

Ministerul Educației Cercetării și Tineretului
Universitatea POLITEHNICA Timișoara
Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului
Catedra Inginerie Chimică

Ing. RIVIȘ ADRIAN

TEZĂ DE DOCTORAT

CONTRIBUȚII LA OPTIMIZAREA ȘI
ÎMBUNĂTĂȚIREA PERFORMANȚELOR
METODOLOGIILOR DE INVESTIGARE A
HIPERLIPOPROTEINEMIILOR

LIBRĂRII
UNIVERSITĂȚII

641. 502
369

Conducător științific

Prof. Dr. Ing. DELIA PERJU

- 2004 -

Cuprins

Introducere	4
Obiectivele lucrării	7
Capitolul 1	
Lipoproteine: Structură, clasificare și metabolism	8
1.1. Structura lipoproteinelor	9
1.2. Clasificarea lipoproteinelor	10
1.3. Producția și metabolismul lipoproteinelor	13
1.3.1. Formarea și metabolismul chilomicronilor	15
1.3.2. Metabolismul LDL	16
1.3.3. Metabolismul HDL	20
1.4. Lipoproteina (a)	21
1.4.1. Structura lipoproteinei (a)	22
1.4.2. Sinteza și metabolismul apo (a)	24
1.4.3. Controlul sintezei apo (a)	25
1.4.4. Influența factorilor de mediu și hormonală asupra concentrației lipoproteinei (a)	26
1.4.5. Alte acțiuni ale lipoproteinei (a)	28
1.4.6. Abordarea terapeutică	29
Capitolul 2	
Metode și metodologii de măsurare a concentrației lipoproteinelor în sânge	31
2.1. Determinarea lipoproteinelor în sânge	31
2.1.1. Observarea plasmei – testul chilomicronilor	32
2.2. Metode electroforetice	33
2.2.1. Lipidograma clasică	34
2.2.2. Lipidograma în tampon albuminos	36
2.2.3. Lipidograma în geloză	37
2.2.4. Lipidograma pe acetat de celuloză	37
2.2.5. Lipidograma în amidon	38
2.2.6. Lipidograma în gel de poliacrilamid	38
2.2.7. Lipidograma în agaroză	39
2.2.8. Mobilitatea electroforetică a lipoproteinelor în diferite medii	41
2.2.9. Aspect electroforetic particular al modelelor lipoproteice	44
2.2.10. Evaluarea lipoproteinelor obținute prin electroforeză	46

2.3. Metode ultracentrifugare	51
2.3.1. Prepararea fracțiunilor de lipoproteine totale	51
2.3.2. Ultracentrifugarea secvențială sau separatoare	53
2.3.3. Ultracentrifugarea analitică	55
2.3.4. Ultracentrifugarea zonală	57
2.4. Alte metode	59
2.4.1. Metode nefelometrice	59
2.4.2. Metode imunochimice LP-X	63
2.4.3. Metode de precipitare	65
2.4.4. Electrocromatografia	66
2.4.5. Combinarea metodelor	68

Capitolul 3

Optimizarea proceselor (sistemelor) și rolul acesteia în creșterea performanțelor	70
3.1. Considerații generale	70
3.2. Prelucrarea datelor experimentale	76
3.2.1. Cercetarea experimentală	76
3.2.2. Modelarea matematică a sistemelor fizice	79
3.2.3. Algoritmii cercetării experimentale	80
3.2.4. Metode statistice în cercetarea experimentală	80
3.2.4.1. Analiza dispersională	81
3.2.4.2. Analiza regresională	81
3.2.5. Strategii de experimentare	88
3.2.6. Modele empirice regresionale	90
3.2.7. Experimentul factorial	92
3.2.7.1. Decizii anterioare planificării experimentului	92
3.2.7.2. Construcția matricii – program a experimentării	93
3.2.7.3. Determinarea modelului matematic al experimentului	94
3.2.7.4. Experimente factoriale fracționare	95
3.2.7.5. Calculul și analiza statistică a modelului matematic empiric	95
3.2.7.6. Decizii în urma modelării liniare prin experiment factorial	98

Capitolul 4

Precizarea metodelor de investigare, a parametrilor măsurați.	
Aparatura utilizată și determinări experimentale	101
4.1. Prezentarea generală a metodelor de investigare	101
4.2. Prezentarea parametrilor măsurați	102
4.3. Prezentarea metodelor de investigare utilizate	105
4.3.1. Determinarea prin test enzimatic colorimetric a colesterolului	105
4.3.2. Determinarea prin precipitare a HDL colesterol	107
4.3.3. Determinarea prin test enzimatic colorimetric a HDL colesterol	109

4.3.4. Determinarea prin precipitare a LDL colesterol	111
4.3.5. Determinarea cantitativă apolipoproteinelor A (apo A) și B (apo B)	112
4.4. Prezentarea aparaturii utilizate	122
4.5. Determinări experimentale	128
Capitolul 5	
Prelucrarea matematică a determinărilor experimentale. Elaborarea modelelor statistice și compararea acestora cu modelele teoretice	135
5.1. Metode de prelucrare statistică (analiza de regresie)	135
5.2. Prelucrarea statistică a datelor experimentale	136
Capitolul 6	
Relații de interdependență dintre componentele determinante	164
Capitolul 7	
Testarea performanțelor modelelor matematice statistice obținute	244
7.1. Modele matematice statistice experimentale	245
7.2. Modul de operare în vederea testării	251
7.3. Calcule matematice efectuate în vederea testării	252
Capitolul 8	
Concluzii și contribuții originale	256
8.1. Concluzii generale	256
8.2. Contribuții personale	262
Bibliografie	266

INTRODUCERE

Principiile și legile teoriei sistemelor, au revoluționat cu adevărat abordarea științifică a unor fenomene în toate domeniile vieții pe pământ.

Însăși definirea unui sistem *ca o mulțime de entități componente, caracterizate de proprietăți individuale specifice, aflate în relații de dependență și care sunt cuplate împreună într-un anumit mod, pentru a conferi ansamblului un scop bine precizat*, și elaborarea celor două legi de bază după care funcționează acestea (după abatere și după perturbație) au făcut posibilă înțelegerea unor fenomene nu numai în tehnică ci și în natură, filosofie, economie, medicină, etc. [23].

Pe măsură ce această știință s-a dezvoltat, noțiunea de sistem ca un tot unitar este utilizată în toate științele atât în vederea înțelegerii unor fenomene cât și pentru îmbunătățirea calității unor cercetări în diferite domenii, inclusiv cel medical.

În teoria sistemelor, obiectivul analizei este definirea cât mai precisă a comportării unui sistem cu o structură dată printr-o descompunere convenabilă în subsisteme. Atât sistemul cât și subsistemele componente pot fi definite prin relații matematice (simple sau complexe) care constituie modele matematice [23,84].

Pentru ca relația specifică să fie determinată, permițând obținerea variabilelor de ieșire din cele de intrare, este necesar ca unui număr de variabile denumite convențional **variabile de decizie**, să li se atribuie valori pentru a ieși din nedeterminare.

Din familia de **decizii obiective** se detașază ușor **decizia optimă**, cea mai bună decizie dintr-un anumit punct de vedere.

Astfel se ajunge la formularea unei probleme de optimizare care trebuie rezolvată cât mai corect.

Cea mai bună decizie sau cea mai bună soluție dintr-un anumit punct de vedere este definit "**criteriu de optimizare**" [83,85].

Pentru rezolvarea problemei de optimizare este necesar să se transpună criteriul de optimizare într-o expresie matematică denumită în mod frecvent **funcție obiectiv** sau **funcție scop** și să se descrie cantitativ interacțiunile și restricțiile variabilelor problemei într-un model matematic.

Soluția optimă va fi găsită prin folosirea unei metode corespunzătoare de căutare a optimului [86, 111].

Indiferent de calea particulară aleasă, drumul către soluția optimă implică obligatoriu parcurgerea a trei etape:

1. elaborarea modelului matematic al fenomenului;
2. construirea funcției obiectiv;
3. căutarea optimului cu o metodă potrivită.

Ateroscleroza reprezintă una din cauzele principale de morbiditate și mortalitate în populația generală și mai ales în cea diabetică.

Înțelegerea procesului de ateroscleroză se bazează pe cunoașterea amănunțită a structurii și metabolismului lipoproteinelor, întrucât anomaliile lipoproteinelor plasmatică, generează și întrețin procesul aterogen.

Fenomenele de formare și de multiplicare a lipoproteinelor sunt complexe motiv pentru care și studiul acestora este dificil.

De-a lungul timpului, metodele de investigare a hiperlipoproteinemiilor (dislipidemii) implementate prin intermediul unor sisteme de măsurare, au fost în continuu îmbunătățite, astfel că la ora actuală se pare că rezultatele sunt promițătoare [30].

Aceste sisteme de măsurare se pot încadra în categoria de "sistem" și ca atare pot fi studiate și prin prisma principiilor sistemelor, fapt ce permite și abordarea lor utilizând operația de optimizare.

Ca atare se pot lua în considerare la utilizarea metodelor de investigare, două funcții obiectiv care trebuie minimizate: riscul de morbiditate și costul tratamentelor medicamentoase.

Minimizarea acestor funcții obiectiv se poate realiza numai în condițiile în care metodele de investigare (sistemele de măsurare a conținutului de lipoproteine în sânge) sunt performante, sigure și dau rezultate cât mai precise.

Lucrarea de față este axată tocmai pe această direcție de cercetare: optimizarea și îmbunătățirea performanțelor metodelor și metodologiilor de investigare a hiperlipoproteinemiilor. Abordarea studiilor științifice s-a efectuat prin prisma teoriei sistemelor, ceea ce demonstrează încă o dată că și medicina are nevoie de această știință miraculoasă.

Desigur, în paralel cu progresele legate de investigare s-a dezvoltat și diversificat și producția de medicamente ele putând fi utilizate la diminuarea dislipidemiilor și în acest fel scăderea pericolelor aferente.

La modul general abordarea sistemică se bazează pe determinarea unor modele matematice statistice, care pot descrie cu o aproximație bună, anumite dependențe importante.

Elaborarea unui model matematic statistic (tip "cutie neagră") implică efectuarea unor măsurători cu scopul acumulării unor date experimentale suficiente pentru obținerea unui model utilizabil și veridic.

Datorită acestei limitări, un model matematic statistic nu poate fi obținut în situația în care nu pot fi efectuate măsurători în sistemul pe care dorim să-l modelăm [77].

În general se apelează la modele statistice în două situații:

1. când fenomenul este insuficient de bine cunoscut (nu se poate obține un model analitic)
2. când fenomenul este foarte complex

Modelele statistice, bazate pe date experimentale pot reda la fel de bine fenomenul ca și unul analitic, dar spre deosebire de acesta, pot fi mult mai simple.

Un model matematic statistic se compune dintr-un număr de ecuații egal cu numărul de variabile dependente existente.

Fiecare dintre ecuații trebuie să exprime dependența observată (pe baza datelor obținute din informațiile experimentale efectuate în sistemul ce se modelează) funcție de variabilele independente [21].

Lucrarea străbate mai multe domenii ale științelor, având un caracter interdisciplinar cum ar fi:

- biochimie;
- chimie analitică;
- chimie fizică;
- statistică;
- matematică (metode de calcul, ecuații de regresie)
- informatică (soft-uri Origin Lab 7.0, Statistica 6.0)
- optimizare.

Luând în considerare conținutul și modul de tratare al obiectivelor stabilite, prelucrării datelor experimentale, lucrarea de față încearcă să abordeze tema propusă atât din punct de vedere al analizelor biochimice, al teoriei sistemelor precum și din punctul de vedere al ingineriei chimice.

OBIECTIVELE LUCRĂRII

Principalele obiective ale lucrării sunt următoarele:

- 1. Realizarea unei documentări bibliografice referitoare la lipoproteine (structura și clasificarea acestora) precum și la metodele și metodologia de măsurare a concentrației lipoproteinelor în sânge cu specificarea principalilor componenți ale căror concentrații trebuie determinate.**
- 2. Documentare referitoare la optimizarea sistemelor și utilizarea acestora la obținerea unor performanțe mai bune la metodele de investigare.**
- 3. Alegerea metodei de măsurare și a metodologiei utilizate în cadrul părții experimentale, precum și a parametrilor, care prin valorile lor redau cel mai corect conținutul de lipoproteine din sânge.**
- 4. Prezentarea sistemului de măsurare ales, precizarea și justificarea necesității măsurării parametrilor.**
- 5. Precizarea condițiilor în care se efectuează măsurătorile și rezultatele experimentale obținute.**
- 6. Prelucrarea matematică a rezultatelor experimentale, determinarea ecuațiilor modelelor matematice statistice și compararea acestora cu modele teoretice.**
- 7. Determinarea relațiilor de interdependență dintre componentele determinante: colesterol – apo A – apo B. Modele matematice statistice.**
- 8. Testarea performanțelor modelelor matematice statistice obținute.**
- 9. Concluzii și contribuții originale.**

CAPITOLUL 1

LIPOPROTEINE: STRUCTURĂ, CLASIFICARE ȘI METABOLISM

Ateroscleroza reprezintă una din cauzele principale de morbiditate și mortalitate în populația generală și, mai ales, în cea diabetică. Înțelegerea acestui proces complex se bazează pe cunoașterea amănunțită a structurii și metabolismului lipoproteinelor, întrucât anomaliile lipoproteinelor plasmatică generează și întrețin procesul aterogen. Într-o măsură importantă, proprietățile aterogene ale lipoproteinelor corelează cu concentrația plasmatică a colesterolului, componenta lipidică majoră a plăcii de aterom. Pe măsură ce cunoștințele despre fiziopatologia aterogenezei se înmulțesc, devine însă din ce în ce mai evident faptul că lipoproteinele joacă un rol mult mai complex și subtil, prin interacțiunile dintre ele, ca și prin interacțiunea cu alte componente ale peretelui vascular (fig. 1.1).

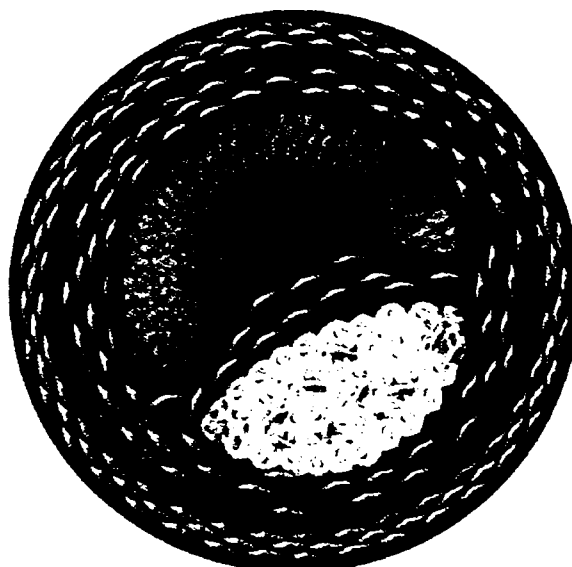


Fig.1.1. Ateroscleroza

Înainte de 1940, singurele cunoștințe despre metabolismul lipidic erau acelea, că lipidele circulă în plasmă legate de proteine nespecifice, necesitate

dictată de caracteristicile lor fizice și chimice. Odată cu introducerea procedurilor de ultracentrifugare, a devenit posibilă izolarea și clasificarea lipoproteinelor, ceea ce a permis ulterior înțelegerea structurii complexe a claselor majore, genetica sintezei acestora, precum și activitatea și mecanismele de reglare ale enzimelor implicate în metabolismul lipoproteinelor.

1.1. Structura lipoproteinelor

Fiind insolubile în apă, lipidele nu pot circula în plasmă ca atare. Lipoproteinele sunt complexe macromoleculare care conțin, pe lângă lipide, proteine denumite apolipoproteine sau apoproteine. Aceste microemulsii transportă colesterolul și trigliceridele în plasma. [93] Structura tuturor este similară: o particulă sferică conținând un nucleu central de lipide nepolare (hidrofobe), în principal trigliceride și esteri de colesterol, și un înveliș format dintr-un singur strat de fosfolipide, colesterol liber și apoproteine (figura 1.2).

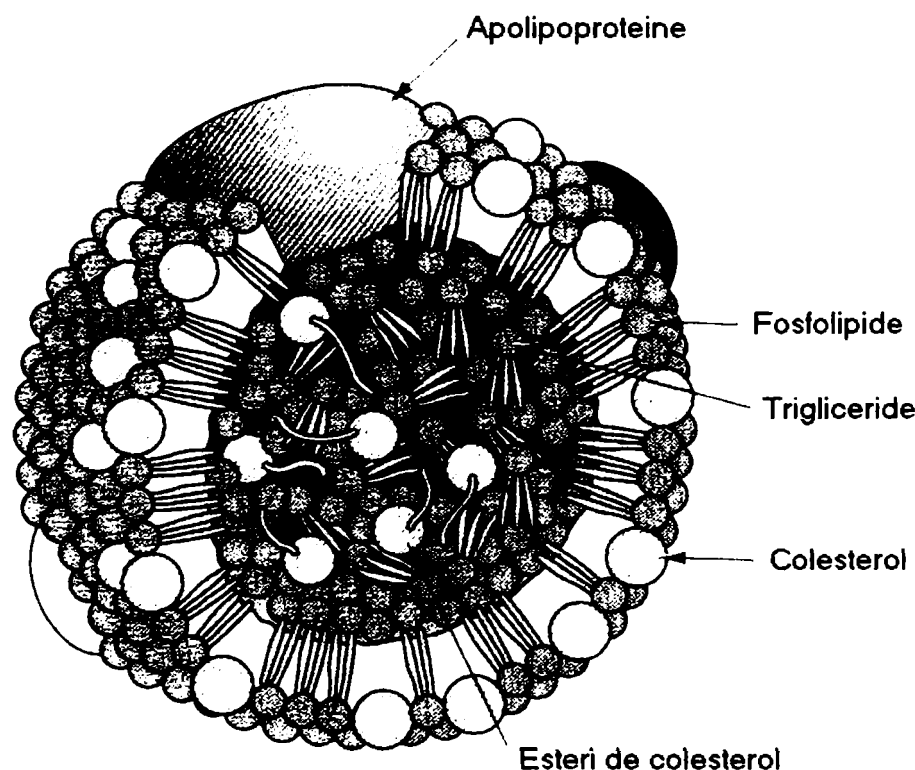


Figura 1.2. Structura generală a unei lipoproteine

Nucleul central al lipidelor nepolare (în principal trigliceride și esteri de colesterol) este înconjurat de un înveliș format dintr-un singur strat de fosfolipide în care sunt inserate colesterol liber și apoproteine. Orientarea componentelor de suprafață este asemănătoare cu cea a foii externe a membranei plasmatică, cu componentele polare spre exterior și cu lanțurile nepolare ale acizilor grași și porțiunea hidrofobă a proteinelor spre nucleul lipidic nepolar [15].

1.2. Clasificarea lipoproteinelor

Lipoproteinele sunt clasificate pe baza densității la care se separă, în cursul ultracentrifugării (vechile denumiri corespund mobilității electroforetice) (tabelul 1.1) [41].

- *Chilomicronii* sunt, în esență, particulele care transportă trigliceridele sintetizate în intestin, după digestia grăsimilor exogene [53]. Apoproteina principală este apo B-48, produsă numai la nivel intestinal. Chilomicronii mai pot conține și apo A-I, apo C și apo E.

- *VLDL (Very low density lipoproteins)* sunt, de asemenea, particule purtătoare de trigliceride. VLDL sunt secretate de către ficat și transportă trigliceridele de producție endogenă [53]. Particulele VLDL sunt subclasificate pe baza vitezei lor de flotație (exprimată în unități Svedberg, Sf). Apoproteina principală este B-100. VLDL mai conțin, în cantități reduse, apo E, apo C-I, apo C-II și apo C-III. VLDL mai pot fi subdivizate și în particule care conțin sau nu apo E [117].

- *IDL (Intermediate density lipoproteins)* reprezintă "resturile", sau remnanții metabolismului lipoproteinelor bogate în trigliceride, generați în cursul conversiei VLDL la LDL [53]. Apo B-100 este apoproteina majoră în IDL; ele mai conțin și apo C și E, dar în proporții și mai reduse decât VLDL. IDL este încă o clasă puțin înțeleasă.

- *LDL (Low density lipoproteins)* este principala lipoproteină în care este transportat colesterolul, și cea care corelează cel mai puternic cu riscul coronarian. Apo B-100, practic unica apoproteină din structura LDL, reprezintă o clasă heterogenă de particule care pot fi separate, fie prin ultracentrifugare, fie prin electroforeză în gradient, în cel puțin șapte subfracții, având o densitate și un raport lipide/apoproteine diferite.

- *Lipoproteina (a) [Lp(a)]* este o subclasă LDL formată din LDL legat de o glicoproteină de dimensiuni mari, similară plasminogenului. Acest complex a fost și el asociat cu ateroscleroza [101].

- *HDL (High density lipoproteins)* are origine hepatică și intestinală, și este cea mai mică, dar și cea mai densă lipoproteină. Deși HDL transportă cantități mari de colesterol, relația sa cu cardiopatia ischemică este negativă. HDL este divizată în mai multe subfracții, pe baza densității sale; cele mai comune sunt HDL2 (densitate cuprinsă între 1,063 și 1,125) și HDL3 (densitate 1,125 – 1,210). Apoproteinele majore din structura HDL sunt apo A-I și apo A-II; HDL conține și apoproteine C, apo A-IV și apo E. Și HDL poate fi subdivizat în funcție de structura sa în particule ce conțin numai apo A-I (Lp A-I), particule ce conțin apo A-I și apo A-II (Lp A-I/A-II) și, într-o măsură mai mică, apo C sau E.

Tabelul 1.1 - Clasele principale de lipoproteine

Clasa	Dimensiuni (Å)	Densitate	Mobilitate electroforetică	Apoproteine majore
Chilomicroni	1000-4000	<0,1	Origine	B-48, C-II, C-III, E, A-I
VLDL	400-700	<1,0006	Pre-β	B-100, C-II, C-III, E
IDL	300-400	1,006-1,019	Pre-β	B-100, C-II, C-III, E
LDL	225-275	1,019-1,063	β	B-100
Lp(a)	300-400	1,040-1,063	β	apo(A)
HDL	75-100	1,063-1,210	α	A-I, A-II, C-II, C-III, E

Clasificarea clinica si etiologica a dislipidemiilor

Cele dintâi observații referitoare la asocierea dintre xantoame și anumite procese patologice, unele de natură familială, datează de aproape 170 de ani. Deși, la acea dată, fiziopatologia dislipidemiilor nu era cunoscută, reprezintă prima descriere clinică a sindroamelor dislipidemice. Cea mai mare parte a progresului înregistrat în înțelegerea fiziopatologiei acestor condiții s-a petrecut în ultimii 50 de ani, grație metodelor moderne de laborator și aplicării lor în medicina clinică [11]. Atenția deosebită care li se acordă, în special în ultimul deceniu, se datorează documentării unei relații de tip cauză-efect între dislipidemie și procesul aterogen.

Clasificarea clinică a dislipidemiilor

Debutul lipidologiei a avut loc în 1967 când Fredrickson [38], Levy și Lees [63,64] (citați de [37]) au prezentat, în premieră, clasificarea hiperlipoproteinemiilor. Pe baza electroforezei pe hârtie și a ultracentrifugării preparative ei au descris cinci fenotipuri, revizuite ulterior de OMS prin introducerea celui de-al șaselea (tabelul 1.2).

Această clasificare cu scop diagnostic și terapeutic se bazează pe demonstrarea creșterii nivelelor plasmaticice ale unor lipoproteine, deci pe diagnosticarea unor hiperlipoproteinemii (HLP), care se manifestă clinic și/sau biologic (fenotipic) prin creșterea concentrației uneia sau mai multor fracțiuni lipidice [39].

Tabel 1.2. Clasificarea OMS a hiperlipoproteinemiilor

Tip	Colesterol	LDLc	TG	LP
I	↑	N	↑	chilomicroni în exces
II _a	↑	↑	N	LDL în exces
II _b	↑	↑	↑	LDL și VLDL în exces
III	↑	↓sau N	↑	remnanți de chilomicroni și IDL în exces
IV	↑sau N	N	↑	VLDL în exces
V	↑	N	↑	chilomicroni și VLDL în exces

TG - trigliceride; Lp - lipoproteine.

Acest tip de abordare este util întrucât subliniază rolul fiziopatologic al lipoproteinelor în geneza hiperlipidemiilor, accentuând faptul că metabolismul lipoproteinelor este acela care controlează concentrațiile lipidelor plasmatică, și că există lipoproteine specifice care modulează procesul aterogen.

Clasificarea, în esență o sistematizare fenotipică (tipizare), nu este exhaustivă, și nici măcar completă, dar are o deosebită valoare practică. Ea nu presupune, de pildă, precizarea etiologiei acestor hiperlipoproteinemii, ci doar identificarea lipoproteinelor a căror concentrație plasmatică depășește valorile normale. Fiecare fenotip poate reprezenta, din punct de vedere etiologic, o formă primară, de cauza genetică, sau una secundară, în care fenotipul respectiv face parte din tabloul clinic al bolii de bază [106].

Unele din tipuri pot fi cauzate de boli genetice diferite, precum și invers, anumite anomalii genetice se pot exprima prin fenotipuri diverse. În plus, există situații care nu sunt incluse în clasificarea OMS, întrucât nu corespund definiției hiperlipoproteinemiilor, deși sunt caracterizate prin anomalii ale metabolismului unor lipoproteine. Este vorba, în primul rând, despre scăderea izolată a nivelului HDLc (hipoalfalipoproteinemia), și în al doilea rând, de creșterea concentrației plasmatică a LDL-apo B (hiperapobetalipoproteinemia), în condițiile unor valori normale ale LDL, caracterizată printr-un număr mare de particule LDL mici și dense, sărace în colesterol, dar extrem de aterogene (LDL_{III} sau LDL patern B). Există, de asemenea, alterări ale compoziției unor lipoproteine, care nu se traduc prin creșterea sau scăderea concentrațiilor plasmatică, dar care s-au dovedit a fi asociate procesului aterogen. Din aceste motive, spre a ne referi la totalitatea modificărilor cantitative și calitative ale lipoproteinelor plasmatică, este recomandabilă folosirea denumirii de **dislipidemii** (“**lipid abnormalities**”), în locul aceleia de hiperlipoproteinemii. Așadar, ambele denumiri sunt corecte, reflectă anomalii diferite, dislipidemiile fiind o categorie mai amplă, care o include pe aceea de hiperlipoproteinemii [73, 74].

În scop terapeutic, clasificarea clinică a dislipidemiilor nu impune și precizarea etiologiei acestora, deși, un diagnostic precis poate fi astăzi util pentru consultul și sfatul genetic și va fi obligatoriu în viitor, atunci când terapia genetică va deveni posibilă. O clasificare clinică simplă și practică împarte hiperlipidemiile în *hipercolesterolemii* (izolate), atunci când creșterea colesterolului plasmatic depășește pe cea a trigliceridelor, în *hipertrigliceridemii* (izolate sau “pure”), când creșterea valorii trigliceridelor este superioară celei înregistrate de colesterol, iar dacă colesterolul și trigliceridele sunt elevate în proporție aproximativ egală, este vorba despre o *hiperlipidemie mixtă* (tabelul 1.3)

Tabelul 1.3. - Clasificarea hiperlipoproteinemiilor

Primare (genetice)	Fenotip (OMS)	Secundare
PRIMARE a. Hipercolesterolemia familială b. Defectul familial al apo B ₁₀₀ c. Hipercolesterolemia poligenică d. Hiperalfalipoproteinemia	Hipercolesterolemii Ha (C/TG ≥ 2.5)	Hipotiroidism
PRIMARE a. Deficitul familial al LPL b. Deficitul familial al apo C _{II} c. Deficitul familial al HTGL d. Hipertrigliceridemia familială	Hipertrigliceridemii (TG/C ≥ 2.5) I,V I,V I,V IV,V	Lupus eritematos; Diabet zaharat; Insuficiență renală cronică; Alcool;
PRIMARE a. Disbetalipoproteinemia b. Hiperlipidemia familială combinată c. Hiperapobetalipoproteinemia	Hiperlipidemii mixte (C/TG sau TG/C < 2.5) III IIb II b	Hipotiroidism; Diabet zaharat; Obezitate; Sindrom nefrotic

TG - trigliceride; C - colesterol

1.3. Producția și metabolismul lipoproteinelor

Producția și metabolismul lipoproteinelor sunt controlate într-o măsură importantă de către porțiunea apoproteică a complexului (tabelul 1.4). Toate aceste proteine au fost descrise, iar genele care le codifică sinteza au fost localizate [17]. Din cele patru categorii principale de apoproteine, apo B au greutatea moleculară cea mai mare. La specia umană, apo B-48 este produsă exclusiv de către intestin și prezentă numai pe suprafața chilomicronilor; apo B-100 este sintetizată în ficat și este componenta proteică majoră a VLDL și IDL, și, practic, unică, a LDL. Apoproteinele C și E sunt sintetizate în ficat; în circulație, ele se găsesc în compoziția chilomicronilor, VLDL, LDL și HDL. Au fost identificate trei forme majore de apo E, codificate de către alelele $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ și $\epsilon 4$. Deși ele diferă doar prin unul sau doi aminoacizi, această diferență influențează în mod semnificativ procesul de recunoaștere al apoproteinei E de către receptori. Întrucât fiecare persoană moștenește două alele ale apo E, sunt posibile șase fenotipuri majore. Frecvența relativă a E3/E3, cel mai întâlnit fenotip, este de aproximativ 60% și cea a E2/E2, cel mai rar fenotip, este de aproximativ 1%.

Tabelul 1.4. - Apoproteinele și rolul lor

Apoproteina	Greutate moleculară	Lipoproteina	Funcție
A-I	28.000	Chilomicroni, HDL	Efluxul colesterolului celular Activarea ACAT
A-II	17.000	HDL	Efluxul colesterolului celular
A-IV	46.000	HDL	Neclar
B-100	550.000	VLDL, IDL, LDL	Legarea de receptorul B/E
B-48	264.000	Chilomicroni	Legarea de LRP
C-I	5800	VLDL, IDL, HDL	Neclar
C-II	9100	VLDL, IDL, HDL	Activarea LPL
C-III	8750	VLDL, IDL, HDL	Inhibarea LPL
E	35.000	VLDL, IDL, HDL	Legarea de receptorul B/E și de receptorul hepatic LRP
(a)	200.000-5000.000	Lp(a)	Interferează cu fibrinoliza

Majoritatea apoproteinelor sunt hidrofobe și servesc drept liganzi pentru receptorii specifici implicați în metabolismul diferitelor lipoproteine, sau drept cofactori ai unor enzime cu același rol. Numeroase enzime joacă un rol important în transportul lipoproteinelor plasmatic (tabelul 1.5). Acestea includ lipoproteinlipaza (LPL) și lipaza hepatică, care catalizează procesul de hidroliză al trigliceridelor din compoziția lipoproteinelor bogate în trigliceride ("delipidarea" acestora); lecitin-colesterol-acil-transferaza (LCAT), care reglează, practic, întreg procesul de esterificare al colesterolului din compoziția lipoproteinelor; colesterol-ester-transfer-protein (proteina de transfer a esterilor de colesterol CETP), care facilitează transferul colesterolului și al esterilor de colesterol între diferite lipoproteine în cursul metabolismului; și acil-coenzima A-aciltransferaza (ACAT), care esterifică colesterolul celular.

Tabelul 1.5 - Enzimele majore implicate în metabolismul lipoproteinelor

Nume	Funcție
Lipoprotein lipaza (LPL)	Hidroliza trigliceridelor din compoziția chilomicronilor și a VLDL
Lipaza Hepatică	Hidroliza trigliceridelor din VLDL. Hidroliza fosfolipidelor din HDL
Lecitin colesterol aciltransferaza (LCAT)	Esterificarea colesterolului plasmatic asociată cu HDL
Colesterol ester transfer protein (CETP)	Transferul esterilor de colesterol și al trigliceridelor între lipoproteine
Acil-coenzima A colesterol aciltransferaza (ACAT)	Esterificarea colesterolului celular

1.3.1. Formarea și metabolismul chilomicronilor

Chilomicronii transportă trigliceride alimentare și colesterol, de la nivelul intestinului spre ficat. (figura 1.3). Trigliceridele sunt hidrolizate în intestin la acizi grași liberi. Se formează, la acest nivel, micelii care conțin acizii grași rezultați și monogliceride, lecitină, liolecitină, acizi biliari. Din aceste micelii, lipidele pătrund în celulele mucoasei intestinale unde acizii grași sunt reesterificați. Trigliceridele formate sunt asamblate cu colesterolul absorbit, cu apo B-48 și apo A-I, formând chilomicronii. După secreția de către enterocite, aceștia intră în circulația limfatică și apoi în cea sanguină, unde primesc apoproteine C și E prin transfer de pe suprafața HDL. Pe măsură ce chilomicronii pătrund în plasmă, trigliceridele sunt rapid hidrolizate de către LPL, enzimă situată pe suprafața capilarelor celulelor endoteliale. LPL este sintetizată în special în țesutul adipos și în mușchiul striat. Este apoi secretată și transportată pe suprafața celulelor endoteliale, proces favorizat de heparină, și își exercită efectul asupra particulelor bogate în trigliceride. Acțiunea sa necesită prezența apo C-II în "învelișul" lipoproteinelor, în timp ce apo C-III inhibă LPL. Prezența enzimei în țesutul adipos pare a fi indusă de către insulină [29].

În urma interacțiunii chilomicronilor sau a altor lipoproteine bogate în trigliceride cu LPL, sunt eliberați acizi grași care circulă în plasmă legați de albumină, spre a satisface necesitățile energetice ale mușchiului și ale altor celule periferice. Excesul de acizi grași este stocat, îndeosebi în țesutul adipos, prin resinteza trigliceridelor. O parte din acizii grași rezultați din hidroliză poate fi preluată și de către ficat, spre a fi utilizată ca sursă de energie, sau pentru resinteza trigliceridelor.

Pe măsură ce nucleul de trigliceride din compoziția chilomicronilor este hidrolizat, fosfolipidele și apoproteinele A și C de pe suprafață sunt transferate spre HDL. Particula reziduală, care a pierdut aproximativ 80-90% din conținutul său în trigliceride și este acum relativ îmbogățită în colesterol, reprezintă ceea ce se numește un remnant sau un rest de chilomicron. Se presupune că, pe măsura formării lor, acești remnanți se îmbogățesc în apo E, care apoi le facilitează recunoașterea de către un receptor hepatocitar denumit LDL- receptor related protein (LRP), [54].

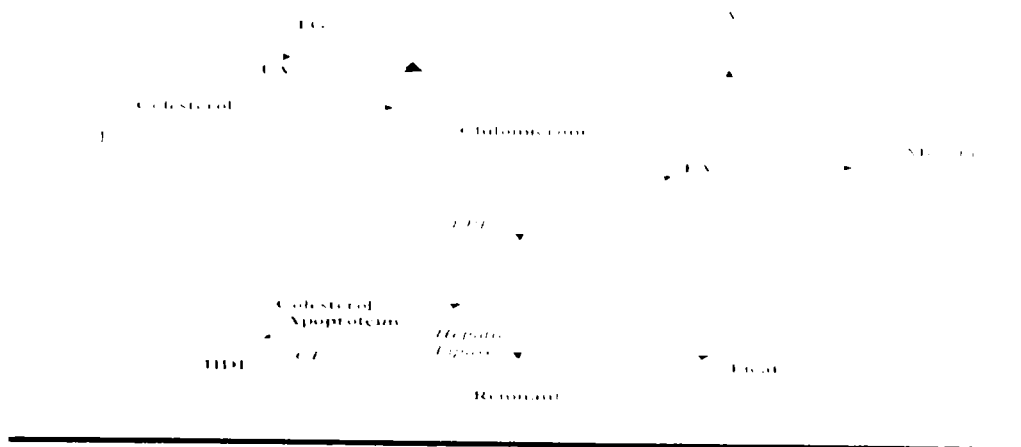


Figura 1.3. Metabolismul chilomicronilor

TG - trigliceride; FA - acizi grași (fatty acids); LPL - lipoprotein lipaza; CE - ester de colesterol (cholesterol ester); I - intestin; A - adipocit

Legarea remnanților de acest receptor este stimulată de prezența LPL. Remnanții sunt încorporați în liposomi, din care colesterolul poate lua orice cale metabolică hepatocitară, inclusiv cea a excreției biliare. Trigliceridele rămase se adaugă depozitului hepatic de trigliceride.

O mare parte din colesterolul hepatic este excretat biliar, și deci, intestinal, fie ca și colesterol liber, fie, după conversie, ca acid biliar. Procesul prin care colesterolul și acizii biliari circulă între intestin și ficat este cunoscut sub denumirea de circulație enterohepatică. Aproximativ jumătate din colesterolul pătruns în intestin este absorbit și se reîntoarce în ficat; jumătatea rămasă este eliminată. Cea mai mare parte (peste 97%) din acizii biliari este reabsorbită. Această cantitate de colesterol și acizi biliari ce se reîntoarce la ficat, alături de influxul constant de colesterol alimentar, reglează cantitatea de colesterol care este sintetizată. O rată crescută a fluxului de colesterol către ficat, fie datorată unui aport alimentar exagerat, fie unei reabsorbții foarte eficiente, inhibă sinteza de novo a colesterolului. Dacă concentrația colesterolului reîntors în ficat este mică, rata sintezei sale va crește [46].

1.3.2. Metabolismul LDL

LDL este, așadar, produsul metabolismului VLDL. Apo B-100 este singura apoproteină din compoziția LDL, și, în plus, fiecare particulă LDL are numai o singură apo B. (tabelul 1.6). Fiecare particulă LDL conține aproximativ 1000-1500 molecule de colesterol esterificat, în funcție de dimensiunea și densitatea particulei și de conținutul său în trigliceride. LDL este heterogen, fiind format din subfracții de dimensiuni și densități diferite.

Cele mai importante sunt LDL-I și LDL-II, particule mari cu densitate mai mică, și LDL-III, subfracție de dimensiuni mici cu densitate mai mare. Dacă se analizează distribuția subspeciilor LDL în populație se constată existența a trei fenotipuri, sau patternuri, clasificate pe baza mărimii vârfului de densitate al LDL (peak size). Patternul B, traduce preponderența în plasma a LDL mici și dense (LDL-III), și are un peak size $< 253,5 \text{ \AA}$; patternul A exprimă predominanța LDL-I și II și are un peak size $> 257 \text{ \AA}$; iar cel intermediar (I), un peak size LDL de $253,5\text{-}257 \text{ \AA}$. Aproximativ 60-70% din populație prezintă fenotipul A (sau I), în timp ce restul au un pattern de tip B. Importanța acestei observații constă în faptul că persoanele cu pattern de tip B au un risc de 3-7 ori mai mare pentru cardiopatia ischemică față de cei cu pattern A, indiferent de nivelul LDL colesterolului total. LDL-I și II pot fi transformate în LDL-III sub acțiunea lipazei hepatice. CETP mediază transferul esterilor de colesterol de pe suprafața LDL-I și II spre lipoproteinele bogate în trigliceride, la schimb cu trigliceridele care urmează sensul opus. În condițiile unei abundențe de trigliceride, acest proces duce la îmbogățirea LDL-I și II în trigliceride, reprezentând un substrat bogat pentru acțiunea lipazei hepatice, care le transformă, prin hidroliza excesului de trigliceride, în LDL-III mici și dense, sărace în trigliceride și bogate în colesterol.

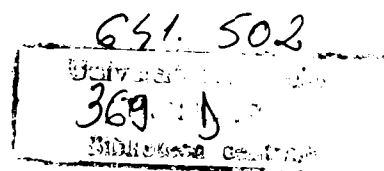
Se estimează că aproximativ 75% din LDL este îndepărtat din plasmă de către ficat. Clearance-ul său, atât cel hepatic cât și cel extrahepatic, poate avea loc pe căi mediate și nemediate de receptori. La persoanele sănătoase, în jur de două treimi din pool-ul circulant de LDL este îndepărtat pe căi mediate de receptori (tabelul 1.6).

Tabelul 1.6. Evenimentele asociate legării LDL de către receptorul său

Eveniment
1. Internalizarea și degradarea LDL în lizozomi; eliberarea de colesterol liber
2. Activarea ACAT — esterificarea colesterolului
3. Inhibarea hepatică a HMG-CoA reductazei și, în consecință, a sintezei de colesterol
4. Scăderea numărului (down-regulation) de receptori LDL

ACAT - acil-coenzima; A - colesterol aciltransferaza

Clearance-ul mediat de receptori se desfășoară pe calea receptorilor B/E (receptorii LDL), situați la nivelul suprafețelor celulare, îndeosebi la nivelul ficatului. Acești receptori, odată sintetizați de către celule, sunt transportați pe suprafața acestora, unde se aglomerează la nivelul unor regiuni subnivelate ale membranei plasmatică. După fixarea pe receptor, are loc internalizarea



complexului receptor-ligand, într-o veziculă de endocitoză care fuzionează cu un lizozom. În timp ce enzimele degradează apo B și hidrolizează esterii la colesterol liber, receptorul este reciclat pe suprafața membranei celulare. Trigliceridele și fosfolipidele pot și ele să fie hidrolizate. Colesterolul liber rezultat poate:

1. servi drept constituent al membranelor celulare;
2. fi reesterificat la esterii de colesterol, pentru stocare;
3. fi convertit la hormoni steroizi la nivelul anumitor țesuturi (ex. suprarenal).
În ficat, colesterolul poate fi excretat biliar, sub formă liberă sau de acizi biliari.

Pătrunderea în celulă a colesterolului liber provenit din LDL induce o serie de procese reglatoare care controlează concentrația sa intracelulară. În primul rând, colesterolul pătruns stimulează propria sa esterificare, prin activarea ACAT. În al doilea rând, influxul intracelular inhibă producția locală de colesterol prin inhibarea hidroximetilglutaril-coenzimei A reductaza (HMG-CoA-reductaza). În al treilea rând, acumularea de colesterol limitează preluarea ulterioară a lipoproteinelor bogate în colesterol, prin inhibarea sintezei receptorilor B/E și a migrării lor pe suprafața celulelor.

Receptorul B/E sau receptorul LDL a fost descris pentru prima dată de Goldstein și Brown la nivelul fibroblaștilor [44]. Este o glicoproteină cu o greutate moleculară de aproximativ 120 000 de daltoni responsabilă de clearance-ul a 75% din LDL-ul circulant și alcătuită din cinci domenii funcționale (tabelul 1.7). Situsul de legare al receptorului LDL situat la nivelul primului domeniu recunoaște atât lipoproteinele conținând apo B, cât și pe cele care conțin apo E.

Controlul sintezei receptorilor B/E de către nivelul colesterolului intracelular are o importanță majoră în reglarea balanței dintre concentrația plasmatică și cea celulară a colesterolului. O parte din colesterolul celular pare a fi convertit la un oxisterol care pătrunde în nucleul celulei, interacționează cu proteinele reglatoare și suprimă în mod direct transcripția genei receptorului LDL. În acest fel, atunci când concentrația intracelulară crește, numărul receptorilor scade; invers, când nivelul colesterolului intracelular scade, numărul receptorilor crește [43].

Un număr crescut de receptori influențează concentrația plasmatică a colesterolului pentru că:

1. favorizează îndepărtarea din circulație a unui număr mare de remnanți VLDL, care sunt precursorii ai LDL, și, în acest fel, scade producția LDL;
2. determină o creștere a clearance-ului LDL mediat de receptor.

Tabelul 1.7. Domeniile funcționale ale receptorului LDL

Domeniu	Descriere
Primul	Situsul de legare, necesar legării LDL ("repeats" bogate în cisteină) Localizat pe suprafața externă a membranei celulare Recunoaște atât apo B cât și apo E
Al doilea	Omolog cu factorul de creștere epidermal Semnificație funcțională necunoscută
Al treilea	Cel mai apropiat de membrana celulară Locul reziduurilor glucidice
Al patrulea	Conține doar 22 aminoacizi Traversează membrana celulară Este hidrofob
Al cincilea	Domeniu intracitoplasmatic Recunoaște veziculele de endocitoză și deci favorizează transportul receptorului la și de la suprafața membranei celulare Reglează aglomerarea receptorilor pe suprafața apicală a celulelor polarizate (ex., ficat și rinichi)

Pentru economia internă a celulei, scăderea numărului de receptori (down-regulation) favorizează acumularea intracelulară de colesterol. Invers, numărul de receptori crește (up-regulation) când conținutul intracelular scade, crescând astfel cantitatea de colesterol liber preluată din plasmă pentru satisfacerea necesităților celulare. Înțelegerea acestui proces este esențială pentru menținerea și reducerea nivelelor plasmatice de colesterol.

Influxul colesterolului provenit din alimentație în ficat conduce la scăderea numărului de receptori hepatici, calea principală de metabolizare a LDL-ului plasmatic; prin urmare, colesterolemia crește. Invers, inhibarea sintezei colesterolului sau întreruperea circulației enterohepatice de către rezine chelatoare de acizi biliari scade nivelul colesterolului hepatocitar. Această scădere, la rândul ei, determină creșterea numărului de receptori hepatici, cu creșterea clearance-ului LDL și scăderea colesterolemiei.

Existența acestei căi metabolice explică și efectul variațiilor isoformelor apoproteinei E. Persoanele cu fenotip apo E2 au un clearance al remnanților VLDL afectat, ceea ce determină scăderea nivelului hepatocitar de colesterol, creșterea numărului receptorilor LDL, și, deci, scăderea concentrațiilor LDL în circulație. Invers, la subiecții cu fenotip E4, remnanții VLDL se leagă de receptori cu o afinitate mult mai mare, conținutul hepatic de colesterol crește, determină scăderea numărului de receptori, și creșterea LDL-ului plasmatic.

Activitatea receptorilor LDL este controlată și de alte procese fiziologice, de exemplu de către hormonii tiroidieni care stimulează receptorii LDL, și de către prezența lipidelor saturate în membranele plasmatice, care pare să inhibe receptorii B/E.

LDL poate fi îndepărtat din plasma și prin mecanisme nemediate de receptorii B/E, care au loc la nivelul celulelor fagocitare. Acestea includ atât

un proces de preluare nespecific de tipul endocitozei, cât și un mecanism specific, mediat de receptorii de pe suprafața macrofagelor (receptori "scavenger") care recunosc numai particule LDL "alterate" [107]. Cel din urmă este considerat răspunzător de acumularea colesterolului în peretele vascular, și devine deosebit de important în prezența unor defecte ale receptorilor LDL, sau a unor anomalii ale compoziției LDL. Acestea din urmă includ oxidarea și glicozilarea LDL, procese care sunt favorizate și accelerate de leziuni structurale și/sau funcționale ale celulelor endoteliale.

1.3.3. Metabolismul HDL

Etapele producerii și metabolismului HDL sunt complexe. Primul pas îl constituie secreția HDL "nascent", o particulă discoidă care conține fosfolipide, colesterol, o cantitate de esteri ai acestuia, și, fie apo A-I, fie apo A-I plus apo A-II (figura 1.4). Apoproteina E este de obicei asociată particulei de apo A-I. Particulele ce conțin numai apo A-I pot fi secretate atât de către intestin cât și de către ficat, în timp ce particulele apo A-I/A-II sunt secretate doar de către ficat. Sub acțiunea LCAT, colesterolul liber este rapid esterificat iar HDL "nascent" se transformă într-o particulă mică, sferică, având densitatea HDL3.

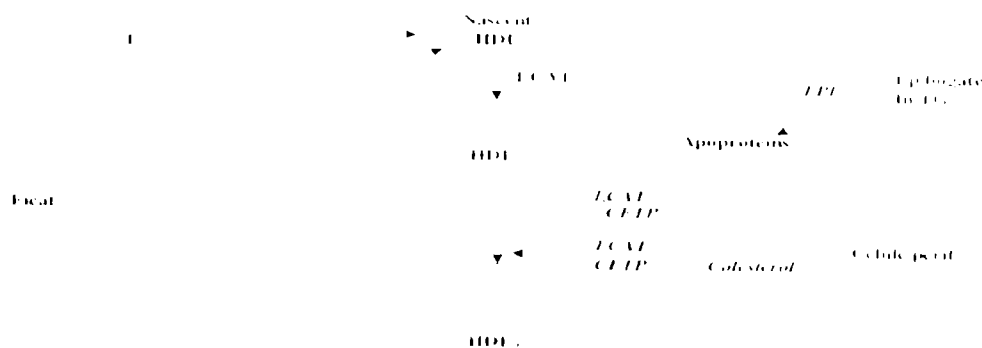


Figura 1.4. Metabolismul HDL

LPL - lipoprotein lipaza; TG - trigliceride; LCAT - lecitin:colesterol aciltransferaza; CETP - cholesterol ester transfer protein; I - intestin

HDL3 constituie o sursă de esteri de colesterol, care sunt transferați lipoproteinelor bogate în trigliceride, și un receptor pentru colesterolul liber, apo C, E și alte componente de pe suprafața lipoproteinelor bogate în

trigliceride, îndepărtate pe măsura degradării acestora sub acțiunea LPL. În urma acestui "schimb" HDL crește în dimensiuni, proces favorizat și de activitatea constantă a LCAT, care esterifică colesterolul liber pe măsură ce acesta pătrunde în particulă. Odată cu acumularea de esteri de colesterol, HDL crește și mai mult în dimensiuni și devine o particulă mai puțin densă, HDL₂. Cu alte cuvinte, în cursul lipolizei, HDL crește mult în dimensiuni.

Transferul "încrucișat" de trigliceride și esteri de colesterol între HDL sau LDL și particulele bogate în trigliceride este facilitat de CETP, și este stimulat de conținutul în trigliceride al VLDL. Ca urmare, în situațiile în care concentrațiile trigliceridelor sunt crescute, HDL colesterolul scade, iar proporția de trigliceride din compoziția HDL și LDL crește.

HDL, alături de LCAT și CETP, pare a fi implicat în reglarea circulației colesterolului între celule și lipoproteinele plasmatică. Ca substrat pentru acțiunea LCAT, colesterolul poate proveni și din membranele celulare, în special în condițiile în care HDL este relativ sărac în colesterol, iar concentrația intracelulară de colesterol este mare. Se consideră că HDL care conțin apo A-I, mai ales dacă au și apo E, reprezintă receptori foarte eficienți pentru colesterolul celular pe care îl transportă spre ficat.

Colesterolul poate fi eliminat din organism numai de către ficat. De aceea, pentru îndepărtarea excesului său din țesuturile periferice, trebuie transportat înapoi la ficat (sediul major al sintezei sale), proces denumit "transport invers" (reverse cholesterol transport). Colesterolul liber poate circula între membranele celulare și HDL sub acțiunea LCAT, iar dacă este esterificat, o parte poate fi transferată direct VLDL și LDL, sub acțiunea CETP. Colesterolul esterificat se reîntoarce la ficat pe calea preluării directe a remnanților VLDL sau după conversia VLDL la LDL. Mai mult, întreaga particulă HDL poate fi îndepărtată intactă din circulație de către ficat. Suma tuturor acestor procese reprezintă calea metabolică a "transportului invers al colesterolului" [99].

Mecanismele care controlează clearance-ul HDL nu sunt încă pe deplin înțelese. Esterii de colesterol pot fi preluați de hepatocite fără endocitoza particulei HDL. În plus, lipaza hepatică poate hidroliza fosfolipidele din HDL care, la rândul lor, pot iniția transferul colesterolului spre suprafața ficatului. Lp A-I par a fi hidrolizate mai rapid decât Lp A-I/A-II. În cele din urmă, pe suprafața celulelor periferice există chiar și receptori HDL specifici care pot controla nu numai efluxul colesterolului celular dar și preluarea și degradarea particulelor HDL.

1.4. Lipoproteina (a)

Rolul lipoproteinelor plasmatică în dezvoltarea aterosclerozei a devenit din ce în ce mai bine înțeles. În ultimii 30 de ani, o lipoproteină distinctă, Lp (a) a trecut din faza de descoperire inițială în cea de recunoaștere, de către

majoritatea cercetătorilor, ca unul din cei mai importanți factori de risc independenți pentru boala cardiovasculară. Lp (a) a fost descoperită în 1963 de către Kare Berg și colaboratorii săi [9,10], la Universitatea din Oslo, în cursul unui studiu asupra diferitelor forme sub care sunt prezente beta-lipoproteinele în populație [10]. Berg și colegii au injectat fracțiuni de beta-lipoproteine izolate din plasma umană la iepuri și apoi au testat reactivitatea antiserului provenit de la aceștia pe plasma umană. La aproximativ o treime din subiecți s-a demonstrat prezența unui nou antigen care a fost denumit Lp (a). Ulterior, tehnici cantitative au arătat că toți subiecții din specia umană posedă Lp (a), în cantități extrem de variate. În anii care au urmat, atât Berg [9] cât și alții au demonstrat că nivelul Lp (a) reprezintă o trăsătură genetică transmisă într-o manieră autosomal codominantă. Interesul legat de această lipoproteină a crescut când s-a observat o asociere între nivelul său plasmatic crescut (peste 30 mg/dl) și cardiopatia ischemică, observație confirmată ulterior de numeroase studii retrospective [13, 42] și prospective [87]. Totuși, două studii nu au găsit asemenea corelații [102]. Motivele se datorează, probabil, diferențelor genotipice, fenotipice și etnice între pacienții selectați, efectului vârstei, sexului, lipsei de standardizare a metodologiei folosite și a unei definiții date a valorilor “normale” ale Lp (a).

1.4.1. Structura Lp (a)

Lp (a) are o structură asemănătoare celei a LDL nativ, prin distribuția colesterolului și a fosfolipidelor, și prin prezența apolipoproteinei B100 (figura 1.5). În plus, conține o glicoproteină specifică, apolipoproteina (a), care, în ciuda numelui, nu este nici lipofilă, și nu se aseamănă cu nici o altă apolipoproteină cunoscută [30]. Ceea ce face din Lp (a) o particulă distinctă este legarea printr-o punte disulfidică și interacțiuni nepolare a unei singure copii de apo B100 (cu masa moleculară de 500 kdaltoni) de apo (a) (cu masa moleculară variabilă, între 300 și 800 kdaltoni). Ca o consecință a diferențelor importante ale mărimii apo (a) în populație, Lp (a) prezintă o mare variabilitate în densitate și greutate moleculară [62] și, din punct de vedere funcțional, o legare deficitară de receptorii LDL, și o afinitate crescută pentru numeroase suprafețe celulare și extracelulare. În timp ce apo B 100 se înfășoară în jurul nucleului lipidic, apo (a) este o proteină cu structură fibrilară, ceea ce crește vâscozitatea intrinsecă a Lp (a). Cea mai mare parte a apo (a) circulă în asociere cu particule LDL-like; totuși, în hipertrigliceridemii, o mică parte a complexului apo (a)-apo B este prezentă și în particulele bogate în trigliceride. În mod obișnuit, în circulație, concentrațiile de apo (a) liberă sunt extrem de mici, sau chiar absente, datorită afinității foarte mari a acesteia pentru lipoproteinele care conțin apo B, și datorită clearance-ului rapid din plasmă.

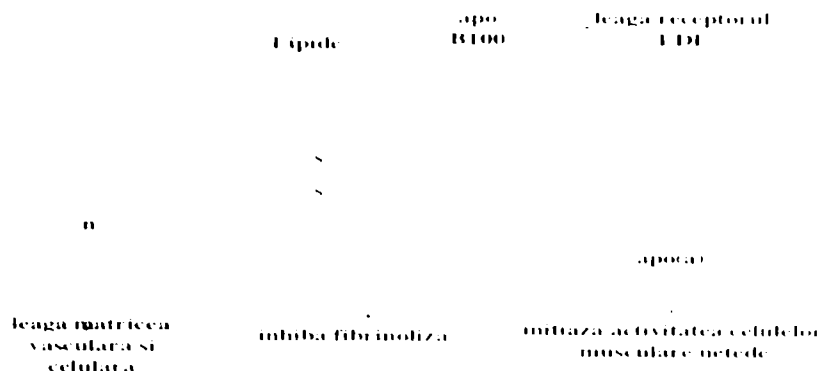


Figura 1.5. Structura Lp (a).

Analiza secvențială completă a ARN-ului mesager al apo (a) a generat o serie de surprize (figura 1.6). Prima a fost constatarea a numeroase “repetiții” (repeats) identice (copii) sau aproape identice, a unei secvențe de 342 de baze. Deși există și alte proteine în structura cărora se întâlnesc subunități interne repetate, gradul și fidelitatea secvențelor repetate din structura apo (a) este fără precedent. A doua surpriza a fost aceea ca apo (a) este extrem de asemănătoare plasminogenului. Acesta constă dintr-un domeniu amino-terminal urmat de cinci unități “kringle” (inel, în norvegiană) și o regiune catalitică proteazică. Plasminogenul este activat de activatori tisulari și de către urokinază, prin acțiunea acestora asupra unui reziduu specific al argininei. După activare și rupere (cleavage), forma sa activă, plasmina, acționează asupra fibrinei determinând liza cheagului [109].

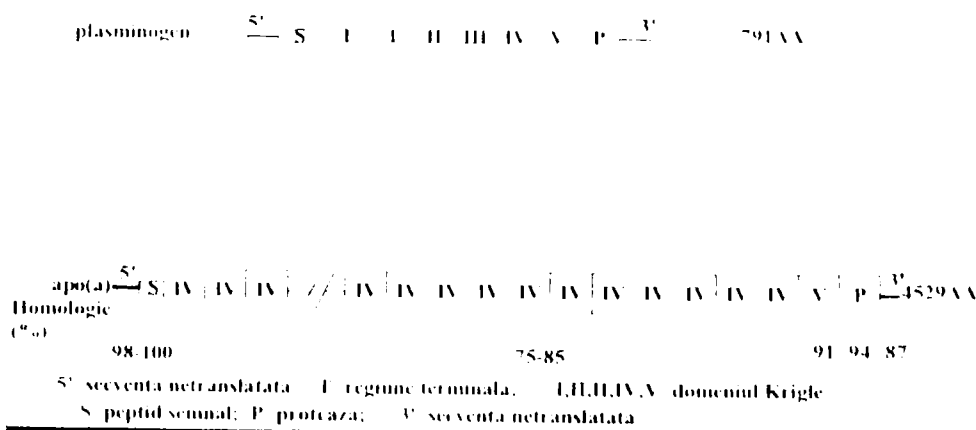


Figura 1.6. Gena plasminogenului și a Apo (a)

Apo (a) este o proteină mult mai mare decât plasminogenul. Unele din proprietățile structurale ale celor două, sunt similare, dar există și deosebiri.

Ambele au peptide identice în regiunea de secreție. Plasminogenul conține un domeniu de pre-activare amino-terminal și trei kringles (1, 2, și 3) care nu au corespondență în structura apo (a). Urmează kringle 4 și 5 și domeniul proteazic, care se păstrează în structura apo (a). ADN-ul apoproteinei (a) descris original conținea 37 de copii ale unei structuri, care are o identitate de 75-85% în secvența de nucleotide și una de 61-75% în cea de aminoacizi cu kringles 4 al plasminogenului, și o serie de domenii unice cu o asemănare încă și mai mare cu kringles 5 și regiunea proteazică a plasminogenului. [62]. Sunt exact 22 de copii ale unei secvențe kringles 4 - like și 15 "repetiții" ale altor structuri. Diferențele între secvențele kringle ale apo (a) și ale plasminogenului explică, probabil, proprietățile diferite. De exemplu, domeniile kringles 4 - like ale apo (a) conțin situsuri de glicozilare, în timp ce kringles 4 al plasminogenului nu le conține [62]. Apo (a) este o proteină puternic glicozilată (aproximativ 30% din greutate), a cărei legare de receptori poate fi influențată de conținutul mare în acid sialic și de sarcina electrică negativă conferită de acesta. Numai copia finală a kringles 4 (kringle 4-37) din structura apo (a) conține aminoacizii-cheie care, în secvența omoloagă a plasminogenului reprezintă situsul de legare pe lisină și fibrină. În plus, kringles 4 - 36 al apo (a) conține cisteină "în exces", candidată la legarea covalentă a apo (a) de apo B100. S-a propus ipoteza că numărul variabil de domenii repetate existente în alelele genei care codifică sinteza apo (a) este răspunzător pentru marea variație a mărimii proteinei în populație. La ora actuală a fost confirmat faptul că alelele genei apo (a) existente în populație conțin între 15 și 40 de domenii kringles, codificând, prin urmare, proteine cu o greutate moleculară de la 300 la 800 kdaltoni [5, 66].

1.4.2. Sinteza și metabolismul apo (a)

Toate componentele Lp (a) sunt sintetizate în ficat. Totuși, nu este stabilit încă, dacă asamblarea și maturarea Lp (a) au loc în interiorul său, sau în afara hepatocitelor. În ceea ce privește catabolismul, căile principale de clearance sunt încă necunoscute. Spre deosebire de LDL, care este catabolizat în primul rând pe calea receptorilor specifici, Lp (a) pare a fi, în mare măsură, independentă de receptor, atât datorită afinității sale scăzute pentru acesta, cât și concentrației plasmatice mai mici decât a LDL. Această concluzie este sprijinită de studii genetice care nu constată linkage între variațiile concentrațiilor Lp (a) în plasma și locusul genei receptorilor LDL, ca și de analiza familiilor purtătoare de gene mutante, fie pentru receptori LDL, fie pentru apo B100 (defective LDL, defective apo B100). În aceste familii, creșterea marcată a LDL plasmatic nu pare a se însoți de modificări importante ale concentrației Lp (a) [57]. În cele din urmă, medicamentele care cresc activitatea receptorilor LDL, ca rezinele chelatoare de acizi biliari sau statinele, nu au un efect semnificativ asupra Lp (a). Este posibil ca apo (a) să se poată

detașa de Lp (a) în circulație, favorizând conversia unei porțiuni din Lp (a) la LDL. Sunt așteptate cu interes dovezile experimentale ale acestei ipoteze.

1.4.3. Controlul sintezei apo (a)

Concentrațiile plasmatice ale Lp (a) variază extrem de mult, de la valori mai mici de 0,1 la peste 200 mg/dl, dar ele sunt relativ constante la un același subiect. Distribuția Lp (a) în nu realizează o curbă gaussiană normală ("bell-shaped", în formă de clopot); mai mult de două treimi din subiecți au concentrații mai mici de 20 mg/dl, în timp ce un număr redus au valori ce ajung la, sau depășesc 100 mg/dl. Întrucât aceste concentrații crescute par să contribuie în mod substanțial la morbiditatea coronariană, înțelegerea factorilor care le controlează este extrem de importantă. Studii metabolice și genetice au arătat că sinteza apo (a), mai mult decât catabolismul său, este factorul determinant al nivelului plasmatic al Lp (a) [57]. La populația umană există o relație inversă între mărimea apo (a) și concentrațiile plasmatice ale Lp (a) [57]. Analiza culturilor hepatocitare de baboon a demonstrat că această relație inversă poate fi explicată prin maturarea dependentă de mărime a apo (a) în reticulul endoplasmic [88]. S-au investigat heterogenitatea inter- și intraindividuală a mărimii apo (a) și au descris mai multe clase (sau fenotipuri) cu dimensiuni diferite, separate pe baza mobilității electroforetice relative față de apo B 100. Ele au fost grupate în fenotipuri F ("faster", mai rapide decât apo B100), B (identice cu apo B100), S (S1-S4, "slower", mai lente ca apo B100), și, respectiv, în fenotipuri cu dublă bandă de migrare electroforetică. Fenotipurile F, mici, se însoțesc de valori plasmatice mari ale Lp (a), cele S, mari, realizează nivele reduse (figura 1.7).

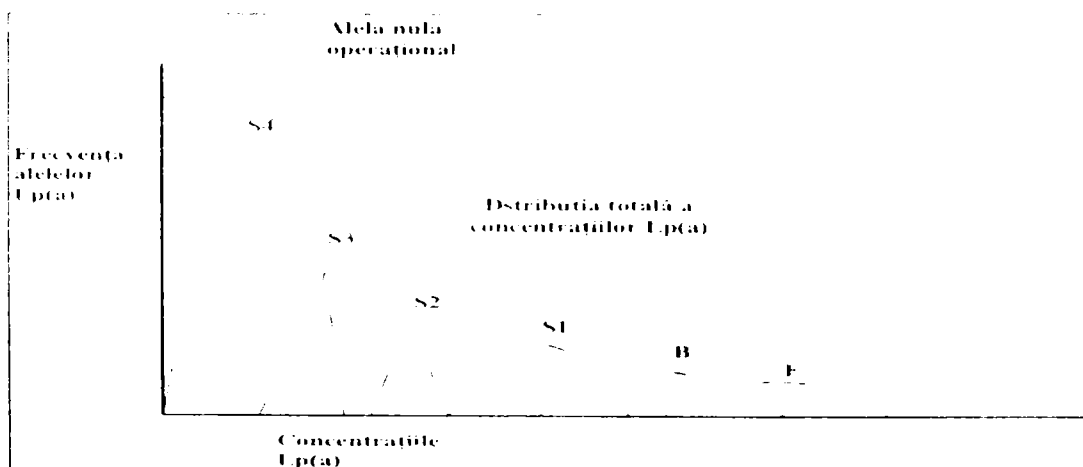


Figura 1.7. Frecvențele relative ale alelelor apo (a) în populație și relațiile lor cu concentrațiile Lp (a)

La 44% din subiecți nu s-a detectat apo (a) la electroforeză, datorită unei concentrații plasmaticice mici sau nedecelabile. Întrucât fenotipul apo (a) este constant la un același subiect, și, întrucât nici un individ nu posedă mai mult de două specii majore de apo (a), s-a presupus că polimorfismul apo (a) este controlat de două alele codominante, împreună cu o alelă nulă operațională [79]. Studii familiale au demonstrat că isoformele apo (a) se moștenesc într-un mod autosomal codominant. Un subiect poate să fie heterozigot pentru două isoforme de mărimi diferite, poate avea o singură isoproteină apo (a) sau, ocazional, apo (a) poate să nu fie decelabilă. Totuși, chiar și în cadrul aceleiași fenotip al apo (a), concentrațiile plasmaticice ale Lp (a) variază de peste 200 de ori, subliniind contribuția unor elemente reglatoare distincte în gena apo (a). Această observație este susținută de constatarea că, atât la specia umană cât și la maimuțe, nivelele hepatice ale ARN-ului mesager al apo (a) corelează cu concentrațiile Lp (a) [66, 79, 116], și de studii genetice care arată că aproape 100% din variația interindividuală a valorilor plasmaticice ale Lp (a) poate fi atribuită locusului genei apo (a) [50]. Așadar, variația extremă a nivelelor plasmaticice ale Lp (a) la populație se datorează unei combinații între diferențele moștenite în elementele care controlează procesul de transcripție al genei apo (a), și numărul diferit de domenii kringler codificate de către gena apo (a), respectiv fenotipului sau mărimii apo (a).

1.4.4. Influența factorilor de mediu și hormonală asupra concentrației Lp (a)

Deși, în general, nivelele Lp (a) rămân relativ constante pe parcursul vieții, există o serie de excepții. S-a raportat că Lp (a) își dublează valoarea în mod tranzitor, după un infarct miocardic sau după o intervenție chirurgicală. Ulterior, s-a găsit un răspuns slab și nesemnificativ al Lp (a) după un infarct miocardic, și s-a constatat o creștere medie cu 59% a concentrației Lp (a) la un grup de femei tinere, la opt zile după operația cezariană. Așadar, se pare că la anumiți indivizi există un răspuns de fază acută al Lp (a), dar acesta este relativ modest în comparație cu al altor reactanți de fază acută [16,18].

Mai consistent, s-a remarcat că tratamentul cu estrogen, progesteron, și alți hormoni sexuali reduce nivelul Lp (a) cu aproximativ 50%. De asemenea, concentrația Lp (a) pare să crească după menopauză. Estrogenii produc și scăderea LDL circulant. În schimb, hormonul de creștere (GH) are efecte opuse asupra celor două lipoproteine, inducând creșterea Lp (a) și scăderea LDL. Aceasta se datorează capacității duble a GH de a crește sinteza hepatică a lipoproteinei și numărul receptorilor LDL, favorizând clearance-ul LDL, dar nu și pe cel al Lp (a), și demonstrând, încă o dată, diferențele în căile metabolice ale celor două lipoproteine.

O condiție care afectează în mod constant nivelul Lp (a) este insuficiența renală. S-a observat creșterea concentrației Lp (a) la pacienții cu sindrom nefrotic, iar alte studii au raportat că valorile Lp (a) sunt crescute în insuficiența renală cronică și în boli care se însoțesc de microalbuminurie.

Înțelegerea rolului fiziologic al Lp (a) ar putea ajuta la elucidarea patofiziologiei asociate nivelului crescut al acesteia. Totuși, funcția normală a Lp (a) nu este cunoscută. Asemănarea structurală neobișnuită dintre apo (a) și plasminogen a inspirat numeroase ipoteze asupra funcțiilor Lp (a), ca și speculația că apo (a) ar reprezenta "puntea" dintre trombogeneză și aterogeneză. Ca "rudă moleculară" [62] a plasminogenului, apo (a) ar putea modula fibrinoliza (figura 1.8), sau ar putea augmenta depozitarea particulelor bogate în colesterol la nivelul depozitelor de fibrină. Această ultimă posibilitate a condus la speculația că, în cursul ontogenezei, apo (a) a ajuns să joace un rol în procesul de vindecare al plăgii, prin eliberarea colesterolului la nivelul sediilor unde este necesară biosinteza de noi membrane.

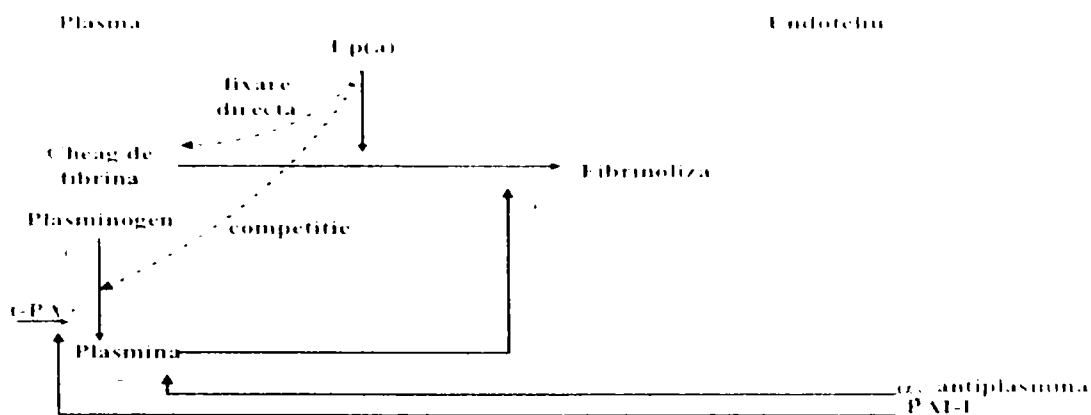


Figura 1.8. Mecanismele fibrinolizei și rolul Lp (a)

Deși secvența de aminoacizi din structura apo (a) este aproximativ 80% similară aceleia a plasminogenului, există diferențe semnificative. Printre acestea se numără pierderea situsului de activare la nivelul căruia zymogenul din structura plasminogenului este clivat de către activatorii acestuia. Ca urmare, apo (a) nu este capabilă să funcționeze ca protează activă "plasminlike". Totuși, numeroase studii au arătat că Lp (a) poate interfera cu legarea plasminogenului pe substraturi ca și fibrina, suprafețele celulare, și matricea extracelulară. Lp (a) poate acționa ca inhibitor competitiv al procesului de generare al plasminei, al fibrinolizei, și al legării plasminogenului de celulele endoteliale, monocite și trombocite, creând astfel

o stare pro-trombogenă. Aceste efecte, însă, nu au fost observate în toate studiile, iar la specia umană nu a fost raportată o corelație clară între nivele crescute ale Lp (a) și diverși parametri ai fibrinolizei ca și timpul de liză al cheagului euglobulinic, produșii de degradare ai fibrinei, sau α -2-antiplasmina.

Mai mult, studiile au arătat că, în plăcile aterosclerotice provenite de la subiecți cu valori diferite ale Lp (a), nu există o corelație inversă între cantitatea de plasminogen și cea de Lp (a), ceea ce contrazice ipoteza că Lp (a) blochează legarea plasminogenului de fibrină, in vivo. Totuși, în studiile citate, nu s-a ținut cont de recent raportatul efect variabil al mărimii și polimorfismului apo (a) asupra procesului fibrinolitik, ceea ce face ca interpretarea tuturor rezultatelor mai sus menționate să se facă cu precauție, până la viitoare studii mai detaliate. În plus, efectul atero-trombogen al Lp (a) poate fi mai mult localizat decât generalizat. De exemplu, la un anumit nivel al patului arterial, Lp (a) poate favoriza formarea de trombi care, la rândul lor, pot deveni elementul trigger al formării plăcii de aterom. Trombii sunt adesea prezenți pe suprafața vaselor coronare și în interiorul plăcilor deja existente. Ei pot juca un rol trigger în proliferarea și migrarea celulelor musculare netede și în producerea matricei extracelulare, pe calea mesagerilor chimici proveniți din produșii de degradare ai trombocitelor sau fibrinei [25].

Concentrațiile crescute de Lp (a) la nivel tisular pot inhiba liza acestor trombi și pot accelera aterogeneza, mai ales în prezența altor factori de risc cardiovascular ca dislipidemiile, diabetul zaharat, fumatul.

Evidențele cele mai convingătoare asupra relației dintre Lp (a) și tromboză derivă din studiile efectuate pe diferite specii de primat care arată o corelație directă între concentrațiile plasmatice crescute ale Lp (a) și accelerarea trombozei într-un segment de arteră carotidă cu o leziune indusă prin clampare. Așadar, la anumite nivele, Lp (a) are o acțiune aterotrombogenă. Este posibil ca o parte din inconsistențele din literatură să se datoreze heterogenității subiecților studiați, legate de fenotipul apo (a). Oricum, se pare că măsurătorile efectuate în sânge integral nu permit detectarea efectelor antifibrinolitice ale Lp (a), care este posibil să fie localizate numai la anumite nivele ale peretelui vascular. Un efect direct al Lp (a) asupra fibrinolizei a fost recent demonstrat pe șoarecele transgenic. Liza cheagurilor de fibrină marcate radioactiv la șoarecele transgenic cu concentrații mari de apo (a) s-a dovedit a fi semnificativ mai lentă decât la animalele de control [20].

1.4.5. Alte acțiuni ale Lp (a)

Inhibarea activării plasminogenului de către Lp (a) poate avea repercursiuni mai extinse decât asupra fibrinolizei. Factorul de creștere tumorală β (TGF- β) este o citokină multipotentă care inhibă proliferarea unui număr mare de tipuri de celule. TGF- β este sintetizat sub forma unei molecule

latente care, pentru a fi activată, necesită acțiunea unei proteaze de tipul plasminei la nivelul unei regiuni propeptidice din structura sa. S-a observat că Lp (a) și apo (a) stimulează proliferarea celulelor musculare netede umane în cultură, într-o manieră dependentă de doză, în timp ce LDL nu are același rol. Acest efect rezultă din inhibarea activării plasminogenului de către Lp (a) și, în consecință, a activării plasminei, un TGF- β latent. În mod similar, apo (a), pe lângă inhibiția activării TGF- β , crește și motilitatea celulelor musculare netede cultivate împreună cu celule endoteliale, într-un model celular de tip "răspuns la injurie". Întrucât proliferarea și migrarea celulelor musculare netede este "emblema" aterosclerozei și a restenozei, aceste rezultate demonstrează alte posibile mecanisme ale acțiunii atero-trombogene a Lp (a).

Prezența apo (a) în structura Lp (a) crește legarea acestei particule bogate în colesterol de componente ale matricei extracelulare tipice plăcii de aterom și anume fibrină, glicozaminoglicani, și fibronectină, explicând acumularea mai mare a Lp (a), în comparație cu LDL, la nivelul leziunii aterosclerotice. În plus, Lp (a) se poate lega și poate fi internalizată la nivelul macrofagelor, contribuind la formarea "celulelor spumoase" (foam cells). Macrofagele bogate în colesterol pot deveni trigger-ul dezvoltării plăcii de aterom prin eliberarea de factori de creștere și chemotactici, și de citokine.

1.4.6. Abordarea terapeutică

Dacă se acceptă ideea că patogenitatea Lp (a) este legată de creșterea nivelului său plasmatic, atunci reducerea acestuia ar trebui să reprezinte obiectivul terapeutic principal. În acest sens, primul pas constă în luarea deciziei referitoare la concentrațiile Lp (a) care trebuie "tratate", valori care se doresc a fi atinse, precum și mijloacele de realizare a acestor obiective. Dieta și exercițiul fizic regulat utilizate în tratamentul dislipoproteinemiilor au un efect minor asupra nivelelor plasmatică ale Lp (a). În general, afirmația este valabilă și pentru unii agenți farmacologici ca inhibitori HMG-CoA-R și fibratii. O excepție este niacina care, în doze de 3-4 grame pe zi, reduce valorile Lp (a) cu 30%.

Oricum, experiența este limitată și rezultatul poate să depindă de fenotipul apo (a), de doza administrată, de durata tratamentului. Din cauza posibilelor efecte adverse ale dozelor mari de niacină, raportul risc/acțiune benefică trebuie atent evaluat, îndeosebi în ceea ce privește alterarea funcției hepatice, intoleranța la glucoză, hiperuricemia, și modificările dermatologice. Datorită acestor efecte adverse potențiale, folosirea niacinei ar putea fi indicată numai în cazurile cu concentrații mari ale Lp (a) și cu istoric personal și/sau familial de cardiopatie ischemică. În aceste situații pot fi prezente adesea și alte dislipidemii, care pot fi ameliorate prin administrarea niacinei. În general,

în prezența unor nivele plasmatiche mari ale Lp (a), ceilalți factori de risc trebuie tratați și mai agresiv [62].

S-a raportat efectul favorabil al unor hormoni, mai ales al estrogenilor, asupra concentrațiilor Lp (a) [14]; oricum, efectele adverse ale acestora nu au fost testate în studii intervenționale. De asemenea, rămâne încă a fi elucidat efectul antioxidantilor sub forma suplimentelor de vitamina C, E și beta-caroten, ca și al Probucolului, sub premisa că patogenitatea Lp (a) ar depinde de forma sa oxidată [62].

Datorită incertitudinilor actuale, orice formă de tratament medicamentos a concentrației crescute de Lp (a) trebuie să se bazeze pe acumularea de noi cunoștințe referitoare la factorii care controlează producția și secreția apo (a) și formarea complexului Lp (a). În așteptarea acestor noi date, în cazurile severe, o metodă eficientă de reducere drastică a nivelelor plasmatiche ale Lp (a), ca și ale LDL, este tehnica LDL-aferezei. În orice caz, această metodă este disponibilă numai în centre înalt specializate, e invazivă, costisitoare, și necesită o complianță absolută din partea pacientului.

CAPITOLUL 2

METODE ȘI METODOLOGII DE MĂSURARE A CONCENTRAȚIEI LIPOPROTEINELOR ÎN SÂNGE

2.1. Determinarea lipoproteinelor în sânge

Studiul lipoproteinelor plasmatică furnizează cheia diagnosticului diferențial al hiperlipoproteinemiilor și, în același timp, orientează terapia generală dietetică și farmacologică a diferitelor tipuri de afecțiuni, deoarece cantitatea fiecărei familii de lipoproteine (HDL, LDL, VLDL și chilomicroni) și proprietățile lor specifice fizico-chimice par să reflecte mai clar starea clinică a unui individ decât determinarea numai a lipidelor plasmatică. De egală importanță, măsurarea lipoproteinelor permite evaluarea eficienței tratamentului.

Există multe metode pentru izolarea și caracterizarea lipoproteinelor bazate pe proprietățile lor specifice, determinate de asocierea particulară a proteinelor cu lipidele care permit separarea lor. Dintre acestea menționăm: precipitarea cu ajutorul anticorpilor și polianionilor nespecifici, electroforeza, ultracentrifugarea, cromatografia, fragmentarea cu săruri în prezența etanolului. Însă, indiferent de tehnica de separare, lipoproteinele sunt invariabil raportate la cele obținute prin cele două metode de referință caracterizate printr-un înalt grad de adaptabilitate și prin capacitatea de a conduce la diferențierea celor cinci tipuri de hiperlipoproteinemie.

Prima metodă de referință este aceea bazată pe flotare și constă în ultracentrifugare, singură sau în combinație cu modelul analitic, care devine tot mai strâns legat de idealul de definiție a hiperlipoproteinemiilor. Ultracentrifugarea analitică, care poate determina cantitativ un număr aproape nelimitat de clase Sf diferențiate prin variații extrem de mici în densitatea lor, are capacitatea de a satisface necesitățile curente ale multor studii experimentale sau clinice. Dar, grupul lipoproteinelor importante în lucrările

clinice este restrâns la patru familii principale: alfa-lipoproteinele (cu densitate mare), beta-lipoproteinele (cu densitate joasă), prebeta-lipoproteinele (cu densitate foarte joasă) și chilomicronii. Deși această subdivizare este acceptată unanim, nu există un acord deplin asupra modului în care aceste grupuri de lipoproteine sunt raportate unul față de altul și dacă conțin subgrupuri cu un comportament metabolic independent, care ar face necesară reconsiderarea lor față de cele patru clase admise. Aceste incertitudini duc la necesitatea extinderii standardelor imunochimice pentru investigarea conținutului și măsurarea purității lipoproteinelor izolate prin diferite procedee. Ultracentrifugarea preparativă duce la obținerea unor modele cantitative de lipoproteine, dar pentru o singură probă de plasmă sunt necesare 3 sau 4 serii de centrifugări urmate de determinarea lipidelor.

A doua metodă de referință este electroforeza, cu valoare semicantitativă, însă mult mai accesibilă în multe laboratoare, datorită adaptabilității la tipizarea unui mare număr de subiecți și unei maxime economicități. Simpla cercetare vizuală a benzilor de fracționare electroforetică permite recunoașterea imediată a celor mai multe modele normale și a unor anomalii ale tipurilor specifice de hiperlipoproteinemie. Numai definirea anomaliilor de graniță și precizarea diagnosticului unor tipuri mai puțin definite impune asocierea electroforezei cu alte determinări.

Alături de electroforeză și ultracentrifugare, observarea plasmei de repaus este o metodă simplă și foarte comodă de apreciere a unor familii de lipoproteine.

Pentru determinarea lipoproteinelor se poate folosi ser sau plasmă, aceasta din urmă fiind preferată deoarece poate fi menținută la rece din momentul recoltării. Proba ideală este reprezentată de plasma menținută constant la 0-4°C și analizată în aceeași zi cu recoltarea. În aceste condiții, plasma nu poate fi folosită decât maximum 7 zile, în timp ce în condiții particulare de refrigerare a probelor sterile păstrarea poate fi prelungită chiar peste 30 de zile. Excepție fac numai probele cu conținut mare de VLDL sau chilomicroni a căror stabilitate este limitată la numai câteva zile, deoarece păstrarea prelungită este însoțită de formarea unor agregate de particule endogene care rămân la origine, fiind confundate cu chilomicronii. Nu se recomandă păstrarea la temperatura de îngheț care alterează modelele lipoproteice, afectând îndeosebi fracțiunea VLDL și cea a chilomicronilor. Pentru studiul LDL și HDL pot fi folosite probe de ser dezghețate o singură dată.

2.1.1. Observarea plasmei – testul chilomicronilor

Prezența în sânge a chilomicronilor, beta-VLDL sau a unei cantități crescute de VLDL, produce creșterea turbidității plasmei. Aceasta își pierde claritatea devenind opalescentă sau lactescentă. Dacă se păstrează timp de

24 h la +4°C, chilomicronii formează în eprubetă un supranatant, sub forma unui inel sau guler cremos (testul chilomicronilor pozitiv). VLDL care au o densitate mai mare decât chilomicronii, rămân dispersate omogen în infranatant. De regulă, creșterea turbidității plasmei se evidențiază în momentul în care trigliceridele (din VLDL, beta-VLDL sau chilomicroni) depășesc concentrația de 250mg %.

Bazați pe aceste fenomene, s-a propus observarea plasmei, în condiții standard, ca o metodă importantă în explorarea tipurilor de HLP [28].

Detalii tehnice

Plasma provenită de la bolnavul aflat în condiții bazale, este păstrată timp de 24 h la temperatura de +4°C, după care se examinează. În funcție de fracția lipoproteică care este crescută, se obțin următoarele aspecte corelative cu tipul HLP:

- HLP tip I: plasma este separată într-un supranatant și un infranatant. Supranatantul are aspect de inel sau guler cremos, fiind alcătuit din chilomicroni (testul chilomicronilor pozitiv). Infranatantul este clar.
- HLP tip II-A: plasma este clară.
- HLP tip II-B: mai frecvent, plasma este difuz opalescentă, dar în funcție de concentrația TG-VLDL, poate fi clară (TG < 250 mg%) sau difuz lactescentă, eventualitate mai rar întâlnită, produsă de o creștere importantă a TG-VLDL.
- HLP tip III: aspectul plasmei este decis de concentrația și proprietățile fizico-chimice ale beta-VLDL. Astfel, se produce fie opalescență sau lactescentă difuză, fie separarea beta-VLDL, într-un supranatant sub forma unui guler cremos. Acesta poate fi confundat cu gulerul chilomicronic (test chilomicronic fals pozitiv). Fenomenul se datorează densității mici a beta-VLDL, care în timp de 24h se ridică la suprafața eprubetei.
- HLP tip IV: TG-VLDL, dispuse difuz în întreaga eprubetă, produc o opalescență sau lactescentă difuză. Rareori, când TG sunt sub concentrația de 250 mg%, plasma este clară.
- HLP tip V : chilomicronii și VLDL în concentrație crescută produc un aspect tipic: supranatant format dintr-un guler chilomicronic și un infranatant difuz opalescent sau lactescent și excepțional clar (efect terapeutic).

2.2. Metode electroforetice

Încărcarea electrică de suprafață a complexelor lipoproteice constituie baza separării familiilor de lipoproteine prin metode electroforetice.

Lipoproteinele "fenotipice" dau o electroforeză cu 4 benzi de lipoproteine majore a căror mobilitate electroforetică depinde de 2 factori:

- în primul rând, de sarcina electrică netă pe o moleculă lipoproteică, rezultată din balanță de sarcini pozitive și negative de pe aminoacizii terminali și subunitățile de lanțuri peptidice. Încărcarea adițională este dată de cationii metalici adsorbiți și anionii acizilor grași și numai în mică măsură de fosfolipidele care nu se disociază la valorile pH-ului electroforetic.
- în al doilea rând, de interacțiunea lipoproteinelor cu mediul de migrare. Astfel, în electroforeza liberă, fără mediu suport, lipoproteinele au aceeași mobilitate ca în bloc de amidon. În alte medii ca: hârtie, agaroză, acetat de celuloză, migrarea lipoproteinelor în funcție de încărcarea electrică netă este modificată de interacțiunea mecanică și chimică dintre lipoproteine și mediul de migrare. Interacțiunea mecanică este determinată de gradul de porozitate a mediului care poate împiedica migrarea în cazul când ordinul de mărime al porilor este mai mic decât cel al particulelor migratoare și se concretizează în rămânerea particulelor mari de chilomicroni la start.

Interacțiunea chimică între lipoproteine și mediul suport, mai accentuată când acesta este reprezentat de hârtie, este demonstrată de lipsa delimitărilor nete ale diferitelor familii de lipoproteine și de variația modelului electroforetic în diferite medii [94].

Cercetări recente sugerează că dintre factorii care influențează mobilitatea electroforetică, structura componentelor proteice - apolipoproteine - ale complexelor lipoproteice este elementul cel mai important.

2.2.1. Lipidograma clasică

Fracționarea electroforetică se efectuează la temperatura camerei, în tampon veronal sodic cu pH-ul 8,6 și forța ionică 0,12 M, pe benzi de hârtie Whatman \neq 1, după o migrare de 4-7 ore la o tensiune constantă de 150-250 V, cu un curent de 3-4 mA pe bandă [32].

a) Reactivi.

1. Tampon veronal sodic 0,12 M, pH=8,6 la care se adaugă etilendiaminotetraacetat disodic 0,001 M (EDTA 0,001 M) cu scopul de a minimaliza efectul contaminării cu ioni metalici din hârtie sau reactivi. Conține: 20,6 g barbitat de sodiu (greutate moleculară = 206,18), 3,68 g barbitat acid (greutate moleculară = 184,2), 0,372 g etilendiaminotetraacetat disodic (greutate moleculară = 372,254) care se dizolvă în apă distilată aducându-se volumul la 1000 ml.
2. Colorantul Sudan negru B 0,5% în soluție alcoolică, sau Sudan III în alcool-acetonă.

b) Pregătirea cuvelor de electroforeză.

Electroforeza se face în cuve de electroforeză cu alimentare electrică la voltaj constant. Benzile de hârtie de filtru Whatman sunt pregătite pentru electroforeză prin marcarea originii cu un creion negru, umezire cu tamponul indicat și echilibrare 3-4 ore înainte de aplicarea probelor.

c) Modul de lucru.

După echilibrare se pun aproximativ 20 μ l plasmă totală în zona marcată, cu ajutorul unei micropipete. Electroforeza se efectuează la temperatura camerei, la voltaj constant. Separarea optimă a lipoproteinelor impune menținerea aceluiași nivel de tampon în ambele părți ale cuvei și verificarea periodică a pH-ului tamponului deoarece îmbătrânirea tamponului este totdeauna asociată cu o scădere a pH-ului sub 8.2. Dacă este folosit zilnic, tamponul dă rezultate bune 1-2 luni și chiar mai mult, cu condiția ca polaritatea cuvei să fie modificată la fiecare migrare. Cuvele sunt menținute la temperatura camerei tot timpul. Când se folosește tampon proaspăt preparat, uneori, benzile de lipoproteine nu se separă net, dificultate care poate fi corectată prin umezirea benzilor în tampon vechi înainte de punerea probelor de ser și folosirea de tampon proaspăt preparat în cuvă.

La sfârșitul intervalului de migrare se îndepărtează benzile din cuvă, se fixează timp de 30 minute la 100°C, apoi se colorează prin imersie într-o soluție alcoolică saturată de Sudan negru B sau o soluție de Sudan III în alcool-acetonă. Timpul de colorare variază în funcție de natura colorantului și vechimea acestuia. Excesul de colorant este îndepărtat prin spălare în 2-3 băi succesive de alcool 50% , apoi benzile se usucă la temperatura camerei. Intensitatea de colorare a diferitelor zone, direct proporțională cu concentrația de lipide, se măsoară prin eluția fâșiilor corespunzătoare familiilor majore de lipoproteine într-un amestec de alcool etilic-acid acetic 20% (v/v) și citire fotocolorimetrică. Intensitatea absolută de colorare a probelor este în funcție de vârsta colorantului și gradul de saturare a acestuia, ceea ce impune necesitatea folosirii periodice a unor benzi de control.

În condiții optime de efectuare a electroforezei, în tampon barbital, modelele lipoproteice arată o zonă lipoproteică slab definită α_1 (HDL) și o separare cu mică putere de rezoluție a lipoproteinelor cu densitate foarte joasă de cele cu densitate joasă; în anumite situații se evidențiază o trenă considerabilă a lipoproteinelor cu densitate foarte joasă, între regiunea beta-lipoproteinelor și origine.

Aspectul tipic al lipidogramei pe hârtie cu fracțiunile de alfa-lipoproteine, beta-lipoproteine și trena spre origine se poate modifica prin înlocuirea tamponului barbital cu un tampon tris-EDTA care determină apariția fracțiunii prebeta-lipoproteinelor.

Dar acest aspect tipic se poate modifica și datorită unor condiții deficitare de efectuare a lipidogramei. Astfel, proba de ser sau plasmă poate fi

păstrată la 4°C mai multe zile înainte de electroforeză, dar niciodată nu va fi înghețată, deoarece înghețarea alterează ireversibil unele modele lipoproteice. După o singură înghețare și dezghețare, plasma bogată în lipoproteine prebeta prezintă o bandă artificială largă în poziția chilomicronilor. Dacă plasma, îndeosebi cea lipemică, este lăsată la temperatura camerei în repaus câteva ore, lipoproteinele denaturate se acumulează la origine și se produce o creștere a mobilității benzilor de lipoproteine.

d) Precauții.

Pentru a anihila acțiunea unor factori, concretizată în alterarea modelelor lipoproteice, se iau următoarele măsuri:

- să se realizeze un contact cât mai bun între benzile de hârtie de filtru și cadrul de susținere a acestora;
- benzile să fie suficient de umede;
- nivelul lichidului trebuie să fie același în ambele camere ale electrozilor cuvei și să nu depășească nivelul maxim și minim de lichid stabilit pentru cuva respectivă;
- electroforeza trebuie efectuată la temperatură relativ constantă, într-un spațiu lipsit de curenți de aer;
- sărurile care se depun în urma migrării în vecinătatea electrodului pozitiv trebuie îndepărtate cu mare atenție cu ajutorul unei spatule și readuse în camera aceluiasi electrod. Nu se permite acumularea sărurilor nici pe ecranul central care separă camerele electrozilor, deoarece puntea de săruri astfel formată induce pierderi în unitatea de energie circulantă;
- amestecul colorant este folosibil aproximativ două luni, după care se prepară un nou amestec. Periodic se adaugă amestec de colorare proaspăt care menține concentrația băii de colorare. Timpul de colorare este în funcție de vechimea tamponului, variind între 45 și 60 de minute pentru tamponul proaspăt în prima săptămână de folosire și 60-90 minute în săptămânile următoare. Ca etalon al variației intensității de colorare se folosește modelul electroforetic al serului normal efectuat la fiecare migrare.

2.2.2. Lipidograma în tampon albuminos

Lipidograma în tampon albuminos se deosebește de lipidograma clasică numai prin adăugarea la tampon a albuminei bovine sau umane, în concentrație de 1%, care are drept rezultat separarea mai netă a familiilor de lipoproteine [64]. În prezența serum-albuminei lipoproteinele apar mai bine definite, deoarece se evidențiază limitele benzilor și se elimină aspectul ondulatoriu sau difuz al conturului lor, se delimitează banda de alfa-lipoproteine, se separă parțial prebeta-lipoproteinele de beta-lipoproteine și se

limitează trena exclusiv la probele care conțin concentrații mari de VLDI. Nu se cunoaște mecanismul exact al acțiunii albuminei asupra separării familiilor de lipoproteine. S-a emis ipoteza saturării porilor de adsorbție ai hârtiei cu albumină în exces, deci eliminarea adsorbției ar permite migrarea uniformă a lipoproteinelor. La aceasta se adaugă prevenirea oxidării lipoproteinelor de către ionul cupric, datorită capacității de legare a albuminei cu metalele. Același mecanism se poate presupune și în cazul folosirii agarozei sau agarului ca mediu-suport.

2.2.3. Lipidograma în geloză

Ca mediu suport se folosește gelul de agar obținut prin dizolvarea acestuia la cald în soluție apoasă și adăugarea tamponului veronal cu pH-ul 8,6 până la obținerea concentrației dorite [56]. Colorarea se face cu Sudan negru, înainte sau după migrare. În urma scindării electroforetice se evidențiază următoarele fracțiuni:

- o fracțiune pre-albuminică;
- o fracțiune lipo-albuminică;
- o fracțiune alfa₁ corespunzătoare lipoproteinelor alfa de pe hârtie;
- o fracțiune alfa₂ corespunzătoare lipoproteinelor beta de pe hârtie;
- chilomicronii care rămân în start.

2.2.4. Lipidograma pe acetat de celuloză

Acetatul de celuloză ca mediu de migrare a lipoproteinelor are unele avantaje: adsorbție mai redusă, porozitate mai mică, diminuarea curentului de electroosmoză, reducerea timpului de migrare prin majorarea voltajului, separarea netă a fracțiunii prebeta de cea a beta-lipoproteinelor. Experiențe simple au demonstrat valoarea cert cantitativă a acestei metode. De exemplu, diluarea serului sau aplicarea lui în cantități descrescătoare par să confirme această presupunere prin diferența de intensitate a benzilor în funcție de cantitatea de ser aplicată [118].

Fracționarea electroforetică se realizează în tampon barital cu pH-ul 8,8, forța ionică 0,05 M. După numai 60 minute de migrare la 350 V se face uscarea benzilor într-un exicator care conține o sare de calciu, apoi se realizează oxidarea cu peroxid de bariu, sau într-un aparat producător de ozon în condiții fizico-chimice relativ constante. Indiferent de tehnica de colorare, lipidograma pe acetat de celuloză evidențiază 4 fracțiuni distincte:

- o bandă de beta-lipoproteine puternic colorată situată la nivelul beta-globulinelor;
- o bandă mai îngustă și mai slab colorată reprezentată de lipoproteinele prebeta și care migrează la nivelul alfa₂-globulinelor;

- o bandă la nivelul alfa₁-globulinelor,
- o bandă corespunzătoare serum-albuminelor și acizilor grași legați la acestea.

După stabilirea proporțiilor acestor fracțiuni s-a calculat raportul beta/prebeta și s-a constatat că variațiile lui coincid cu cele ale raportului colesterol/trigliceride.

2.2.5. Lipidograma în amidon

Mediul oferit de amidon prezintă următoarea particularitate: la simpla migrare electroforetică în funcție de încărcarea electrică se adaugă un efect de filtrare care permite migrarea particulelor și separarea lor în funcție de talie și masă. Colorarea se face cu o soluție alcoolică de Sudan negru și este urmată de o decolorare mai îndelungată.

Studiul fracțiunilor obținute prin eluție după electroforeză în bloc de amidon demonstrează prezența unei lipoproteine alfa₂, care migrează în fața fracțiunii beta-lipoproteinelor, precipitabilă cu sulfat de dextran în prezența clorurii de calciu. Puțin înapoia albuminelor se evidențiază o bandă îngustă care corespunde fie lipoproteinelor alfa, fie unei lipoalbumine, iar în poziția globulinelor alfa₁ se evidențiază o altă bandă îngustă.

2.2.6. Lipidograma în gel de poliacrilamid

Gelul de poliacrilamid oferă două posibilități de tratare, și anume: în “plăci” sau în “disc electroforetic”, având marele avantaj al unei puteri foarte mari de rezoluție datorată porozității care îi conferă proprietatea de filtrare față de moleculele care îl străbat. În funcție de concentrația gelului se poate varia dimensiunea porilor și prin aceasta se poate influența migrarea familiilor de lipoproteine. Concentrația gelului trebuie stabilită cu grijă deoarece gelul prea concentrat nu permite pătrunderea particulelor prea mari, dar în același timp nici nu se poate dilua nelimitat pentru că manipularea lui devine foarte dificilă, iar moleculele mici migrând foarte repede, trebuie scurtat timpul de migrare ceea ce împiedică migrarea particulelor mai mari [118].

Indiferent de modalitatea de aplicare a gelului de poliacrilamid, aceasta ridică unele probleme mai dificile legate de colorare, concentrarea gelului și, mai ales, de identificarea benzilor obținute. Deoarece se consideră că colorantul interferă cu migrarea lipoproteinelor, s-au studiat diferite modalități de colorare și s-au propus mai multe soluții, dintre care cea mai adecvată pare aceea a precolorării pe cale externă.

Lipidograma evidențiază următoarele benzi:

- o bandă la nivelul albuminelor și alfa₁-globulinelor;
- o bandă la nivelul alfa₂-globulinelor și beta-globulinelor;

- o bandă de lipoproteine beta cu 3 subfracțiuni de mobilitate electroforetică diferită.

2.2.7. Lipidograma în agaroză

a) Reactivi

1. Tampon barbital cu $\text{pH} = 8,6$ și forță ionică 0,05, obținut prin dizolvarea a 1,84 g acid dietilbarbituric și 10,30 g dietilbarbiturat de sodiu în 1000 ml apă distilată. Se păstrează la 4°C timp îndelungat. Molaritatea soluției tampon influențează extinderea migrării și gradul de separare a benzilor de lipoproteine. Experimentele cu tampon barbital 0,1; 0,075 și 0,05 M au arătat că tamponul 0,05 M este cel mai bun deoarece asigură o separare mai netă, cu zone mai extinse și mai clare între fracțiunile lipoproteice.
2. Soluția de agaroză 0,8% se pregătește astfel: se pune 0,8 g agaroză la înmuiat în 100 ml apă distilată timp de 24 ore. La sfârșitul acestui interval se îndepărtează apa prin decantare și se transvazează cantitativ cu ajutorul unui amestec de 50 ml apă distilată și 50 ml tampon barbital într-un Erlenmeyer cu capac de sticlă. Se introduce într-o baie de apă care fierbe până când soluția devine clară. Se adaugă 0,1 g mertiolat drept conservant, apoi se repartizează agaroză în eprubete, filtrându-se aproximativ 12-15 ml agaroză în fiecare eprubetă și se păstrează în stare gelificată la 4°C . În momentul folosirii, agaroză se încălzește în baie de apă.

Deși soluțiile de agaroză mai diluate au putere mai mare de rezoluție, nu se recomandă folosirea lor deoarece la concentrații mici nu formează un gel suficient de rigid pentru a preveni prăbușirea șanțului spre interior și apariția de fisuri pe margini [71].

3. Acid acetic glacial 5%
4. Sudan negru B 0,5% în etanol 60%
5. Etanol 50%
6. Albastru de bromfenol. Se adaugă o mică cantitate de albastru de bromfenol la 2 ml ser de control, care marchează traseul servind la urmărirea migrării electroforetice.

Echipament

1. Lame de sticlă pe care se toarnă mediul-suport; trebuie să fie perfect curate și să nu conțină urme de grăsimi. Pentru aceasta se spală lamele cu detergent, apoi sub curent abundent de apă caldă (nu se permite răcirea apei înainte de îndepărtarea completă a detergentului) și apoi cu apă distilată. După spălare, lamele se usucă și se lustruiesc pentru ca agaroză să adere bine la toată suprafața. Înainte de folosire se introduc într-o baie de alcool și se flambează pentru îndepărtarea completă a grăsimilor. Din acest moment, lamele pot fi manipulate numai prin atingerea marginilor

lor. Lamele curate pot fi păstrate într-o baie de alcool 95% sau ca lame uscate într-un disc Petri uscat și curat.

Dacă lamele au mai fost folosite în migrări electroforetice anterioare, se recomandă introducerea lor într-o baie de apă care fierbe până când agaroză se hidratează și se topește înlăturându-se cu ușurință. Apoi se introduc într-o baie cu amestec oxidant, care permite contactul individual cu lamele pentru un interval de 4-24 ore, după care soluția oxidantă se îndepărtează prin decantare, iar lamele se spală sub curent puternic de apă. Se controlează completa îndepărtare a acidului prin măsurarea pH-ului apei de spălare. Se spală lamele cu apă distilată și se păstrează după cum s-a descris.

Se recomandă înlocuirea lamelor cu benzi de film fotografic din poliester subțire. Se pot folosi filme radiologice care s-au curățat după hidratarea gelatinei timp de câteva ore în apă rece.

Prin acest procedeu gelatina se îndepărtează ușor, iar filmele se păstrează la loc uscat până la folosire.

