

Clinica medicală nr. I din Tg.-Mureș (cond.: prof. P. Dóczy, doctor-docent  
în științe, medic emerit al R.S.R.)

## DOZAREA ACTIVITĂȚII LIPOPROTEIN-LIPAZEI PLASMATICE (Metodă enzimologică perfecționată)

E. Módy

Este cunoscut faptul că la clarificarea plasmei lipemice contribuie atât heparina (*Hahn*, 7), cât și enzima de origine tisulară, denumită lipoprotein-lipază (*Korn*, 8). Aceasta din urmă fiind activată de heparină, scindează grăsimile neutre legate de proteine (*Robinson*, 10). Luînd în considerare însemnătatea tulburărilor metabolismului lipidic în ateroscleroză, urmărirea modificărilor activității lipoprotein-lipazei printr-o metodă corespunzătoare prezintă și o importanță diagnostică (*Moga, Hărăguș*, 9, *Shettler*, 12).

Majoritatea metodelor folosite pînă acum se bazează fie pe determinarea fotometrică a densității optice la un amestec de plasmă și o emulsie de grăsimi (Connor, 2), fie pe determinarea cantitativă a produselor de scindare: a glicerolului (Connor, 3), respectiv a acizilor grași liberi (Dole, 4, 5. Geday, 6). Inconvenientul tuturor metodelor folosite pînă acum constă în întrebuițarea unor emulsii artificiale de lipide (ulei de cocos, ulei de măsline, etc.), cu toate că substratul natural al enzimei se compune de fapt din grăsimile neutre legate de proteine, adică dintr-o fracțiune lipoproteinică nativă și proprie organismului. Sandhofer și colab. (1, 11) au propus folosirea unei emulsii lipido-proteice obținute prin amestecarea uleiului de cocos cu plasmă nativă într-un omogenizator cu turație mare. Dar nici acest procedeu nu poate fi considerat ireproșabil.

Inconvenientul unui substrat artificial se poate înlătura prin folosirea plasmei lipemice umane. Pentru obținerea acesteia din urmă am folosit plasma unui individ sănătos, care a consumat dimineată 50 g unt, recoltîndu-se sîngele oxalatat în perioada lipemiei maxime (după 4 ore). Plasma lipemică obținută se păstrează la frigider, putîndu-se folosi drept substrat natural. Pe baza acestui principiu a fost elaborată metoda noastră pentru determinarea activității lipoprotein-lipazei din plasmă.

#### Reactivii necesari:

1. Oxalat de potasiu 1,85 g %
2. Tris-hidroximetil-aminometan 0,4 M. pH 8,8
3. Hidroxid de sodiu 0,01 N
4. Fenoltaleină, soluție 1 g % în etanol 96
5. Etanol 96°
6. Plasmă lipemică normală.

#### Descrierea metodei:

Într-o eprubetă de centrifugă gradată, de 10 ml, se pipetează 1 ml oxalat de potasiu (sol. 1,85%) și se recoltează asupra lui 9 ml sînge. Se amestecă bine și se pune imediat la centrifugă, timp de 10 minute și cu 3.000 turații pe minut. Plasma se folosește pentru determinarea activității enzimactice *imediat* după recoltare (activitatea lipoprotein-lipazei descrește în urma conservării, chiar și în frigider).

Se iau două eprubete serologice curate. În fiecare se pipetează cite 1 ml plasmă proaspăt recoltată, cite 0,1 ml de tampon tris și cite 0,9 ml plasmă lipemică (ca substrat). Se recomandă păstrarea reactivilor într-o baie de apă la 37° C, cei puțin timp de 30 de minute, înainte de folosirea lor. Se citesc apoi densitățile optice ale amestecurilor astfel obținute, față de apă distilată la fotometru, folosind cuve de 0,5 cm și filtrul S-53. Valorile de extincție se notează. Prima eprubetă se așează într-un stativ la temperatura camerei, cea de-a doua se pune într-o baie de apă la 37° C și se ține acolo timp de 3 ore. Cu 10 minute înainte de sfîrșitul acestei perioade de timp se pune și proba păstrată la temperatura camerei în baia de apă. Apoi se citesc încă o dată valorile de extincție, la fel în comparație cu apă distilată. În urma acțiunii lipoprotein-lipazei densitatea optică a probei ținute la 37° C scade proporțional cu activitatea enzimei (tabelul nr. 1)

