

Academia de științe medicale, Centrul de cercetări medicale din Tirgu-Mureș
(cond.: prof. dr. L. Csögör, doctor-docent, medic emerit, membru al
Academiei de științe medicale)

METODĂ MODIFICATĂ PENTRU DETERMINAREA COLESTEROLULUI AORTIC *

Delia Nicoară, dr. Șt. Csögör, dr. M. Kerekes

Arterele și în special aorta constituie un țesut privilegiat din punctul de vedere al acumulării colesterolului. Prin experiența pe animale, în special iepuri și ciini de prerie (5), s-a putut dovedi că țesutul aortic are capacitatea de a stoca colesterolul în cantități foarte mari, pierzându-l apoi foarte greu, spre deosebire de alte țesuturi. Având în vedere importanța pe care o prezintă depunerea colesterolului în aortă în ateroscleroza umană și consecințele ei, determinarea lui prezintă interes, privind urmărirea procesului aterosclerotic.

Există o multitudine de metode pentru determinarea colesterolului din țesuturi, inclusiv peretele aortic (3, 4, 6, 7, 8). La baza tuturor stă extracția colesterolului cu un solvent organic sau cu un amestec de sol-

* Lucrare prezentată la consfătuirea: „Metabolismul lipidic și glucidic. Investigație biochimică și metodologie de laborator”, organizată de U.S.S.M., Filiala Mehedinți, Drobeta-Turnu Severin, 29—30 septembrie 1972.

venți, urmată, în majoritatea cazurilor, de determinarea lui colorimetrică. Extracția poate fi făcută direct pe omogenatul de aortă umed sau uscat, sau indirect, după solubilizarea țesutului prin fierbere cu hidroxid de potasiu. Extracția directă a colesterolului duce la valori scăzute. Cauza acestui neajuns o constituie în primul rând, puternicele legături dintre colesterol și proteinele tisulare. Pe lângă aceasta, procedeele sînt laborioase, necesitînd totodată cantități mari de solvenți organici.

În cursul încălzirii cu hidroxid de potasiu, legăturile dintre proteine și colesterol sînt complet distruse. Procedul poate fi aplicat datorită stabilității extraordinare a colesterolului față de această intervenție drastică. Pe lângă aceasta, mai are avantajul că, în cursul fierberii cu KOH, are loc o hidroliză a esterilor colesterolului. Acest fapt are importanță mai ales dacă se întrebuițează reacția de culoare Liebermann-Burchard, intensitatea acesteia fiind diferită pentru colesterol, respectiv pentru esterii săi. Este deci evident că trebuie acordată prioritate metodei care folosește ca primă fază hidroliza.

Majoritatea metodelor pentru determinarea colesterolului tisular recurg la reacția de culoare Liebermann-Burchard. Numai puține utilizează reacția Zlatkis-Zak, în primul rînd pentru motivul că, pe lângă colesterol, reacția de culoare este produsă și de alți componenți tisulari, cum ar fi compușii cu hidroxil fenolic. (Acest impediment dispăre în cazul unei extracții cloroformice, compușii fenolici nefiind solubili în cloroform.) Avînd în vedere avantajele reacției (execuție simplă, rezultate reproducibile, sensibilitate mare), am încercat să elaborăm o variantă a pregătirii țesutului, respectiv a extracției colesterolului, care să permită obținerea unor rezultate satisfăcătoare și cu reacția Zlatkis-Zak.

Metoda

Aortele, respectiv porțiunile de aortă provenite de la cadavrele umane sau animalele de experiență, s-au spălat cu ser fiziologic. Părțile fără leziuni vizibile cu ochiul s-au separat de plăcile ateromatoase. Aorta s-a tăiat în bucățele mici și s-a uscat la 120° în etuvă, pînă la greutatea constantă. Țesutul uscat s-a triturat, obținîndu-se o pulbere fină, din care s-au cîntărit la balanța analitică eșantioane de 100 mg. Țesutul cîntărit s-a introdus într-o eprubetă, adăugîndu-se 5 ml hidroxid de potasiu 30%. Eprubetele au fost ținute în baie de apă la 100° C, timp de 20 min. După răcire s-au adăugat 5 ml cloroform, efectuîndu-se extracția colesterolului, timp de 20 minute, prin agitare din 2 în 2 minute. Din extractul cloroformic s-au scos apoi 0,1 ml, executîndu-se reacția Zlatkis-Zak (11). Extincțiile au fost citite la un spectrofotometru Spectromom 202, la 560 nm, în cuvă de 1 cm, față de apă. Cantitatea colesterolului s-a calculat cu ajutorul unei curbe etalon corespunzătoare.