2. Cuvă de electroforeză
3. Cuve de colorare a lamelor
4. Baie de fixare care conține acid acetic glacial 5%
5. Integrator automat.

b.) Mod de lucru:

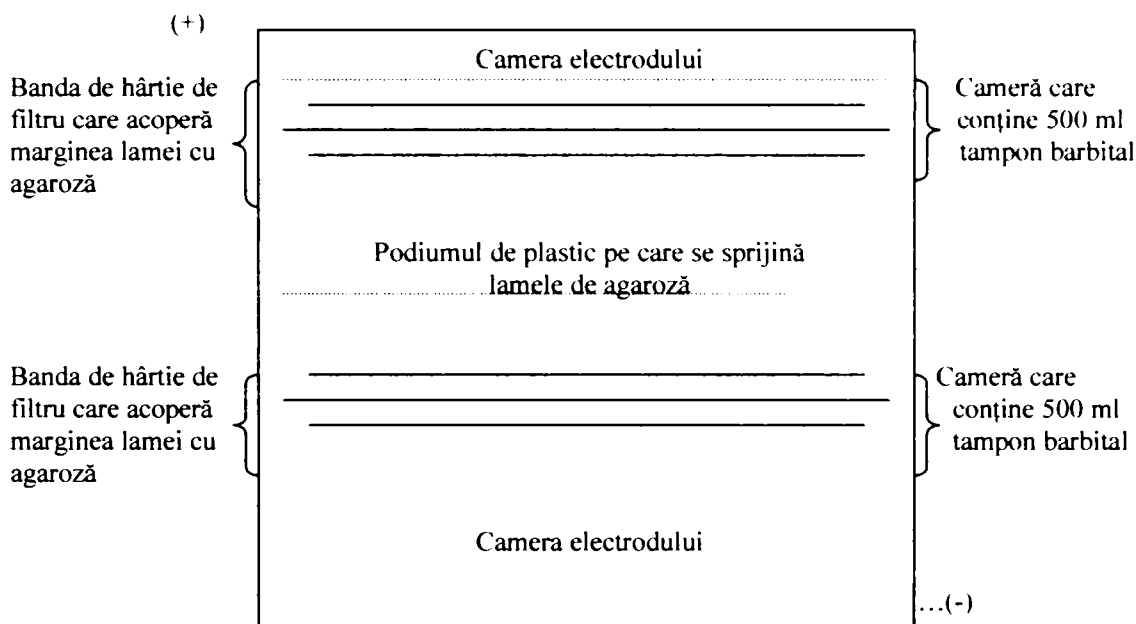
Se încălzește agaroză la 70-80°C. Se pipetează câte 2.5 ml agaroză cu o pipetă spartă la vârf, care este plimbată încet dinspre centru spre marginile lamei, astfel încât întreaga suprafață să fie uniform acoperită. Operațiunea trebuie să se desfășoare destul de repede încât toate lamele să fie acoperite cu agaroză în 10 minute, având grijă ca în acest interval să nu scadă temperatura agaroză sub 60°C. Trebuie atenție ca lamele să fie așezate perfect orizontal. După 30 minute de la turnarea agaroză pe prima lamă, soluția de agaroză este suficient gelificată pentru săparea șanțurilor cu ajutorul unei ștanțe speciale. Trebuie evitată deformarea șanțurilor rezervor pentru probă.

Fiecare rezervor este umplut cu aproximativ 50 μl soluție de agaroză, iar după 5 minute se aplică aproximativ 50 μl ser. Se evită revărsarea serului peste marginile rezervorului și formarea de bule. Fiecare serie de migrare este însoțită de o probă de control care a fost precolorată cu albastru de bromfenol.

În fiecare cameră a electrodului se pun câte 500 ml tampon barbital rece. Se introduc lamele în cuva de electroforeză cu originea lamelor orientată spre catod. Închiderea circuitului electric se face prin intermediul a două benzi de hârtie de filtru umezite cu tampon barbital. Fiecare bandă este plasată în tampon, câte una în fiecare cameră a electrodului și acoperind gelul pe o distanță de 1 cm. Benzile de hârtie trebuie să facă contact direct pe întreaga lungime a lamelor cu agaroză.

Se închide circuitul și se aplică o tensiune de 350 V până când zona corespunzătoare lipoproteinelor alfa a migrat la o distanță de aproximativ 3 cm de origine.

După întreruperea curentului, punțile de hârtie de filtru sunt îndepărtate, iar lamele introduse în soluția fixator de acid acetic glacial 5% timp de 30 de minute. Soluția de fixare deshidratează parțial gelul și îndepărtează sărurile tamponului. Apoi lamele se pun pe un suport, iar pe suprafața agarozei se întinde o hârtie de filtru umezită cu apă, care să adere perfect la gel și se face uscarea la temperatura camerei, timp de 24 ore, sau uscarea forțată la 80-85°C timp de 20 minute.



Lamele sunt colorate cu o soluție de Sudan negru B 0,5% în etanol 60% timp de 20 minute. După îndepărtarea colorantului se spală lamele în 3 băi succesive de etanol 50%, câte 5 minute în fiecare baie și se lasă să se usuce la temperatura camerei.

2.2.8. Mobilitatea electroforetică a lipoproteinelor în diferite medii

Lipidograma clasică în tampon veronal sodic are putere mică de rezoluție evidențiind două fracțiuni majore:

- o bandă de alfa₁-lipoproteine slab definită, care migrează puțin în fața alfa₁-globulinelor;
- o bandă de beta-lipoproteine cu intensitate maximă la nivelul beta-globulinelor, dar putând ocupa poziții diferite de la nivelul alfa₂-globulinelor până la cel al gama-globulinelor și chiar la linia de origine; în

acest din urmă caz, se formează o trenă considerabilă de lipoproteine între regiunea beta și origine.

După adăugarea albuminei în soluția tampon, lipidograma capătă următorul aspect: banda alfa se intensifică, fracțiunea prebeta se separă parțial de beta și apare evidentă la nivelul alfa₂-globulinelor, beta-lipoproteinele dau o bandă în poziția obișnuită, iar trena spre origine, care acoperă toată zona dintre regiunea beta și start, apare numai în cazul unor concentrații mari de prebeta-lipoproteine.

După cum am văzut electroforeza în agar, agaroză, acetat de celuloză și alte medii evidențiază 4 fracțiuni majore:

a) Frațiunea alfa-lipoproteinelor are, în general, mobilitate electroforetică intermediară între cea a albuminelor și a alfa₁-globulinelor și apare ca o singură bandă cu intensitate uniformă. Când această fracțiune este abundentă, se produce o separare parțială în două zone:

- o zonă majoră catodică;
- o zonă minoră, care migrează spre anod și acoperă, parțial sau total, banda de albumină, formând uneori chiar o zonă în fața albuminelor. Unii autori au presupus că apariția acestei zone ar fi determinată de colorarea complexelor formate de acizii grași liberi cu albuminele și nu de o porțiune a lipoproteinelor cu densitate mare. Se pare că intensitatea de colorare și gradul de separare a acestei zone se accentuează pe măsura păstrării serului la 4°C.

b) Frațiunea lipoproteinelor prebeta migrează, în general, la nivelul alfa₂-globulinelor. În cazul electroforezei în acetat de celuloză și diferite geluri s-a raportat o proporție relativ mică de dedublare electroforetică a fracțiunii prebeta, corespunzând unei subfracționări demonstrate de ultracentrifugare. O subfracțiune migrează în poziția alfa₂ obișnuită, iar cealaltă într-o poziție mai avansată. După unii autori, scindarea prebeta-lipoproteinelor ar fi legată de folosirea îndelungată a anticoncepționalelor orale sau de terapia cu clofibrat.

Lipidograma pe hârtie în tampon veronal albuminos nu evidențiază fracțiunea prebeta decât în cazul unor tulburări hiperlipemice particulare, în timp ce serul "à jeun" al subiectului normal nu formează prebeta.

În agaroză, banda prebeta-lipoproteinelor este vizibilă clar, chiar în cazul unor valori scăzute ale trigliceridelor serice și migrează foarte variabil înaintea fracțiunii beta, în funcție de o serie de factori, dintre care cei mai importanți sunt: structura componentelor proteice ale prebeta-lipoproteinelor, conținutul în acizi grași liberi ai plasmei și, mai ales, variațiile lipoproteinelor cu densitate mare. Serurile care evidențiază o bandă prebeta de tip migrator rapid arată adesea o descreștere semnificativă a clasei lipoproteinelor cu densitate mare, cantitățile de VLDL și HDL fiind invers proporționale. Existența în ser a benzii prebeta de tip migrator lent nu poate fi atribuită distribuției anormale de fosfolipide, deoarece fosfolipidele serice totale au

concentrație normală, în schimb raportul cefalină/lecitină care se schimbă prin creșterea fracțiunii de cefalină și descreșterea corespunzătoare a fracțiunii de lecitină, pare să aibă implicații în mobilitatea fracțiunii prebeta.

Lipidograma pe acetat de celuloză evidențiază o bandă prebeta mai îngustă și mai slab colorată la nivelul alfa₂-globulinelor, aspect obținut și în gel de amidon.

Gelul electroforetic de poliacrilamid dă o electroforeză cu înfățișare tipică, deosebită de cele menționate prin aceea că, banda difuză de prebeta-lipoproteine migrează în urma benzii beta și nu înainte ei.

- c) În toate mediile suport, fracțiunea beta-lipoproteinelor migrează în poziția beta-globulinelor dând o bandă puternic colorată.
- d) Chilomicronii având componenta proteică slab reprezentată în moleculilor, nu migrează, din care cauză ei se găsesc în apropierea punctului de aplicare sau chiar în start pe suportul de migrare. Pe hârtie, chilomicronii formează o bandă simetrică în jurul liniei de origine. Unii autori au raportat că în acetat de celuloză o parte a chilomicronilor ar avea o oarecare mobilitate, migrând spre regiunea alfa₂ și împiedecând distingerea fracțiunii VLDL, de cea a chilomicronilor.

Separarea optimă a fracțiunilor lipoproteice se produce când distanța de migrare de la punctul de aplicare până în centrul benzii alfa se menține între anumite limite. Migrarea prea îndepărtată dă, de obicei, benzi curbate și cu limite mai puțin distincte.

Denumirea fracțiunilor lipoproteice separate prin electroforeză se face în funcție de mobilitatea electroforetică a proteinelor, de unde și numele de lipoproteine alfa și beta. Gennes și Polonovski [26], abandonând nomenclatura al cărui sistem de referință îl constituie poziția globulinelor și în care ordinea alfa₁-alfa₂-beta nu corespunde datelor furnizate de ultracentrifugare, propun să se dea denumiri diferitelor lipoproteine numai o semnificație alfabetică, alfa desemnând lipoproteinele cu mobilitatea cea mai mare, iar beta indicându-le pe cele mai lente. S-a stabilit o corespondență aproximativă a fracțiunilor separate în urma electroforezei în diferite medii fără să se ia în considerație mobilitatea reală a lipoproteinelor.

Diferiți autori au studiat comparativ modelele electroforetice obținute pe diferite medii-suport, folosind ca metodă de referință electroforeza pe hârtie în tampon barbital care conține albumină. Au fost studiate în paralel lipidogramele în agaroză și acetat de celuloză care au devenit, în ultima vreme, medii-suport frecvent folosite pentru fracțiunile lipoproteice. Electroforeza în agaroză furnizează o bună separare a celor 4 familii de lipoproteine majore, dând uneori mai mult de o bandă pentru fiecare familie de lipoproteine. Preparatele de acetat de celuloză dau o separare mai slabă a chilomicronilor și fracțiunii VLDL.

Gelul de poliacrilamid (PGE) adaptat mai recent la electroforeza lipoproteinelor plasmatice funcționează ca un filtru și oferă unele avantaje

pentru distingerea heterogenității modelelor lipoproteice caracteristice în diferite tipuri de hiperlipoproteinemie, separând lipoproteinele pe baza mărimii lor și dând o configurație în funcție de încărcarea electrică. O mențiune specială trebuie făcută pentru combinarea modelelor lipoproteinelor plasmatiche obținute prin diferite metode electroforetice, în definirea tipului III de hiperlipoproteinemie. Modelele lipoproteinelor obținute prin electroforeză în poliacrilamid au fost comparate cu cele obținute pe alte medii, acordându-se atenție deosebită întrebării dacă este posibil un diagnostic al hiperlipoproteinelor tip III numai pe baza electroforezei, deoarece în multe laboratoare nu este accesibilă ultracentrifugarea. Studiile au arătat că tipul III poate fi definit prin prezența lipoproteinelor cu mobilitate beta pe hârtie, agaroză sau medii similare, dar cu densitate mai mică decât a beta lipoproteinelor convenționale (LDL). Pacienții cu acest model au două populații majore de particule VLDL plasmatiche care pot fi mai ușor separate prin electroforeză în bloc de amidon. Pe acest mediu fracțiunea VLDL alfa₂-migratoare are compoziție obișnuită întâlnită la subiecții normali și în alte tipuri de hiperlipoproteinemie. Componenta VLDL beta-migratoare are un conținut neobișnuit de mare de colesterol față de trigliceride.

Pe hârtie se diferențiază uneori o bandă prebeta, iar pe PGE lipoproteinele migrează împreună, de obicei în pozițiile VLDL și HDL. Astfel, 96% din cazuri s-au caracterizat prin combinarea prezenței lipoproteinelor beta migratoare pe hârtie în absența benzii care migrează ca LDL pe poliacrilamid [6].

Deoarece testul fals pozitiv a fost restrâns exclusiv la plasma pacienților cu concentrații foarte mari de trigliceride (tip I sau IV), iar testul fals negativ a fost dat de serul pacienților tip III bine tratați, s-a tras concluzia că electroforeza singură oferă o indicație de precizie rezonabilă a diagnosticului tip III.

2.2.9. Aspect electroforetic particular al modelelor lipoproteice

În afara modelelor electroforetice lipoproteice normale, studiul fracționării electroforetice a evidențiat și modele lipoproteice cu aspect particular:

a.) “Broad-beta-lipoproteine” - “beta-VLDL” - “floating beta-lipoproteine” au fost identificate ca lipoproteine cu mobilitate electroforetică beta care flotează la densitatea 1,006, după 16 ore la 100 000 g sau ca lipoproteine ale căror concentrații de LDL și VLDL sunt inversate [6]. La electroforeză în bloc de amidon VLDL devin clar bimodale, o fracțiune migrând în poziția alfa₂ obișnuită din care cauză a fost numită “alfa₂-VLDL” iar cealaltă într-o poziție beta anormală care i-a dat numele de „beta-VLDL”. Electroforeza pe hârtie a fracțiunii de ultracentrifugare evidențiază “broad beta” numai la pacienți homozigoți pentru deficiența

familială în HDL (boala Tangier) și la pacienți cu hiperlipoproteinemie de tip III.

- b.) În 30-39% din plasmăle subiecților normali și ocazional în toate tipurile de hiperlipoproteinemie apare la electroforegramă o zonă distinctă formată din lipoproteine de mobilitate prebeta, fără ca trigliceridele să fie crescute în mod deosebit, datorită unei lipoproteine grele prebeta - "prebeta lourde" - care mai degrabă sedimentează decât flotează la densitatea 1,006. Această fracțiune descrisă de Rider, Levy și Fredrickson [89] ca "sinking prebeta" corelată cu fracțiunea lipoproteică cu densitate 1,050-1,080 și care pare să corespundă antigenului Lp descris de Berg [9], este un indicator al polimorfismului genetic al lipoproteinelor ce nu pare să aibă implicații patologice, găsindu-se deopotrivă la 10% subiecți dislipemici și rudele lor normale. Demonstrarea antigenului Lp se face examinând fracțiunile alfa + beta cu ajutorul electroforezei, care permite decelarea unei benzi prebeta absentă în mod normal în această fracțiune și a cărei importanță biologică nu se cunoaște încă.
- c.) Antigenul Lp diferă de "retro-alfa-lipoproteine" care migrează imediat în urma benzii alfa, deci are cam aceeași mobilitate electroforetică dar, care, spre deosebire de SPB nu este precipitat cu sulfat de dextran. Retroalfa apare ca o bandă îngustă, slab colorată, localizată între zona beta și alfa, de obicei mărginită de alfa-lipoproteine. Această bandă cu aspect particular este rară la subiecții normali, dar se întâlnește frecvent în plasma subiecților obezi hipergliceridemici asociată cu diabetul sau afecțiunile hepatice. Lipoproteina retroalfa are densitate cuprinsă între 1,063 și 1,21 g/ml și reacționează cu antiserul alfa-lipoproteinelor în imunoelectroforeză.
- d.) "Lipoproteina X" LP-X este denumirea dată unor asocieri particulare de fosfolipide, colesterol și apoproteină-VLDL întâlnite în afecțiunile hepatice obstructive [103]. Se pare că este vorba de lipoproteine cu densitate joasă, cu compoziție și proprietăți anormale. Poate fi separată prin metoda de precipitare Cohn și este identificabilă printr-un anticorp care reacționează și cu apo-VLDL. Are mobilitate electroforetică mai mică decât fracțiunea beta în agaroză sau pe hârtie, dar o migrare specifică, în direcția catodică în gel de agar. Datorită prezenței colesterolului liber și fosfolipidelor se colorează slab cu coloranți specifici lipidelor. Lipoproteina X este însoțită frecvent de o diminuare sau chiar dispariție a lipoproteinei alfa.
- e.) Alfa-lipoproteinele anormale în colostază, cu mobilitate electroforetică variabilă din poziția alfa₁-globulinelor până în poziția beta-globulinelor. Studiul asupra lipoproteinelor lejere filtrate pe gel de Sephadex a demonstrat eterogenitatea lor și în ceea ce privește greutatea moleculară, unele având valori apropiate de ale fracțiunii HDL datorate unei cantități anormal de mare de fosfolipide, în proporție asemănătoare celei găsite în

mod normal în HDL. Aceste alfa-lipoproteine anormale sunt precipitate împreună cu lipoproteinele beta de către heparină în prezența ionilor de calciu. Precipitatul examinat prin imunoelectroforeză în prezența antiserului antilipoproteinelor colostazei obținut la iepure prezintă un arc de lipoproteine normale, un arc de lipoproteine cu mobilitate beta, dar cu poziție antigenică alfa, situat aproape de start și unul, sau mai frecvent două arcuri de lipoproteine particulare în apropierea startului care nu reacționează nici cu serurile imune antibeta, nici cu serurile imune antialfa. Același precipitat în prezența antiserului uman normal formează două arcuri de precipitare care corespund alfa- și beta-lipoproteinelor.

- f.) VLDL anormal în maladia Tangier [6] care se mai poate detecta pe baza unei apoproteine VLDL cu mobilitate beta în boli severe ale parenchimului hepatic.

2.2.10. Evaluarea lipoproteinelor obținute prin electroforeză

Modelele structurale ale lipoproteinelor plasmatice obținute prin metode electroforetice sunt de un real folos în clasificarea diferitelor tipuri de hiperlipoproteinemii, motiv pentru care apare necesară evaluarea lor cantitativă.

Citirea modelelor lipoproteice se realizează cu ajutorul unui densitometru cu integrare automată. Modelele înregistrate sunt divizate în zone corespunzătoare celor 4 familii majore de lipoproteine: alfa, prebeta, beta și chilomicroni. Unitățile de înregistrare ale ariei de integrare care corespund diferitelor fracțiuni lipoproteice sunt trasate manual. Limita alfa-lipoproteinelor este ușor de definit. De remarcat faptul că cea mai importantă și, în același timp, cea mai dificilă demarcație este cea între fracțiunile prebeta și beta. Cele mai bune rezultate au fost obținute prin separarea lor în punctul de mijloc dintre cele două linii perpendiculare pe linia de bază, situate la nivelul primei și a celei de a doua deviații perceptibile față de linia dreaptă care descrie panta descendentă a vârfului fracțiunii beta. Această demarcație nu este posibilă în cazul în care componenta prebeta este mai mare decât beta. În această situație particulară, limita principală a componentei prebeta este marcată în punctul de întoarcere a curbei treni la linia de bază. Delimitarea chilomicronilor, când aceștia există, nu ridică probleme deosebite, deoarece se găsesc la start sau în apropierea acestuia. Limitele între fracțiuni sunt notate pe linia de bază, iar proiecțiile lor verticale sunt marcate pe linia de integrare. Concentrația diferitelor clase de lipoproteine se exprimă procentual.

Deși o estimare aproximativă a nivelului beta și prebeta lipoproteinelor poate fi dedusă din determinările chimice ale colesterolului și trigliceridelor, o interpretare strictă pe această linie poate duce la erori, în cazul unor anomalii clinice. În timp ce corelația între concentrația colesterolului și nivelul

fracțiunii beta este semnificativă în toate grupele și pare să reflecte o legătură structurală între aceste elemente, trigliceridele nu arată același grad de corelare. S-au menționat cazuri în care prebeta depășește limitele superioare ale normalului în prezența unor concentrații normale ale trigliceridelor, deci fără semnificație patologică [34]. Nici concentrația alfa-lipoproteinelor nu poate fi estimată direct din concentrația plasmatică a colesterolului și trigliceridelor. Din aceste motive s-a considerat că metodele electroforetice au doar o valoare semicantitativă, deoarece simpla evaluare a concentrațiilor diferitelor familii de lipoproteine separate prin electroforeză nu dă indicații riguroase.

În ultimul timp, evaluarea cantitativă a lipoproteinelor plasmatice a devenit tot mai importantă în investigarea tulburărilor metabolismului lipidic, îndeosebi în studiile epidemiologice asupra afecțiunilor aterosclerotice și în urmărirea în timp a efectului dietei restrictive, precum și al tratamentului hipolipemiant.

Folosirea electroforezei pe hârtie, care s-a bucurat de succes la început datorită lucrărilor lui Fredrickson și Lees [38], a fost limitată datorită unui mare dezavantaj, și anume: lipsa unei bune separări între lipoproteinele beta și prebeta, care determină dificultăți în interpretarea exactă și evaluarea cantitativă a rezultatelor.

Studiile efectuate au demonstrat că electroforeza în gel de agaroză este o metodă cantitativă corespunzătoare scopurilor clinice, având în vedere proporționalitatea între cantitatea de lipoproteine plasmatice și intensitatea de culoare demonstrată pentru toate fracțiunile lipoproteice, care indică o legătură între intensitatea de culoare și concentrația totală de lipide plasmatice.

Electroforegrama în agaroză evidențiază de obicei 5 fracțiuni:

- două fracțiuni cu mobilitatea cea mai mare, cunoscute în literatură ca lipoproteine alfa și pentru care Dyeberg și Hjorne [34] propun o distincție în “pre-alfa” și “alfa” pentru “complexul alfa-proteinelor”, prin analogie cu “complexul de lipoproteine beta” divizat în beta și prebeta-lipoproteine;
- o fracțiune prebeta în cantități detectabile la aproape toți subiecții, inclusiv la cei tineri;
- fracțiunea beta, bine separată de prebeta;
- adesea, o trenă de chilomicroni în cantități detectabile, totuși foarte mici, la un număr mare de subiecți după o noapte de post.

Mai jos, (tabel 2.1) este prezentată valoarea medie relativă, exprimată în procente, a fracțiunilor lipoproteice la subiectul normal.

Tabelul 2.1 Frațiunea lipoproteică (valoarea medie relativă) la subiecții normali

Frațiunea lipoproteică	%
Alfa-lipoproteine	22 – 38
Prebeta-lipoproteine	7 – 25
Beta-lipoproteine	45 – 63
Chilomicroni	0 – 4

Evaluarea cantitativă a conținutului în lipoproteine s-a făcut prin exprimarea intensității de culoare a fiecărei fracțiuni individuale ca procent din intensitatea totală de culoare, raportată la concentrația de lipide totale plasmatică [34].

Precizia metodei care exprimă rezultatele cantitative ca lipide lipoproteice a fost găsită satisfăcătoare, cu o deviație standard de 10-25 mg/100 ml pe cele 5 fracțiuni lipoproteice. Deoarece intensitatea de culoare a benzilor diferitelor familii de lipoproteine raportată la unitatea de greutate diferă mult, a devenit necesară determinarea factorului de culoare care normalizează valorile componentelor alfa și prebeta pentru cantități echivalente de beta-lipoproteine, prin două metode de standardizare:

- variațiile zilnice în intensitatea de culoare au fost normalizate față de valorile pentru fracțiunea beta a serului normal înghețat, care este inclus ca martor în fiecare migrare electroforetică;
- variațiile în cantitatea fiecărei probe de plasmă aplicate pe gel, ca și cele în intensitatea de culoare a probei au fost normalizate prin procedeul de calcul, utilizând concomitent măsurarea concentrației lipidelor totale, colesterolului, trigliceridelor și fosfolipidelor.

Factorii de corecție pentru valorile extincției diferitelor benzi de lipoproteine, obținute după separarea electroforetică, colorare și eluare, au fost calculați pe baza compoziției medii a lipidelor diferitelor lipoproteine și a intensității de culoare relativă pe unitatea de greutate pentru lipidele care iau parte la complexe lipoproteice. Folosind corecția valorilor de extincție, concentrația lipidelor totale plasmatică și raportul proteine/lipide al lipoproteinelor se obțin rezultate mai corecte în analizele de lipoproteine prin metoda electroforetică.

Compoziția relativă a lipidelor fracțiunilor lipoproteice date se exprimă prin simbolurile u , v , x , y și z în care: u indică conținutul relativ în trigliceride; v colesterol; x esteri de colesterol; y fosfolipide, z acizi grași. Aceste simboluri sunt reunite în ecuația:

$$u + v + x + y + z = 100.$$

Intensitatea de culoare relativă a lipidelor este exprimată prin simbolurile a , b , c , d și e , în care a se referă la trigliceride, b la colesterol, c la esteri de colesterol, d la fosfolipide și e la acizi grași. Valorile acestor

simboluri vor fi exprimate în funcție de lipidele cu cea mai mare intensitate de culoare pe unitatea de greutate.

“E” reprezintă valoarea extincției obținută prin evaluarea unei fracțiuni lipoproteice sau a sumei fracțiunilor lipoproteice colorate cu Sudan black. Dacă toate lipidele s-ar colora cu același grad de intensitate în funcție de greutatea lor, se poate defini simbolul E' care este un parametru ideal.

Cu ajutorul simbolurilor menționate pot fi elaborate calculele pentru diferite fracțiuni lipoproteice. Pentru alfa-lipoproteine aceste ecuații vor fi:

$$\begin{aligned} E_{\text{alfa}} &= E_{TG\text{ alfa}} + E_{C\text{ alfa}} + E_{CE\text{ alfa}} + E_{PL\text{ alfa}} + E_{FA\text{ alfa}} \\ E'_{\text{alfa}} &= E'_{TG\text{ alfa}} + E'_{C\text{ alfa}} + E'_{CE\text{ alfa}} + E'_{PL\text{ alfa}} + E'_{FA\text{ alfa}} \\ E'_{TG\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot u_{\text{alfa}} \\ E'_{C\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot v_{\text{alfa}} \\ E'_{CE\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot x_{\text{alfa}} \\ E'_{PL\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot y_{\text{alfa}} \\ E'_{FA\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot z_{\text{alfa}} \end{aligned}$$

Relația între E și E' este dată de ecuațiile:

$$\begin{aligned} E_{TG\text{ alfa}} &= E'_{TG\text{ alfa}} \cdot a \\ E_{C\text{ alfa}} &= E'_{C\text{ alfa}} \cdot b \\ E_{CE\text{ alfa}} &= E'_{CE\text{ alfa}} \cdot c \\ E_{PL\text{ alfa}} &= E'_{PL\text{ alfa}} \cdot d \\ E_{FA\text{ alfa}} &= E'_{FA\text{ alfa}} \cdot e \end{aligned}$$

Pe baza acestor două grupe de ecuații se obțin în continuare ecuațiile:

$$\begin{aligned} E_{TG\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot u_{\text{alfa}} \cdot a \\ E_{C\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot v_{\text{alfa}} \cdot b \\ E_{CE\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot x_{\text{alfa}} \cdot c \\ E_{PL\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot y_{\text{alfa}} \cdot d \\ E_{FA\text{ alfa}} &= E'_{\text{alfa}} \cdot z_{\text{alfa}} \cdot e \end{aligned}$$

În continuare derivă:

$$E_{\text{alfa}} = E'_{\text{alfa}} (u_{\alpha} \cdot a + v_{\alpha} \cdot b + x_{\alpha} \cdot c + y_{\alpha} \cdot d + z_{\alpha} \cdot e)$$

$$\text{sau } E'_{\text{alfa}} = E_{\text{alfa}} \cdot \frac{1}{u_{\alpha} \cdot a + v_{\alpha} \cdot b + x_{\alpha} \cdot c + y_{\alpha} \cdot d + z_{\alpha} \cdot e}$$

$$\text{sau } E'_{\text{alfa}} = E_{\text{alfa}} \cdot F_{\text{alfa}}$$

$$\text{în care: } F_{\text{alfa}} = \frac{1}{u_{\alpha} \cdot a + v_{\alpha} \cdot b + x_{\alpha} \cdot c + y_{\alpha} \cdot d + z_{\alpha} \cdot e}$$

În același mod se obțin ecuațiile:

$$E'_{\text{beta}} = E_{\text{beta}} \cdot F_{\text{beta}}$$

$$\text{unde: } F_{\text{beta}} = \frac{1}{u_{\beta} \cdot a + v_{\beta} \cdot b + x_{\beta} \cdot c + y_{\beta} \cdot d + z_{\beta} \cdot e}$$

$$E'_{\text{p}} = E_{\text{p}} \cdot F_{\text{p}}$$

$$\text{unde: } F_p = \frac{l}{u_p \cdot a + v_p \cdot b + x_p \cdot c + y_p \cdot d + z_p \cdot e}$$

$$E'_{ch} = E_{ch} \cdot F_{ch}$$

$$\text{unde: } F_{ch} = \frac{l}{u_{ch} \cdot a + v_{ch} \cdot b + x_{ch} \cdot c + y_{ch} \cdot d + z_{ch} \cdot e}$$

Folosind un amestec de lipide s-au calculat factorii de corecție și s-au găsit următoarele valori:

$$F_{alfa} = 2,12$$

$$F_{beta} = 1,60$$

$$F_p = 1,60$$

$$F_{ch} = 1,35$$

Pe baza factorilor de corecție aplicați la rezultatele electroforezei cantitative a lipoproteinelor se pot obține valorile lipoproteinelor. Datorită capacității mari de separare a fracțiunilor, reproductibilității și concordanței cu rezultatele furnizate de ultracentrifugarea analitică, estimarea lipoproteinelor prin electroforeză în gel de agaroză este considerată o metodă cantitativă corespunzătoare scopurilor clinice.

Pentru transformarea caracterului semicantitativ al electroforezei într-un caracter cantitativ, s-a propus și tipizarea modelelor lipoproteice [51]. Există cel puțin 4 scopuri pentru care electroforeza cantitativă este folositoare când aceasta devine posibilă:

- furnizează date numerice asupra fiecărei clase de lipoproteine care pot fi comparate cu nivelul normal și limitele de diagnostic în același mod în care le-ar fi dat dozarea lipidelor serice și ultracentrifugarea;
- furnizează date asupra lipoproteinelor unui mare număr de subiecți în studiile epidemiologice;
- dau o informare diagnostică specifică care, în lipsa electroforezei, este obținută numai indirect, prin procedee foarte complexe, de exemplu: concentrarea beta-lipoproteinelor în diagnosticul diferențial al tipurilor II și III și concentrarea alfa-lipoproteinelor în stabilirea predispoziției familiale la cancer;
- pentru evaluarea cantitativă a eficacității tratamentului dietetic sau medicamentos.

Definiția corectă a modelelor lipoproteice printr-o abordare sistematică depinde foarte mult de standardizarea secvențelor analitice ale electroforezei. După cum am arătat, înghețarea și dezghețarea alterează modelele lipoproteice. Același efect are și repausul îndelungat, care face ca modelele electroforetice să se deterioreze treptat, primele modificări constând în descreșterea limitelor clare ale benzilor corespunzătoare familiilor de

lipoproteine. Deteriorarea lor este întârziată de unele substanțe (EDTA, antioxidanți) și depinde de temperatură, din care cauză trebuie evitată păstrarea sau manipularea îndelungată la temperatura camerei. Dacă este absolut necesar, probele pot fi păstrate mai multe luni în condiții ideale de temperatură și sterilitate.

Când este posibil, rezultatele electroforezei sunt raportate la cele furnizate de ultracentrifugarea analitică, care constituie în prezent standardul de laborator pentru măsurarea lipoproteinelor.

2.3. Metode ultracentrifugale

Studiile moderne asupra lipoproteinelor se bazează pe ultracentrifugare, care separă clasele de lipoproteine în funcție de masa și dimensiunile macromoleculare.

2.3.1. Prepararea fracțiunilor de lipoproteine totale

Stabilirea exactă a densității plasmei sau serului este destul de dificilă, deoarece depinde de variațiile în nivelul total de macromolecule și în compoziția de molecule mici, dar, în general, se consideră că are o densitate de 1,0063 g/ml.

Ultracentrifugarea plasmei la densitatea obișnuită a acesteia pentru o perioadă scurtă de timp, aproximativ 1 minut la 100.000g, aduce repede chilomicronii la suprafață. Ultracentrifugarea mai îndelungată la această densitate permite colectarea fracțiunii VLDL la suprafață. Densitatea plasmei poate fi variată prin adăugarea oxidului de deuteriu sau a unor săruri. Cel mai frecvent sunt folosite două sisteme de săruri monovalente: NaCl în studiile asupra lipoproteinelor cu densitate joasă și NaCl – NaBr în studiile asupra lipoproteinelor cu densitate mare.

Pentru ca soluțiile de săruri să fie pure și reproductive, se recomandă folosirea numai a sărurilor uscate obținute prin calcinare timp de 10 – 12 ore la 550°C și păstrarea într-un exicator până în momentul întrebuirii.

Concentrația soluțiilor folosite pentru corectarea densității va fi exprimată ca o concentrație molală (moli/1000 g H₂O) pentru a evita dependența rezultatelor de temperatură, întrucât prepararea soluțiilor și manipularea lor la temperatură riguros controlată este dificilă.

Obținerea soluțiilor cu densitate dată este relativ ușoară și se face pe baza unor tabele ale dispozitivului computer, dar manipularea exactă a densității plasmei sau serului ridică unele probleme legate de creșterea semnificativă a volumului inițial de soluție prin adăugarea unor cantități mari de săruri și deci de variația în cantitatea de macromolecule totale și în compoziția fondului de molecule mici. Pentru obținerea unei densități precise se ia în considerație raportul interpolat al masei sării, la masa apei care, fiind

valabil pentru densitatea inițială și cea finală, servește la stabilirea prin calcul a cantității de sare care trebuie să aducă soluția inițială la densitatea finală. De asemenea, cunoscându-se masa inițială a apei și sării, masa de sare adăugată și densitatea finală a soluției, se poate deduce volumul soluției finale. Frațiunile de ultracentrifugare preparativă necesare pentru ultracentrifuga analitică sunt fracțiuni de lipoproteine totale cu densitate sub 1,006; 1,063 și 1,203 g/ml și se obțin prin amestecul corespunzător a 2 ml ser cu 4 ml din următoarele soluții:

0,195 m NaCl ($\rho = 1,0063$ g/ml)

2,505 m NaCl ($\rho = 1,0915$ g/ml)

0,195 m NaCl + 4,507 m NaBr ($\rho = 1,3104$ g/ml)

(în care m = concentrația molală exprimată în moli/1 000g H₂O).

Toate aceste soluții conțin etilendiaminotetraacetat disodic în concentrație de 10 mg/100 ml.

Centrifugarea se face în eprubete de nitrat de celuloză supuse unui tratament special, și măsurate cu atenție în lungime și diametru. Eprubetele supradimensionate se țin în apă caldă câteva zile pentru reducerea dimensiunilor. Înainte de ultracentrifugare, eprubetele sunt imersate în apă caldă peste noapte, limpezite cu apă obișnuită de 10 ori, imersate peste noapte în apă distilată, clătite cu apă distilată de 3 ori, și apoi uscate două zile la 37°C într-un cuptor perfect curat, fără particule de praf în suspensie.

Folosirea soluțiilor cu densitate progresivă permite flotarea claselor de lipoproteine din ce în ce mai grele, care conțin din ce în ce mai puține lipide. Diferiți autori au folosit densități diferite de solvent. Metoda cea mai frecvent adoptată este cea a lui Havel, Eder și Bragdon [52] cu solvent care corectează densitatea serului la 1,006; 1,019 și 1,063 pentru separarea lipoproteinelor. În tehnica clasică, plasma este mai întâi centrifugată 16 ore la 110.000 x g, ceea ce permite flotarea chilomicronilor și prebeta-lipoproteinelor. Densitatea eficace care determină această separare este densitatea plasmei excluzând vârfurile densității proteinelor (1,006 g/ml) și nu densitatea plasmei întregi (1,029). Se știe că lipoproteinele au o densitate mai mică decât alte proteine plasmatică, cuprinsă între 0,93 și 1,16 în timp ce densitatea proteinelor variază între 1,33 și 1,37. Frațiunea superioară este recuperată cantitativ. Ceea ce rămâne se transferă în altă eprubetă, iar densitatea este corectată cu KBr sau NaBr la valoarea de 1,063. Aceeași forță centrifugă aplicată timp de 22 ore permite flotarea beta-lipoproteinelor. Un ultim transfer al rezidului, corectarea densității la 1,21 și o ultracentrifugare de 22-24 ore separă alfa-lipoproteinele de alte proteine plasmatică. Frațiunile de lipoproteine totale sunt supuse unei dialize pentru îndepărtarea soluțiilor concentrate de săruri care au servit la corectarea densităților. Deși vitezele mai mari reduc timpul de ultracentrifugare, creșterea riscului de fragmentare a eprubetei de centrifugă, însoțită implicit de pierderi în probă, a impus în procedeele moderne de ultracentrifugare preparativă, reducerea vitezei de

ultracentrifugare. Astfel ultracentrifugarea fracțiunilor cu densitate mai joasă (LDL) are loc la 40 000 r.p.m. timp de 18 ore la 18°C, iar a fracțiunilor de lipoproteine cu densitate mare (HDL) în aceleași condiții de temperatură, cu aceeași viteză, timp de 24-26 ore.

Unii autori recomandă umplerea aproape totală a eprubetelor de ultracentrifugare preparativă cu material suplimentar pentru reducerea pierderilor de probă în cazul unor viteze mari de rotație, procedeu care are însă dezavantajul îndepărtării cu mai mare dificultate a fracțiunilor lipoproteinelor separate. [95]

2.3.2. Ultracentrifugarea secvențială sau separatoare

În prima etapă s-a obținut separarea familiilor majore de lipoproteine în două fracțiuni: ultracentrifugarea la densitate 1,006 separă fracțiunea chilomicronilor + prebeta, care ajunge în partea superioară a tubului, de fracțiunea alfa + beta care formează reziduul, în acesta din urmă fiind incluse și toate celelalte proteine plasmatică. Ultracentrifugarea separatoare realizează izolarea fiecărei fracțiuni lipoproteice. O problemă mai dificilă este separarea chilomicronilor exogeni de lipoproteinele endogene cu densitate foarte joasă. În prezent, chilomicronii sunt definiți ca lipoproteine a căror viteză de flotare depășește valoarea 400, iar lipoproteinele cu densitate foarte joasă sunt lipoproteine cu viteză de flotare între 20 și 400. Această definiție nu corespunde întru totul realității deoarece cele două clase se pot suprapune parțial (există lipoproteine exogene a căror valoare Sf este sub 400 și lipoproteine endogene a căror valoare Sf depășește 400), dar este acceptată cu caracter operațional.

Chilomicronii, când sunt prezenți în cantitate mare în ser, pot fi obținuți prin ultracentrifugarea serului cu $\rho = 1,0259$ g/ml la 23°C cu o viteză de 25000 r.p.m. În acest caz se folosește rotorul SW 25,3 cu manșoane pentru eprubete de ultracentrifugare preparativă de 0,5x 2,5. La valorile serice $\eta = 1,755$ și $\rho = 1,0259$ g/ml și o temperatură de 23°C este necesară o centrifugare de $5,74 \times 10^6$ g/min, timp de 79,9 minute de centrifugare la viteza maximă de 25 000 r.p.m. (în care se include și timpii de accelerare și încetinire). După centrifugare eprubetele sunt îndepărtate din manșoane și menținute înclinate sub un unghi de 45°. Se șterge fundul eprubetei cu un tifon înmuiat în apă distilată, se usucă și apoi se înțeapă partea cea mai de jos a eprubetei și se colectează 6,5 ml subnatant reprezentat prin fracțiunea cu Sf sub 400. Supranatantul de 0,5 ml conține lipoproteine cu Sf peste 400, dar și o oarecare cantitate de lipoproteine cu densitate foarte joasă, Sf 20-400. În prepararea fracțiunilor VLDL, îndepărtarea supernatantului prezintă avantajul că îndepărtează lipoproteinele Sf peste 400, dar și dezavantajul că e însoțită de o regăsire parțială a VLDL în subnatant; cu toate acestea este recomandată

în cazul serurilor cu cantitate mare de chilomicroni, deoarece avantajele sunt mai mari decât dezavantajele.

Pentru izolarea secvențială a fracțiunilor VLDL, LDL și HDL se supune centrifugării la 40 000 r.p.m. timp de 18 ore, un volum de 6 ml soluție serică care conține 2-6 ml infranatant seric cu Sf sub 400 corectat cu NaCl cu $\rho = 1,0063$ g/ml. În acest caz se folosește o ultracentrifugă preparativă Beckman cu rotor 40,3 sau 50,3 și cuve de nitrat de celuloză 0,5-2,5. Frațiunea VLDL din clasa Sf 20-400 este îndepărtată cantitativ în prima fracțiune de 1 ml, iar al doilea mililitru este luat ca referință. Apoi cei patru ml din partea inferioară sunt corecți cu 2 ml NaCl + NaBr la densitatea finală de 1,065 g/ml timp de 18 ore, care determină separarea LDL din Sf 0-20 în primul ml din partea superioară a eprubetei, iar al doilea ml este luat ca referință. Pentru separarea fracțiunii LDL se adaugă la cei 4 ml soluție rămasă 2 ml soluție NaCl + KBr pentru corecția densității la 1,216 g/ml și se supun ultracentrifugării 24-26 ore. Frațiunea HDL va fi recuperată din fracțiunea de 1 ml din partea superioară, iar următoarea fracțiune de 0,5 ml este luată ca referință.

Pentru verificarea densității soluțiilor serice de lucru se recomandă să se determine refractometric densitatea fiecărei fracțiuni, îndeosebi a celor de referință. Refractometrul este termostatat la $26 \pm 0,03^\circ\text{C}$, verificându-se temperatura.

În timpul ultracentrifugării preparative se produce o redistribuire apreciabilă a sărurilor, dinspre partea superioară spre cea inferioară a eprubetei preparative, a cărei intensitate depinde de natura și concentrația de săruri ca și de natura centrifugării. Practic, o picătură din soluția de lipoproteine se pune în centrul unei prisme de sticlă care este închisă imediat, iar după exact 1 minut se face citirea. Respectarea acestui interval de timp de la aplicarea probei până la citire este obligatorie, deoarece este suficient de scurt pentru a nu permite evaporarea semnificativă, dar și suficient pentru echilibrarea temperaturii. După fiecare determinare refractometrică se spală suprafața prismelor cu apă distilată și se șterge cu un tifon care nu lasă scame. Pentru corectarea densității se extrapolează densitatea celei de-a doua fracțiuni de 1 ml sau 0,5 ml pentru a obține indicele de refracție corespunzător mediului și densitatea fracțiunilor lipoproteice.

Pentru îndepărtarea cantitativă a fracțiunilor rezultate în urma ultracentrifugării preparative se consideră că cele mai bune rezultate se obțin prin pipetarea fracțiunii supernatante cu evaluare optică a limitelor ei și cu grijă pentru a nu perturba infranatantul. Pipetarea se va face într-o cameră întunecoasă, pe un dispozitiv de fixare pe care cade o rază de lumină focalizată care permite vizualizarea lipoproteinelor prin dispersie Tyndall.

De obicei clasele de lipoproteine sunt izolate în prima fracțiune de 1 ml rezultată în urma ultracentrifugării la densități diferite, iar a doua fracțiune de 1 ml este luată ca referință pentru determinarea refractometrică a concentrației

de bază a sărurilor. De aceea pentru fiecare fracțiune lipoproteică se fac două pipetări: a primului ml care conține cantitativ fracțiunea lipoproteică și a celui de al doilea ml (uneori 0,5 ml) care constituie mediul de referință pentru verificarea densității probei date prin refractometrie. Când însă una din clasele de lipoproteine este prezentă în ser în cantitate excesivă, se ia în considerație prima fracțiune de 2 ml, iar fracțiunea următoare de 1 ml este luată ca referință.

Fracțiunile izolate sunt păstrate în eprubete cu dop de 9 ml la 23°C.

În cazul în care ultracentrifugarea separatoare nu este urmată de ultracentrifugarea analitică, refractometria constituie singura metodă de evaluare a VLDL și LDL. Deoarece determinarea refractometrică nu necesită decât o picătură de fracțiune lipoproteică, fracțiunile pot servi în continuare la determinarea în ultracentrifuga analitică sau pentru determinări de lipide și proteine. Dacă se practică ulterior ultracentrifugarea analitică, refractometria servește la controlul concentrației lipoproteinelor și indică dacă centrifugarea are loc la concentrația optimă. Spre exemplu, dacă concentrația LDL depășește 1300 mg/100 ml, proba va fi diluată pentru a evita repetarea ultracentrifugării, care este costisitoare. În plus, dacă se determină refractometric serul total și se cunoaște conținutul total lipoproteic al serului, se poate calcula o valoare exactă și reproductibilă pentru proteinele serice totale.

2.3.3. Ultracentrifugarea analitică

Ultracentrifugarea analitică este tehnica de fracționare cea mai completă care permite obținerea unor tablouri complete ale compoziției și proprietăților fiecărei clase.

Ultracentrifugarea analitică se poate practica în urma ultracentrifugării preparative și va studia clasele de lipoproteine în funcție de densitatea și talia moleculelor. Această metodă poate determina cantitativ un număr aproape nelimitat de subclase Sf de lipoproteine care se deosebesc prin parametrii caracteristici ai densităților lor. Pentru studiile curente clinice sau experimentale sunt importante însă numai cele 4 familii de lipoproteine majore menționate.

În ultracentrifuga analitică se folosesc cuve obișnuite de 2,5 cu două sectoare: sectorul probei și sectorul liniei de bază, fiecare sector fiind umplut cu 0,415 ml cu ajutorul unor seringi calibrate. Cuvele sunt prevăzute cu piese centrale de 12 mm grosime, în fiecare piesă centrală existând un rezervor care permite egalizarea meniscului în ambele sectoare ale cuvei, însă fără schimb de lichid dintr-un sector în altul. După fiecare folosire, piesele centrale sunt spălate cu apă folosind un dispozitiv special tubular, apoi într-o baie de curățire ultrasonică, după care se clătesc cu apă distilată și se usucă cu un suflător de aer cald. Poziția exactă a cuvelor este foarte importantă în

determinarea lipoproteinelor flotante și cu toate că reglarea este asigurată în rotor cu ajutorul unui dispozitiv optic, uneori cuvele se rotesc ușor după reglare, ceea ce determină apariția de striatii în modelul limitelor succesive dintre fracțiunile lipoproteice. Modificarea poziției poate fi corectată prin folosirea unor cantități mici de ulei de silicon greu, care însă prezintă inconvenientul că modifică parțial greutatea cuvelor analitice.

Deoarece ultracentrifugarea lipoproteinelor presupune flotarea acestora în soluție de săruri, în timpul centrifugării se produce o redistribuire semnificativă a sărurilor. Reproductibilitatea fazei de accelerare a centrifugării în timpul căreia se produce o migrare semnificativă a macromoleculilor este asigurată de un accelerator automat, care face să crească intensitatea curentului de alimentare la motor de la 0 la 14 A în exact 10 secunde și menține curentul maxim constant până când se atinge viteza plină (FS).

Calitatea ultracentrifugării analitice pentru analiza lipoproteinelor se face corespunzător cu o cuvă de calibrare Beckman. Pentru determinările de rutină, operațiunea se repetă la intervale de 4 luni. De asemenea, este necesară efectuarea calibrării după orice manipulare a sistemului optic, sau după o modificare a sistemului de control. Deși se folosesc filme cu stabilitate mare, calibrarea se impune pentru fiecare lot nou de filme.

Concentrația lipoproteinelor se exprimă în mod curent ca masă pe unitatea de volum, cu toate că poate fi dedusă și din creșterea indicelui de refracție totală. Calculul concentrației se face pornind de la presupunerea că indicele de refracție specific (SRI) crește constant cu $0,00154 \Delta n/g/100 \text{ ml}$ pentru clasa Sf 0-400 de TLDL (LDL total) determinată în NaCl 1,063 g/ml. Pentru lipoproteinele cu densitate mare, concentrațiile sunt calculate pornind de la presupunerea unei creșteri constante a indicelui de refracție specific de $0,0149 \Delta n/g/100 \text{ ml}$ evaluat în NaBr 1,203 g/ml.

Ultracentrifuga analitică permite studiul fiecărei fracțiuni după viteza de flotare datorită unui sistem optic care înregistrează în serie, prin fotografiere, limitele lipoproteinelor flotante folosite apoi la determinarea concentrațiilor prin raportare la anumite condiții standard. Această tehnică de fracționare folosește ser cu densitatea de aproximativ 1,063. Lipoproteinele cu densitate sub 1,063 sunt descrise în termeni de "viteză de flotare" sau "coeficient de flotare". De obicei chilomicronii nu sunt evaluați prin această metodă, dar trebuie să fie separați și determinați în prealabil. Ultracentrifugarea analitică furnizează evaluarea cantitativă a fracțiunii LDL (Sf 0-20) și fracțiunii VLDL (Sf 20-400) și a multor subclase ai căror parametri variază între aceste limite de Sf. În mod obișnuit se iau în considerație fotografiile făcute la timpii 0; 6 și 30 de minute pentru determinările la densitate joasă a lipoproteinelor Sf 100-400, Sf 20-100 și respectiv, Sf 0-20, iar timpul 64 de minute este indicat pentru determinările la densitate mare. Totuși, când concentrația serului în lipoproteinele Sf 20-400

nu depășește 150 mg/100 ml, se recomandă ca lipoproteinele Sf 20-100 să fie evaluate în intervalul de două minute apropiat de momentul în care se atinge viteza maximă.

Toate datele pentru fiecare centrifugare sunt transcrise în sistemul de operare a computerului dând densitatea fiecărei fracțiuni, concentrația relativă la ser și condițiile centrifugării analitice. Apoi aceste date sunt prezentate în formă de grafic al spectrului care permite evaluarea optică rapidă, compararea probelor și obținerea mediilor pentru o populație dată, ca și calea de determinare a erorilor.

Constanta de sedimentare definită ca viteză pe unitatea de câmp, obținută pentru lipoproteine într-un mediu de densitate definită, este dată de relația:

$$S = \frac{v}{\omega \cdot 2^x} = \frac{M \cdot (1 - V \cdot d)}{F}$$

în care: v - viteza de sedimentare

x - distanța între particule și axa de rotație

ω - viteza unghiulară

d - densitatea

M - masa moleculară

V = volumul specific

F = coeficientul de fricție molară.

După cum rezultă din formulă, constanta de sedimentare este direct proporțională cu masa moleculară și invers proporțională cu coeficientul de fricție molară. Această constantă se exprimă în unități Svedberg.

Ultracentrifugarea analitică evidențiază 5 tipuri fundamentale, dar și o serie de modele care par să reprezinte variații sau combinații ale tipurilor de bază.

Ultracentrifugarea analitică este tehnica de fracționare cea mai indicată deoarece permite obținerea unor informații complete asupra compoziției fiecărei clase și a unui număr foarte mare de subclase de lipoproteine, precum și a proprietăților acestora, dar nu este accesibilă decât în unele laboratoare.

2.3.4 Ultracentrifugarea zonală

Ultracentrifugarea zonală permite izolarea simultană și rapidă a lipoproteinelor plasmatiche. Metoda se bazează pe separarea claselor lipoproteice prin centrifugare în gradient de densitate în rotoare zonale.

În tabelul 2.2 se prezintă parametrii caracteristici rotoarelor Beckman [114].

Tabel 2.2. Parametrii rotoarelor Beckman

Parametrii	Rotor	
	Ti-14	Ti-15
Volumul (ml)	650	1.665
Lungimea de undă (cm)	5,3	7,5
Rază maximală (cm)	6,67	8,89
Viteză maximală (r.p.m.)	48.000	35.000
Forță maximală	172.000	122.000
Forță maximă corectată pentru gradient (d = 1,4)	148.000	105.000

Soluțiile de lucru se pompează în interiorul rotorului printr-un canal spre centru sau prin intermediul a 4 linii din sept spre periferia rotorului. Deoarece mai frecvent probele de plasmă sunt plasate la periferia rotorului, separarea diferitelor clase de lipoproteine se face pe baza diferenței în viteza de flotare a acestora.

Concentrațiile corespunzătoare de săruri pentru izolarea claselor de lipoproteine sunt introduse prin liniile care duc la periferia rotorului, apoi se injectează proba în gradientul de densitate cel mai mare și se umple complet rotorul cu soluții adiționale cu densitate mare. Toate aceste operațiuni se desfășoară cu ansamblul static așezat în poziție de lucru pe rotorul care se învârtă la 3.000 r.p.m. după această etapă preliminară, se îndepărtează corpul static și se face centrifugarea la viteza și timpul dorit. Se micșorează apoi viteza rotorului la 3.000 r.p.m., se repune corpul static în poziție și se pompează, prin canalele periferice, o soluție cu densitate mare pentru a evacua conținutul rotorului prin linia de centru. Soluția care iese din rotor este colectată în porțiuni mici, de obicei 25 ml, și verificată la 280 nm.

Gradientul frecvent folosit pentru izolarea preparativă a lipoproteinelor plasmatică este de ordinul 1,0-1,4. În toate soluțiile de lucru s-a adăugat EDTA 1mM pentru a preveni denaturarea lipoproteinelor prin oxidare catalizată probabil de ioni metalici prezenți în sărurile folosite pentru realizarea gradientelor.

Clasele HDL, LDL, VLDL au fost identificate după 12-18 ore de centrifugare zonală în rotorul Ti-14 sau Ti-15, deși nu se obține separarea simultană cantitativă a fiecărei clase. HDL poate fi izolat corespunzător din lipoproteinele cu densitate mare după 24 ore de centrifugare, iar VLDL și LDL care se deplasează rapid în gradient de densitate și se unesc după centrifugare de 24 ore necesită un procedeu special, în două etape:

- etapa 1: se colectează VLDL + LDL după centrifugare de 2 ore sau 5 ore în rotorul Ti-14 și respectiv Ti-15. Se introduce gradientul proaspăt în

rotor după îndepărtarea VLDL și LDL pentru a reface soluția de gradient îndepărtată:

- etapa 2: se continuă centrifugarea 24 ore pentru separarea HDL de proteinele plasmatic reziduale cu densitate mai mare. Folosind acest procedeu, separarea cantitativă a fost obținută cu 20-50 ml plasmă în rotorul Ti-14 sau 20-150 ml în Ti-15.

Rotorul Ti-15 are putere de rezoluție mai mare ca Ti-14 și permite o mai bună vizualizare a vârfului asimetric în gradient. Frațiunea VLDL izolată în etapa 1 a fost subîmpărțită în 3 subgrupe: chilomicroni, VLDL și o fracțiune contaminată care pare a fi identificată cu proteinele serice cu densitate mai mare. Subfracționarea a fost desăvârșită prin centrifugarea fracțiunii VLDL-chilomicroni în rotorul Ti-14 timp de 30 minute, la 30 000 r.p.m. în gradient de densitate de ordinul 1-1,1.

Ultracentrifugarea în gradient de densitate în rotorul zonal este o metodă comodă și reproductibilă pentru izolarea preparativă a lipoproteinelor plasmatic. În același timp s-a evaluat capacitatea analitică a acestei metode prin subfracționarea particulelor care conțin trigliceride prezente în plasma subiecților după ingestia de hrană și s-a constatat că izolarea repetată, concentrarea și recentrifugarea diferitelor fracțiuni nu denaturează apreciabil lipoproteinele. O fracțiune dată migrează la recentrifugare în aceeași poziție dacă se respectă condițiile de centrifugare în ce privește gradientul de densitate, viteza și intervalul de timp.

Potențialul ultracentrifugării zonale în izolarea, subfracționarea și purificarea lipoproteinelor plasmatic, este dovedit și de profilul lipoproteic al fracțiunii HDL care arată două subclase distincte deși incomplet separate.

2.4. Alte metode

2.4.1. Metode nefelometrice

Proprietățile fizice – densitatea și mărimea – sunt aspecte caracteristice distinct ale lipoproteinelor, de aceea separarea lipoproteinelor pe baza mărimii particulelor reprezintă o modalitate tot atât de importantă de caracterizare a lipoproteinelor ca și tehnicile de separare bazate pe diferențele în densitatea acestora.

Lipoproteinele cu densitate foarte joasă, inclusiv chilomicronii, pot fi separate pe baza capacității lor de a trece prin filtru de membrană cu dimensiuni variate ale porilor care să permită trecerea exclusivă a particulelor de un anumit ordin de mărime. Această separare diferențială în funcție de mărimea particulelor dă o evaluare empirică a concentrației particulelor care dispersează lumina dintr-o probă dată, sau concentrația relativă a unor fracțiuni separate prin ultrafiltrare.

Nefelometria se bazează pe faptul că o rază de lumină care trece printr-o soluție coloidală sau suspensie își pierde intensitatea datorită dispersiei de către particulele suspendate în calea sa. Cantitatea de lumină dispersată crește proporțional cu numărul și mărimea particulelor și intensitatea luminii dispersate poate fi evaluată cu un fotometru corespunzător. La acest studiu se pretează îndeosebi lipoproteinele cu densitate foarte joasă (Sf 10-20), care cuprind particule cu mărimea de aproximativ 0,02-1 μ , acest ordin de mărime dispersând o cantitate considerabilă de lumină.

Studiile asupra dispersiei luminii de către lipoproteinele serului uman nu sunt prea numeroase. Helson [76] a studiat dispersia luminii de către lipoproteinele serice, ajungând la concluzia că serul de post al subiecților normali are aceeași valoare a indicelui de dispersie a luminii și realizează curbele de toleranță la grăsimi bazate pe creșterea indicelui de dispersie în timpul chilomicronemiei induse.

Se știe că lipoproteinele cu diametru mare, îndeosebi cele peste 100 $m\mu$, bogate în trigliceride, determină creșterea turbidității serului. Legitatea raportului între turbiditate și nivelul trigliceridelor serice a fost studiată de Albrink și colab. [1], care consideră că lactescența este direct proporțională cu concentrația totală a trigliceridelor serice, concluzie infirmată parțial de Angervall [3] care afirmă că, deși există o legătură între turbiditate și trigliceridele serului de post, dispersia particulelor limitează valoarea screening - testului de turbiditate.

Se folosește nefelometrul pentru măsurarea lipemiei postprandiale, iar Bierman și colab. [12] evaluează concentrația de chilomicroni după floclare diferențiată în gradient de densitate. Pentru aceasta ei folosesc coloane speciale de floclare în care se obține o separare a două grupe, distincte ca mărime, de particule lipoproteice în plasma lipemică, și anume: particule primare de ordinul a 200 $m\mu$, care flotează în partea superioară a coloanelor și o distribuție considerabil mai mare a particulelor cu ordin de mărime 100-600 $m\mu$ similară pentru particulele primare și secundare.

Stone și colab. [108] studiază, pentru prima dată, corelația matematică între intensitatea de dispersie a luminii și nivelul trigliceridelor serice. Ei au propus o metodă simplă pentru estimarea concentrației lipoproteinelor bogate în trigliceride (Sf 0-20; 20-400 și peste 400) care folosește tehnica de filtrare prin membrană și nefelometria. Chilomicronii au fost separați de VLDL (Sf 20-400) prin filtrarea serului diluat, după care s-a evaluat concentrația particulelor în fiecare fracțiune prin măsurarea intensității luminii dispersate. S-a demonstrat o strânsă corelație între această măsurare a concentrației de VLDL și nivelul trigliceridelor serice. Totodată s-a demonstrat validitatea filtrării prin filtre de membrană și a nefelometriei pentru separarea și evaluarea cantitativă a particulelor cu ordinul de mărime care corespunde

lipoproteinelor din clasa Sf peste 400, care nu pot fi evaluate prin tehnica de ultracentrifugare.

În varianta inițială se proceda la măsurarea luminii dispersate prin probele de ser de post diluat sau nediluat cu ajutorul unui micronefelometru, această metodă servind ca screening-test aplicabil unui număr mare de probe.

Ulterior s-a propus perfecționarea acestei tehnici, care constă în filtrarea serului diluat pentru separarea în clase a lipoproteinelor, în funcție de capacitatea lor de a trece prin membrane de esteri ai celulozei cu mărime dată a porilor și evaluarea concentrației relative a particulelor de diferite mărimi prin măsurarea modificărilor în intensitatea luminii dispersate după fiecare filtrare.

Material și metodă

Se recoltează sânge de la subiecți după 14 ore de post. Se lasă să se închege la temperatura camerei, se centrifughează 20 minute la 3.000 r.p.m. și apoi se decantează serul cu mare atenție. Se repetă centrifugarea pentru a înlătura orice alte particule care dispersează lumina și ar putea interfera astfel în dozare.

Evaluarea are loc în două etape: ultrafiltrarea și măsurarea intensității dispersiei luminii.

- a.) Ultrafiltrarea. Filtrarea preliminară se folosește ca procedeu de rutină pentru îndepărtarea particulelor cu diametrul sub $0,4\mu$ care influențează slab, dar relativ constant, intensitatea luminii dispersate. Probele de ser se diluează în seringi de plastic; filtrarea se face prin filtru de membrană cu diametrul de $0,45\mu$ având grijă să se înlătore primele 10 picături de filtrat și se colectează următorii 2,5 ml probă pentru estimarea intensității luminii dispersate într-un micronefelometru. Restul probei care trece prin filtrul membranei respective se colectează într-un cilindru gradat și se recuperează apoi într-o seringă de plastic uscată, de unde este trecut în continuare printr-un filtru de membrană de $0,1\mu$. Operațiunea este similară celei dinainte, adică primele 10 picături se aruncă, următorii 2,5 ml se folosesc pentru măsurarea intensității luminii dispersate. Aliquotele de 2,5 ml se lasă în repaus cel puțin 10 minute, apoi se agită cu grijă pentru omogenizare, evitându-se formarea bulelor de aer.
- b.) Măsurarea intensității luminii dispersate. Determinările au arătat că intensitatea luminii dispersate de către serul nediluat este proporțională cu conținutul în trigliceride până la o concentrație de 200mg/100 ml. La această concentrație a trigliceridelor, probele de ser apar clare sau foarte slab opalescente la testul plasmei de repaus, putând fi folosite fără diluție.

Probele cu concentrație mai mare de trigliceride, de la slab opalescente la intens lactescente, nu pot fi folosite ca atare și se diluează până când apar clare sau numai slab opalescente. Pentru ser clar sau slab opalescent se

folosesc 2,5 ml ser nediluat. Pentru ser lactescent se face diluția serului (frecvent 1:10) în ser fiziologic, în care caz se folosesc 0,25 ml ser.

În general se fac 4 determinări:

1. Ser nediluat
2. Ser diluat 1:10 ser fiziologic, 0,9% nefiltrat
3. Ser diluat 1:10, după trecerea prin filtrul de membrană 0,45 μ
4. Filtrat din etapa anterioară, după trecerea prin filtrul de membrană 0,1 μ .

Dacă este necesară separarea fracțiunii VLDL se procedează la filtrarea soluției rezultate din ultima etapă prin filtru de membrană cu mărimea porilor sub 0,1 μ .

Concentrația lipoproteinelor din clasa Sf peste 400 este măsurată în unități de intensitate a luminii dispersate și se exprimă prin simbolul chilomicroni (LDI). Convertirea acestui simbol în concentrație aproximativă de lipoproteine exprimată în mg/100ml ser se face conform ecuațiilor:

$$\text{Tg-chilomicroni} = \text{chilomicroni (LDI)} \times 0,75 \text{ mg/100 ml}$$

Dat fiind că Tg-chilomicroni total = 85% din masa lipoproteinei respective, obținem ecuația:

$$\text{Concentrația Sf peste 400} = \text{chilomicroni (LDI)} \times 0,75 \times 100/85 \text{ mg/100 ml} = \text{chilomicroni (LDI)} \times 0,9 \text{ mg/100 ml.}$$

Experiența a demonstrat că bilirubina interferă absorbind o mare cantitate de lumină roșie (650nm) și determinând rezultate fals crescute, ceea ce impune diluarea serului intens icteric 1:10 cu ser fiziologic. La această diluție absorbția devine neglijabilă și nu afectează semnificativ rezultatele.

Hemoliza nu modifică intensitatea luminii dispersate, deci nu se impun precauții speciale legate de acest fenomen.

Constatarea dependenței indicelui de dispersie a luminii față de temperatură, care se manifestă în descreșterea valorii sale în medie cu 0,9% pentru fiecare creștere a temperaturii cu 1°C a impus necesitatea standardizării temperaturii de citire a probelor la 20°C.

Efectuarea determinărilor nefelometrice trebuie să aibă loc cât mai repede după recoltare, la câteva ore de la prepararea probelor de ser care sunt menținute tot timpul la 20°C, deoarece păstrarea timp de 1-3 zile la 0-4°C determină modificarea intensității luminii dispersate cu aproximativ 5%. Probele păstrate timp mai îndelungat, chiar în stare filtrată, produc modificări pronunțate și variabile.

Compararea rezultatelor obținute prin filtrare de membrană combinată cu nefelometria, cu cele furnizate de ultracentrifugarea analitică [108], a demonstrat corelația între lipoproteinele din clasa Sf 20-400 și cele estimate nefelometric. Deși metodele nefelometrice nu furnizează o evaluare directă a concentrației lipoproteinelor din clasa Sf 0-20, acestea pot fi deduse cu un grad mare de exactitate din determinările nefelometrice și estimarea colesterolului seric total.

2.4.2. Metode imunochimice LP-X

Lipoproteina X (LP-X) are caracteristici chimice și imunochimice diferite de cele ale LDL normale datorită unui conținut bogat în colesterol și fosfolipide.

După completa delipidare prin etanol și eter la temperatură joasă aceste lipoproteine migrează în regiunea electroforetică alfa, spre deosebire de celelalte două fracțiuni ale lipoproteinelor beta: LP-A și LP-B care au mobilitate electroforetică obișnuită în poziția beta.

Partea proteică a LP-X (Apo-X) este constituită din 40% albumină și 60% apolipoproteină C (Apo-C). Deoarece albumina este înglobată în interiorul moleculei, nu se poate evidenția în LP-X nativ cu un antiser specific antialbuminic, scindarea ei necesitând un tratament energetic cu n-heptan sau cu fosfolipază A₂ care evidențiază albumina făcând posibilă reacția cu serul antialbuminic.

Apo-C constă în 3 componente antigenice, care la imunoelectroforeză în gel de agar, în prezența antiserului anti-LP-X, evidențiază 3 arcuri de precipitare diferite, iar la electroforeza în gel de poliacrilamid dau 3 benzi caracteristice cu migrare rapidă și o bandă slabă în apropierea startului, ceea ce demonstrează multiplicitatea antigenică a componentelor polipeptidice neidentice ale Apo-C.

LP-X nativ reacționează numai cu antiserul anti-LP-C.

Mobilitatea electroforetică a LP-X nativ este diferențiată după suport: LP-X migrează în poziția lipoproteinelor beta lente pe hârtie, agaroză, amidon, poliacrilamid și spre catod în gel de agar. În schimb, Apo-X are mobilitate alfa la electroforeza în gel de agar.

Material și metodă.

Dozarea LP-X este importantă în diagnostic și terapie. Se folosește ser prelevat dimineața și conservat la 4°C până în momentul utilizării. Nu se admite folosirea de ser înghețat în prealabil, deoarece înghețarea produce modificări ireversibile.

Cercetările au demonstrat că LP-X rămâne stabilă 3-4 luni dacă conservarea serului se face la 4°C, după care concentrația sa scade, din care cauză nu se permite păstrarea mai îndelungată a serului.

- Imunodifuziunea după Ouchterlony. Se aplică tehnica Ouchterlony modificată de Burstein care propune înlocuirea agarului cu agaroză 1% [19].

Se prepară agaroză 1% în tampon veronal pH = 8,2 și forță ionică 0,04 M, la care se adaugă lactat de calciu 2mM prin încălzire în baie de apă la 100°C. Se lasă agaroză să se răcească la 60°C, se toarnă pe suporturi în

cantitate de $0,1 \text{ ml/cm}^2$ și se lasă să se închege la temperatura camerei o oră. Dacă nu se folosește imediat, suporturile cu agaroză astfel preparate se pot conserva la 4°C . Difuziunea se practică în cameră umedă la 37°C , iar rezultatele se citesc după 24-48 ore.

Deoarece folosește un antiser monospecific anti-LP-X, care poate să reacționeze și cu Apo-C al VLDL, metoda Ouchterlony este mai puțin specifică decât metoda Seidel.

- Tehnica Seidel. Se bazează pe migrarea tipic catodică a LP-X în gel de agar și combină electroforeza în acest mediu cu precipitarea imunologică a lipoproteinelor în prezența unui antiser specific anti-LP-X [103].

Electroforeza se practică pe plăci de $8 \times 10 \text{ cm}$ pe care se toarnă gelul de agar 1% preparat în tampon veronal cu pH 8,6 și forță ionică 0,05 M. Aplicarea serului se poate face după 6 ore de la turnarea agarului. Dacă nu se poate respecta acest interval de timp, plăcile se pot conserva până la 48 de ore după prepararea în cameră umedă la temperatura camerei. Pentru migrarea electroforetică, se indică același tampon folosit și pentru prepararea agarului. Migrarea se face 60 minute la o tensiune de 8 v/cm , după care se îndepărtează orice urmă de lichid și se aplică antiserul anti LP-X.

Aplicarea antiserului se poate face în două moduri:

- fie într-un orificiu cu diametrul de 4 mm aflat între două orificii de însămânțare la distanță de 10 mm de latura catodică a migrării (în prezența lipoproteinei-X apare o bandă de precipitare la 2-10 mm de punctul de aplicare a serului);
- fie ca picătura ($10 \mu\text{l}$) aplicată pe suprafața gelului de agar la o distanță de 3-5 mm de orificiul unic, localizat totdeauna pe latura catodică a migrării. Difuziunea se realizează în cameră umedă la 37°C . În acest caz, precipitatul apare împrejurul locului de depunere a antiserului.

Când antiserul este depus ca picătură, apariția precipitatului durează 2-10 ore, în timp ce dacă depunerea se face în orificiu, precipitatul apare după 24-48 de ore. După apariția precipitatului se procedează la fixare prin imersia suportului în NaCl 0,9%, 24 de ore, după care se usucă gelul acoperit cu o hârtie de filtru umedă la 37°C . Apoi se face colorarea timp de 15 minute, în soluție de albastru Coomassie (Coomassie 0,2% în metanol/apă/acid acetic 9/9/2 v/v.)

- Imunoelectroforeza. Se practică în gel de agar 1% preparat cu tampon veronal pH 8,6 și forță ionică 0,05 M, orificiu de umplere fiind la egală distanță de anod și catod. Migrarea se face timp de 120 minute la o tensiune constantă de 8 v/cm , folosind în camera de electroforeză același tampon veronal. Imunodifuziunea se realizează în camera umedă la 37°C timp de 24-48 de ore, după care se face colorarea gelului după tehnica Seidel.

Mai recent, s-a propus o metodă care se bazează pe migrarea tipică catodică a LP-X la electroforeza în gel de agar și pe conținutul constant în fosfolipide.

2.4.3. Metode de precipitare

Metodele de precipitare se află printre cele mai vechi tehnici de fracționare a lipoproteinelor și sunt foarte utile în izolarea lipoproteinelor pure. S-au pus la punct metode pentru recunoașterea tuturor familiilor de lipoproteine prin precipitare diferențială.

Fracționarea cu alcool la temperaturi scăzute după tehnica Cohn permite separarea unei fracțiuni care include cea mai mare parte a lipoproteinelor beta și a unei fracțiuni bogate în alfa-lipoproteine.

Separarea clasei HDL se poate obține prin precipitarea celorlalte familii: LDL, VLDL și chilomicroni care formează complexe cu heparina sau sulfatul de dextran. În prezența cationilor de Mg^{2+} și Mn^{2+} , complexele respective precipită, lăsând în soluție numai HDL solubile.

Combinarea flotării cu precipitarea cu polivinilpirolidon în tehnica Gordis și Bierman este folosită pentru a separa particulele mari și a diferenția chilomicronii de VLDL. Această tehnică este utilă în distingerea hiperlipemiei endogene de cea exogenă și folosită îndeosebi în lucrările de preparare a fracțiunilor lipoproteice, deoarece particulele de floclare pot fi păstrate pentru dozările de lipide și alte analize.

Dozarea beta-lipoproteinelor prin metoda Burstein și Samaille.

Metoda Burstein [12] este una dintre puținele metode directe de evaluare a beta-lipoproteinelor, caracterizându-se prin mare exactitate și simplitate. Se pretează îndeosebi analizelor de serie, conținutul de beta-lipoproteine al serurilor nelipemice fiind apreciat ușor prin evaluarea turbidității înainte și după adăugarea clorurii de calciu în prezența căreia beta-lipoproteinele sunt precipitate selectiv de către heparină.

Reactivi:

- a) Clorura de calciu 25 mM. Se conservă la rece.
- b) Soluție de heparină și clorură de sodiu. Se obține prin adăugarea a 4 ml ser fiziologic la 1 ml soluție de heparină 1%.

Procedeu

Se pipetează în eprubete obișnuite 1 ml clorură de calciu, 0,02 ml soluție de heparină în ser fiziologic și 0,02 ml ser. Pentru fiecare probă se pregătește un blanc, procedându-se în mod similar, dar înlocuind soluția de heparină cu 0,02 ml apă distilată.

Se lasă în repaus la temperatura camerei aproximativ 5 minute, apoi se citește extincția probelor și blancurilor față de apă distilată sau extincția fiecărei probe față de blancul corespunzător la 640-650 m μ

Calcul

Rezultatele sunt indicate direct în unități de extincție, după formulele:

1. Turbiditatea serului: $E = A_1 \cdot VF/VA$; $E = A_1 \cdot 52$
2. Conținutul de beta-lipoproteine: $E = (A_2 - A_1) \cdot 52$
în care : $A_2 =$ extincția probei
 $A_1 =$ extincția blancului

Valorile normale

1. Turbiditatea serului: 0,01
2. Beta-lipoproteine: 4-10 U.E.

Determinările trebuie făcute în ziua recoltării sângelui.

2.4.4. Electrocromatografia

Electrocromatografia este o metodă de separare a lipoproteinelor plasmatică pentru analiza ulterioară a lipidelor, care combină electroforeza cu cromatografia și constă în migrarea particulelor în funcție de vectorul rezultat al vitezei electroforetice orizontale produse de un câmp electric orizontal, aplicat la baza ecranului și vitezei verticale a tamponului, într-un substrat reprezentat prin hârtie sau pulbere de celuloză. Problemele tehnice sunt rezolvate prin folosirea combinată a electrozilor spălați în trepte, care asigură curentul în plan orizontal și a unui distribuitor de tampon cu scurgere lentă, care asigură dimensiunea electrocromatografică.

În funcție de modul de aplicare a probei, se deosebesc:

- electrocromatografia continuă, când proba este aplicată neîntrerupt, iar fracțiunile sunt colectate pe măsura acumulării la partea inferioară a ecranului;
- electrocromatografia în stea, când proba este aplicată ca un spot și se developează în model bidimensional;
- o formă particulară este electrocromatografia bidimensională liberă.

Detalii tehnice

Probele de plasmă se precolorează cu Sudan negru B și se concentrează la 1/3 din volumul inițial prin ultrafiltrare, folosind un filtru membrană cu mărimea porilor sub 5m μ , sub un curent de azot cu presiunea 10 kg/cm².

Se aplică apoi 0,5 ml ser ca spot pe hârtie de filtru Whatman 3MM și se supune migrării timp de 3 ore cu un tampon veronal de pH 8,6 și forță ionică 0,033. La electrocromatografia în stea se aplică un curent constant de 27 mA și o tensiune inițială de 600 volți, care scade la 400 volți la sfârșitul

intervalului. După migrare, hârtia de filtru se usucă la 110°C, apoi zonele precolorate sunt tăiate și eluate.

Modelele electroforetice ale lipoproteinelor pot fi evidențiate prin precolorarea serului sau prin colorarea acestuia în urma migrării prin transferul colorantului nepolar din apă sau solventul organic la lipoproteine. Ambele metode de colorare rezolvă aspectele calitative, deoarece permit localizarea cu ușurință a zonelor corespunzătoare lipoproteinelor, dar ridică probleme de ordin cantitativ. Evaluarea fracțiunilor lipoproteice nu poate fi 100 % cantitativă întrucât uscarea hârtiei prin încălzire pentru fixarea proteinelor și prevenirea difuziei reduce intensitatea colorării datorită oxidării parțiale a lipidelor, iar solvenții nepolari dizolvă parțial colorantul și acizii grași. De asemenea, lipidele nesaturate, datorită prezenței dublelor legături, fixează o cantitate mai mare de colorant decât lipidele saturate.

Precolorarea prezintă avantajul că evită colorarea fondului și pierderea parțială a lipidelor în solventul organic în care se dizolvă colorantul, cu condiția ca și concentrația finală a solventului să rămână mică, pentru a evita denaturarea proteinelor.

Electrocromatografia evidențiază 4 fracțiuni:

- alfa-lipoproteinele (HDL, cu densitate cuprinsă între 1,063 și 1,210 g/ml)
- beta- lipoproteinele (LDL, cu densitate 1,019 – 1,063)
- alfa₂ –lipoproteinele (VLDL, cu densitate 1,006 – 1,019)
- chilomicronii (cu densitate sub 1,006 g/ml), a căror localizare pe bandă se face printr-o metodă standardizată bazată pe compararea modelelor necolorate, precolorate și postcolorate. Pentru aceasta se separă fracțiunile din banda umedă imediat după migrare, se extrag cu cloroform-metanol 2:1 (v/v) și se spală cu soluție apoasă de CaCl₂ pentru determinarea acizilor grași. Lipoproteinele destinate determinării celorlalte lipide sunt separate în același mod, dar fără precolorare. Eluția lipidelor din lipoproteinele separate prin electrocromatografie cu cloroform-metanol 2:1 fiind însoțită de pierderea fosfolipidelor în proporție de 10%, se recomandă procedeul de extracție cu cloroform-metanol-acid acetic. Fragmentele de bandă care conțin fracțiunile alfa și beta din 2 ml plasmă sunt liofilizate 15 ore și apoi extrase cu 100 ml cloroform-metanol 1:1, cu agitare continuă 15 ore. Se repetă extracția cu același solvent timp de 2 ore, apoi urmele de fosfolipide sunt extrase cu metanol-acid acetic 99:1 (v/v). Se combină extractele și se evaporă la uscat în atmosferă de azot la 40°C, iar extractul uscat se dizolvă în 15 ml cloroform-metanol 2:1. Calculul concentrațiilor absolute se face cu ajutorul lipoproteinelor plasmatice și al raportului de lipide în fracțiunile alfa și beta, evidențiind un procent crescut (99,2%) de regăsire a lipidelor.

Valoarea datelor furnizate

Electrocromatografia este o metodă rapidă, nu prea costisitoare, având și marele avantaj că produce lipoproteine pure, contaminarea fiind evitată prin migrarea acestora pe traiectorii proprii. Studiile comparative au arătat că electrocromatografia dă modele lipoproteice asemănătoare celor din sistemul Fredrickson [39] pentru tipurile II, III, și IV de hiperlipoproteinemie, diagnosticarea tipului IV fiind chiar mai fidelă prin electrocromatografie.

2.4.5. Combinarea metodelor

Unul din obiectivele fundamentale ale laboratorului de lipidologie este acela de a furniza date calitative și cantitative asupra lipidelor și lipoproteinelor serice.

Acest lucru este posibil prin combinarea metodelor de explorare redată în tabelul 2.3. Se detaliază modul de aplicare în clinică a acestor metode și interpretarea lor. În esență este vorba de cuantificarea lipidelor și lipoproteinelor serice. Dacă obținerea datelor cantitative asupra lipidelor serice este facilă, cuantificarea LP implică metode laborioase (lipidograme cantitative și/sau ultracentrifugare). În eventualitatea când acestea nu sunt accesibile se poate recurge la utilizarea unor "artificii" de cuantificare a L.P., bazate pe dozarea prealabilă a colesterolemiei și trigliceridemiei care vor fi introduse în următoarele formule:

$$\text{col. VLDL} = \text{TG seric}/5 \text{ în (mg \%)}$$

$$\text{col. LDL} = \text{colesterolemie} - (\text{col.VLDL} + \text{col. HDL}) \text{ în (mg\%)}$$

Concentrația LP se exprimă prin cantitatea de colesterol (col.) din lipoproteinele respective (col. VLDL; col. LDL; col HDL) în mg%. În mod convențional col HDL se consideră a fi 45.

Valoarea acestor "artificii" este, totuși, redusă pe de o parte, datorită limitelor de acuratețe și, pe de altă parte, datorită inaplicabilităților, în cazul prezenței în ser a beta-VLDL sau TG mai mari de 400 mg% .

Cuantificarea lipidelor și lipoproteinelor serice prin metodele expuse, determină indirect reducerea importanței celorlalte metode.

Aceasta se aplică totuși în laboratoarele de lipidologie în diferite circumstanțe.

Tabel 2.3. Principalele metode de explorare a lipidelor și lipoproteinelor serice; semnificația și valoarea lor în lipidologia clinică

Metode de explorare	Semnificații	Valoare clinică
Colesterolul seric total, trigliceridemia, lipidele serice totale, fosfolipidele serice, AGL-serici	cuantificarea lipidelor date calitative orientative asupra LP	etapă în diagnosticul lipidologic împreună cu testul chilomicronilor și a formulelor expuse permit cuantificarea LP
Testul chilomicronilor în observarea plasmei	date calitative orientative asupra LP	etapă în diagnosticul lipidologic
Lipidograma calitativă	date calitative, dar mai precise asupra LP	etapă în diagnosticul lipidologic
Lipidograma cantitativă	- cuantificarea LP (pasibilă de erori)	etapă superioară în diagnosticul lipidologic
Ultracentrifugarea analitică și preparativă	cuantificarea LP metode foarte exacte, dar foarte laborioase	etapă finală în diagnosticul lipidologic

Atunci când necesitățile o impun se recurge la explorări suplimentare:

- determinarea activității LPL, LCAT
- testul intravenos al toleranței la grăsimi.

CAPITOLUL 3

OPTIMIZAREA PROCESELOR (SISTEMELOR) ȘI ROLUL ACESTEIA ÎN CREȘTEREA PERFORMANȚELOR

La modul general operația de optimizare se utilizează în toate tehnologiile începând cu cele legate de microcipuri, continuând cu zborurile spațiale și terminând cu cele foarte simple din industria agroalimentară.

Desigur că nici domeniul medical și farmaceutic nu este exclus din această paletă largă, cu atât mai mult cu cât aici este vorba de rezolvarea unor probleme de optimizare legate de lupta împotriva unor boli uneori foarte periculoase pentru viața oamenilor.

Deoarece tema acestei lucrări se referă la îmbunătățirea performanțelor metodelor de investigare a dislipidemiilor, deci la instalații (sisteme) concrete cu ajutorul cărora se măsoară conținutul de lipide în sânge, este necesară cunoașterea principiilor de bază ale optimizării.

Extrapolând aceste principii pentru domeniul investigațiilor medicale, se poate realiza o abordare științifică originală și eficientă a temei propuse.

3.1. Considerații generale

O problemă de optimizare urmărește obținerea **soluției optime**, înțelegând prin aceasta **cea mai bună soluție (decizie) dintr-un anumit punct de vedere**. Odată ales punctul de vedere, respectiv criteriul de optimizare, soluția rezultă în mod obiectiv din problema complet formulată. În acest scop, este necesar să se transpună criteriul de optimizare într-o expresie matematică, denumită în mod frecvent funcție obiectiv, și să se descrie cantitativ interacțiunile și restricțiile variabilelor problemei într-un model matematic. Rămâne ca *soluția optimă să fie certă prin folosirea unei metode corespunzătoare de căutare a optimului* [80,81].

Soluția optimă nu trebuie să depindă de utilizare (în limita preciziei metodei alese), dar depinde în mod categoric de criteriul de optimizare ales.

Multiplicarea soluțiilor optime în raport cu criteriul de optimizare ales pune în mod natural problema arbitrarului, aparent deplasat de la alegerea

valorilor variabilelor la alegerea criteriului de optimizare. Fără a minimiza importanța acestui aspect, în special în probleme de artă sau chiar în viața de toate zilele, trebuie arătat că în problemele curente ale tehnologiei – proiectarea și exploatarea optimă a proceselor – gradele de libertate în alegerea criteriului de optimizare sunt practic iluzorii, singurul punct de vedere acceptabil din care se realizează optimizarea fiind cel economic [8].

Deși optimizarea nu este altceva decât o expresie a dorinței din totdeauna a omului către perfecțiune și deși, după cum va rezulta evident din capitolele următoare, multe dintre instrumentele matematice utilizate în operațiile de optimizare au fost create cu secole în urmă, dificilele și voluminoasele calcule necesare soluționării numerice a problemelor au exclus aplicabilitatea lor practică. Dezvoltarea vertiginoasă a metodelor automate de calcul, specifică secolului XX-lea, nu numai că a conferit noi atribute vechilor metode de calcul, dar a declanșat o adevărată avalanșă de cercetări în domeniul regăsit al optimizării. Drept rezultat al acestui elan, în momentul de față este imposibil de cuprins totalitatea metodelor și modelelor utilizate în scopul atingerii soluției optime [82,83].

Indiferent de cale particulară aleasă, drumul către **soluția optimă** implică parcurgerea a **trei etape distincte**:

1. *elaborarea modelului matematic al procesului;*
2. *construirea funcției obiectiv;*
3. *căutarea optimului.*

Ordinea primelor două etape poate fi bineînțeles inversată, rezultatul acestora fiind formularea problemei de optimizare.

Stabilirea criteriului de optimizare și transpunerea sa sub formă matematică a funcției obiectiv reprezintă una dintre laturile formulării problemei de optimizare, etapă esențială în rezolvarea acesteia [22].

În practica optimizării au fost utilizate și se utilizează nenumărate criterii pentru determinarea celor mai bune condiții pentru desfășurarea unei anumite activități, de natura criteriului și de forma adoptată pentru aceasta (funcția obiectiv) depinzând în ultimă instanță și valorile rezultate din calcul. Restrângând sfera preocupărilor la cele legate de tehnologiile de fabricație, în mod natural varietatea criteriilor de optimizare se reduce la cele de natură economică și la criteriile practice de optimizare care, nu sunt altceva decât forme simplificate sau derivate ale celor dintâi.

În principiu, optimizarea unor procese din sfera producției materiale trebuie realizată în raport cu un criteriu economic, deci funcția obiectiv ar trebui să reprezinte un indicator al eficienței economice an procesului analizat.

În practică, deoarece poziția optimului nu depinde de termenii constanți (în raport cu variabilele procesului) și nici de factorii constanți care multiplică funcția obiectiv, este posibilă, și de cele mai multe ori indicată, **simplificarea funcției obiectiv prin eliminarea tuturor termenilor constanți**

din sume și prin împărțirea termenilor restanți cu unii dintre factorii constanți. În felul acesta se obțin funcții obiectiv care nu mai au nici dimensiunile și nici atributele indicatorilor economici de origine, fără însă ca prin aceasta, acuratețea cu care se determină poziția optimului să fie micșorată [119,120].

Dacă se ține seama și de observația conform căreia în majoritatea problemelor de optimizare specifice tehnologiei chimice funcția obiectiv nu depinde foarte puternic de variabilele procesului în zona învecinată optimului, atunci este posibil ca simplificarea funcției obiectiv să fie făcută și pe seama termenilor a căror contribuție la stabilirea poziției optimului este minoră sau neglijabilă. Se atrage însă atenția asupra faptului că efectul unei asemenea simplificări asupra soluției optime nu poate fi apreciat în prealabil. Pentru a reduce la minim riscurile este necesar ca stabilirea termenilor la care se poate renunța să se realizeze pe baza comparației variațiilor diversilor termeni în raport cu variabilele procesului. În cazul în care o asemenea comparație nu este posibilă, este recomandabil a se renunța la simplificarea funcției obiectiv.

În cele mai multe probleme reale, eficiența procesului este apreciată nu printr-un singur indicator, ci prin mai mulți. Într-o asemenea situație este necesar să se aleagă unul dintre aceștia, cel mai complet sau mai reprezentativ, și să se verifice în final modul în care soluția optimă corespunde din punct de vedere al celorlalți indicatori. În anumite cazuri este posibil ca după alegerea criteriului de optimizare, ceilalți indicatori să fie introduși în formularea problemei sub forma unei relații suplimentare în modelul matematic [7, 33, 70].

De exemplu, o problemă în care criteriile de optimizare în competiție ar fi: maximizarea beneficiului realizat de pe urma desfășurării procesului, minimizarea investițiilor și folosirea maximală a materiilor prime, poate fi transformată într-o problemă de maximizare a beneficiului, în condiții în care investițiile nu trebuie să depășească o anumită valoare, iar randamentul de transformare este limitat inferior.

Rezolvând problema pentru mai multe valori limită impuse, este posibil să se selecteze cea mai convenabilă soluție optimă și în același timp, să se elimine eventuale incompatibilități între restricțiile nou create [86].

În țara noastră eficiența economică a investițiilor, ca relație între efectele economice și cheltuielile făcute pentru obținerea acestor efecte, se exprimă cu ajutorul unui sistem de indicatori tehnico-economici. În cele ce urmează se vor prezenta acei indicatori care pot fi mai des utilizați drept criterii de optimizare, modul de calcul sau de estimare a acestora, precum și alte criterii de natură economică sau derivate din acestea, folosite în mod curent în literatura de specialitate. O categorie aparte o vor constitui criteriile utilizate într-o serie de aplicații matematice, cum ar fi de pildă reprezentarea unor date experimentale prin relații de corelare [24, 55].

Se definește a fi un sistem, o mulțime de entități componente, caracterizate de proprietăți individuale specifice, aflate în relații de dependență și care sunt cuplate împreună într-un anumit mod pentru a conferi ansamblului un scop bine precizat un ansamblu de elemente interdependente care formează un întreg organizat. Sistemul poate fi deschis, dacă comunică cu mediul, sau închis, dacă este independent de acesta. Din motive evidente, de natură economică sau fizică, sistemele tehnologice reale, cum sunt și cele specifice proceselor de fabricație, sunt întotdeauna sisteme deschise [23].

Elementele unui sistem sunt la rândul lor sisteme cu structură organizată, **subsisteme**, în timp ce sistemele ca atare, reprezintă o unitate, un subsistem, al unui sistem de ordin superior.

În teoria sistemelor, obiectul analizei este definirea și cunoașterea cât mai precisă a comportării unui sistem cu o structură dată, printr-o descompunere convenabilă în subsisteme. Un sistem este definit structural prin elementele componente și prin relațiile dintre aceste elemente.

Pentru ca relația specifică unității (modelului matematic) să fie determinată, permițând obținerea variabilelor de ieșire din cele de intrare, este necesar ca unui număr de variabile, denumite convențional variabile de decizie, să li se atribuie valori pentru a ieși din nedeterminare. Referitor la modul de operare a deciziei, o clasificare sugestivă conduce la următoarele trei categorii de **decizii**:

- ◆ decizia arbitrară: se aleg în mod arbitrar valori pentru variabilele de decizie. Deși evident nerecomandabilă, decizia arbitrară este relativ frecvent întâlnită în problemele ingineresti;

- ◆ decizia empirică: alegerea valorilor variabilelor de decizie este justificată de o experiență anterioară. Această experiență poate proveni din rezolvarea unor probleme similare, din indicațiile de literatură, observații asupra desfășurării unor procese de aceeași natură, etc. decizia empirică este în mod curent utilizată pentru rezolvarea problemelor de proiectare sau exploatare ce comportă un număr mare de grade de libertate;

- ◆ decizia obiectivă: rezultă în mod automat, obiectiv, din formularea completă a problemei [85].

Din familia de decizii obiective se detașează **decizia optimă: cea mai bună decizie dintr-un anumit punct de vedere**. Prin urmare, odată ales punctul de vedere, respectiv criteriul de optimizare, soluția este conținută în problema complet formulată, prin modelul matematic al procesului și prin expresia matematică a criteriului de optimizare, denumită în mod curent funcție obiectiv. Rămâne doar ca această soluție optimă să fie obținută prin folosirea unei metode de căutare a optimului [68].

Deci, *soluția optimă depinde de criteriul de optimizare ales.*

Din definirea noțiunii de optimizare rezultă următoarele [111,112]:

- a) pentru optimizarea unui sistem este necesar ca problema să permită mai multe soluții posibile, una din ele fiind aleasă cea mai bună din punct de vedere al criteriului de optimizare ales. Acest lucru implică ca în sistemul optimizat să existe variabile (parametrii) ce pot lua una din două sau mai multe valori posibile, influențând pe această cale starea sistemului și valoarea criteriului de optimizare. Aceste variabile se numesc **variabile de decizie**. Numărul de variabile de decizie într-o problemă de optimizare determină dimensiunea problemei respective: o problemă cu trei variabile de decizie, de exemplu, este o problemă tridimensională.
- b) este necesară definirea riguroasă a unui punct de vedere din care se propune optimizarea sistemului. Acest punct de vedere trebuie să poată lua forma unei mărimi prin care se poate măsura eficiența diferitelor soluții posibile obținute prin diferite seturi de valori date variabilelor de decizie. Acest punct de vedere care permite prin valorile numerice pe care le poate lua, măsurarea eficienței diferitelor soluții se numește **criteriu de optimizare**. Criteriul de optimizare este exprimat ca o funcție a variabilelor de decizie, funcție denumită **funcție obiectiv** sau **funcție scop**.

În orice problemă de optimizare se cere stabilirea acelor valori ale variabilelor de decizie care asigură, după caz valoarea cea mai mare sau valoarea cea mai mică a criteriului de optimizare. Astfel, orice problemă de optimizare este o problemă de determinare a unui extrem. Notarea funcției obiectiv se face conform relațiilor:

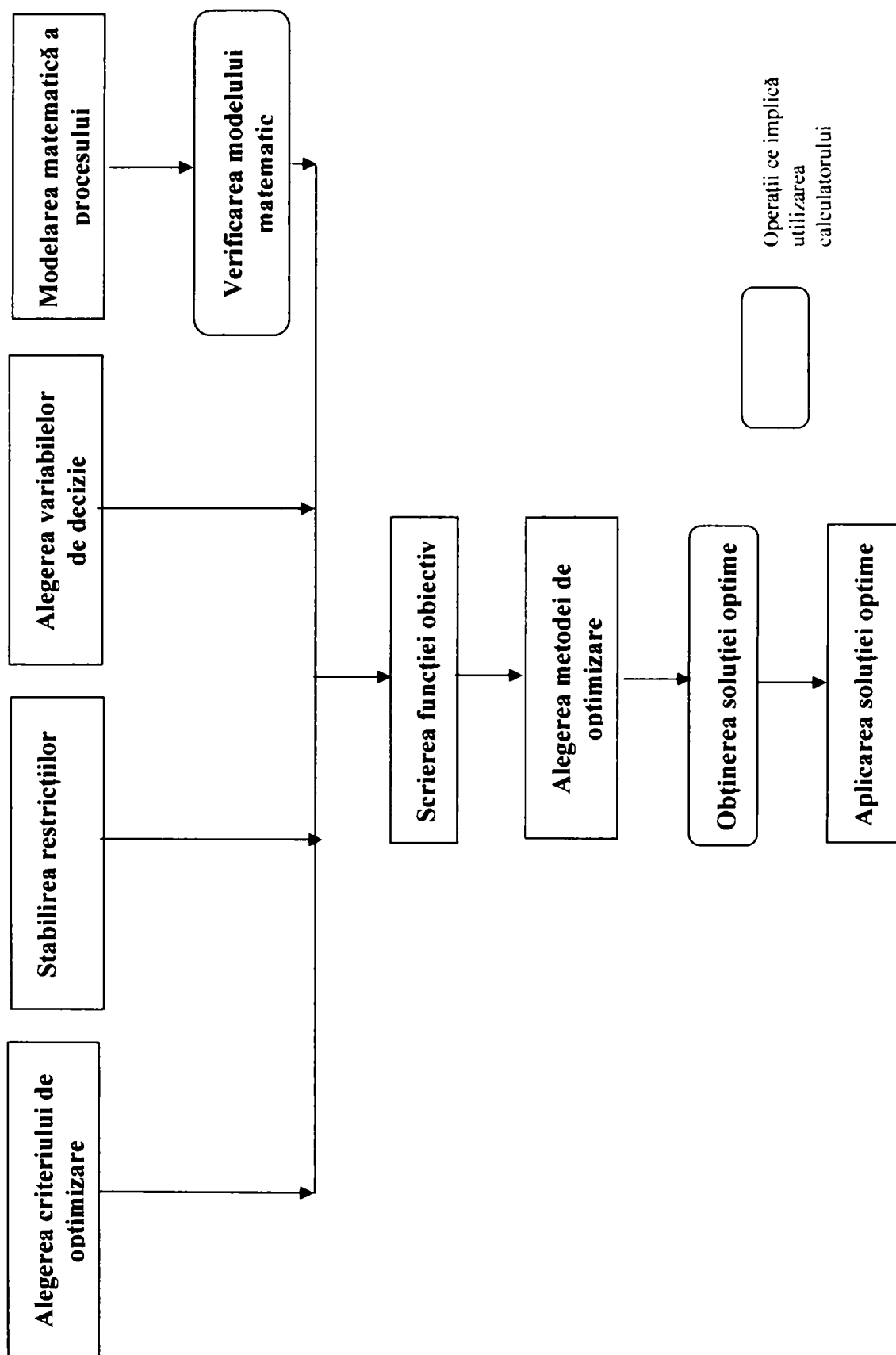
$$y = f_{ob}(\bar{x}) = \max \quad \text{sau} \quad \max_x f_{ob}(\bar{x})$$

dacă tipul de extrem căutat este un maxim, sau

$$y = f_{ob}(\bar{x}) = \min \quad \text{sau} \quad \min_x f_{ob}(\bar{x})$$

dacă tipul de extrem căutat este un minim. Setul de valori ale variabilelor de decizie care asigură valoarea optimă (cea mai mare sau cea mai mică cu putință) a criteriului de optimizare se numește **soluția optimă** sau **politica optimă**. Valorile optime ale variabilelor de decizie notate x_1^* , x_2^* , ..., x_n^* , iar valoarea maximă sau minimă a criteriului de optimizare se va nota cu y^* .

- c) optimizarea este un caz particular al îmbunătățirii unui sistem respectiv îmbunătățirea maximă posibilă. O îmbunătățire mai mică a sistemului nu poate fi numită optimizare. Este posibil să existe o optimizare:
1. a parametrilor – într-un sistem cu parametri concentrați, soluția problemei de optimizare este dată de un anumit set de valori ale variabilelor de decizie.
 2. de funcție – într-un sistem cu parametri distribuiți, soluția optimă este dată de o funcție de variabile de decizie.



Schema de bază a rezolvării unei probleme de optimizare este redată:

Fig. 3.1. Algoritmul rezolvării unei probleme de optimizare

3.2. Prelucrarea datelor experimentale

3.2.1. Cercetarea experimentală

Sistemele tehnologice, și nu numai, sunt sisteme concrete cu o structură constituită din elemente fizice și o funcționalitate determinată, exprimată prin capacitatea de realizare a unor transformări specifice ale substanței, energiei și informației (figura 3.2).

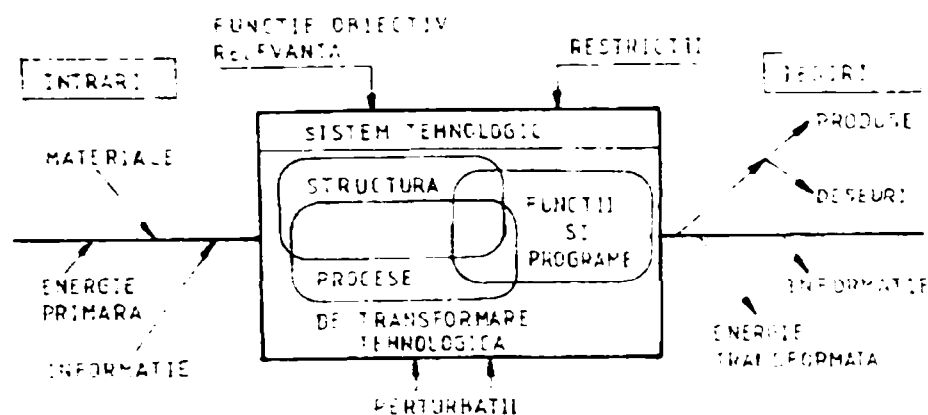


Figura 3.2 – Structura sistemului tehnologic [77]

Legăturile de cauzalitate ce caracterizează funcționalitatea sistemelor tehnologice se exprimă, într-o formă generală, prin ecuația de ieșire (funcția de răspuns) a acestora:

$$y = f(x, s) \quad (3.1)$$

în care:

- intrările x reprezintă acțiuni (comenzi) exercitate asupra sistemului;
- ieșirile y sunt atribute ale sistemului (modificate din cauza variației intrărilor) și pot fi dependente direct de intrări respectiv dependente indirect, prin intermediul unor mărimi caracteristice structurii sistemului, și anume stările s , condiționate de intrări, în forma:

$$s = F(x) \quad (3.2)$$

Cercetarea experimentală reprezintă o intervenție controlată în evoluția (funcționarea) unui sistem, având ca **finalitate**:

- ◆ verificarea și adâncirea cunoștințelor privind acțiunea factorilor de influență asupra funcțiilor de răspuns ale sistemului;

♦ *determinarea condițiilor optime de funcționare a unui sistem* în raport cu criteriile și restricțiile impuse. De exemplu, stabilirea condițiilor de prelucrare, care maximizează productivitatea tehnologică a executării unor matrițe de injectat materiale polimerice.

În condițiile actuale este deosebit de utilă reprezentarea experimentului (mai ales a celui de finalitate tehnologică) ca sistem cibernetic (figura 3.3).

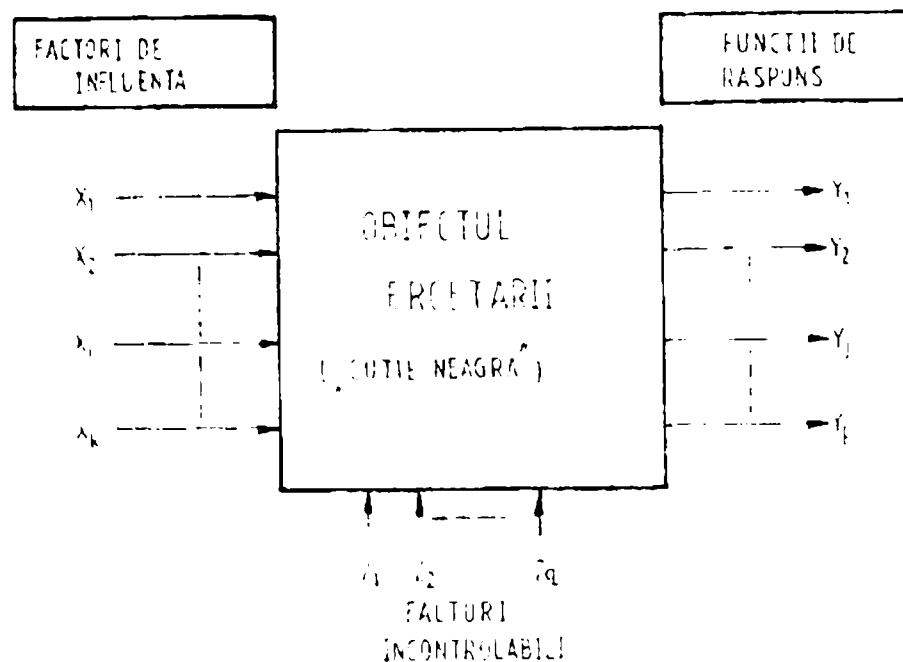


Figura 3.3 – Structura unui experiment [77]

Obiectul cercetării integrează sistemul supus cercetării experimentale cu mulțimea mijloacelor de încercare și măsurare necesare evaluării stării, comportamentului și evoluției sistemului respectiv.