Cantitatea acizilor grași eliberați în urma acțiunii lipoprotein-lipazei se determină prin titrare cu NaOH 0,01 N, în mediu cu alcool. În acest scop conținutul fiecărei eprubete se pune prin spălare cantitativă cu un volum de 3 ml de apă bidistilată într-un balon Erlenmayer de 25 ml, se adaugă la fiecare cite 5 ml de etanol 96° și 1—2 picături de fenoltaleină, se amestecă bine și se titrează dintr-o microbiuretă cu soluție de NaOH 0,01 N

Tabelul nr. 1.

Media valorilor de extincție, respectiv a cantității acizilor grași liberi din plasmale obținute de la 20 de persoane în vîrsta între 20—55 ani

Nr. probelor	Valori de extincție		Ac. grași liberi. μecu/ml/oră	
	înainte de incubație	după 3 ore	fără de incubație	după 3 ore
20	0,680	0,609	0,011	1,49
s:	± 0,14	± 0,25	± 0,002	± 1,15
t:	2,178		2,989	
p:	< 5 %		< 1 %	

#### Calcularea rezultatelor:

Din cantitatea de NaOH, consumată la proba ținută în baie de apă, se scade cantitatea consumată de martor (proba ținută la temperatura camerei). Diferența se înmulțește cu 10, apoi se împarte cu 3. Astfel se obține cantitatea de acizi grași liberi (neesterificați: AGNE), exprimată în μecu/ml plasmă și pe oră. Aceste cifre sînt luate drept unități (U) ale activității enzimatice.

*Valori normale:* descreșterea densității optice într-o proporție de peste 5% față de valoarea inițială, respectiv 0,5—8,0 μecu/ml/oră AGNE.

#### Concluzii

Perfecționarea metodei constă în folosirea plasmelor lipemice normale drept substrat în locul unor amestecuri artificiale de lipide. Activitatea lipoprotein-lipazei se determină atît prin urmărirea scăderii densității optice a amestecului, cît și prin dozarea titrimetrică a acizilor grași liberi: μecu/ml/oră. Valori normale: descreșterea densității optice într-o proporție de peste 5% față de valoarea inițială, respectiv 0,5—8,0 unități AGNE.

Sosit la redacție: 5 septembrie 1966.

#### Bibliografie

1. BRAUNSTEINER H., SAILER S., SANDHOFER F.: Wien. kl. Wschr. (1961), 73, 815; 2. CONNOR W. E., ECKSTEIN J. W.: J. Clin. Invest. (1959), 38, 1746; 3. CONNOR W. E., ARMSTRONG M. L.: Circul. (1961), 24, 87; 4. DOLE V. P.: J. Clin. Invest. (1956), 35, 150; 5. DOLE V. P., MEINERTZ H.: J. Biol. Chem. (1960), 235, 2595; 6. GEDAY E.: Acta Med. Scand. (1966), 179, 5; 7. HAHN P. F.: Science. (1943), 98, 19; 8. KORN E. D.: J. biol. Chem. (1955), 215, 1; 9. MOGA A., HĂRĂGUȘ ȘT.: Ateroscleroza. Ed. Acad. R.P.R. 1963; 10. ROBINSON D. S.: Am. J. Clin. Nutr. (1960), 8, 7; 11. SANDHOFER F., SAILER S., BRAUNSTEINER H.: D. Med. Wschr. (1964), 89, 426; 12. SHETTLER G.: Arteriosklerose. G. Thieme, Stuttgart, 1961