Pentru a obține date referitoare la exactitatea metodei, am efectuat determinarea colesterolului din aceleași aorte și cu o metodă de extracție directă (6). În cazul acesta țesutul aortic uscat și triturat s-a extras cu un amestec cloroform-metanol 2:1 (3 ml) la 50° C, pe baie de apă, timp de o oră. După filtrare, 0,1 ml extract s-a evaporat la sec, reziduul s-a reluat cu 3 ml acid acetic glacial distilat, executîndu-se apoi reacția Zlatkis-Zak.

Rezultate

Cantitățile de colesterol obținute după macerarea prealabilă cu KOH, au fost mai mari decât cele obținute cu extracția directă. O comparație absolut precisă este desigur dificilă, avînd în vedere că nu poate fi asigurată identitatea eșantioanelor prelucrate. În tabelul I sînt prezentate cîteva rezultate obținute cu cele două metode.

Tabelul nr. 1

Cantitatea colesterolului din aortele cu leziuni aterosclerotice

Aortă nr.	g colesterol/100 g țesut uscat		Diferența
	Metoda studiată	Metoda de comparație	
1.	6,04	4,52	1,52
2.	4,45	2,52	1,93
3.	4,10	2,81	1,29
4.	7,39	5,48	1,91
5.	3,11	2,53	0,58

S-a determinat colesterolul din 86 de aorte, respectiv din porțiuni de aortă. Gradul leziunilor ateromatoase l-am apreciat după clasificarea propusă de O.M.S. În tabelul II prezentăm mediile valorilor obținute.

Tabelul nr. 2

Cantitatea de colesterol din peretele aortic

Numărul de cazuri	Gradul leziunilor ateromatoase	g colesterol/100 g țesut uscat (limite)
5	Aorte normale	0,336— 0,820
25	Porțiuni de aortă aparent sănătoase (de la subiecți cu ateroscleroză)	0,685— 1,520
22	Strii și plăci ateromatoase	1,350— 3,117
20	Plăci fibroase	2,760— 7,650
14	Plăci fibroase cu complicații	6,800—17,660

Rezultatele corespund cantitativ datelor din literatură (9). În același timp, în concordanță cu majoritatea autorilor (1, 2, 9), am constatat și un paralelism între gradul leziunii și cantitatea de colesterol. Totuși, trebuie semnalat faptul că există autori care nu confirmă corelația între severitatea leziunilor aterosclerotice și procentajul colesterolului total din peretele aortic (10). O acumulare exagerată se constată desigur în plăcile ateromatoase.

Pe baza datelor prezentate, credem că metoda descrisă poate servi pentru determinarea colesterolului din peretele aortic cu o exactitate corespunzătoare, macerarea cu KOH permițind o extracție mai completă a colesterolului, decât extracția directă cu solvenți organici.

Sosit la redacție: 28 februarie 1973.

Bibliografie

1. Harland W. A., Gilbert J. D., Steel G., Brooks C. J. W.: *Atherosclerosis* (1971), 13, 239;
 2. Insull W. Jr.: *Circulation* (1964), 30, 16;
 3. Jacotot B., Beaumont J. L.: *Path. Biol.* (1966), 14, 733;
 4. Kabara J. J., in Glick D.: *Methods of biochemical analysis*. Interscience publishers, New York, (1966), 10, 263;
 5. Khan B., Cox G. E., Asdal K.: *Arch. Pathol.* (1963), 76, 369;
 6. Maurizi C. P., Alvarez C., Fischer G. C., Taylor C. B.: *Arch. Pathol.* (1968), 86, 644;
 7. Mizuguchi T.: *Jap. Heart Journ.* (1968), 9, 34;
 8. Nieminen E.: *Ann. Acad. Sci. Fenn. Med.* (1965), 118, 1;
 9. Schettler F. G.: *Atherosclerosis*. Elsevier, Amsterdam, (1969), 145;
 10. Smith E. B.: *J. Atheroscler. Res.* (1965), 5, 224;
 11. Zlatkis A., Zak B., Boyle A. J.: *J. Lab. Clin. Med.* (1953), 41, 486.
-