Funcțiile de răspuns (funcții obiectiv, indicatori de performanță, criterii de optimizare) definesc și evaluează cantitativ comportamentul și tendințele de evoluție ale sistemului ce se constituie obiect al cercetării, în condițiile date.

Pentru ca o mărime concretă (fizică) sau abstractă să poată fi acceptată ca funcție de răspuns, ea trebuie să satisfacă următoarele cerințe:

- să caracterizeze cuprinzător, multilateral, esența sau eficiența obiectului cercetării: dacă acestea se modifică în timp, trebuie modificate corespunzător și funcțiile de răspuns, în cadrul unei experimentări secvențiale;
- să poată fi exprimată cantitativ pentru toate stările obiectului experimentării; mulțimea valorilor funcției de răspuns reprezintă domeniul său de definiție;

- să aibă un caracter univoc (unei stări a obiectului experimentării, determinată de un set oarecare de nivele ale factorilor de influență, să-i corespundă o valoare și numai una, a funcției de răspuns);
- să aibă o semnificație fizică clară, să fie cât mai simplă și mai ușor de calculat din punct de vedere matematic;
- să poată fi determinată cu o precizie cât mai mare, superioară erorii experimentului.

Factorii de influență (variabile independente) reprezintă modalități și mijloace de influențare a comportamentului obiectului cercetării, corespunzător obiectivelor urmărite prin experimentul efectuat.

Pentru ca o mulțime de mărimi fizice să poată fi acceptată ca factor de influență, trebuie satisfăcute următoarele cerințe:

- să fie independente, adică să poată fi comandate la orice nivel al domeniului de existență, independent de nivelele celorlalți factori din sistem;
- să fie compatibile, adică să permită realizarea oricărei combinații a nivelelor factorilor;
- să fie controlabile, adică să poată fi măsurate, reglate și menținute la nivelele programate existente;
- să exercite o influență directă și univocă asupra stării și comportamentului obiectului cercetării [58].

Structura experimentului este definită prin numărul și condițiile de desfășurare a încercărilor necesare și suficiente pentru realizarea obiectivelor cercetării.

În elaborarea structurii unui experiment trebuie avute în vedere următoarele:

- ◆ în cadrul unei încercări, fiecare factor poate lua una și numai una din mulțimea valorilor discrete disponibile în domeniul său de existență;
- ◆ o mulțime determinată de nivele ale factorilor definește una din stările posibile ale obiectului cercetării și materializează posibilitatea efectuării unei încercări;
- ◆ mulțimea combinațiilor posibile ale nivelelor factorilor de influență determină mulțimea stărilor obiectului cercetării și deci volumul experimentării:

$$N = p^k \text{ încercări} \quad (3.3)$$

unde: k - numărul factorilor de influență;

p - numărul nivelelor de variație ale factorilor.

- ◆ realizarea obiectivelor cercetării în situația în care experimentul nu este controlabil în mod absolut (asupra obiectului cercetării acționează întotdeauna și factori incontrollabili, de exemplu temperatura, presiunea și umiditatea mediului ambiant) și rezultatele sale nu sunt perfect reproductibile

(există întotdeauna erori și incertitudini de măsurare), obligă adeseori la replicarea încercărilor, adică la repetarea acestora prin readucerea obiectului cercetării în condițiile inițiale:

◆ definierea completă a structurii unui experiment impune precizarea succesiunii de efectuare a încercărilor programate;

◆ pentru sistemele tehnologice, la care numărul factorilor de influență și a nivelelor de variație este în mod natural mare, se pune problema stabilirii unei strategii de experimentare, care să permită minimizarea numărului de încercări și implicit a costurilor cercetării [110].

3.2.2. Modelarea matematică a sistemelor fizice

Identificarea sistemelor fizice de interes tehnologic – obiecte, fenomene, procese – este posibilă în trei moduri :

• *identificare analitică*, adică determinarea modelului matematic pe baza cunoașterii legilor fizice, care guvernează starea și evoluția sistemului.

Etapele sunt următoarele:

- adoptarea unor ipoteze, logic justificate, prin care se particularizează și se simplifică sistemul analizat;
- scrierea unor ecuații diferențiale, care descriu fenomenologia proceselor de transformare specifice sistemului;
- integrarea ecuațiilor diferențiale pentru câteva cazuri particulare idealizate, considerate ca stări limită;
- verificarea experimentală a modelelor propuse. Este o etapă importantă, dar nu esențială, deoarece o bună concordanță cu datele experimentale nu reprezintă o confirmare decisivă a validității modelului, tot așa cum o slabă concordanță nu înseamnă, în mod obligatoriu, o infirmare a validității modelului.

Utilitatea modelelor analitice este predominant gnoseologică, deoarece aplicarea lor pentru rezolvarea unor probleme practice este dificilă și extrem de laborioasă.

• *identificare experimentală* (empirică), adică determinarea modelului prin prelucrarea matematică a datelor intrări - ieșiri, obținute prin măsurări.

Se renunță în mod deliberat la analiza detaliată a fenomenelor care au loc în sistem și a interacțiunii dintre ele. Se urmărește exclusiv stabilirea, pe principiile statisticii matematice și analizei regresionale, a legăturii dintre funcțiile de răspuns (indicatori de performanță) și variabilele independente ale sistemului într-o formă matematică cât mai simplă (cel mai des, polinomială), adaptabilă calculului automat și utilizabilă nemijlocit în aplicații practice [35].

Valabilitatea acestor modele este localizată și greu extrapolabilă, existând tendința liniarizării ecuațiilor de ieșire.

Din punct de vedere gnoseologic, utilitatea modelelor empirice este redusă.

- *identificare mixtă*, analitică și experimentală, adică determinarea modelului pe baza unei structuri (forme matematice) prestabilite, folosind informațiile apriorice despre sistemul considerat și a valorilor numerice ale coeficienților de regresie corespunzători, estimate pe baza datelor rezultate experimental.

Pentru această variantă se recurge, de regulă, la experimente factoriale în care se variază simultan, pe nivele determinate, toate variabilele independente cu influență semnificativă asupra funcționării sistemului cercetat. Pe această bază, devine posibilă testarea obiectivă a adecvantei modelului empiric cu procesele reale de transformare specifice sistemului și se deschid perspective apropiate pentru evidențierea condițiilor optime de desfășurare a acestora [2].

Din punct de vedere gnoseologic, utilitatea modelului analitico-empiric este relativ redusă.

3.2.3 Algoritmul cercetării experimentale

Se remarcă existența unor cicluri complete de investigație, organizate iterativ și plasate simbolic pe o spirală convergentă spre obiectivele cercetării experimentale.

Fiecare ciclu în parte include 4 etape consecutive:

- ◆ cunoașterea aprofundată a obiectului cercetării și adoptarea structurii modelului matematic inițial, care leagă funcțiile de răspuns de factorii de influență existenți;

- ◆ conceperea programului de experimentare, corespunzător numărului și nivelelor de variație ale factorilor de influență, precum și numărului de replici și randomizării necesare;

- ◆ realizarea efectivă a programului de experimentare asociat unui ciclu de experimentare dat;

- ◆ analiza statistică a rezultatelor experimentale obținute, finalizată prin estimarea coeficienților de regresie, testarea adecvantei și stabilirea intervalului de încredere (precizie) a modelului matematic adoptat inițial.

Inadecvanța modelului matematic curent, impune inițierea ciclului de investigație următor, în conceperea căruia se vor avea în vedere toate informațiile dobândite în ciclul anterior.

3.2.4. Metode statistice în cercetarea experimentală

Cele mai utilizate metode de analiză statistică clasică a datelor experimentale sunt analiza dispersională și analiza regresională [21].

3.2.4.1. Analiza dispersională

Această metodă statistică utilizată în cercetarea experimentală are ca obiectiv principal determinarea importanței și gradului de interacțiune a unei mulțimi de factori x , ($i = 1 \dots n$), asupra unei funcții de răspuns y a obiectului cercetării.

Analiza dispersională realizează:

- gruparea factorilor de influență (semnificativi, respectiv nesemnificativi), în raport cu funcția de răspuns y ;
- ierarhizarea factorilor semnificativi după gradul de influență asupra funcției de răspuns.

Analiza dispersională nu își propune și nici nu poate realiza modelul matematic al sistemului cercetat $y = f(x_i)$.

În urma analizei dispersionale rezultă o distribuție a factorilor de influență de tipul celei din figura 3.4.

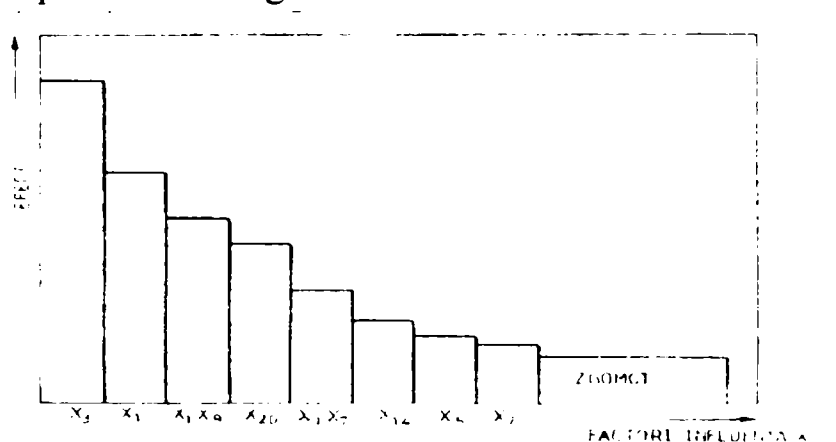


Figura 3.4. – Distribuția factorilor de influență în urma analizei dispersionale [77]

Asupra evoluției oricărui sistem acționează simultan mai mulți factori, aleatori și sistematici, fiecare având o anumită influență asupra performanțelor acestuia.

Prin analiza dispersională sunt separate efectele produse de variația factorilor aleatori de efectele cauzate de factorii sistematici (factori de influență controlați), separarea făcându-se prin descompunerea dispersiei totale în dispersiile componente și estimarea acestora, apreciindu-se astfel caracterul și gradul de influență al fiecărui factor.

3.2.4.2. Analiza regresională

Obiectivul principal al analizei regresionale este elaborarea modelului regresional al obiectului cercetării $y = f(x_i)$, care să descrie, într-un mod adecvat, comportarea sistemului respectiv în domeniul dat al experimentării. Acest model de regresie multiplă a factorilor include două componente:

- funcția valorilor medii (centrelor geometrice de grupare) din spațiul multifactorial;
- intervalul de împrăștiere a frecvențelor în jurul centrelor de grupare singulare.

Modelele regresionale se utilizează pentru identificarea stării și prevederea comportamentului obiectului cercetării (fenomen, obiect, proces), pentru optimizarea evoluției și pentru conducerea sa în spațiu și timp.

Scopurile analizei regresionale sunt:

- identificarea unui model matematic adecvat pentru descrierea obiectului cercetării;
- studiul mecanismelor de inițiere și acțiune a funcționalității sistemului cercetat;
- analiza caracterului și gradului de influență a diferiților factori cu ajutorul modelului obținut;
- definirea valorilor optime ale factorilor în raport cu funcția de răspuns y sau alte funcții de optimizare ale obiectului cercetării și conducerea optimală a acestuia.

Analiza dispersională (analiza variației) este o metodă statistică de analizare a datelor de măsurare, care sunt de fapt valori obținute experimental ale unor funcții obiectiv, ce depind de unul sau mai mulți factori de influență cu acțiune simultană. Scopul analizei dispersionale este de a stabili semnificația factorilor de influență asupra funcției obiectiv ce face obiectul analizei. În sistemele fizice, legătura dintre funcția obiectiv y și factorii de influență se poate scrie:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k, z_1, z_2, \dots, z_m, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_d) \quad (3.4)$$

unde: x_1, x_2, \dots, x_k – factori de influență controlabili;
 z_1, z_2, \dots, z_m – factori de influență necontrolabili, aleatori, care generează erorile aleatoare;
 $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_d$ – parametrii statistici, de regulă necunoscuți, numiți coeficienți de influență.

Dacă numărul factorilor de influență este $k > 1$, analiza este multiplă, iar dacă numărul de funcții obiectiv analizate y_q este $q > 1$, analiza este multidimensională.

Dacă toți factorii de influență x_1, x_2, \dots, x_k prezintă nivele discrete, numerice sau nu, analiza devine calitativă - analiza dispersională.

Dacă toți factorii de influență x_1, x_2, \dots, x_k sunt variabile continue, atunci analiza devine cantitativă – analiza regresională. Obiectivul principal al analizei regresionale este elaborarea modelului matematic, regresional al obiectului cercetării, care să descrie comportarea sistemului respectiv în domeniul dat al experimentării, studiul mecanismelor de inițiere și acțiune a funcționalității sistemului cercetat, analiza caracterului și gradului de

influență a diferiților factori cu ajutorul modelului obținut, definirea valorilor optime ale factorilor de influență în raport cu funcția obiectiv y sau alte funcții de optimizare ale obiectului cercetării și conducerea optimală a acestuia [105].

Dacă unii factori de influență prezintă nivele discrete, iar alții sunt mărimi continue, analiza este a covarianței.

Există deci trei categorii de modele în funcție de tipul de analiză realizat: modelele dispersionale, regresionale sau de covarianță.

În cazul cercetării unui fenomen sau proces, una din problemele cele mai frecvent întâlnite este aceea de a explicita pe baza rezultatelor experimentale, dependența funcțională (regresională) dintre funcția obiectiv și factorii de influență. Una din metodele aplicate în mod curent în prelucrarea rezultatelor măsurătorilor prin analiză regresională este metoda celor mai mici pătrate. Această metodă permite stabilirea coeficienților de regresie pentru o formă impusă a relației funcționale dintre variabilele independente și funcția obiectiv.

În cazul în care suprafața de răspuns prezintă o zonă de curbura se recurge la modelarea cu polinoame de ordin superior, de preferință de ordin II. Modelarea cu ajutorul experimentelor factoriale are ca o primă etapă precizarea funcției obiectiv și identificarea factorilor de influență. Etapa imediat următoare alegerii funcției obiectiv și identificării factorilor de influență o constituie stabilirea domeniului experimentării.

Practic, stabilirea domeniului de experimentare presupune două faze:

- stabilirea punctului central al experimentului;
- stabilirea intervalelor de variație ai factorilor de influență.

Din considerente practice nivelul superior al unui factor de influență se codifică „+1”, iar nivelul inferior cu „-1”. Coordonatele punctului central al experimentării vor avea valoarea „0”. În continuare, se trece planificarea experimentelor prin precizarea formei matricei program.

Matricea program a unui experiment factorial la care nivelele factorilor de influență sunt notate cu valori codificate „+1” și „-1”, iar valorile funcției obiectiv sunt determinate experimental se prezintă în tabelul 3.1.

Tabelul 3.1 – Matricea program a unui experiment factorial

Număr încercări	Valori codificate ale factorilor de influență						Valorile funcției obiectiv y
	x_1	x_2	...	x_i	...	x_k	
1.	-1	-1	...	-1	...	-1	y_1
2.	+1	-1	...	-1	...	-1	y_2
...
i	-1	+1	...	-1	...	-1	y_i
...
N	+1	+1	...	+1	...	+1	y_N

Volumul programelor factoriale central – compuse se calculează cu relația:

$$N = N_L + N_\alpha + N_0 \quad (3.5)$$

unde:

N_L – numărul de măsurători provenit de la modelarea liniară;

N_α – numărul de măsurări suplimentare, efectuate „în stea”, la distanța α față de centrul programului experimental;

N_0 – numărul de măsurări suplimentare, efectuate în centrul programului experimental.

Dacă ecuația modelului experimental este o ecuație polinomială de gradul II, care este cea mai des utilizată, atunci are forma:

$$y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i \neq j}}^k b_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 \quad (3.6)$$

în care: y – funcția obiectiv;
 x_j – factorii de influență;
 b_0, b_j, b_{ij}, b_{jj} – coeficienții de regresie.

Matricile program ale experimentelor rotabile nu îndeplinesc în general condiția de ortogonalitate, motiv pentru care calculul coeficienților de regresie și al dispersiilor corespunzătoare acestora, se face cu relații mai complexe:

- pentru termenul liber b_0 :

$$b_0 = \frac{A}{N} \left[2\lambda^2 (k+2) \sum_{i=1}^N y_i - 2\lambda C \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^N x_{ij}^2 y_i \right] \quad (3.7)$$

- pentru coeficienții b_j :

$$b_j = \frac{C}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij} y_i \quad (3.8)$$

- pentru coeficienții b_{ij} :

$$b_{ij} = \frac{C^2}{N\lambda} \sum_{i=1}^N x_{ij} x_{ii} y_i \quad (3.9)$$

- pentru coeficienții b_{ij} :

$$b_{ij} = \frac{A}{N} \left\{ C^2 \left[(k+2)\lambda - k \sum_{i=1}^N x_{ij}^2 y_i + C^2 (1-\lambda) \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^N x_{ij}^2 y_i - 2\lambda C \sum_{i=1}^N y_i \right] \right\} \quad (3.10)$$

unde:

$$\lambda = \frac{kN}{(k+2)(N-N_0)} \quad (3.11)$$

k – numărul factorilor de influență;

N – dat de relația (3.5);

N_0 – numărul de măsurători suplimentare efectuate în centrul experimentului;

$$A = \frac{1}{2\lambda[(k+2)\lambda - k]} \quad (3.12)$$

$$C = \frac{N}{\sum_{i=1}^N x_{ij}^2} \quad (3.13)$$

Coeficienții modelului regresional exprimă influența factorilor de influență x_j asupra funcției obiectiv y . Valoarea fiecărui coeficient arată amplitudinea influenței factorului pe care acesta îl înmulțește. Semnul coeficientului de regresie indică sensul influenței factorului asupra funcției obiectiv.

Conceptul care stă la baza aplicării majorității testelor statistice constă în compararea dispersiei rezultatelor datorată erorilor aleatoare (dispersie de reproductibilitate) cu dispersia rezultatelor datorate unor cauze sistemice. Estimarea dispersiei reproductibilității este o etapă obligatorie în analiza modelului regresional. De obicei, estimarea dispersiei reproductibilității s_0^2 , se face cu ajutorul mai multor măsurări replicate în centrul domeniului experimental:

$$s_0^2 = \frac{\sum_{v=1}^c (y_{0v} - \bar{y}_0)^2}{c-1} \quad (3.14)$$

unde:

c – numărul de replici, $v = 1, \dots, c$, executate în punctul central pentru calculul dispersiei reproductibilității;

y_{ov} – valorile măsurate y_{o1}, \dots, y_{oc} ale funcției obiectiv în centrul domeniului experimental;

\overline{y}_0 – media valorilor y_{ov} măsurate ale funcției obiectiv în centrul domeniului experimental.

Cu ajutorul dispersiei reproductibilității se pot calcula dispersiile de estimare pentru coeficienții de regresie.

Relațiile următoare (3.15, 3.16, 3.17, 3.18) reprezintă dispersiile corespunzătoare coeficienților de regresie:

$$s_{b_0}^2 = \frac{2A\lambda^2(k+2)}{N} s_0^2 \quad (3.15)$$

$$s_{b_j}^2 = \frac{C}{N} s_0^2 \quad (3.16)$$

$$s_{b_{ij}}^2 = \frac{C^2}{\lambda N} s_0^2 \quad (3.17)$$

$$s_{b_{ij}}^2 = \frac{AC^2[(k+1)\lambda - (k-1)]}{N} s_0^2 \quad (3.18)$$

unde A și C sunt date de relațiile (3.12) și (3.13).

Următoarele etape ce contribuie la analiza modelului matematic sunt:

- verificarea semnificației statistice a coeficienților polinomului de regresie cu ajutorul criteriului Student;
- estimarea valorilor funcției obiectiv și verificarea adecvănței modelului cu ajutorul testului Fisher a dispersiei de concordanță cu dispersia reproductibilității.

Dacă unul din coeficienții pătratici, b_{ij} , este nesemnificativ, după excluderea acestuia din model este necesară recalcularea coeficienților ecuației de regresie, datorită interdependenței existente între termenii pătratici, apărute ca urmare a neortogonalității coloanelor corespunzătoare factorilor x_j^2 din matricea program.

Dat fiind modul de structurare al matricii program a experimentului, calculul dispersiilor care se compară cu ajutorul criteriului Fisher prezintă unele particularități:

- dispersia reproductibilității, s_0^2 , se poate estima cu ajutorul

determinărilor N_0 efectuate în punctul central al programului experimental (număr de grade de libertate $\nu_2 = N_0 - 1$);

- calculul dispersiei de concordanță s_{conc}^2 presupune:
 - a) calculul sumei pătratelor diferențelor dintre valorile estimate și cele măsurate, SS_N pentru toate cele N puncte ale experimentului;
 - b) determinarea sumei de pătrate corespunzătoare dispersiei de concordanță, SS_{conc} :

$$SS_{conc} = SS_N - SS_0 \quad (3.19)$$

unde SS_0 reprezintă suma pătratelor diferențelor între valorile măsurate în cele N_0 determinări efectuate în punctul central și media aritmetică \bar{y}_0 a acestor valori;

- c) numărul gradelor de libertate corespunzător dispersiei de concordanță:

$$\nu_1 = N - k - (N_0 - 1) \quad (3.20)$$

unde k reprezintă numărul termenilor rezultați, semnificativi ai polinomului de regresie;

- d) stabilirea valorii dispersiei de concordanță:

$$s_{conc}^2 = \frac{SS_{conc}}{\nu_1} \quad (3.21)$$

Verificarea adecvantei modelului se face prin compararea cu ajutorul testului Fisher, F , a dispersiei de concordanță cu dispersia de reproductibilitate:

$$F_{calc} = \frac{s_{conc}^2}{s_0^2} \quad (3.22)$$

Dacă $F_{calc} < F_{tab}$, în care $F_{tab} = F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}$ atunci cu siguranța dată de probabilitatea $P = 1 - \alpha$, concordanța dintre valorile estimate și cele măsurate este mulțumitoare și se consideră că modelul găsit descrie în mod adecvat procesul sau fenomenul studiat.

α reprezintă pragul de semnificație, iar $P = 1 - \alpha$, nivelul de încredere.

În expresia lui F_{tab} , ν_1 și ν_2 reprezintă:

- ν_1 – numărul de grade de libertate cu care se calculează s_{conc}^2 :

$$v_1 = N - k \quad (3.23)$$

- v_2 – numărul de grade de libertate cu care se calculează s_0^2 :

$$v_2 = C - l \quad (3.24)$$

3.2.5. Strategii de experimentare

Obiectivul primordial al oricărui experiment este modelarea matematică a acțiunii factorilor de influență asupra funcției obiectiv a sistemului (obiect, fenomen, proces) considerat, în forma de principiu:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (3.25)$$

În modelarea empirică, de regulă se acceptă aprioric o anumită formă a modelului matematic, care se consideră că aproximează cel mai bine modelul real, urmând ca desfășurarea experimentului să furnizeze datele necesare determinării coeficienților (constantelor) formei adoptate a modelului.

Obiectivele urmărite prin modelare sunt:

- ◆ studiul și analiza sistemului cercetat cu ajutorul modelului pentru obținerea de date mai complete și de noi legități ale acestuia;
- ◆ evidențierea mecanismului de acțiune a factorilor asupra sistemului cercetat;
- ◆ verificarea ipotezelor referitoare la interacțiunile interne ale sistemului;
- ◆ predicția stării și comportamentului sistemului;
- ◆ calculul și proiectarea sistemului;
- ◆ optimizarea sistemului în raport cu diferite criterii;
- ◆ conducerea sistemului în spațiu și timp.

Principalele cerințe impuse modelelor în general și celor empirice în particular, sunt:

- capacitatea de a reflecta în mod adecvat sistemul cercetat (valorile funcției obiectiv prezise de model să nu difere semnificativ de cele reale);
- aptitudinea de a furniza informații suficient de precise privind direcția de orientare a experimentării în vederea atingerii domeniului optim al funcției obiectiv [104].

Alegerea formei matematice a modelului implică recurgerea la:

- cunoștințe și legități cu caracter general, aplicabile sistemelor fizice;
- informații cu privire la sisteme și metode similare cu cele cercetate;
- încercări proprii de modelare în domeniul respectiv.

În continuare, se concepe, se proiectează și se realizează o cercetare experimentală ale cărei rezultate vor trebui să permită determinarea efectivă a coeficienților numerici ai modelului matematic adoptat anterior. Pentru aceasta, la dispoziția cercetătorului stau două strategii principial diferite:

- strategia clasică (Gauss-Seidel), caracterizată prin sloganul "un factor la un moment dat";
- strategia modernă (Box-Wilson), caracterizată prin sloganul "toți factorii în fiecare moment".

Aceste strategii sunt aplicate pentru identificarea punctelor de interes pentru experimentator, ce aparțin suprafeței de răspuns (valorilor funcției obiectiv).

În general, spațiul în care există funcția obiectiv, este multidimensional, și anume " $k + 1$ " dimensional (spațiu multifactorial), k reprezentând numărul factorilor de influență.

Curbele rezultate sunt curbe de nivel constant sau curbe de răspuns egal. Evidențierea punctului corespunzător valorii de interes (extrem) a funcției obiectiv, ca obiectiv al cercetării, este posibilă prin trei modalități de principiu:

- prin cunoașterea tuturor stărilor posibile ale sistemului cercetat și implicit ale funcției obiectiv, inclusiv a valorilor optime, ceea ce exclude necesitatea unui model matematic al sistemului;

- prin selectarea aleatoare a unui număr de stări ale sistemului și determinarea corespunzătoare a funcției obiectiv, în speranța că domeniul de optim sau chiar punctul de extrem, se găsesc în interiorul selecției considerate;

- prin construirea empirică a unui model matematic al sistemului și utilizarea lui pentru predicția valorilor funcției obiectiv în stări care nu au fost studiate experimental, dar de interes pentru cercetător; datorită experimentării incomplete, se postulează că modelul matematic obținut reflectă continuitatea și variația lină a funcției obiectiv și, la fel ca aceasta, prezintă un singur optim (extrem) [72].

În astfel de condiții, construcția modelului matematic și utilizarea lui pentru predicția valorilor funcției obiectiv în orice punct al spațiului multifactorial, inclusiv în punctul de optim, este posibilă prin cele două strategii diferite amintite anterior:

- ◆ **strategia Gauss-Seidel** reduce orice cercetare experimentală la o cercetare unifactorială, în sensul că la un moment dat se reglează (se modifică) un singur factor, pentru ceilalți factori existenți se atribuie valori constante, mai mult sau mai puțin arbitrare, care pot exercita o influență semnificativă asupra rezultatului obținut; astfel, pentru evidențierea influenței unui factor, se utilizează numai o parte a încercărilor experimentale, ceea ce amplifică semnificativ, în cazul unui număr mare de factori de influență, volumul experimentării; *modul principial de operare al acestei strategii este*

următorul: se admite o valoare $x_1 = const.$ și se variază, în domeniul de existență, alt factor de influență x ; apoi, pentru valoarea lui x_1 , care a dat valoarea y cea mai convenabilă, se reglează factorul de influență variat în domeniul său de existență; în final, se reține cea mai bună valoare a lui y ;

♦ **strategia Box-Wilson** utilizează un experiment factorial, caracterizat prin faptul că în fiecare încercare se modifică valoarea tuturor factorilor existenți; în consecință, influența fiecărui factor asupra valorilor y ale funcției obiectiv, este determinată de toate încercările incluse în cercetarea experimentală; volumul experimentului este astfel mult mai redus, iar certitudinea rezultatelor mult mai ridicată; *modul principal de operare al acestei strategii este următorul*: se inițiază experimentarea într-un domeniu restrâns al spațiului multifactorial; în continuare, pe baza informațiilor dobândite, se realizează o deplasare secvențială în spațiul multifactorial (de exemplu prin deplasarea după direcția de pantă maximă), până la atingerea valorii de extrem a funcției obiectiv [49].

3.2.6. Modele empirice regresionale

În sistemele fizice (fenomene, obiecte, procese), între o funcție de răspuns F și mulțimea factorilor semnificativi x_1, \dots, x_k , se stabilește o legătură de tipul:

$$F = F(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (3.26)$$

În afara factorilor semnificativi (controlabili) asupra sistemului acționează însă și o mulțime de factori aleatori z_1, z_2, \dots, z_m .

Forma și structura modelului real al sistemelor fizice și în particular al sistemelor tehnologice, nu este, în general, cunoscută. Modelul real, conține în mod concret, atât influența factorilor semnificativi, cât și a factorilor nesemnificativi, influențe ce se exprimă concret prin coeficienții de influență (de regresie) β_1, \dots, β_n , astfel încât forma funcției de răspuns pentru modelul real devine:

$$F = f(x_1, x_2, \dots, x_k, z_1, z_2, \dots, z_m, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n) \quad (3.27)$$

În urma modelării sistemului, valorile reale β_1, \dots, β_n ale coeficienților de regresie, pentru un model dat, se înlocuiesc cu estimațiile statistice ale acestora b_1, \dots, b_n , determinate în urma prelucrării datelor experimentale, iar influența factorilor aleatori este inclusă în eroarea experimentală, urmărindu-se minimizarea acesteia [78].

În acest mod, de la modelul real se trece la modelul empiric, în care funcția de răspuns reală se înlocuiește prin estimația ei statistică, ca o funcție

a factorilor existenți și a estimațiilor statistice ale coeficienților de regresie reali:

$$y = y(x_1, x_2, \dots, x_k, b_1, b_2, \dots, b_n) \quad (3.28)$$

Pentru a trece de la această formă generală a modelului empiric, la forma concretă, legătura între funcția de răspuns și coeficienții de regresie se exprimă prin funcții de bază (de formă polinomială, exponențială, logaritmică, putere, ș.a.m.d.).

Cea mai des întâlnită formă este cea polinomială, datorită facilităților de prelucrare matematică pe care le implică.

De exemplu, în cazul unei funcții obiectiv dependentă de doi factori x_1 și x_2 , modelul empiric poate fi reprezentat printr-un polinom:

- de ordinul zero $\tilde{y} = b_0$ (practic inutilizabil, deoarece nu este pusă în evidență influența factorilor x_1 și x_2);
- de ordinul întâi $\tilde{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2$;
- de ordinul doi $\tilde{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_{12} + b_{22}x_{22}$;
- ș.a.m.d.

În general, forma unui model polinomial de ordinul întâi, se poate scrie

$$\tilde{y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j \quad (3.29)$$

iar pentru un polinom de ordinul doi:

$$\tilde{y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i \neq j}}^k b_{ij} x_i x_j \quad (3.30)$$

Experimentul efectuat are ca unic scop furnizarea datelor necesare calculului coeficienților modelului adoptat. De aici, rezultă că numărul coeficienților determină volumul experimentării, ceea ce ne obligă la alegerea polinomului de grad minim, necesar și suficient într-o situație dată.

Polinomul de grad unu (model liniar) presupune dirijarea factorilor de influență pe două nivele de variație, minim și maxim, rezultând un volum maxim al experimentării de $N=2^k$; el cuprinde un număr minim de încercări și conține informații asupra direcției către optim, dar se impune verificarea adecvantei sale.

Apare deci problema selectării subdomeniului de experimentare astfel încât modelul liniar să fie adecvat. Continuitatea funcției obiectiv și caracterul analitic (variația liniară) al modelului adoptat garantează existența unor asemenea domenii practic în apropierea oricărui punct al spațiului

multifactorial. În aceste condiții, devin esențiale dimensiunile subdomeniului, adică domeniile de variație ale factorilor.

Pornind din acest domeniu, pe baza informațiilor obținute, experimentarea este continuată secvențial după direcția de pantă maximă (gradientului) pe suprafața de răspuns, în alte subdomenii dimensionate corespunzător, până la atingerea domeniului ce conține punctul de interes pentru cercetător.

Dacă acest lucru nu este posibil cu ajutorul polinoamelor de ordinul întâi, se recurge la modelarea suprafeței de răspuns prin polinoame de ordin superior, de preferință de ordinul doi, până la identificarea optimului. În cazul acestor modele, se realizează dirijarea factorilor pe trei nivele de variație, ceea ce mărește considerabil volumul experimentului ($N=3^k$) și complică prelucrarea rezultatelor sale.[98]

În mod excepțional, se poate recurge și la modele polinomiale de ordinul trei, dar materializarea lor presupune realizarea unor experimente factoriale incomplete, fracționare, pe baza anumitor principii și reguli de reducere a volumului experimentului.

În mod normal, se efectuează experimentări factoriale complete, care includ toate combinațiile posibile ale nivelelor factorilor.

3.2.7. Experimentul factorial

3.2.7.1. Decizii anterioare planificării experimentului

Stabilirea domeniului inițial de experimentare presupune:

a) *stabilirea limitelor domeniului de definiție a factorilor.*

În acest caz apar următoarele restricții:

- de principiu (fenomenologice), pentru valorile factorilor de influență (zero absolut pentru temperatură, viteza luminii în vid pentru viteză etc.);
- tehnico-economice (costul materialelor, durata proceselor);
- determinate de condițiile concrete ale experimentului (baza materială, tehnologie, organizare);

b) *analiza informației apriorice referitoare la modificarea funcției obiectiv la mici variații ale factorilor de influență.*

Practic, stabilirea domeniului de experimentare se face în două etape:

1. **Stabilirea nivelului de bază** (punctul central al experimentării): acesta este un punct multidimensional al spațiului multifactorial, ce cuprinde

o combinație a nivelelor factorilor care corespunde celor mai bune valori ale funcției obiectiv, pe baza informației apriorice deținută de experimentator. Nivelul de bază se consideră punct inițial al experimentului (punct central);

2. **Stabilirea intervalului de variație** al factorilor de influență: acesta este o valoare, un număr, care adunat sau scăzut la nivelul de bază, determină nivelul superior și respectiv inferior al factorului considerat într-un experiment dat. Din considerente de simplificare a matricii experimentului și de prelucrare a datelor experimentale, nivelul de bază se consideră egal (codificat) cu zero, iar nivelele superior și inferior rezultă +1 și, respectiv -1.

3.2.7.2. Construcția matricii – program a experimentării

Pentru prima etapă a cercetării, este suficientă variația factorilor pe două nivele, rezultând imediat volumul maxim al experimentării $N = 2^k$.

Experimentul se numește factorial complet, dacă sunt incluse toate combinațiile posibile ale nivelelor factorilor.

Matricea-program a experimentării se realizează tabelar (tabelul 3.2), pe coloane figurează factorii, iar pe linii încercările componente ale programelor. Nivelele factorilor se marchează în valori codificate +1 și -1. Valorile funcției obiectiv y sunt determinate experimental.

Tabelul.3.2 – Matricea-program a experimentului factorial

Număr încercări	Valori codificate ale factorilor de influență						Valorile funcției obiectiv
	x_1	x_2	...	x_i	...	x_k	y
1	-1	-1	...	-1	...	-1	y_1
2	+1	-1	...	-1	...	-1	y_2
...
i	-1	+1	...	-1	...	-1	y_i
...
N	+1	+1	...	+1	...	+1	y_N

Matriciile-program ale experimentelor factoriale, satisfac următoarele proprietăți:

a) simetrie în raport cu punctul central al experimentării (nivel zero):

$$\sum_{i=1}^N x_{ij} = 0, \quad j = 1, \dots, k \quad (3.31)$$

b) normalitate:

$$\sum_{i=1}^N x_{ij}^2 = N \quad , \quad j = 1, \dots, k \quad (3.32)$$

c) ortogonalitate:

$$\sum_{i=1}^N x_{ij} x_{iu} = 0 \quad , \quad j \neq u \quad (3.33)$$

d) rotabilitate: precizia de estimare a coeficienților de regresie și implicit a funcției obiectiv este aceeași la distanțe egale de centrul experimentului, independent de direcție.

3.2.7.3. Determinarea modelului matematic al experimentului

Obiectivul experimentului factorial este stabilirea modelului, în primă fază polinomial liniar al sistemului investigat, adică determinarea valorii concrete a coeficienților b_j din relația:

$$\tilde{y} = \sum_{j=0}^k b_j x_j \quad (3.34)$$

Dacă se admite că fiecare factor are $p = 2$ nivele de variație, atunci, volumul experimentului factorial complet este $N = 2^k$ încercări ce trebuie să îndeplinească condițiile:

- randomizării succesiunii încercărilor;
- replicării încercărilor (dacă este cazul); în această situație se va lucra cu media aritmetică a rezultatelor replicilor pentru fiecare încercare;
- păstrării omogenității dispersiilor empirice s_i^2 pentru fiecare încercare;
- respectării celor patru proprietăți ale matricilor-program.

În această situație, metoda celor mai mici pătrate, permite determinarea coeficienților b_j cu relația:

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^N x_{ij} y_j}{N} \quad , \quad j = 1, \dots, k \quad (3.35)$$

3.2.7.4. Experimente factoriale fracționare

Cu creșterea numărului de factori de influență k , crește diferența dintre volumul experimentului factorial complet EFC și numărul coeficienților de regresie liniară ce trebuie determinați, volumul experimentării devenind redundant în raport cu necesarul pentru determinarea modelului matematic căutat.

În aceste condiții, este posibilă determinarea coeficienților căutați apelând la un volum mai mic de măsurări, corespunzător unei replici fracționare ale experimentului complet, în următoarele condiții:

- matricea-program a experimentului factorial fracționar să respecte cel puțin atâtea încercări, câți coeficienți trebuie determinați;
- matricea-program a experimentului factorial fracționar să respecte cele patru proprietăți enunțate la paragrafele anterioare.

Pentru obținerea replicii fracționare cu rezoluția cea mai mare trebuie înlocuită interacțiunea între numărul cel mai mare de factori cu noul factor introdus în matricea-program. Dacă există mai multe coloane cu număr maxim de interacțiuni, se înlocuiește cea care, pe baza informației apriorice, este cotată de influență mai slabă pentru sistemul studiat.

Experimentele factoriale fracționare (EFF) se caracterizează prin simbolizarea 2^{k-p} , în care p reprezintă numărul efectelor liniare ce înlocuiesc efecte de interacțiune, iar valoarea 2^{k-p} reprezintă volumul experimentului.

3.2.7.5. Calculul și analiza statistică a modelului matematic empiric

Din cele prezentate anterior, rezultă că pentru modelarea liniară a unui sistem influențat de k factori independenți, se preferă adoptarea următoarei forme pentru funcția de răspuns:

$$\tilde{y} = \sum_{j=0}^k b_j x_j \quad (3.36)$$

Pentru determinarea efectivă a coeficienților b_j ai modelului se concepe o matrice-program a experimentării (tabelul 3.3) și se realizează efectiv experimentarea. Se impun prelucrarea rezultatelor experimentale pentru definirea modelului matematic și verificarea validității sale. Această prelucrare include două etape principale:

1. Calculul coeficienților de regresie și implicit, explicitarea modelului matematic adoptat;
2. Analiza statistică din trei puncte de vedere a modelului obținut:

- estimarea erorii experimentale (dispersiei reproductibilității valorii funcției obiectiv la nivel de experiment);
- verificarea semnificației statistice a coeficienților de regresie;
- verificarea adecvantei (concordanței) valorilor funcției obiectiv calculate cu modelul empiric, cu valorile reale (măsurate) ale funcției obiectiv.

Sucesiunea efectivă a calculelor necesare și suficiente pentru prelucrarea completă a rezultatelor experimentale este următoarea:

1. Calculul mediei aritmetice \bar{y} a funcției obiectiv, pentru fiecare încercare (rând i al matricii):

$$\bar{y}_i = \frac{1}{n} \sum_{q=1}^n y_{iq} \tag{3.37}$$

Tabelul. 3.3 – Matrice-program a rezultatelor experimentului

Număr încercare	Nivelele factorilor de influență						Valori măsurate ale funcției răspuns				Dispersie
	x ₀	x ₁	...	x _i	...	x _k	y _{i1}	...	y _{in}	\bar{y}	
1	+1	-1	...	-1	...	-1	y ₁₁	...	y _{1n}	\bar{y}_1	s ₁ ²
2	+1	+1	...	-1	...	-1	y ₂₁	...	y _{2n}	\bar{y}_2	s ₂ ²
...
I	+1	-1	...	+1	...	-1	y _{i1}	...	y _{in}	\bar{y}_1	s _i ²
...
N	+1	+1	...	+1	...	+1	y _{N1}	...	y _{Nn}	\bar{y}_N	s _n ²

2. Calculul coeficienților de regresie b_j:

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij} \bar{y}_i \tag{3.38}$$

3. Calculul dispersiei funcției de răspuns pentru fiecare încercare:

$$s_i^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{q=1}^n (y_{qi} - \bar{y}_i)^2 \tag{3.39}$$

4. Verificarea omogenității dispersiilor funcției obiectiv (criteriul Cochran):

$$G_{CALC} = \frac{\max s_i^2}{\sum_{i=1}^N s_i^2} \quad (3.40).$$

Dacă $G_{CALC} < G_{TAB\lambda, v_1, v_2}$, atunci dispersiile sunt omogene; $\alpha = 0,05$; $v_1 = n-1$; $v_2 = N$.

Dacă dispersiile nu sunt omogene, se recomandă:

- creșterea numărului de replici paralele (n);
- metode de măsurare mai precise;
- înlocuirea funcției obiectiv inițiale y , cu o funcție a acesteia, y' , caracterizată printr-un domeniu de existență mai restrâns.

5. Calculul dispersiei reproductibilității:

$$s_0^2 = \frac{1}{Q(n-1)} \sum_{i=1}^Q s_i^2 \quad (3.41).$$

Q reprezintă numărul de puncte replicate, iar n numărul de replici / punct.

6. Calculul dispersiei coeficienților de regresie:

$$s_{bj}^2 = \frac{s_0^2}{N \cdot n} \quad (3.42).$$

7. Testarea semnificației statistice a coeficienților, printr-una din variantele:

- calcularea criteriului Student t_{CALC} :

$$t_{CALC} = \frac{|b_{jmin}|}{s_{bj}} \quad (3.43).$$

Dacă $t_{CALC} > t_{TAB, \alpha, Q(n-1)}$, $\alpha = 0,05$, atunci toți coeficienții de regresie sunt semnificativi. În caz contrar, o parte dintre ei sunt nesemnificativi și nu se include în model.

- calcularea intervalului de încredere al coeficienților de regresie:

$$I(b) = \pm t_{TAB, \alpha, Q(n-1)} \cdot S_{b_j} \quad (3.44).$$

Dacă $|b_j| > |I(b)|$, $\forall j = 0, \dots, k$, toți coeficienții sunt semnificativi. În caz contrar, o parte dintre ei sunt ne semnificativi și nu se includ în model.

8. Verificarea concordanței ecuației de regresie:

a) calculul dispersiei de adecvanță:

$$s_{adecv}^2 = \frac{n}{N} \sum_{i=1}^N (\bar{y}_i - \tilde{y}_i)^2 \quad (3.45).$$

în care i reprezintă numărul de termeni semnificativi din ecuația de regresie, iar \tilde{y} valori estimate pe baza modelului regresional determinat.

b) Calculul criteriului Fisher:

$$F_{CALC} = \frac{s_{adecv}^2}{s_0^2} \quad (3.46).$$

Dacă $F_{CALC} > F_{TAB, \alpha, v1, v2}$, ecuația de regresie obținută nu este adecvată datelor experimentale; $\alpha = 0,05$; $v1 = N - 1$; $v2 = Q(n-1)$.

3.2.7.6. Decizii în urma modelării liniare prin experiment factorial

Principalii purtători de informații sunt coeficienții de regresie prin valoarea lor numerică și semn. Analiza coeficienților de regresie permite aprecierea amplitudinii și sensului de influență ale factorilor [100].

Astfel, există două situații caracteristice:

- a) coeficienții sunt semnificativi;
- b) coeficienții sunt ne semnificativi.

a) Dacă toți coeficienții sunt semnificativi, este foarte important ca valorile lor să fie relativ apropiate (de același ordin de mărime), ceea ce indică faptul că modelul este în apropierea domeniului de optim în raport cu toți factorii analizați.

b) Dacă o parte sau toți coeficienții sunt ne semnificativi, aceasta se poate datora, pe de o parte condițiilor de experimentare, în sensul că intervalele de variație ale factorilor au fost prea înguste sau eroarea experimentală a fost prea mare, caz în care se recomandă refacerea cercetării cu corecțiile adecvate.

Pe de altă parte, caracterul ne semnificativ al factorilor poate deriva fie din menținerea în experiment a unor factori realmente ne semnificativi, fie din neincluderea în experiment a unor factori semnificativi.

Un alt aspect al interpretării rezultatelor îl constituie analiza comparativă a informației apriorice și a informației rezultate din experimentul factorial. Se impune verificarea identității condițiilor de experimentare din punct de vedere al intervalului de variație și respectiv din particularitățile metodelor de experimentare, care pot fi:

- unifactoriale (clasice);
- multifactoriale (moderne).

În concluzie, erorile de experimentare, respectiv de informare precum și caracterul local al explorării spațiului multifactorial și respectiv caracterul monofactorial al informației apriorice sunt aspecte de care trebuie să se țină seama în interpretarea rezultatelor și implicit în luarea deciziilor.

Adoptarea deciziilor este influențată de trei categorii de elemente:

- adecvanța sau inadecvanța modelului liniar;
- caracterul semnificativ sau ne semnificativ al coeficienților de regresie;
- poziția relativă a domeniului explorat prin experiment în raport cu domeniul de optim;
- poziția relativă a domeniului explorat prin experiment în raport cu domeniul de optim.

Deciziile se iau funcție de următoarele situații tipice[115]:

a) Modelul liniar este adecvat:

- dacă toți coeficienții sunt semnificativi și de valori apropiate, înseamnă că suntem aproape de optim; în acest caz se poate decide trecerea la o modelare empirică de ordin superior sau deplasarea în continuare către optim prin metode iterative;
- dacă deși toți coeficienții sunt semnificativi, există totuși diferențe mari între valorile lor numerice, se recomandă repetarea experimentului, cu corectarea în prealabil a intervalelor de variație, și anume, creșterea intervalelor aferente factorilor cu valori b_j mici și/sau micșorarea intervalelor aferente factorilor cu valori b_j mari; pe de altă parte, se va încerca diminuarea erorilor experimentale prin creșterea numărului de replici și/sau perfecționarea metodelor de măsurare;
- dacă numai o parte a coeficienților de regresie sunt semnificativi, este necesară acțiunea asupra intervalelor de variație a factorilor ne semnificativi, asupra reducerii erorii experimentale, asupra includerii

în experiment sau a eliminării din experiment de factori; se recomandă trecerea de la experimente factoriale fracționare de rezoluție mai mică, la experimente factoriale fracționare de rezoluție mai mare, sau la experimente factoriale complete;

- dacă toți coeficienții modelului sunt ne semnificativi, este un semnal că în conceperea și efectuarea experimentării s-au strecurat greșeli importante, caz în care se impune o revizuire globală a modelării liniare.

b) Modelul liniar nu este adecvat:

- dacă experimentul a fost corect conceput și realizat, este un semn că suntem în apropierea unui extrem, și deci sunt condiții favorabile trecerii la modelare de ordin superior;
- dacă modelul nu a fost corect conceput și/sau analizat, se impune reluarea cercetării experimentale, în primul rând prin reducerea intervalelor de variație a factorilor, respectiv prin introducerea în experiment de factori suplimentari, neglijați anterior; există situații în care se recomandă chiar modificarea punctului central al experimentării; în mod excepțional, se poate continua cercetarea și cu modele liniare neadecvate, sau se poate asigura adecvanța modelului liniar prin substituirea funcției obiectiv.

CAPITOLUL 4

PRECIZAREA METODELOR DE INVESTIGARE, A PARAMETRILOR MĂSURAȚI. APARATURA UTILIZATĂ ȘI DETERMINĂRI EXPERIMENTALE

4.1. Prezentare generală a metodelor de investigare

Studiile moderne asupra lipoproteinelor se bazează pe ultracentrifugare, care separă clasele de lipoproteine în funcție de masa și dimensiunile macromoleculare.

Stabilirea exactă a densității plasmei sau serului este destul de dificilă, deoarece depinde de variațiile în nivelul total de macromolecule și în compoziția de molecule mici, dar, în general, se consideră că are o densitate de 1,0063 g/ml.

Ultracentrifugarea separatoare realizează izolarea fiecărei fracțiuni lipoproteice. O problemă mai dificilă este separarea chilomicronilor exogeni de lipoproteinele endogene, cu densitate foarte joasă.

În timpul ultracentrifugării preparative se produce o redistribuire apreciabilă a sărurilor, dinspre partea superioară spre cea inferioară a eprubetei preparative, a cărei intensitate depinde de natura și concentrația de săruri, ca și de natura centrifugării.

În cazul în care ultracentrifugarea separatoare nu este urmată de ultracentrifugarea analitică, refractometria constituie singura metodă de evaluare a VLDL și LDL. Deoarece determinarea refractometrică nu necesită decât o picătură de fracțiune lipoproteică, fracțiunile pot servi în continuare la determinarea în ultracentrifuga analitică sau pentru determinări de lipide și proteine. Dacă se practică ulterior ultracentrifugarea analitică, refractometria servește la controlul concentrației lipoproteinelor și indică dacă centrifugarea are loc la concentrația optimă. Spre exemplu, dacă concentrația LDL depășește 1300 mg/100 ml, proba va fi diluată pentru a evita repetarea ultracentrifugării, care este costisitoare. În plus, dacă se determină refractometric serul total și se cunoaște conținutul total lipoproteic al serului,

se poate calcula o valoare exactă și reproductibilă pentru proteinele serice totale.

Ultracentrifugarea analitică este tehnica de fracționare cea mai completă care permite obținerea unor tablouri complete ale compoziției și proprietăților fiecărei clase.

Ultracentrifugarea analitică se poate practica în urma ultracentrifugării preparative și va studia clasele de lipoproteine în funcție de densitatea și talia moleculelor. Această metodă poate determina cantitativ un număr aproape nelimitat de subclase Sf de lipoproteine care se deosebesc prin parametrii caracteristici ai densităților lor. Pentru studiile curente clinice sau experimentale sunt importante însă numai cele 4 familii de lipoproteine majore menționate.

Toate datele pentru fiecare centrifugare sunt transcrise în sistemul de operare a computerului dând densitatea fiecărei fracțiuni, concentrația relativă la ser și condițiile centrifugării analitice. Apoi, aceste date sunt prezentate în formă de grafic al spectrului care permite evaluarea optică rapidă, compararea probelor și obținerea mediilor pentru o populație dată, ca și calea de determinare a erorilor.

Ultracentrifugarea analitică evidențiază 5 tipuri fundamentale, dar și o serie de modele care par să reprezinte variații sau combinații ale tipurilor de bază.

Ultracentrifugarea analitică este tehnica de fracționare cea mai indicată, deoarece permite obținerea unor informații complete asupra compoziției fiecărei clase și a unui număr foarte mare de subclase de lipoproteine, precum și a proprietăților acestora, dar nu este accesibilă decât în unele laboratoare.

4.2. Prezentarea parametrilor mășurați

Colesterolul plasmatic și trigliceridele plasmatic sunt o fracție a lipidelor plasmatic care circulă prin vasele sangvine sub forma unor legături cu proteinele plasmatic. Această circulație este necesară deoarece diversele fracții ale lipidelor plasmatic nu sunt hidrosolubile și ar produce o turbiditate accentuată a plasmii. Pentru ca plasma să aibă un aspect clar și nu turbid, colesterolul cât și trigliceridele sunt legate sub formă de cenapse cu proteinele plasmatic. Aceste legături poartă numele de lipoproteine plasmatic.

Întrucât proteinele plasmatic au o greutate mare, în funcție de cantitățile de proteine ce sunt legate de colesterol și trigliceride, se deosebesc 3 forme de lipoproteine:

1. **Alfalipoproteinele** sunt lipoproteinele care conțin predominant proteine și colesterol. Au greutate moleculară mare. Colesterolul conținut în ele poartă numele de **HDL (high density lipoproteins)** care reprezintă 1/3 din colesterolul total plasmatic;

2. **Betalipoproteinele** sunt lipoproteinele care conțin o cantitate mai mică de proteine decât alfalipoproteinele, și mai mult colesterol. Au greutate moleculară mai mică decât alfalipoproteinele. Colesterolul conținut în ele poartă numele de **LDL (low density lipoproteins)**;
3. **Prebetalipoproteinele** sunt lipoproteinele care conțin o cantitate mică de proteine și trigliceride. Sunt cele mai ușoare lipoproteine fiind numite **VLDL (very low density lipoproteins)**.

Apolipoproteinele A sunt principalele componente proteice ale lipoproteinelor de densitate mare (HDL). Apo A-1 reprezintă aproximativ 60% din proteinele HDL. S-a constatat că Apo A-1 oferă componenta structurală necesară formării HDL. Apo A-1 este și agentul responsabil pentru activarea lecitin colesterol aciltransferazei (LCAT), care catalizează esterificarea colesterolului.

Apolipoproteina B (Apo B) este principala proteină a lipoproteinelor de densitate mică (LDL), cuprinzând aproximativ 90% din masa proteinelor LDL.

Formulele de calcul pentru colesterol și fracțiile sale (HDLc și LDLc) sunt următoarele:

- pentru colesterol

$$\text{conc.colesterol} = \frac{\Delta A_{\text{mostra}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{concentratie.standard}$$

- pentru HDLc

$$\text{conc.HDLc} = \frac{\Delta A_{\text{mostra}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{concentratie.standard}$$

- pentru LDLc

$\text{conc. LDL} = \text{conc. colest.total} - \text{conc.colest. (HDL+VLDL) supernat.}$

în care: $\Delta A_{\text{mostră}}$ variația absorbantei mostrei

$\Delta A_{\text{standard}}$ variația absorbantei standard.

Unul din obiectivele propuse ale lucrării este determinarea fracțiilor plasmatic prezentate mai sus, a fracțiilor colesterolului total plasmatic (HDLc, LDLc), a trigliceridelor plasmatic (VLDL), cât și a unor fracții a lipidelor plasmatic circulante în sânge sub forma de apolipoproteine Apo A (bogată în HDLc) și Apo B (bogată în LDLc), ultimele fracții ale lipidelor plasmatic necesitând costuri ridicate pentru investigare.

S-a dat prioritate colesterolului total, a fracțiilor lui (HDLc, LDLc), a Apo A și Apo B, cât și a interpretării valorilor lor la cele 2 loturi de subiecți, deoarece se știe că colesterolul este elementul biologic central în apariția

aterosclerozei. Această afecțiune medicală se dezvoltă la nivelul arterelor mari și mijlocii sub forma depunerilor de colesterol sub intima acestor vase sangvine, la început sub formă de striatii, ulterior ele confluează în timp apărând plăcile de colesterol; ele au culoarea galbenă datorită colesterolului și sunt denumite plăci de aterom (din grecescul atheros = galben).

Desigur că, în acest context anatomopatologic trebuiau găsite metode invazive (nesângerânde) pentru diagnosticarea aterosclerozei și acestea sunt metodele de determinare a nivelului colesterolului plasmatic. Ulterior, s-au descoperit fracțiile sale HDLc și LDLc, și mai recent apolipoproteinele care conțin aceste fracții ale colesterolului în mod diferit.

Descompunerea acestor fracții ale colesterolului a arătat că doar **fracția LDL prezintă risc de aterogeneză**, deoarece aceasta se găsește în compoziția plăcilor de aterom.

S-a dovedit că **raportul HDL/LDL, denumit indice de aterogenitate** este un marker important în aprecierea diagnostică și evolutivă a aterosclerozei, fiind considerat profilul biochimic al acesteia. De asemenea, Apo A și Apo B completează în mod fericit valorile fracțiilor colesterolului pentru a putea face aprecieri atât diagnostice cât și de a modula terapia modificărilor plasmatice ale acestor fracții lipidice (tratamentul cu statine).

Creșterea valorilor lipoproteinelor plasmatice se constată cel mai frecvent și cu implicații sociale cele mai grave, în ateroscleroză, care reprezintă de mai multe decenii "boala secolului". Această entitate patologică este vârf de morbiditate și mortalitate în țările industrializate, iar în țara noastră datele statistice sunt apropiate de cele din aceste țări.

Modificările lipoproteinelor reprezintă profilul biochimic al aterosclerozei, adică diagnosticul biologic al acestei afecțiuni medicale, alături de alte posibilități de diagnostic (examen clinic, EKG, ecocardiograma, etc).

Au fost luate în studiu 2 loturi de 15 subiecți aflați sub tratament:

- unul prezentând cardiopatie ischemică cu sau fără infarct miocardic, la care ateroscleroza reprezintă cauza anatomo-patologică;
- altul, cu hipertensiune arterială,

comparativ cu un lot martor de subiecți sănătoși, fără o afecțiune cardiacă.

La cele două loturi s-au determinat fracțiile lipidelor plasmatice: colesterol cu fracțiile (HDLc, LDLc), trigliceridele și apolipoproteinele Apo A și Apo B, efectuate în dinamică (trei determinări la interval de 3 luni – martie, iunie, septembrie -) pentru aceiași subiecți.

Repartizarea subiecților la cele două loturi s-a făcut pe cele două sexe și vârsta pacienților la cardiopatie ischemică (46-71 ani) iar la hipertensiune arterială (55-75 ani).

De asemenea, s-a făcut repartizarea pe 2 loturi în funcție de sexul subiecților, cea a bărbaților cu 18 subiecți cu vârsta între 46-75 ani, iar cea a femeilor cu 12 subiecți, la care vârsta este cuprinsă între 55-72 ani.

Este un lucru dovedit că determinările acestor fracții lipidice la intervale de timp scot în evidență valori diferite, de la o determinare la alta, uneori normale, alteori crescute. Acest lucru nu este în relație directă totdeauna cu gravitatea cardiopatiei ischemice, de aceea nu putem aprecia de fiecare dată prognosticul afecțiunii la un subiect numai pe baza valorilor acestor fracții lipidice serice. Determinarea valorilor fracțiilor lipidelor serice ghidează în schimb terapia medicamentoasă (cu fibrati și statine) în situația unor valori crescute și modulează dozele de medicament pe 24 de ore în funcție de nivelul acestor fracții lipidice plasmatic.

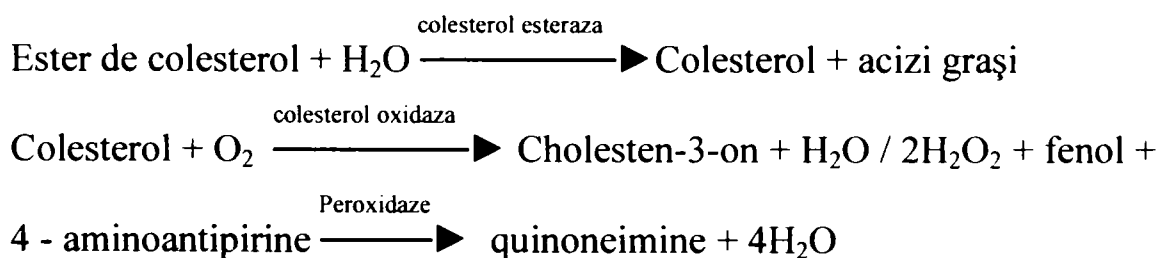
Prezența la un individ a modificărilor anatomice de ateroscleroză poate fi documentată prin mai multe metode (clinice, EKG, angiografie, ecocardiografie, etc...), care nu fac obiectul tezei de față. Lucrarea de față se ocupă de aspectul biochimic prin care putem documenta modificările de ateroscleroză, iar acestea sunt reprezentate de valorile colesterolului total și a fracțiilor sale (HDLc, LDLc), cât și a celor două apolipoproteine Apo A și Apo B, care conțin în structura lor fracțiile colesterolului.

4.3. Prezentarea metodelor de investigare utilizate

4.3.1. Determinarea prin test enzimatic colorimetric a colesterolului

Principiu

Colesterolul și esterii săi sunt eliberați din lipoproteine.[92] Esterii de colesterol hidrolizează formând colesterolul, și prin oxidarea enzimatică de către colesterol oxidaza, se formează H_2O_2 conform următoarei reacții:



Concentrația reactivului

Reactiv/R1: (reactiv enzimatic tamponat)	
Soluție tampon, pH 6.9	90 mmol/l
Fenol	26 mmol/l
Oxid de colesterol	200 U/l
Ester de colesterol	300 U/l
Peroxidaze	1250 U/l
4-Aminoantipirine	0.4 mmol/l
Reactiv /R4 (standard)	
Colesterol	200mg/dl sau 5.17 mmol/l

Preparare și stabilitate

Reactivul /R1 și /R4 standard sunt gata de utilizare.

Reactivul este stabil dacă nu este deschis până la data de expirare înscrisă pe sticlă și dacă este păstrat la 2-8°C.

Deschis, reactivul este stabil pentru 4 săptămâni la 20 - 25°C, sau 12 săptămâni la 2 - 8°C.

Mostre

Ser. plasmă colectată pe heparină.

Procedură

Lungime de undă: Hg 546 nm (500 – 550 nm);

Temperatură: +37°C;

Cuve : 1 cm;

Ajustare la zero: reactiv blank, un singur reactiv blank pe serie.

	Blank	Standard	Mostre
Standard	-	10 μl	-
Mostră	-	-	10 μl
Reactiv activ	1000 μl	1000 μl	1000 μl

Se amestecă, se măsoară după incubarea la 37°C timp de 5 minute.

În decurs de 60 de minute se citește absorbanta mostrei față de reactivul blank.

Calcul**după standard**

$$\text{conc.coolesterol} = \frac{\Delta A_{\text{mostră}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{concentrație standard}$$

Concentrația standard : 200 mg/dl sau 5.16 mmol/l

după factor

Lungime de undă	c (mg/dl)	c (mmol/l)
Hg 546 nm	860 x ΔA	22.2 x ΔA

Această metodă este liniară până la 800 mg/dl sau 21 mmol/l.

Dacă concentrația de colesterol este mai mare în ser sau plasmă, se diluează mostra 1:2 cu soluție salină și se repetă testul. Se înmulțește rezultatul cu 2.

Valori normale

Următoarele limite sunt recomandate pentru recunoașterea hipercolesterolemiei :

Suspecți peste: 220 mg/dl sau 5.3 mmol/l

Risc crescut peste: 260 mg/dl sau 6.7 mmol/l

4.3.2. Determinarea prin precipitare a HDL colesterol

Principiu

Chilomicroni, VLDL (lipoproteine de foarte mică densitate) și LDL (lipoproteine de mică densitate) se precipită prin adăugare de acid fosfowolframic și de clorură de magneziu. După centrifugare, lichidul supernatant conține fracțiunea HDL, conținutul lor de colesterol este determinat enzimatic.

Concentrația reactivului

Acid fosfowolframic 0.55 mmol/l

Clorură de magneziu 25 mmol/l

Preparare și stabilitate

1. Precipitant pentru macroanalize. Conținutul se utilizează nediluat.
2. Precipitant pentru semi-microanalize:
Se diluează 4 părți de reactiv precipitant cu o parte apă redistilată (ex.80 ml + 20 ml).

Reactivul HDL este stabil până la data expirării, dacă este depozitat între 15-25°C.

Mostre

Ser, plasmă heparinizată sau EDTA.

Procedură

Se amestecă bine, se lasă să stea 10 minute la 15-15°C și se centrifughează pentru 2 minute la 1000 g sau 10 minute la 4000g. După centrifugare, se separă supernatant limpede de precipitat, în decurs de o oră, și se determină concentrația de colesterol.

Determinarea colesterolului

Precipitare

Pipetare în tuburile centrifugii.

Lungime de undă: Hg 546 nm, 500 nm;

Temperatură: +25 / +30 / +37°C;

Cuve: 1 cm;

Ajustare la zero: reactiv blank.

Reactivi	Macro	Semi Micro
Mostră	500	200 μ l
Reactiv HDL nediluat	1000 μ l	-
Reactiv HDL diluat	-	500 μ l
Pipetare în cuve	Reactiv blank	Mostră
H ₂ O distilată	100 μ l	-
Supernatant HDL	-	100 μ l
Reactiv CHOD PAP de colesterol	1000 μ l	1000 μ l

Se amestecă și se măsoară după incubare la 37°C pentru 5 minute sau 10 minute la 20-25°C. În decurs de 60 minute se citește absorbanta față de reactivul blank.

Calculule

Lungime de undă	Macro (mg/dl)	Semi Micro (mg/dl)
Hg 546 nm	280 x Δ A	327 x Δ A
500 nm	188 x Δ A	220 x Δ A

Interpretare clinică

Parametrul	Valori	Dereglarea lipidelor
Colesterol Trigliceride	< 200 mg/dl (5.1 mmol/l) < 200 mg/dl (2.3 mmol/l)	Nu
Colesterol	200 – 300 mg/dl 5.1 – 8.6 mmol/l	Da, dacă colesterolul HDL < 35 mg/dl
Colesterol Trigliceride	> 200 mg/dl (8.6 mmol/l) > 200 mg/dl (2.3 mmol/l)	Da

Observații

Valorile obținute sunt valide dacă:

- în mostră nu sunt prezenți chilomicroni;
- concentrația de trigliceride nu depășește 400 mg/dl;
- mostra nu are semne de hiperlipoproteinemie de tip III.

În măsurătorile la Hg 546 nm, proprietățile spectrale ale hemoglobinei simulează valori ridicate de colesterol HDL, care pot fi ignorate până la 200 mg Hb/100 ml.

Supernatantul obținut la centrifugare trebuie să fie limpede. Dacă mostra are un conținut crescut de trigliceride (peste 1000 mg/dl), precipitatul de lipoproteine poate fi incomplet (supernatant tulbure), sau o parte din precipitat poate pluti la suprafață. În aceste cazuri, se diluează specimenul 1:1 cu soluție 0.9% NaCl și se repetă pasul precipitării.

4.3.3. Determinarea prin test colorimetric enzimatic a HDL colesterol

Principiu

În primul pas, LDL, VLDL și chilomicroni sunt eliminați și transformați în componente nereactive, în condiții specifice reacției. La cel de-al doilea reactiv, doar colesterolul HDL este supus reacției de culoare.

Concentrația reactivului

Reactiv /R1: (reactiv enzimatic)

Soluție tampon, pH 7.0	100mM
Colesterol oxidaza	> 0.8 KU/l
Colesterol esteraza	> 1.0 KU/l
Catalase	> 500 KU/l

HDCBS 0.5 mmol/l

Reactiv /R2: (reactiv de culoare)

Peroxidaza	30 KU/l
Aminoantipirine	4 mmol/l

Reactiv /R4: (standard de ser)

Colesterol HDL	40 mg/dl
----------------	----------

Preparare și stabilitate

Reactivii sunt gata de utilizare și stabili până la data expirării înscrisă pe etichete, dacă este evitată contaminarea. Stabilitatea analizorului desigilat este o lună, la temperaturi între 2-8°C.

Standardul trebuie dizolvat în 3 ml apă distilată, mișcându-se încet pentru 30 minute. După dizolvare, standardul este stabil pentru 3 zile la 2-8°C.

Mostre

Ser, plasma colectată pe heparină.

Procedura

Lungime de undă: 600 nm (lungimea de undă laterală 700nm);

Temperatură: 37°C;

Cuve: 1 cm;

Ajustare la zero: reactiv blank, un singur reactiv blank pe serie.

Reactivi	Standard	Mostră
Standard	3 μl	-
Mostră	-	3 μl
Reactiv /R1	300 μl	300 μl
Se amestecă bine și se incubează la 37°C pentru 5 minute. Se adaugă:		
Reactiv /R2	100 μl	100 μl

Se incubează la 37°C. Se citește absorbanta inițială A_1 după exact 30 de secunde și A_2 după 5 minute, pentru standard și mostră.

Se calculează $\Delta A = A_2 - A_1$

Calcule

după standard:

$$conc.HDL_c = \frac{\Delta A_{mostră}}{\Delta A_{standard}} \times concentratie.s\ standard$$

Concentrație standard: 40 mg/dl.

Această metodă este liniară până la 150 mg/dl.

Sensibilitatea metodei este aproximativ 2 mg/dl.

Valori normale

Valori HDLc	Bărbați	Femei
Normal	>55 mg/dl	>65 mg/dl
Risc scăzut	35 – 55 mg/dl	45 – 65 mg/dl
Risc crescut	<35 mg/dl	<45 mg/dl

4.3.4. Determinarea prin precipitare a LDL colesterol

Principiu

Lipoproteinele de densitate scăzută (LDL) sunt precipitate de heparină la punctul lor izoelectric (pH 5,12). După centrifugare, lipoproteinele de densitate mare (HDL) și lipoproteinele de foarte scăzută densitate (VLDL) rămân în supernatant și pot fi apoi determinate enzimatic.

Concentrație reactiv

Heparină	0.68 g/l
(corespunzând la 100.000 (U/l)	
Citrat de sodiu	0.064 mol/l
Stabilizatori	2%

Preparare și stabilitate

Reactivul precipitant este gata de utilizare. Reactivul LDL este stabil până la data expirării, dacă este depozitat la 2-8°C.

Mostre

Ser, plasmă heparinizată sau EDTA.

Procedura

Pipetare în tuburile centrifugii.

Mostră	100 μl
Reactiv LDL	1000 μl

Pipetare în cuve

	Reactiv blank	Mostră
H ₂ O distilat	100 μl	-
supernatant	-	100 μl
Colesterol reactiv	1000 μl	1000 μl

Se amestecă bine, se lasă să stea 10 minute la 15-25°C și se centrifughează pentru 15 minute la 4000 rpm.

După centrifugare, se separă supernatant limpede de precipitat. În decursul unei ore se determină concentrația colesterolului.

Determinarea colesterolului

Lungime de undă: Hg 546 nm, 500nm

Temperatura: +25 / +30 / +37°C

Cuve: 1 cm

Ajustare la zero: reactiv blank

Se amestecă și se măsoară după incubare la 37°C pentru 5 minute sau 10 minute la 20-25°C. În decursul a 60 minute se citește absorbanta față de reactivul blank.

Calcul

Hg 546 nm 1028 x ΔA

500nm 690 x ΔA

$conc. LDL_c = conc. colest. total - conc. colest. (HDL + VLDL) supernat.$

Valori normale

Valori utilizate ca și criteriu pentru tratament:

Nu necesită tratament	< 150 mg/dl
Interval de suspect	150 – 190 mg/dl
Se cere tratament	> 190 mg/dl

Observații

Lipoproteinele de densitate scăzută și Lp(a) foarte rare sunt precipitate cantitativ; are loc o ușoară coprecipitare a VLDL, dar deoarece conținutul de colesterol al acestei ultime fracțiuni de lipoproteină este scăzut, valorile colesterolului LDL nu sunt crescute semnificativ și estimarea riscului cardiovascular nu este afectată.

4.3.5. Determinarea cantitativă a apolipoproteinelor A (Apo A) și B (Apo B)

Determinarea Apo A (Apo A) se face cantitativ, prin analizarea imunoturbidimetrică a apolipoproteinei A în serul uman, pentru a ajuta la stabilirea riscului de boală: cardiopatie ischemică (CI).

Apolipoproteinele A-1 și A-2 sunt principalele componente proteice a lipoproteinelor de densitate mare (HDL). Apo A-1 reprezintă aproximativ 60% din proteinele HDL [90]. S-a constatat că Apo A-1 oferă componenta structurală necesară formării HDL [75]. Apo A-1 este și agentul responsabil pentru activarea lecitin colesterol aciltransferazei (LCAT), care catalizează

esterificarea colesterolului [47]. Esterii colesterolului sunt apoi transportați la ficat unde sunt îndepărtați, catabolizați și excretați [45]. Acest mecanism îndepărtează colesterolul de celulele periferice și poate explica proprietățile anti-aterogenice ale HDL Apo A-1.

Apolipoproteina B (Apo B) este principala proteină a lipoproteinelor de densitate mică (LDL), cuprinzând aproximativ 90% din masa proteinelor LDL. Apo B joacă un rol major în recunoașterea receptorilor celulari pentru catabolismul LDL [75].

Numeroase studii au indicat că măsurătorile de apolipoproteină A-1 și B sunt folositoare în stabilirea riscului de îmbolnăvire (CI). Ei sunt indicatori biochimici mai specifici și mai sensibili pentru riscul de îmbolnăvire coronarian decât trigliceridele, măsurarea colesterolului de ser sau analizarea colesterolului HDL și a colesterolului LDL [59, 69, 75]. Pacienții cu cardiopatie ischemică au în mod consecvent nivele scăzute de Apo A-1, și nivele ridicate de Apo B, decât subiecții de control [59, 69, 75].

Nivelurile de apolipoproteină

Studiul unui grup de subiecți normali asimptomatici, și a unui grup de pacienți supuși tratamentului coronarian, arată că valorile apolipoproteinelor pot fi folosite să distingă cazurile de cardiopatie ischemică [61].

Pacienții cu cardiopatie ischemică, prezintă în mod consecvent nivel mai ridicat de Apo B, și nivel mai scăzut de Apo A-1, decât subiecții de control.

Pacienți	Nivel de Apo A-1 (mg/dL)	Nivel de Apo B (mg/dL)
Normali	132±20	83±13
Diagnosticăți cu CI	98±15	114±23

Pacienții care suferă infarct miocardic prezintă un nivel de ser semnificativ scăzut de Apo B (medie de 59 mg/dL).

Au fost dezvoltate numeroase metode pentru cuantificarea apolipoproteinelor de ser.

Reactivul Sigma Diagnostics Apo A-1 este utilizat în măsurarea concentrației de Apo A-1 în ser uman imunoturbidimetric [4, 91].

Principiul metodei

Apo A-1 și Apo B în ser se combină cu anticorpi specifici prezenți în reactiv și formează un complex insolubil, rezultând o turbiditate a amestecului. Cantitatea de turbiditate formată este proporțională cu concentrația de Apo A-1, respectiv Apo B în mostră. Turbiditatea este măsurată cu spectrofotometrul la 340 nm și concentrația de Apo A-1,

respectiv Apo B în mostră este determinată dintr-o curbă de calibrare obținută folosind calibratori Apo A-1 și Apo B multi-nivel.

Reactivi

Reactiv cu anticorpi Apo A-1 și Apo B, soluție tamponată conținând anticorpi de capră pentru apolipoproteinele umane A-1 și B. Azotură de sodiu 0.1%, adăugat ca și conservant.

Calibratori Apo A-1

Ser uman, conținând 5 diferite concentrații de Apo A-1 și ser uman pentru Apo B. Azotură de sodiu 0.1%, adăugat ca conservant.

Controlerele I și II de ser apolipoproteinic, ser uman conținând Apo A-1 și Apo B. Azotură de sodiu 0.1%, adăugat ca și conservant. Reactivul cu anticorpi, calibratori și controalele de ser conțin azotură de sodiu, care poate reacționa cu plumbul și cuprul din instalații, pentru a forma azotură de metal foarte explozivă. Se evită acumulările de azoturi.

Preparare

Se prepară reactivul cu anticorpi activ, prin adăugarea de 0.1 ml de activator de Apo A-1 la 10 ml de reactiv cu anticorpi Apo A-1. Se amestecă bine prin agitare blândă. Toți reactivii sunt furnizați în formă lichidă, gata de folosire fără diluare prealabilă. Înainte de folosire, trebuie permis reactivilor să se echilibreze la temperatura camerei. Reactivul cu anticorp Apo A-1 poate apărea turbure. Un reactiv Apo A-1 excesiv de turbure trebuie filtrat printr-un filtru cu membrană de 0.45 microni înainte de utilizare.

Toți reactivii sunt furnizați în formă lichidă, gata de folosire fără diluare prealabilă. Înainte de folosire, trebuie permis reactivilor să se echilibreze la temperatura camerei. Reactivul cu anticorp Apo B poate apărea turbure. Un reactiv Apo B excesiv de turbure trebuie filtrat printr-un filtru cu membrană de 0.45 microni înainte de utilizare.

Se păstrează în frigider (2-8°C). Reactivii sunt stabili până la data expirării arătată pe etichete. Reactivul cu anticorpi activ este stabil pentru 48 de ore în frigider (2-8°C).

Sângele trebuie obținut de la pacienți care nu au mâncat și serul trebuie colectat cât de curând posibil și apoi refrigerat (2-8°C). Mostrele care nu au fost testate în decurs de 72 de ore trebuie înghețate (-20°C). A se evita înghețarea și dezghețarea repetată a mostrelor. Este recomandat serul, nu plasma, pentru a minimiza turbiditatea nespecifică.

Concentrații ridicate de bilirubină (150 mg/dL) și hemoglobină (50 mg/dL) nu interferează cu metoda turbidimetrică a Apo A-1 și Apo B [91]. Nu se cunoaște nici o altă substanță care să interfereze cu determinarea de Apo A-1 și Apo B [4]. Totuși, ca o precauție, mostrele foarte lipemice și mostrele cu concentrație de trigliceride mai mare decât 1000mg/dl trebuie diluate înainte de analize.

Procedura manuală

Materiale:

Spectrofotometrul capabil să măsoare cu exactitate absorbanta la 340 nm;

Cuve de 1 cm cu proprietăți optice potrivite pentru utilizarea la 340 nm;

Apă distilată sau deionizată;

Dispozitive de pipetare pentru obținerea exactă a volumelor cerute de metodă (5 μ l și 1.0 ml);

Seringă de unică folosință și seringi cu membrane filtrante (mărimea porilor de 0.45 microni);

Hârtie milimetrică ;

Cronometru;

Tuburi de test;

Dispozitiv de desenare linii curbe (curba franceză).

Procedura

Toți reactivii trebuie să se echilibreze la temperatura camerei înainte de utilizare.

1. Se prepară analizele după cum urmează :

Pentru Apo A

	Calibratori 1 - 5		Controale I și II		Mostre	
	Blank	Test	Blank	Test	Blank	Test
Calibratori 1-5	5 μ l	5 μ l	-	-	-	-
Controale I & II	-	-	5 μ l	5 μ l	-	-
Mostre	-	-	-	-	5 μ l	5 μ l
Apă*	1 ml	-	1 ml	-	1 ml	-
Reactiv anticorpi activi*	-	1 ml	-	1 ml	-	1 ml

Pentru Apo B

	Calibratori 1 - 5		Controale I și II		Mostre	
	Blank	Test	Blank	Test	Blank	Test
Calibratori 1-5	10 μ l	10 μ l	-	-	-	-
Controale I & II	-	-	10 μ l	10 μ l	-	-
Mostre	-	-	-	-	10 μ l	10 μ l
Apă*	1 ml	-	1 ml	-	1 ml	-
Reactiv anticorpi activi*	-	1 ml	-	1 ml	-	1 ml

*Apa deionizată și reactivul cu anticorpi activ trebuie adăugați la intervale cronometrate

2. Se amestecă imediat după adăugarea apei sau a reactivului cu anticorpi.
3. Se incubează la temperatura camerei (18-26°C) pentru 15 minute.
4. Se setează lungimea de undă a spectrofotometrului la 340 nm și indicatorul de absorbantă la zero, cu apă ca referință.
5. Se citește și se înregistrează absorbanta tuturor tuburilor la 340 nm, utilizând aceleași intervale de timp ca la pasul 1.
6. Se scade valoarea absorbantei blank din valoarea testului corespunzător, pentru a elimina absorbanta cauzată de turbiditatea mostrei (ΔA).
7. Pentru a determina concentrația de Apo A-1(mg/dL) din mostră, se studiază secțiunea "Calcul".

Calibrare

Această procedură trebuie calibrată utilizând calibratorii Apo A-1 furnizați cu pachetul. Utilizarea altor calibratori Apo A-1 nu este recomandată.

Controlul calității

Încrederea în rezultatele testului trebuie monitorizată prin utilizarea regulată a serurilor de control de concentrații cunoscute de Apo A-1. În acest scop, sunt furnizate serurile de apolipoproteine de control I și II. Concentrația de Apo A-1 trebuie să se încadreze în intervalele specificate pentru fiecare control.

Calculule

1. Pe hârtie milimetrică se trasează concentrațiile calibratorilor 1-5 pe axa X, iar pe axa Y absorbanta corectată (ΔA) a calibratorilor. Se trasează linia ce unește punctele utilizând, un dispozitiv de desenare curbiliniu (curba franceză).
2. Se determină concentrația de Apo A-1 pentru controalele de ser și mostre din curba de calibrare realizată.

Observație: Curba tipică de calibrare aleasă nu poate fi folosită pentru a determina rezultatele testului de laborator. Fiecare laborator trebuie să-și realizeze o curbă de calibrare.

Limitări

Pentru mostre foarte lipemice și mostre cu concentrație de trigliceride mai mare decât 1000 mg/dL, se diluează o parte de mostră cu o parte de salină izotonică. Se înmulțește rezultatul cu 2, pentru a compensa diluarea. Reactiv Apo A-1 Sigma Diagnostics măsoară concentrații de Apo A-1 de până la 230 mg/dl, iar pentru Apo B de până la 200 mg/dl.

Valori probabile

Pentru Apo A

Intervalul probabil pentru concentrațiile de Apo A-1 este de 73 până la 169 mg/dL, cu o valoare medie de 121 mg/dL [106]. Valorile probabile pe vârstă și sex sunt după cum urmează [113]:

Vârsta	Apo A-1, mg/dL	
	Femei	Bărbați
20-29	132	121
30-39	134	134
40-49	134	134
50-59	150	139
>60	146	138

Pentru Apo B

Intervalul probabil pentru concentrațiile de Apo B este de 58 până la 138 mg/dl, cu o valoare medie de 98 mg/dl [106]. Valorile probabile pe vârstă și sex sunt după cum urmează [113]:

Vârsta	Apo B, mg/dl	
	Femei	Bărbați
20-29	71	75
30-39	76	88
40-49	88	98
50-59	101	90
>60	89	100

Intervalele de deviație standard pentru Apo A-1 și Apo B au fost între 15,6 și 32,3 mg/dl. Este recomandat ca fiecare laborator să-și stabilească un interval probabil caracteristic populației locale.

Raportul de Apolipoproteine

De regulă, raportul de Apo A-1 și Apo B este mai mic sau egal cu 1 în cazurile de CI. Într-un studiu, datele au fost interpretate pentru a caracteriza riscul corespunzător raportului [61].

Riscul de CI	Raportul de Apo A-1/Apo B	
	Bărbați	Femei
Media	1.4	1.6
De două ori media	1.1	1.1
De trei ori media	1.0	1.0

Au fost analizate prin metoda descrisă și printr-o procedură imunoturbidimetric un total de 96 seruri având concentrația de Apo A-1 de la 89 la 207 mg/dL, și 99 seruri având concentrația de Apo B de la 35 la 177 mg/dL. Comparația valorilor a dezvăluit pentru Apo A-1 un coeficient de corelație de 0.998 și ecuația de regresie a fost $y = 0.91x + 10.62$, iar pentru Apo B un coeficient de corelație de 0.999 și ecuația de regresie a fost $y = 0.94x + 5.47$.

Studiile de precizie din cadrul procesului și dintre procese au dezvăluit următoarele date:

Pentru Apo A-1

	În cadrul procesului	
	Ser 1	Ser 2
Media (mg/dL)	102	192
Deviația standard (mg/dL)	2.2	6.4
Coeficient de variație (%)	2%	3.3%
Număr de analize	20	20

	Dintre procese	
	Ser 1	Ser 2
Media (mg/dL)	109	196
Deviația standard (mg/dL)	5.1	9.2
Coeficient de variație (%)	4.7%	4.7%
Număr de analize	10	10

Pentru Apo B

	În cadrul procesului	
	Ser 1	Ser 2
Medie (mg/dL)	42	115
Deviația standard (mg/dL)	2.2	2.1
Coeficient de variație (%)	5.1%	1.8%
Număr de analize	20	20

	Dintre procese	
	Ser 1	Ser 2
Medie (mg/dL)	40	110
Deviația standard (mg/dL)	1.9	7
Coeficient de variație (%)	4.8%	6.4%
Număr de analize	10	10

O altă metodă utilizată este prezentată în continuare.

Apolipoproteinele A₁ (Apo A₁) și B (Apo B) se păstrează la 2-8 °C și se determină numai pentru diagnostic “in vitro”.

Principiu

Apolipoproteinele conținute în serul uman formează imunocomplexe cu anticorpii corespunzători lor. Concentrațiile sunt determinate prin metoda turbidimetrică. Rezultatele sunt evaluate folosind o curbă de referință preparată cu ajutorul diluțiilor de calibrator.

Semnificație clinică

În studiul bolilor cardiovasculare determinarea apolipoproteinelor A₁ și B reprezintă parametrii mai specifici decât determinarea normală a lipidelor.

Lipoproteinele A₁ și B au respectiv markerii de la lipoproteinele HDL și LDL. La nivel individual, riscul este crescut de o concentrație mărită de Apo B și o concentrație scăzută de Apo A₁.

Reactivi utilizați

Reactiv 1 TRIS/PEG. tampon pH 7.5.

Reactiv 2 Antiser Apolipoproteinele A₁ și B.

Preparare și stabilitate

R.1: Gata de folosire. Stabil la 2-8°C, până la data expirării.

R.2: Trebuie diluat cu soluția tampon. Diluțiile depind de analizor. Stabil la 2-8°C, până la data expirării.

Calibrator: gata de folosire.

Curba de calibrare: se prepară diluții ale calibratorului dual Apo A1/B folosind 9 g/l NaCl ca diluant astfel:

Pentru Apo A

Nr.probă	1	2	3	4	5
Diluție	1/7	1/14	1/28	1/56	0
NaCl (μl)	300	100	100	100	100
Calibrator (μl)	50	-	-	-	-
Factor	3,0	1,5	0,75	0,37	0

Pentru Apo B

Nr.probă	1	2	3	4	5
Diluție	1/5	1/10	1/20	1/40	0
NaCl (μl)	400	200	200	200	200
Calibrator (μl)	100	-	-	-	-
Factor	3,0	1,5	0,75	0,37	0

Pentru a obține concentrația Apo A₁ a diferiților calibratori, se înmulțește concentrația calibratorului Apo A₁ cu factorul de diluție corespunzător indicat în tabel.

Mostre

Ser proaspăt. Apolipoproteinele în ser sunt stabile 8 zile între 2-8°C. Nu se utilizează mostre hemolizate sau lipemice. Controalele și mostrele se diluează manual sau automat cu soluție salină (NaCl 0.9%).

Procedura manuală

1. Condițiile metodei :

Lungime de undă:	340 nm
Temperatură:	37°C
Cuve:	1 cm

2. Se ajustează instrumentul la zero cu apă distilată.

3. Se diluează antiserul Apo A₁ (R.2) 1:41 cu soluția tampon R.1.
Reactivul activ este stabil 2 săptămâni la 2-8 °C.

4. Se diluează mostrele și controalele 1:21 cu soluție salină (NaCl 0.9%)

5. Se pipetează în cuve .

Pentru apo A

	Blank	Calibrator	Mostră
NaCl 9 g/l (μl)	20	-	-
Calibrator (μl)	-	20	-
Mostră dil. (μl)	-	-	20
Reactiv activ (ml)	1.0	1.0	1.0

Pentru apo B

	Blank	Calibrator	Mostră
NaCl 9 g/l (μl)	100	-	-
Calibrator (μl)	-	100	-
Mostră dil. (μl)	-	-	100
Reactiv activ (ml)	1.0	1.0	1.0

6. Se amestecă și se citește absorbția (A) față de blank, după 10 minute după adăugarea reactivului activ.

Calcul

Se calculează absorbția pentru fiecare calibrator și se trasează valorile găsite față de concentrație într-o curbă de calibrare. Concentrația Apo A₁ în mostră este calculată prin interpolarea valorii sale A pe curba de calibrare.

Valori de referință

Pentru Apo A, între 100-190mg/dl, iar pentru Apo B, între 55-159 mg/dl. Fiecare laborator trebuie să-și stabilească propriul interval de referințe.

4.4. Prezentarea aparaturii utilizate

Analiza colesterolului cu cele două sub fracțiuni HDLc și LDLc și a trigliceridelor, s-a făcut cu analizorul SCREEN MASTER-PLUS. Acesta este un fotometru interferențial cu filtre, complet asistat de către un microprocesor, putând realiza măsurători fotometrice urmate de prelucrarea rezultatelor acestora în funcție de programe, cu parametri stabiliți de către operator. Se pot realiza următoarele grupe de determinări: absorbanta, concentrația și determinări cinetice.

Selectarea filtrului interferențial se realizează automat, sub controlul microprocesorului. Aceasta ușurează citirea și elimină erorile de selectare a filtrului, ce puteau apare la aparatele cu selecție manuală. Sistemul optic este foarte sofisticat: există o lampă cu halogen de mare putere (5 W), iar fascicolul luminos este centrat de către o lampă cu cuarț, permițând măsurarea cu acuratețe, chiar și în cazul utilizării cuvetelor cu volum redus. Pot fi memorate 60 de programe. Toate valorile parametrilor analizelor pot fi memorate permanent de către instrument. Instrumentul este programat cu ajutorul unei tastaturi pentru introducerea parametrilor, afișajul realizându-se pe un ecran alfanumeric cu 32 de caractere. Pe acest ecran pot fi vizualizate și stările instrumentului sau semnalele de eroare. Rezultatele analizelor sunt vizualizate direct în unitățile de măsură, preselectate în faza de programare.

Utilizarea instrumentului este asistată de un sistem software avansat, care dirijează și controlează operațiile realizate de către utilizator. Instrumentul este echipat cu un semnalizator acustic. Pentru realizarea unei analize este necesară introducerea corectă a tuturor parametrilor.

Instrumentul este echipat cu o imprimantă termică de 20 de coloane, putându-se tipări atât rezultatele analizelor cât și parametrii de programare.

Analiza apo A și apo B s-a făcut cu STAT FAX 1904 PLUS, care este un fotometru bicromatic compact, controlat de un microprocesor. El are 6 filtre la temperatura de 37° C.

Diametrul standard a tuburilor rotunde utilizate este de 12 mm. Instrumentul este utilizat pentru a măsura absorbanta sau concentrația.

Funcția principală a aparatului este de a citi și a calcula determinările finale și cinetica colorimetrică. Pe acest aparat se poate derula fiecare procedeu de experimentare pentru citirea absorbantei la fiecare lungime de undă disponibilă. În plus, cele mai utilizate ecuații regresionale pot fi preprogramate pentru ușurarea experimentelor de laborator. Aceste programe includ calcularea rației și standardizarea uni și multicriterială. Prin afișarea alfanumerică, aparatul atenționează operatorul să citească tuburile în secvența următoare. Apoi efectuează calculele necesare și printează rezultatele.

În plus față de cele 6 posibilități de filtrare principale, operatorul poate selecta lungimea de undă pentru citirile bicromatice pentru orice variantă de

operare. Aceasta ajută la corectarea imperfecțiunilor în tuburi și deseori elimină efectele turbidității nedorite.

Fiecare mod de operare se accesează independen, reducându-se erorile și simplificându-se operația.

În **modul de absorbție**, aparatul citește și afișează diferite absorbanțe utilizând filtrele selectate de operator.

În **modul factor**, absorbanțele sunt înmulțite de factorul introdus de operator și apoi raportate ca și concentrații.

În **modul standard**, se calculează concentrațiile după legea lui Beer pe baza unei singure citiri standard.

În **modul de absorbție multi punct %**, sunt afișate absorbanțele simple ca procent în primul standard într-o curbă multipunct.

În **modul programabil** sau **modul multipunct**, se calculează concentrațiile cu legea lui Beer, pe baza unei legături punct la punct, a punctelor multiple standard (până la 7). Albirea probei este valabilă în toate modurile, cu excepția modului de absorbție și a modului de rată.

Modul de rată, determină modificarea valorii absorbției pe minut și apoi se înmulțește cu factorul de rată introdus de operator, sau raportează concentrația la un standard citit anterior. Citirile intermediare ale absorbției cineticii pot fi vizualizate pe grafic pentru verificarea liniarității reacției. Modulul de rată include o opțiune “ Batch” care permite determinărilor cinetice să se desfășoare simultan, decât consecutiv.

Aparatul conține memorie nevolatilă, ceea ce permite memorarea parametrilor de testare și a curbelor standard. Numele a 30 dintre cele mai comune determinări sunt memorate pe primele 30 poziții de testare, ceea ce permite utilizatorului să-și programeze parametrii de testare prin simplă accesare a numelui. În plus, alte teste pot fi memorate prin numerotare în “User menu”, cu o capacitate totală de 69 de teste.

Aparatul, de asemenea, conține un bloc de incubare la 37° C cu 12 stații. În incubator pot fi introduse tuburi de testare cu diametru de 12 mm (mărimea se specifică la timpul experimentării). Un sistem similar de incubare, care se automonitorează este construit pentru citirile absorbției controlate, la temperatură de 37° C. Aceasta este deseori esențial pentru precizia determinărilor ratei.

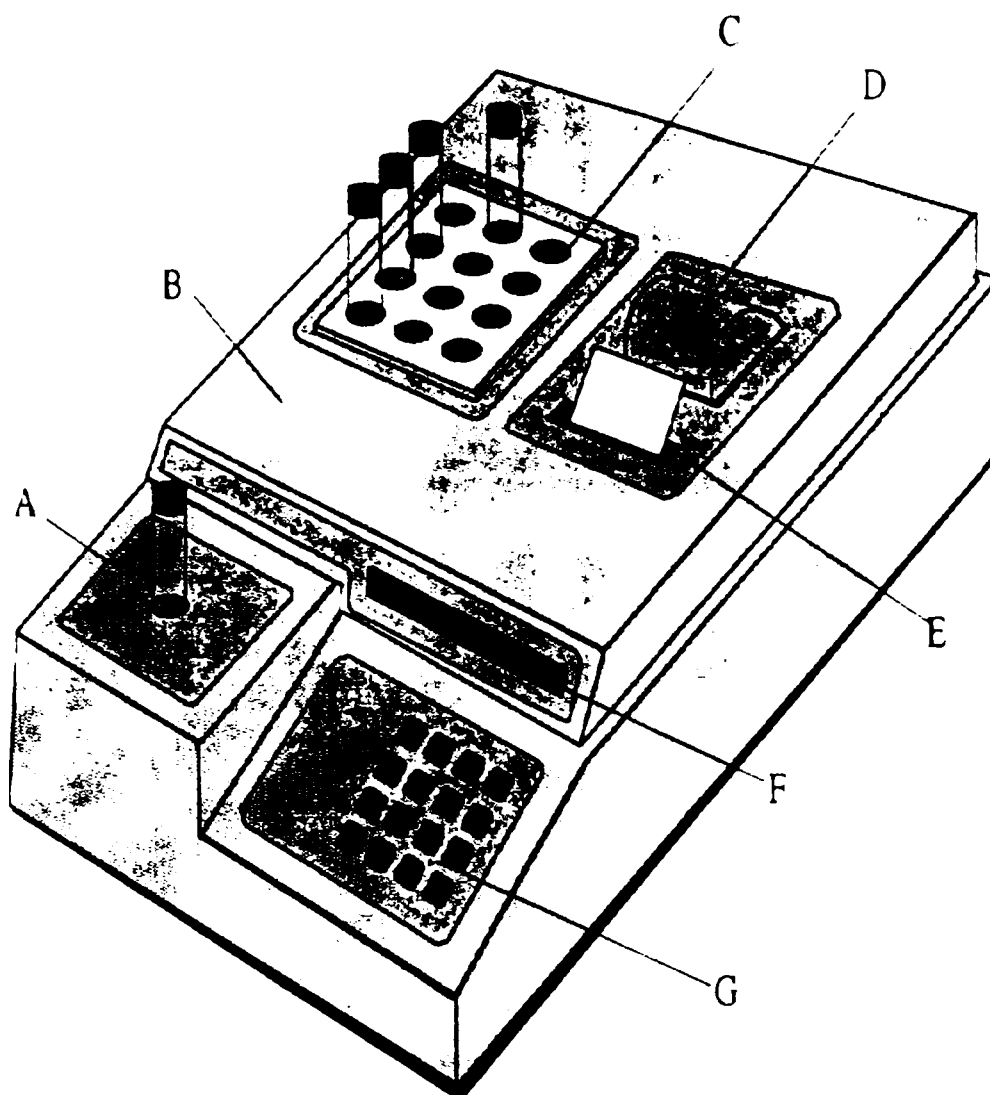
Caracteristicile principale ale aparatului sunt prezentate în tabelul 4.1

Tabel 4.1 Principalele caracteristici ale aparatului

Absorbanța	0 – 2,5Å
Acuratețe fotometrică	±(1% din citire +0,005 Å) pentru 1,5 Å ±(2% din citire +0,005 Å) pentru 1,5 -2Å
Stabilitate	Până la 0,005 Å în 8 ore/bicromatic
Sursa de lumină	Lampă halogen Tungsten
Lungimea de undă	340, 405, 459, 505, 545, 600 nm
Tipul filtrului	Interferențial cu multe cavități
Temperatura	37 ± 0,3 ° C
Timpul de încălzire	120 s
Viteză	Citire, calcul și listare în 3 secunde
Dimensiunea tubului	12 mm standard
Volumul minim	1 ml
Volumul maxim	2 ml (doar la temperatura de 37° C)
Ecran	Alfanumeric, 16 caractere
Imprimare	Termală, cu 20 de caractere pe linie
Temperatura recomandată	18-35° C
Umiditate recomandată	Mai mică de 85%
Tastatură	16 taste, membrană switch, 4x4
Tensiune de alimentare	120 V sau 240 V AC, 50-60 Hz
Greutate	4,5 kg

Aparatul oferă rezultate rapide, precise, reproductibile; operare nelimitată, ușoară; flexibilitate și economie; calibrare exactă a factorilor și salvare.

În figurile 4.1,4.2, 4.3 4.4 și 4.5 este redat aparatul STAT FAX 1904 PLUS și înregistrarea curbelor de etalonare a Apo A și Apo B.



- A – sistem optic
- B – capac
- C – incubator
- D – imprimantă
- E – hârtie imprimantă
- F – ecran alfanumeric
- G - tastatură

**Fig.4.1. Schema de principiu a fotometrului bicromatic
STAT FAX 1904 PLUS**

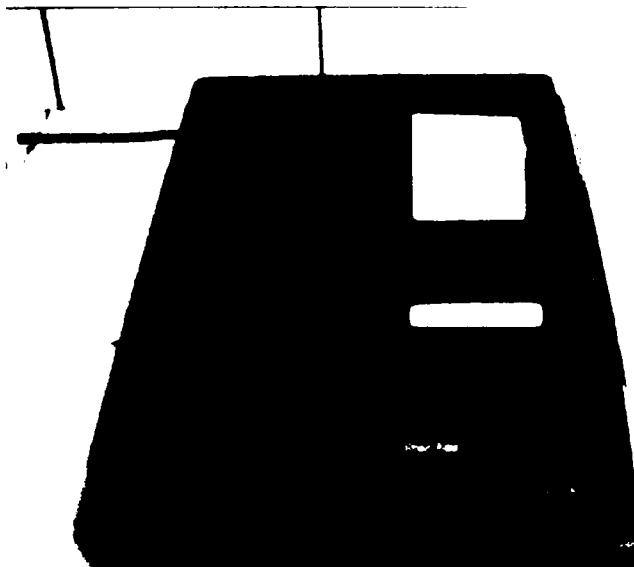


Fig. 4.2. Fotometrul bicromatic STAT FAX 1904 PLUS

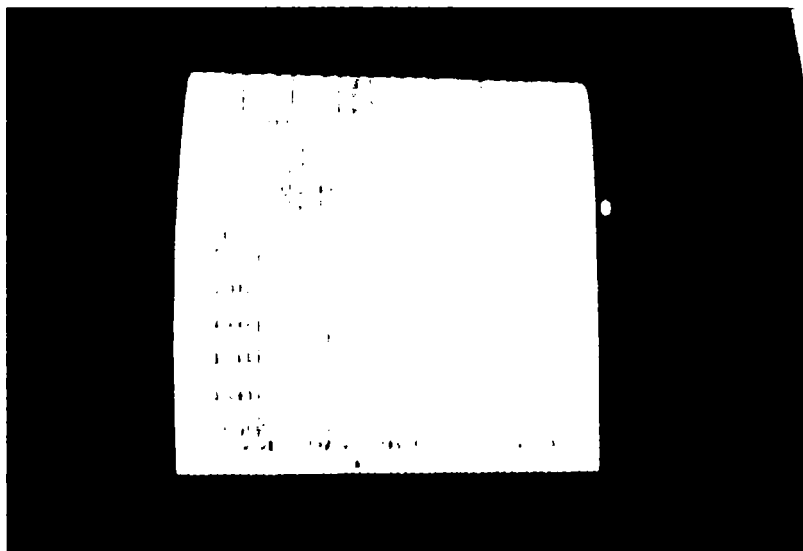


Fig. 4.3 Curba de etalonare pentru determinarea Apo A și Apo B

Cele doua curbe de etalonare pentru determinarea Apo A și Apo B sunt redate în fig. 4.4 și 4.5.

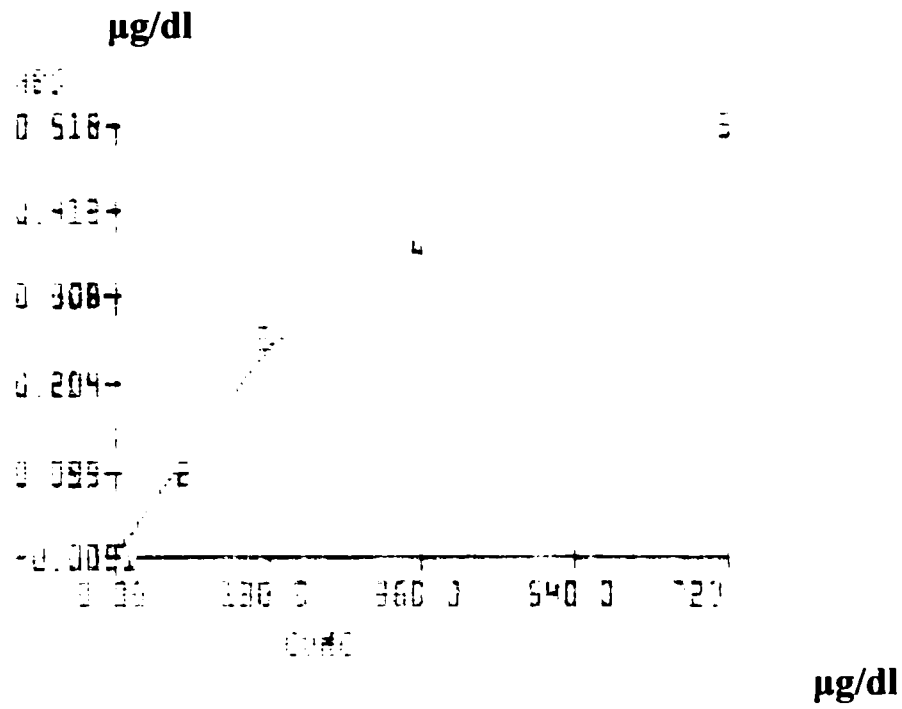


Fig. 4.4. Curba de etalonare pentru Apo A

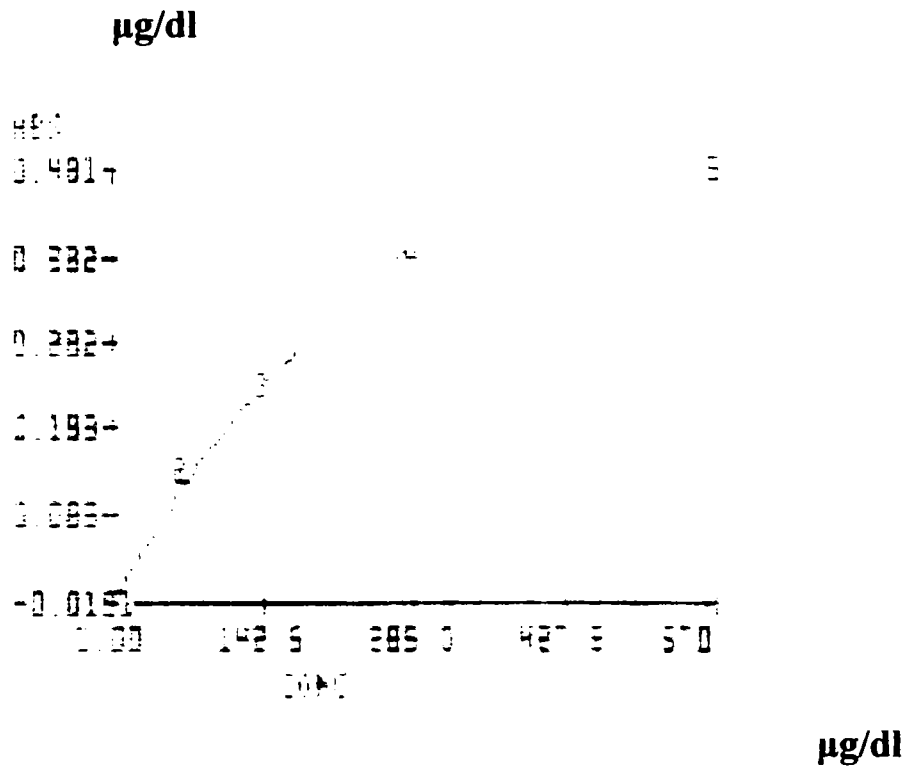


Fig. 4.5. Curba de etalonare pentru Apo B

4.5. Determinări experimentale

Determinările fracțiilor lipidelor plasmatice s-au efectuat pe loturi de subiecți, în laboratorul clinic al Spitalului Municipal Timișoara, condus de Prof. Dr. C. Dogaru.

Dacă determinarea colesterolului seric și a fracțiilor sale LDLc și HDLc, cât și a trigliceridelor serice este de mai mulți ani în uzul curent, nu același lucru se poate spune despre dozarea apolipoproteinelor, care datorită costului prohibitiv, nu pot fi introduse în determinările curente la subiecții cu modificări ale lipidelor serice.

S-a urmărit analiza de laborator pentru două grupe de pacienți cu boli diferite, grupa 1 hipertensiune arterială și grupa 2 cardiopatie ischemică. Celelalte două grupe sunt rezultatul împărțirii subiecților pe sexe. Analizele urmărite au fost: colesterolul cu cele două subfracțiuni HDLc și LDLc, trigliceride și două analize mai puțin investigate la noi, datorită costurilor ridicate, apo A și apo B. Aceste analize au fost făcute la un interval de 3 luni, de 3 ori.

Rezultatele obținute pentru prima luna (luna martie), pentru cele patru grupe se regăsesc în tabelele 4.1, 4.2, 4.3 și 4.4.

Tabel 4.1 Rezultate obținute la grupa 1- hipertensiune arterială

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo A I (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
16	190	88	67	76	145	97	B	68
17	191	118	37	123	128	106	B	62
18	216	321	38	128	131	128	F	65
19	162	116	46	86	128	90	B	70
20	139	68	60	65	141	119	B	66
21	271	91	64	165	138	183	B	75
22	355	156	73	257	137	236	B	68
23	157	80	74	67	149	108	B	63
24	158	128	75	66	136	113	B	70
25	162	131	39	108	151	134	F	58
26	231	187	62	117	168	112	F	62
27	291	199	51	184	155	180	F	55
28	279	120	78	169	187	131	F	55
29	148	80	36	80	124	86	F	63
30	211	116	75	71	180	107	F	72

Tabel 4.2 Rezultate obținute la grupa 2- cardiopatie ischemică

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo AI (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
1	100	51	21	50	88	60	B	46
2	127	66	33	73	113	65	F	64
3	150	83	38	77	112	78	B	71
4	163	168	50	67	149	76	B	65
5	134	94	44	66	128	128	B	63
6	168	83	56	92	123	138	B	63
7	141	96	58	52	121	141	B	65
8	221	93	87	106	160	148	B	66
9	285	195	42	167	118	203	B	69
10	196	120	103	72	124	120	B	69
11	181	113	59	95	150	94	F	67
12	227	211	40	131	131	152	B	68
13	196	136	68	59	160	98	F	61
14	189	58	88	41	157	93	F	62
15	232	150	81	56	168	118	F	59

Tabel 4.3 Rezultate obținute la grupa 3 – bărbați

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo AI (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
1	100	51	21	50	88	60	B	46
16	190	88	67	76	145	97	B	68
3	150	83	38	77	112	78	B	71
4	163	168	50	67	149	76	B	65
5	134	94	44	66	128	128	B	63
6	168	83	56	92	123	138	B	63
7	141	96	58	52	121	141	B	65
8	221	93	87	106	160	148	B	66
9	285	195	42	167	118	203	B	69
10	196	120	103	72	124	120	B	69
17	191	118	37	123	128	106	B	62
12	227	211	40	131	131	152	B	68
19	162	116	46	86	128	90	B	70
20	139	68	60	65	141	119	B	66
21	271	91	64	165	138	183	B	75
22	355	156	73	257	137	236	B	68
23	157	80	74	67	149	108	B	63
24	158	128	75	66	136	113	B	70

Tabel 4.4. Rezultate obținute la grupa 4 – femei

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Trigliceride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo A I (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
2	127	66	33	73	113	65	F	64
18	216	321	38	128	131	128	F	65
25	162	131	39	108	151	134	F	58
26	231	187	62	117	168	112	F	62
27	291	199	51	184	155	180	F	55
28	279	120	78	169	187	131	F	55
29	148	80	36	80	124	86	F	63
30	211	116	75	71	180	107	F	72
11	181	113	59	95	150	94	F	67
13	196	136	68	59	160	98	F	61
14	189	58	88	41	157	93	F	62
15	232	150	81	56	168	118	F	59

Valorile analizelor de colesterol - cu cele 2 subfracțiuni HDLc și LDLc -, trigliceride, apo A și apo B, pentru cea de-a doua determinare (luna iunie), la un interval de trei luni pentru cele 4 grupe, se regăsesc în tabelele 4.5, 4.6, 4.7 și 4.8

Tabel 4.5 Rezultate obținute la grupa 1- hipertensiune arterială

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Trigliceride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo A I (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
16	195	82	85	78	140	95	B	68
17	201	110	45	135	130	88	B	62
18	189	254	65	121	99	122	F	65
19	167	244	48	109	85	128	B	70
20	136	99	52	79	109	85	B	66
21	137	107	20	112	47	94	B	75
22	260	140	52	191	102	170	B	68
23	158	128	75	66	136	113	B	63
24	156	129	72	78	128	105	B	70
25	179	200	45	116	86	130	F	58
26	220	170	53	130	152	118	F	62
27	265	187	48	172	149	175	F	55
28	191	132	60	126	111	116	F	55
29	136	140	65	68	120	118	F	63
30	247	137	71	107	183	102	F	72

Tabel 4.6. Rezultate obținute la grupa 2- cardiopatie ischemică

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo AI (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
1	150	176	54	89	107	98	B	46
2	148	106	51	81	81	112	F	64
3	162	73	66	91	98	99	B	71
4	163	285	43	111	80	123	B	65
5	89	102	40	47	80	52	B	63
6	175	130	82	90	139	124	B	63
7	193	149	85	101	135	105	B	65
8	234	86	77	141	140	88	B	66
9	205	135	65	122	112	90	B	69
10	240	163	76	152	123	148	B	69
11	117	68	48	62	79	87	F	67
12	140	52	63	71	129	71	B	68
13	223	185	81	131	126	152	F	61
14	202	78	85	120	155	91	F	62
15	228	160	52	131	160	110	F	59

Tabel 4.7 Rezultate obținute la grupa 3 – bărbați

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo AI (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
1	150	176	54	89	107	98	B	46
3	162	73	66	91	98	99	B	71
4	163	285	43	111	80	123	B	65
5	89	102	40	47	80	52	B	63
6	175	130	82	90	139	124	B	63
7	193	149	85	101	135	105	B	65
8	234	86	77	141	140	88	B	66
9	205	135	65	122	112	90	B	69
10	240	163	76	152	123	148	B	69
12	140	52	63	71	129	71	B	68
16	195	82	85	78	140	95	B	68
17	201	110	45	135	130	88	B	62
19	167	244	48	109	85	128	B	70
20	136	99	52	79	109	85	B	66
21	137	107	20	112	47	94	B	75
22	260	140	52	191	102	170	B	68
23	158	128	75	66	136	113	B	63
24	156	129	72	78	128	105	B	70

Tabel 4.8. Rezultate obținute la grupa 4 – femei

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo A I (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
2	148	106	51	81	81	112	F	64
11	117	68	48	62	79	87	F	67
18	189	254	65	121	99	122	F	65
13	223	185	81	131	126	152	F	61
14	202	78	85	120	155	91	F	62
15	228	160	52	131	160	110	F	59
25	179	200	45	116	86	130	F	58
26	220	170	53	130	152	118	F	62
27	265	187	48	172	149	175	F	55
28	191	132	60	126	111	116	F	55
29	136	140	65	68	120	118	F	63
30	247	137	71	107	183	102	F	72

Ultimul set de analize (luna septembrie) a relevat următoarele rezultate, sintetizate în tabelele 4.9, 4.10, 4.11 și 2.12.

Tabel 4.9. Rezultate obținute la grupa 1- hipertensiune arterială

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo A I (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
16	188	85	83	77	146	93	B	68
17	197	112	49	139	128	79	B	62
18	175	98	60	106	203	148	F	65
19	194	94	57	128	225	138	B	70
20	194	103	65	109	220	137	B	66
21	176	115	59	107	190	110	B	75
22	243	137	52	188	104	155	B	68
23	151	110	73	69	128	107	B	63
24	160	125	69	80	132	109	B	70
25	166	129	34	122	121	114	F	58
26	216	180	42	169	146	123	F	62
27	231	193	46	170	150	153	F	55
28	184	195	44	132	149	124	F	55
29	198	135	34	156	140	126	F	63
30	236	148	60	168	193	134	F	72

Tabel 4.10. Rezultate obținute la grupa 2- cardiopatie ischemică

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo AI (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
1	151	91	64	80	194	101	B	46
2	217	162	41	168	203	138	F	64
3	155	86	50	91	166	104	B	71
4	112	99	50	60	139	83	B	65
5	166	104	57	101	178	106	B	63
6	175	130	82	90	139	124	B	63
7	180	103	52	119	164	115	B	65
8	230	83	70	135	131	85	B	66
9	114	71	35	75	118	97	B	69
10	162	181	57	96	216	109	B	69
11	156	107	46	101	166	110	F	67
12	242	87	52	151	123	81	B	68
13	174	125	37	129	139	115	F	61
14	170	80	82	114	151	89	F	62
15	206	168	44	152	172	138	F	59

Tabel 4.11. Rezultate obținute la grupa 3 – bărbați

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo AI (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Vârsta
1	151	91	64	80	194	101	B	46
3	155	86	50	91	166	104	B	71
4	112	99	50	60	139	83	B	65
5	166	104	57	101	178	106	B	63
6	175	130	82	90	139	124	B	63
7	180	103	52	119	164	115	B	65
8	230	83	70	135	131	85	B	66
9	114	71	35	75	118	97	B	69
10	162	181	57	96	216	109	B	69
12	242	87	52	151	123	81	B	68
16	188	85	83	77	146	93	B	68
17	197	112	49	139	128	79	B	62
19	194	94	57	128	225	138	B	70
20	194	103	65	109	220	137	B	66
21	176	115	59	107	190	110	B	75
22	243	137	52	188	104	155	B	68
23	151	110	73	69	128	107	B	63
24	160	125	69	80	132	109	B	70

Tabel 4.12. Rezultate obținute la grupa 4 – femei

Nr. pacient	Colesterol total (mg%)	Triglice-ride (mg%)	HDL colesterol (mg%)	LDL colesterol (mg%)	Apo A I (mg%)	Apo B (mg%)	Sexul	Varsta
2	217	162	41	168	203	138	F	64
11	156	107	46	101	166	110	F	67
13	174	125	37	129	139	115	F	61
14	170	80	82	114	151	89	F	62
15	206	168	44	152	172	138	F	59
18	175	98	60	106	203	148	F	65
25	166	129	34	122	121	114	F	58
26	216	180	42	169	146	123	F	62
27	231	193	46	170	150	153	F	55
28	184	195	44	132	149	124	F	55
29	198	135	34	156	140	126	F	63
30	236	148	60	168	193	134	F	72

Tratamentul hiperlipoproteinemiilor (dislipidemiilor) se face cu statine de tipul SIMVASTATINULUI, sau cel mai utilizat la noi ZOCOR-MSD. de 10, respectiv 20 mg. Doza administrată pentru infarctul miocardic acut este de 20 mg. În rest, în funcție de caz, se administrează între 10-20 mg, zilnic pe termen lung.

CAPITOLUL 5

PRELUCRAREA MATEMATICĂ A DETERMINĂRIILOR EXPERIMENTALE. ELABORAREA MODELELOR STATISTICE ȘI COMPARAREA ACESTORA CU MODELELE TEORETICE

5.1. Metode de prelucrare statistică a datelor experimentale (analiză de regresie)

Pentru modelarea liniară a unui sistem influențat de k factori independenți, se preferă adoptarea următoarei forme pentru funcția de răspuns:

$$\tilde{y} = \sum_{j=0}^k b_j x_j \quad (5.1)$$

Pentru determinarea efectivă a coeficienților b_j ai modelului se concepe o matrice-program a experimentării și se realizează efectiv experimentarea. Se impun prelucrarea rezultatelor experimentale pentru definirea modelului matematic și verificarea validității sale. Această prelucrare include două etape principale:

- calculul coeficienților de regresie, și implicit, explicitarea modelului matematic adoptat;
- analiza statistică din trei puncte de vedere a modelului obținut:
 - estimarea erorii experimentale (dispersiei reproductibilității valorii funcției obiectiv la nivel de experiment);
 - verificarea semnificației statistice a coeficienților de regresie;
 - verificarea adecvantei (concordanței) valorilor funcției obiectiv calculate cu modelul empiric, cu valorile reale (măsurate) ale funcției obiectiv.

Principalii purtători de informații sunt coeficienții de regresie prin valoarea lor numerică și semn. Analiza coeficienților de regresie permite aprecierea amplitudinii și sensului de influență ale factorilor.

Astfel, există două situații caracteristice:

- a) coeficienții sunt semnificativi;
- b) coeficienții sunt ne semnificativi.

a) Dacă toți coeficienții sunt semnificativi, este foarte important ca valorile lor să fie relativ apropiate (de același ordin de mărime), ceea ce indică faptul că modelul este în apropierea domeniului de optim în raport cu toți factorii analizați.

b) Dacă o parte, sau toți coeficienții sunt ne semnificativi, aceasta se poate datora, pe de o parte condițiilor de experimentare, în sensul că intervalele de variație ale factorilor au fost prea înguste sau eroarea experimentală a fost prea mare, caz în care se recomandă refacerea cercetării cu corecțiile adecvate.

Prelucrarea datelor din punct de vedere statistic s-a făcut cu programul Origin Lab v.7.0.

Corelația colesterol-apoA este necesară deoarece hipercolesterolemia totală izolată reprezintă un risc pentru ateroscleroză și ea trebuie corelată cu valorile lui apo A, care este fracție apo, protectoare contra apariției aterosclerozei (fiind bogate în HDLc)

Același lucru este valabil pentru corelația între colesterolul total și apo B, care este fracția apo cu risc crescut de aterogeneză (fiind bogate în LDLc), care se găsește în compoziția plăcii de aterom.

Din aceleași considerente s-au făcut corelații între fracția HDLc și Apo A (în compoziția căreia se află în proporție de 60%), și de asemenea, corelații dintre fracția LDLc și apo B (în compoziția căreia se află în proporție de 90%).

S-au făcut aceste corelații pentru valorile fracțiilor plasmatică, determinate la 3 probe efectuate la un interval de 3 luni (martie, iunie, septembrie).

Considerentele care au stat la baza acestor determinări biochimice sunt variațiile ciclice ale aceleiași fracții la același individ, explicată de influențele endogene și exogene la care este supus organismul uman, atât sănătos, cât și cel care prezintă modificări de ateroscleroză; exemple: boli asociate, determinismul genetic, fumatul, stresul psihic, obezitatea, diabetul zaharat.

La subiecții cu ateroscleroză aceste variații ne permit să facem aprecieri de ordin terapeutic (reducerea sau creșterea dozelor de statine în funcție de valorile găsite ale fracțiilor lipidice).

S-a ales compararea între sexe privind valorile fracțiilor lipidice plasmatică, deoarece statusul hormonal diferit la cele două sexe determină variații ale fracțiilor lipidelor plasmatică, așa cum vor fi prezentate în detaliu la cap. 6.

Deoarece s-a investigat apo A și apo B, se urmăresc valorile obținute pentru acești parametri față de colesterol și față de fracțiile acestuia HDLc și LDLc. Se vor urmări variațiile: **colesterol-apo A, colesterol-apo B, HDL-apo A, LDL-apo B**, astfel încât coeficientul de regresie să fie $> 0,4$, condiție necesară pentru a se putea optimiza.

1. Pentru prima grupă, cu diagnostic de **hipertensiune arterială**, la cele trei determinări, adică luna martie, iunie și septembrie, rezultatele statistice (ecuația dreptei, coeficientul de regresie și deviația standard) sunt prezentate în figurile 5.1 – 5.10.

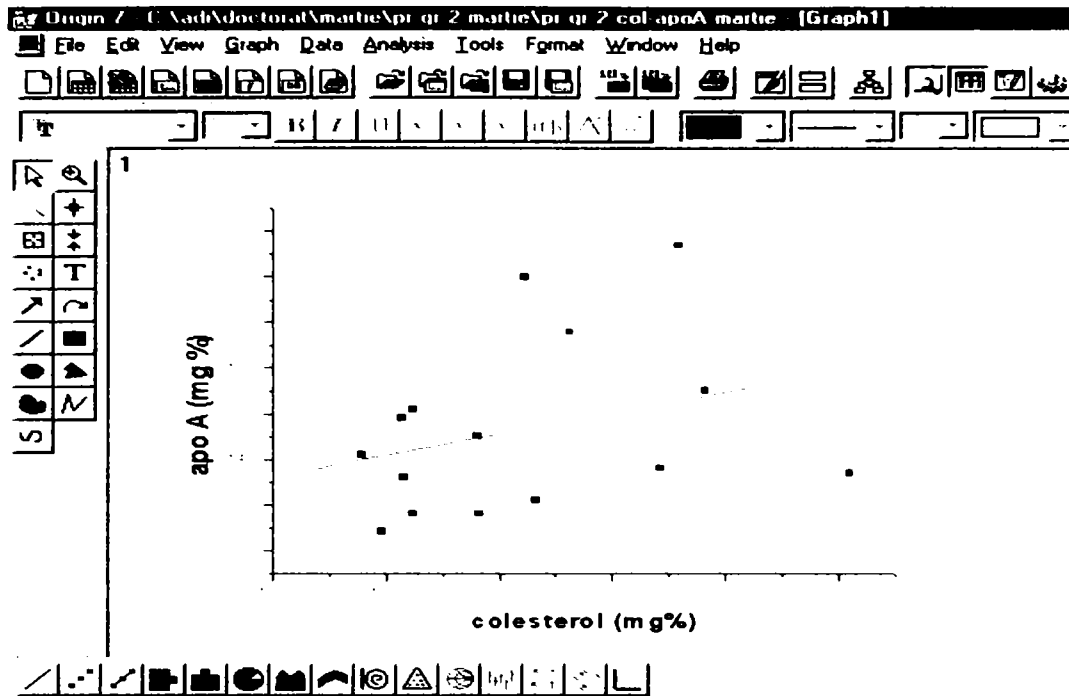


Fig. 5.1. Variația colesterol-apo A (grupa 1, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 126,95 + 0,09 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,309, iar deviația standard 18.75.

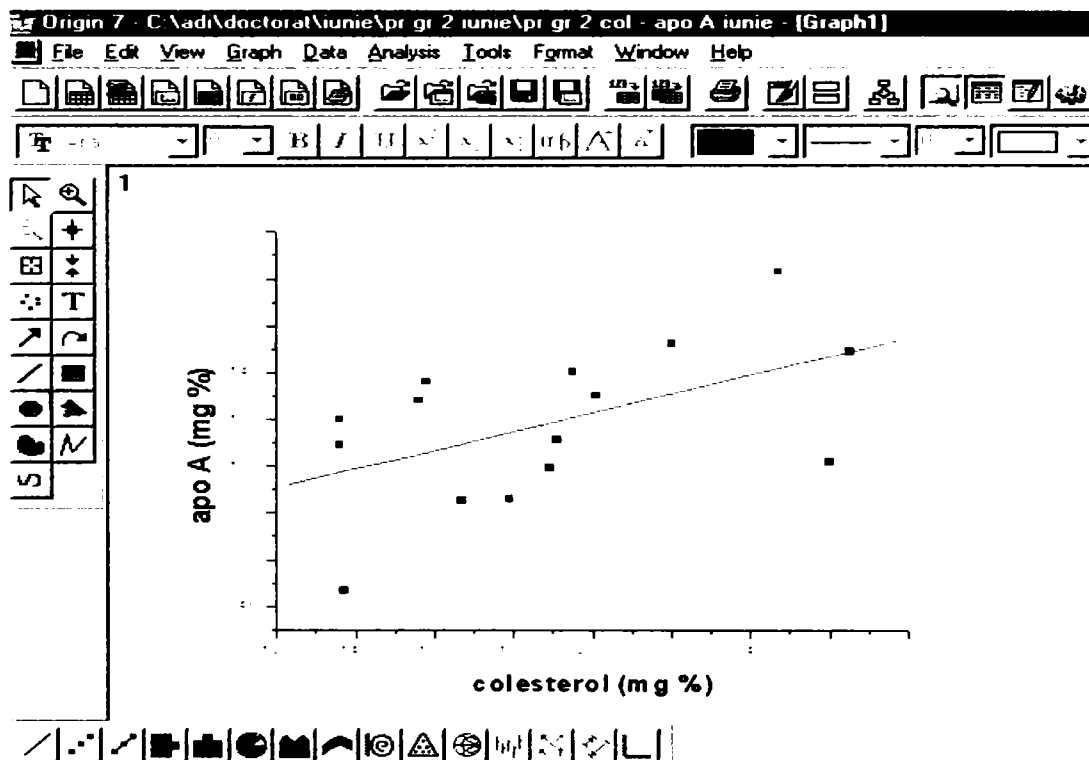


Fig. 5.2 Variația colesterol-apo A (grupa 1, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 42,71 + 0,4 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,524, iar deviația standard 29,19.

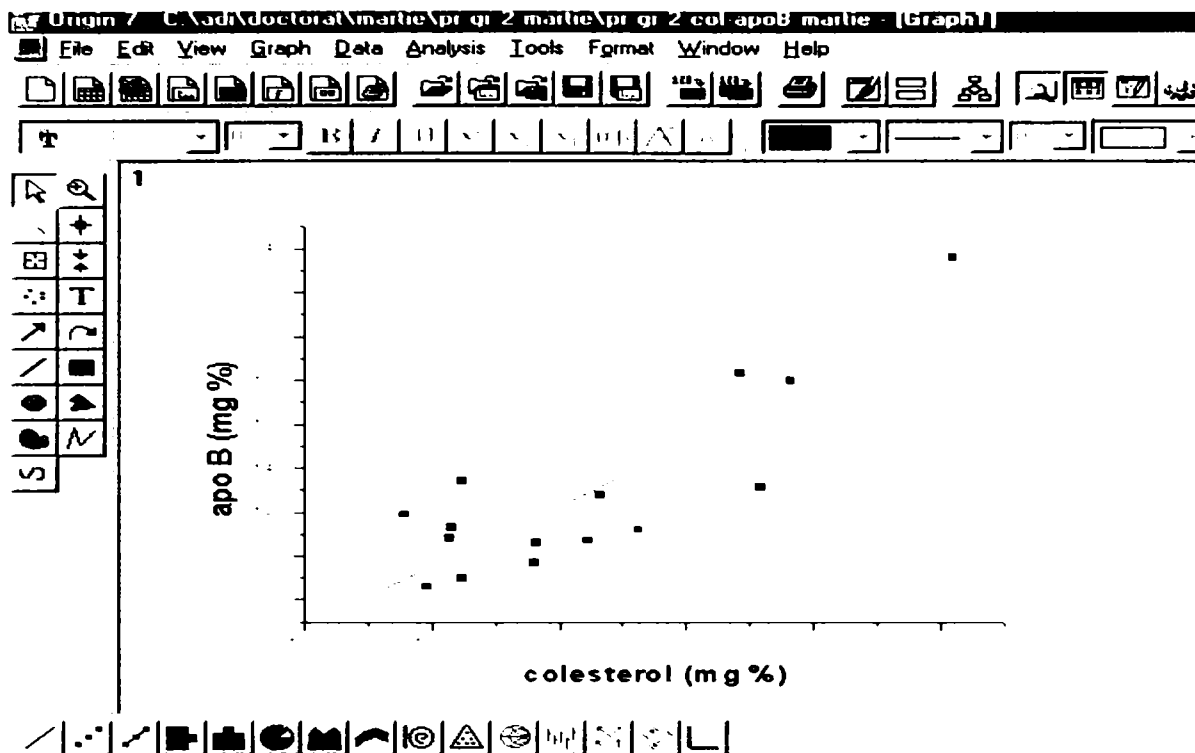


Fig.5.3 Variația colesterol-apo B (grupa 1, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 13,66 + 0,54 x$,

Coeficientul de regresie este 0,849, iar deviația standard 22,73.

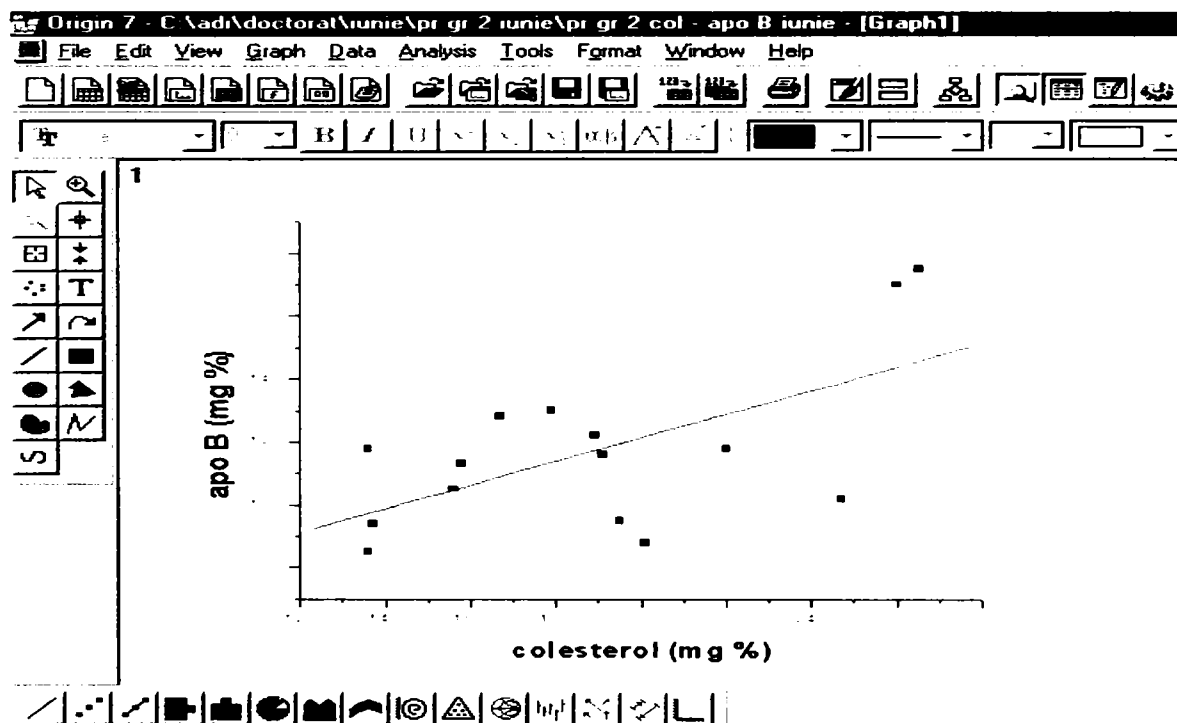


Fig.5.4 Variația colesterol-apo B (grupa 1, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 46,47 + 0,37 x$,

Coeficientul de regresie este 0,614, iar deviația standard 21,61.

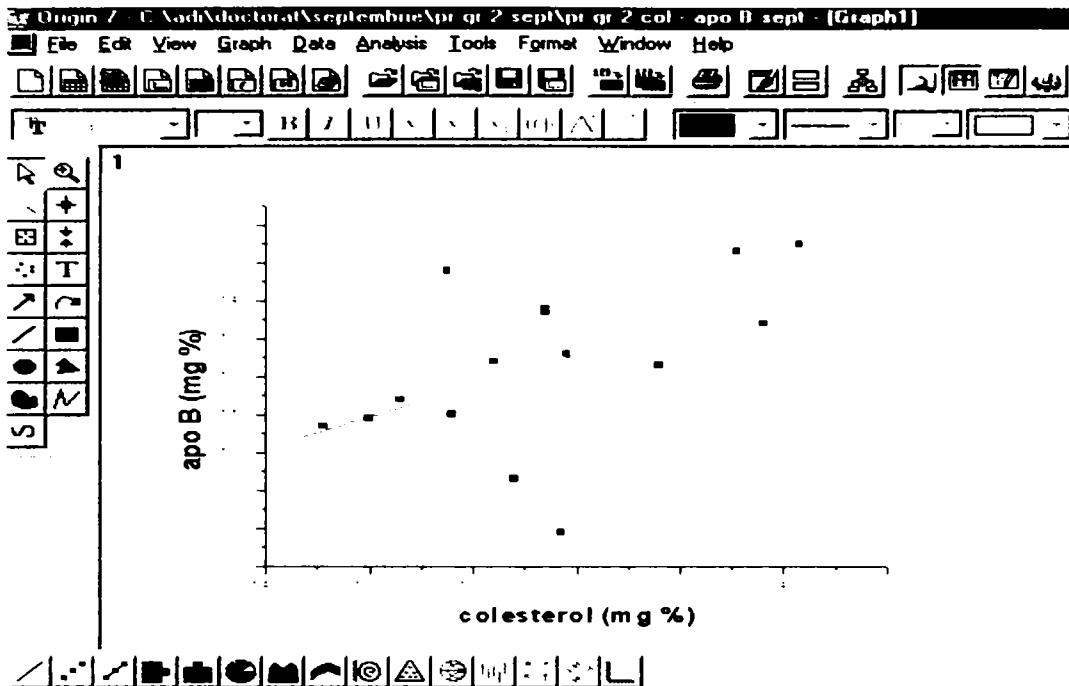


Fig.5.5 Variația colesterol-apo B (grupa 1, septembrie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 43,86 + 0,409 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,519, iar deviația standard 19,31.

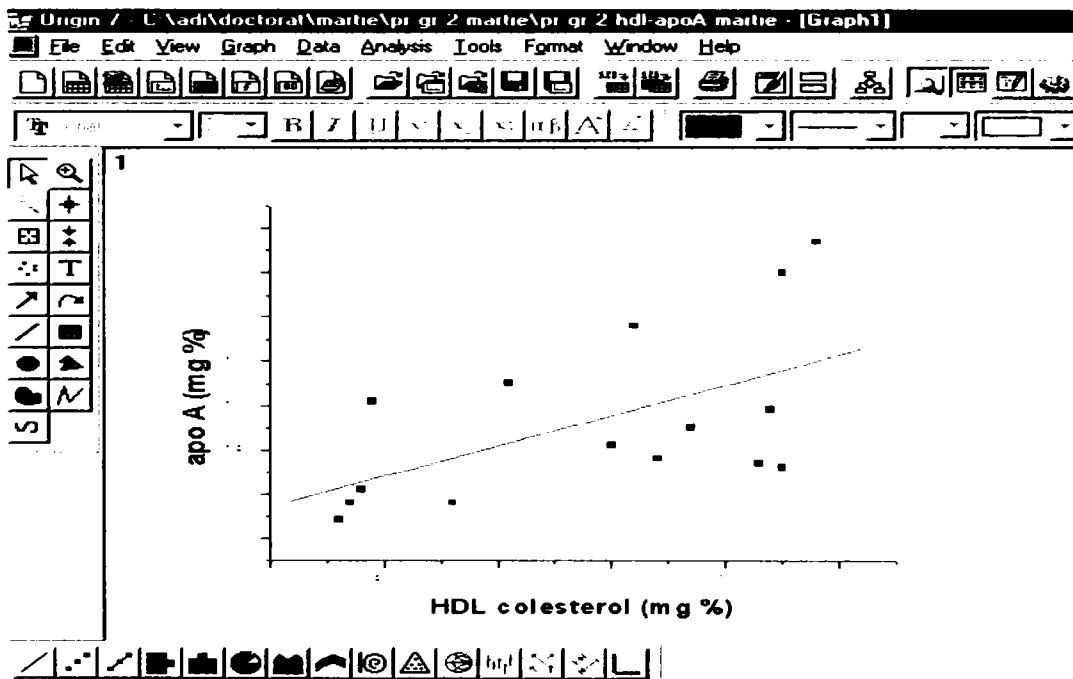


Fig.5.6 Variația HDLc-apo A (grupa 1, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 106,57 + 0,68 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,567, iar deviația standard 16,24.

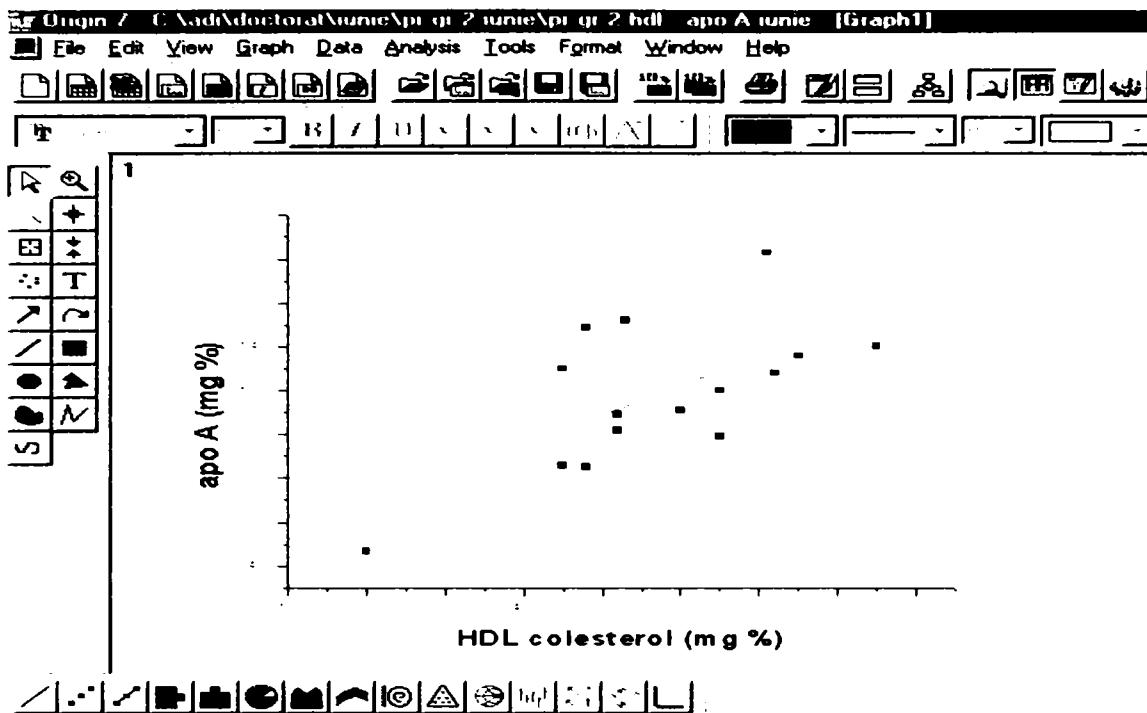


Fig.5.7 Variația HDLc-apo A (grupa 1, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 42,66 + 1.32 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,639, iar deviația standard 26,35.

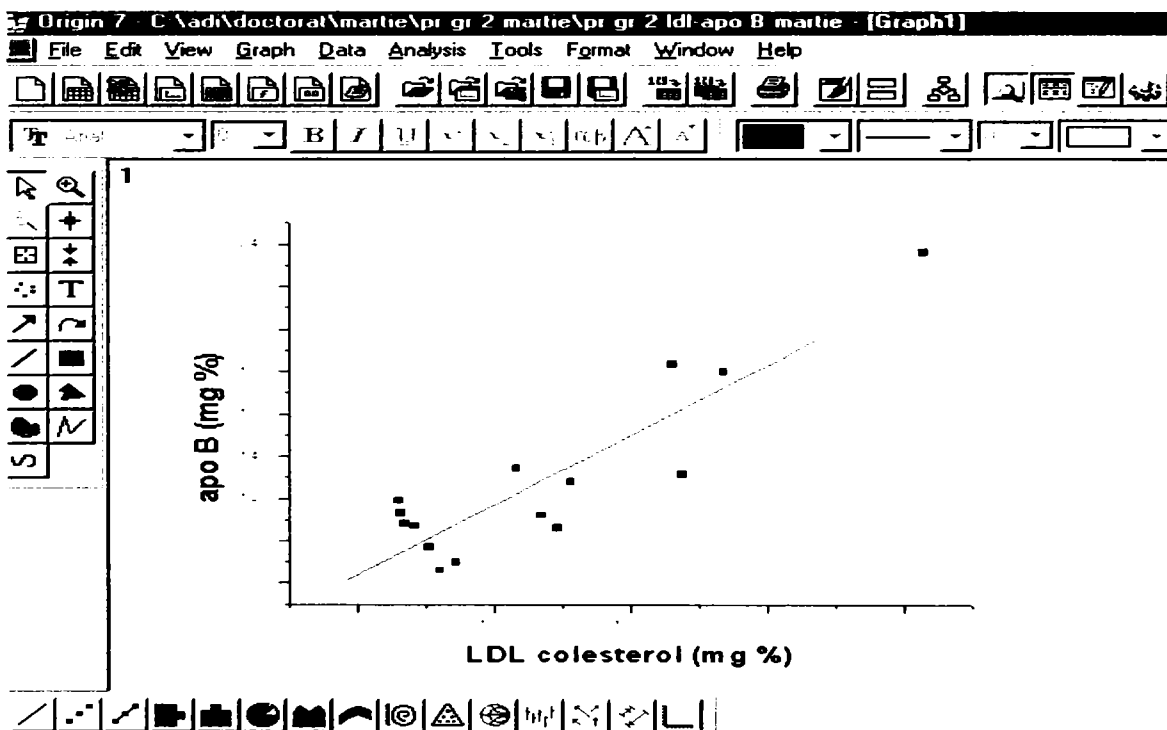


Fig.5.8 Variația LDLc-apo B (grupa 1, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 51,52 + 0,65 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,891, iar deviația standard 19,27.

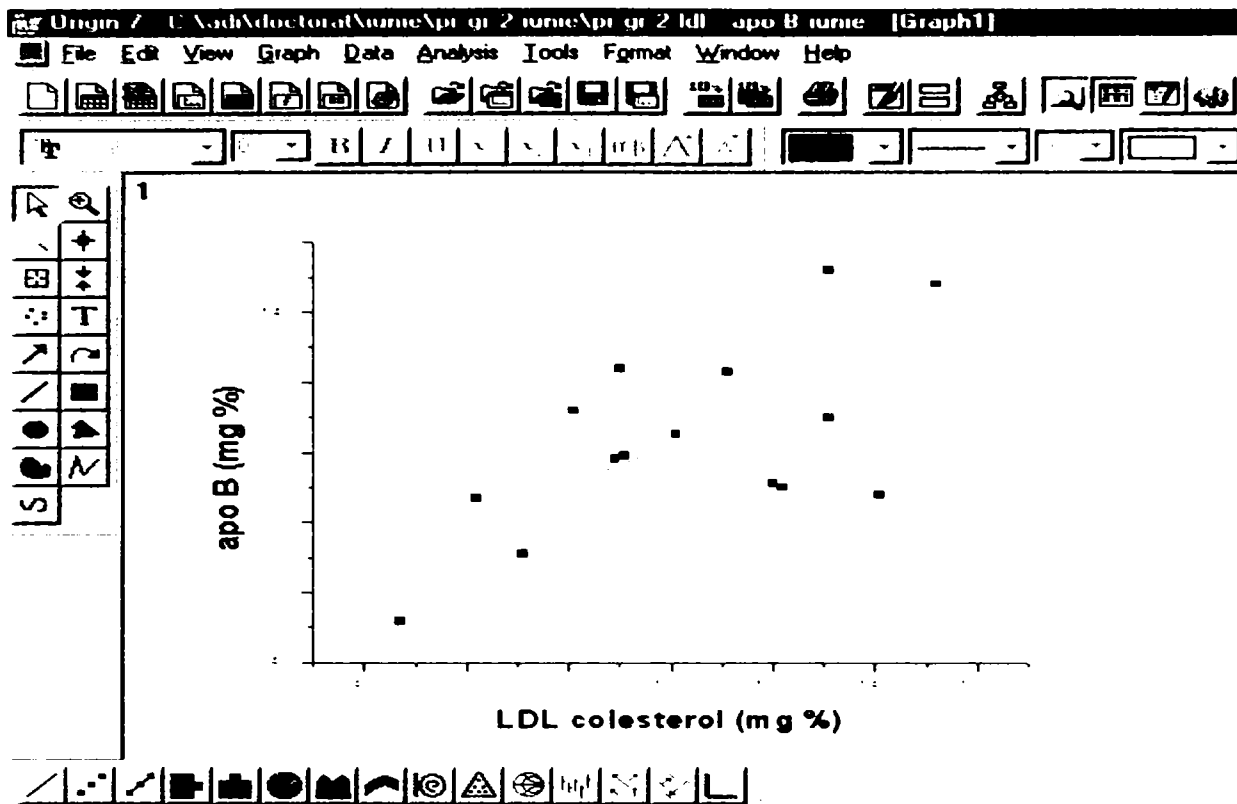


Fig.5.9 Variația LDLc-apo B (grupa 1, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 47,16 + 0,54 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,627, iar deviația standard 21,44.

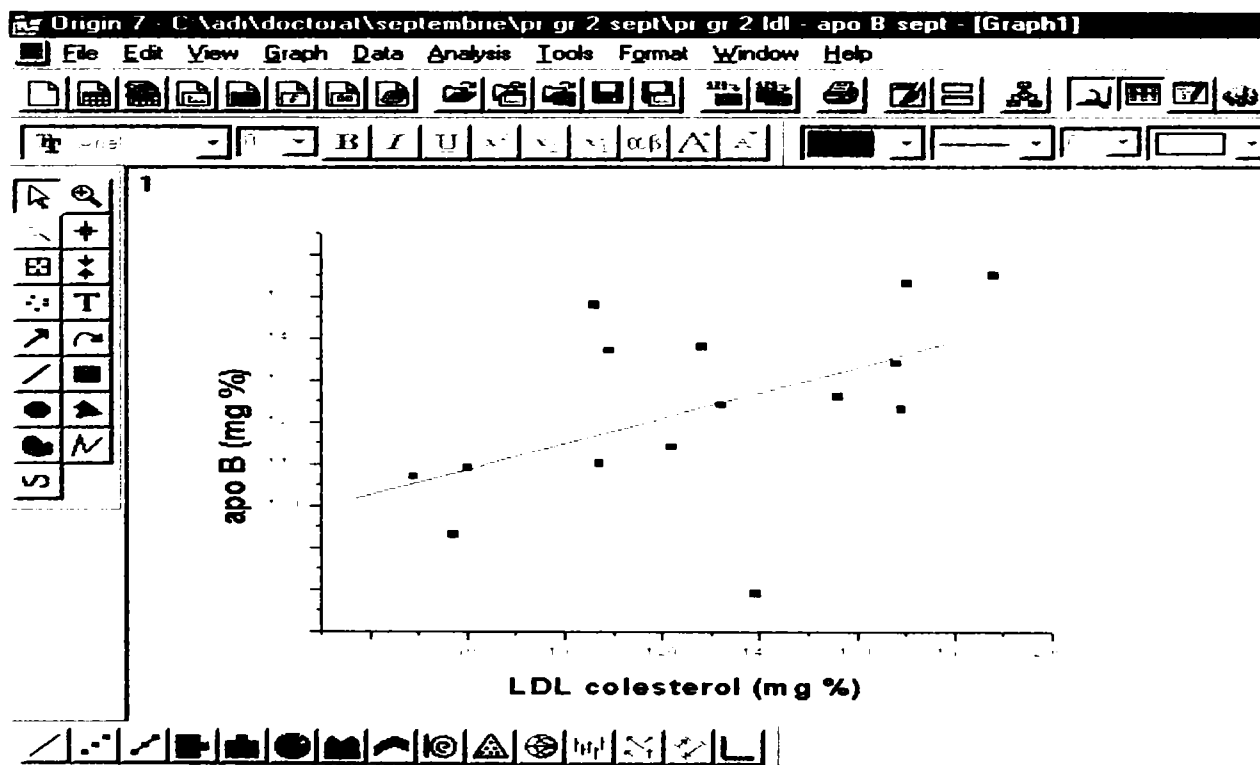


Fig.5.10 Variația LDLc-apo B (grupa 1, septembrie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 84,27 + 0,30 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,519, iar deviația standard 19,3.

Analizând corelațiile între colesterolul total, cu fracțiile sale HDLc și LDLc, și lipoproteinele apo A și apo B, pentru grupa 1 - hipertensiune arterială, pentru cele 3 determinări realizate la același interval de 3 luni (martie, iunie și septembrie) se pot trage următoarele concluzii:

- Pentru corelația colesterol – apo A, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,309 –0,524, iar deviația standard este cuprinsă între 18,75 - 29,15.
- Pentru corelația colesterol – apo B, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,519 –0,849, iar deviația standard este cuprinsă între 19,31 – 22,73. Corelația cea mai bună este pentru un coeficient de regresie cât mai apropiat de 1, iar deviația standard cât mai mică.
- Pentru corelația HDLc – apo A, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,567 –0,639, iar deviația standard este cuprinsă între 16,24- 26,35.
- Pentru corelația LDLc – apo B, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,32 –0,891, iar deviația standard este cuprinsă între 19,27- 21,44. Pentru una din determinări coeficientul de regresie este < 0,4, dar la celelalte determinări ajunge la valori apreciabile pentru prelucrarea statistică.

Valorile corelațiilor de mai sus, se încadrează în intervalul normal pentru o prelucrare statistică a datelor, și ele conduc la o serie de concluzii din punct de vedere al diagnosticului aterosclerozei și al tratamentului medicamentos cu statine.

2. Pentru grupa 2, cu diagnostic de **cardiopatie ischemică**, la cele trei determinări, adică luna martie, iunie și septembrie, rezultatele statistice (ecuația dreptei, coeficientul de regresie și deviația standard) sunt prezentate în figurile 5.11 – 5.19.

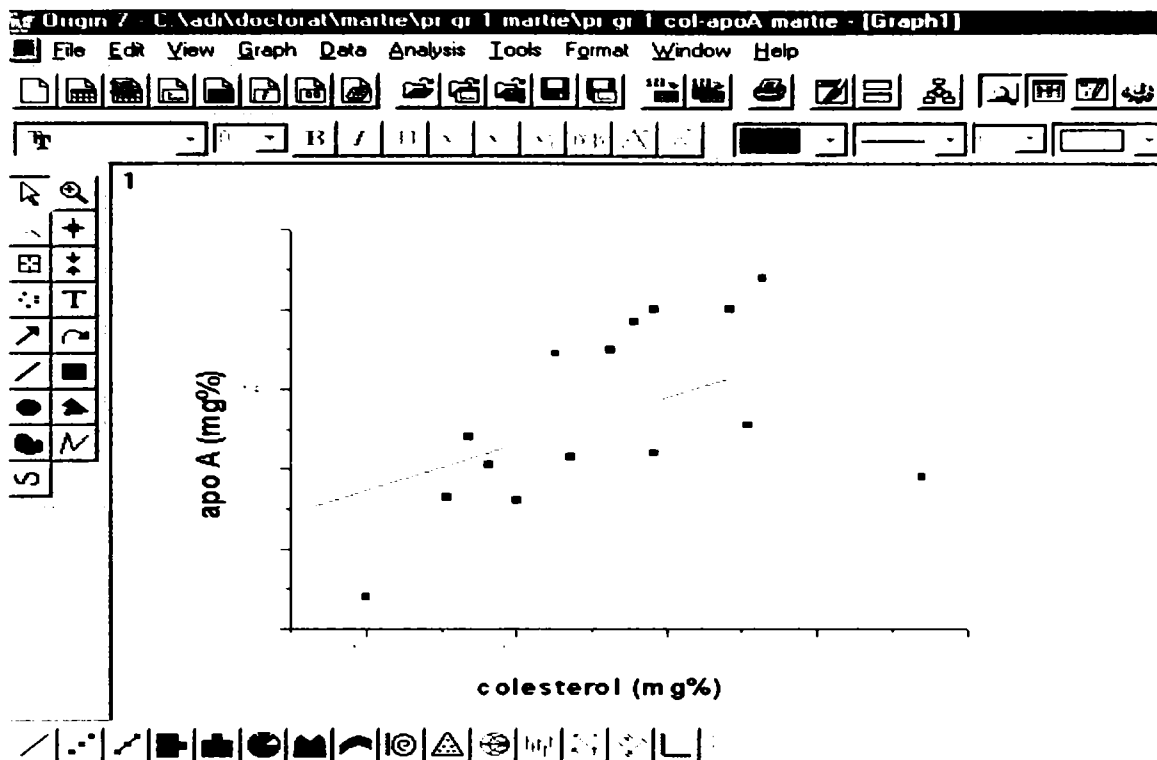


Fig.5.11. Variația colesterol-apo A (grupa 2, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 91,01 + 0,23 x$

Coeficientul de regresie este 0,496, iar deviația standard 20,4889.

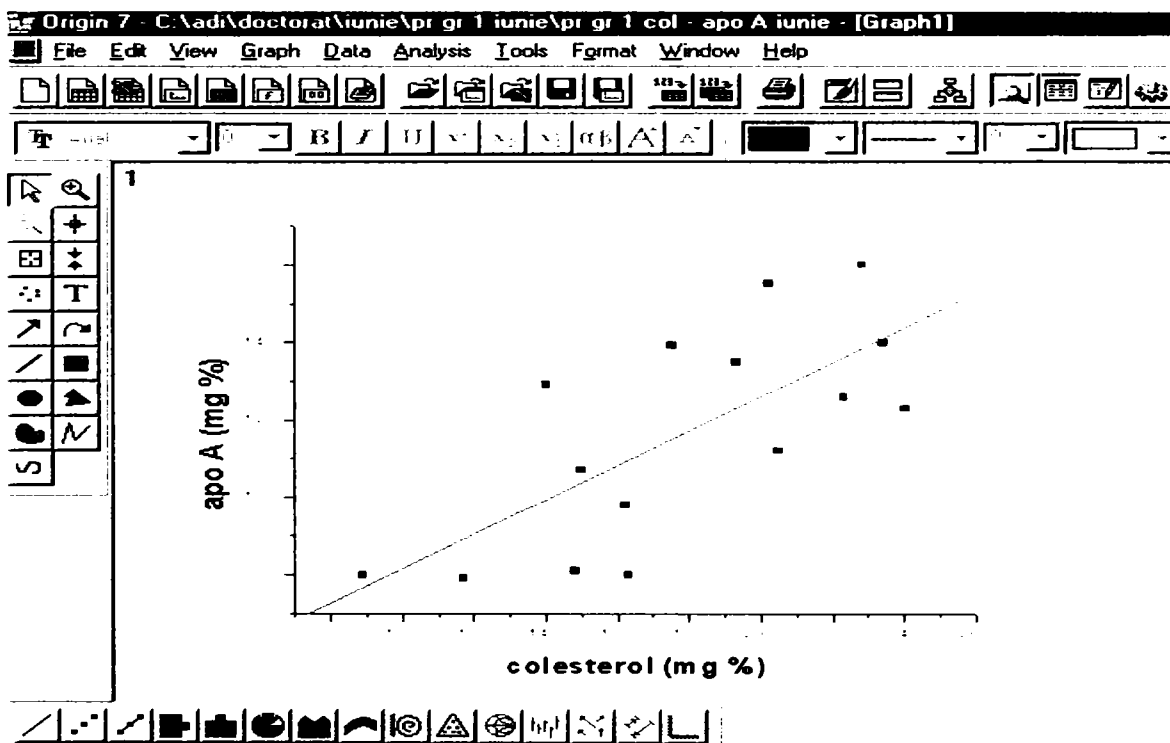


Fig.5.12. Variația colesterol-apo A (grupa 2, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 37,22 + 0,44 x$,

Coeficientul de regresie este 0,717, iar deviația standard 20,12.

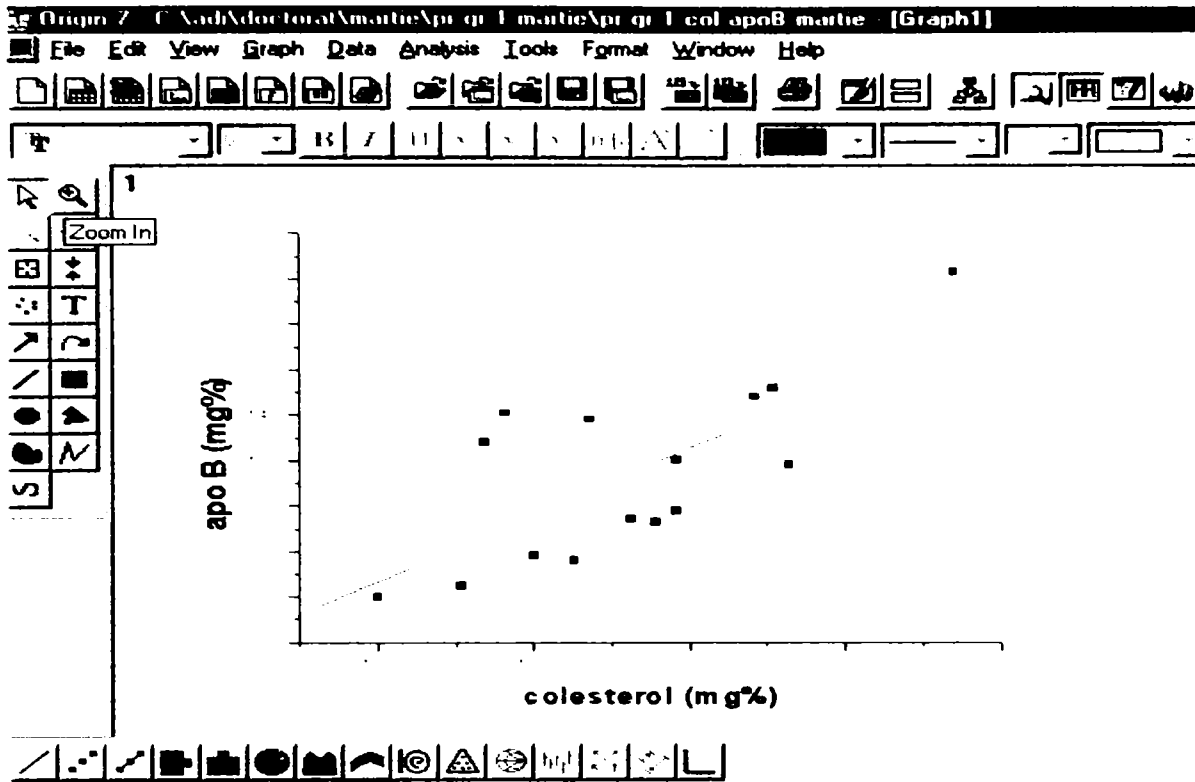


Fig.5.13. Variația colesterol-apo B (grupa 2, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 8,02 + 0,58 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,7254, iar deviația standard 27,81.

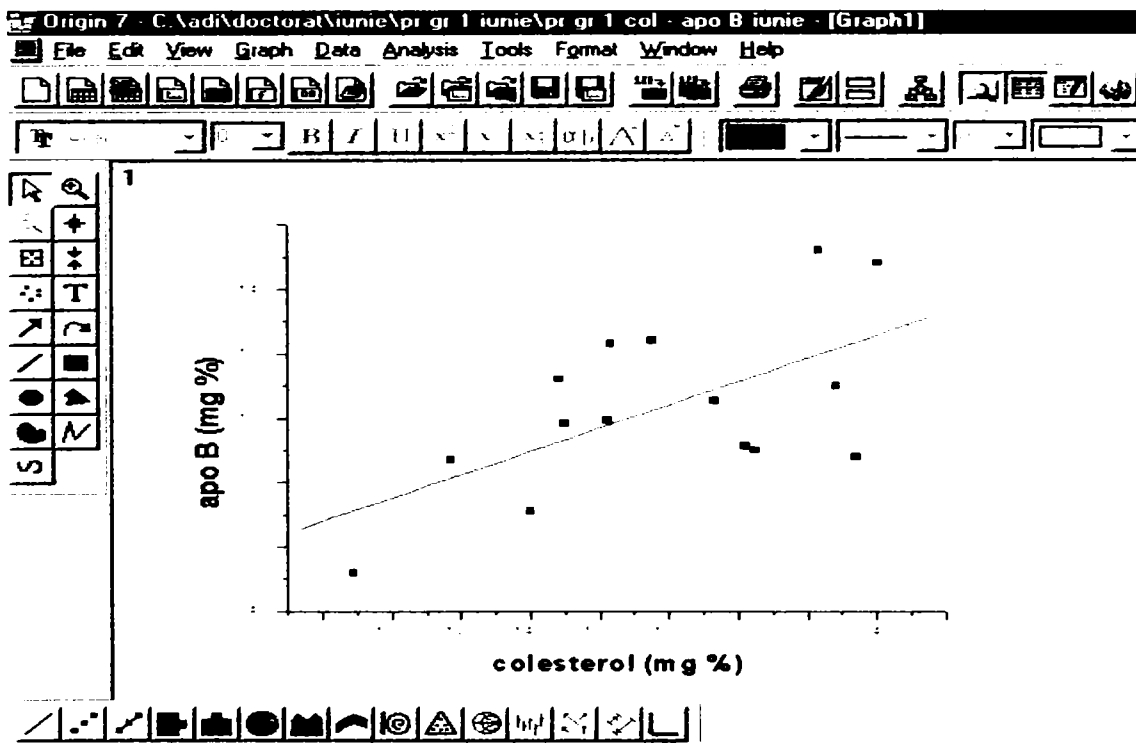


Fig.5.14. Variația colesterol-apo B (grupa 2, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 39,20 + 0,36 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,61, iar deviația standard 21,80.

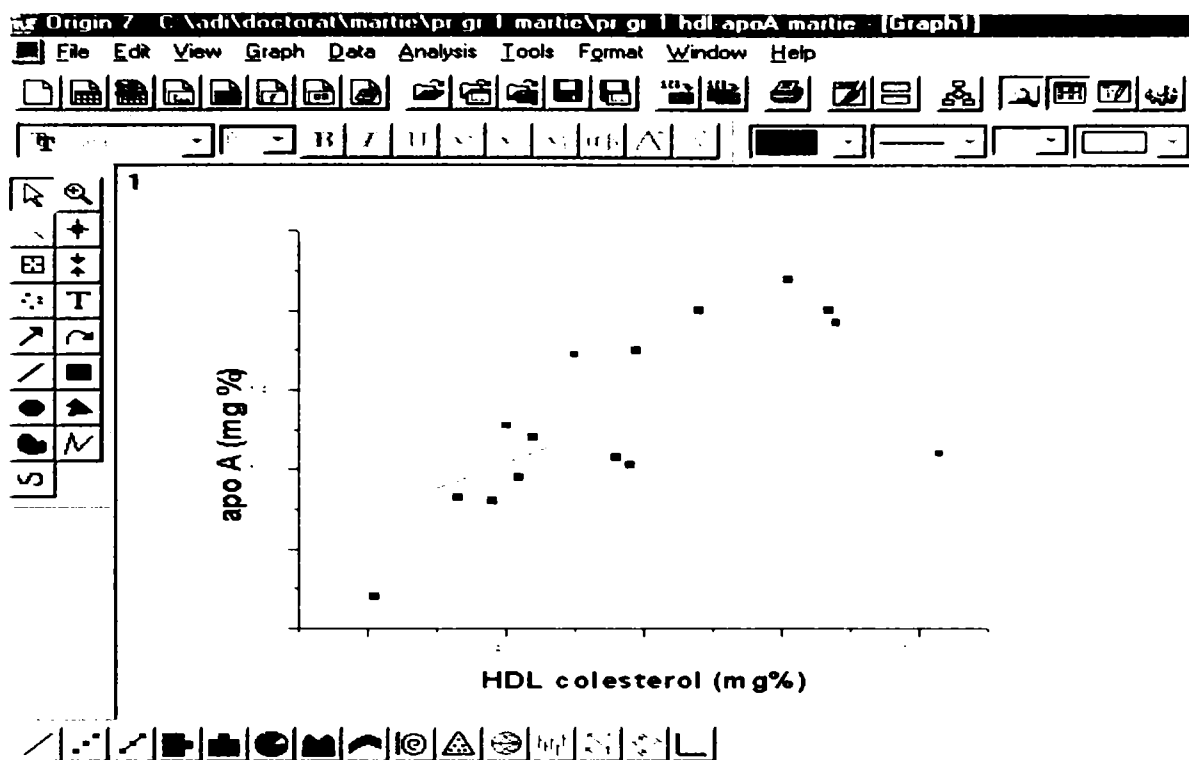


Fig.5.15. Variația HDLc - apo A (grupa 2, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 95,45 + 0,65 x$,

Coeficientul de regresie este 0,6741, iar deviația standard 17,43.

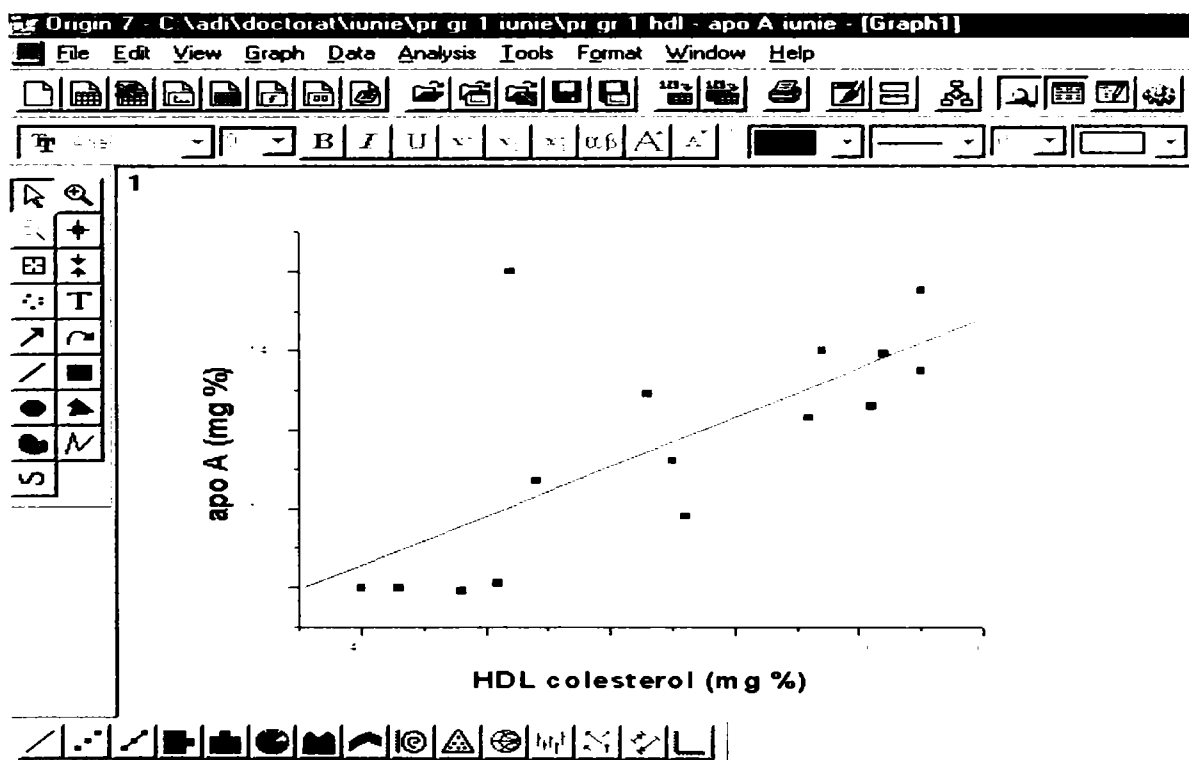


Fig.5.16. Variația HDLc - apo A (grupa 2, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 35,55 + 1,25 x$,

Coeficientul de regresie este 0,709, iar deviația standard 20,34.

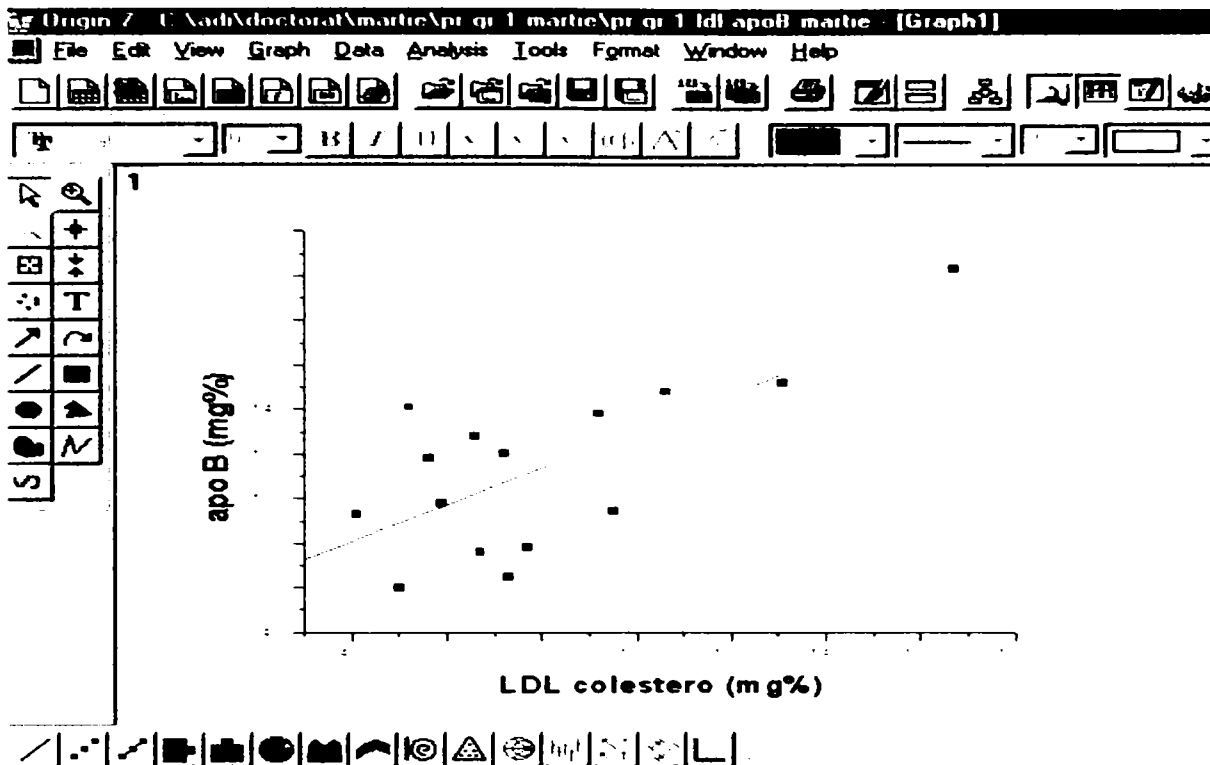


Fig.5.17. Variația LDLc - apo B (grupa 2, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 47,71 + 0,82 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,7167, iar deviația standard 28,18.

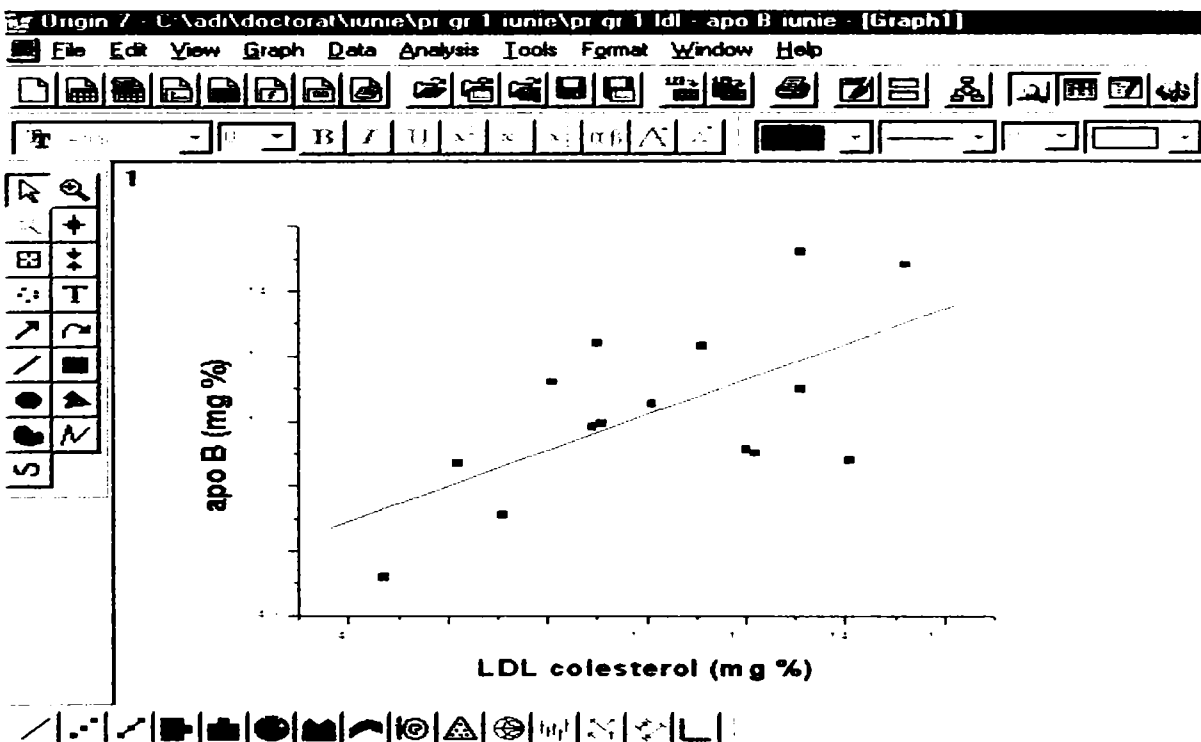


Fig.5.18. Variația LDLc - apo B (grupa 2, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 47,16 + 0,54 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,627, iar deviația standard 21,44.

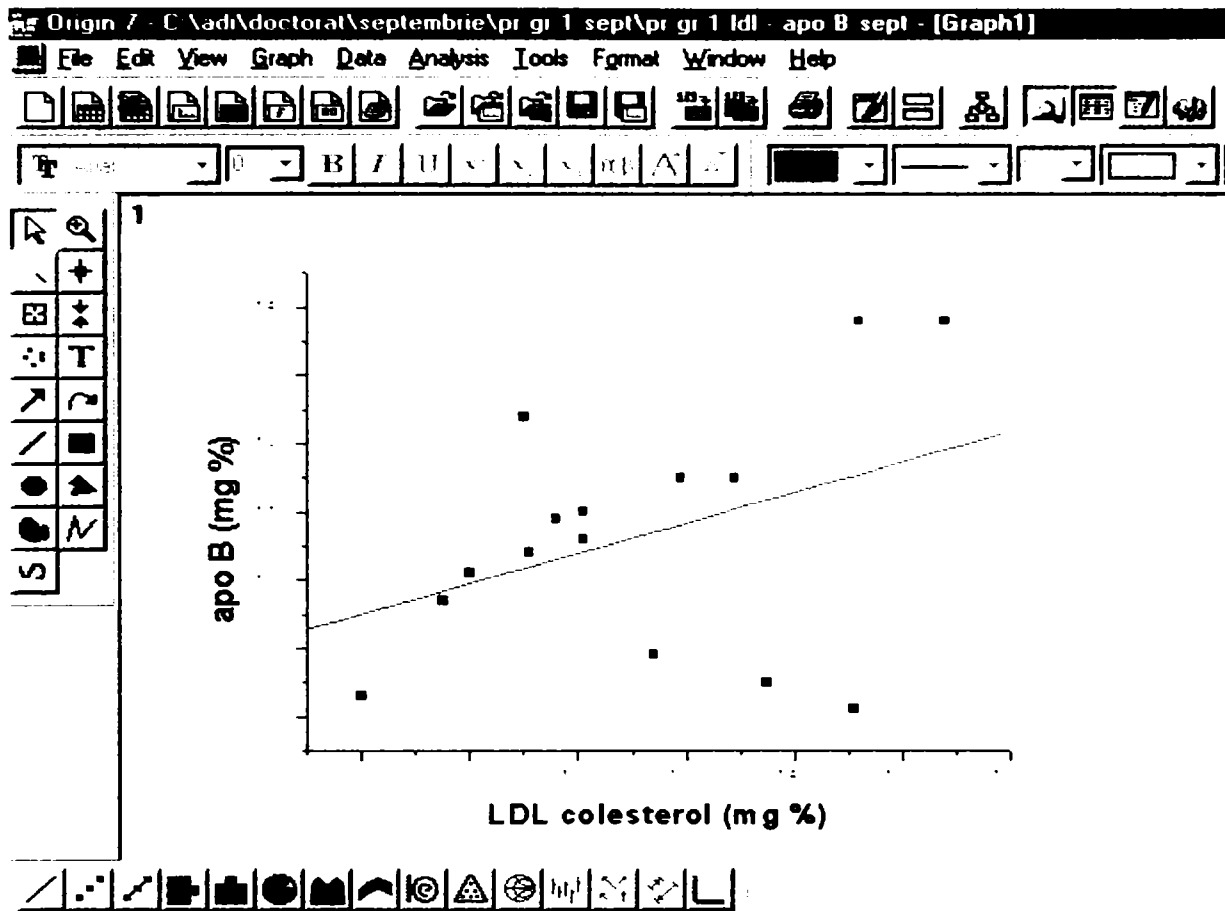


Fig.5.19. Variația LDLc - apo B (grupa 2, septembrie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 81,57 + 0,22 x$,

Coeficientul de regresie este 0,38, iar deviația standard 17,22.

Analizând corelațiile între colesterolul total, cu fracțiile sale HDLc și LDLc, și lipoproteinele apo A și apo B, la grupa 2 - cardiopatie ischemică, pentru cele 3 determinări realizate la același interval de 3 luni (martie, iunie și septembrie) se pot trage următoarele concluzii:

- Pentru corelația colesterol – apo A, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,496 –0,717, iar deviația standard este cuprinsă între 20,12 - 20,49.
- Pentru corelația colesterol – apo B, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,61 –0,72, iar deviația standard este cuprinsă între 21,8 – 27,81. Corelația cea mai bună este pentru un coeficient de regresie cât mai apropiat de 1, iar deviația standard cât mai mică.
- Pentru corelația HDLc – apo, A variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,67 –0,709, iar deviația standard este cuprinsă între 17,43- 20,34.
- Pentru corelația LDLc – apo B, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,38 –0,71 iar deviația standard este cuprinsă între 17,22- 28,18.

Valorile corelațiilor de mai sus se încadrează în intervalul normal pentru o prelucrare statistică a datelor, și ele conduc la o serie de concluzii din punct de vedere al diagnosticului aterosclerozei și al tratamentului medicamentos cu statine.

3. Pentru grupa 3 – **bărbați**, la cele trei determinări, adică luna martie, iunie și septembrie, rezultatele statistice (ecuația dreptei, coeficientul de regresie și deviația standard) sunt prezentate în figurile 5.20 – 5.29.

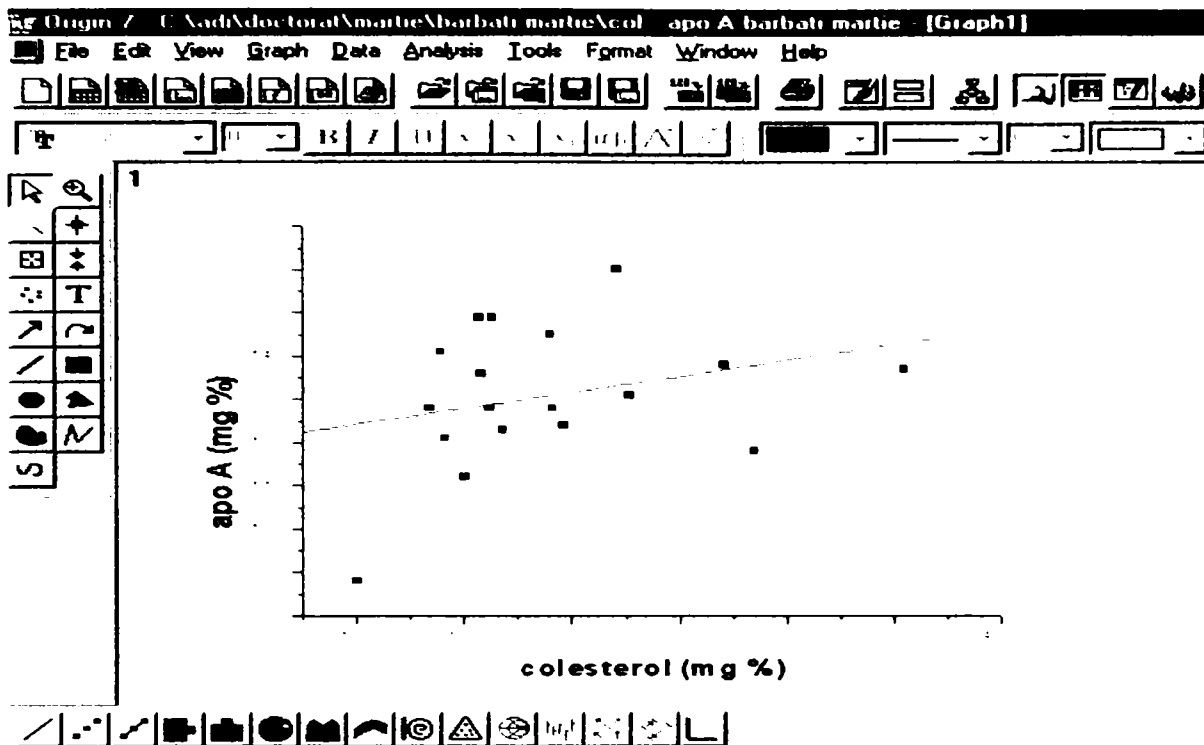


Fig. 5.20. Variația colesterol-apo A (grupa 3, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 116,86 + 0,07 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,285, iar deviația standard 16,09.

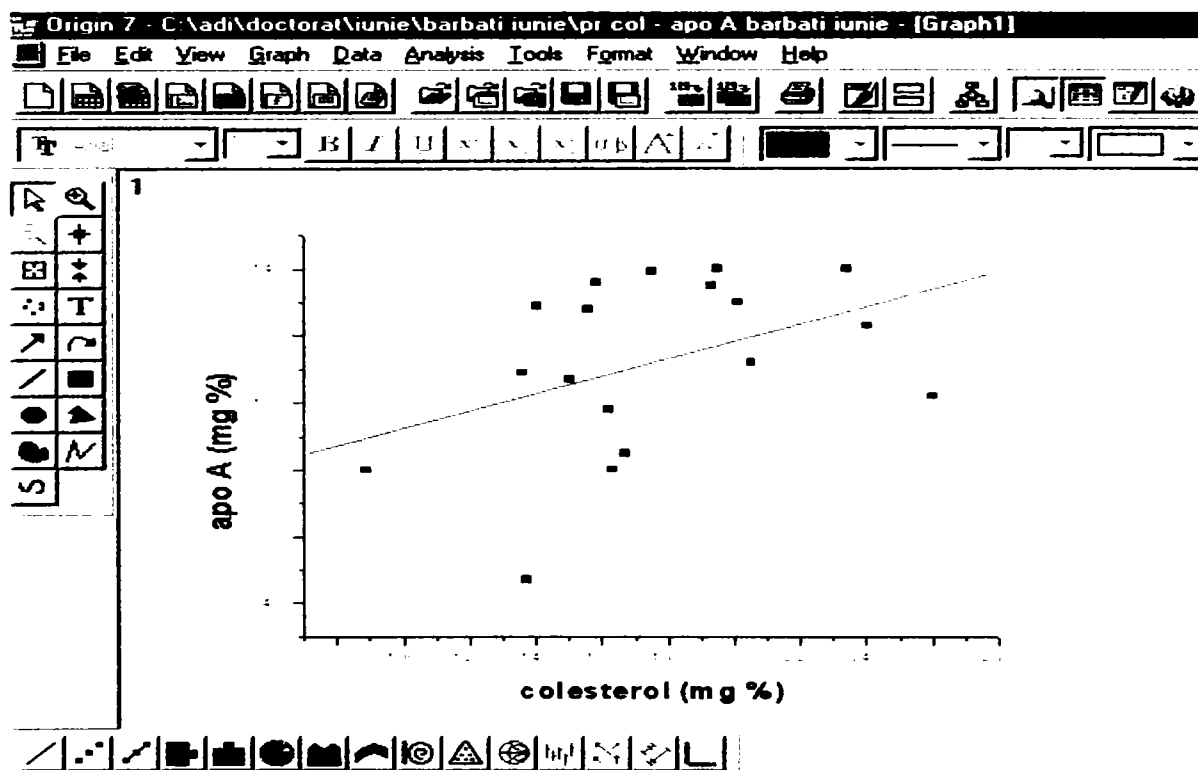


Fig. 5.21. Variația colesterol-apo A (grupa 3, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 66,7 + 0,25 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,417, iar deviația standard 24,59.

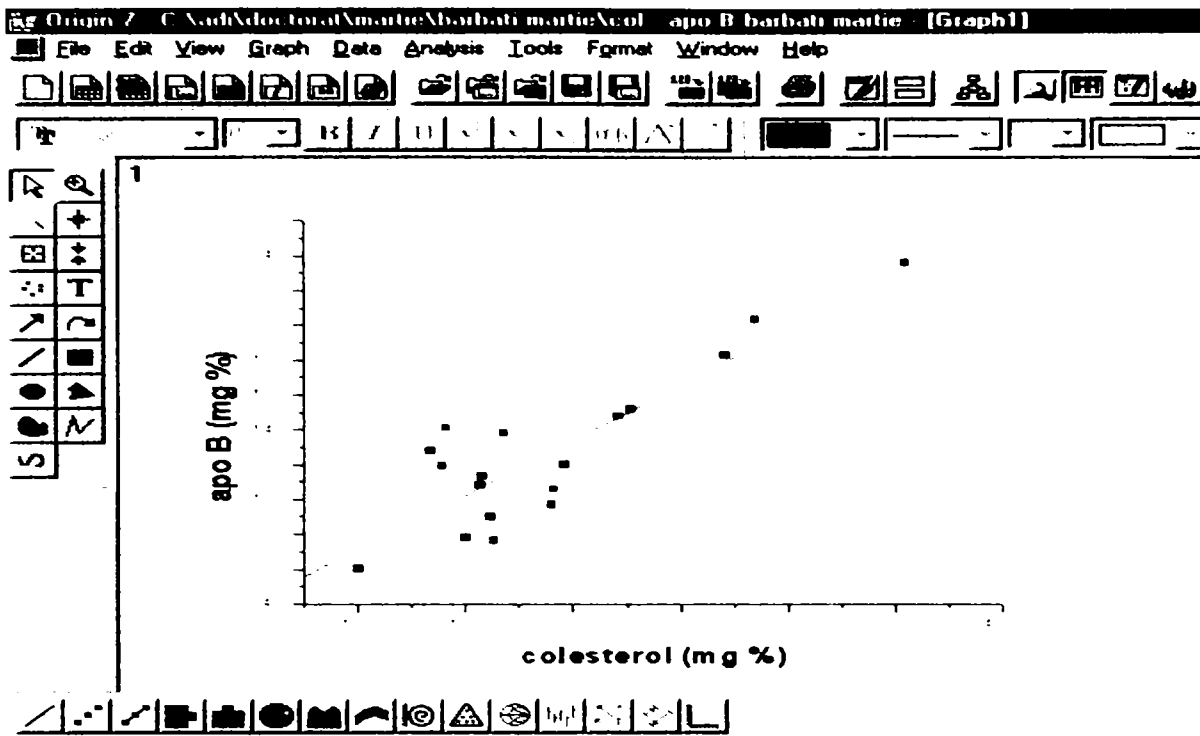


Fig. 5.22. Variația colesterol-apo B (grupa 3, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 8,61 + 0,62 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,869, iar deviația standard 23,12.

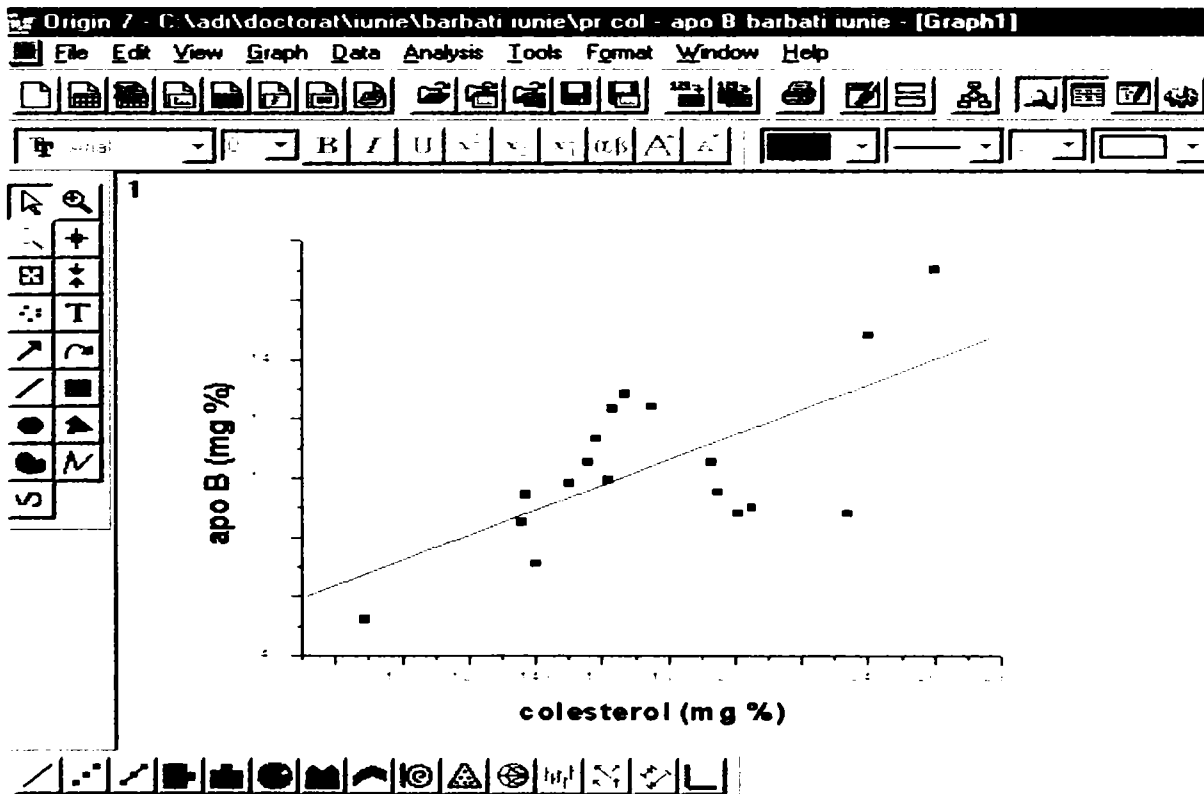


Fig. 5.23. Variația colesterol-apo B (grupa 3, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 29,87 + 0,42 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,652, iar deviația standard 21,44.

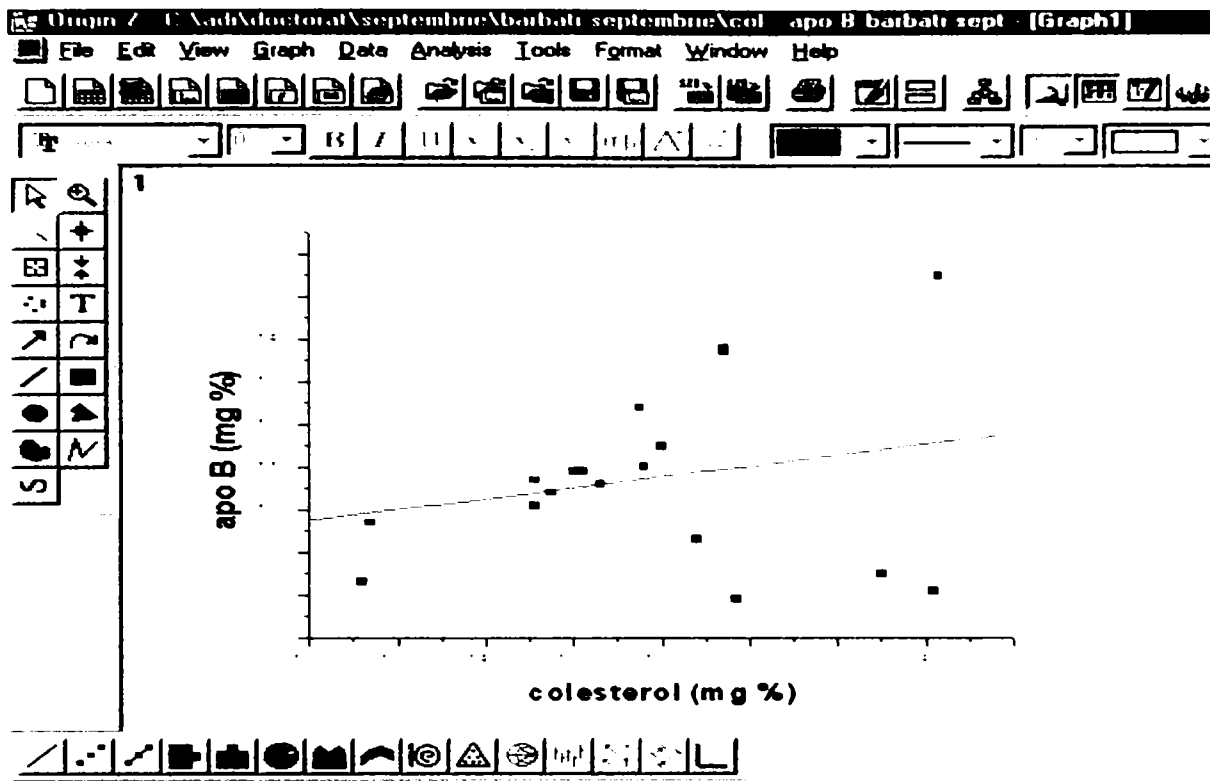


Fig. 5.24. Variația colesterol-apo B (grupa 3, septembrie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 84,59 + 0,128 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,227, iar deviația standard 20,93.

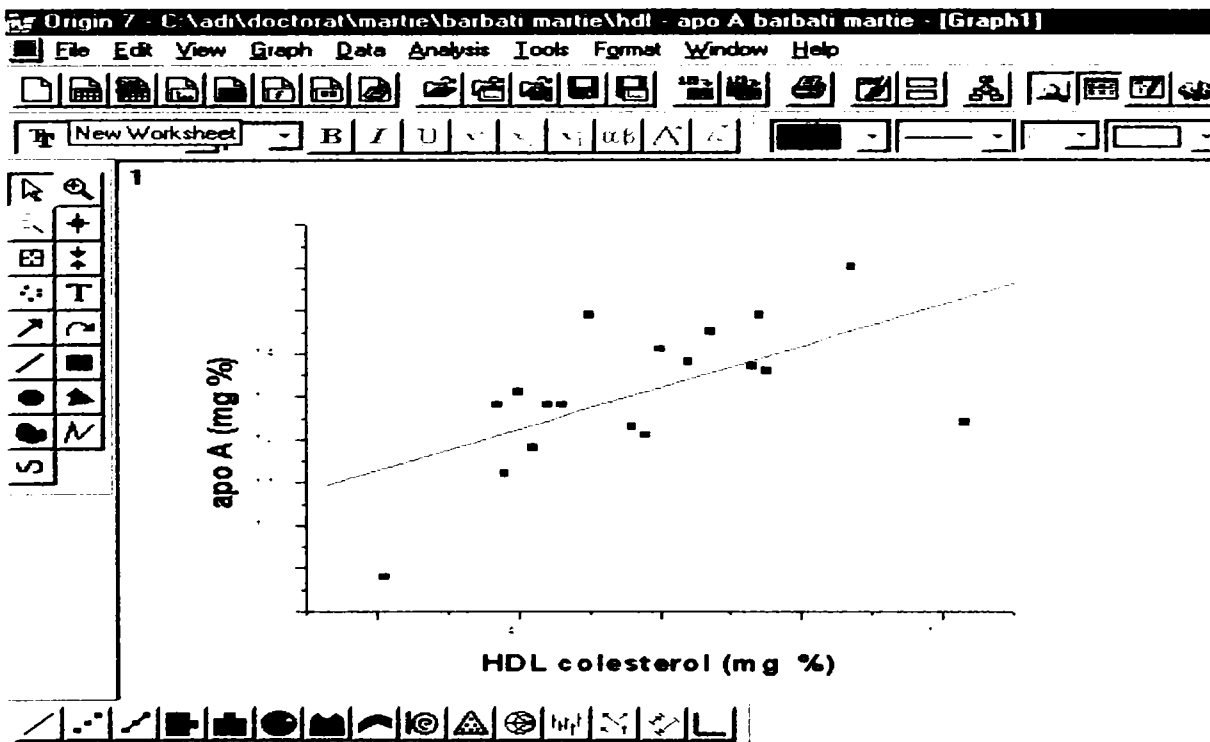


Fig. 5.25. Variația HDLc - apo A (grupa 3, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 103,02 + 0,48 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,6013, iar deviația standard 13,42.

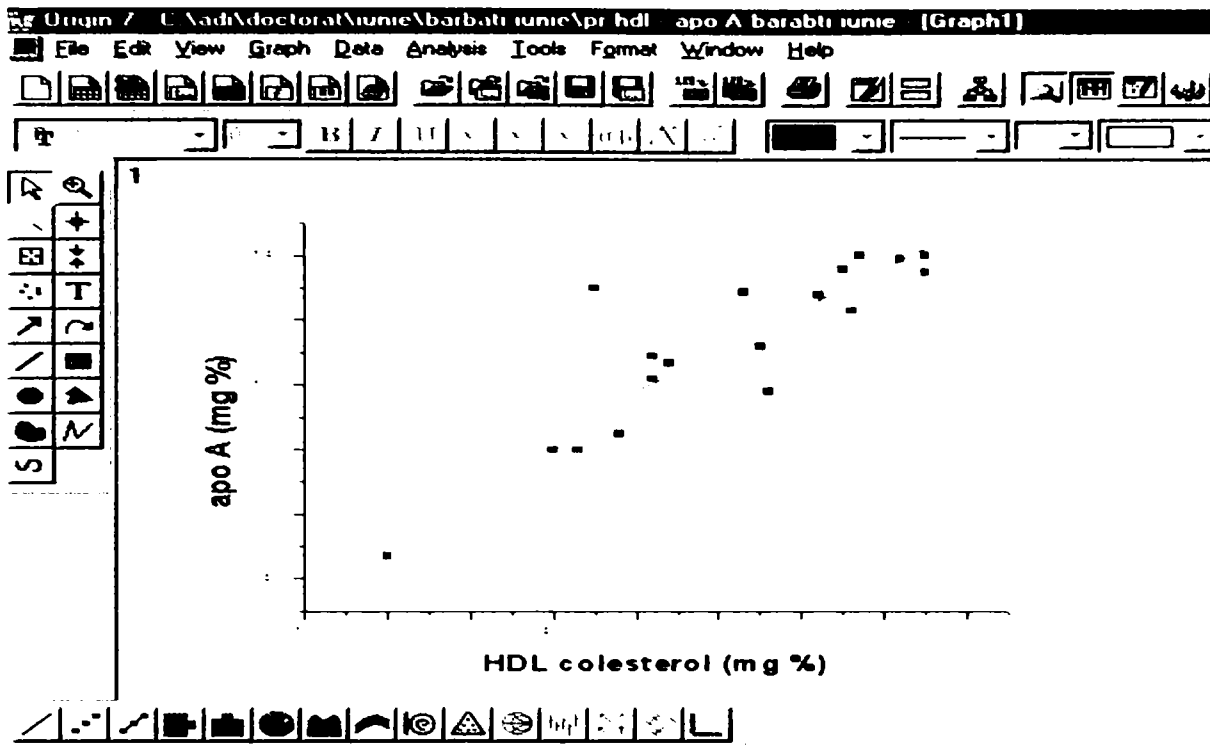


Fig. 5.26. Variația HDLc - apo A (grupa 3, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 34,61 + 1,27 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,871, iar deviația standard 13,28.

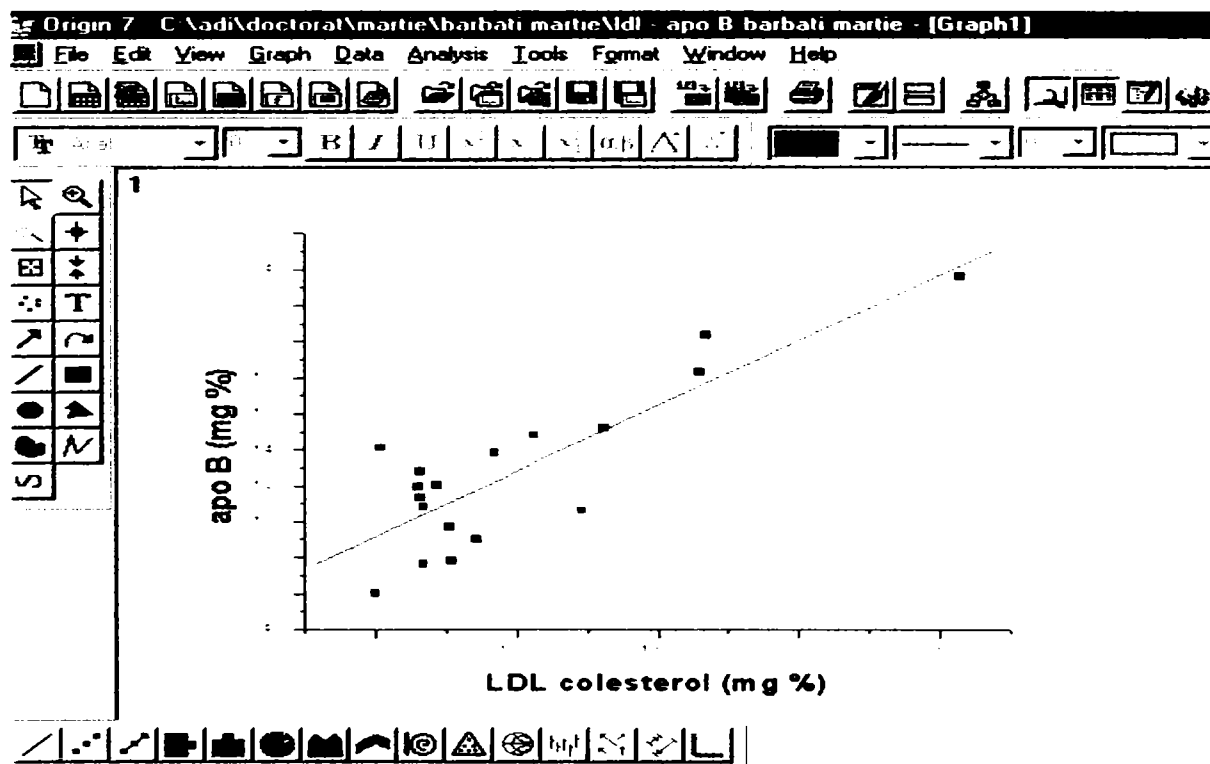


Fig. 5.27. Variația LDLc - apo B (grupa 3, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 55,69 + 0,72 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,844, iar deviația standard 25,09.

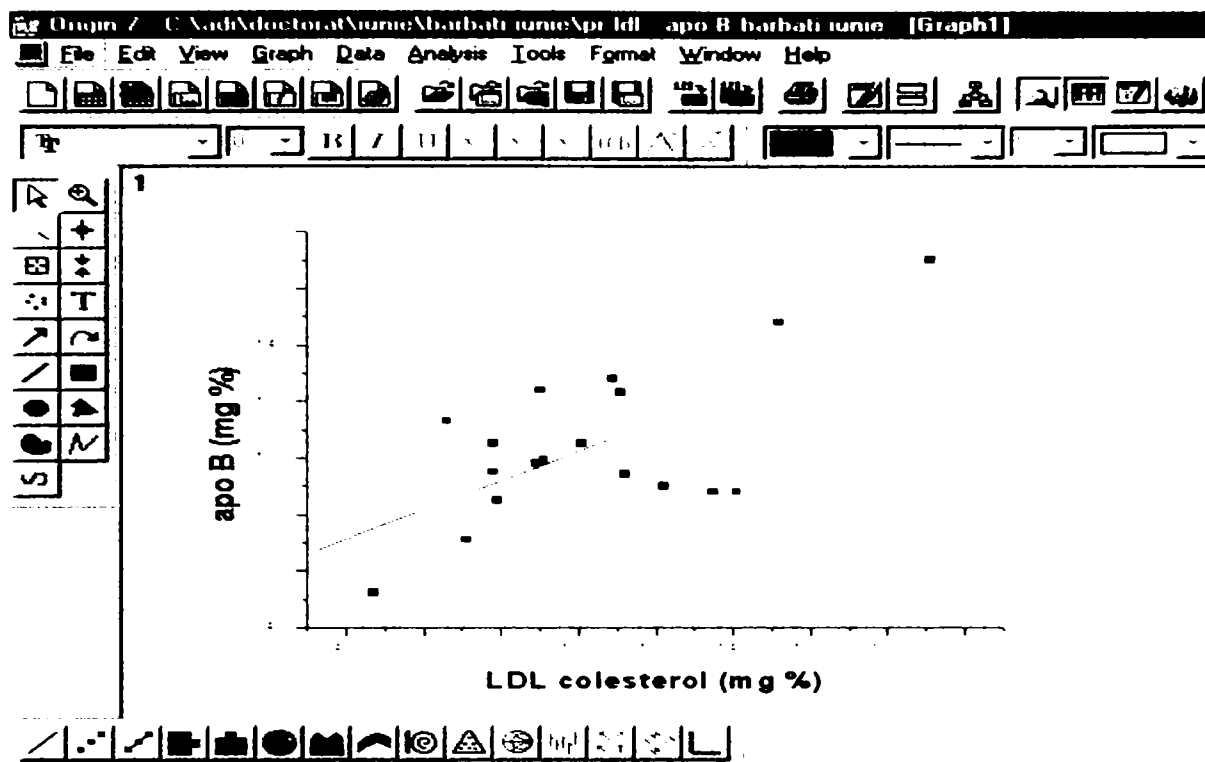


Fig. 5.28. Variația LDLc - apo B (grupa 3, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 50,27 + 0,52 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,667, iar deviația standard 21,07.

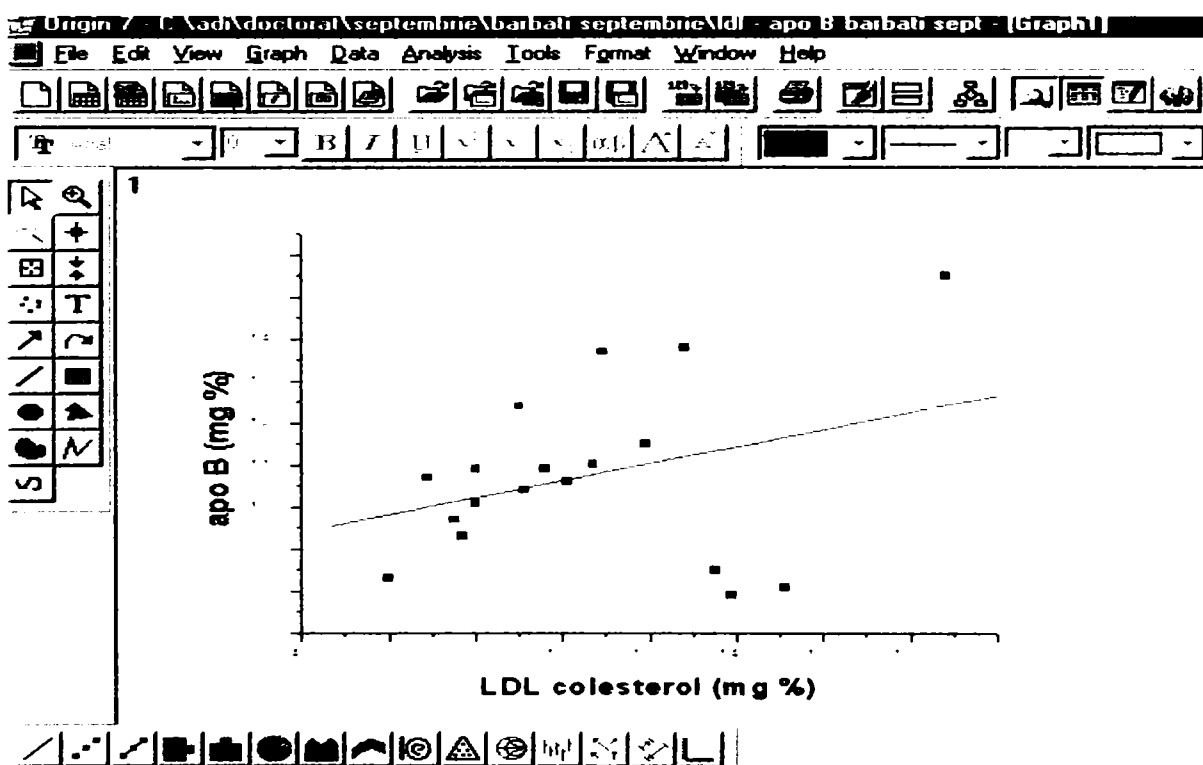


Fig. 5.29. Variația LDLc - apo B (grupa 3, septembrie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 86,02 + 0,20 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,32, iar deviația standard 20,35.

Analizând corelațiile între colesterolul total, cu fracțiile sale HDLc și LDLc, și lipoproteinel apo A și apo B, la grupa 3 – bărbați, pentru cele 3 determinări realizate la același interval de 3 luni (martie, iunie și septembrie) se pot trage următoarele concluzii:

- Pentru corelația colesterol – apo A, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,28 –0,41, iar deviația standard este cuprinsă între 16,09 - 20,49.
- Pentru corelația colesterol – apo B, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,42 –0,869, iar deviația standard este cuprinsă între 20,93 – 23,12.
- Pentru corelația HDLc – apo A, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,60 –0,87, iar deviația standard este cuprinsă între 13,28 - 13,28.
- Pentru corelația LDLc – apo B, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,32 –0,85, iar deviația standard este cuprinsă între 20,35 – 25,09.

Corelația cea mai bună este pentru un coeficient de regresie cât mai apropiat de 1, iar deviația standard cât mai mică.

Valorile corelațiilor de mai sus se încadrează în intervalul normal pentru o prelucrare statistică a datelor, și ele conduc la o serie de concluzii din punct de vedere al diagnosticului aterosclerozei și al tratamentului medicamentos cu statine.

4. Pentru grupa 4 – **femei**, la cele trei determinări, adică luna martie, iunie și septembrie, rezultatele statistice (ecuația dreptei, coeficientul de regresie și deviația standard) sunt prezentate în figurile 5.30 – 5.41.

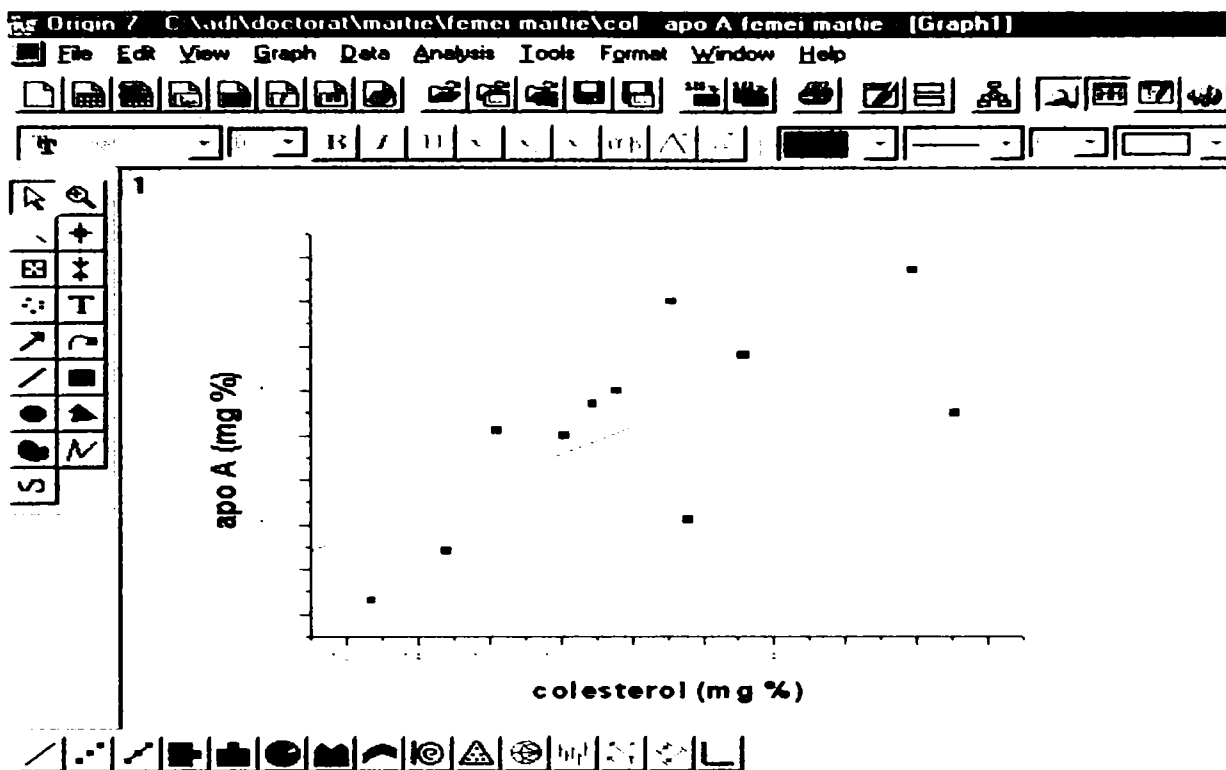


Fig. 5.30. Variația colesterol-apo A (grupa 4, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 90,18 + 0,309 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,689, iar deviația standard 16,72.

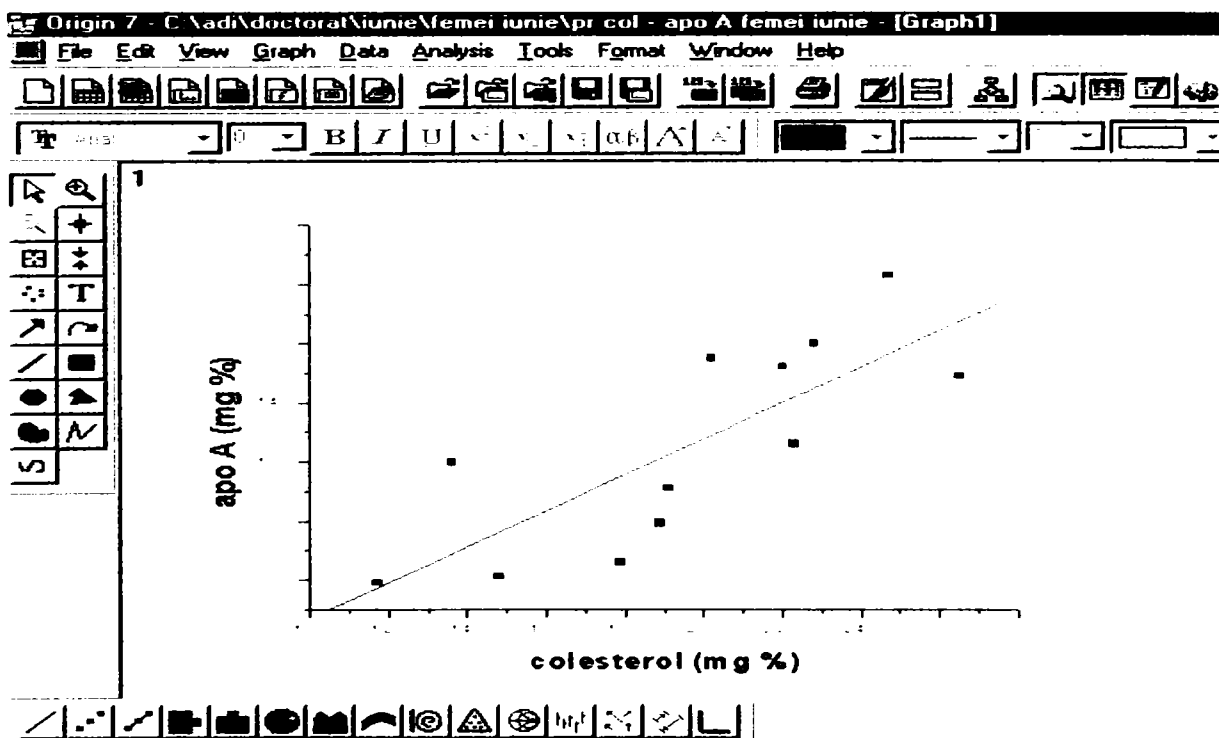


Fig. 5.31. Variația colesterol-apo A (grupa 4, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 5,96 + 0,60 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,789, iar deviația standard 22,37.

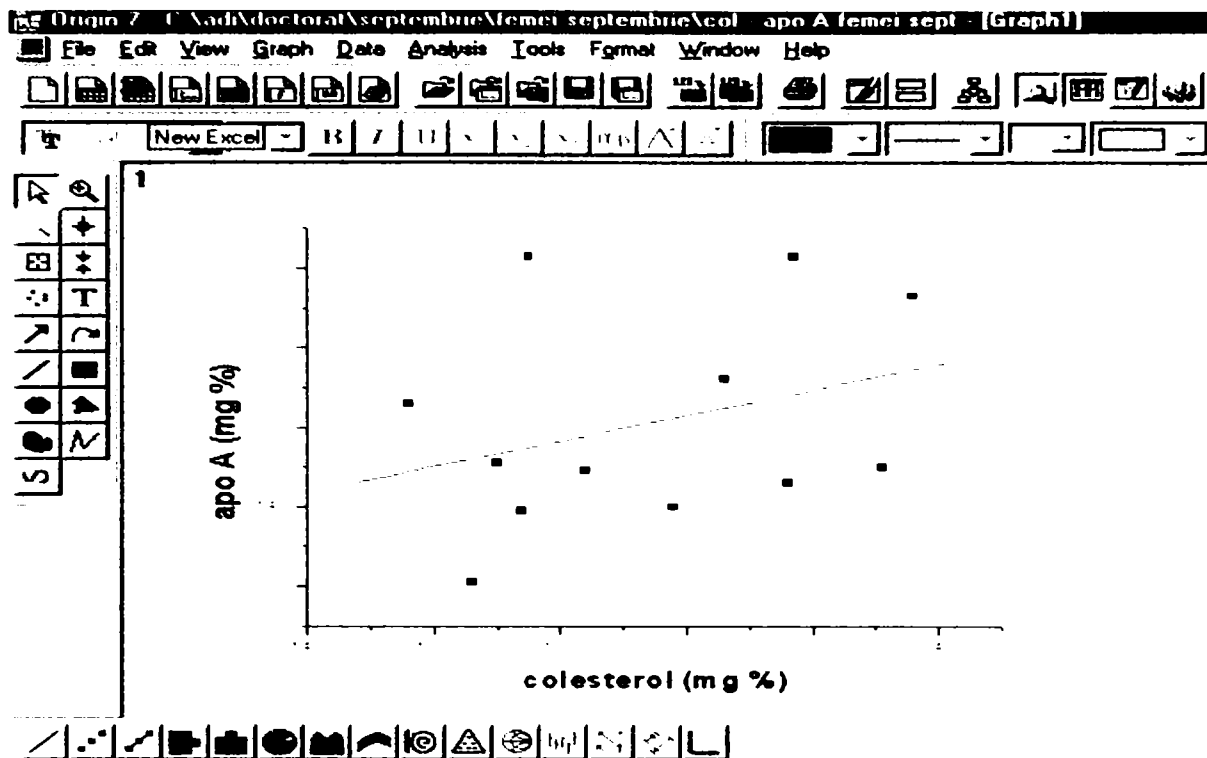


Fig. 5.32. Variația colesterol-apo A (grupa 4, septembrie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 98,92 + 0,32 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,323, iar deviația standard 26,44.

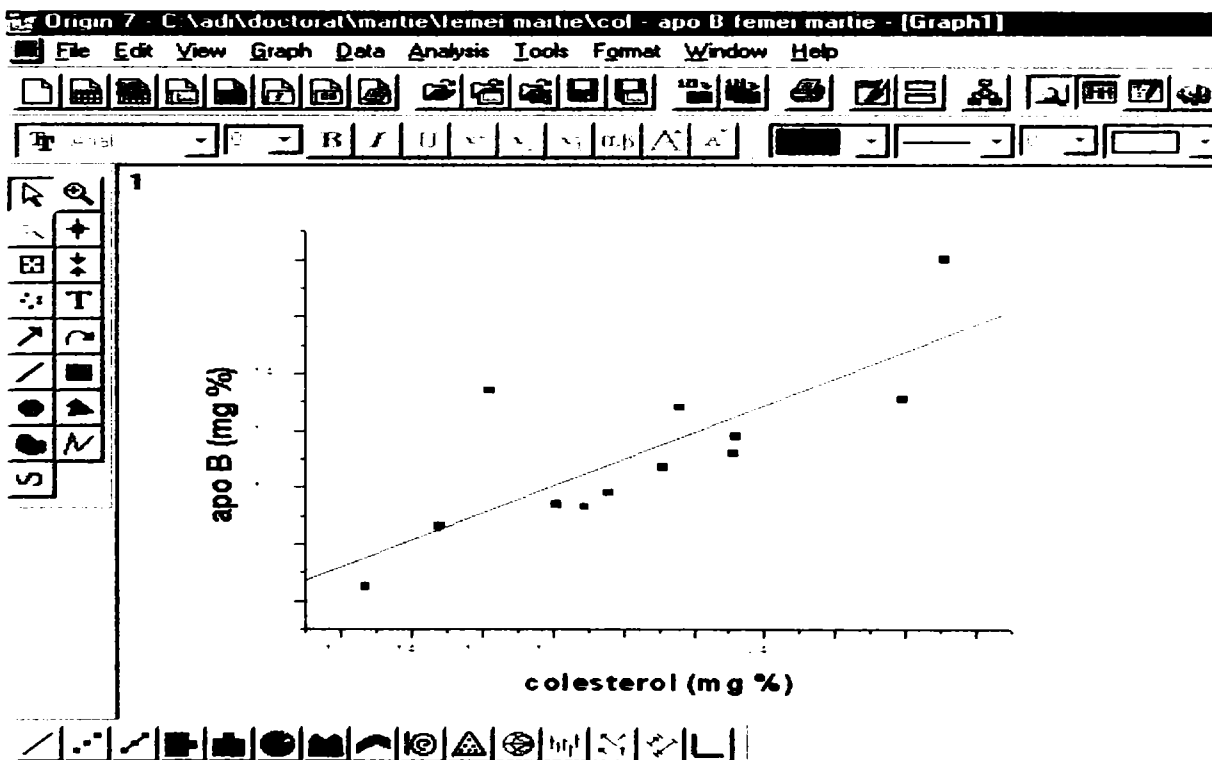


Fig. 5.33. Variația colesterol-apo B (grupa 4, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 14,48 + 0,47 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,793, iar deviația standard 18,82.

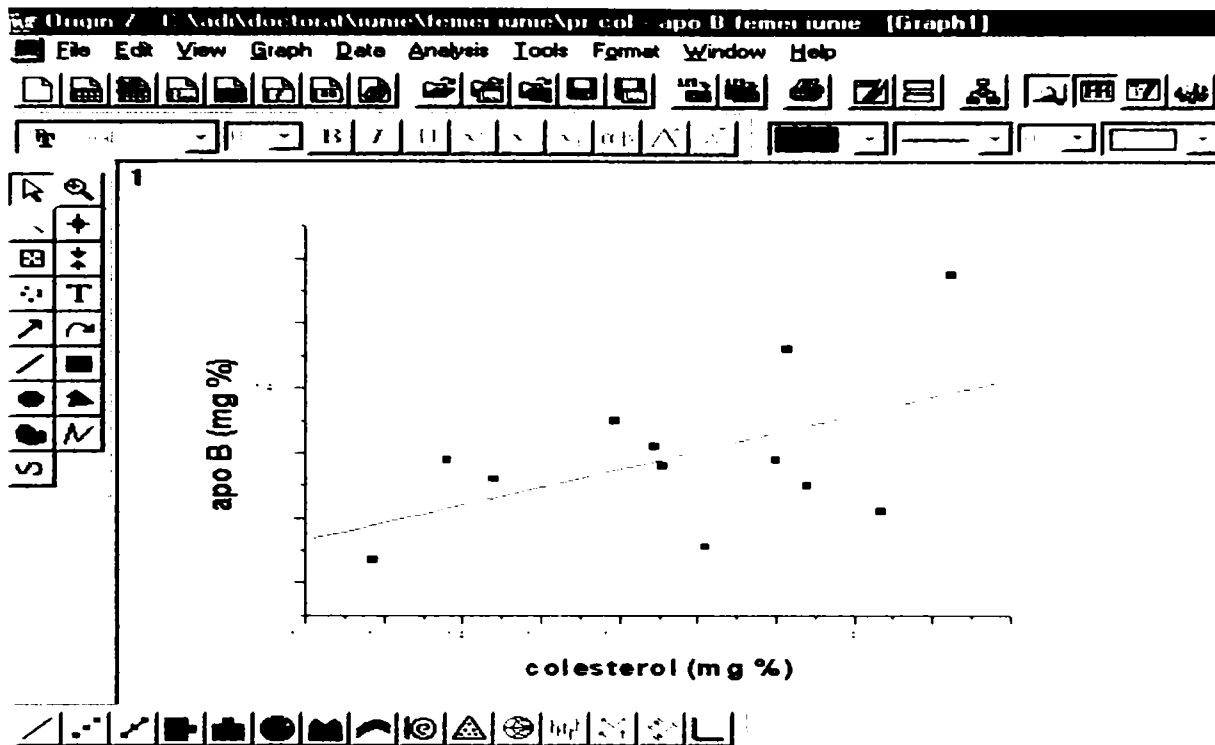


Fig. 5.34. Variația colesterol-apo B (grupa 4, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 65,42 + 0,27 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,507, iar deviația standard 22,12.

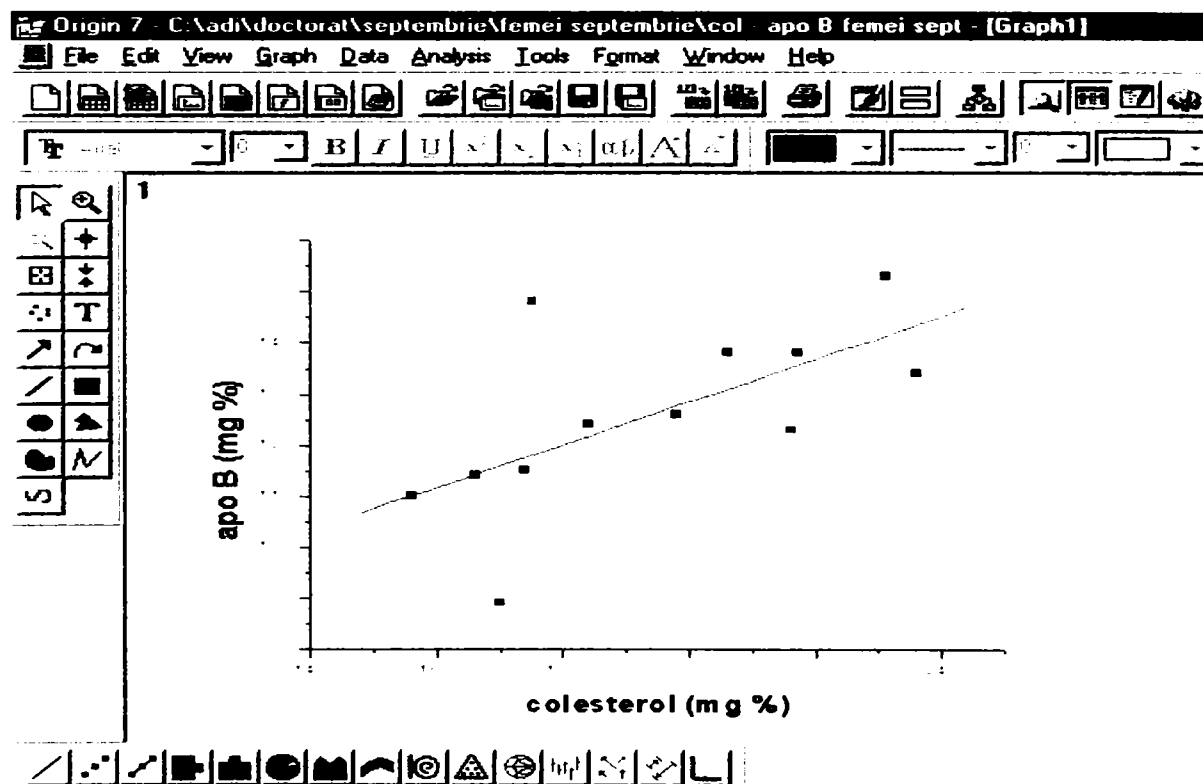


Fig. 5.35. Variația colesterol-apo B (grupa 4, septembrie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 44,60 + 0,41 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,63, iar deviația standard 14,37.

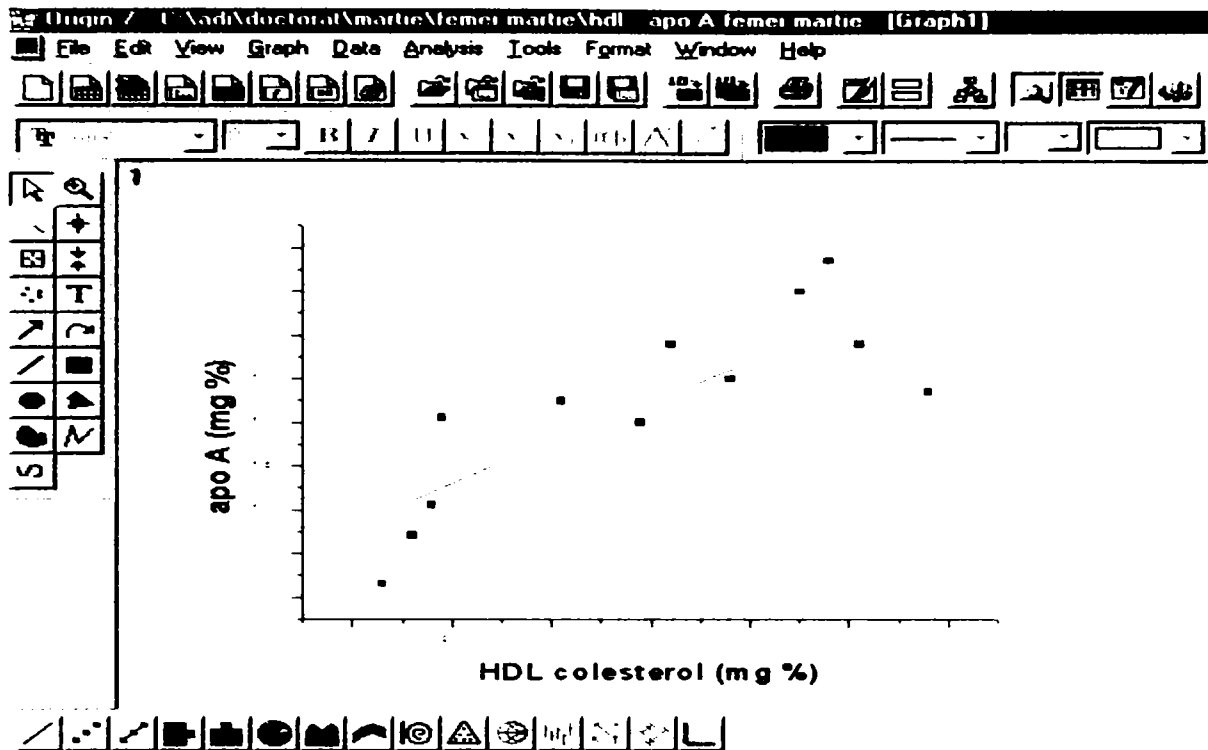


Fig. 5.36. Variația HDLc-apo A (grupa 4, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 99,18 + 0,92 x$,

Coeficientul de regresie este 0,813, iar deviația standard 13,43.

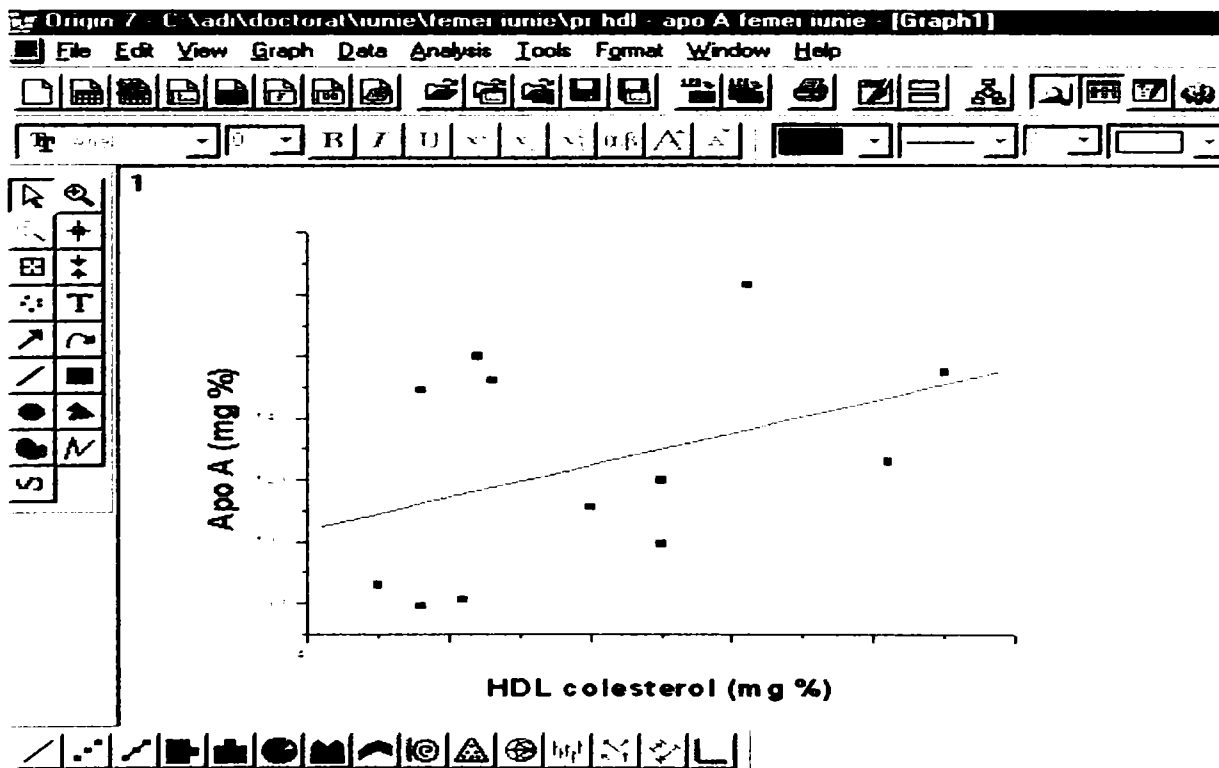


Fig. 5.37. Variația HDLc-apo A (grupa 4, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 62,04 + 1,04 x$,

Coeficientul de regresie este 0,399, iar deviația standard 33,38.

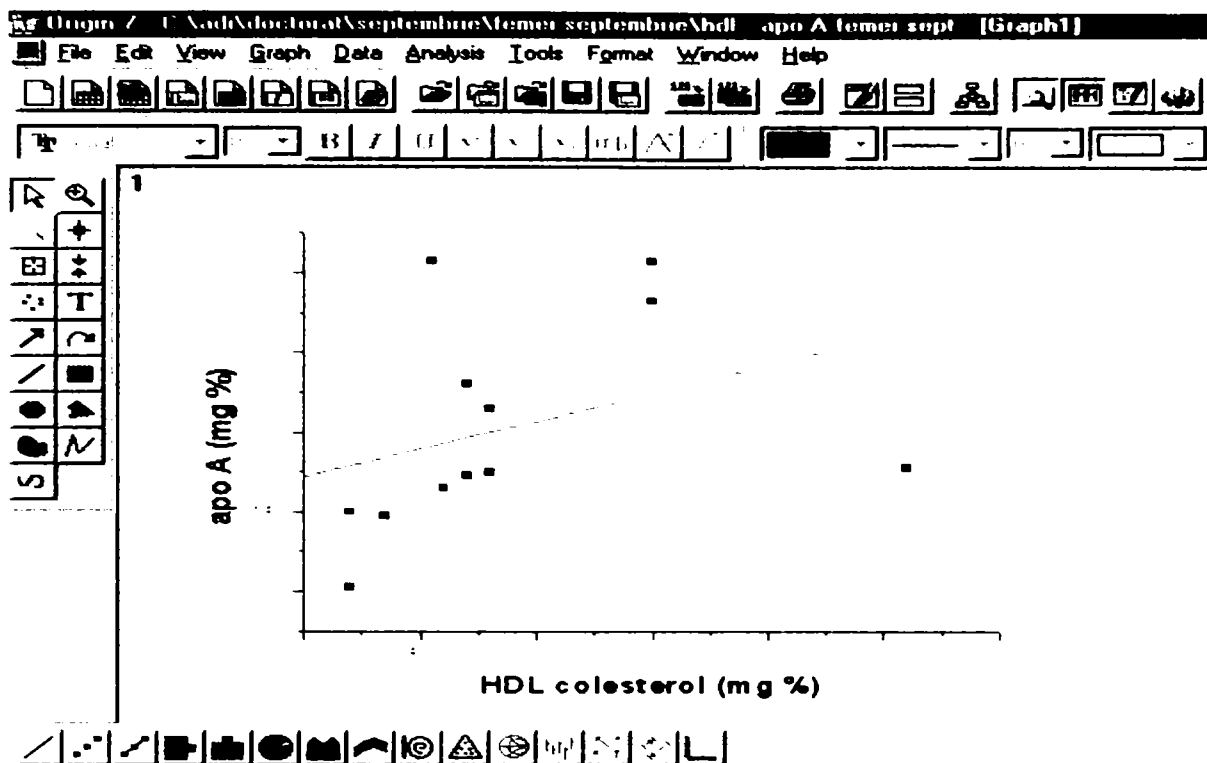


Fig. 5.38. Variația HDLc-apo A (grupa 4, septembrie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 127,8 + 0,70 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,36, iar deviația standard 26,06.

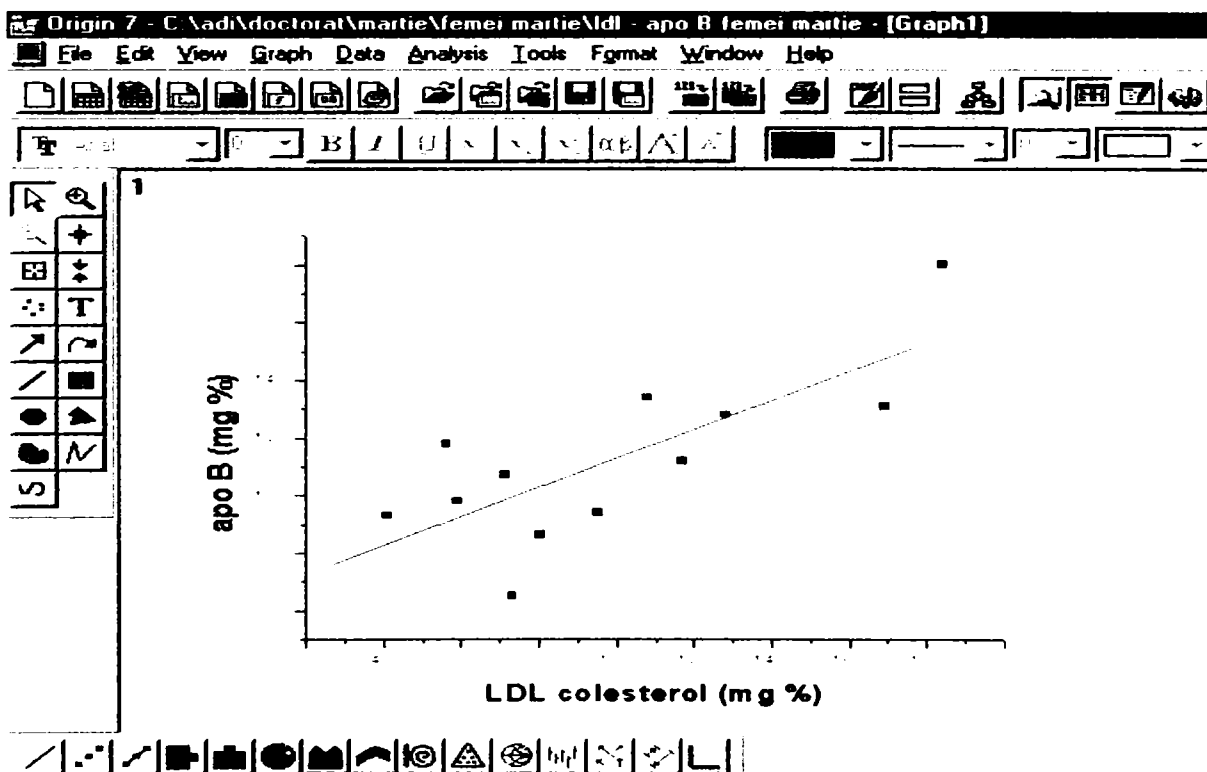


Fig. 5.39. Variația LDLc-apo B (grupa 4, martie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 62,52 + 0,504 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,765, iar deviația standard 19,87.

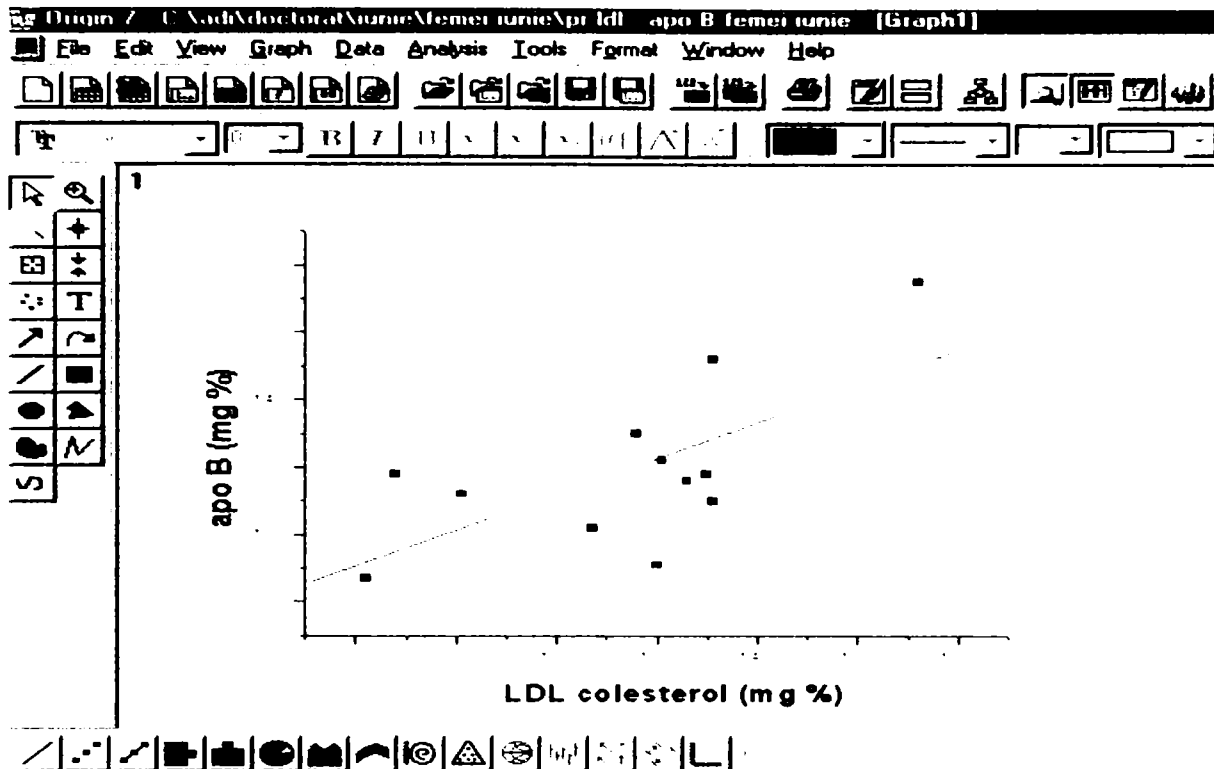


Fig. 5.40. Variația LDLc-apo B (grupa 4, iunie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 58,75 + 0,53 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,669, iar deviația standard 19,06.

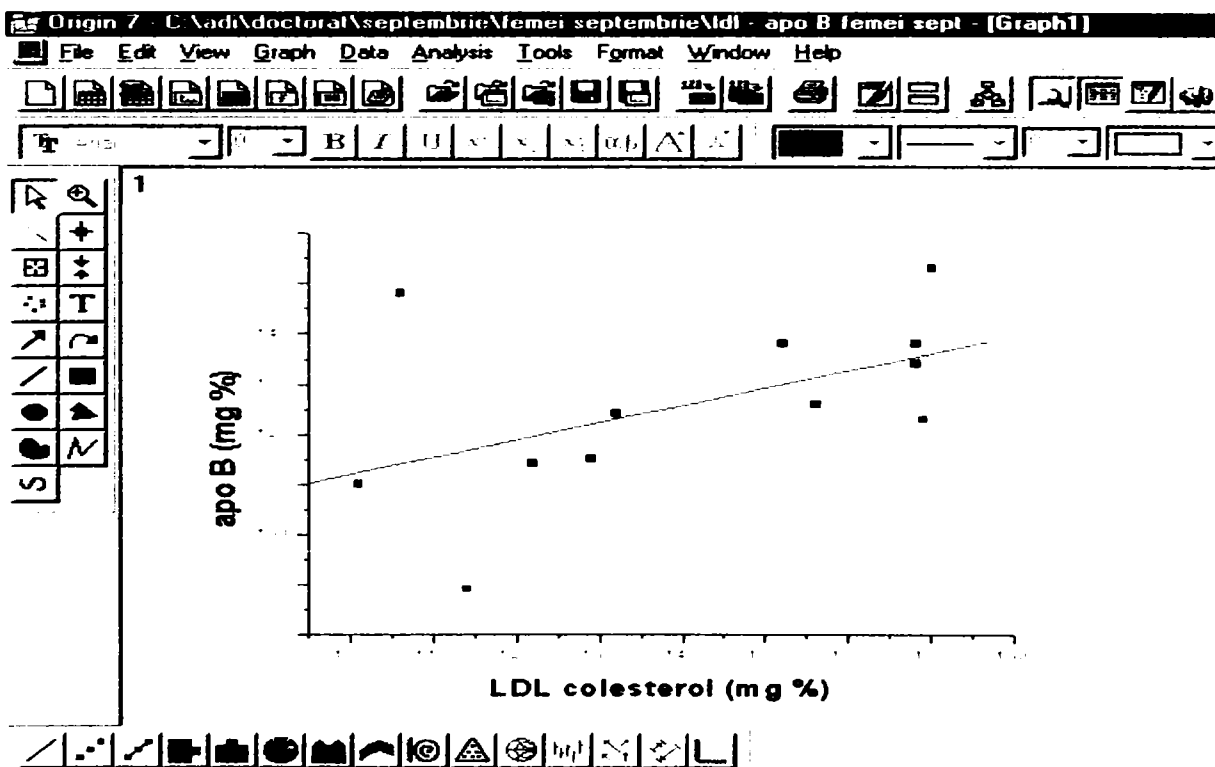


Fig. 5.41. Variația LDLc-apo B (grupa 4, septembrie)

Ecuția dreptei este de forma $y = 77,36 + 0,34 x$,
 Coeficientul de regresie este 0,51, iar deviația standard 16,00.

Analizând corelațiile între colesterolul total, cu fracțiile sale HDLc și LDLc, și lipoproteinele apo A și apo B, pentru grupa 3 – bărbați, pentru cele 3 determinări realizate la același interval de 3 luni (martie, iunie și septembrie) se pot trage următoarele concluzii:

- Pentru corelația colesterol – apo A, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,32 –0,79, iar deviația standard este cuprinsă între 16,72 - 26,44.
- Pentru corelația colesterol – apo B, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,51 –0,79, iar deviația standard este cuprinsă între 14,37 – 22,12.
- Pentru corelația HDLc – apo A, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,36 –0,813, iar deviația standard este cuprinsă între 13,43 - 33,38.
- Pentru corelația LDLc – apo B, variația coeficientului de regresie este cuprinsă între 0,51 –0,765, iar deviația standard este cuprinsă între 16,00 – 19,06.

Corelația cea mai bună este pentru un coeficient de regresie cât mai apropiat de 1, iar deviația standard cât mai mică.

Valorile corelațiilor de mai sus, se încadrează în intervalul normal pentru o prelucrare statistică a datelor, și ele conduc la o serie de concluzii din punct de vedere al diagnosticului aterosclerozei și al tratamentului medicamentos cu statine.

Aceste particularități legate de tipul de afecțiune cardiacă, de sexul sau vârsta subiecților, se regăsesc și în modificările diverselor fracții ale lipidelor plasmaticice.

Interpretarea valorilor fracțiilor lipidelor plasmaticice este supusă unor factori care par uneori paradoxali, mai ales dacă sunt corelați cu starea clinică a subiecților respectivi. Sunt o serie de factori care produc aceste modificări ale hiperlipoproteinemiilor primare induse genetic: fumatul, alcoolismul cronic, diverse endocrinopatii, pancreatite cronice și care trebuie luate în bilanțul evaluării valorilor obținute la un moment dat, dar și în corelarea lor cu determinările efectuate dinamic.

Un alt aspect al interpretării rezultatelor îl constituie analiza comparativă a informației apriorice și a informației rezultate din experimentul factorial. Se impune verificarea identității condițiilor de experimentare din punct de vedere al intervalului de variație, și respectiv din particularitățile metodelor de experimentare, care pot fi:

- **unifactoriale (clasice);**
- **multifactoriale (moderne).**

În concluzie, erorile de experimentare, respectiv de informare, precum și caracterul local al explorării spațiului multifactorial, și respectiv caracterul

monofactorial al informației apriorice sunt aspecte de care trebuie să se țină seama în interpretarea rezultatelor, și implicit în luarea deciziilor și eventual de prognozare a stării de sănătate a pacientului.

CAPITOLUL 6

RELAȚIILE DE INTERDEPENDENȚĂ DINTRE COMPONENETELE DETERMINANTE

La pacienții hipertensivi nu sunt obligatorii modificări ale profilului lipidic atâta timp cât ei nu dezvoltă o formă de cardiopatie ischemică; există și pacienți care au dezvoltat pe parcurs o cardiopatie ischemică la care s-a asociat hipertensiune arterială. Întrucât modificarea metabolismului lipidic (dislipidemii) reprezintă profilul biochimic al aterosclerozei la pacienții cu hipertensiune arterială, de obicei nu sunt obligatorii modificări ale profilului lipidic. Din contră, pacienții care prezintă o formă de cardiopatie ischemică, cu sau fără infarct miocardic, prezintă de regulă modificări ale profilului lipidic.

Deoarece evoluția acestui profil este oscilantă, se explică valori diferite la determinările efectuate dinamic, apărând uneori valori normale ale acesteia.

Este un lucru dovedit că determinările acestor fracții lipidice la intervale de timp, scot în evidență valori diferite, de la o determinare la alta, uneori normale, alteori crescute. Acest lucru nu este în relație directă totdeauna cu gravitatea cardiopatiei ischemice, de aceea nu putem aprecia de fiecare dată prognosticul afecțiunii la un subiect numai pe baza valorilor acestor fracții lipidice serice. Determinarea valorilor fracțiilor lipidelor serice ghidează în schimb terapia medicamentoasă (cu fibrati și statine) în situația unor valori crescute, și modulează dozele de medicament pe 24 de ore în funcție de nivelul acestor fracții lipidice plasmatice.

În ceea ce privește dispersia valorilor fracțiilor lipidelor serice, acestea sunt nuanțate în funcție de sexul și vârsta subiecților.

Se știe că femeile sunt protejate în timpul vieții active gonadice de a face o formă de ateroscleroză, datorită efectului protector al hormonilor estrogeni, în special foliculina. Aceștia produc o scădere a adezivității și agregării plachetare, cresc puterea fibrinolitica a serului, produc vasodilatație

arterială, deci inhibă tocmai o parte din factorii care stau la baza mecanismului aterogenezei.

Acest efect protector este anulat în condițiile în care persoanele de sex feminin aflate în activitate gonadică prezintă unul sau mai mulți din următorii factori: fumat, diabet zaharat și utilizarea anticoncepționalelor orale.

În aceste condiții arătate mai sus, femeia este expusă riscului de a prezenta o formă clinică de ateroscleroză: cardiacă, cerebrală, etc.

Persoanele de sex masculin nu prezintă această protecție hormonală, indiferent de vârstă, de aceea, aceștia sunt expuși modificărilor profilului lipidic la orice vârstă, și deci la apariția unei forme clinice de ateroscleroză. De obicei, prevalența unei forme clinice de cardiopatie ischemică la sexul masculin este între 40-65. Aceasta este incidența maximă a infarctului miocardic la sexul masculin.

Din contră, femeile fac infarct miocardic după vârsta menopauzei, până la vârsta de 70-75 ani, această extindere la vârste mai înaintate ținând cont de protecția hormonală contra aterosclerozei până la vârsta menopauzei.

Aceste particularități legate de tipul de afecțiune cardiacă, de sexul sau vârsta subiecților, se regăsesc și în modificările diverselor fracții ale lipidelor plasmaticice și ele vor fi analizate în graficele prezentate în continuare.

Interpretarea valorilor fracțiilor lipidelor plasmaticice este supusă unor factori care par uneori paradoxali, mai ales dacă sunt corelați cu starea clinică a subiecților respectivi. Sunt o serie de factori care produc aceste modificări ale hiperlipoproteinemiilor primare induse genetic: fumatul, alcoolismul cronic, diverse endocrinopatii, pancreatite cronice, și care trebuie luate în bilanțul evaluării valorilor obținute la un moment dat, dar și în corelarea lor cu determinările efectuate dinamic.

Luând în considerare cele expuse mai sus, s-a ajuns la concluzia că relațiile de dependență **colesterol-apo A-apo B**, **colesterol-HDL-apo A**, **colesterol-LDL-apoB** și **apo A-apo B-vârstă**, pot modela mai bine situația unui bolnav.

În continuare s-a urmărit variația parametrilor **colesterol-HDL-apo A**, **colesterol-LDL-apoB**, **colesterol-apo A-apo B**, **apo A- apo B-vârstă**, și compararea lor cu valorile normale.

Alegerea corelațiilor între valorile colesterolului total, cât și a celor 2 fracții ale sale (HDLc și LDLc), și a valorilor lipoproteinelor apo A și apo B, este justificată de faptul că aceste fracții lipidice reprezintă markerii biochimici ai aterosclerozei. Așa cum s-a prezentat anterior colesterolul este prezent în substratul anatomic al aterosclerozei care reprezintă plăcile de aterom din pereții arterelor mari și mijlocii. Prezența la un individ a modificărilor anatomice de ateroscleroză poate fi documentată prin mai multe metode (clinice, EKG, angiografie, ecocardiografie, etc...), care nu fac obiectul tezei de față.

Lucrarea de față se ocupă de aspectul biochimic prin care putem documenta modificările de ateroscleroză, iar acestea sunt reprezentate de valorile colesterolului total și a fracțiilor sale (HDLc, LDLc), cât și a celor două apolipoproteine apo A și apo B, care conțin în structura lor fracțiile colesterolului.

Se știe că depunerile de colesterol în pereții arterelor începe la vârste tinere, ele evoluând în ani de zile, având o maximă incidență între 40 și 60 de ani la bărbați, iar la femei după vârsta de 50 de ani, când instalarea menopauzei nu îi mai conferă femeii protecția hormonală față de apariția aterosclerozei.

Prelucrarea datelor experimentale s-a făcut cu programul STATISTICA 6.0, la care s-au folosit metodele *Quadrat Surface* și *Spline*, cu un coeficient de încredere setat la introducerea valorilor experimentale de, 95 %. Aceste reprezentări ne dau ecuațiile de aproximare a suprafețelor prin regresie multiplă neliniară, care vor fi folosite ca modele matematice în capitolul 7.

Construirea modelului matematic s-a realizat computerizat cu programul STATISTICA 6.0, care analizează funcțiile concatenate ca și funcții spline. Termenul „spline” indică o bandă elastică pentru desenarea unor curbe netede, de-a lungul unui set de puncte de control. Matematic, asemenea curbe pot fi descrise, pe porțiuni, ca aproximări ale unor funcții polinomiale de ordinul doi în punctele de control [21].

Curbele B-spline sunt o clasă de curbe spline foarte utile în aplicațiile grafice. Pentru un set de $(n+1)$ puncte de control p_k ($k = 0 - n$), se pot determina punctele care aparțin unei curbe B-spline aproximată prin puncte de control date pe baza ecuației parametrice (6.1):

$$P_u = \sum_{k=0}^n p_k \cdot N_{k,t} \quad (6.1)$$

în care:

P_u – funcția curbei B-spline;

p_k – unul din cele $(n+1)$ puncte de control;

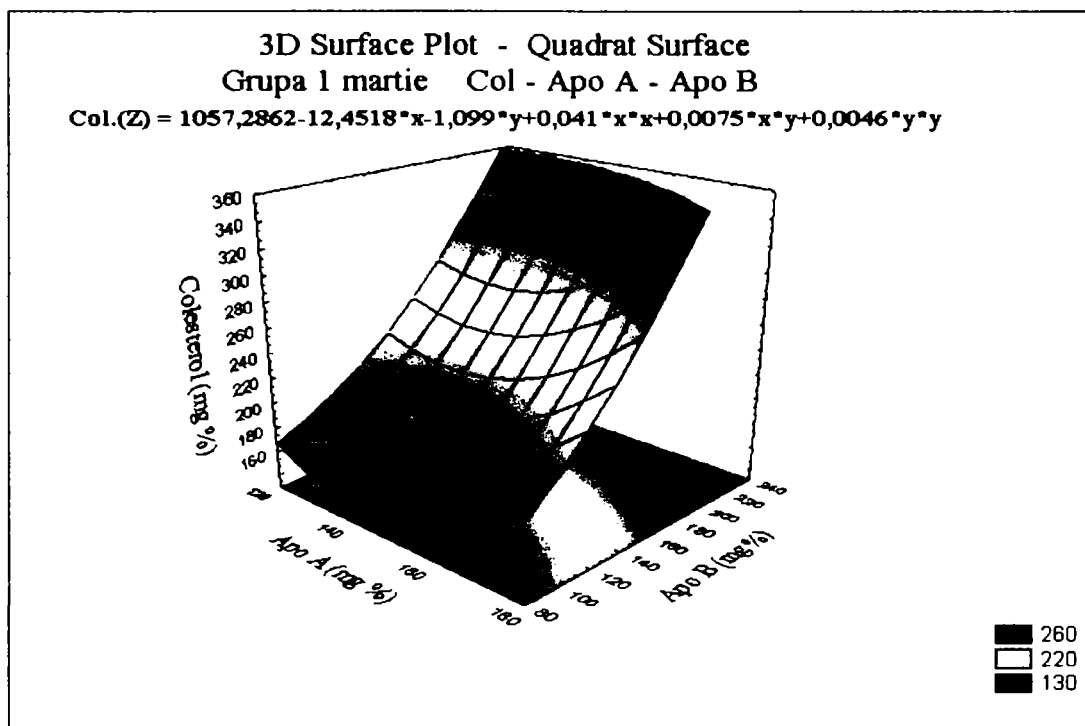
$N_{k,t}$ – funcții polinomiale;

n – numărul punctelor de control;

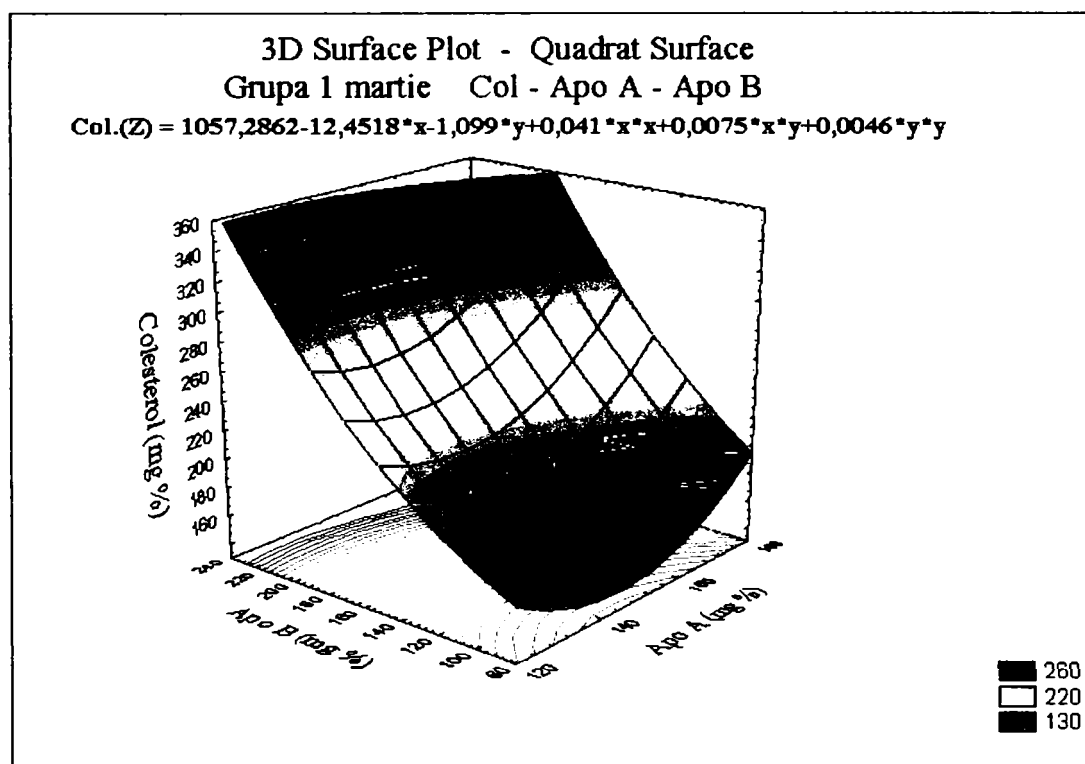
t – puncte de control din cele $(n+1)$ puncte de control

Reprezentarea corelațiilor colesterolului total, a fracțiilor sale (HDLc, LDLc, cu apolipoproteinele principale, apo A și apo B, s-a făcut la cele 3 determinări efectuate la un interval de 3 luni (martie, iunie, septembrie) pentru cele două grupe de boli, **hipertensiune arterială** și **cardiopatie ischemică**, și apoi pe cele două grupe obținute prin împărțirea pe sexe a subiecților – **bărbați** și **femei**. Din aceste reprezentări s-au evidențiat o serie de concluzii referitoare la relevanța determinărilor.

Grupa 1 Hipertensiune arterială



**Fig. 6.1. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 1, martie)
 Quadrat surface areas**



**Fig. 6.2. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 1, martie)
 Quadrat surface lines**

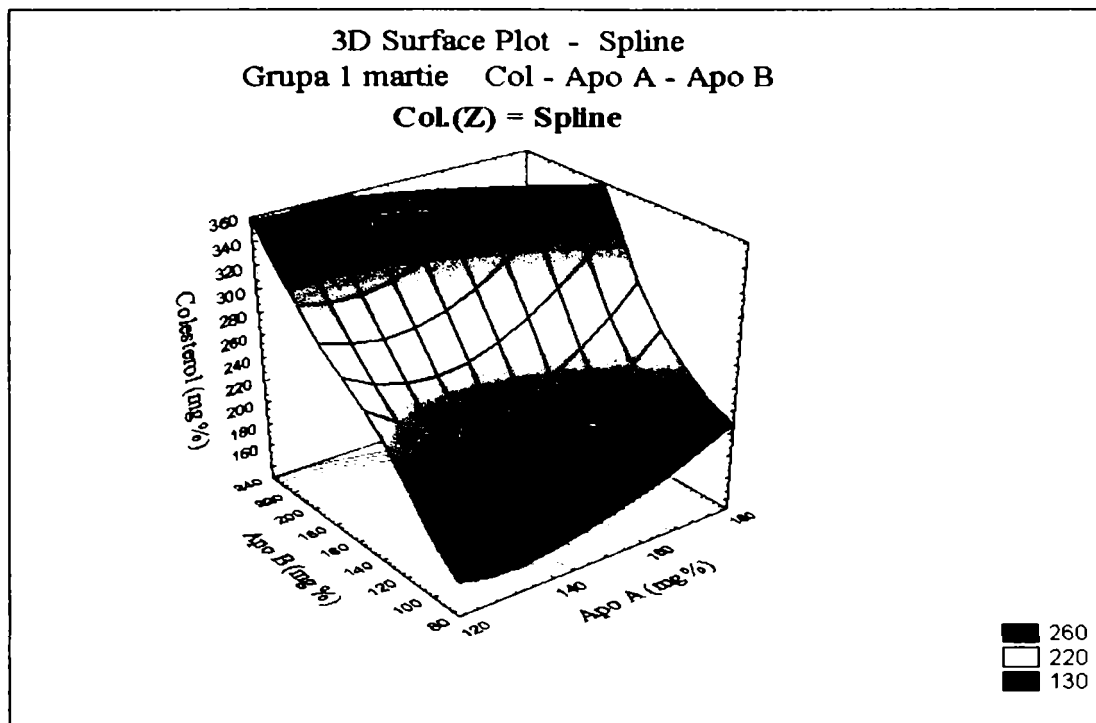


Fig. 6.3. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 1, martie) varianta - spline

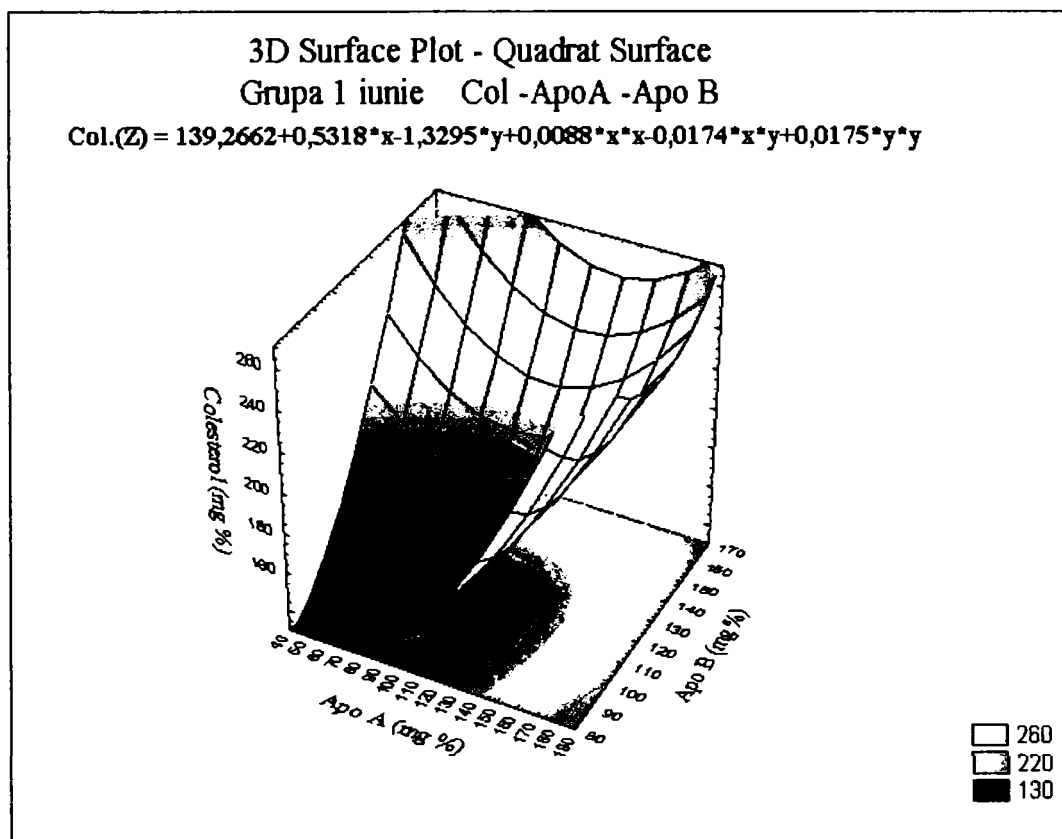
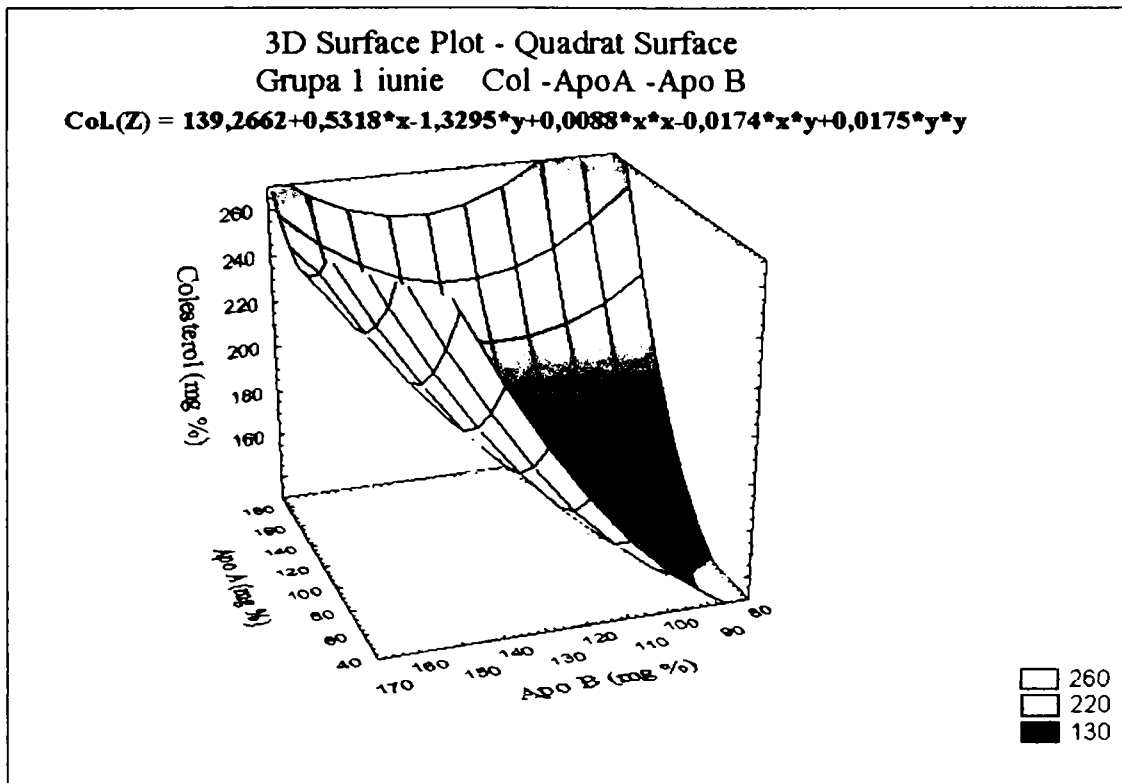
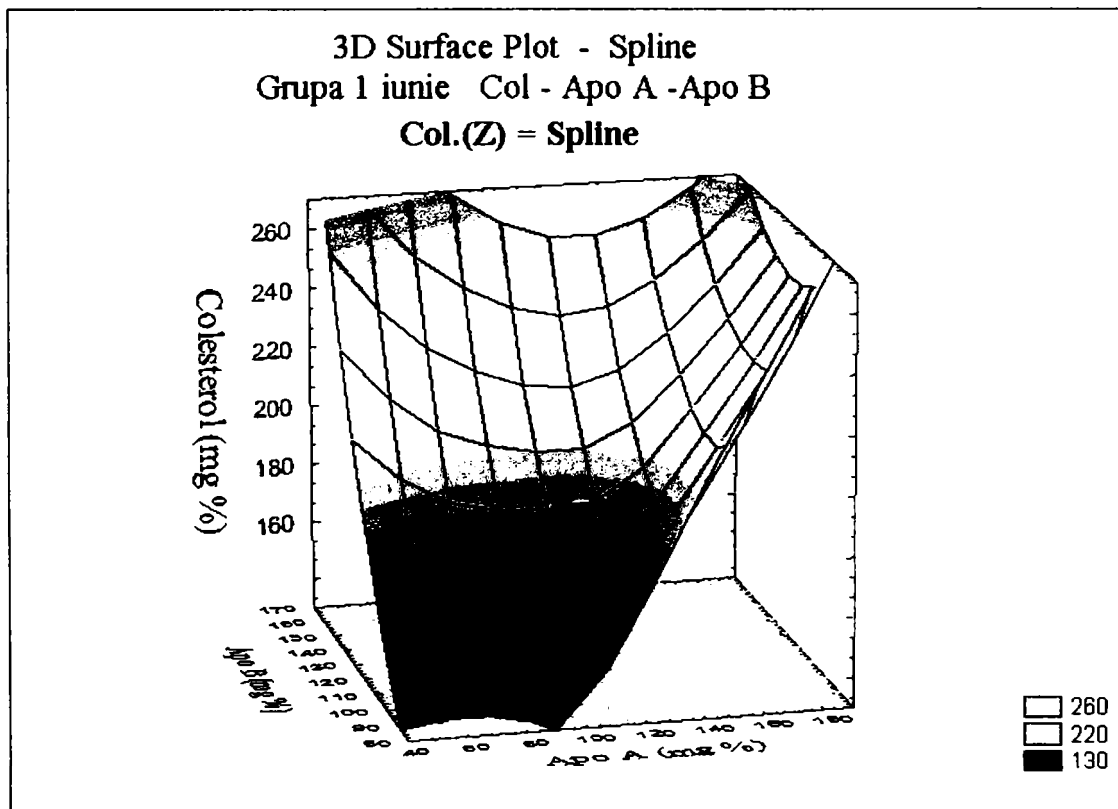


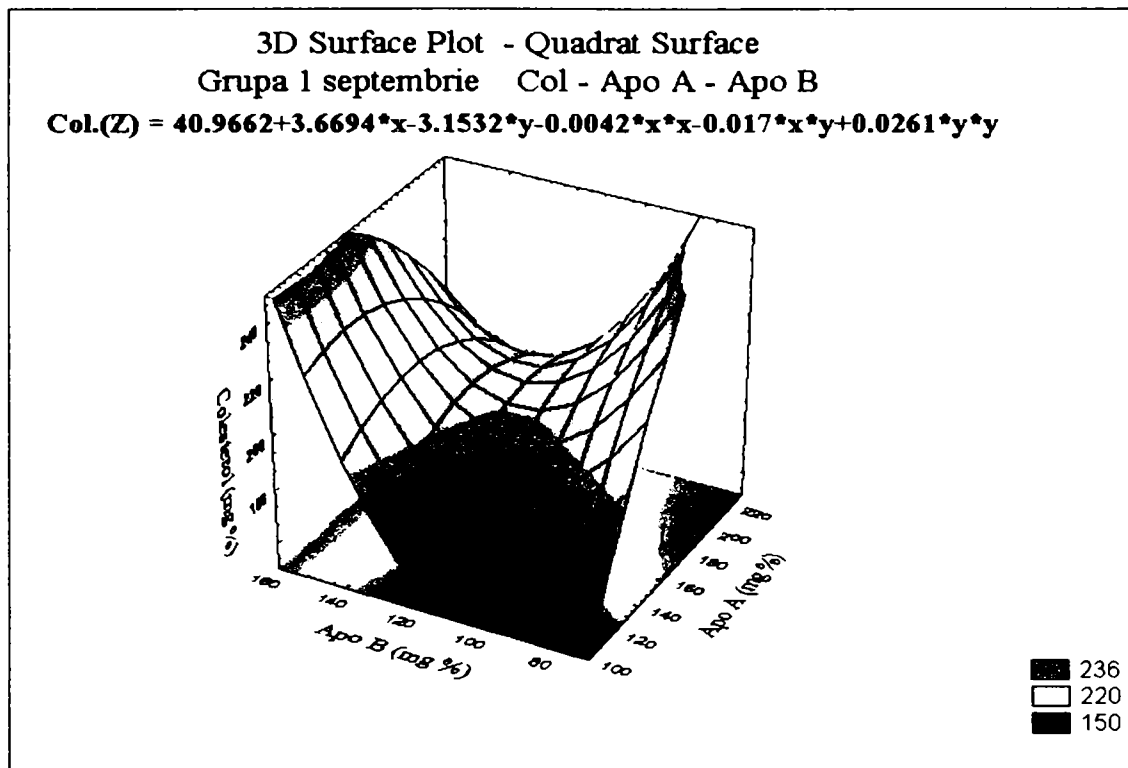
Fig. 6.4. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 1, iunie) Quadrat surface areas



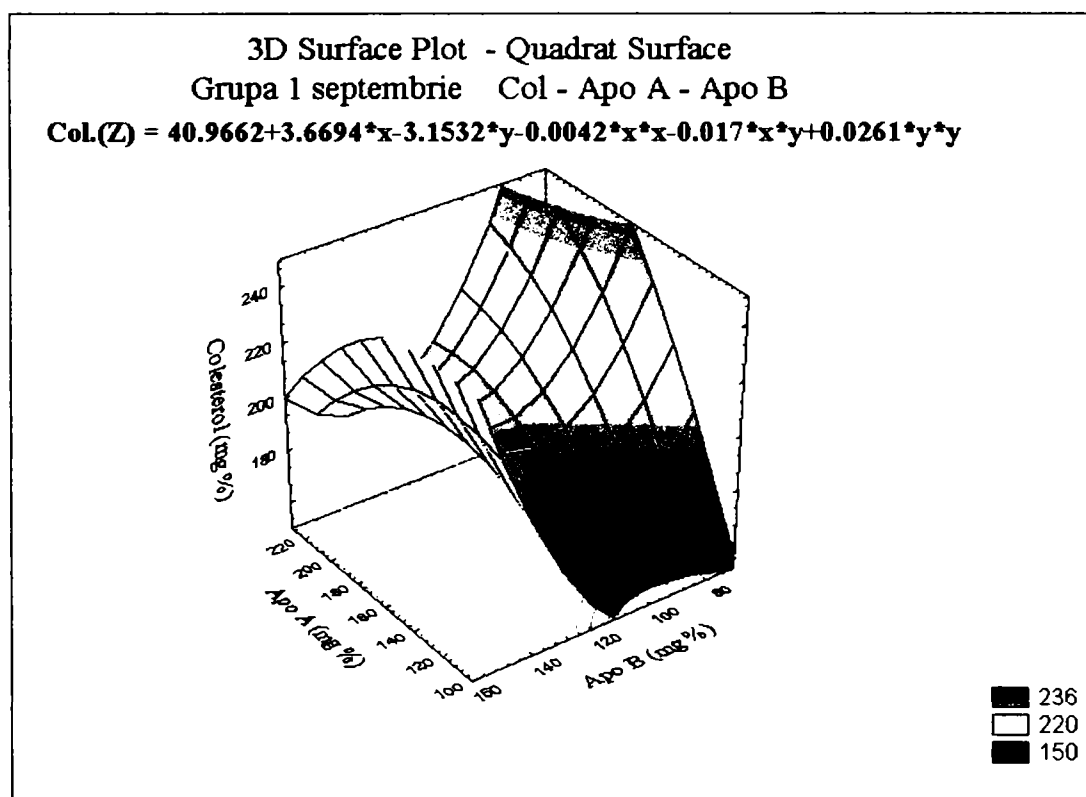
**Fig. 6.5. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 1, iunie)
 Quadrat surface lines**



**Fig. 6.6. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 1, iunie)
 varianta - spline**



**Fig. 6.7. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 1, septembrie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.8. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 1, septembrie)
 Quadratic surface lines**

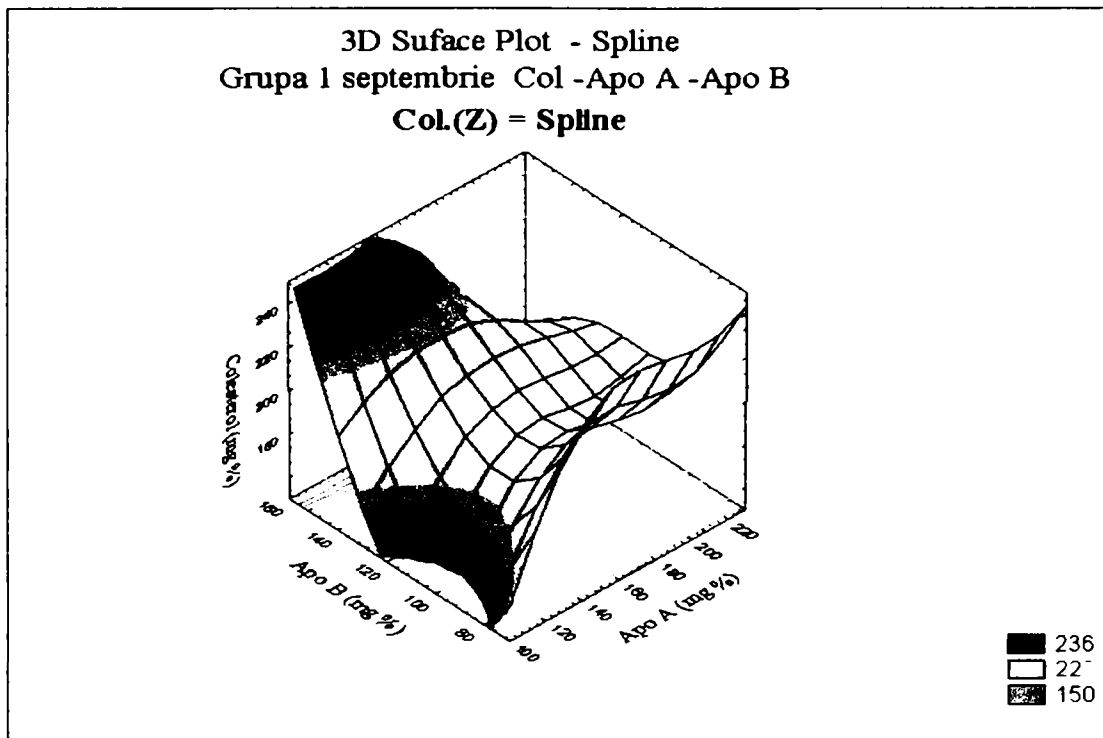


Fig. 6.9. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 1, septembrie) varianta spline

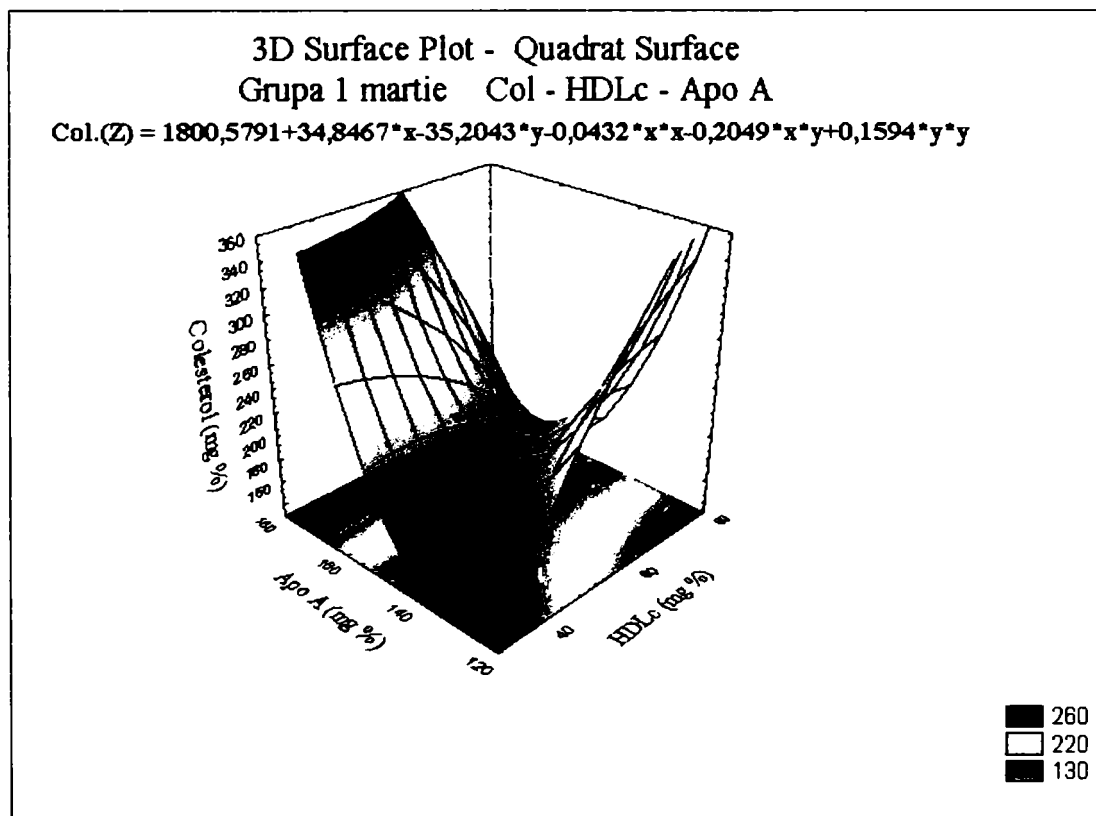
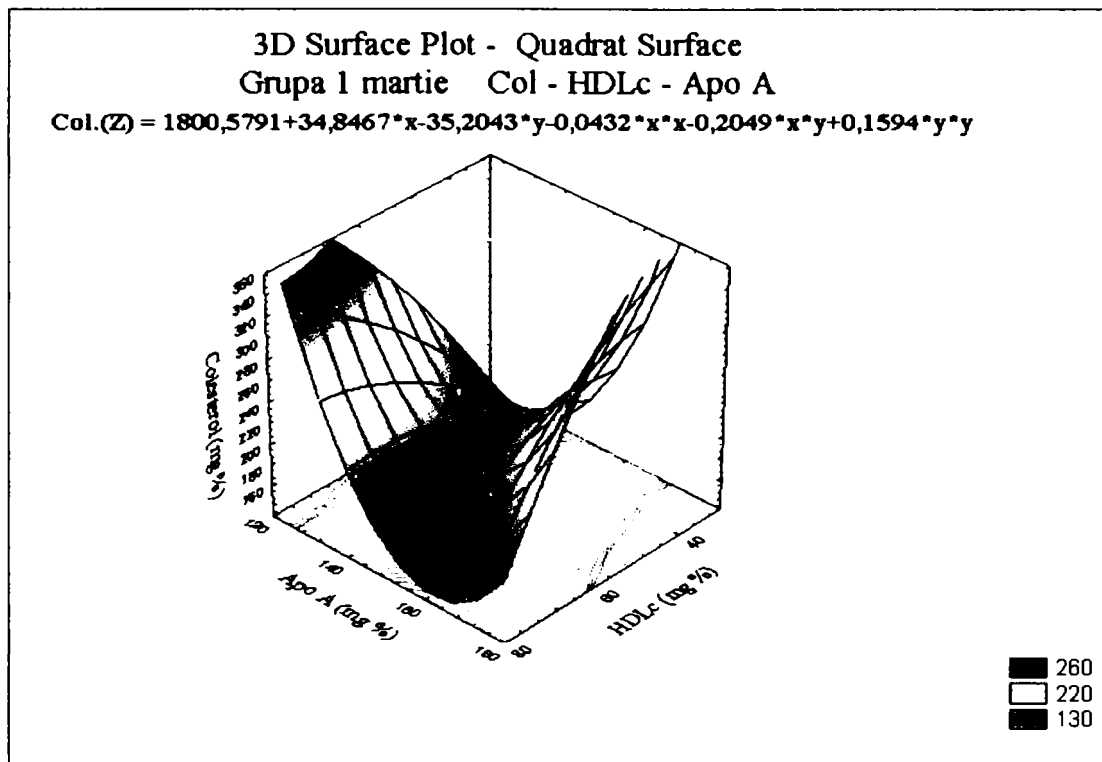
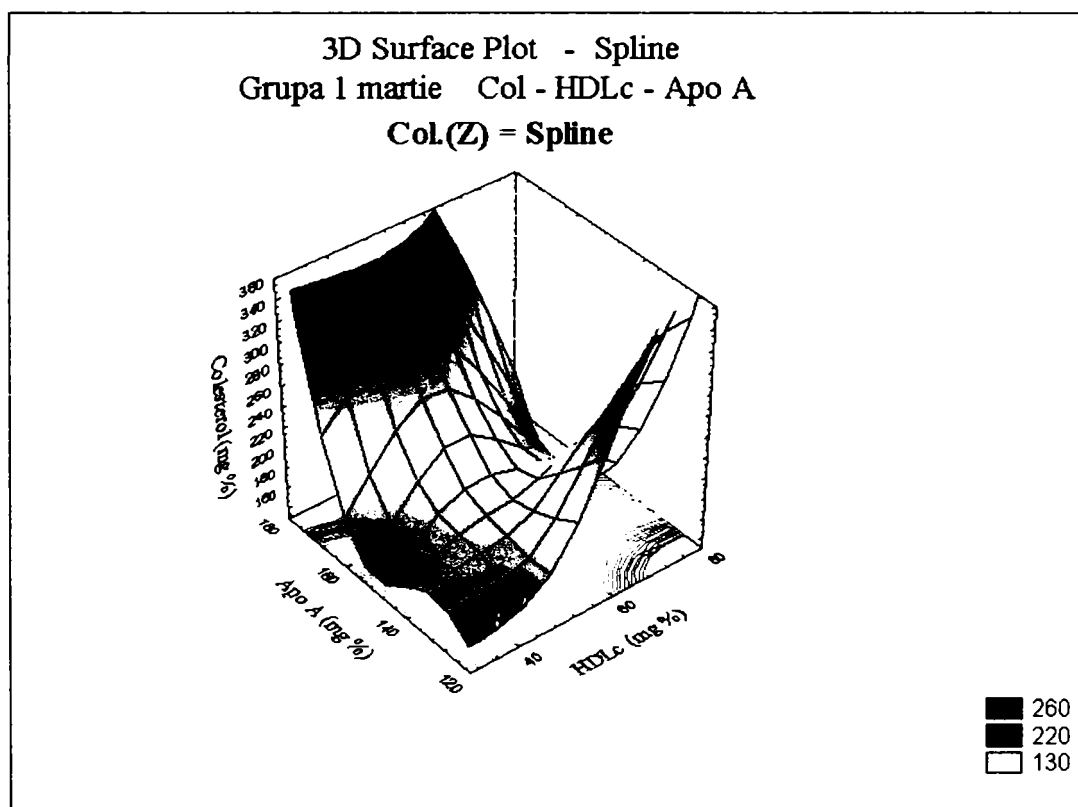


Fig. 6.10. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 1, martie) Quadratic surface areas



**Fig. 6.11. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 1, martie)
 Quadrat surface lines**



**Fig. 6.12. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 1, martie)
 varianta spline**

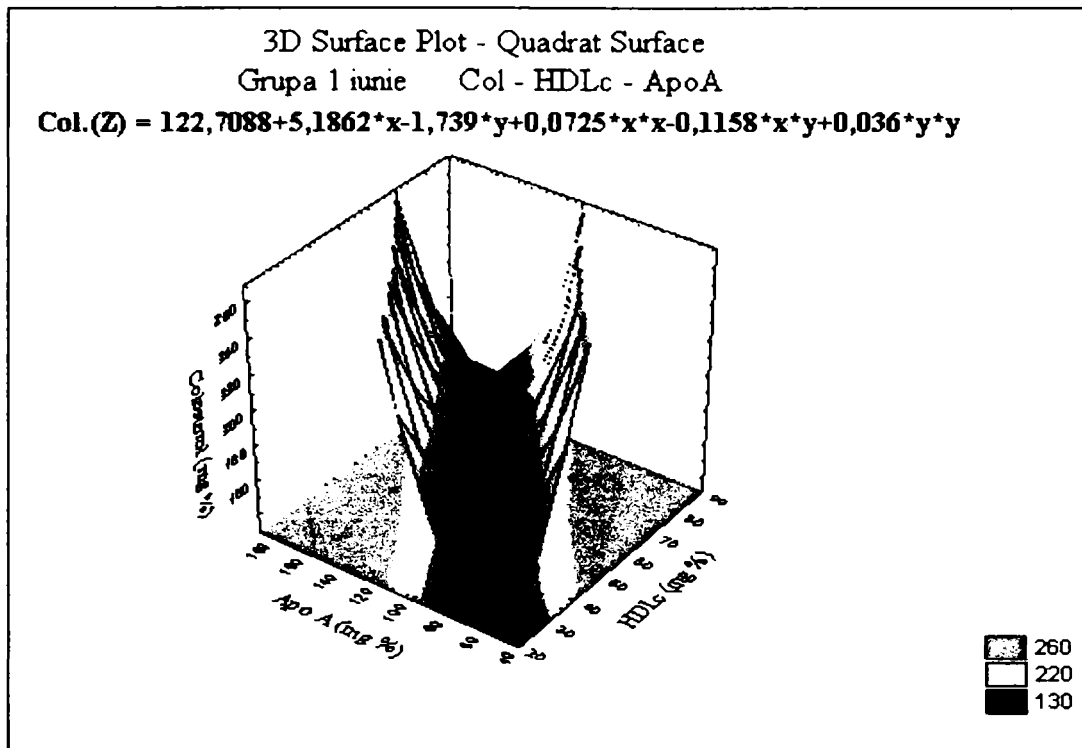


Fig. 6.13. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 1, iunie)
Quadrat surface areas

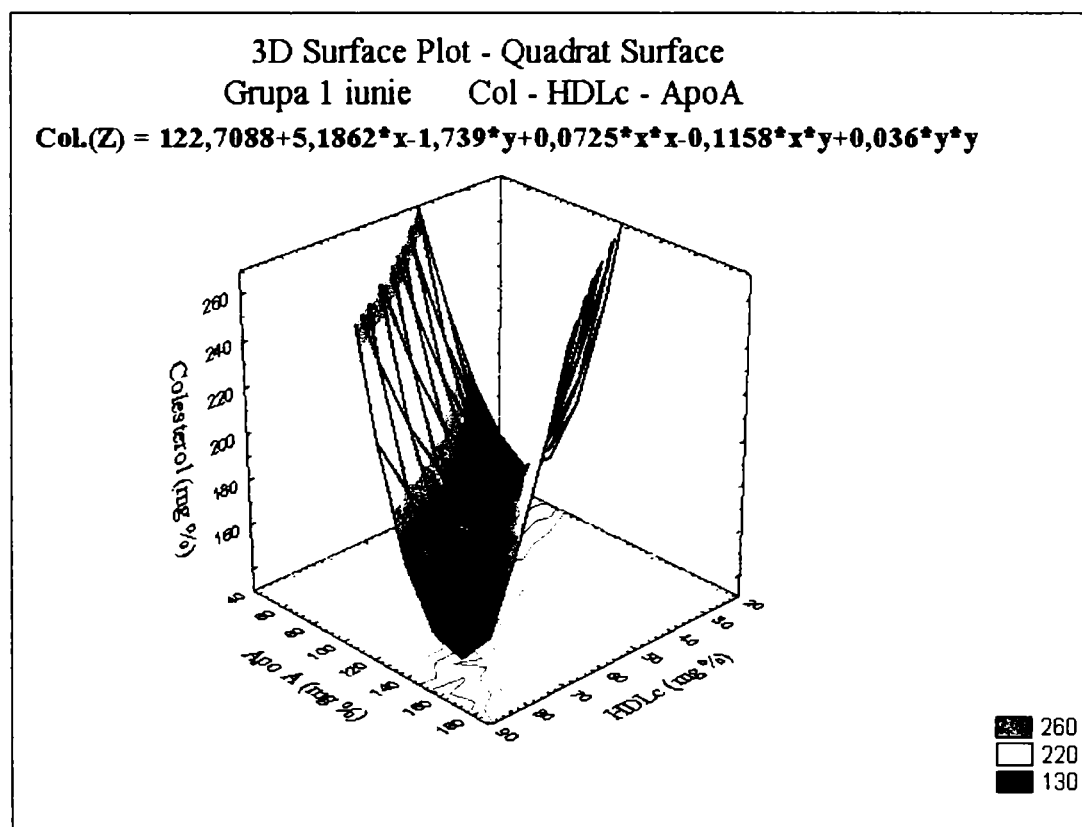


Fig. 6.14. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 1, iunie)
Quadrat surface lines

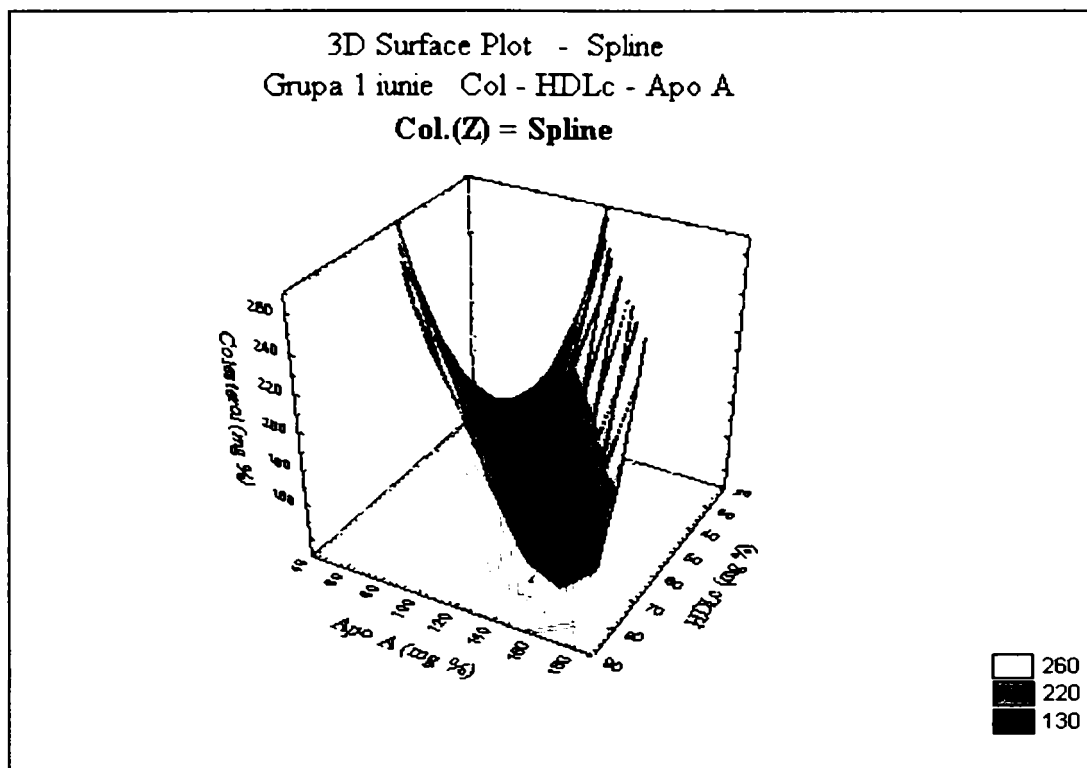


Fig. 6.15. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 1, iunie) varianta spline

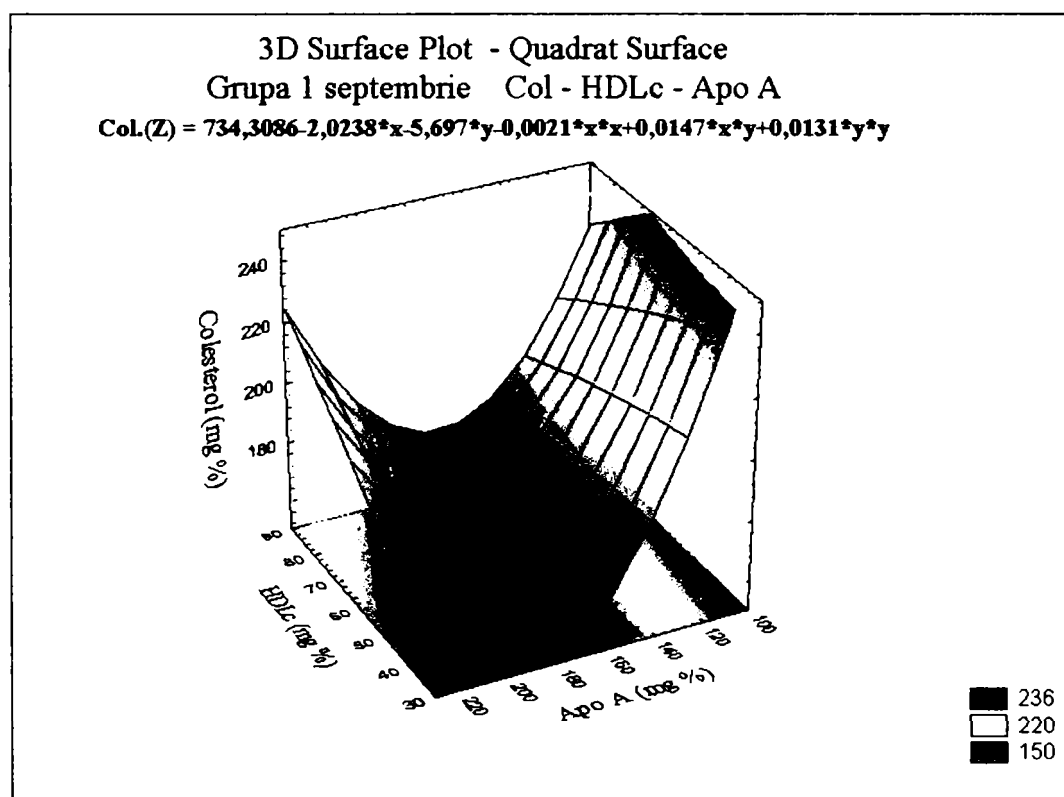
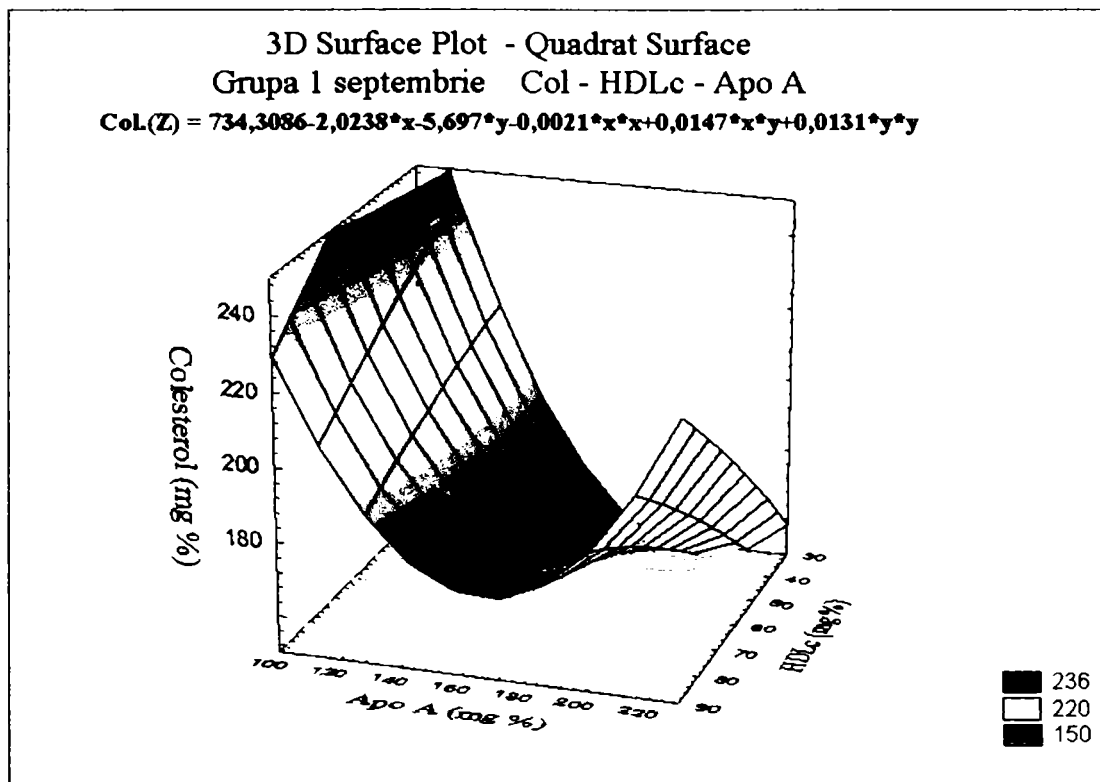
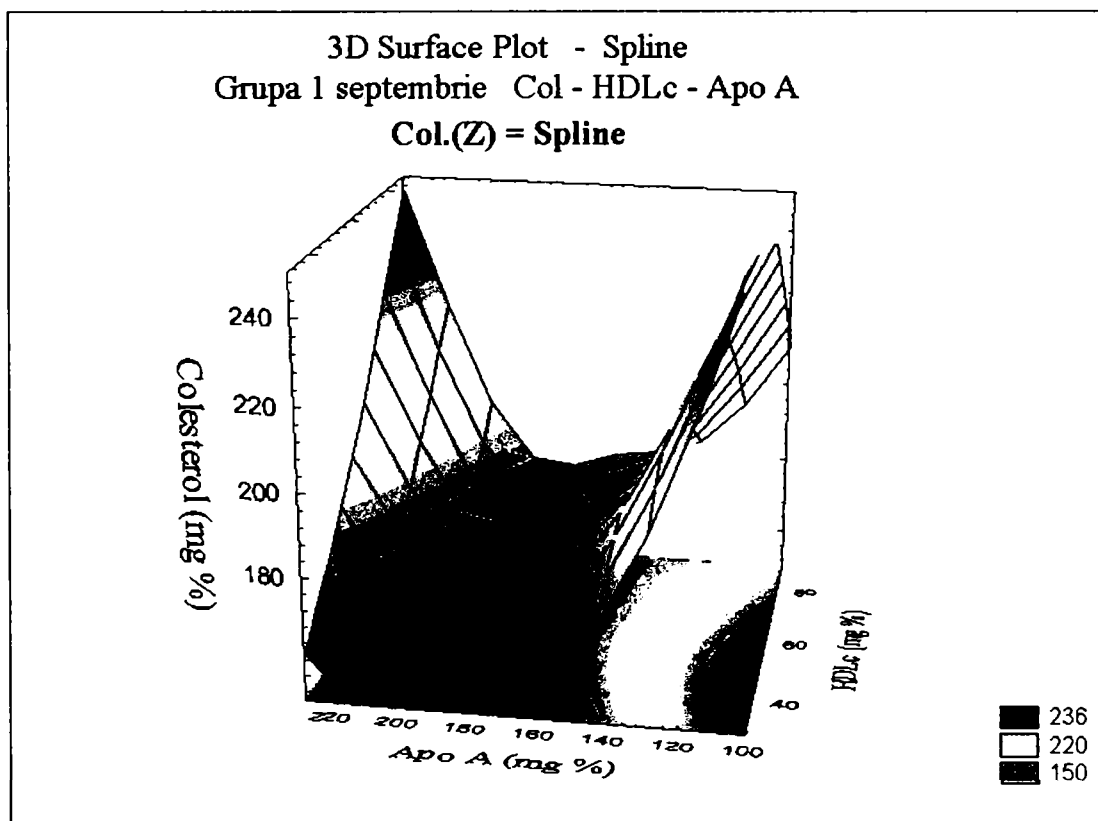


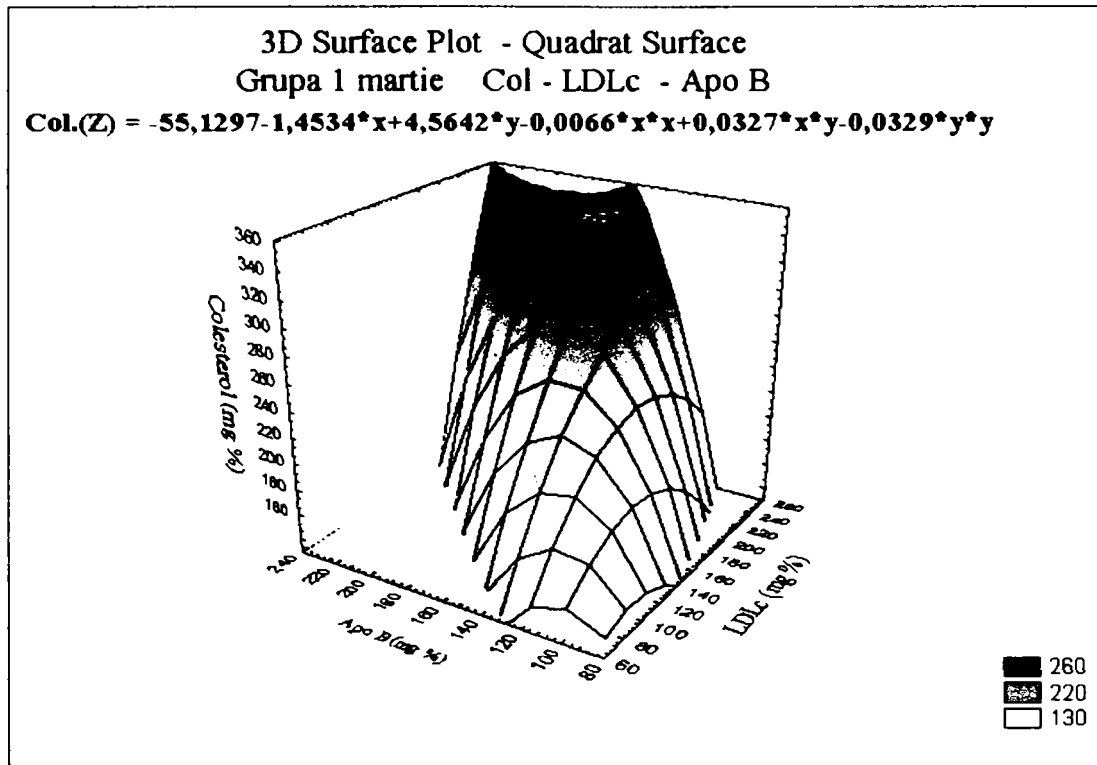
Fig. 6.16. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 1, septembrie) Quadrat surface areas



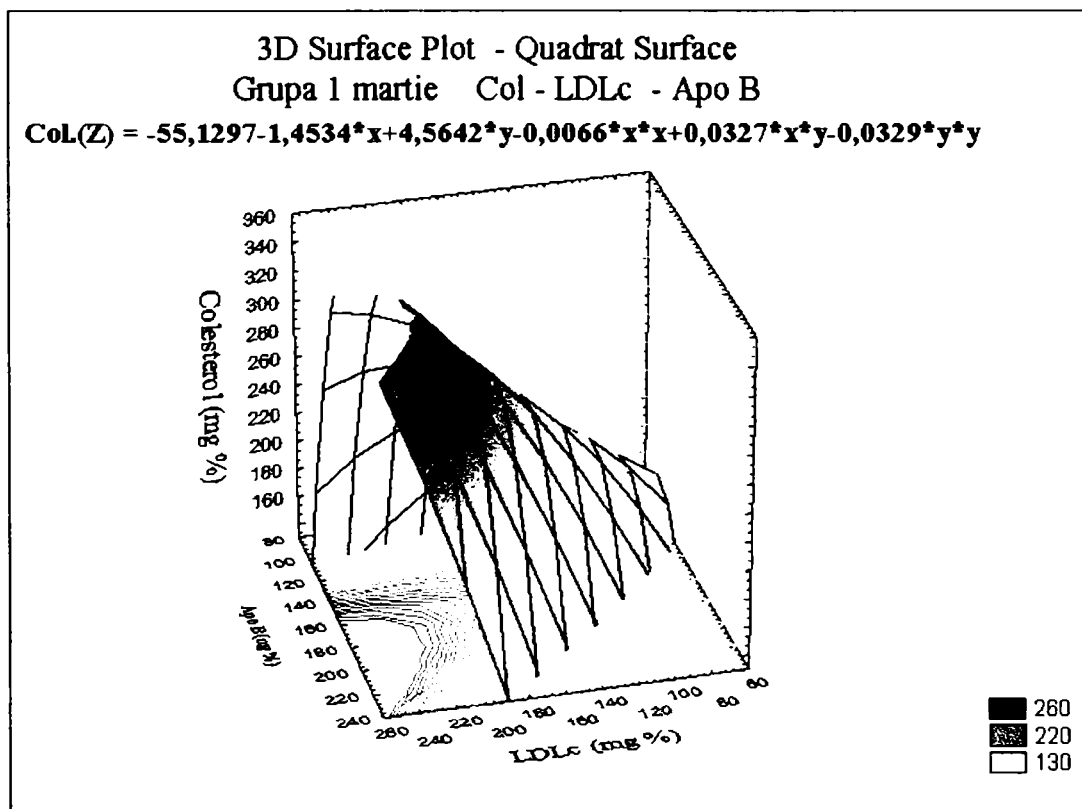
**Fig. 6.17. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 1, septembrie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.18. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 1, septembrie)
 Varianta spline**



**Fig. 6.19. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 1, martie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.20. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 1, martie)
 Quadratic surface lines**

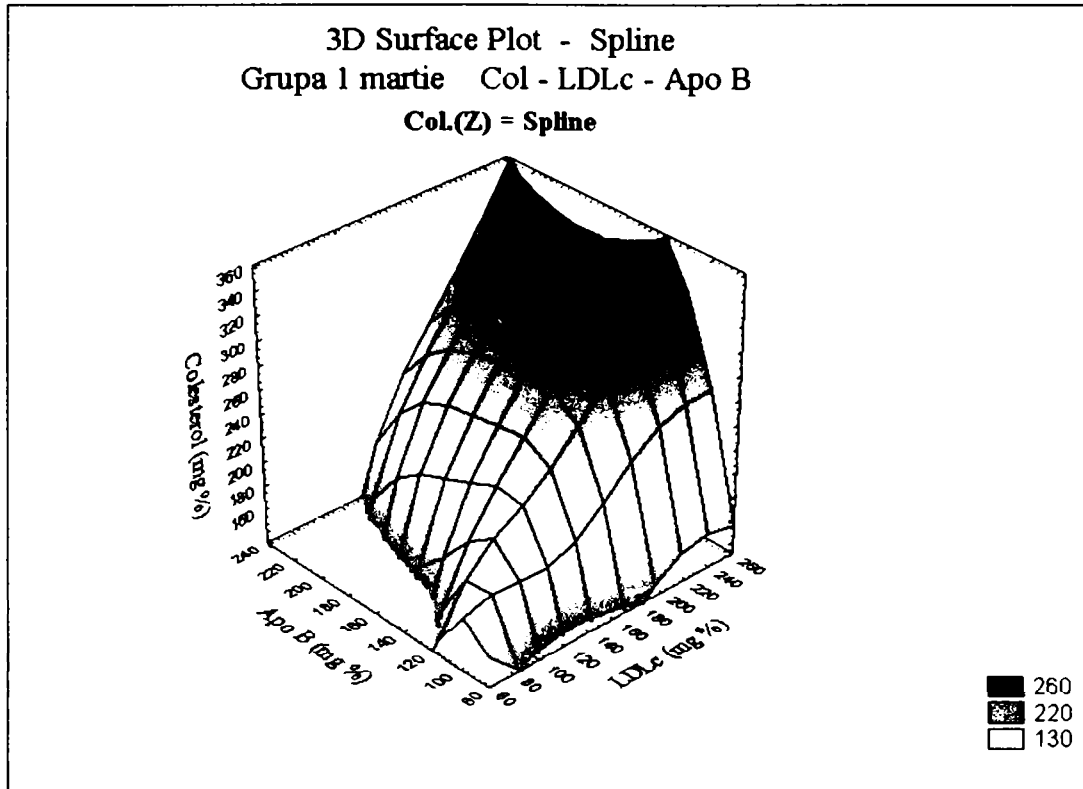


Fig. 6.21. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 1, martie) varianta spline

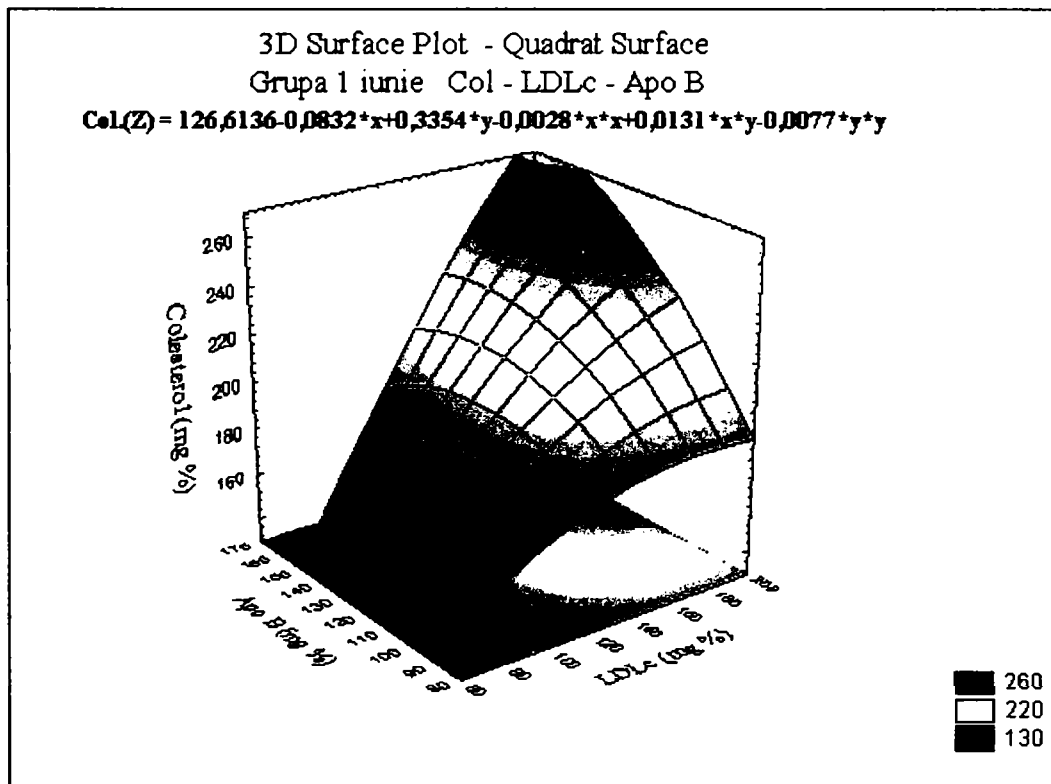
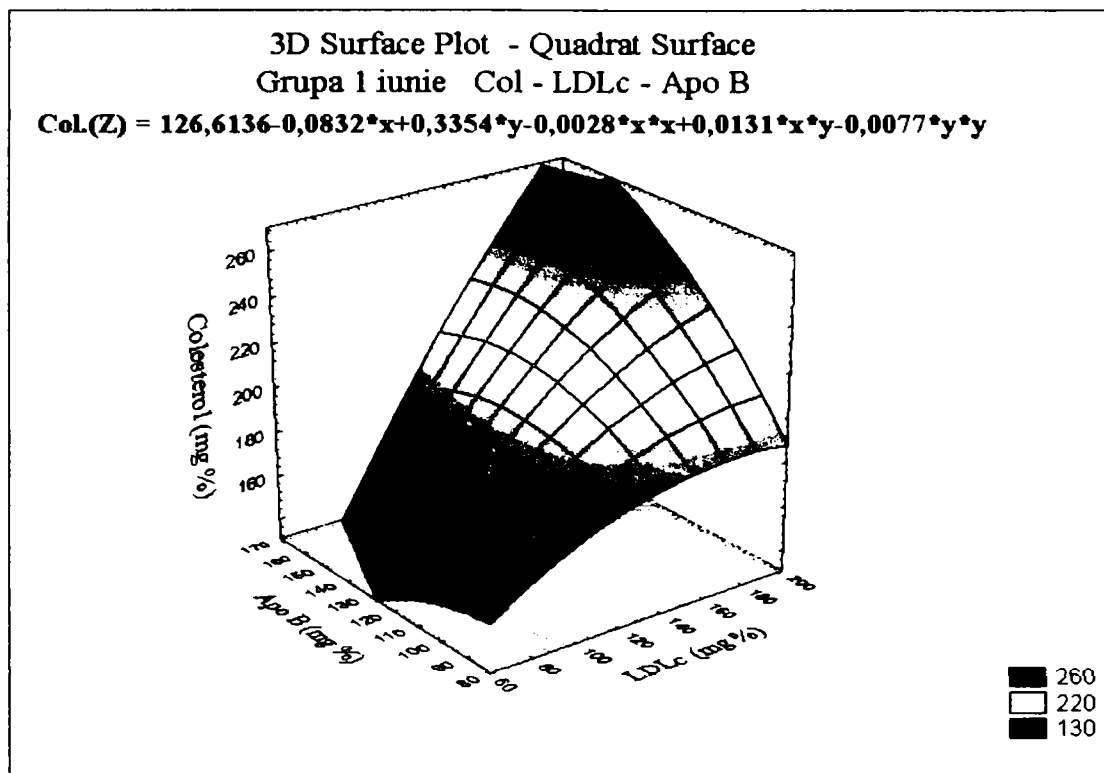
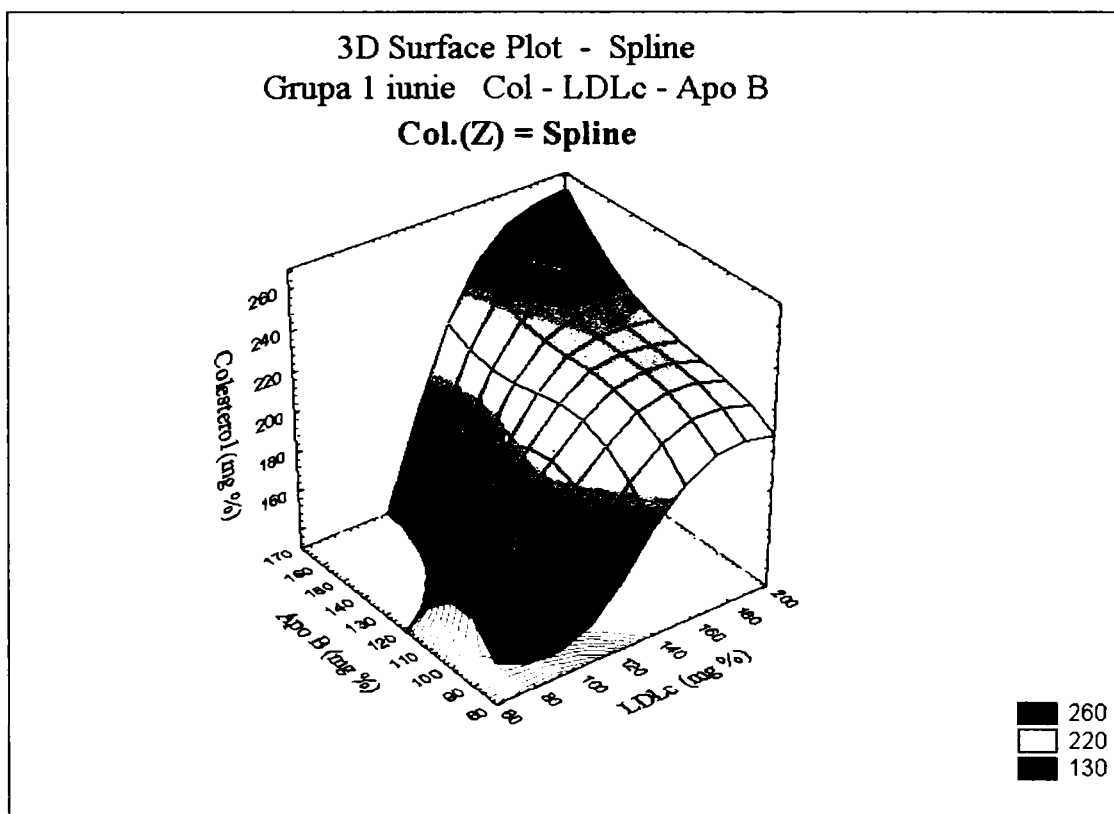


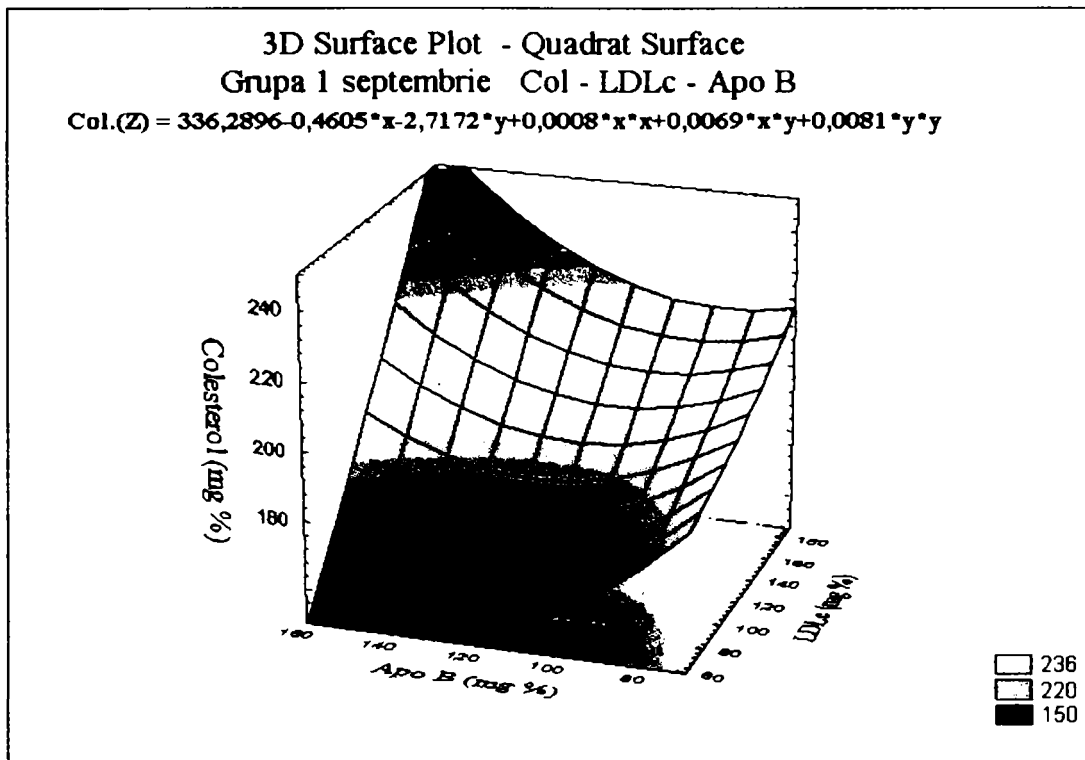
Fig. 6.22. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 1, iunie) Quadratic surface areas



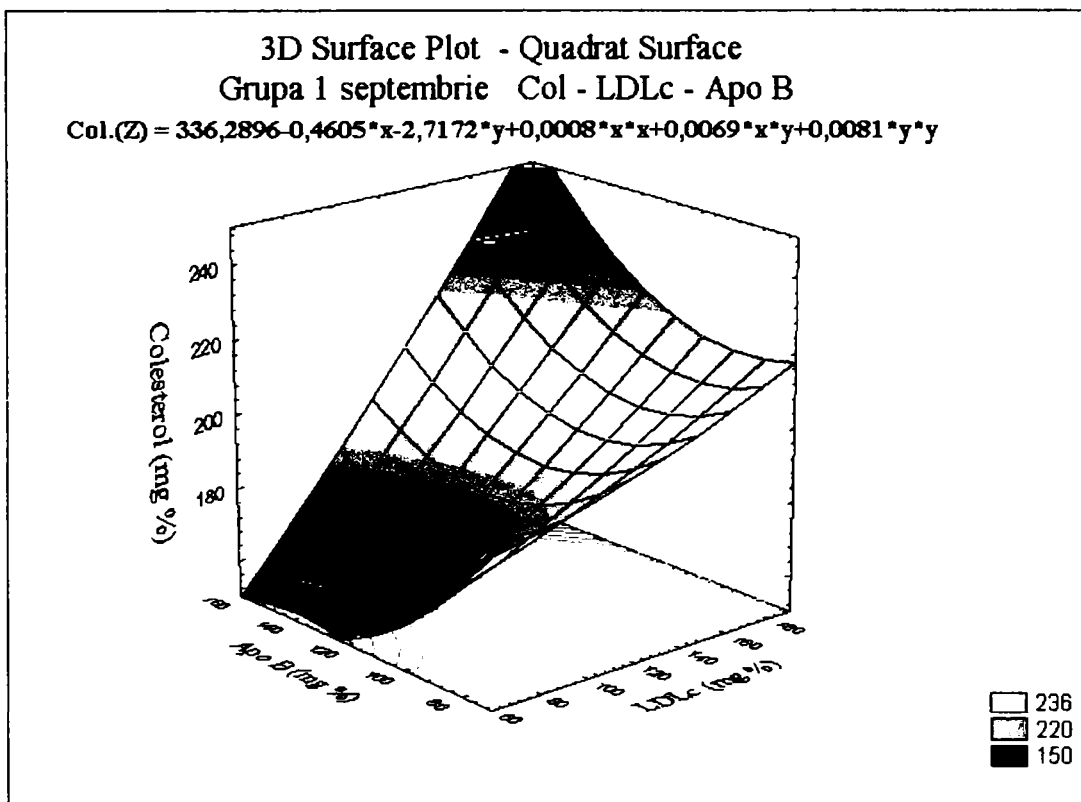
**Fig. 6.23. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 1, iunie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.24. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 1, iunie)
 varianta spline**



**Fig. 6.25. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 1, septembrie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.26. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 1, septembrie)
 Quadratic surface lines**

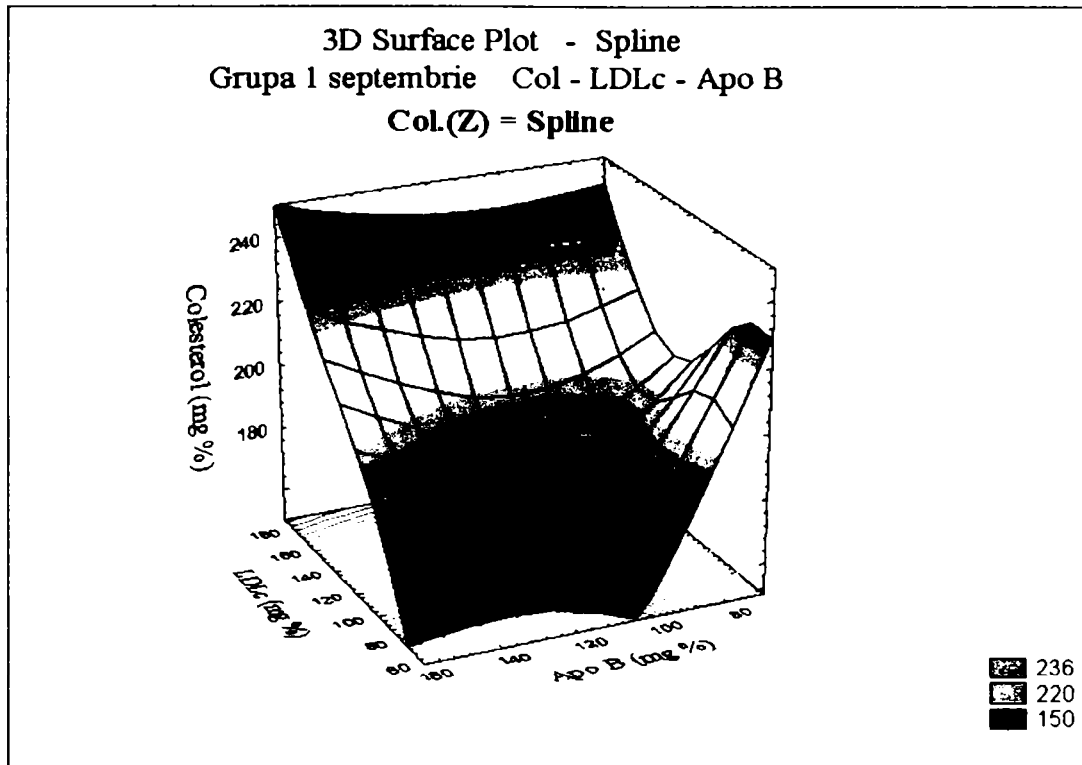


Fig. 6.27. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 1, septembrie) varianta spline

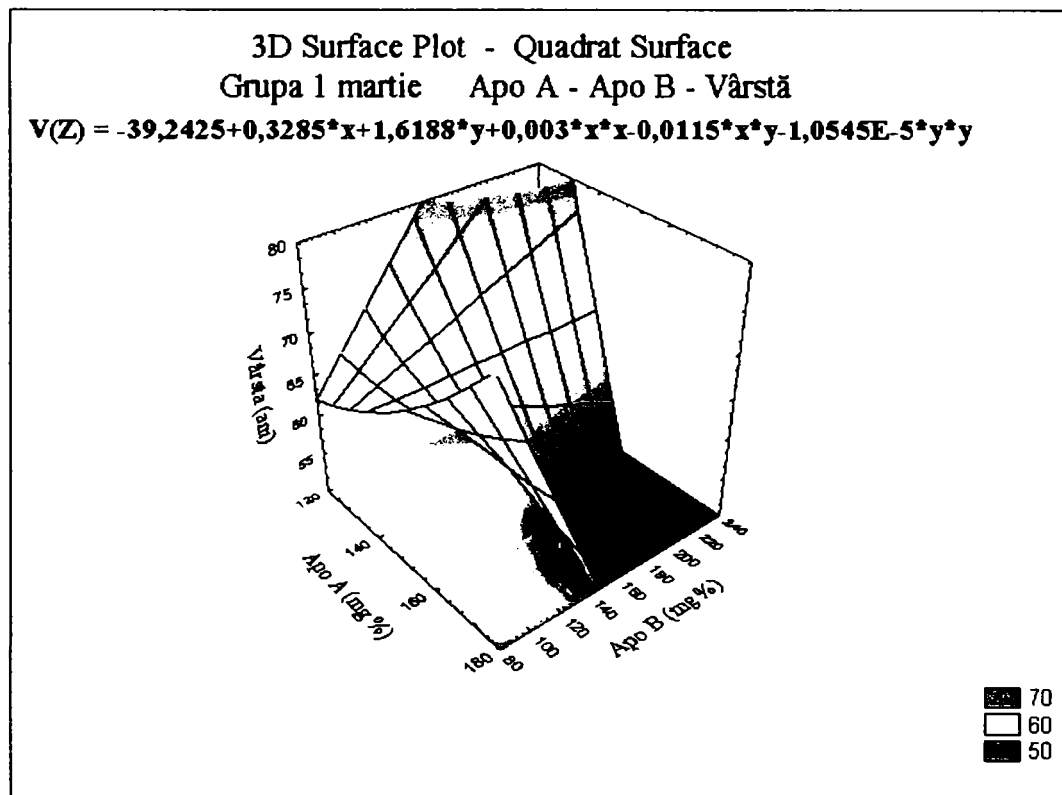
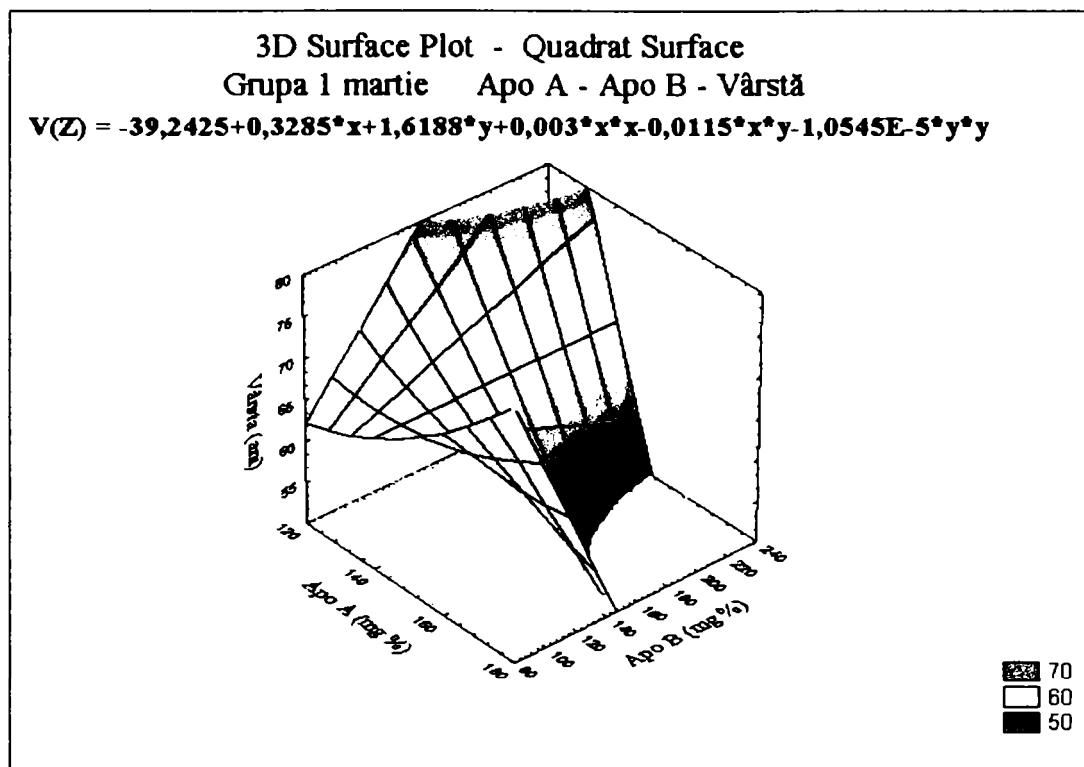
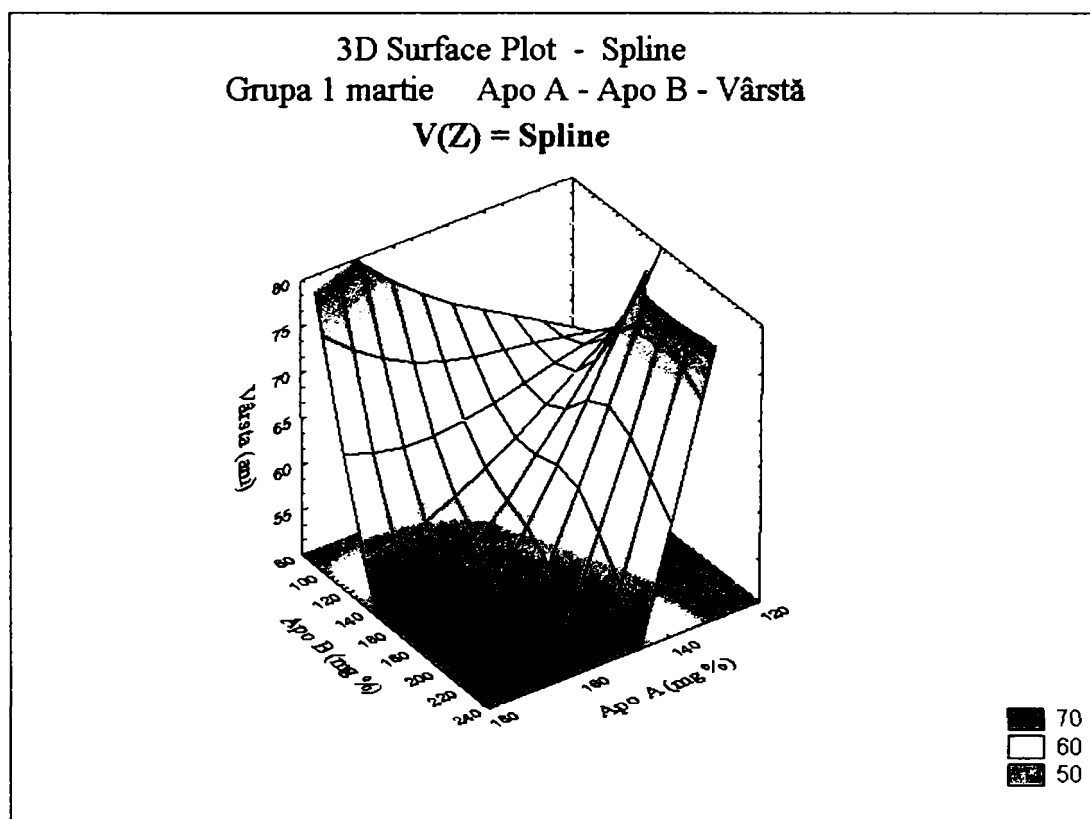


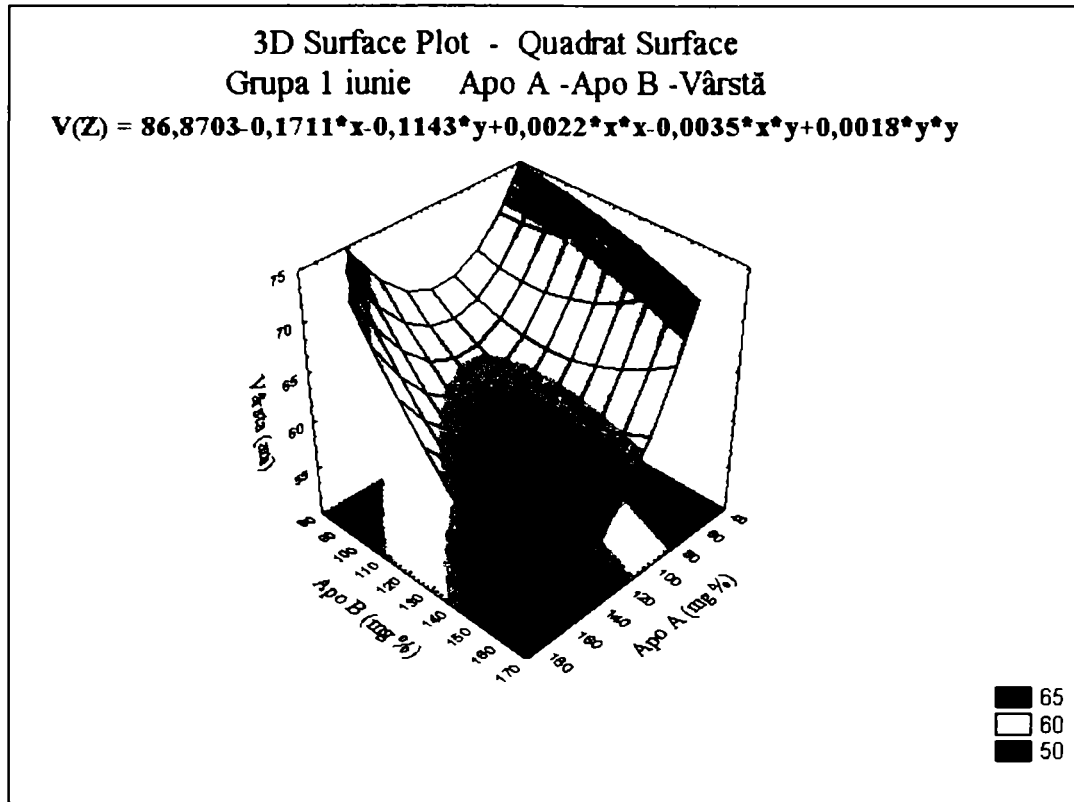
Fig. 6.28. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 1, martie) Quadrat surface areas



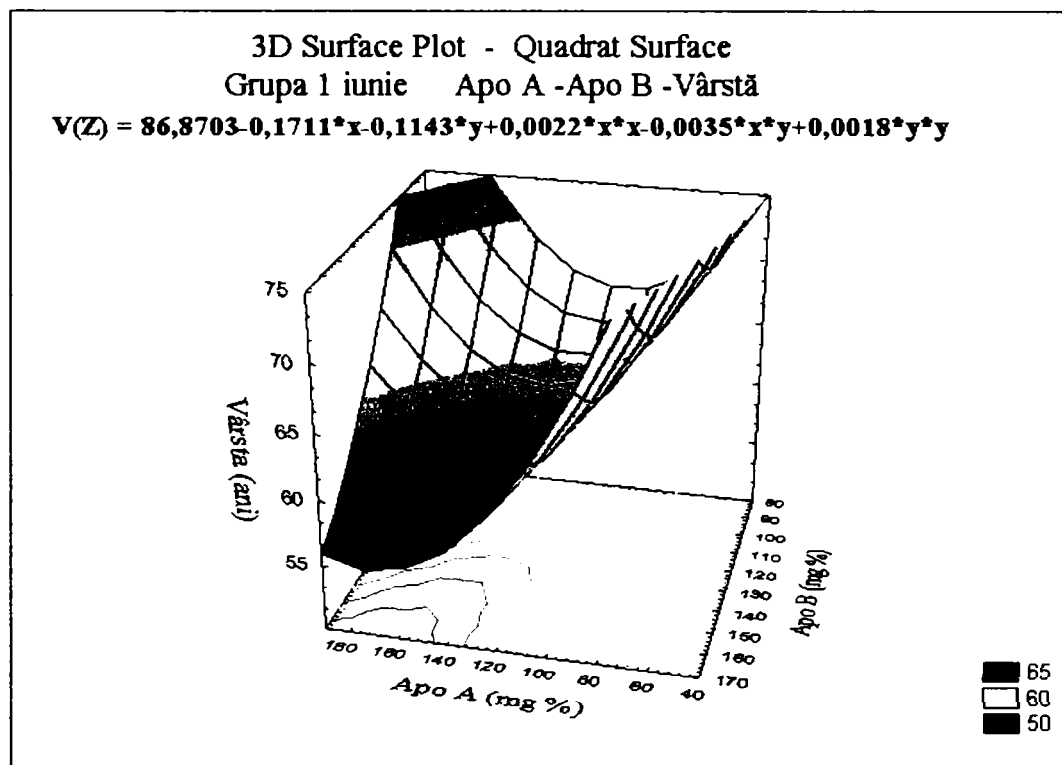
**Fig. 6.29. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 1, martie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.30. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 1, martie)
 varianta spline**



**Fig. 6.31. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 1, iunie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.32. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 1, iunie)
 Quadratic surface lines**

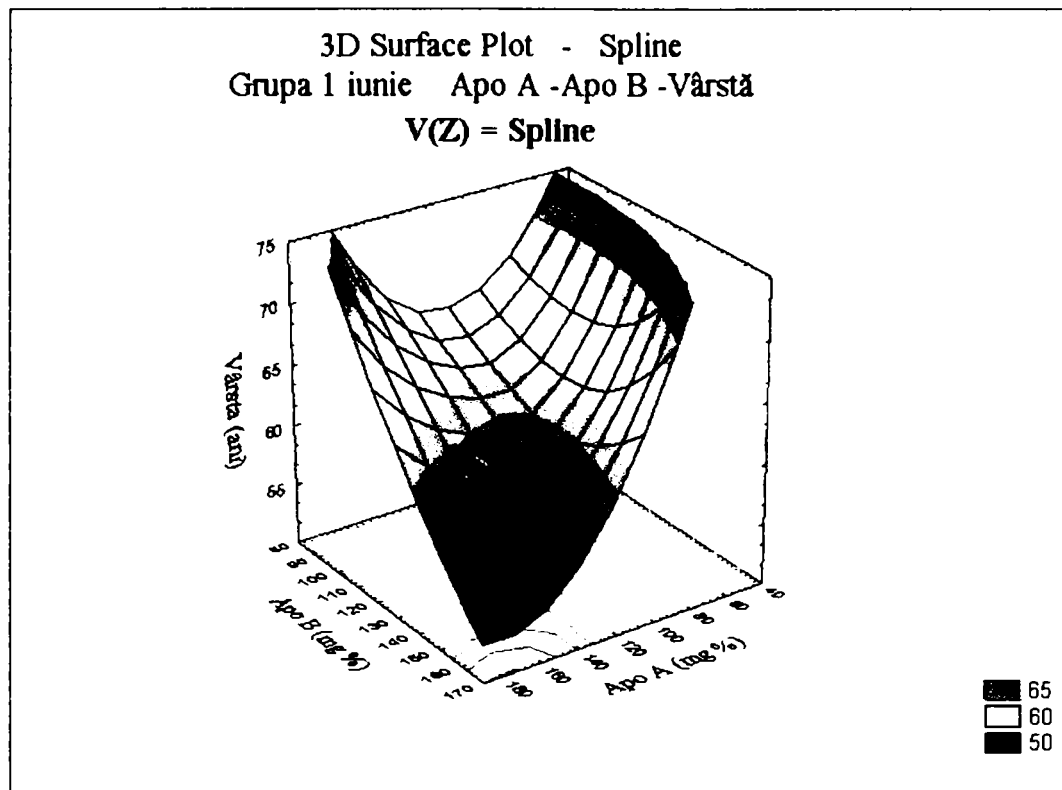


Fig. 6.33. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 1, iunie) varianta spline

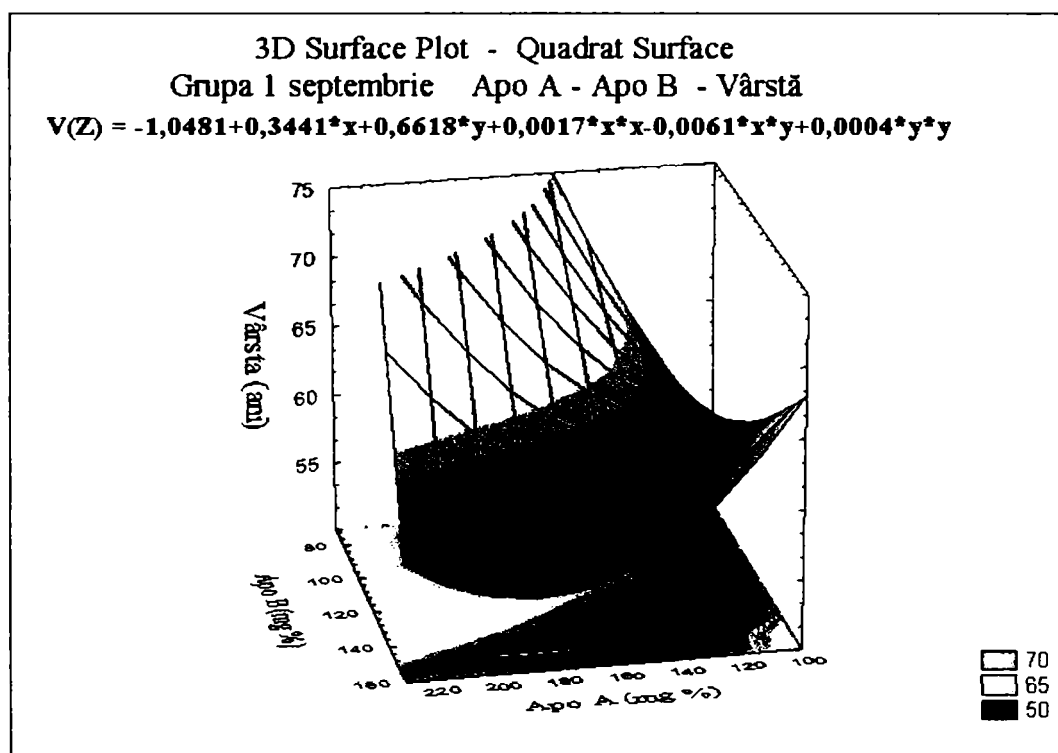
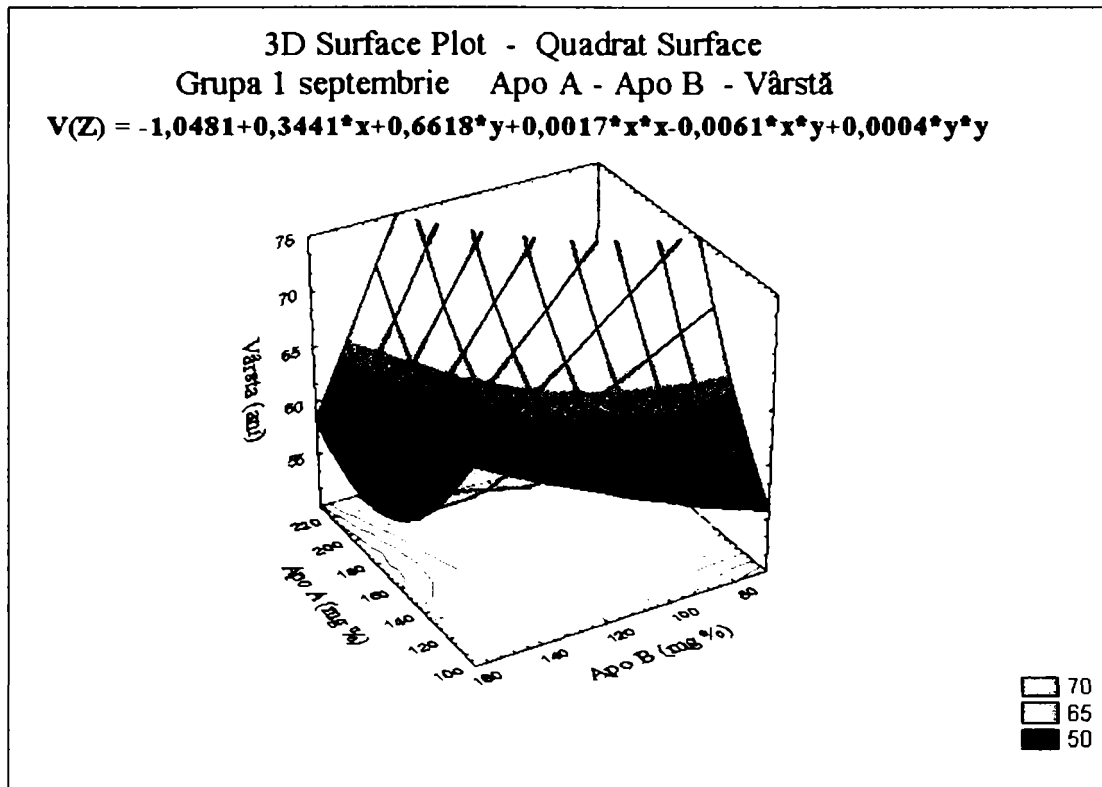
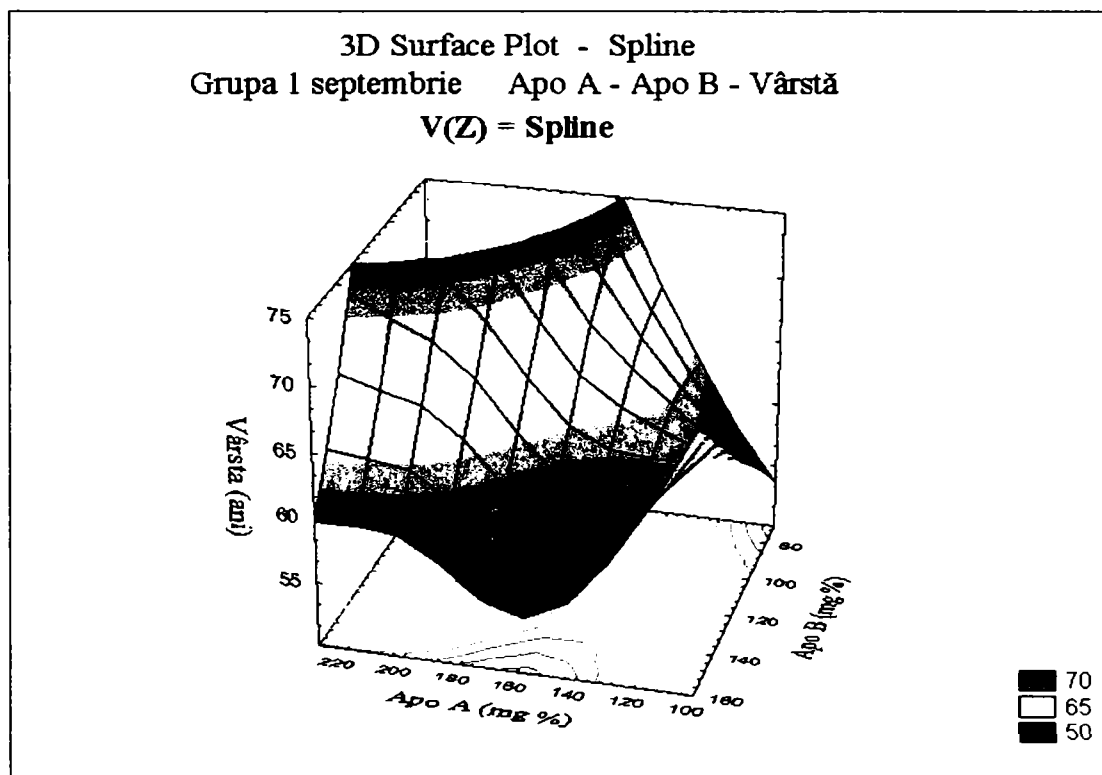


Fig. 6.34. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 1, septembrie) Quadrat surface areas



**Fig. 6.35. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 1, septembrie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.36. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 1, septembrie)
 varianta spline**

În urma analizei valorilor fracțiilor lipidelor plasmatice (Fig. 6.1-fig. 6.36), se constată la subiecții cu hipertensiune arterială - cu vârsta între 55 – 75 ani, cu o medie de 65 de ani - pentru prima determinare (martie), valori HDLc scăzute la 4 subiecți (26,66%), 3 femei și 1 bărbat. Dintre acești subiecți, 3 subiecți prezentau cardiopatie ischemică asociată cu hipertensiune arterială. Valorile LDLc au fost crescute la acești 4 subiecți, iar pentru determinarea a doua (iunie) doar un subiect (6,66%) a prezentat HDLc scăzut. La cea de-a treia determinare (septembrie), 3 subiecți (20%) au rămas cu valori scăzute ale HDLc și valori crescute ale LDLc, toți subiecții fiind de sex feminin. De subliniat că două dintre femei aveau vârsta de 55 ani, respectiv 58 ani, și erau la climax chirurgical de la vârsta de 38, respectiv 40 de ani, ceea ce explică importanța lipsei protecției hormonale în apariția aterosclerozei. Determinarea apo A și apo B a arătat valori puțin modificate comparativ cu cele ale fracțiilor colesterolului.

Se constată că la majoritatea subiecților cu hipertensiune arterială se găsesc valori puțin modificate față de cele normale, deși vârsta subiecților este destul de ridicată, atât la cei de sex masculin, cât și la cei de sex feminin. Acest lucru sugerează faptul că hipertensiunea arterială are mecanisme patogenetice proprii, unele dintre ele prezente și în determinismul formelor clinice de ateroscleroză, dar fără ca să fie obligatorie modificarea profilului biochimic a fracțiunilor lipidice, așa cum le întâlnim în ateroscleroză. Trebuie să subliniem că aceste modificări ale profilului biochimic al lipidelor plasmatice, care uneori nu se corelează cu afecțiunea subiectului, cu vârsta sau sexul subiecților, este influențată și de constanța acestora. Controlul valorilor tensionale, la lotul de subiecți cu hipertensiune arterială, face ca această suferință să nu mai aibă același impact negativ asupra evoluției acestor subiecți, această boală nemaiprezentând un factor de risc pentru apariția unei forme clinice de ateroscleroză.

Grupa 2 Cardiopatie ischemică

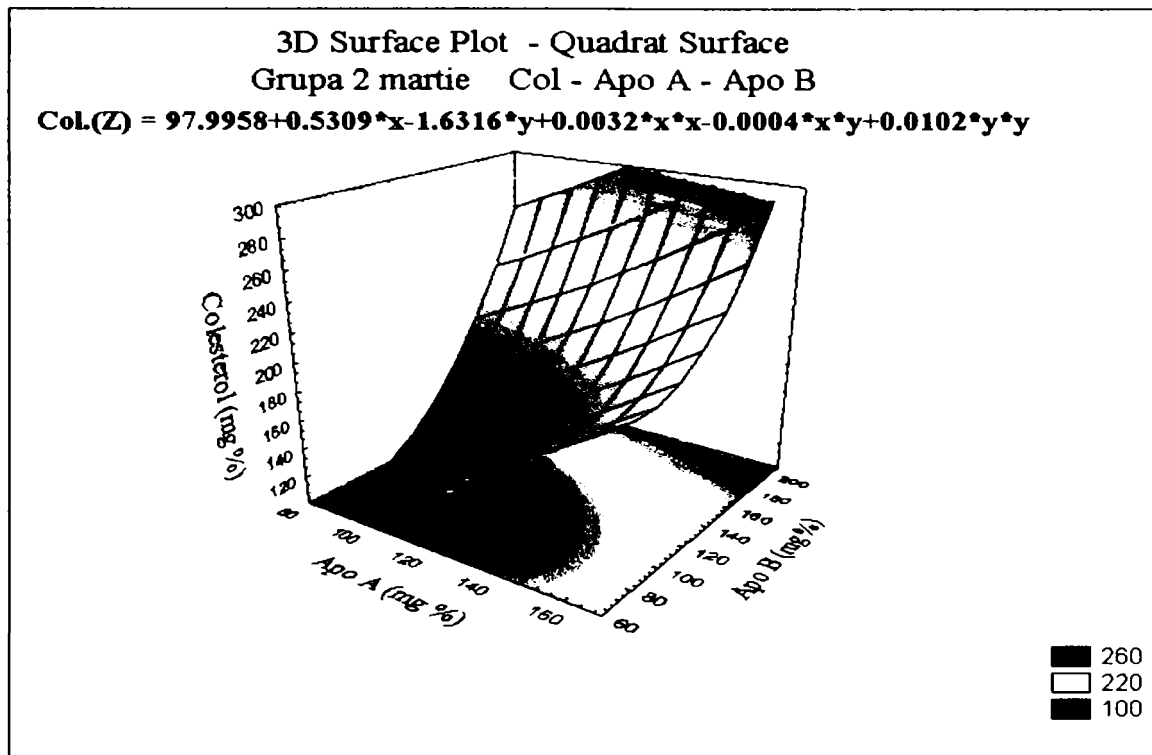


Fig. 6.37. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 2, martie)
 Quadratic surface areas

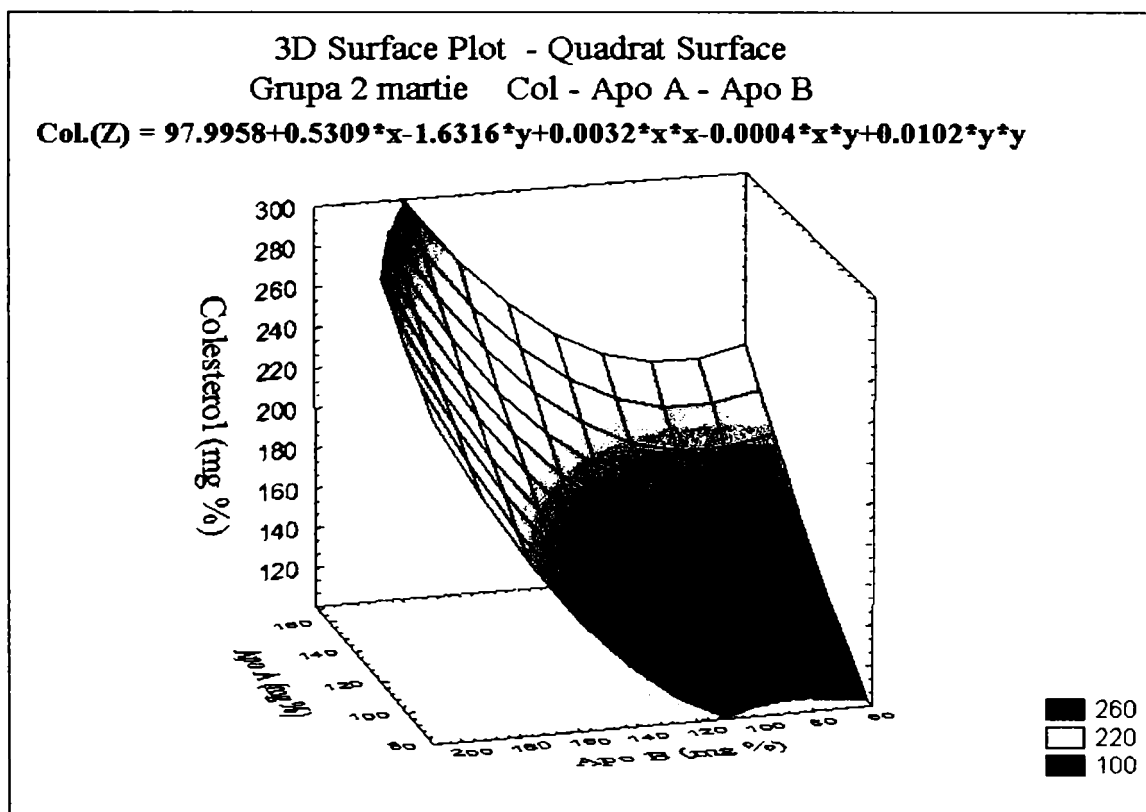


Fig. 6.38. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 2, martie)
 Quadratic surface lines

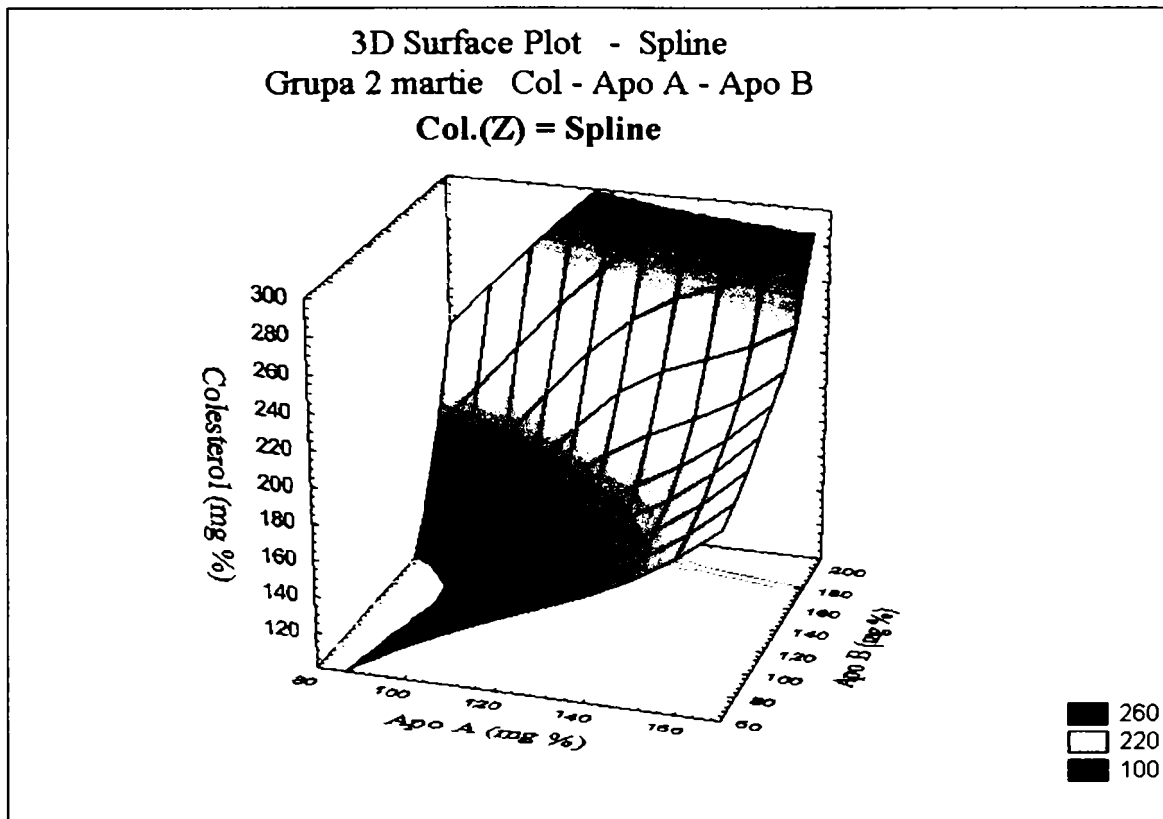


Fig. 6.39. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 2, martie) varianta - spline

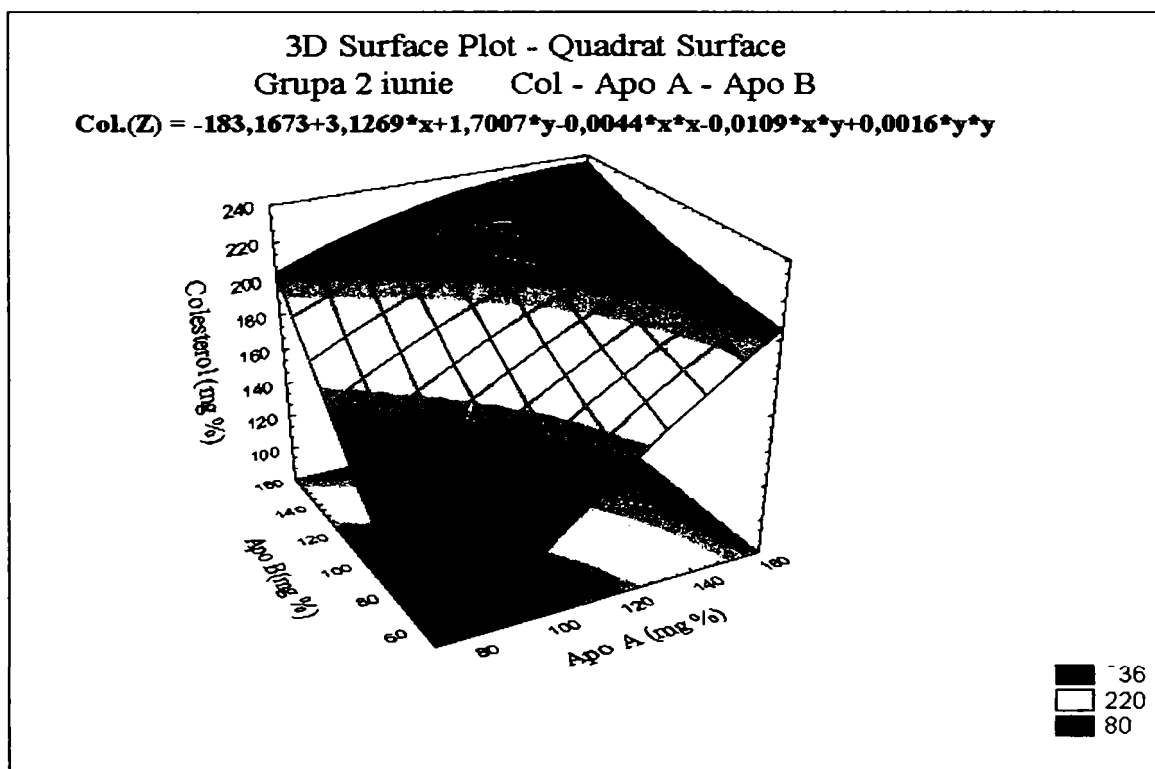
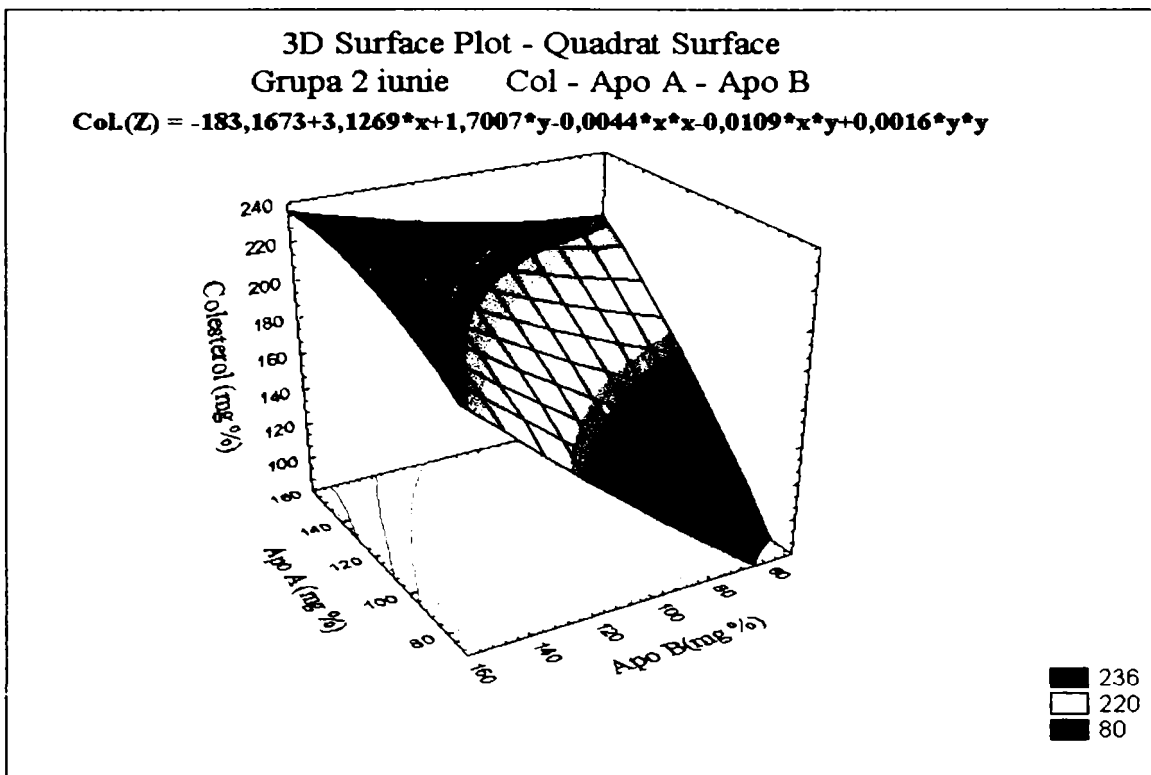
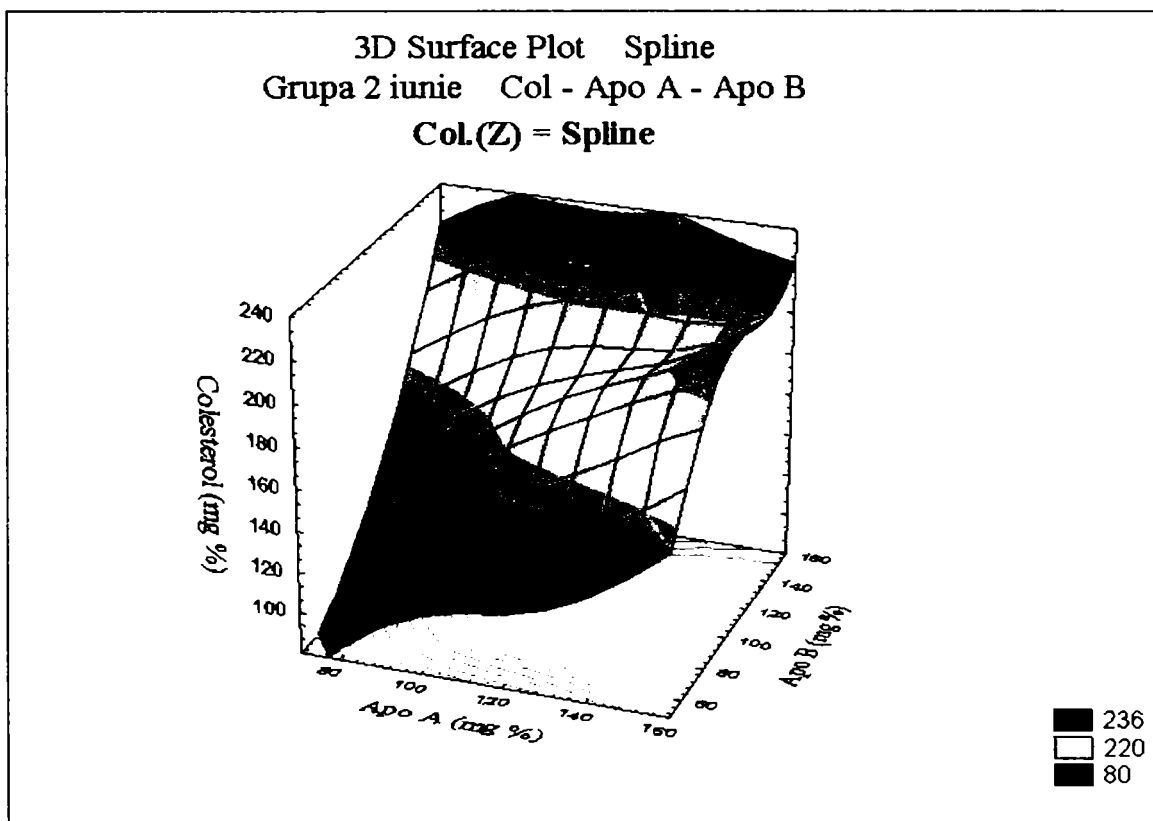


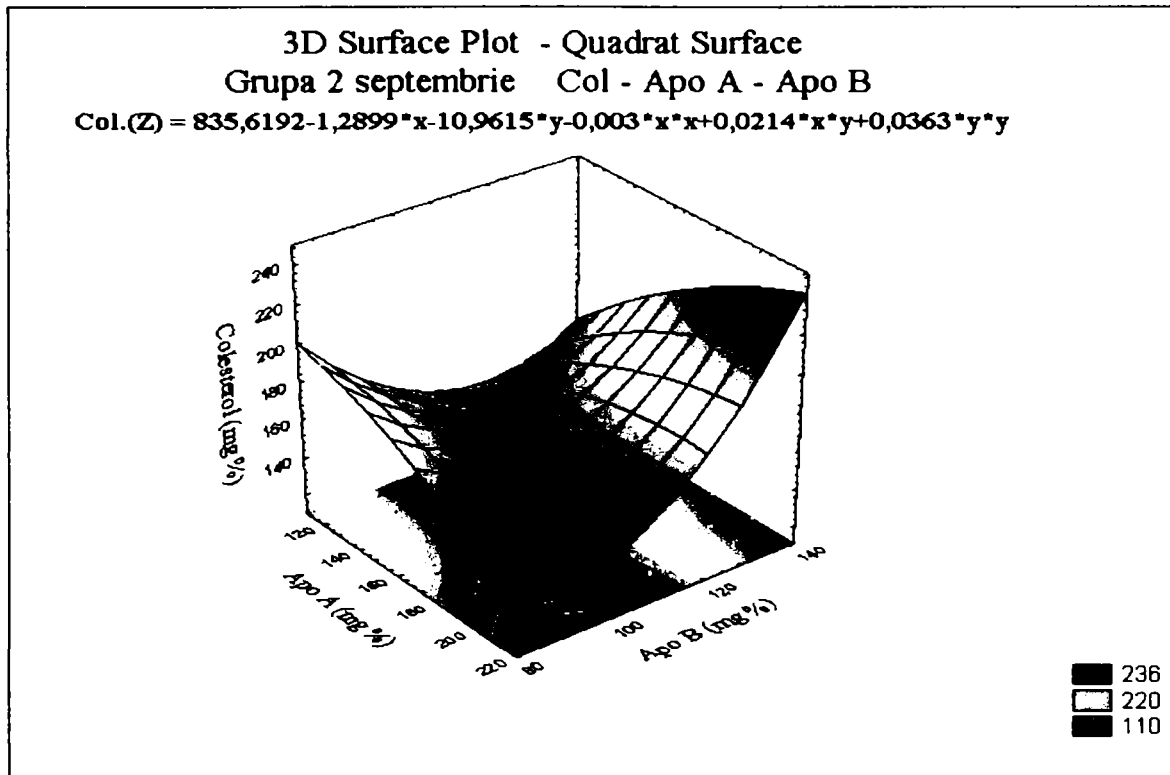
Fig. 6.40. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 2, iunie) Quadrat surface areas



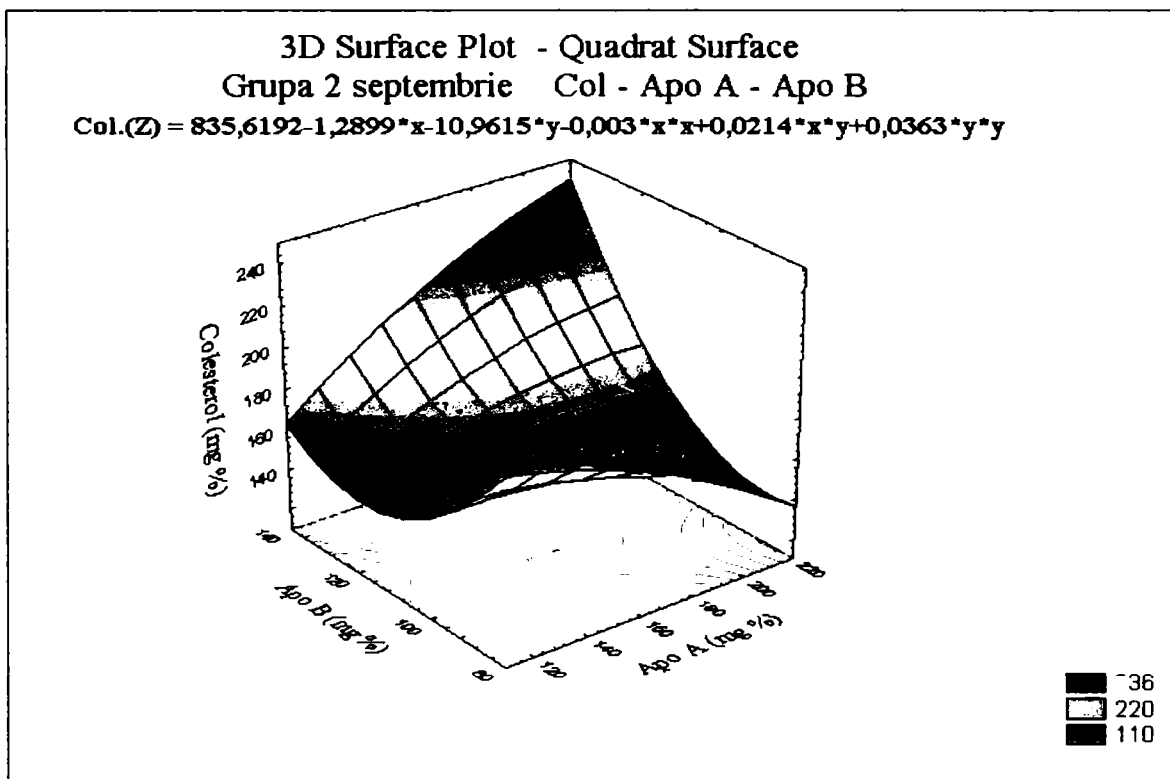
**Fig. 6.41. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 2, iunie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.42. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 2, iunie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.43. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 2, septembrie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.44. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 2, septembrie)
 Quadratic surface lines**

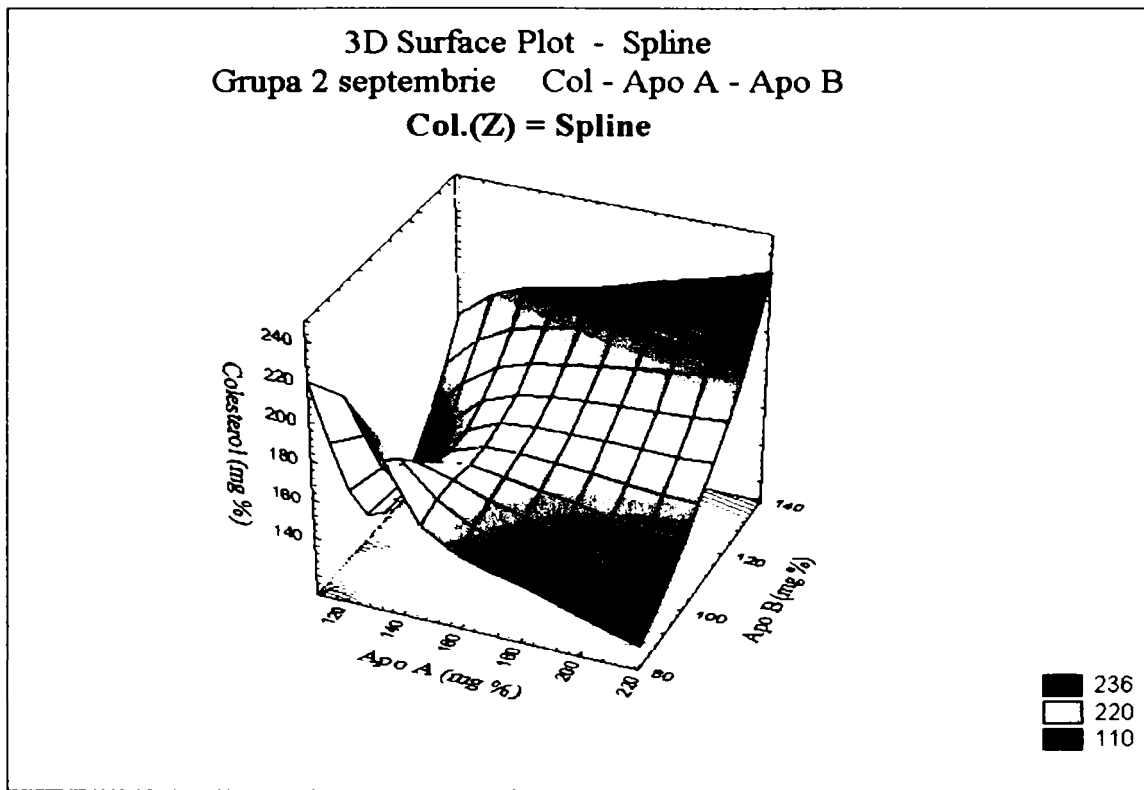


Fig. 6.45. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 2, septembrie) varianta – spline

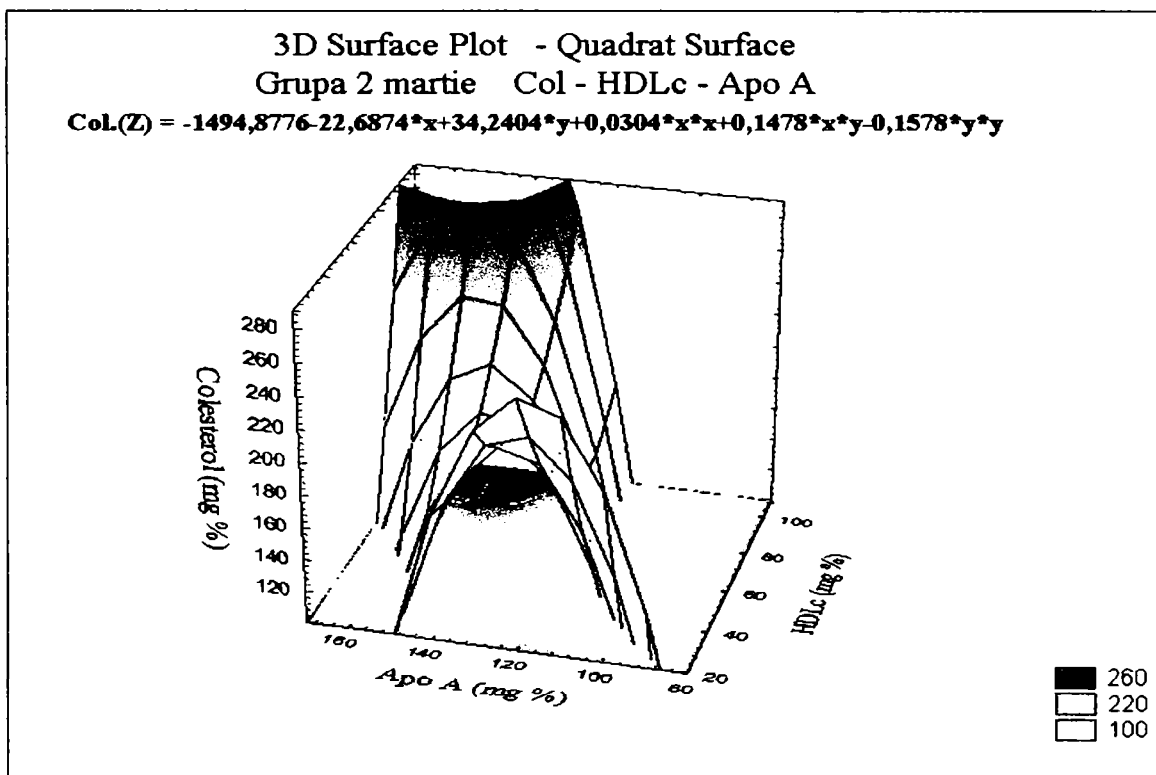
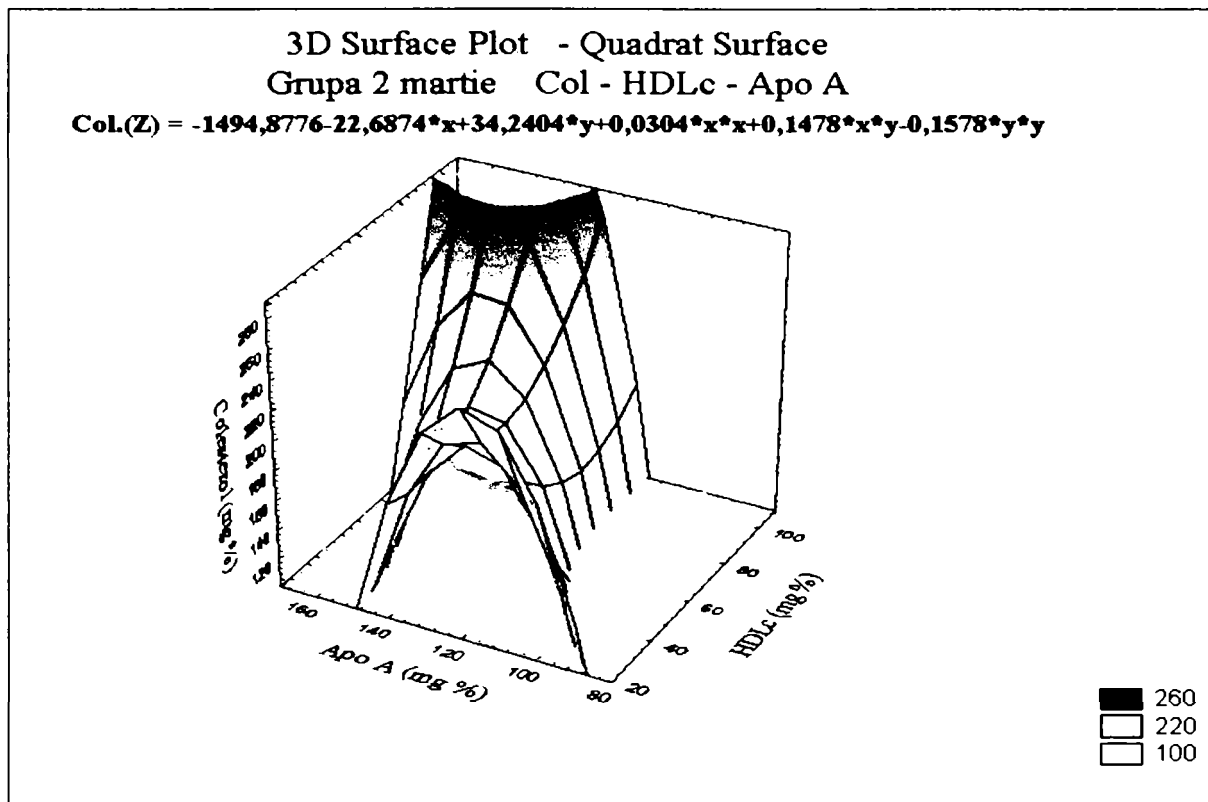
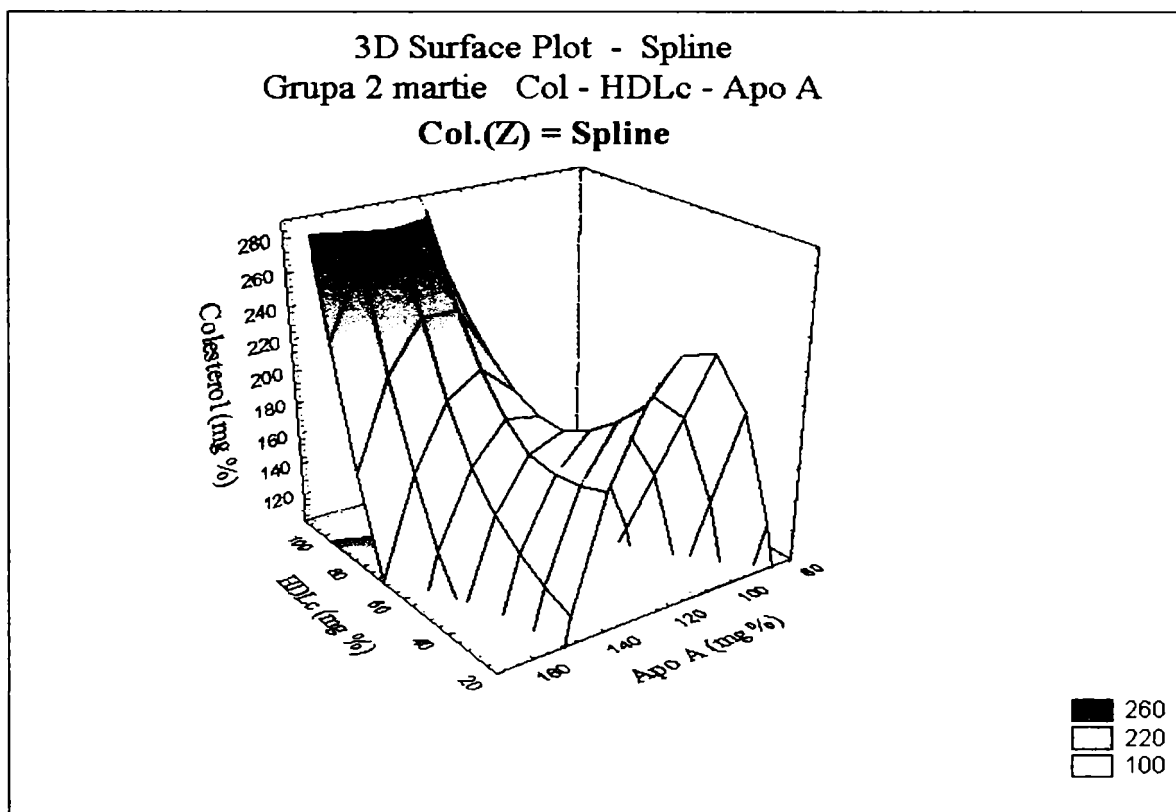


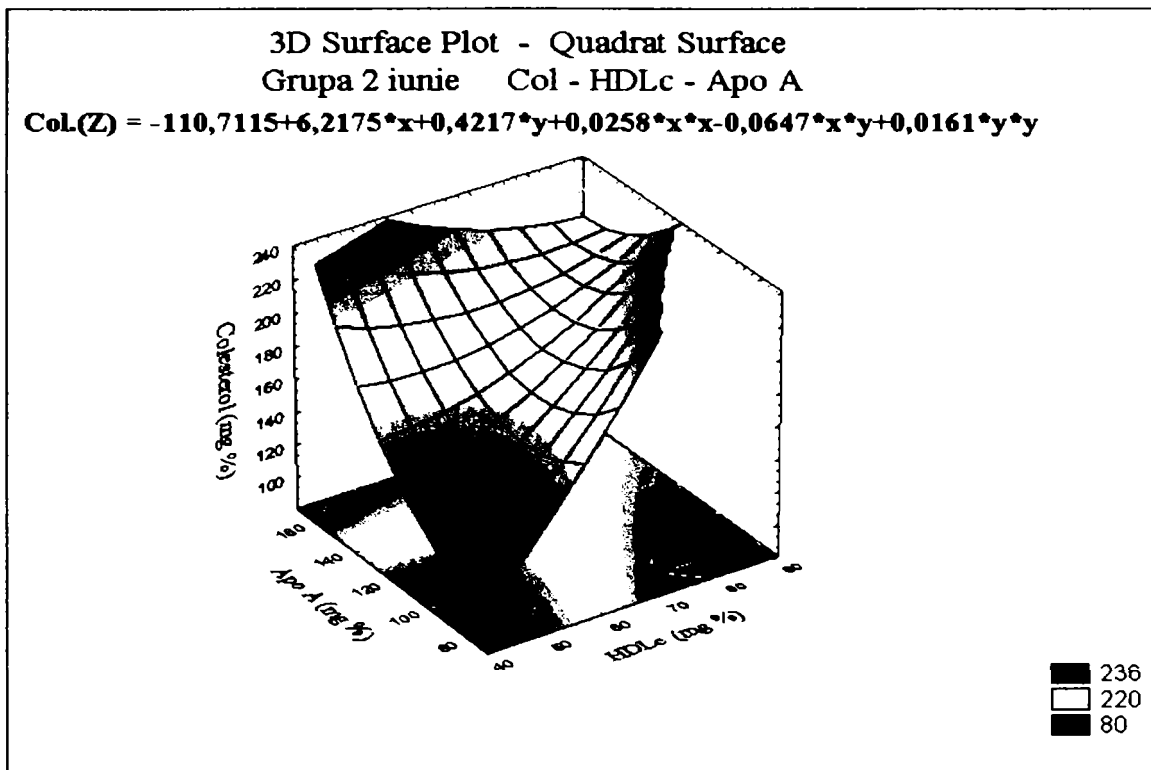
Fig. 6.46. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 2, martie) Quadrat surface areas



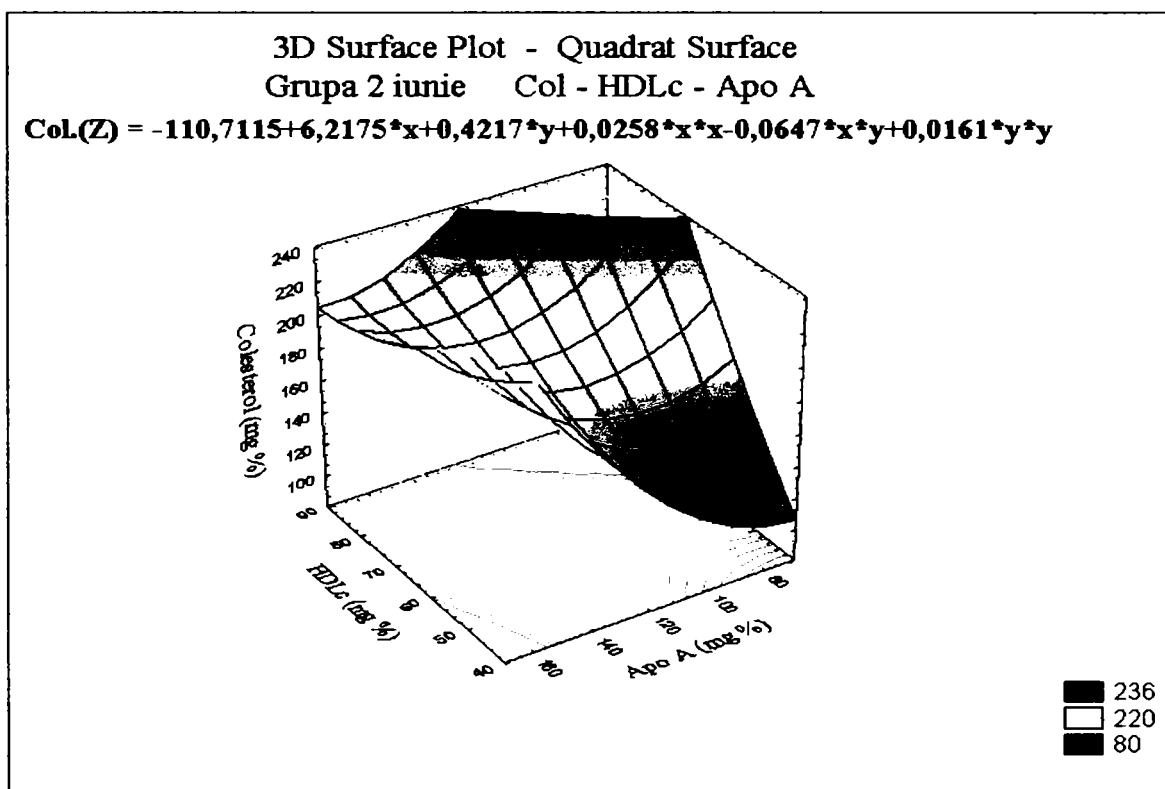
**Fig. 6.47. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 2, martie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.48. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 2, martie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.49. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 2, iunie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.50. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 2, iunie)
 Quadratic surface lines**

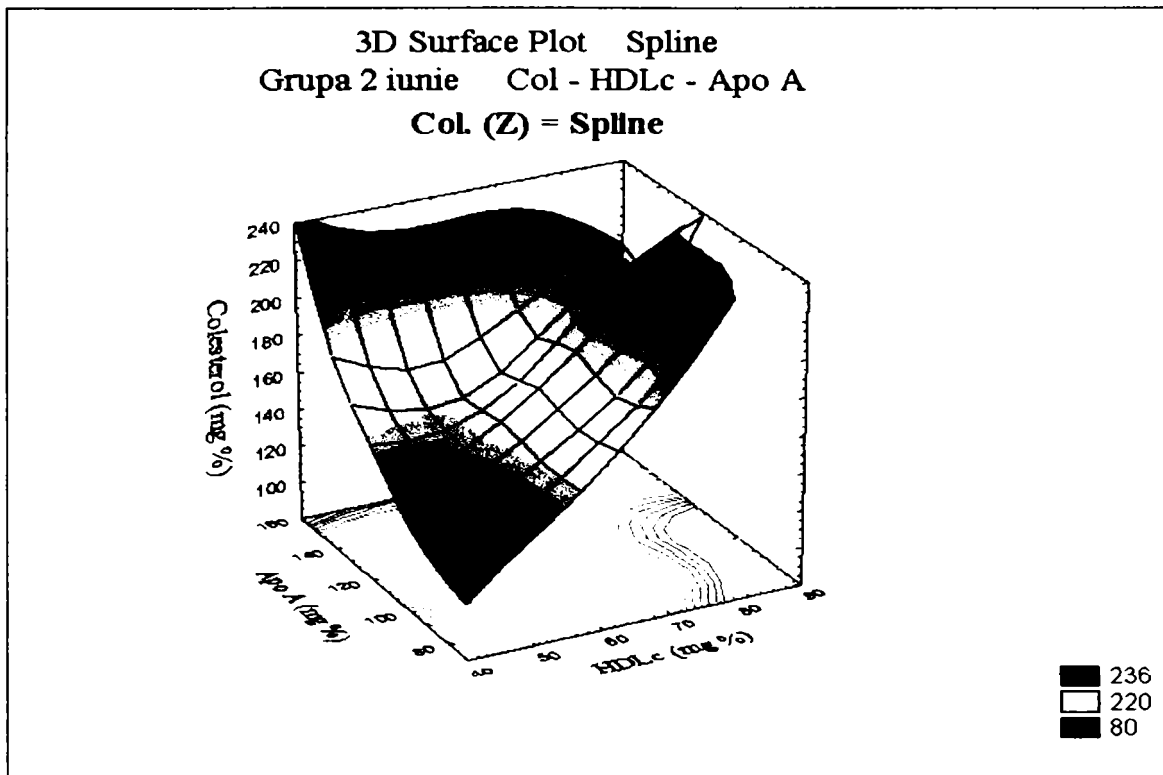


Fig. 6.51. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 2, iunie) varianta – spline

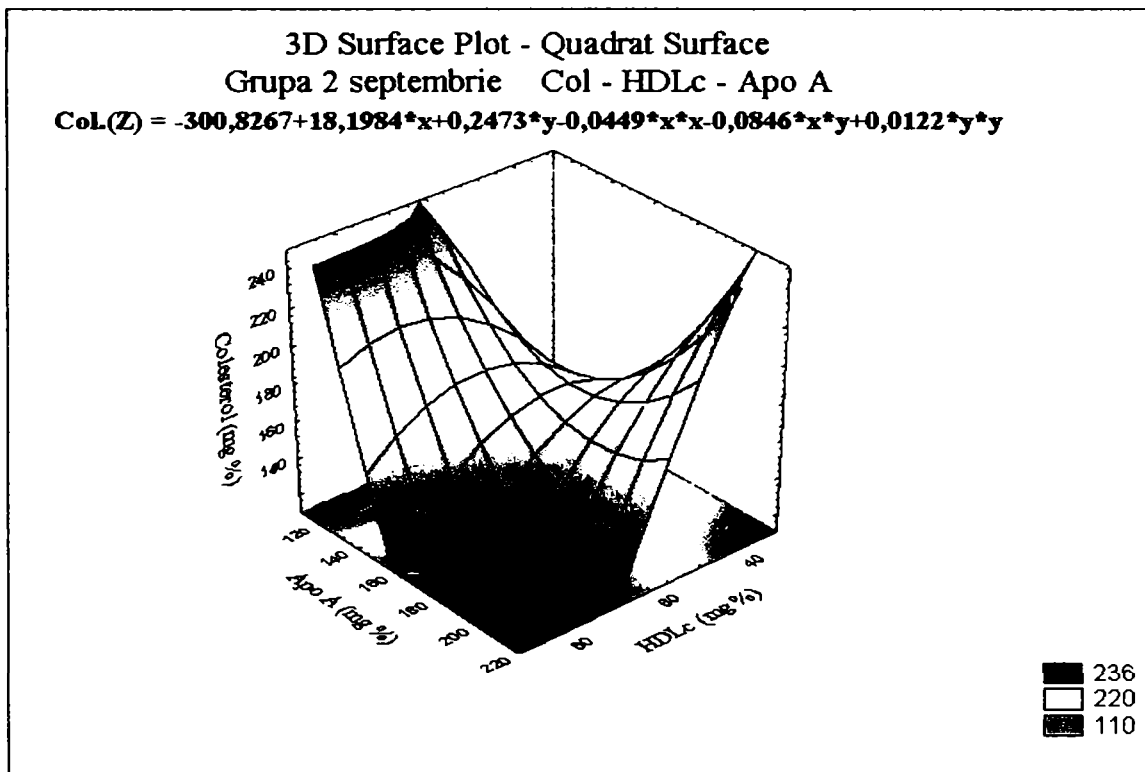
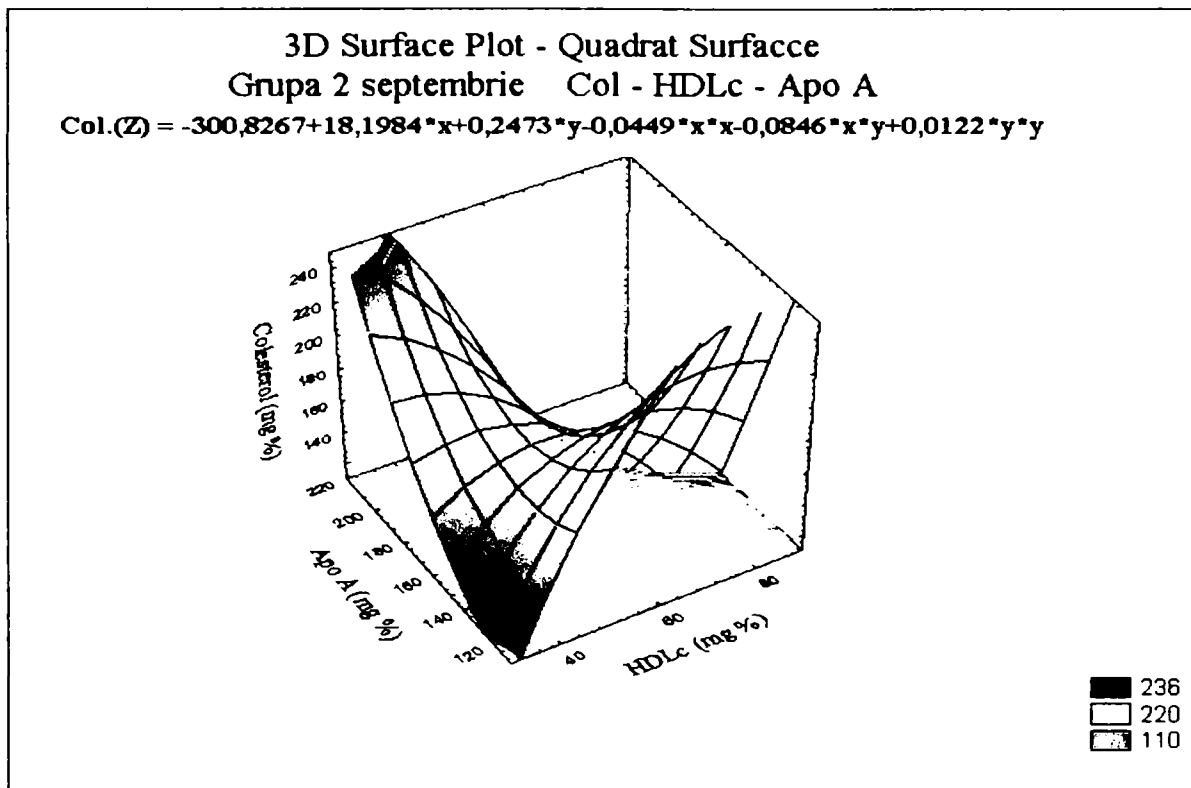
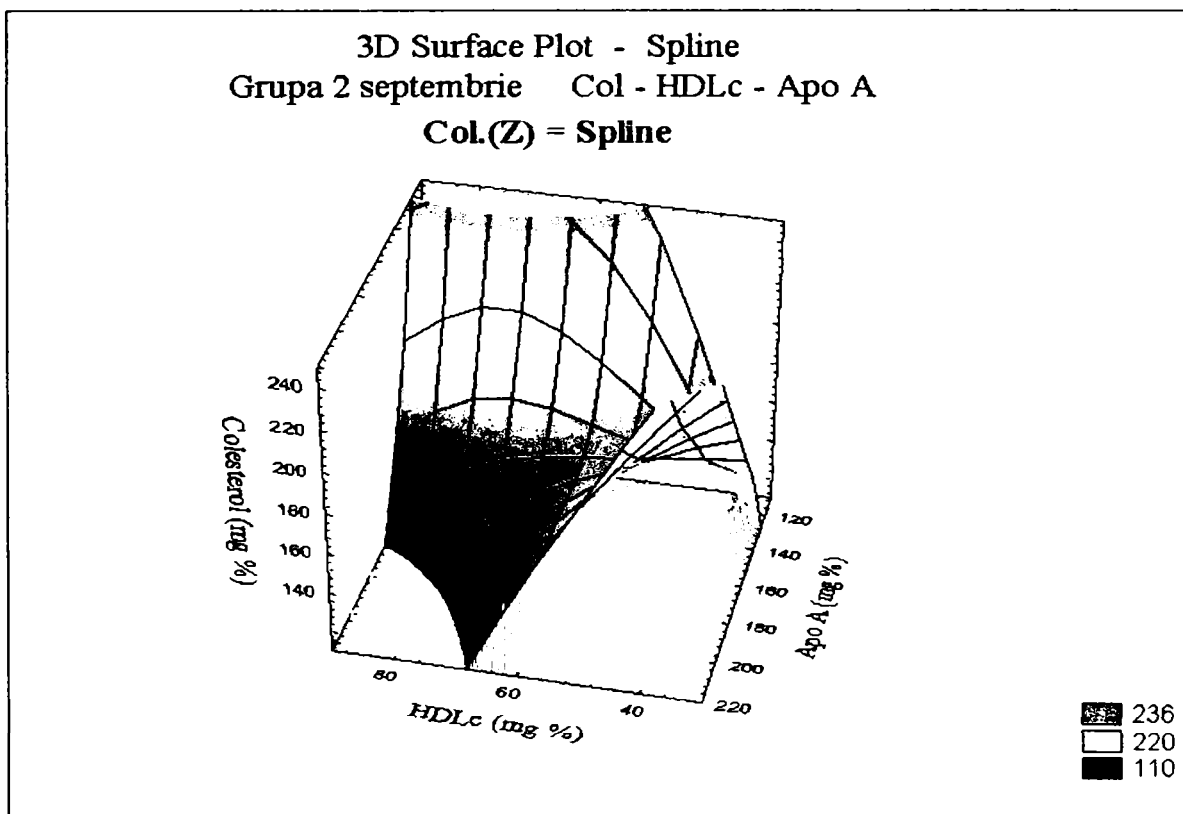


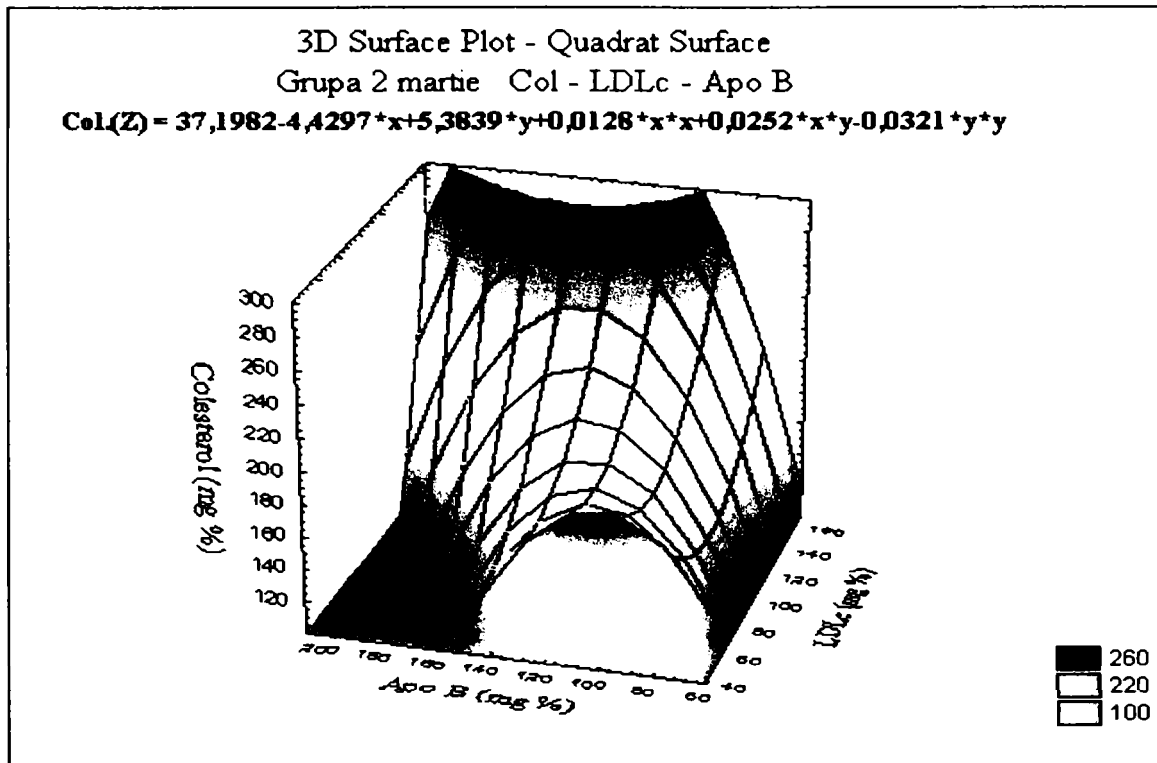
Fig. 6.52. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 2, septembrie) Quadrat surface areas



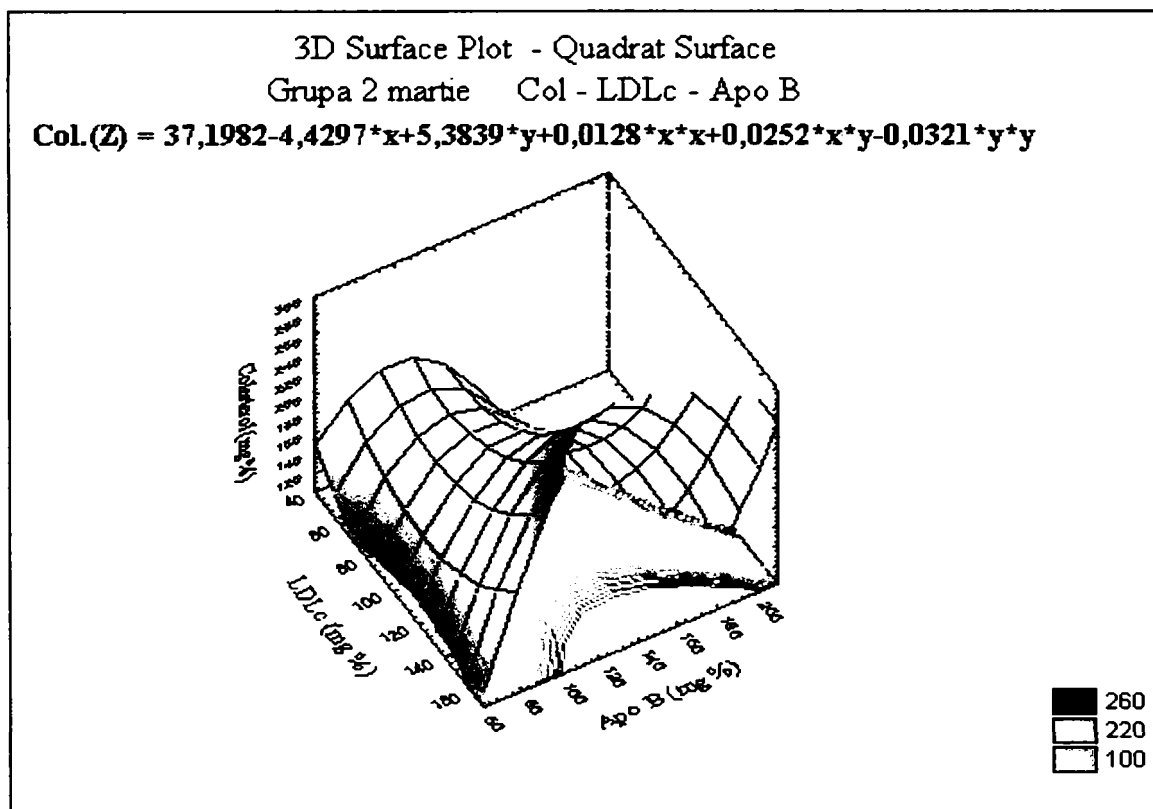
**Fig. 6.53. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 2, septembrie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.54. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 2, septembrie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.55. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 2, martie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.56. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 2, martie)
 Quadratic surface lines**

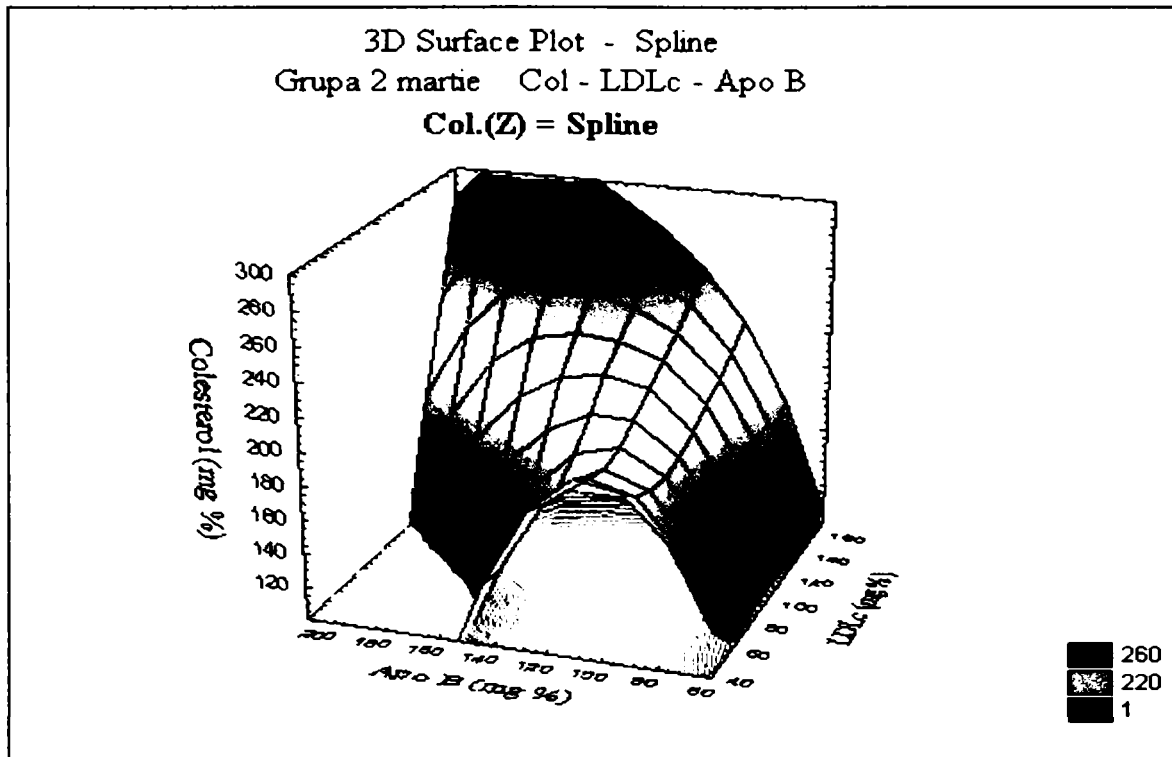


Fig. 6.57. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 2, martie) varianta – spline

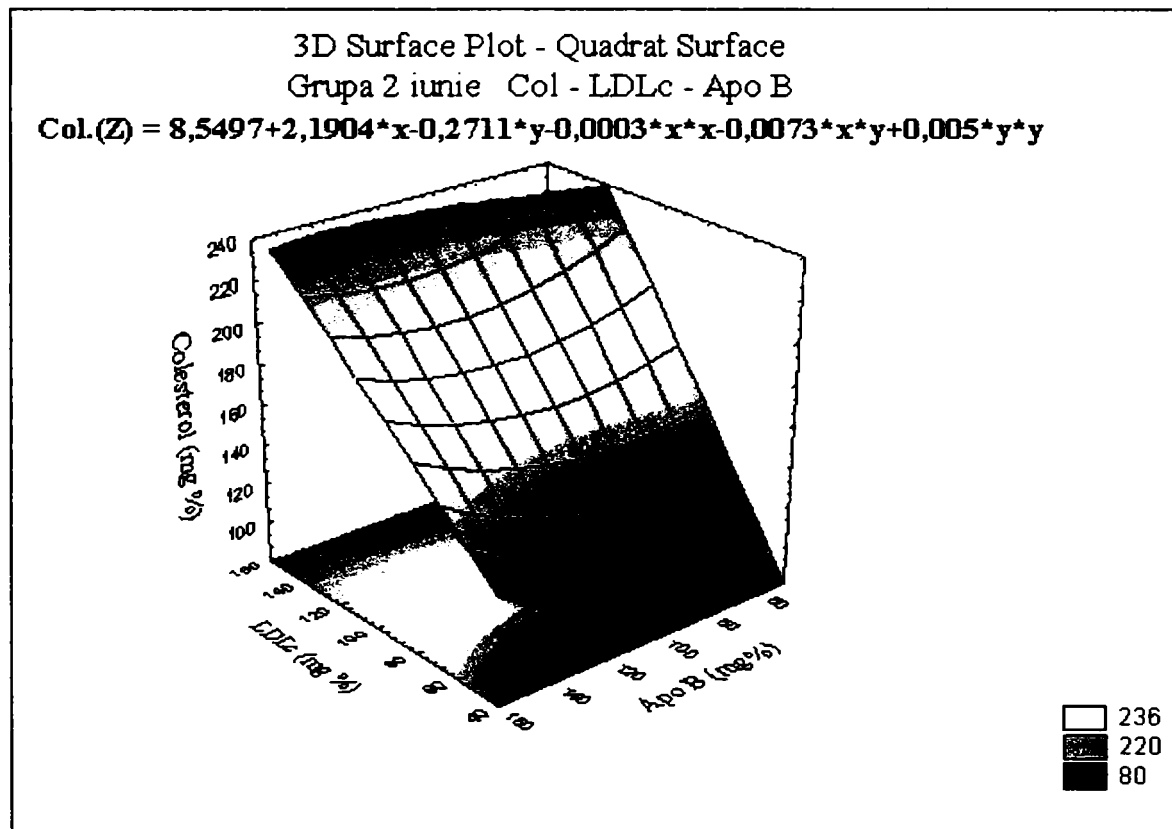
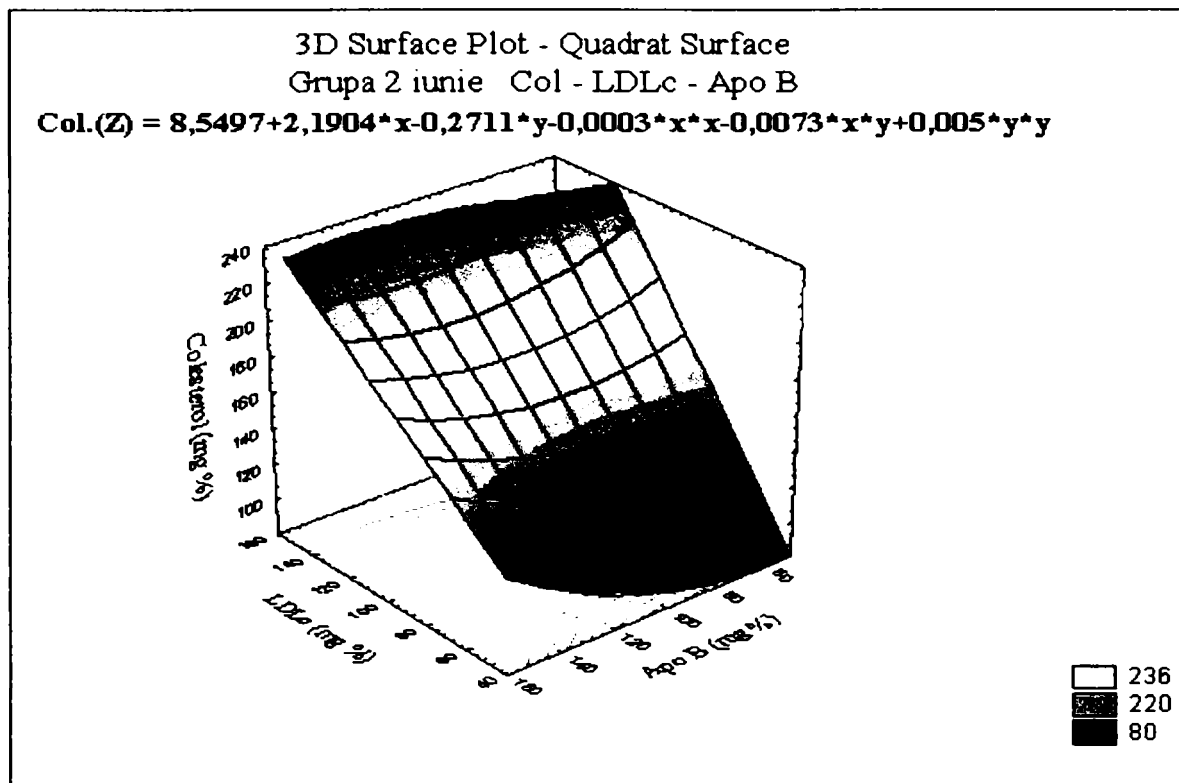
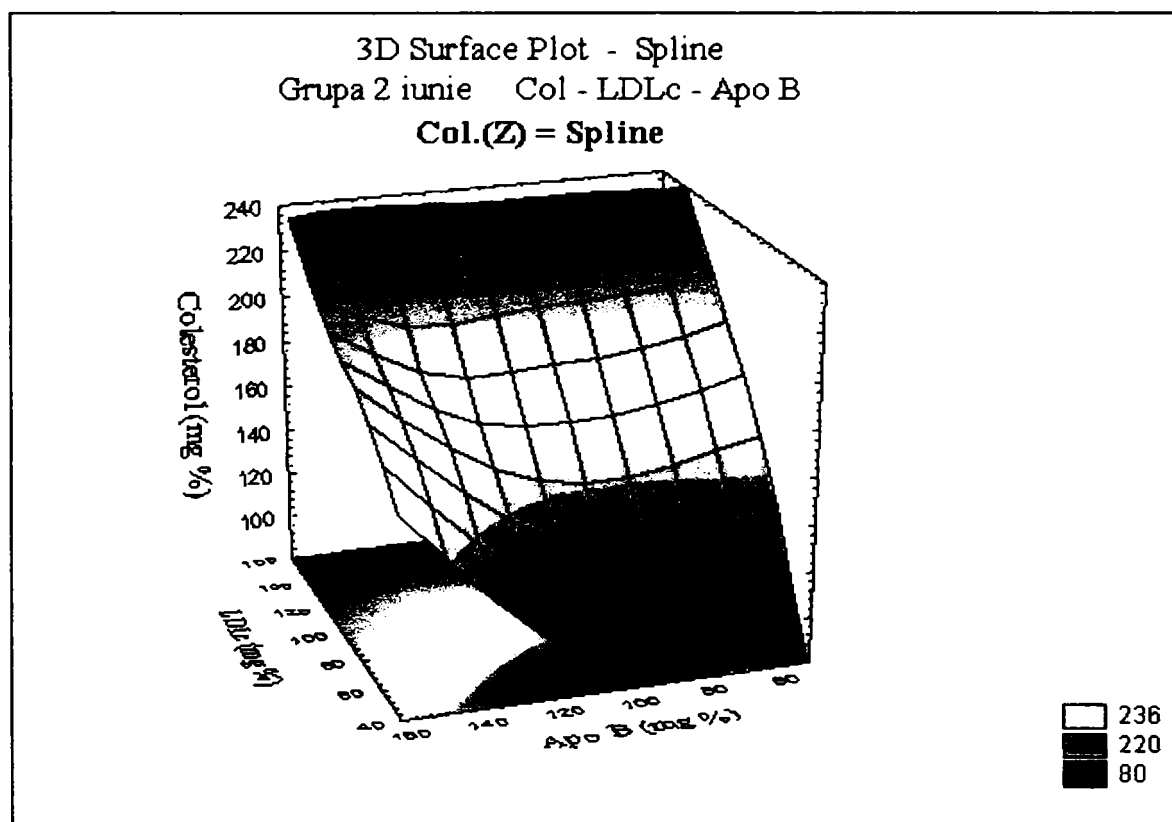


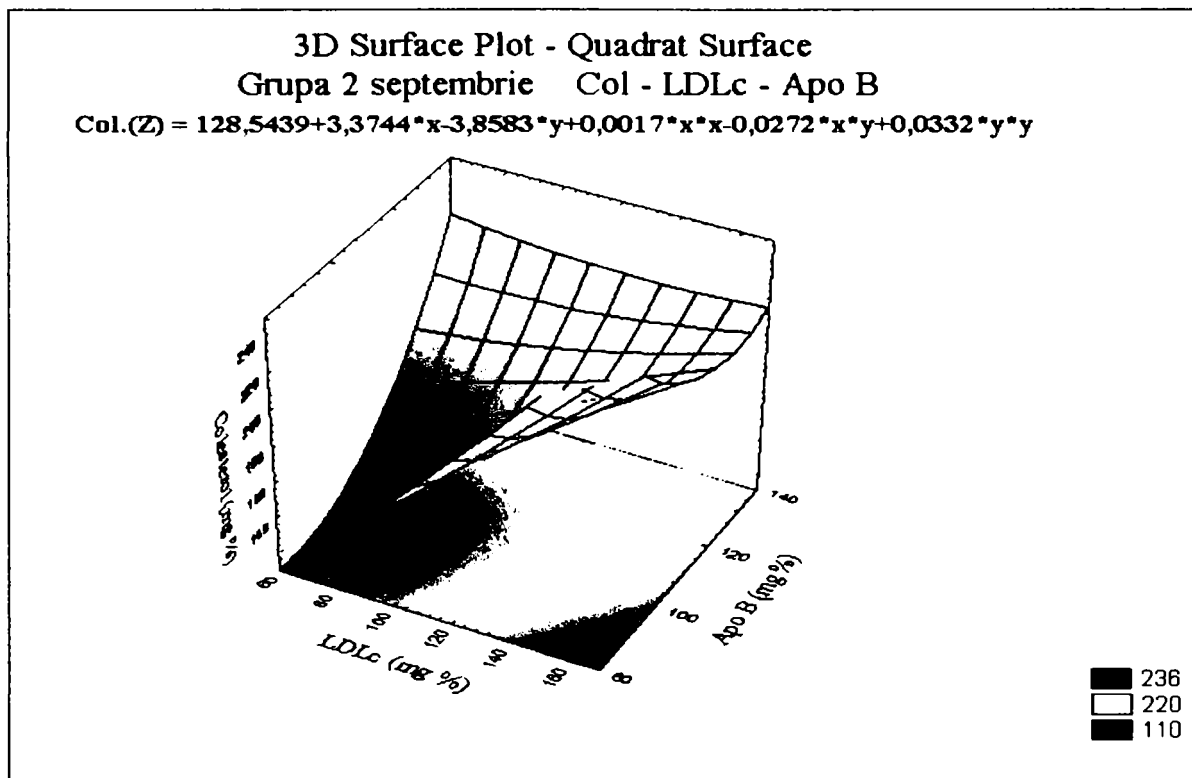
Fig. 6.58. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 2, iunie) Quadratic surface areas



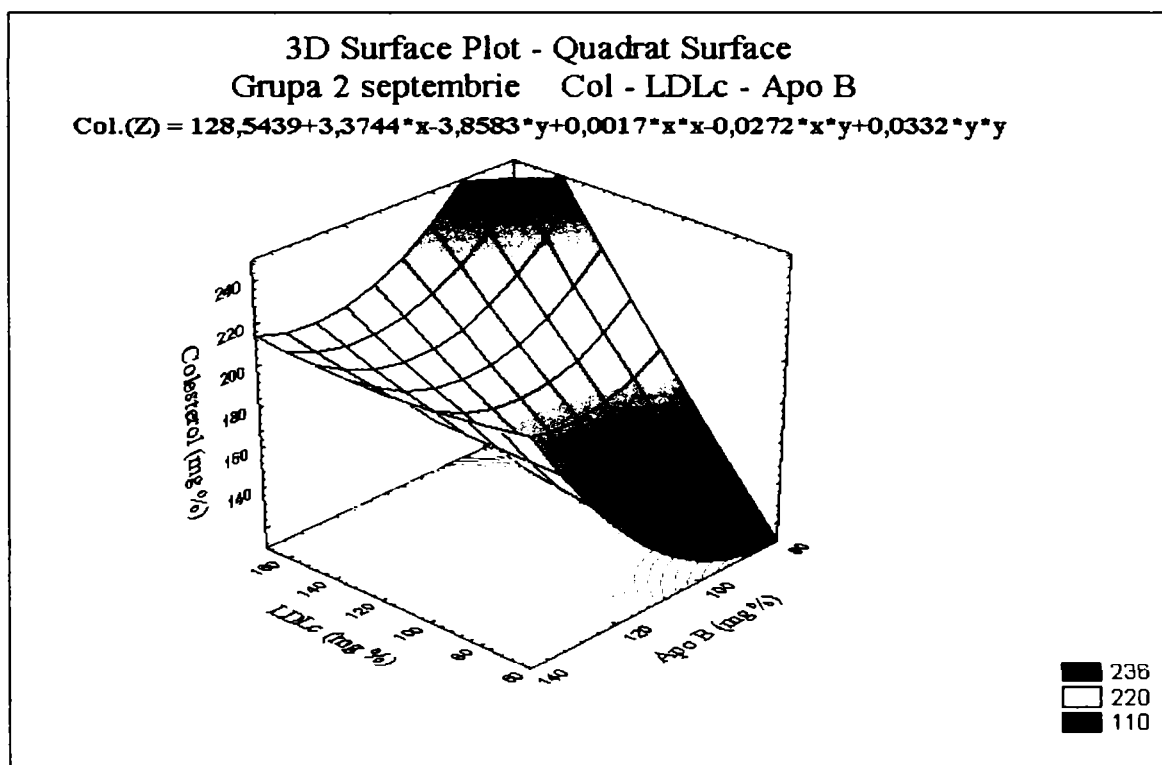
**Fig. 6.59. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 2, iunie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.60. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 2, iunie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.61. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 2, septembrie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.62. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 2, septembrie)
 Quadratic surface lines**

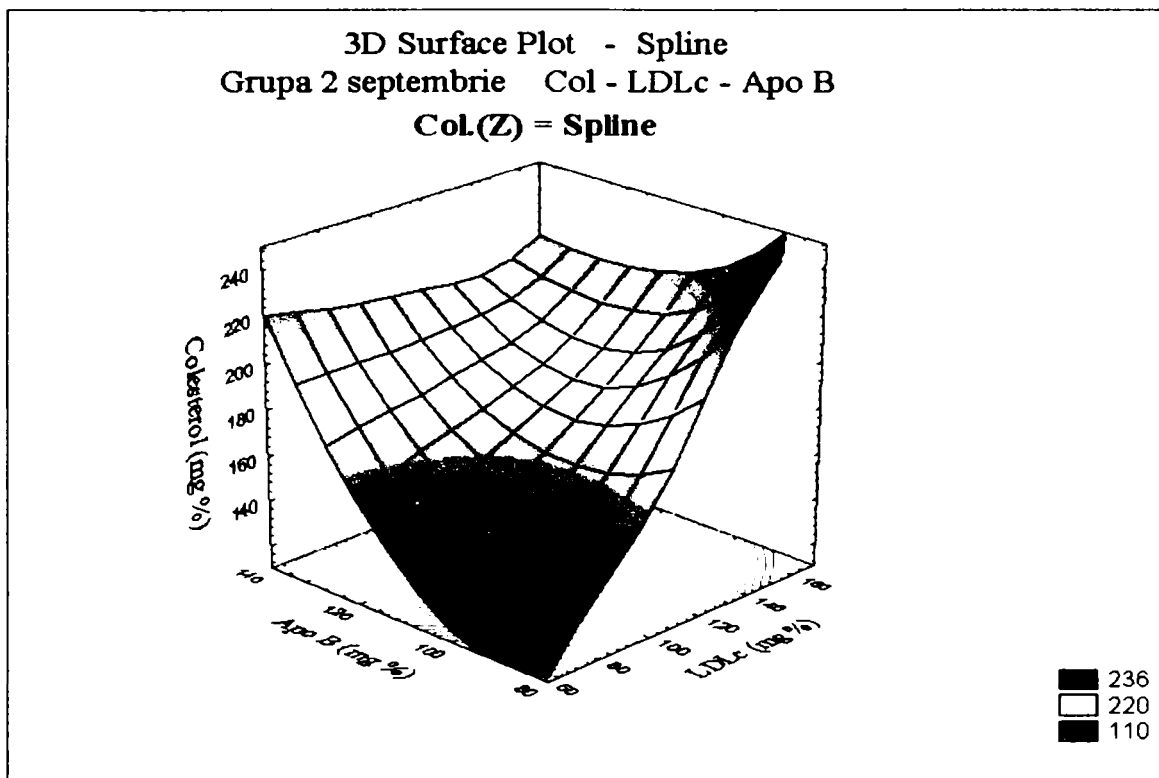


Fig. 6.63. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 2, septembrie) varianta – spline

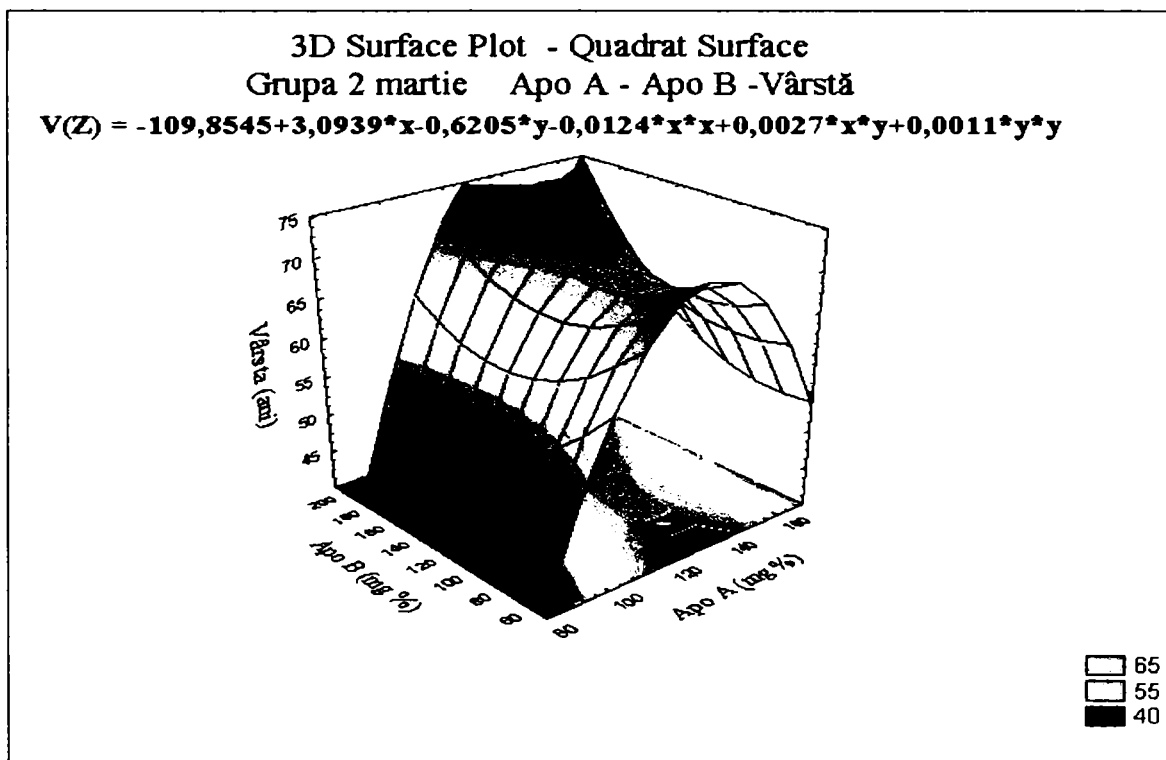
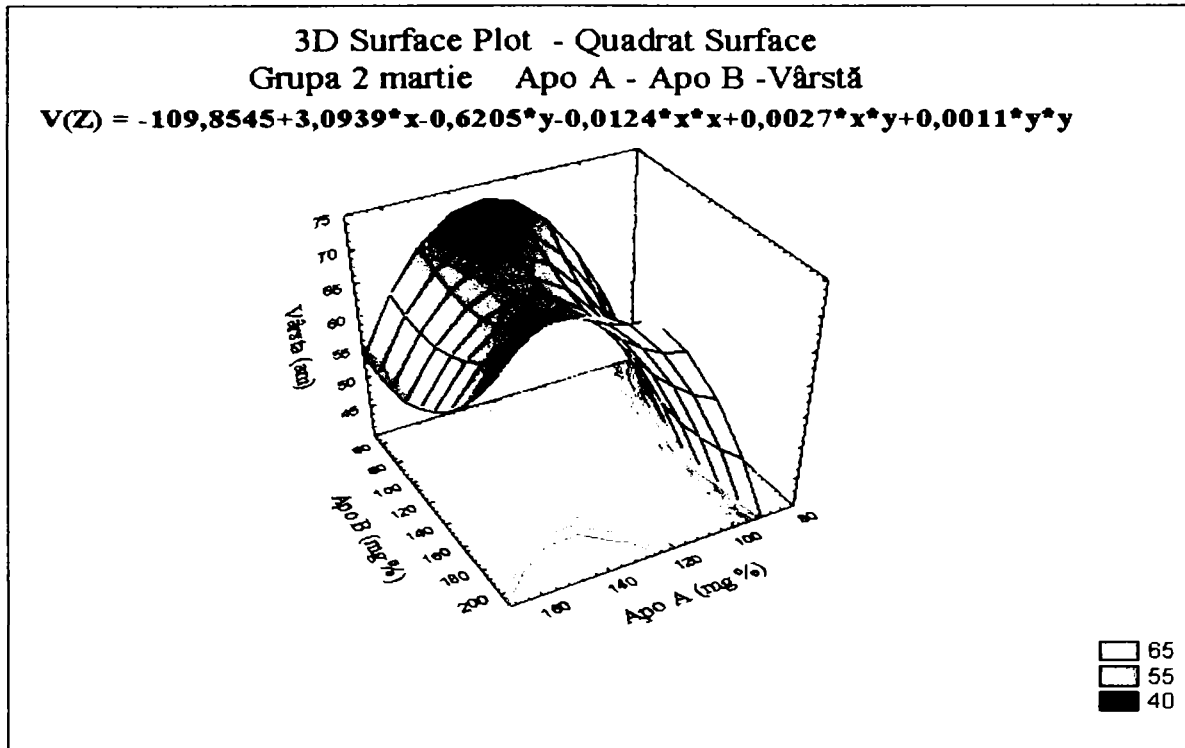
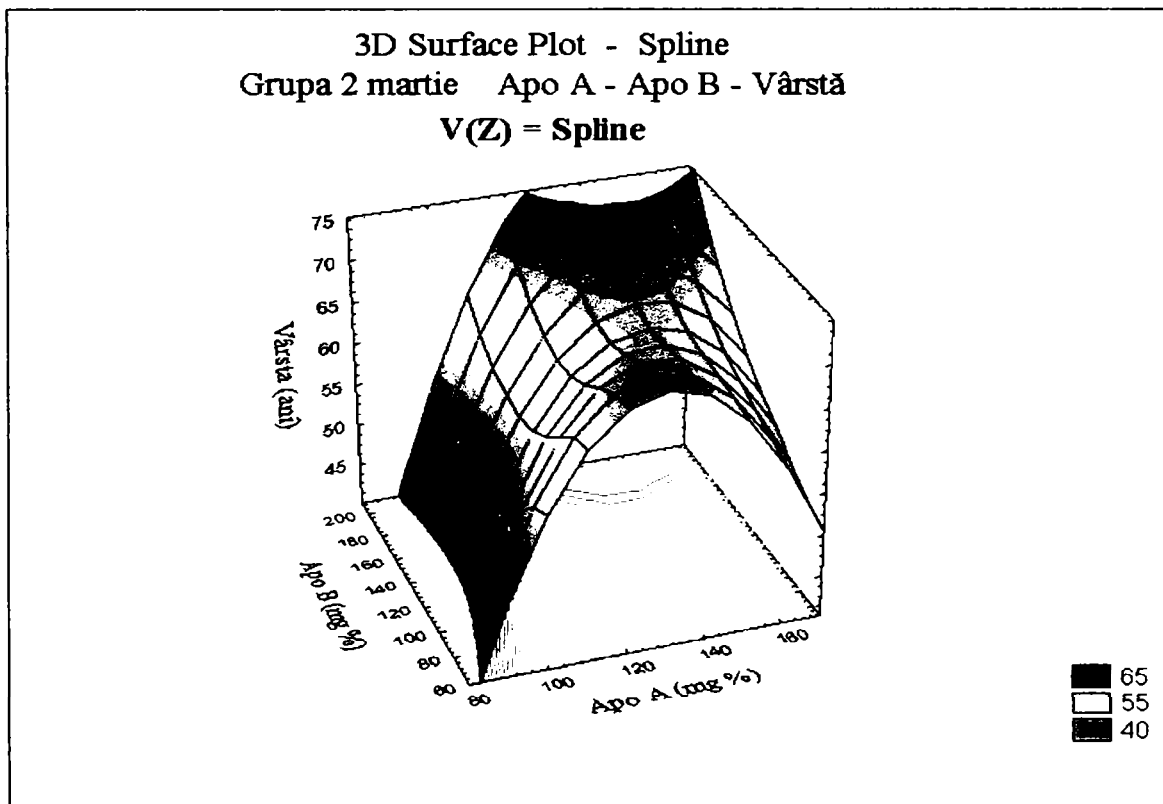


Fig. 6.64. Variația apo A-apo B-vârșă (grupa 2, martie) Quadrat surface areas



**Fig. 6.65. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 2, martie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.66. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 2, martie)
 varianta – spline**

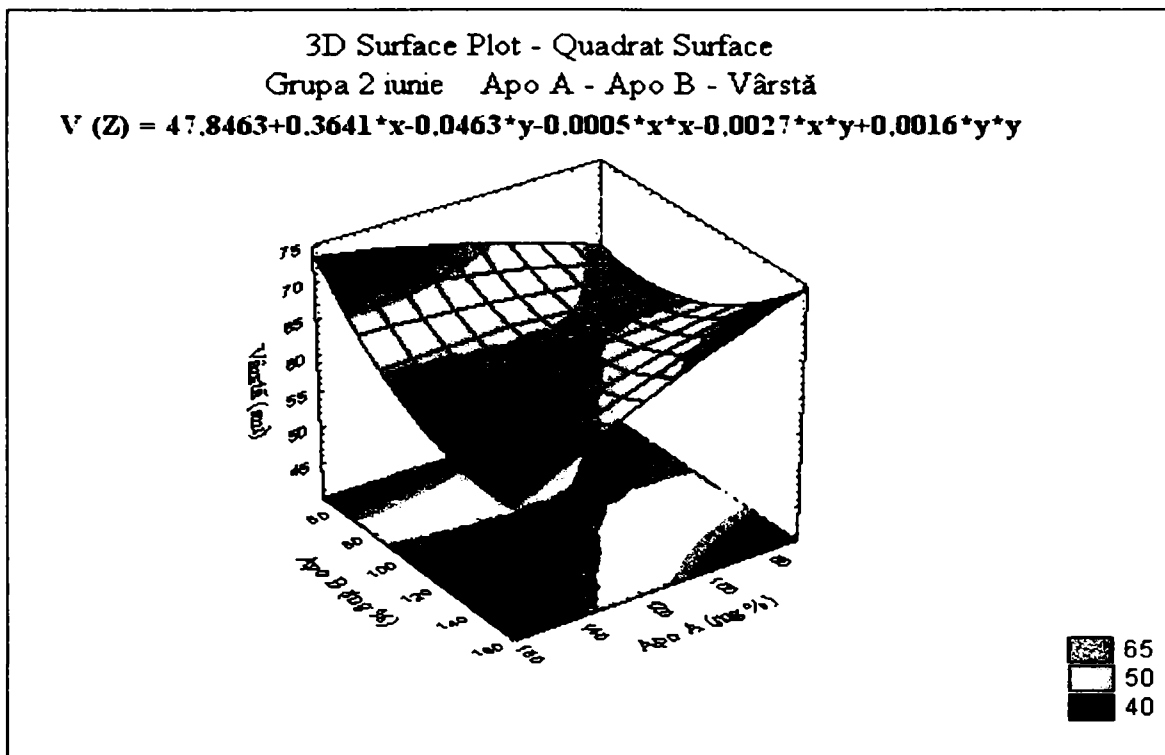


Fig. 6.67. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 2, iunie)
Quadrat surface areas

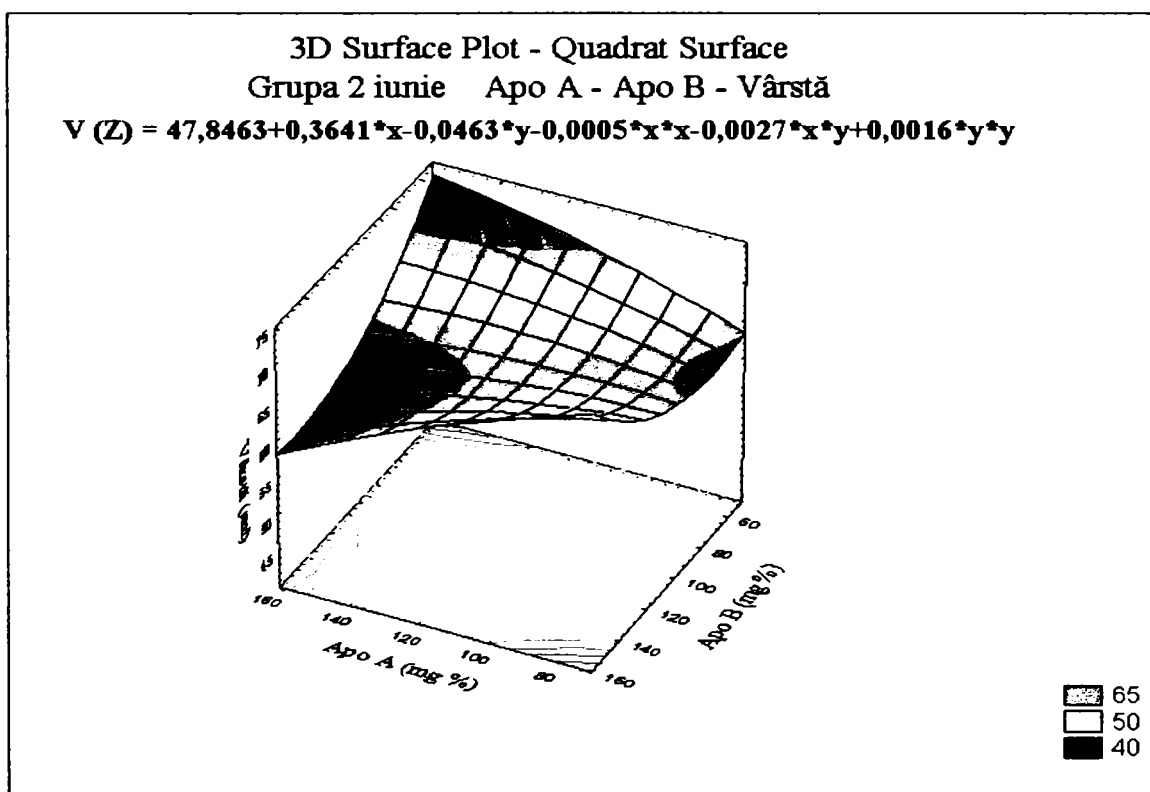
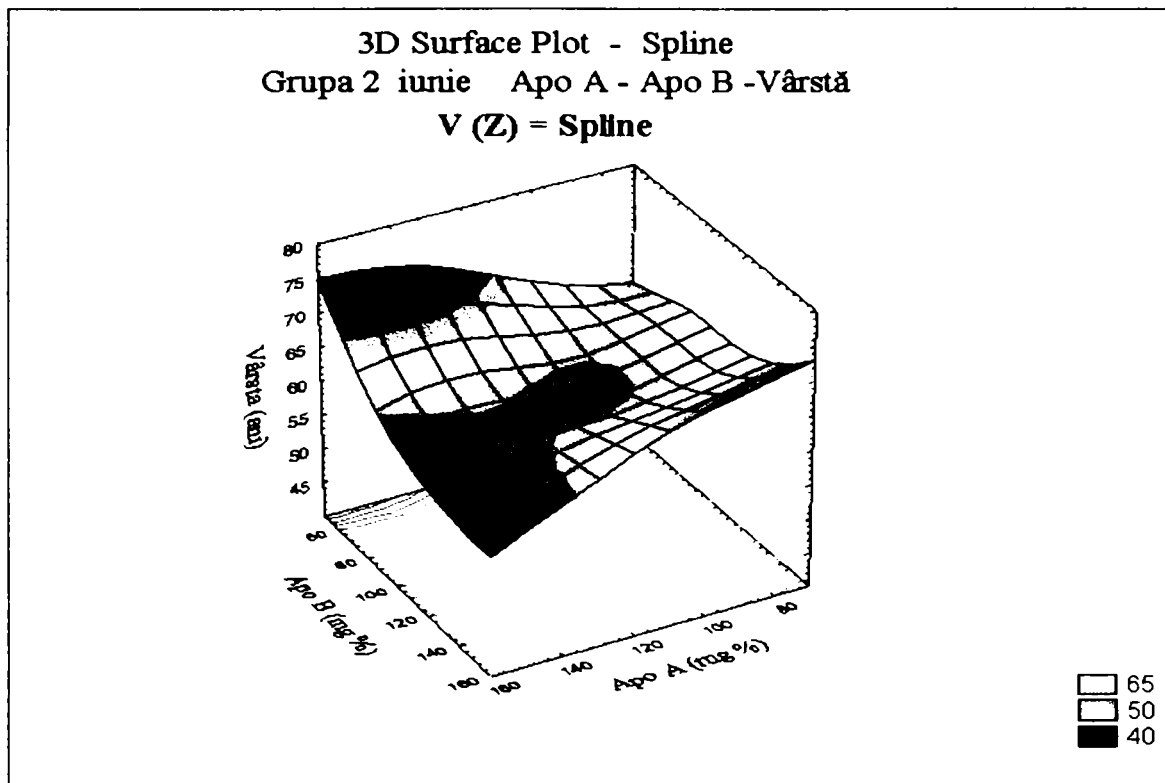
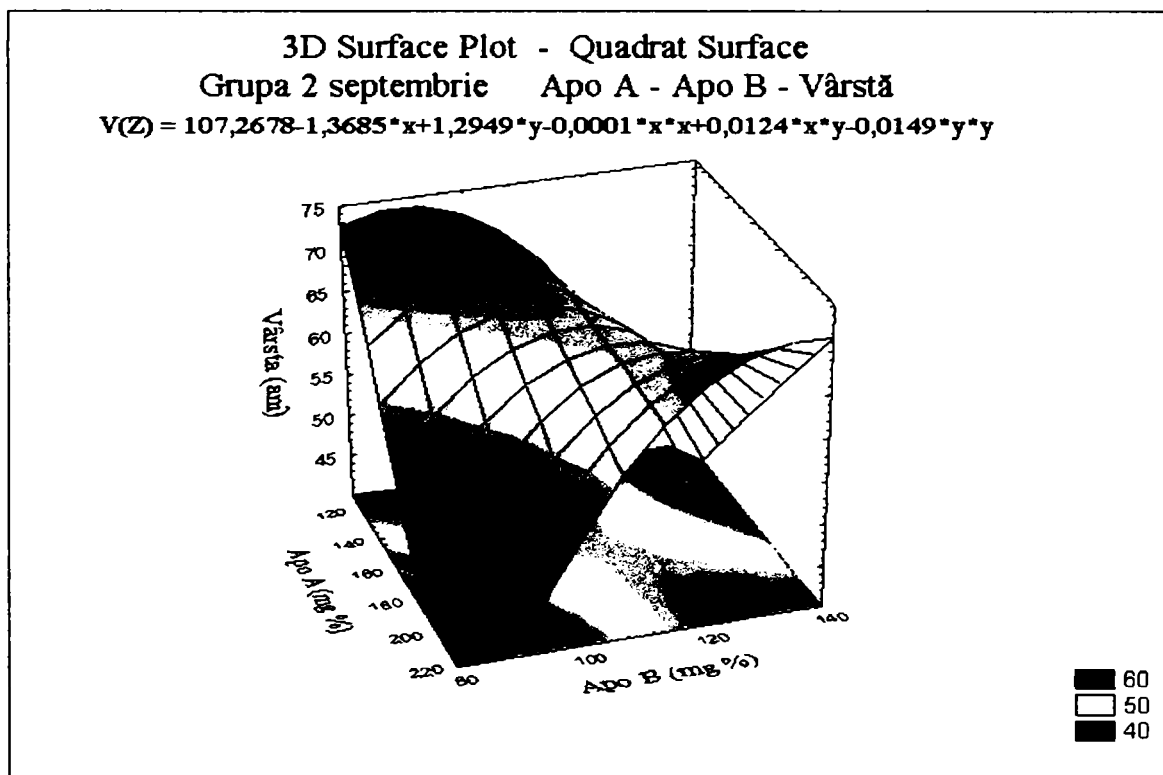


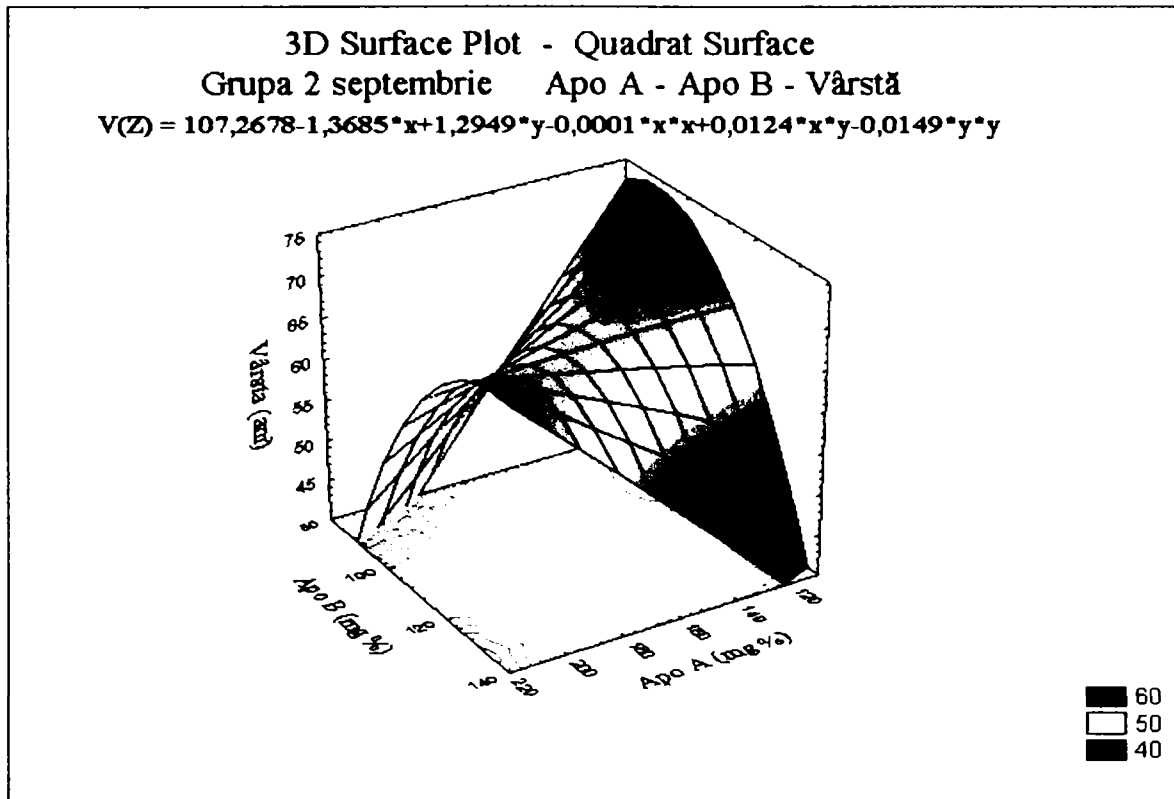
Fig. 6.68. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 2, iunie)
Quadrat surface lines



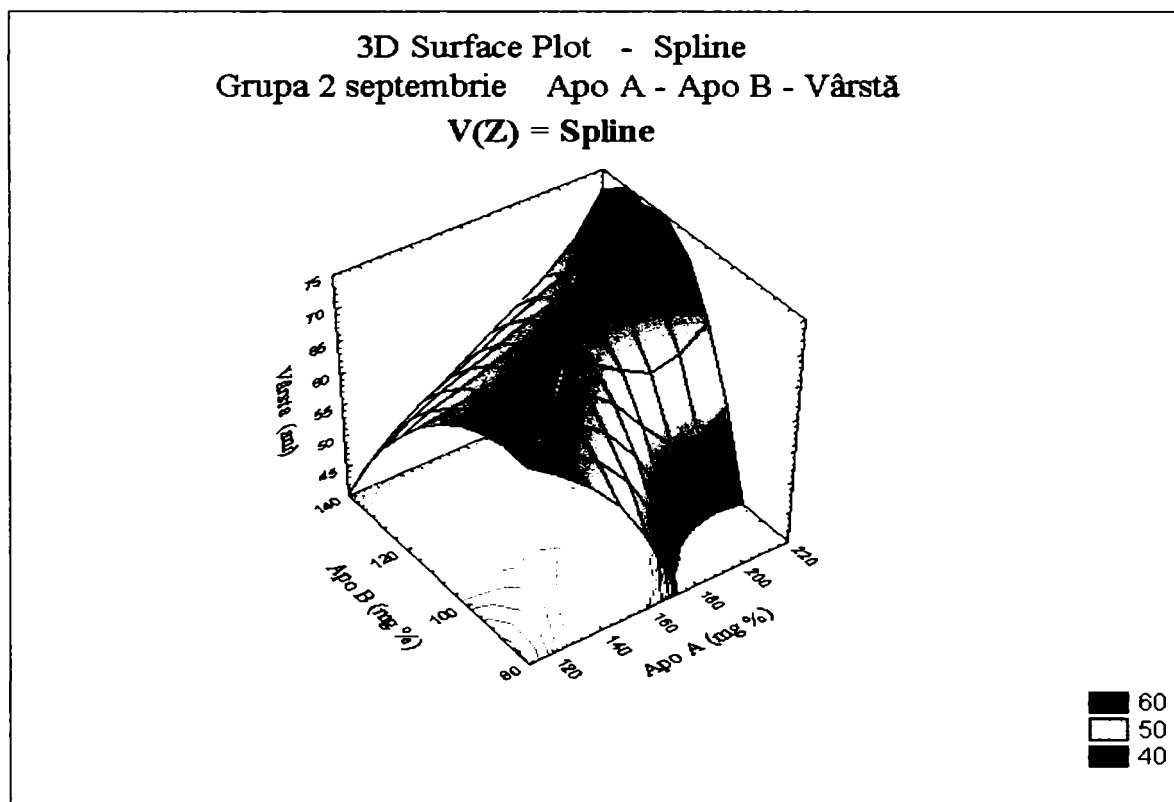
**Fig. 6.69. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 2, iunie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.70. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 2, septembrie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.71. Variația apo A-apo B-vârstă (grupa 2, septembrie)
 Quadrat surface lines**



**Fig. 6.72. Variația apo A-apo B-vârstă (grupa 2, septembrie)
 varianta – spline**

Din analiza valorilor fracțiilor lipidice, (fig.6.37- 6.72), la lotul cu subiecții cu cardiopatie ischemică, cu vârsta cuprinsă între 46 – 71 ani, cu o medie de 64 de ani, se constată următoarele:

- la prima determinare (martie) HDLc a fost scăzut la 5 subiecți (33,3%) dintre care un subiect este de sex feminin, iar valorile LDLc au fost crescute la 9 subiecți (60%).
- la a doua determinare (iunie), respectiv a treia determinare (septembrie), doar la 2 subiecți (13,3%) s-a constatat persistența valorilor scăzute ale HDL și la 4 subiecți (26,66%) valori crescute ale LDLc.

Remarcăm valoarea HDLc de 21 mg % la prima determinare (martie), la un bărbat de 46 de ani cu antecedente de infarct miocardic, fost fumător, la care HDLc a crescut la 54 mg %, respectiv 61 mg % la următoarele determinări. La acest subiect s-a constatat o creștere spectaculoasă a lipoproteinei apo A de la 88 mg % la 107 mg%, respectiv 94 mg%, cu creșterea apo B de la 60 mg% la 98 mg %, respectiv 101 mg % la următoarele determinări. Acest subiect a fost supus unui tratament hipolipemiant cu statine (simvastatin 20 mg/zi).

Acest caz ilustrează valoarea predictivă pentru ateroscleroză, a determinării HDLc, LDLc, apo A, apo B și importanța aplicării terapiei hipolipemiante cu statine pentru scăderea fracțiilor aterogene (LDLc, apo B) și creșterea fracțiilor lipidice protectoare a aterosclerozei (HDLc, apoA).

Din analiza graficelor prezentate mai sus, la subiecții cu cardiopatie ischemică se desprind următoarele concluzii:

- la unii subiecți, valorile diverselor fracții lipidice au fost diferite la cele 3 determinări efectuate la interval de 3 luni, ceea ce concordă cu considerente teoretice expuse anterior, privind evoluția dinamică a acestor valori.
- analiza valorilor apolipoproteinelor, efectuate la lotul de subiecți cu cardiopatie ischemică, sugerează o concordanță, la majoritatea cazurilor, între valorile crescute ale apo A și cel al HDLcolesterol, ceea ce sugerează un prognostic evolutiv favorabil al afecțiunii cardiace. Din contră, la subiecții cu apo B crescut s-au întâlnit valori crescute ale LDLcolesterol-ului, cu mici excepții, ceea ce are ca valoare predictivă, o evoluție nefavorabilă a acestor subiecți.

- în general, aceste date prezentate s-au corelat cu prezența la subiecții cu apo B crescut și LDLc crescut, a unor factori de risc aterogenetic (fumat, obezitate, stres psihic, etc).

Determinarea valorilor trigliceridelor serice la subiecții cu cardiopatie ischemică nu a evidențiat modificări semnificative, doar la 2-3 subiecți fiind valori puțin peste valorile normale maxime admise. De altfel, hipertrigliceridemia reprezintă un factor de risc aterogenetic, cu valoare mai redusă comparativ cu modificările colesterolului plasmatic și a fracțiilor sale.

Hipertrigliceridemiile situate la valori foarte crescute (3-4 ori față de valorile normale) sunt considerate ca având o corelație cu dezvoltarea unei forme clinice de ateroscleroză și acestea, de obicei, sunt hipertrigliceridemii primare induse genetic.

Grupa 3 Bărbați

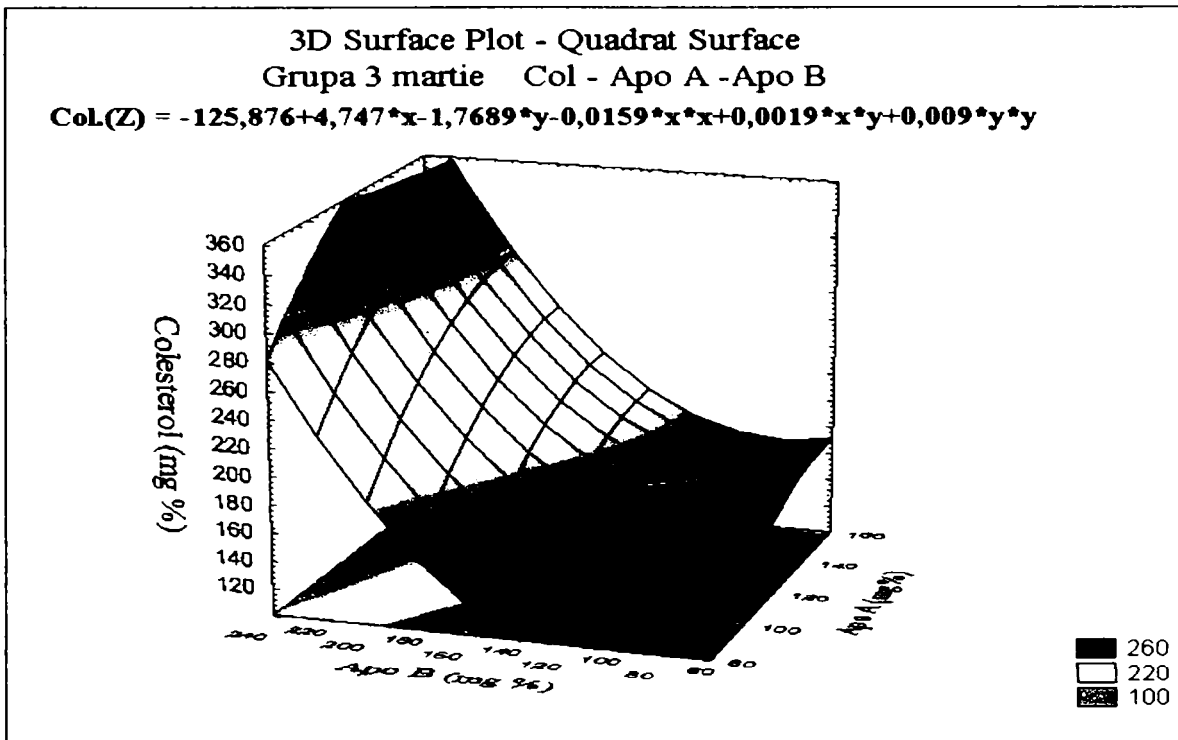


Fig. 6.73. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 3, martie)
 Quadratic surface areas

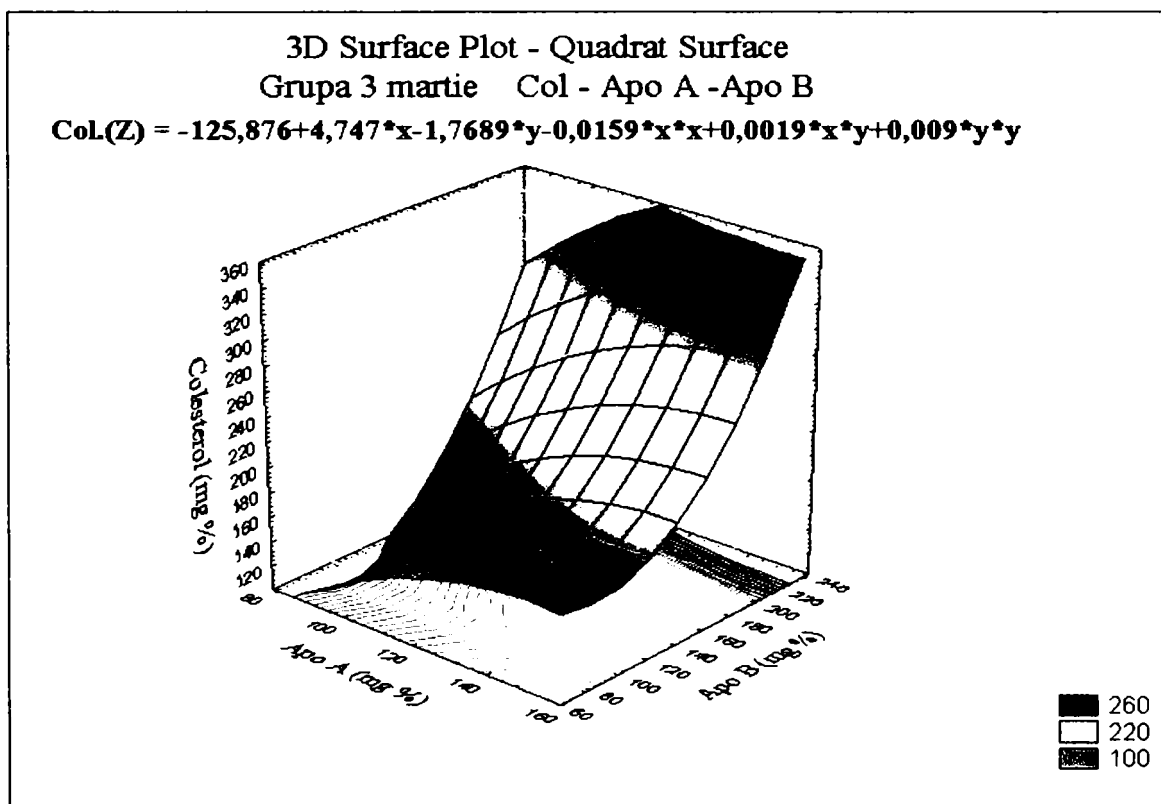


Fig. 6.74. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 3, martie)
 Quadratic surface lines

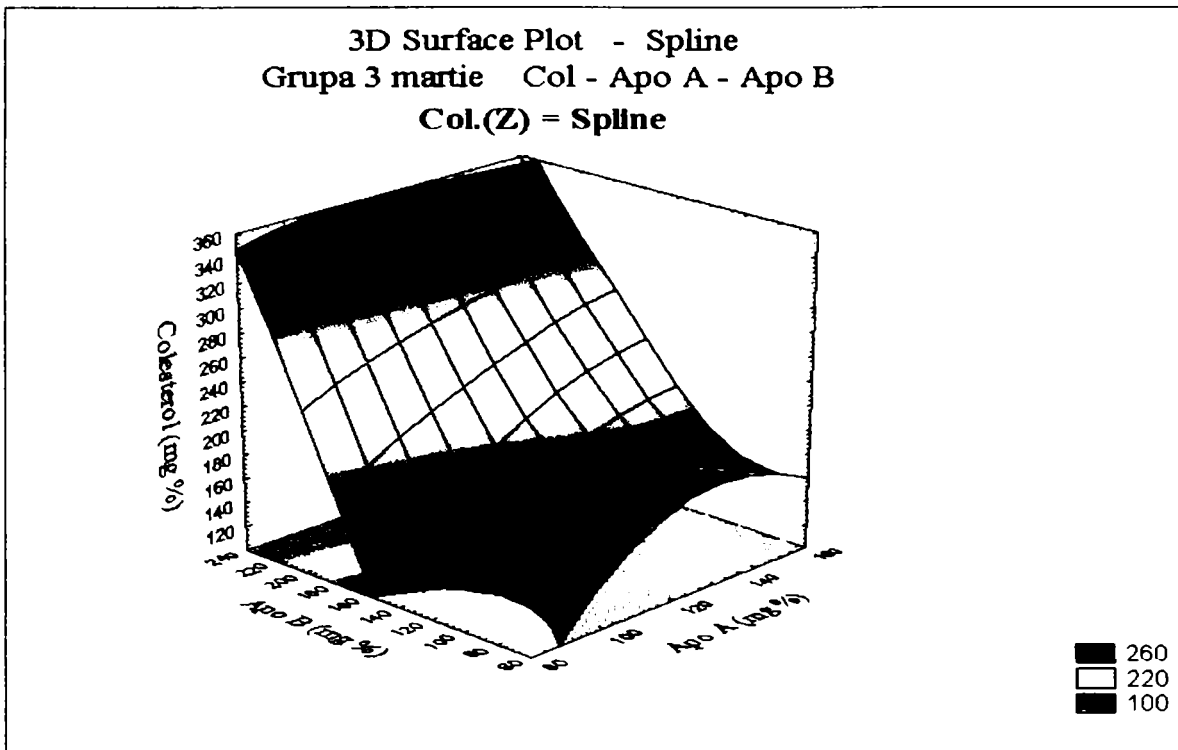


Fig. 6.75. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 3, martie) varianta – spline

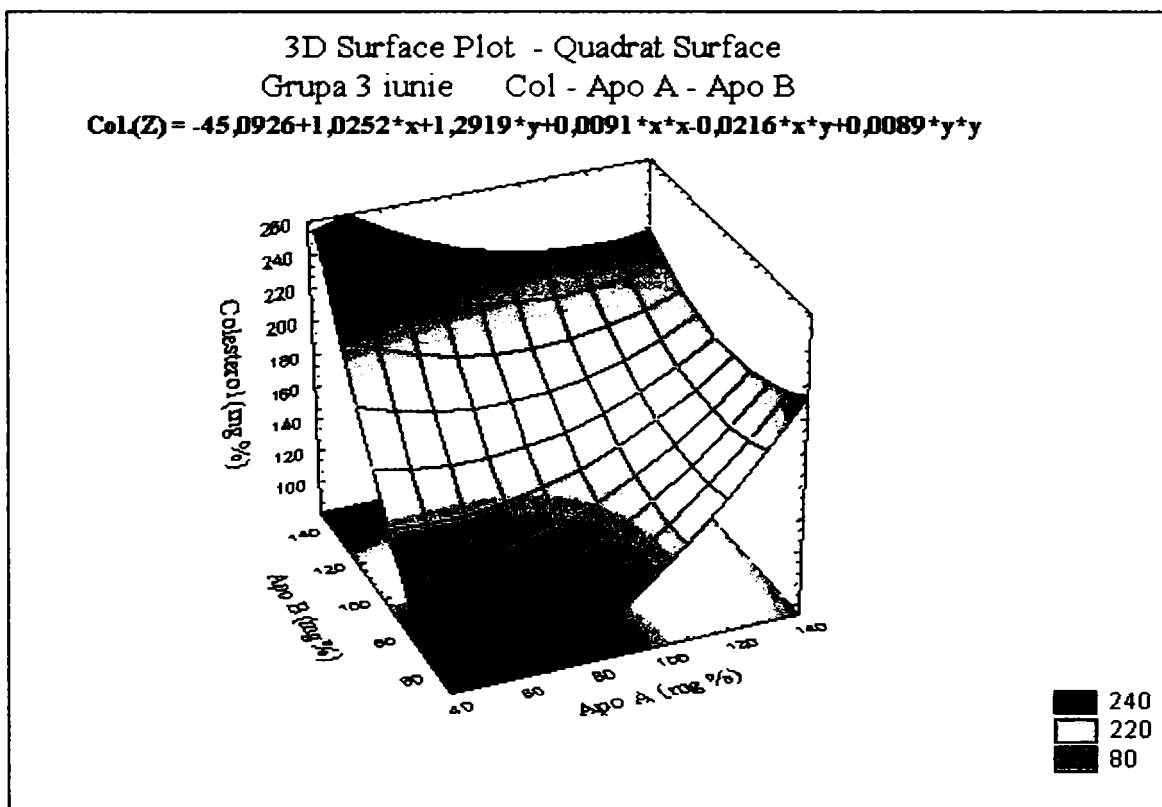
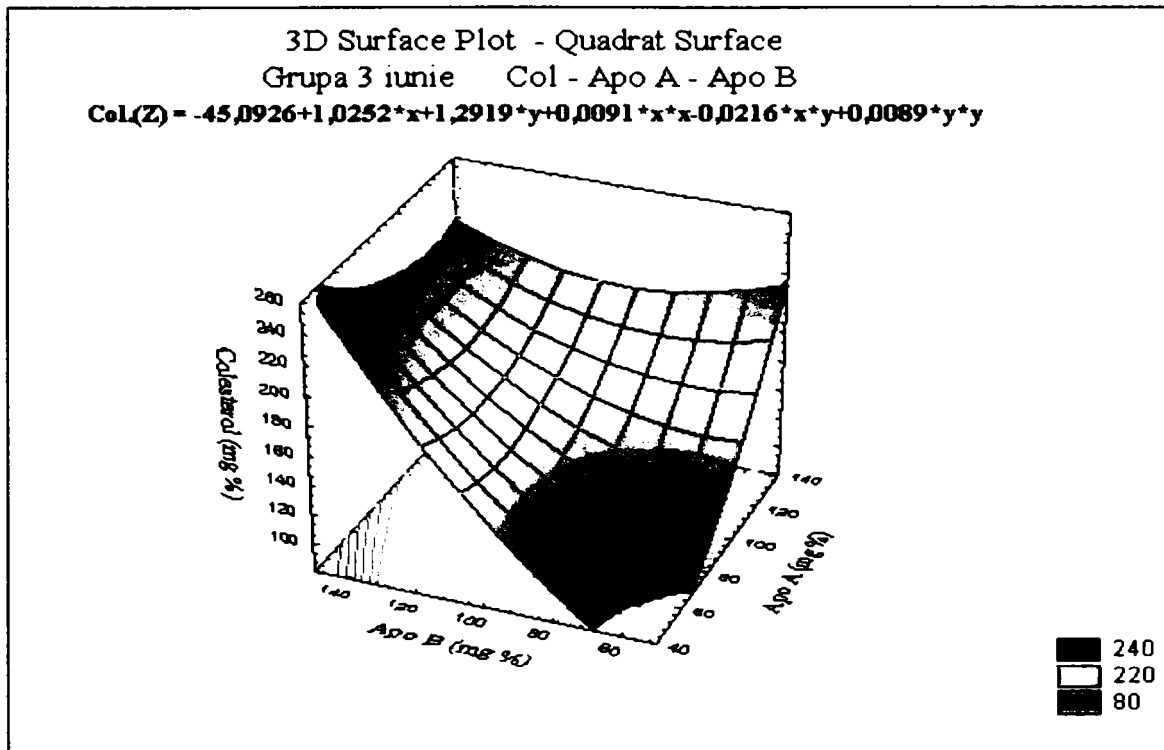
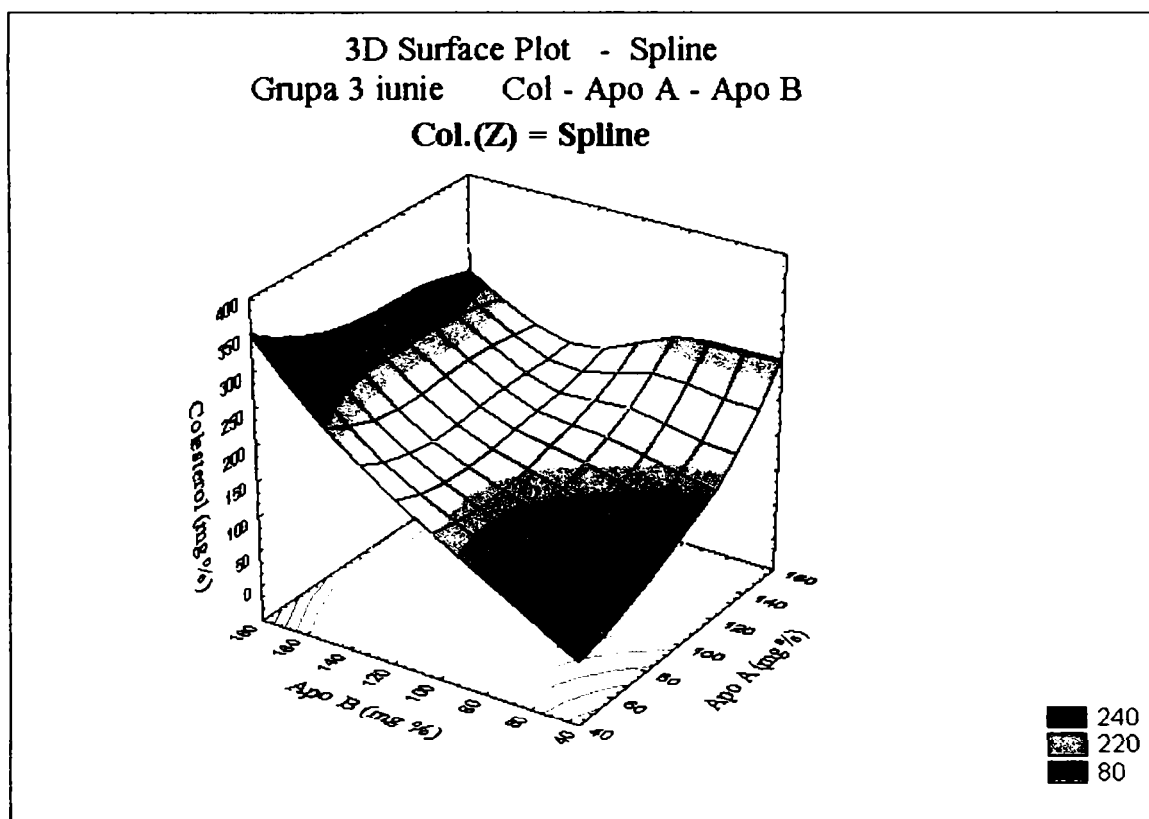


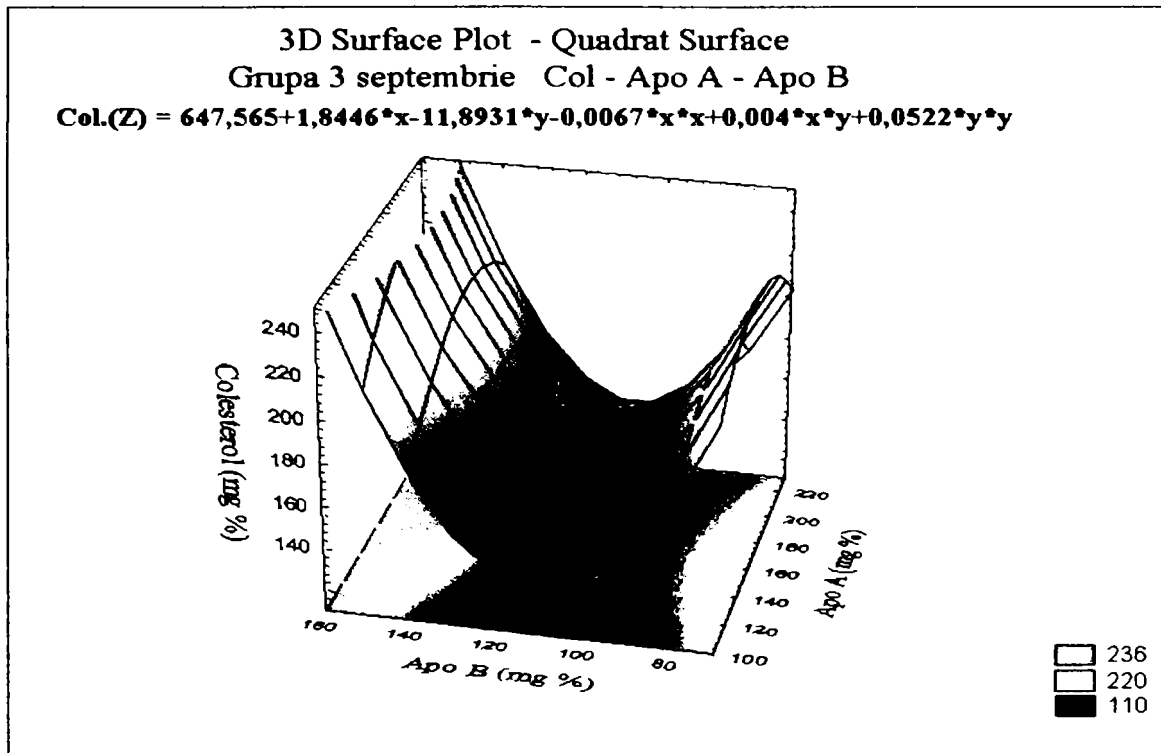
Fig. 6.76. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 3, iunie) Quadrat surface areas



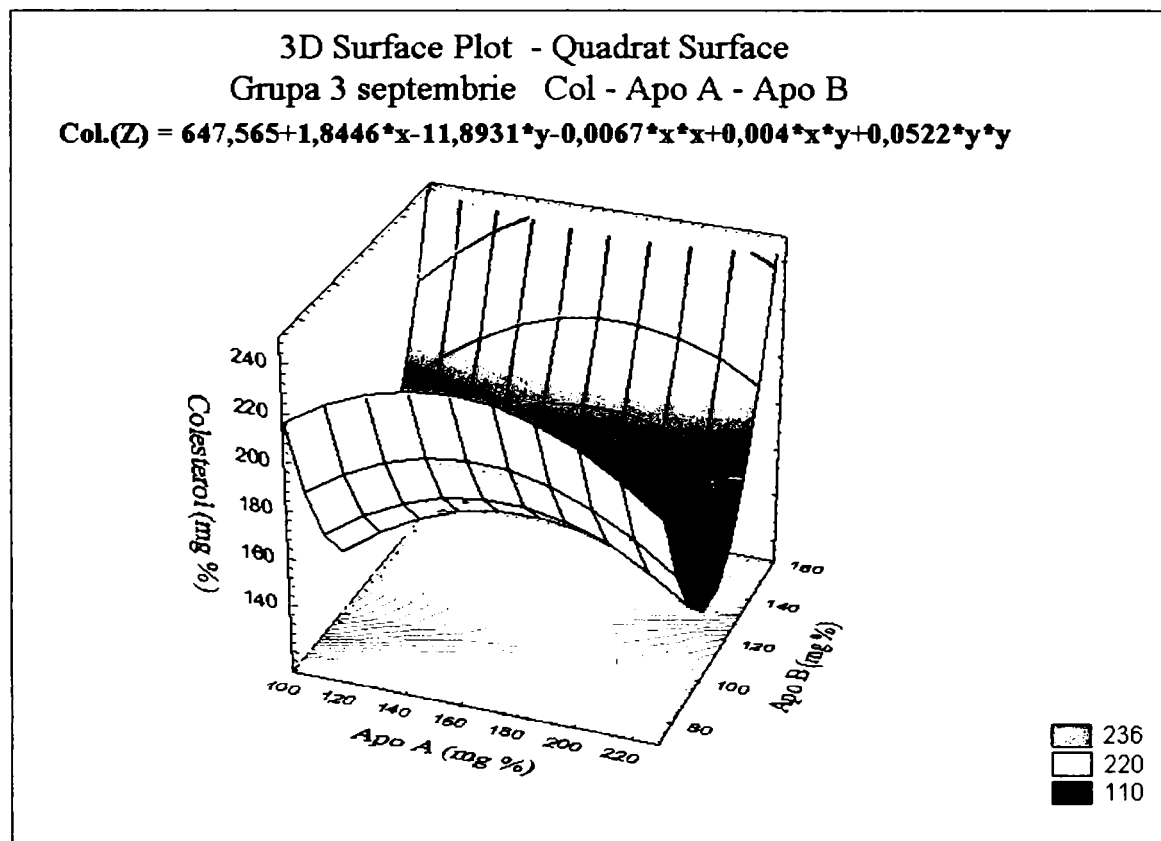
**Fig. 6.77. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 3, iunie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.78. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 3, iunie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.79. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 3, septembrie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.80. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 3, septembrie)
 Quadratic surface lines**

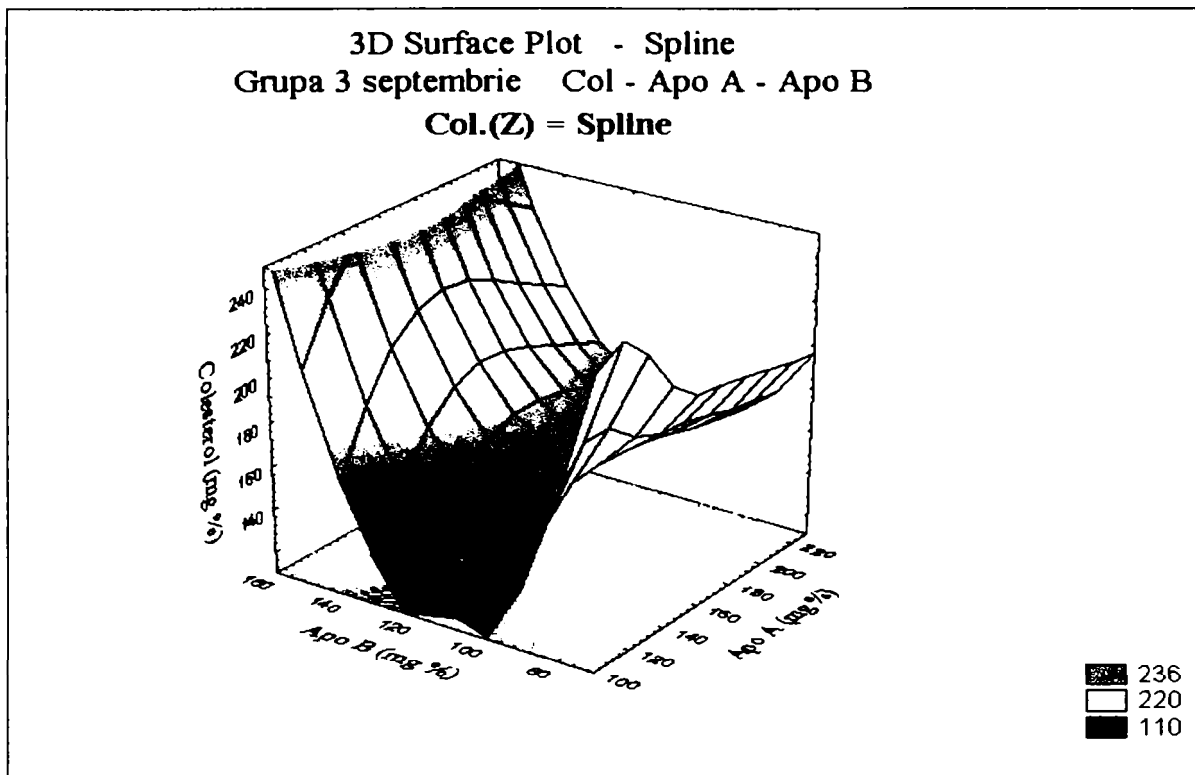


Fig. 6.81. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 3, septembrie) varianta – spline

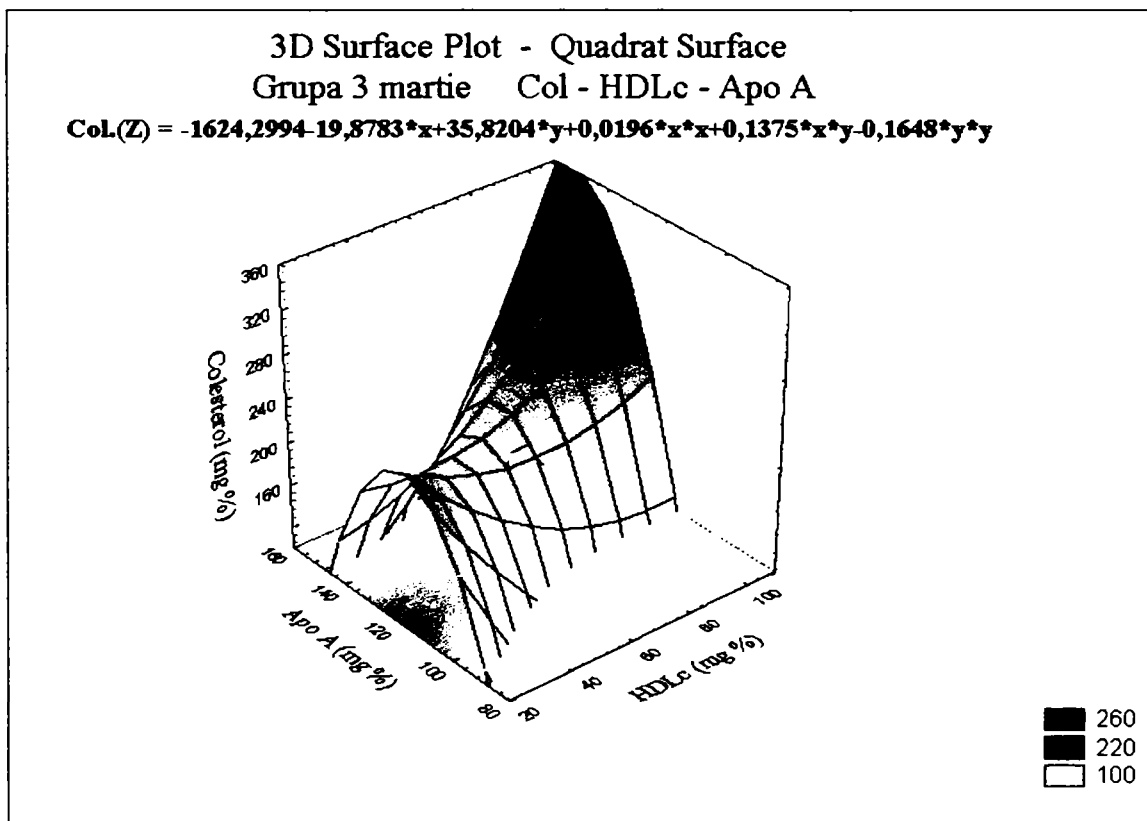
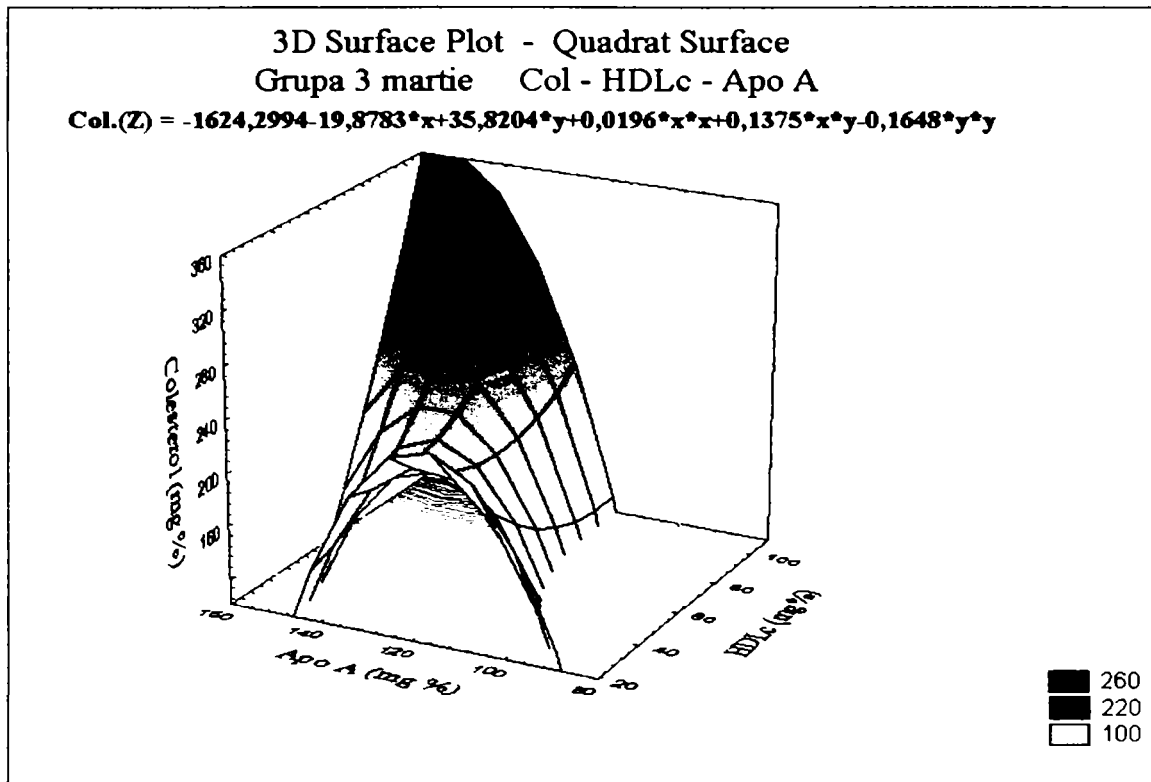
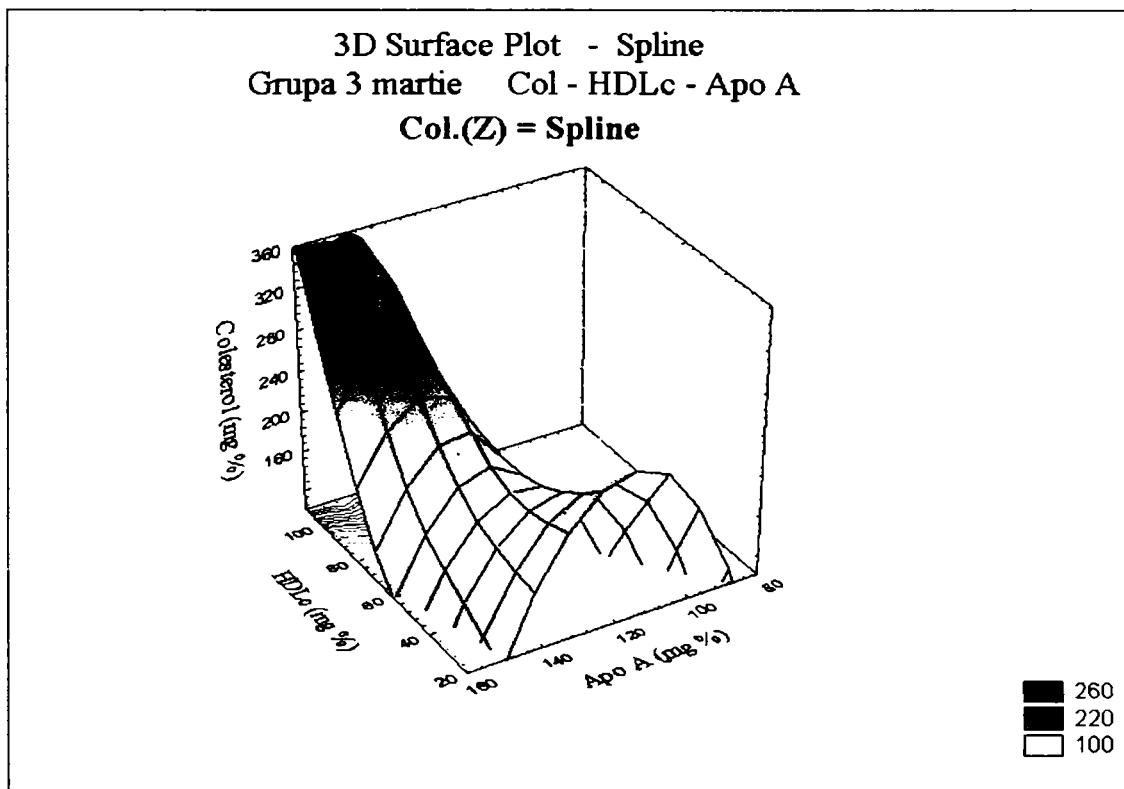


Fig. 6.82. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 3, martie) Quadrat surface areas



**Fig. 6.83. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 3, martie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.84. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 3, martie)
 varianta – spline**

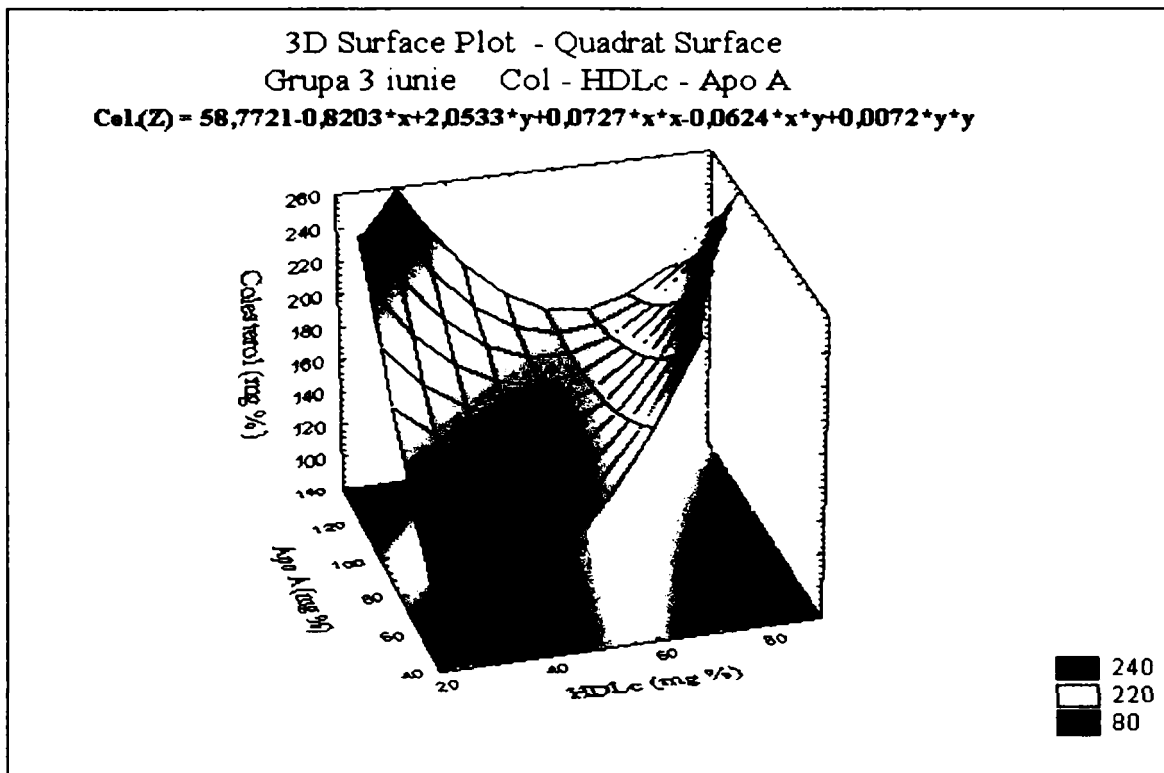


Fig. 6.85. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 3, iunie)
Quadrat surface areas

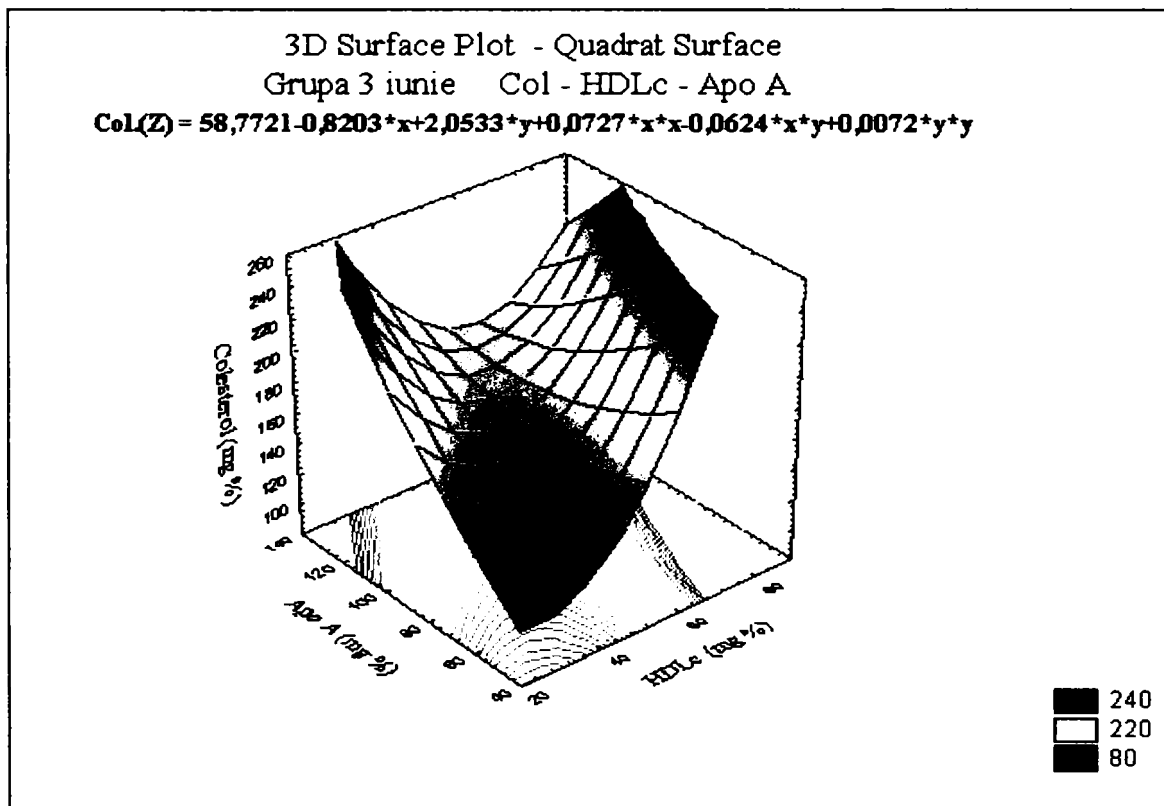


Fig. 6.86. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 3, iunie)
Quadrat surface lines

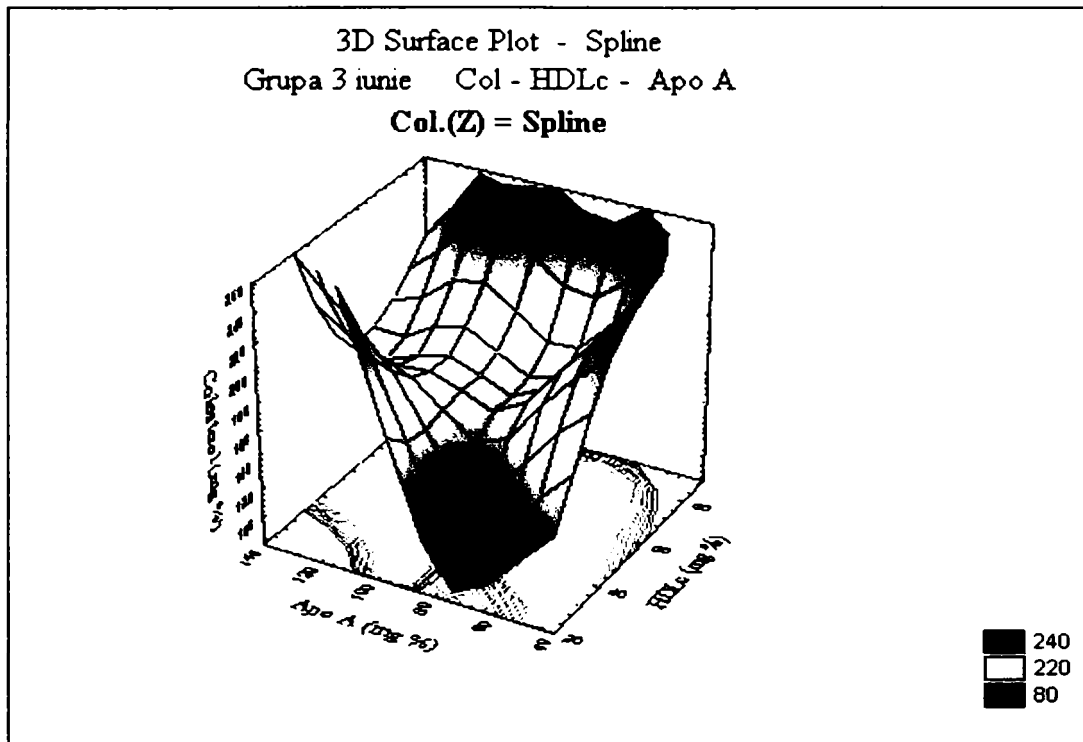


Fig. 6.87. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 3, iunie) varianta – spline

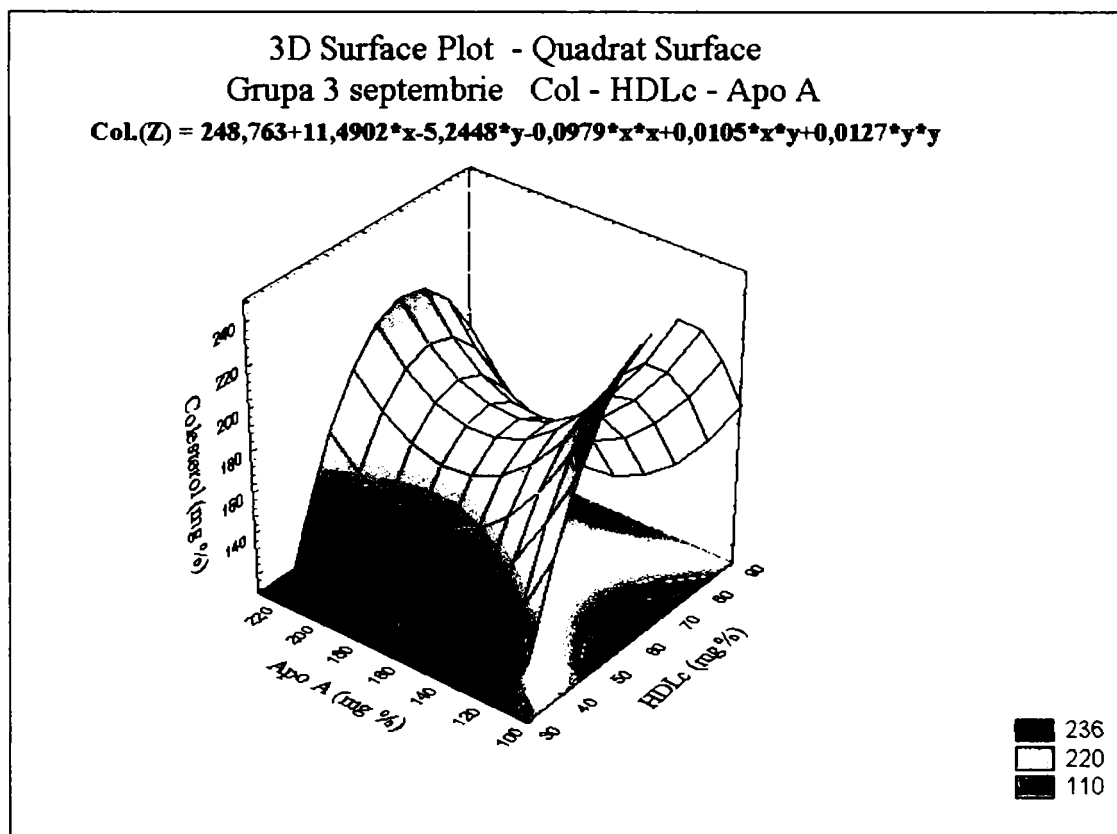
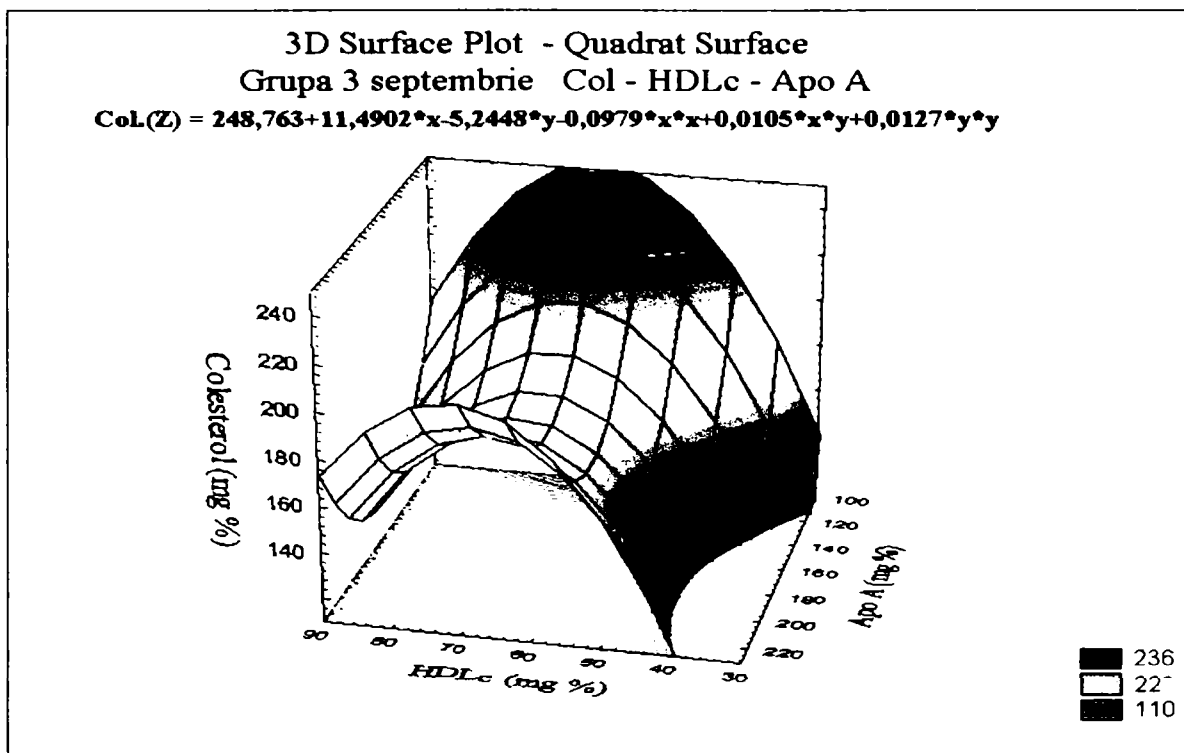
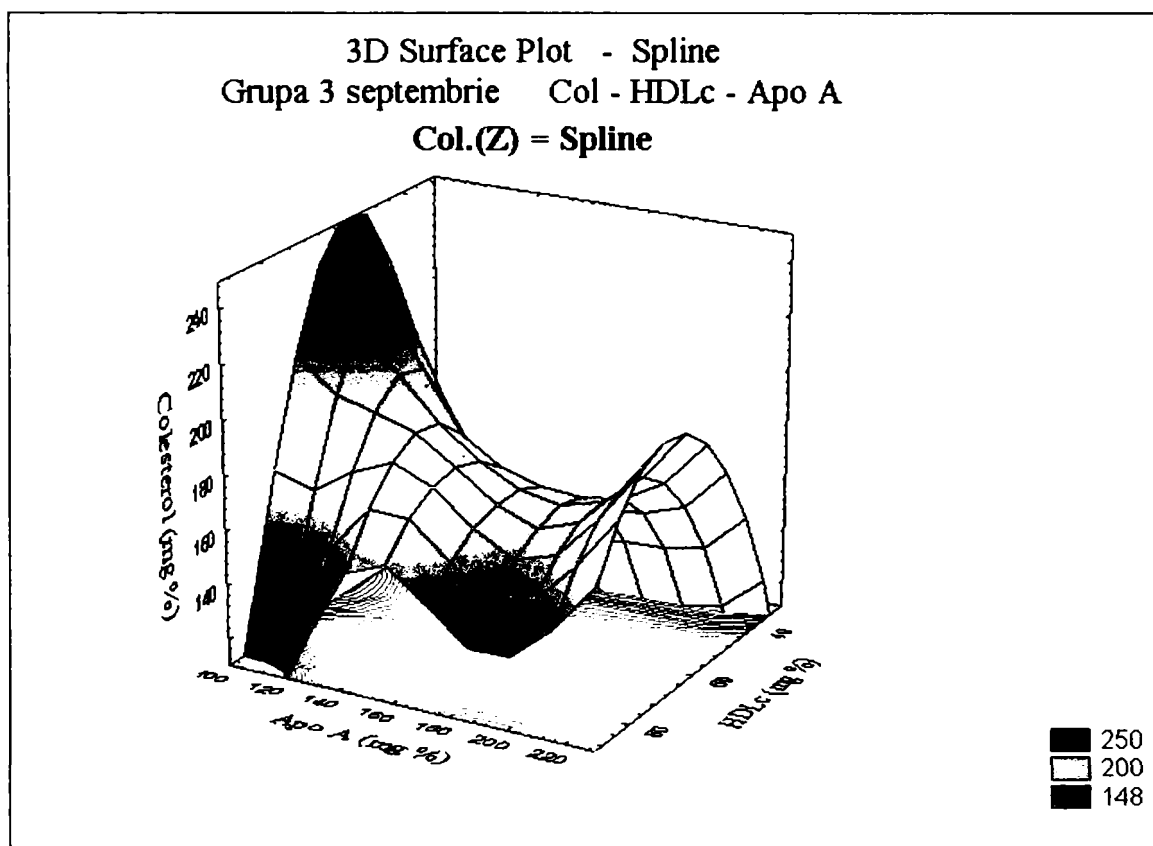


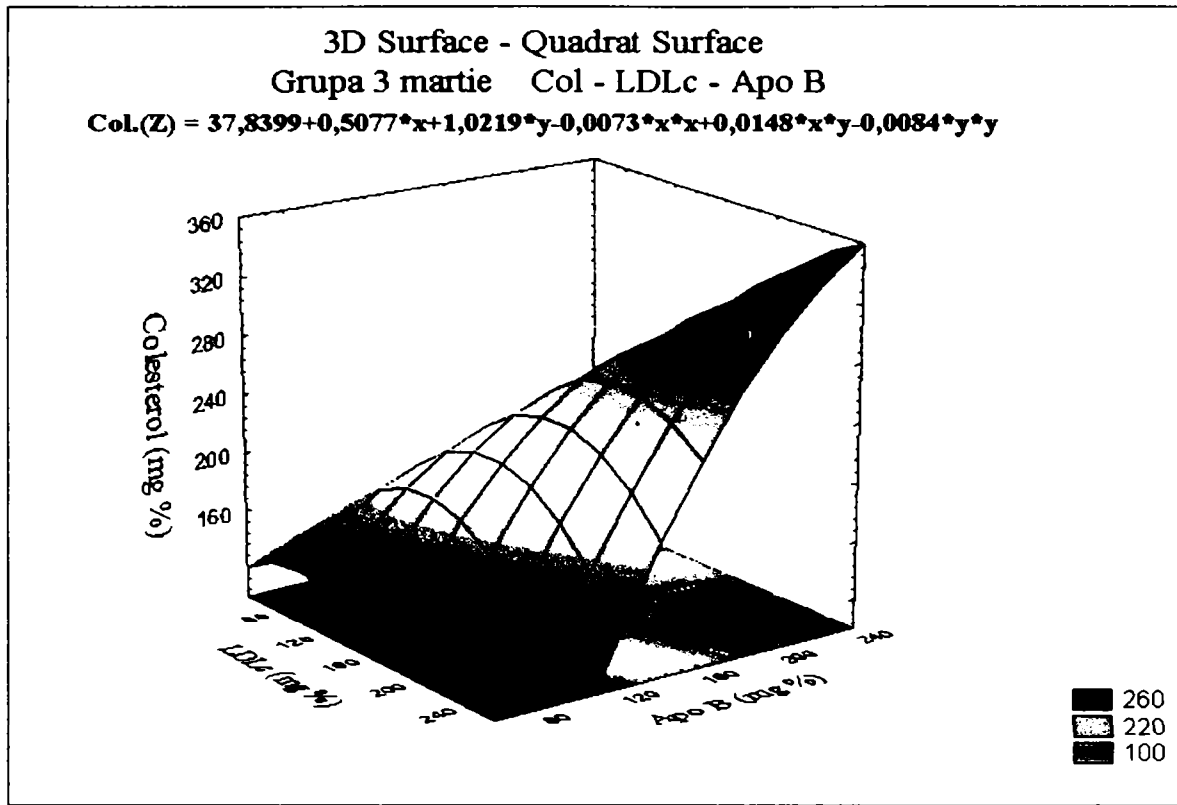
Fig. 6.88. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 3, septembrie) Quadratic surface areas



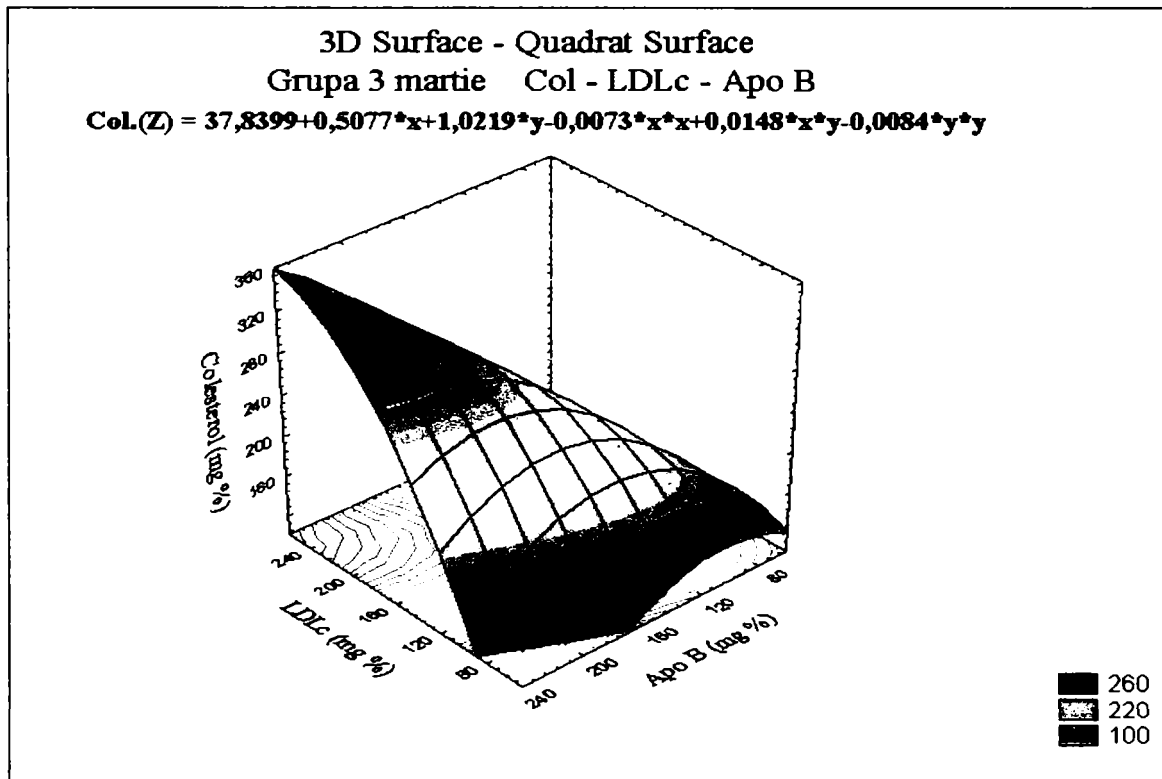
**Fig. 6.89. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 3, septembrie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.90. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 3, septembrie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.91. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 3, martie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.92. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 3, martie)
 Quadratic surface lines**

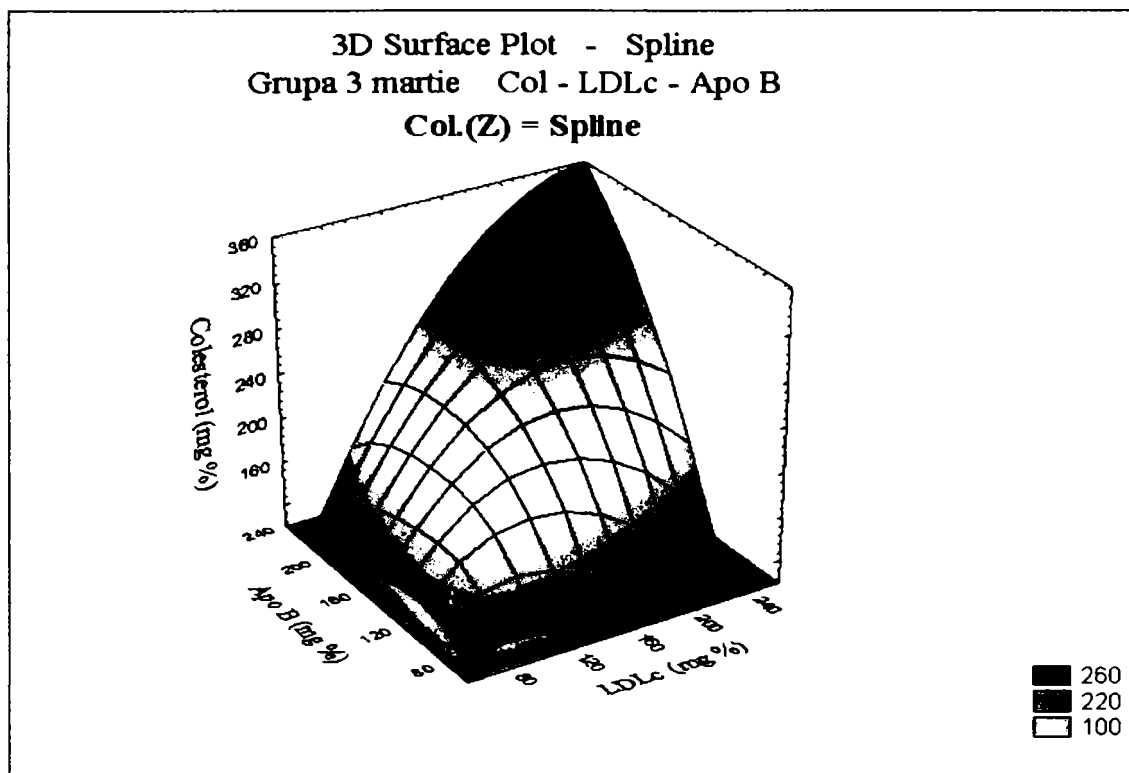


Fig. 6.93. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 3, martie) varianta – spline

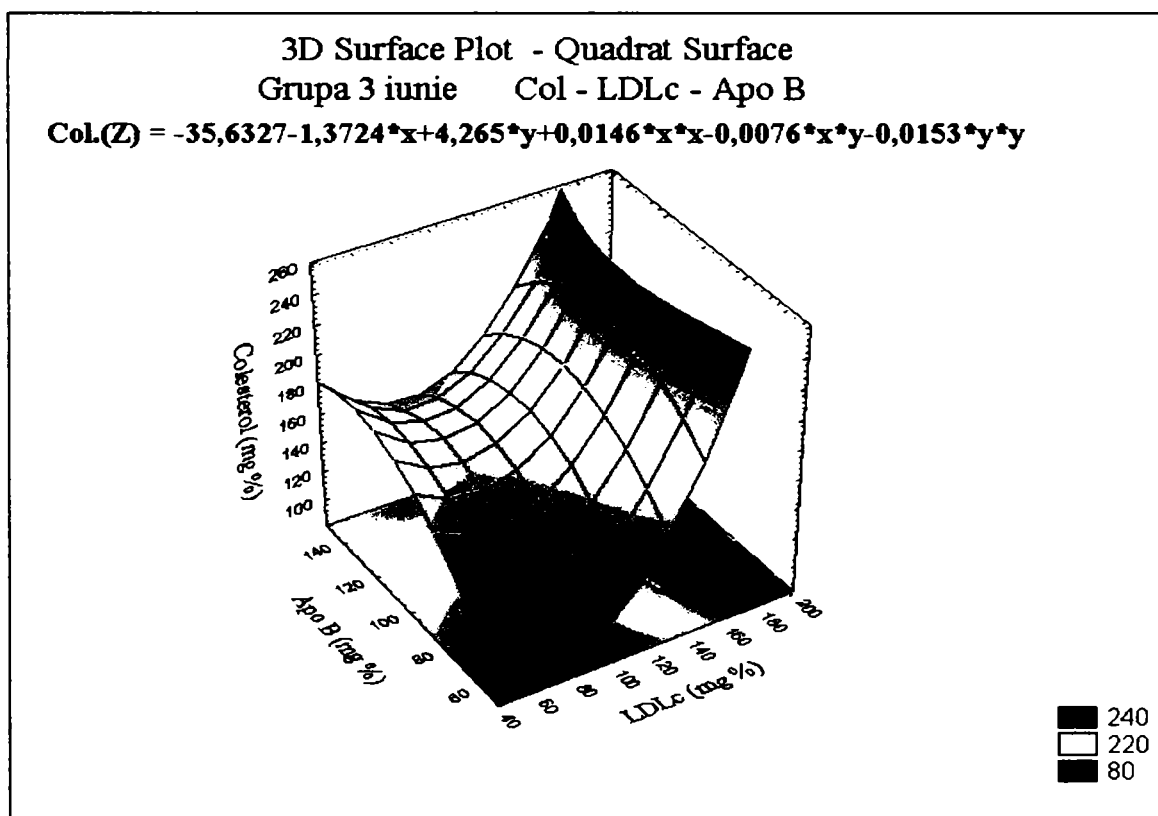
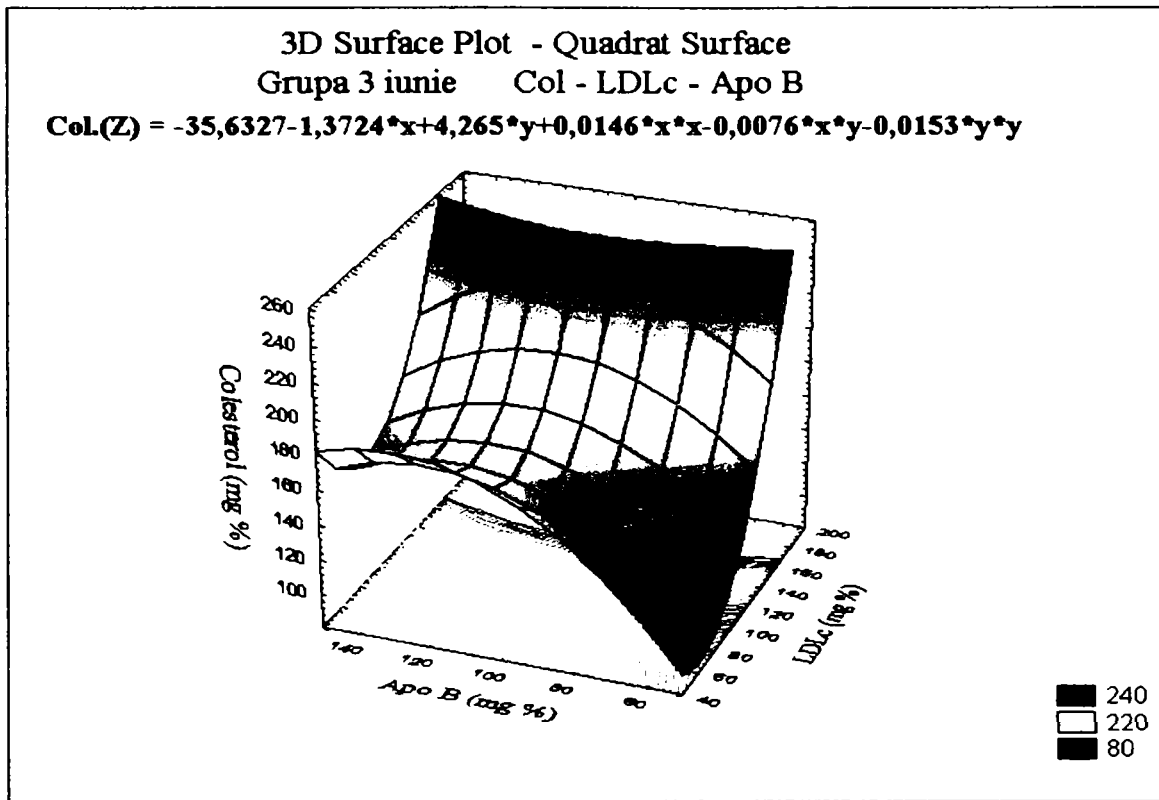
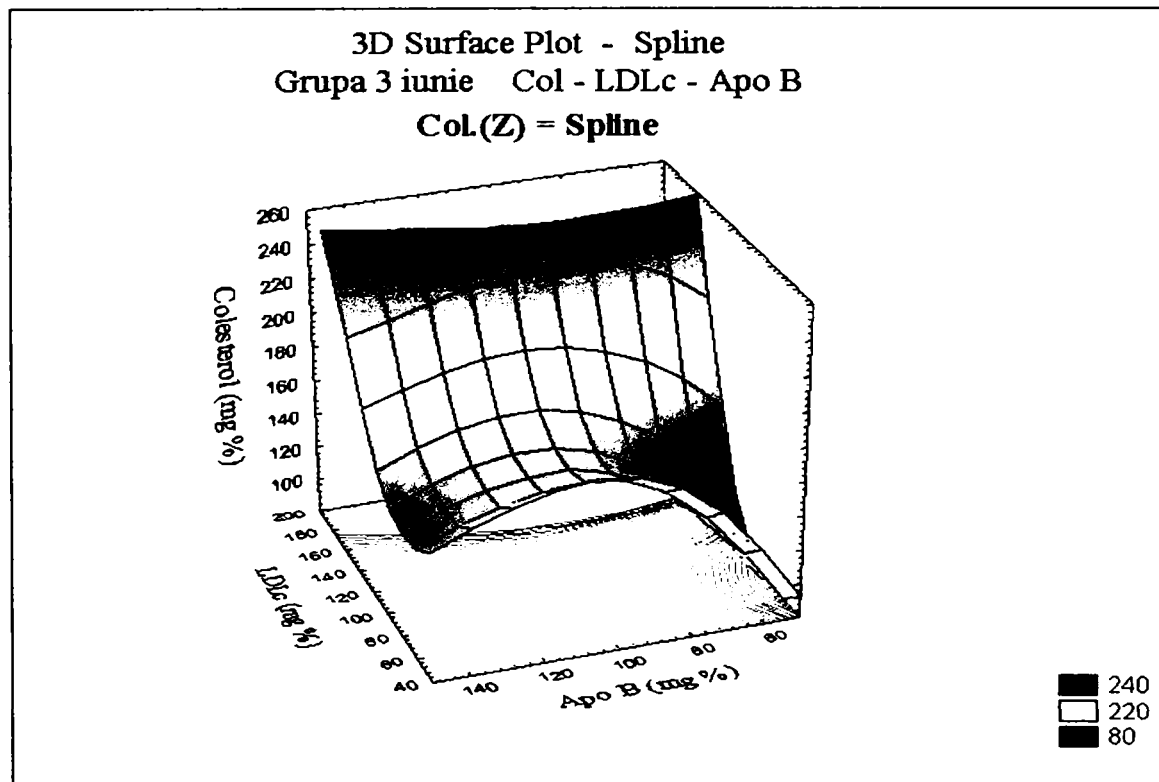


Fig. 6.94. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 3, iunie) Quadrat surface areas

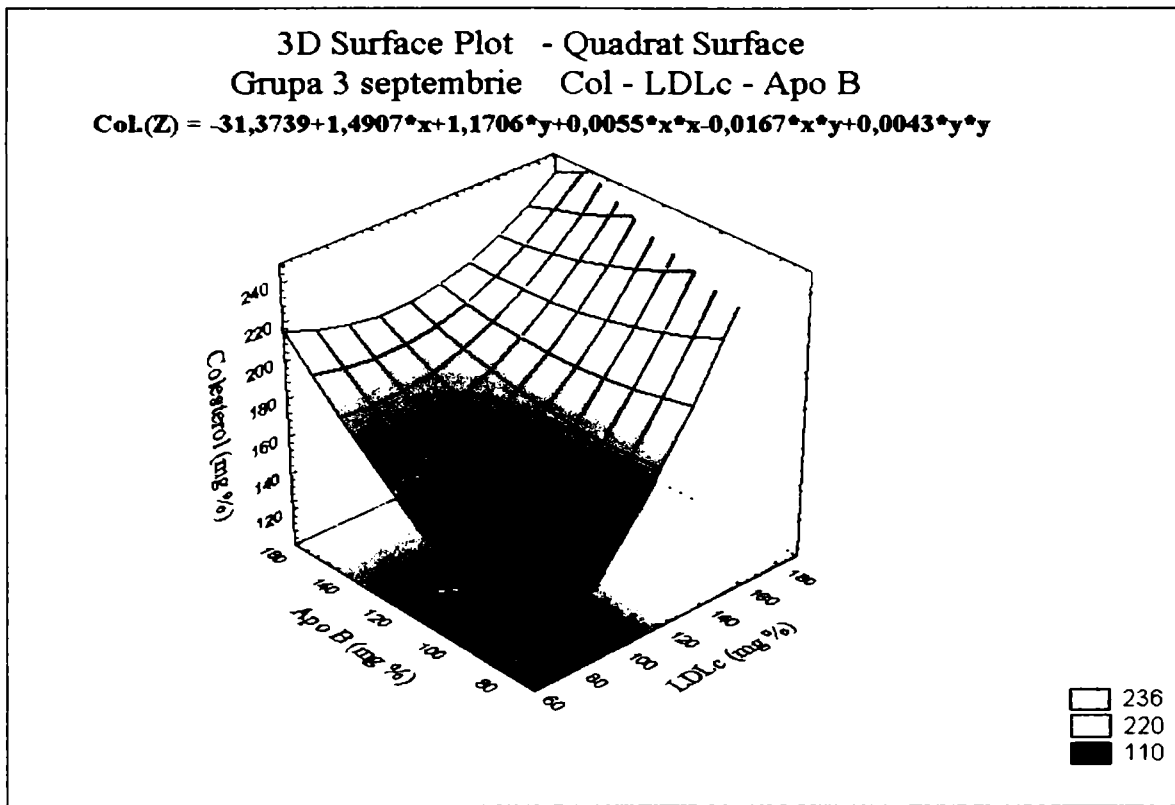


**Fig. 6.95. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 3, iunie)
 Quadratic surface lines**

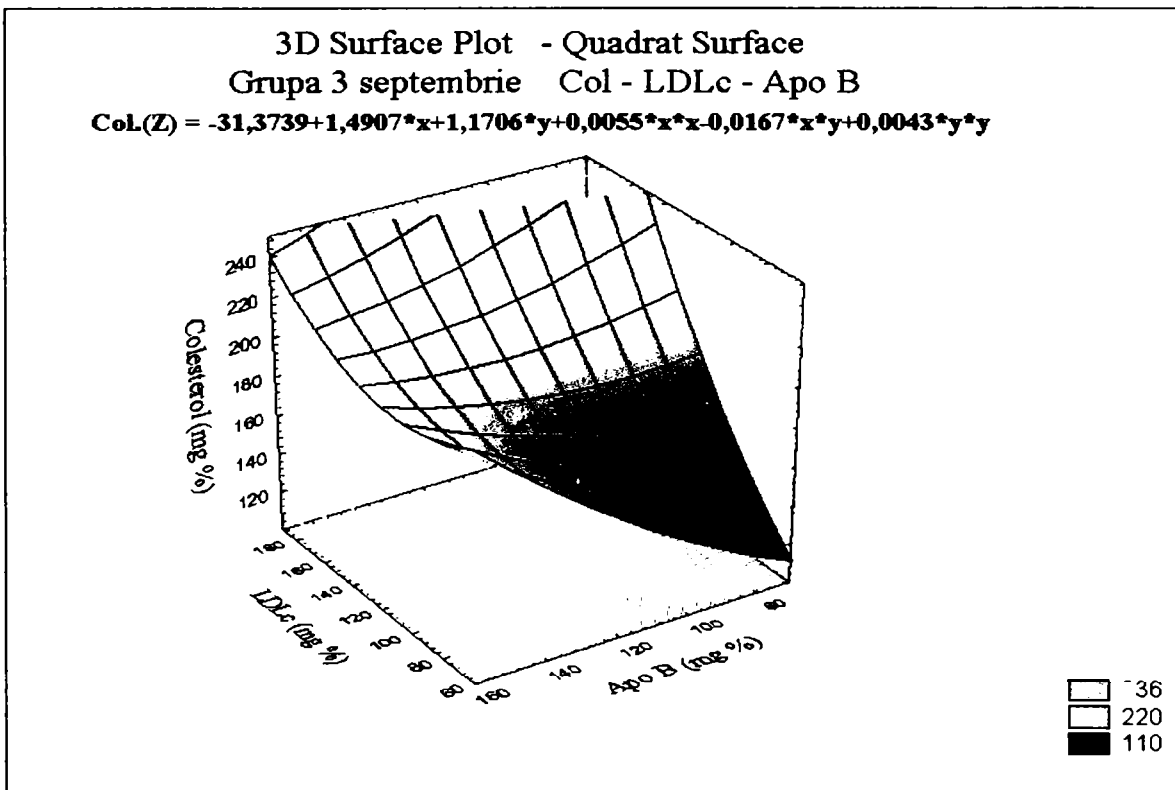


**Fig. 6.96. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 3, iunie)
 varianta – spline**

Universitatea Tehnică
 TULIȘOARA
 Bibliotecă centrală



**Fig. 6.97. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 3, septembrie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.98. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 3, septembrie)
 Quadratic surface lines**

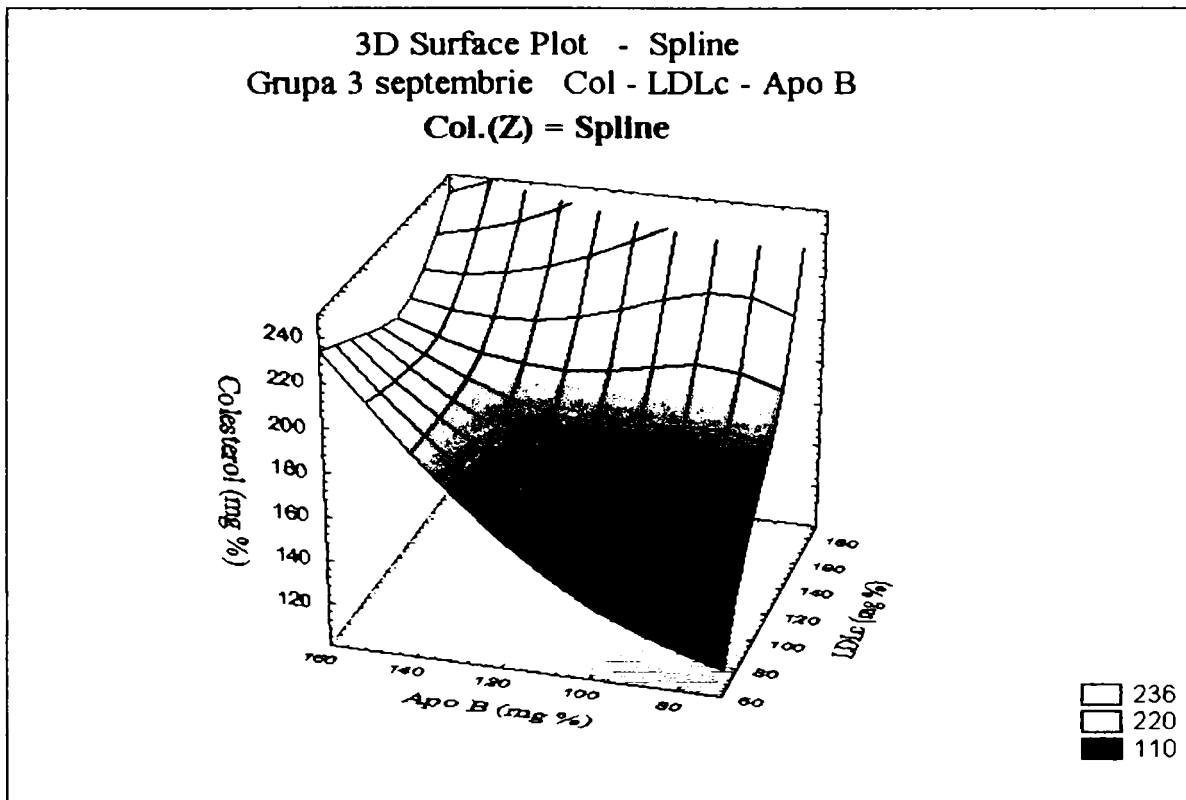


Fig. 6.99. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 3, septembrie) varianta – spline

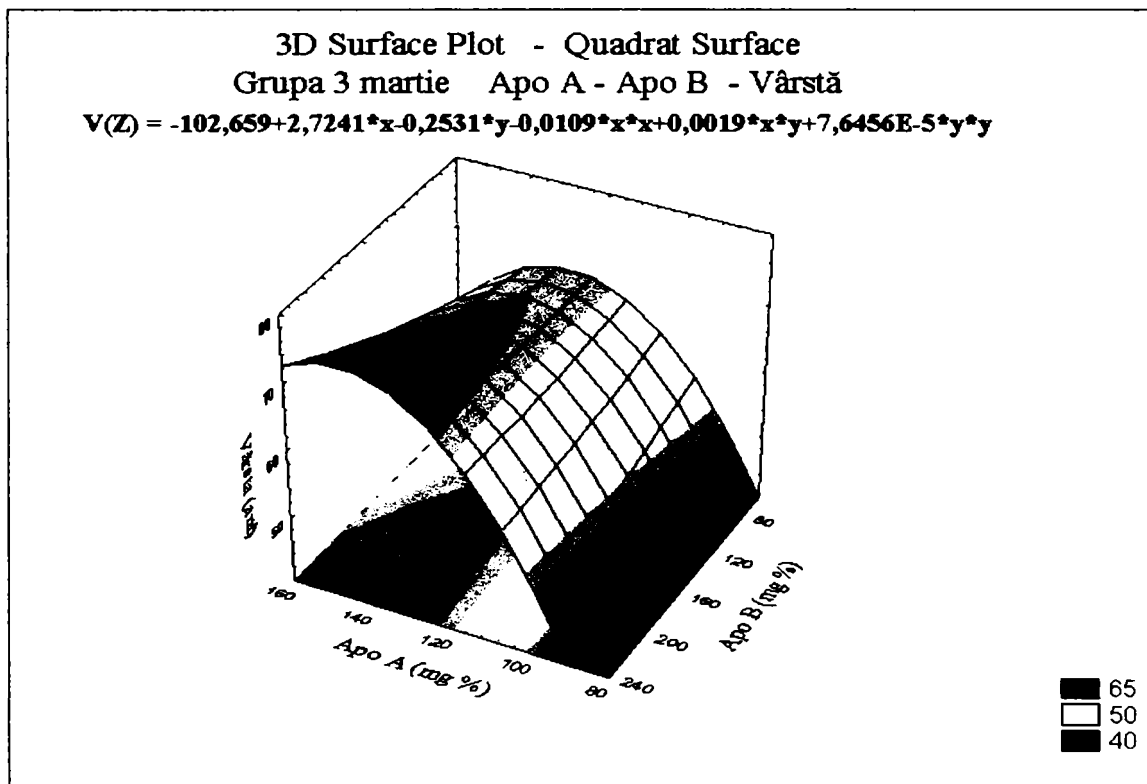
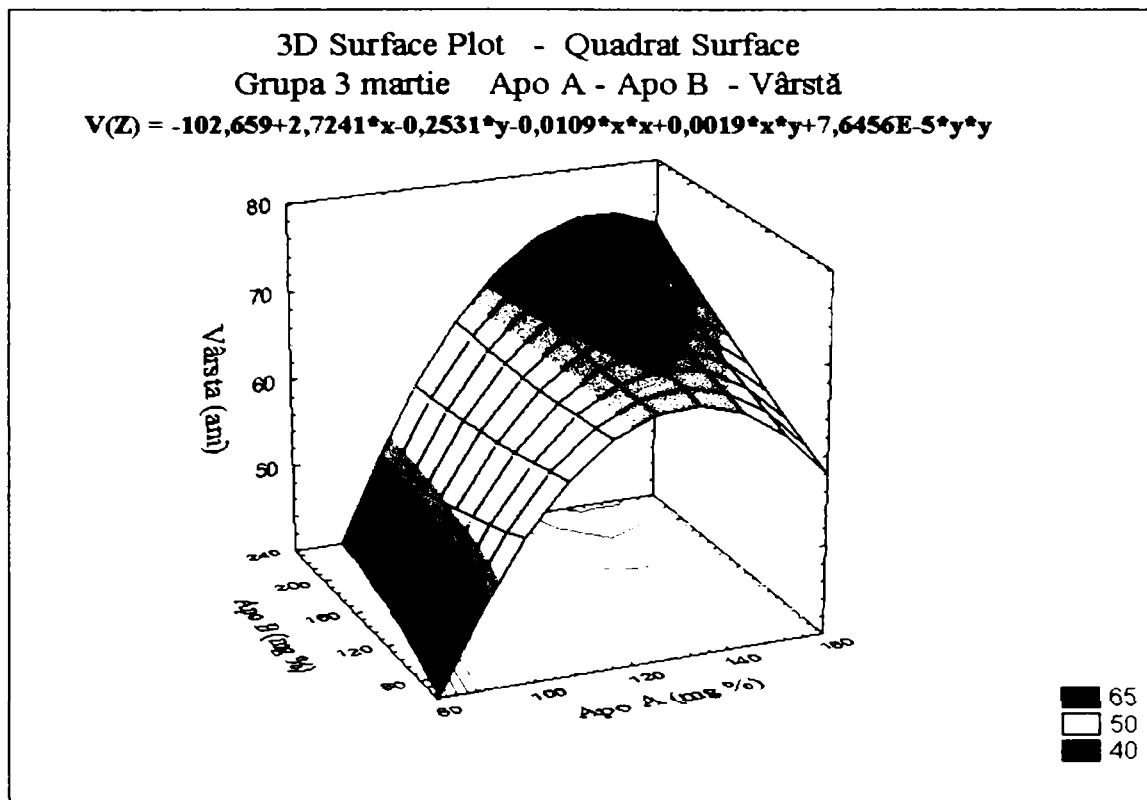
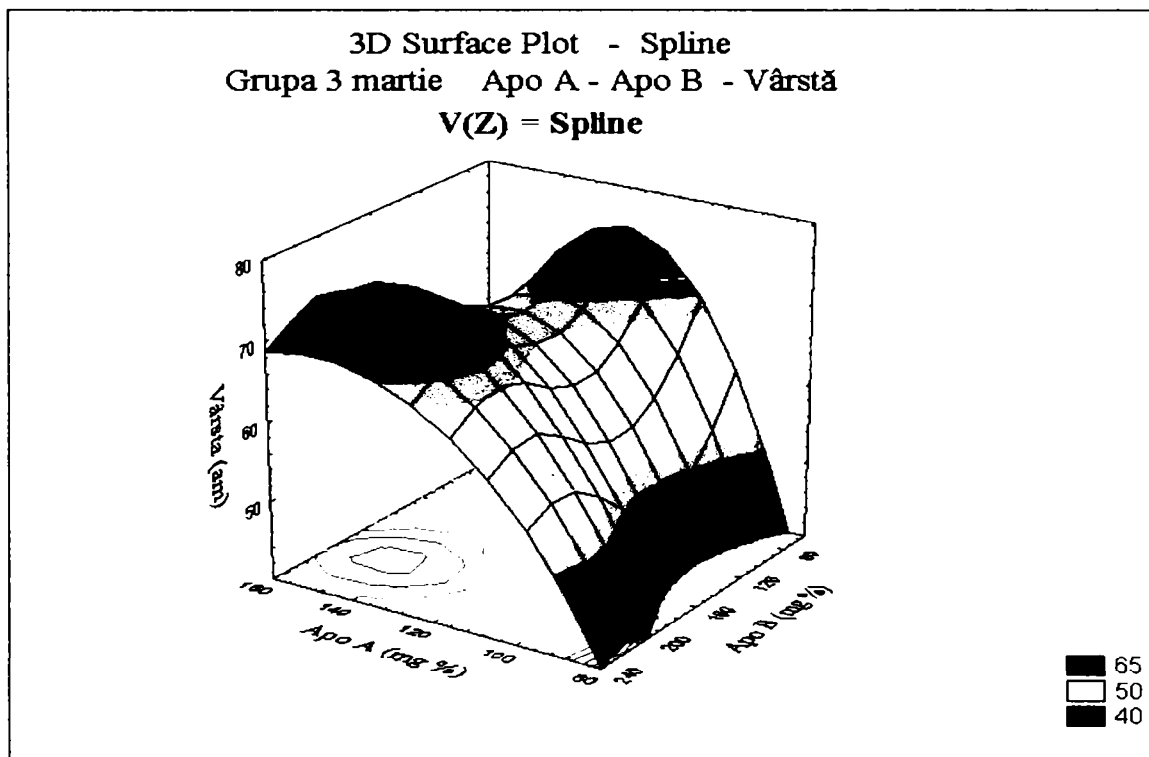


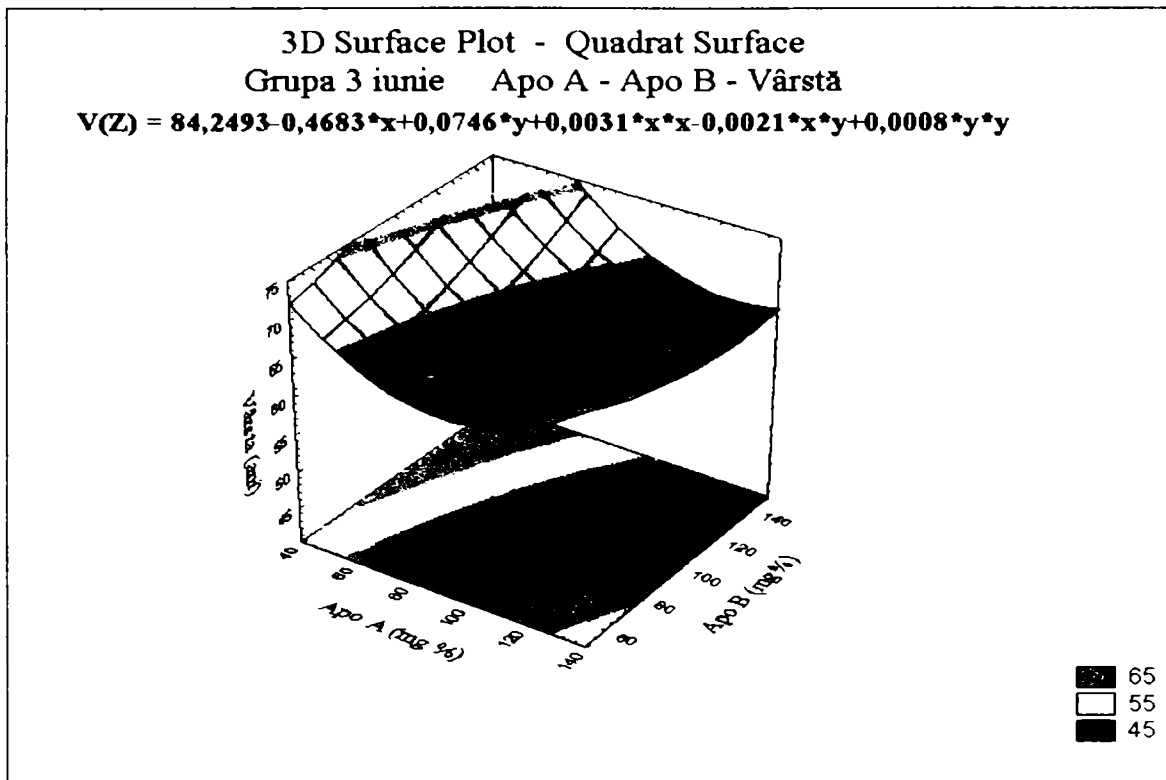
Fig. 6.100. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 3, martie) Quadrat surface areas



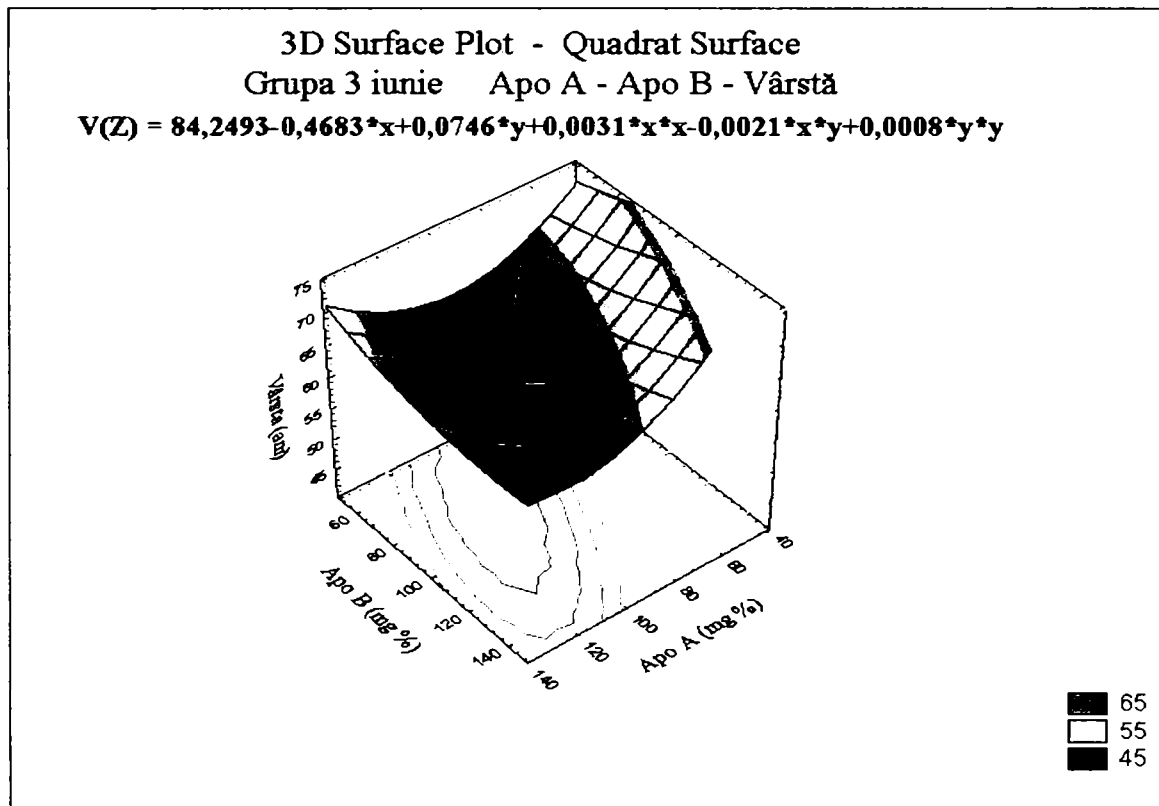
**Fig. 6.101. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 3, martie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.102. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 3, martie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.103. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 3, iunie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.104. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 3, iunie)
 Quadratic surface lines**

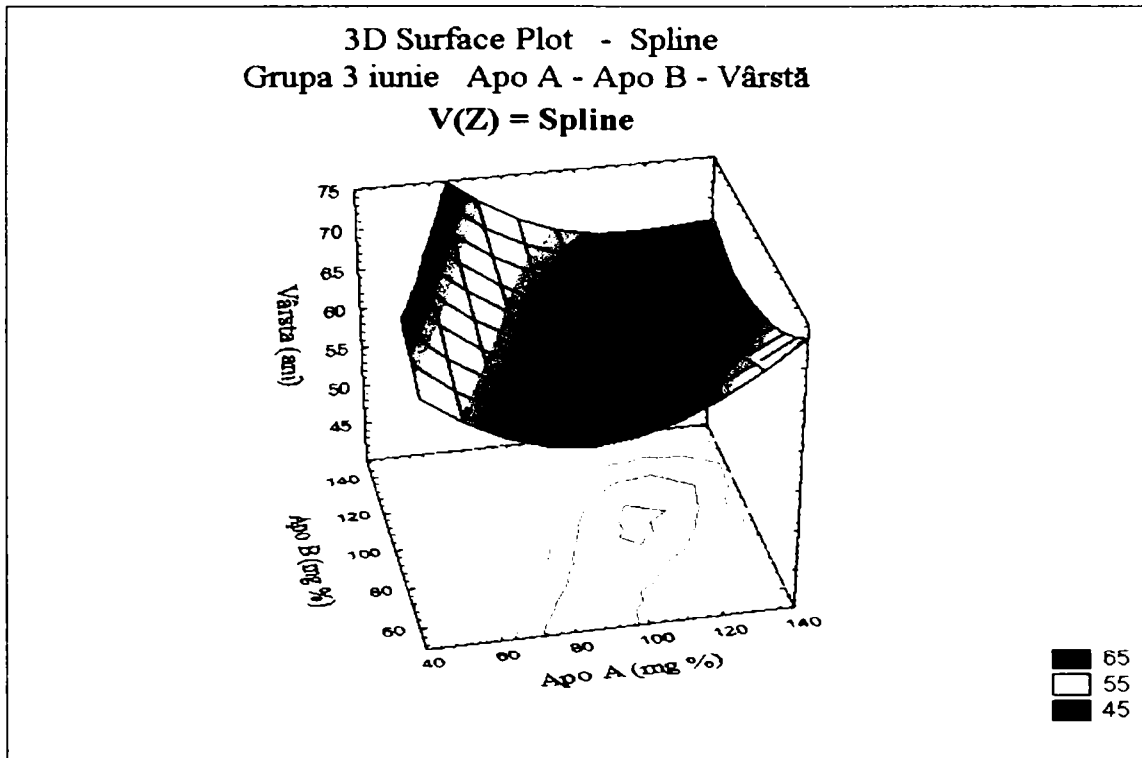


Fig. 6.105. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 3, iunie) varianta – spline

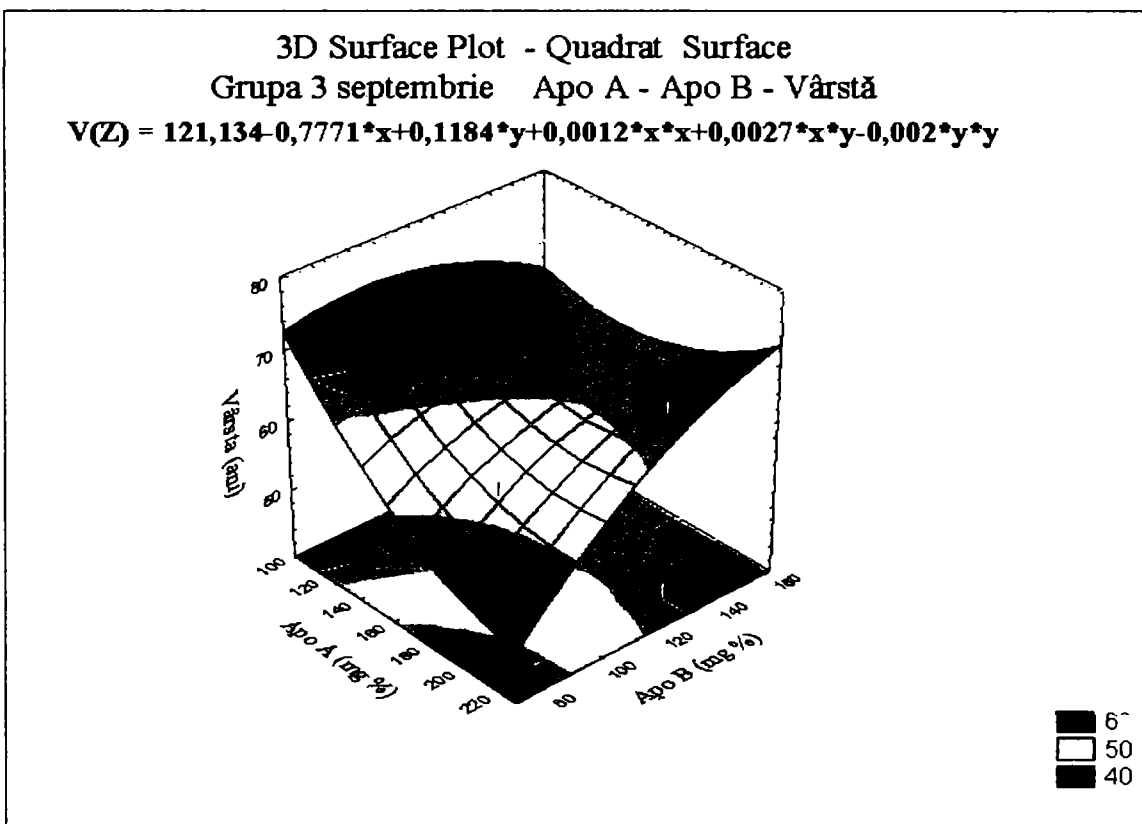
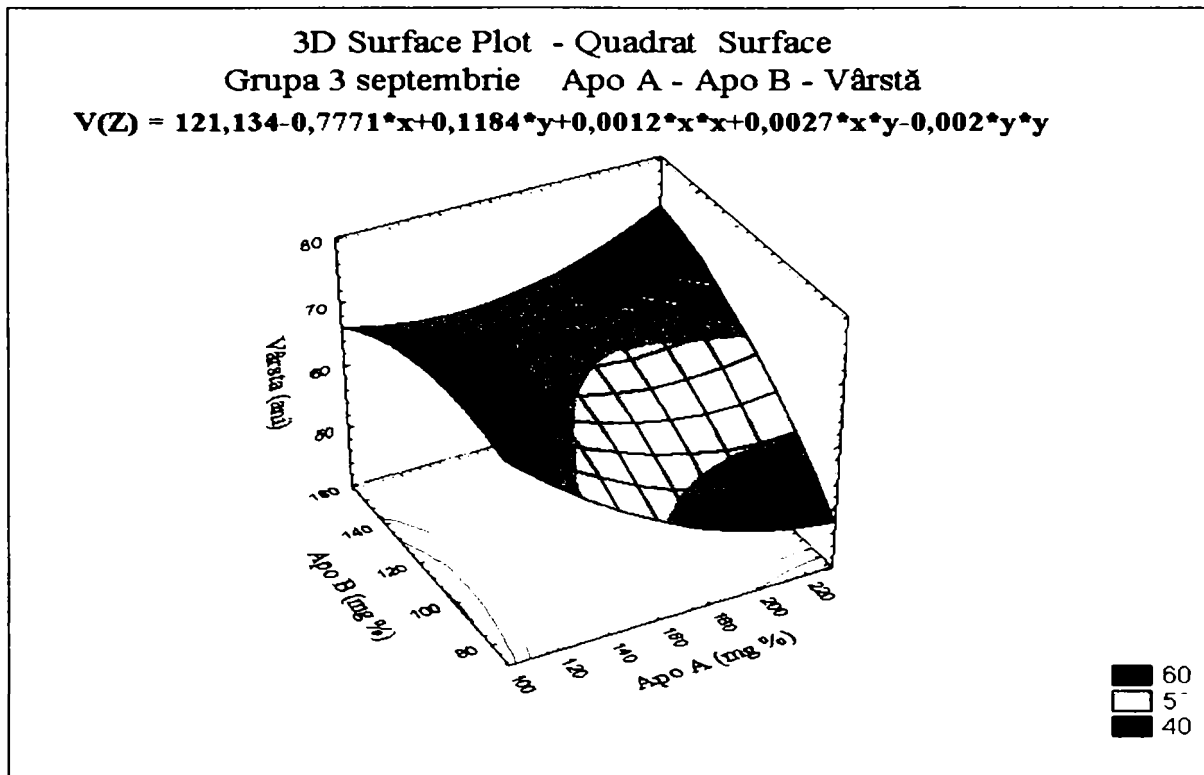
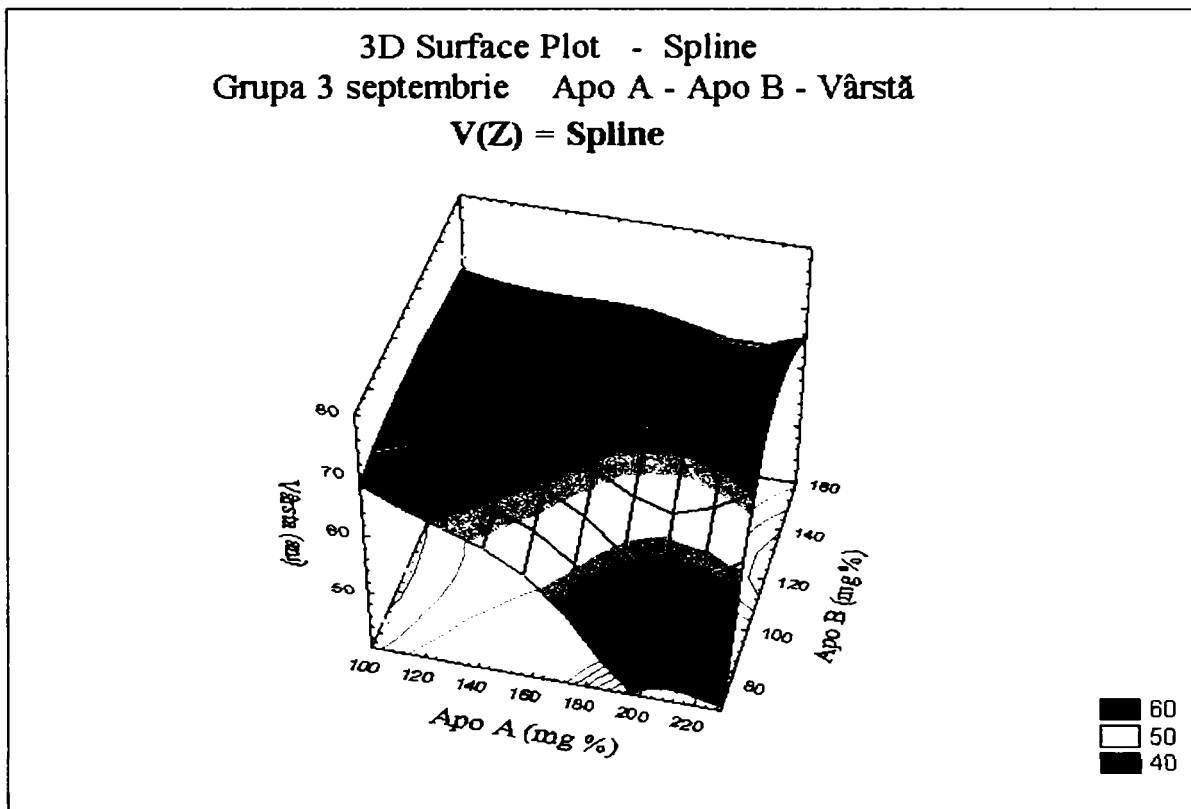


Fig. 6.106. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 3, septembrie) Quadrat surface areas



**Fig. 6.107. Variația apo A-apo B-vârstă (grupa 3, septembrie)
 Quadrat surface lines**



**Fig. 6.108. Variația apo A-apo B-vârstă (grupa 3, septembrie)
 varianta – spline**

Examinând rezultatele determinărilor fracțiilor lipidice, (fig.6.73-6.108), la grupa 3 - bărbați cu vârsta cuprinsă între 46-75 ani, cu o medie de 66 de ani, se remarcă la prima determinare (martie), valori ale colesterolului total sub limita protectoare antiaterogenă, la 7 subiecți (38,88%). Remarcăm valoarea de 21 mg % la un subiect de 46 de ani, ceea ce dovedește vârsta critică pentru apariția cardiopatiei ischemice și mai ales a unui infarct miocardic. La următoarele 2 determinări (iunie, septembrie), valori scăzute ale HDLc s-au întâlnit doar la un subiect (5,55%). Interpretăm această ameliorare a valorilor HDLc, prin corectarea factorilor de risc aterogen și prin tratamentul cu statine.

Procentajul redus (5,55%) de subiecți cu HDLc scăzut, credem că se datorează în mare măsură și vârstei crescute a majorității subiecților, știută fiind scăderea incidenței cardiopatiei ischemice cu înaintarea în vârstă.

Aceleași corelații s-au făcut, dar în sens invers, cu valorile LDLc, care la subiecții cu HDLc scăzut la prima determinare au fost crescute, iar la următoarele două determinări, doar la un subiect ele au rămas crescute, la ceilalți 6 subiecți ele scăzând sub limita riscului aterogen.

Grupa 4 Femei

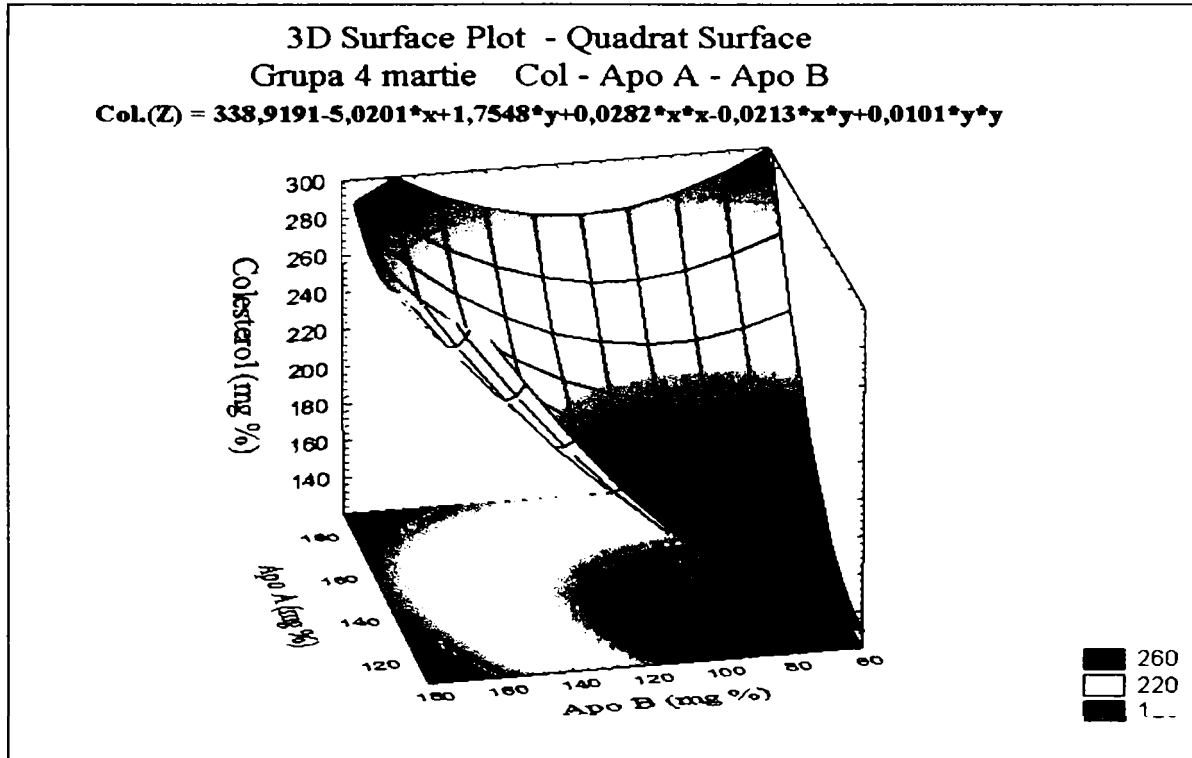


Fig. 6.109. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 4, martie)
 Quadratic surface areas

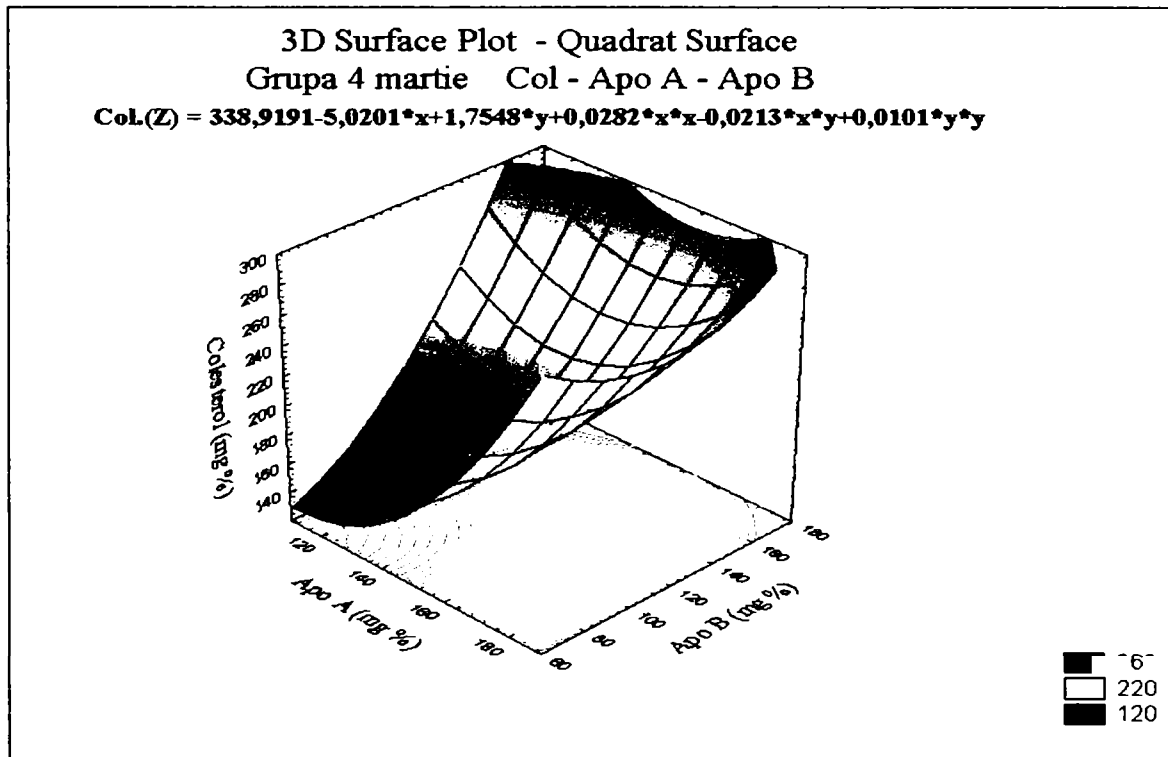


Fig. 6.110. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 4, martie)
 Quadratic surface lines

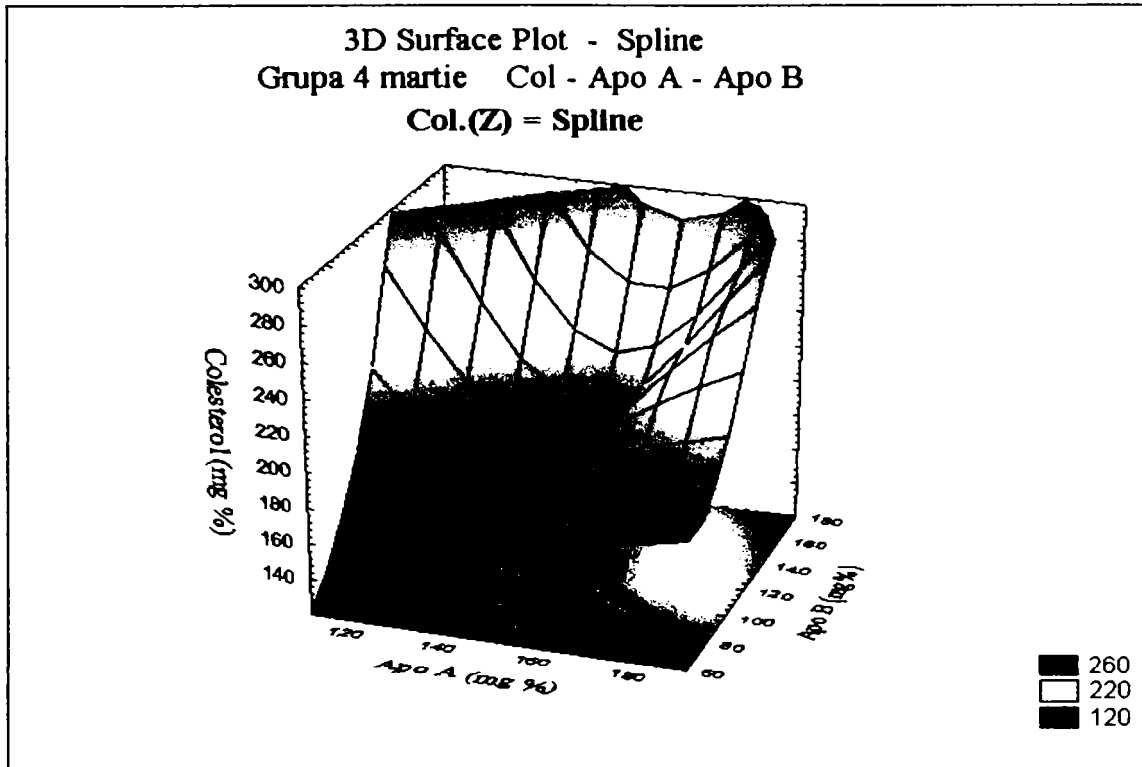


Fig. 6.111. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 4, martie) varianta – spline

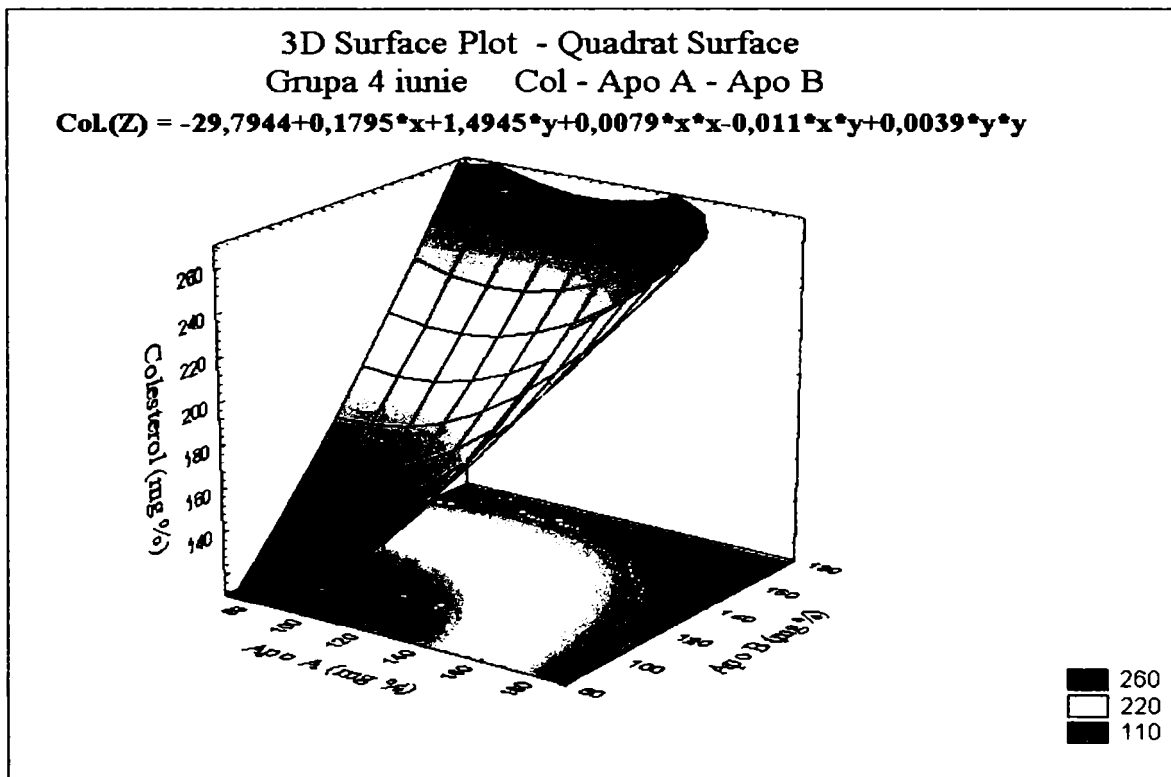
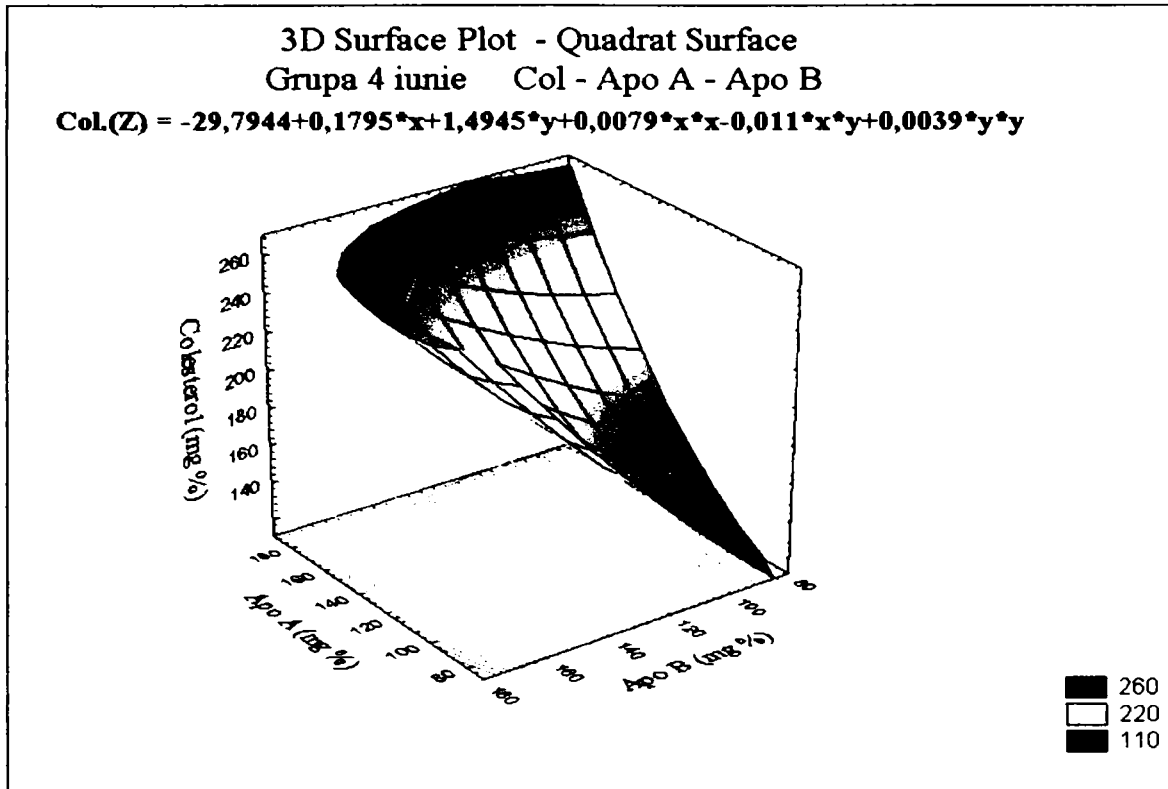
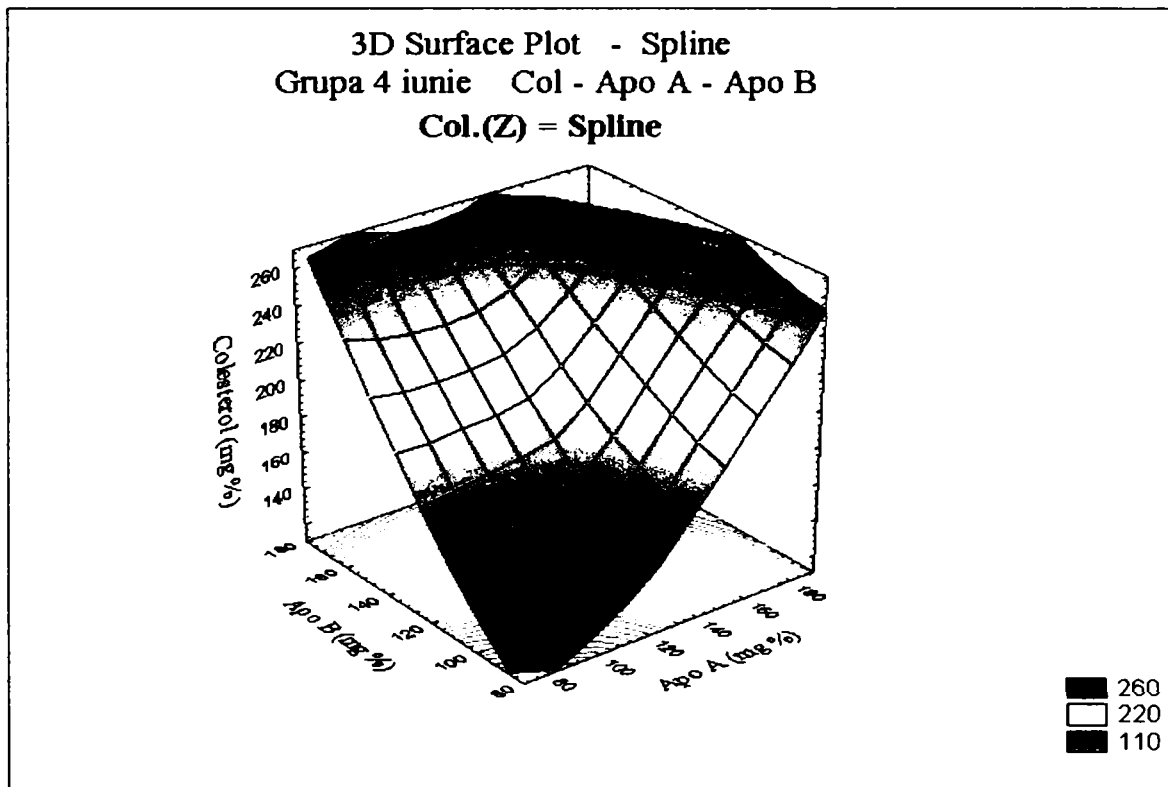


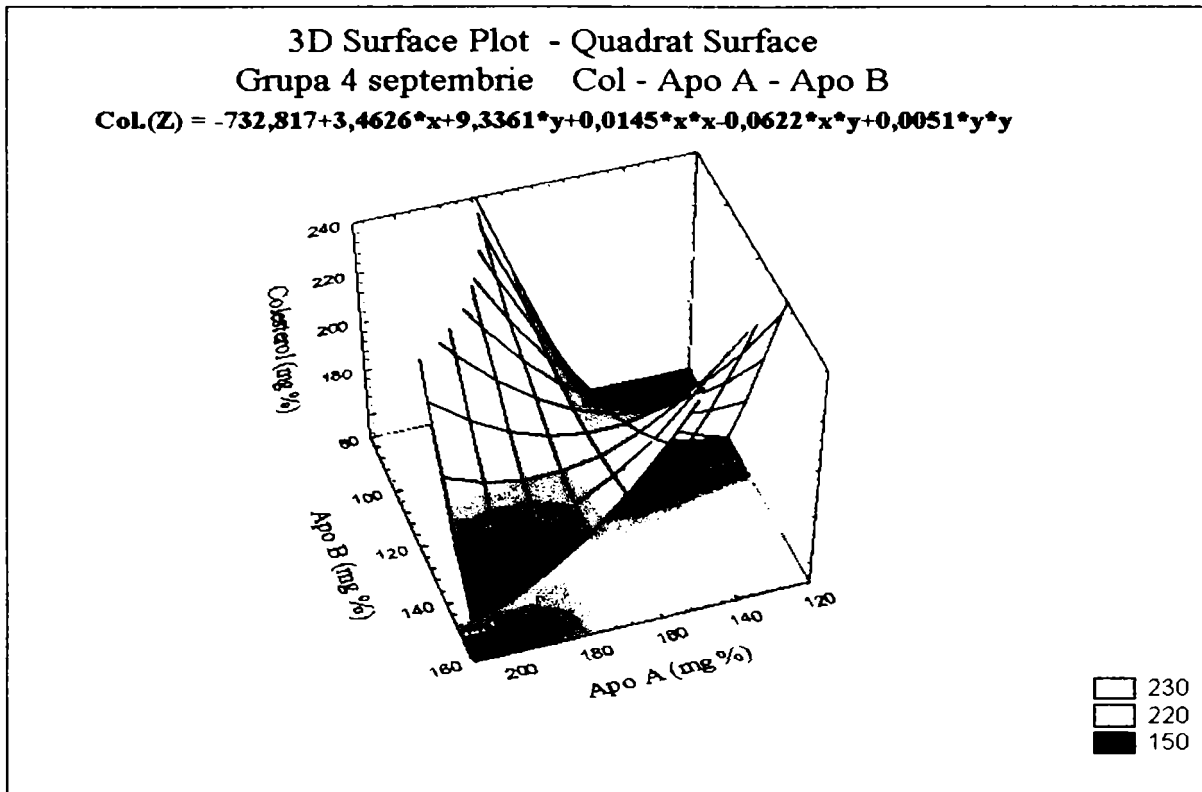
Fig. 6.112. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 4, iunie) Quadrat surface areas



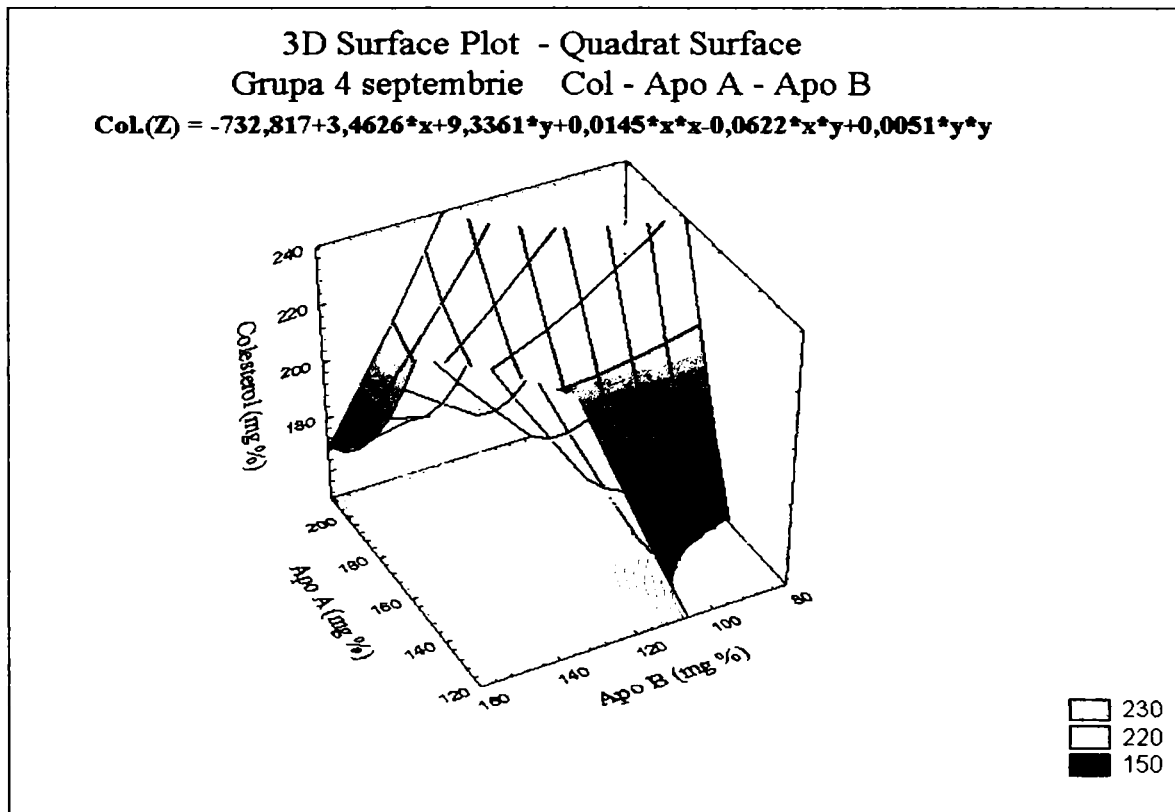
**Fig. 6.113. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 4, iunie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.114. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 4, iunie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.115. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 4, septembrie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.116. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 4, septembrie)
 Quadratic surface lines**

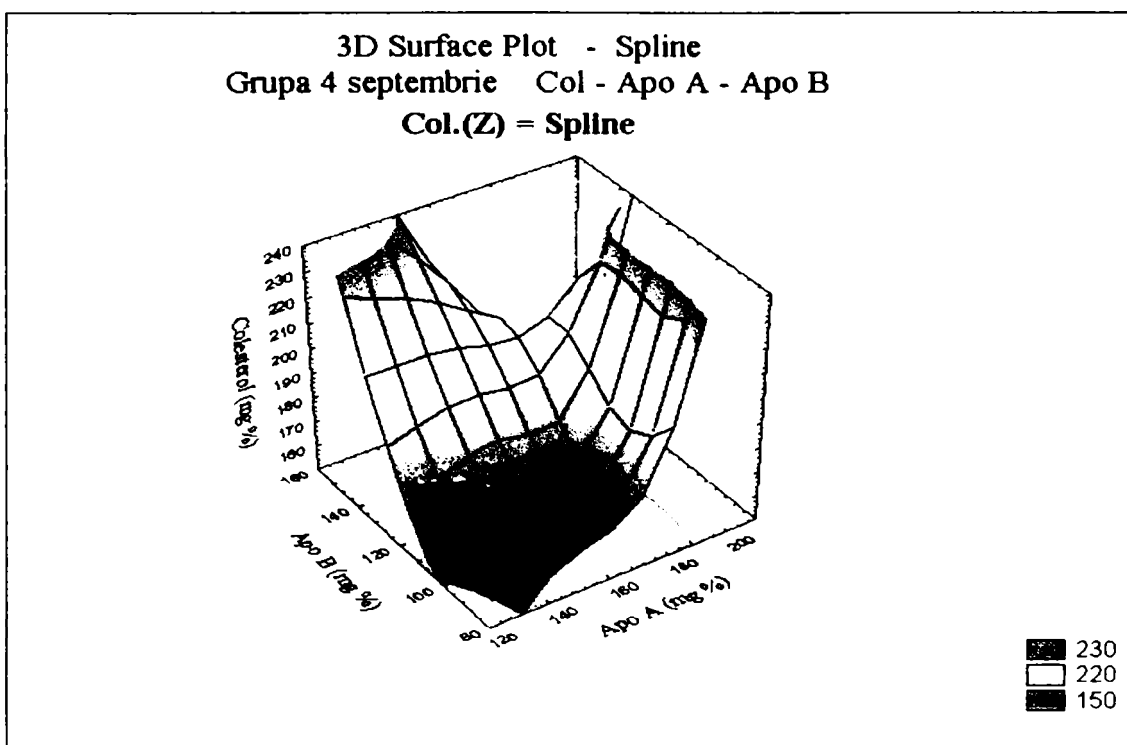


Fig. 6.117. Variația colesterol-apo A-apo B (grupa 4, septembrie) varianta – spline

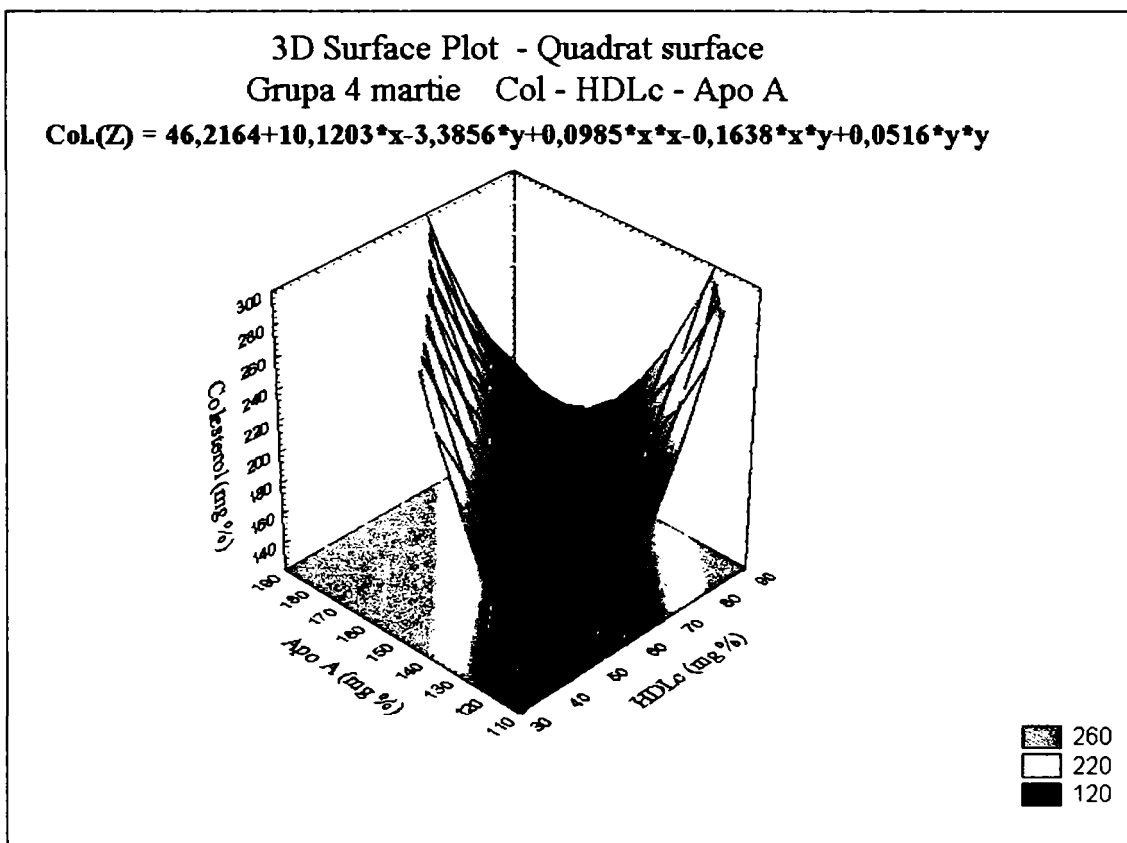
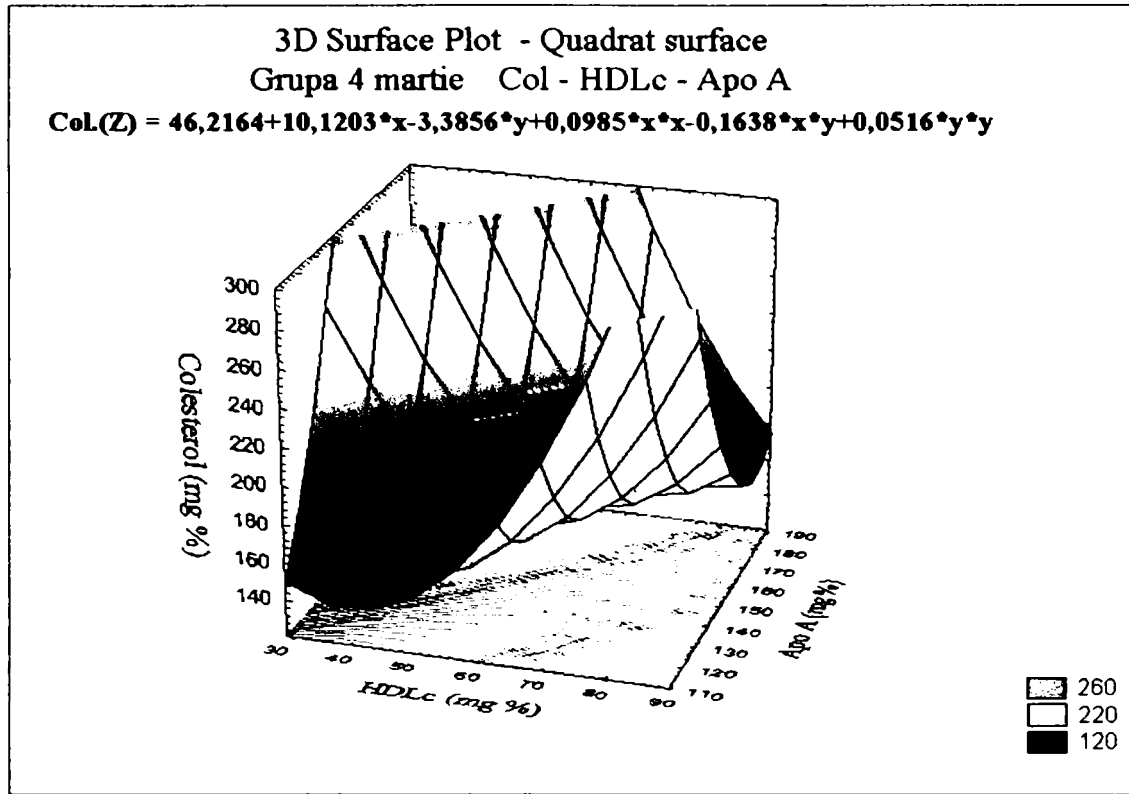
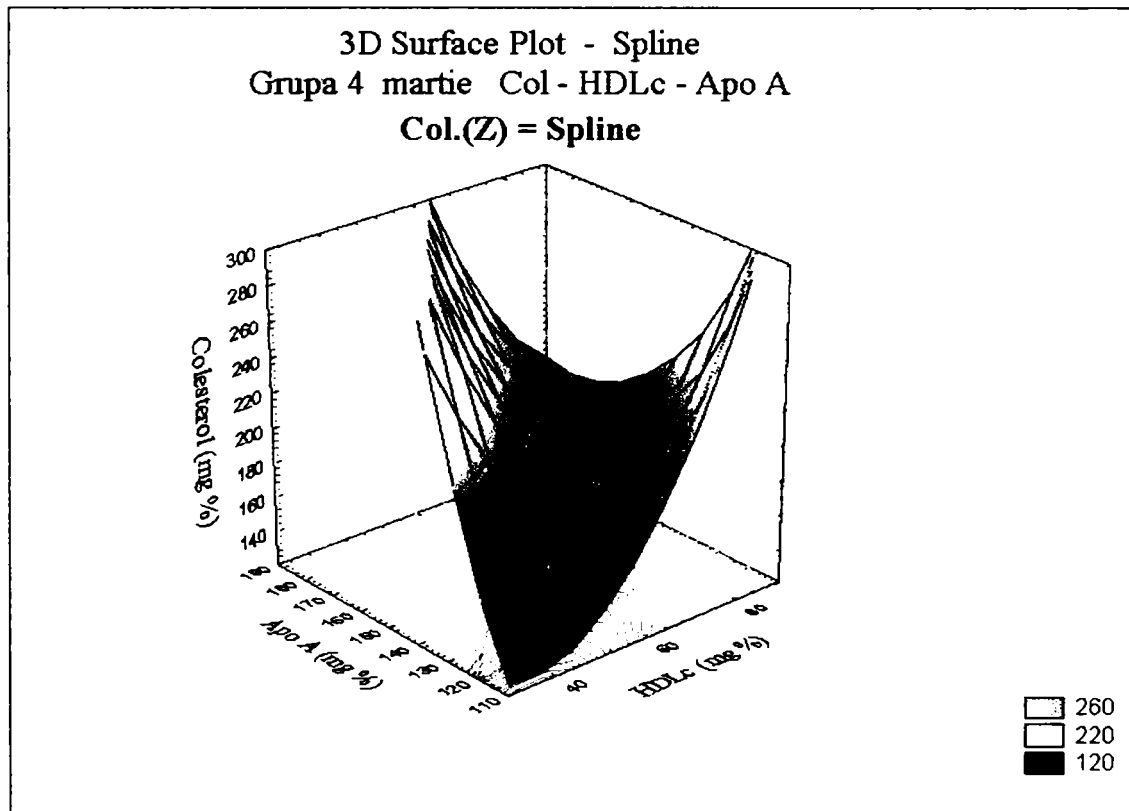


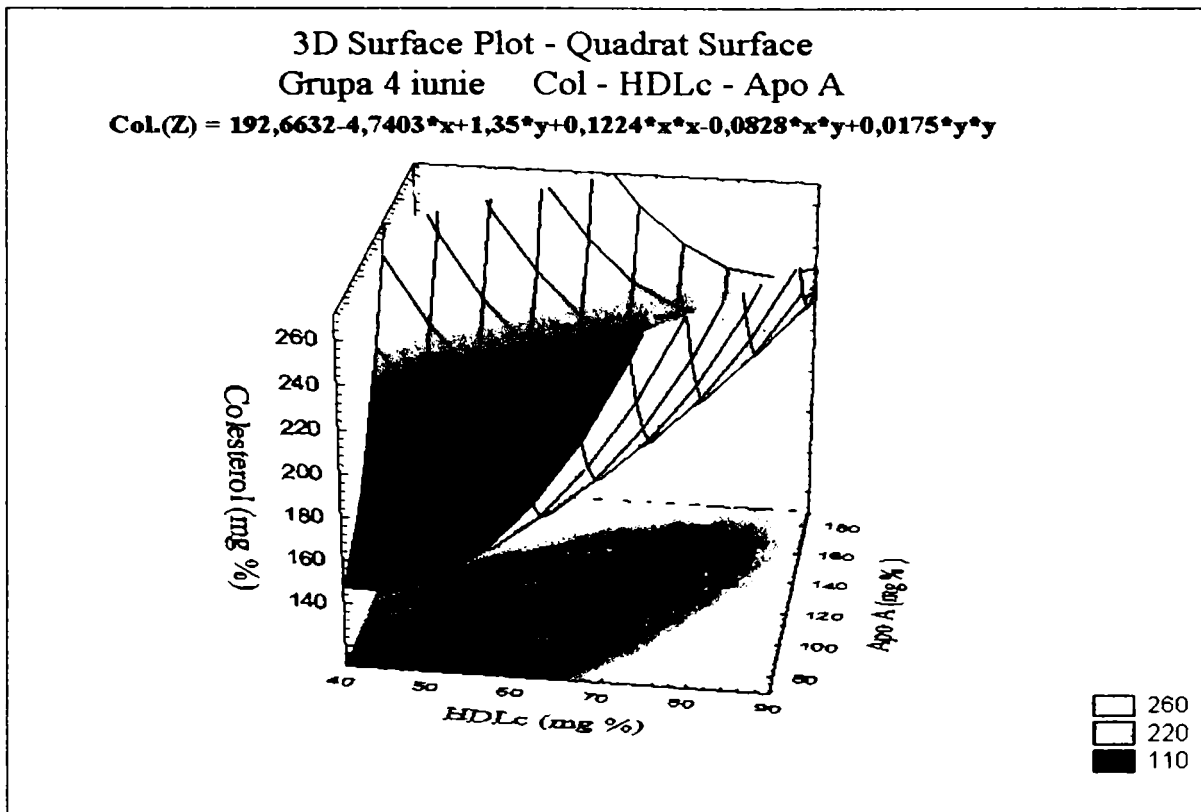
Fig. 6.118. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 4, martie) Quadrat surface areas



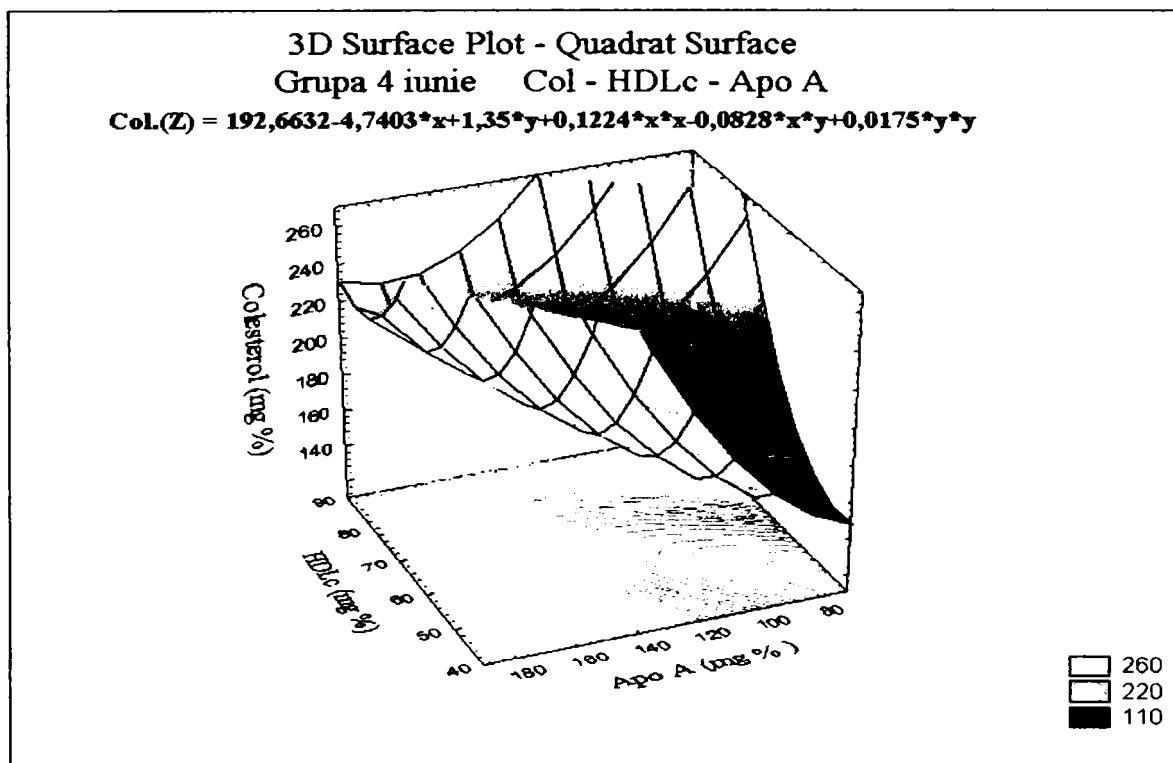
**Fig. 6.119. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 4, martie)
 Quadrat surface lines**



**Fig. 6.120. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 4, martie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.121. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 4, iunie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.122. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 4, iunie)
 Quadratic surface lines**

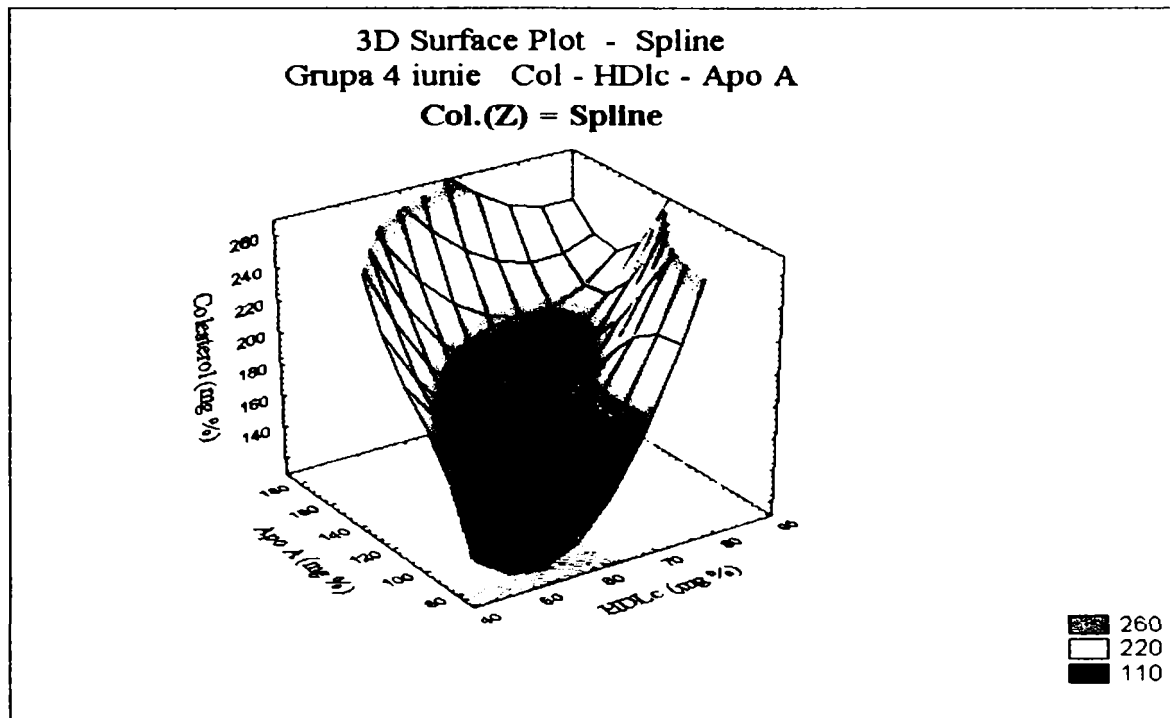


Fig. 6.123. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 4, iunie) varianta – spline

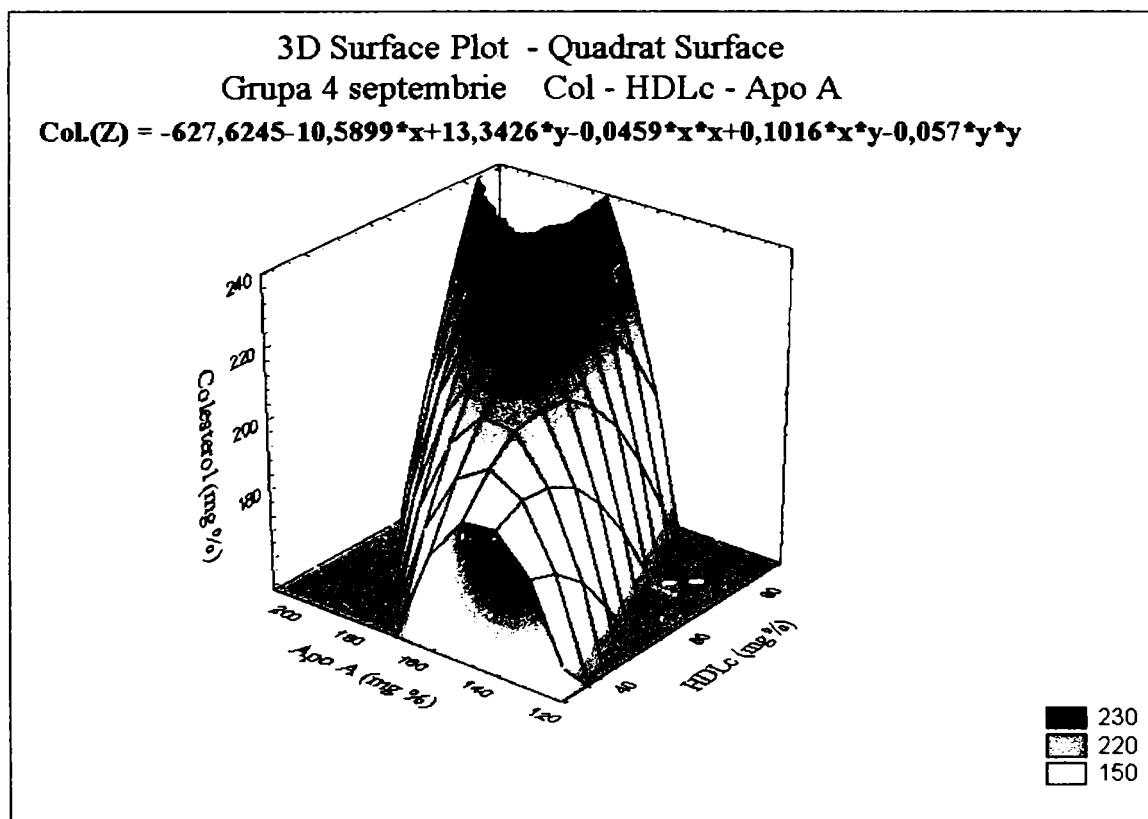
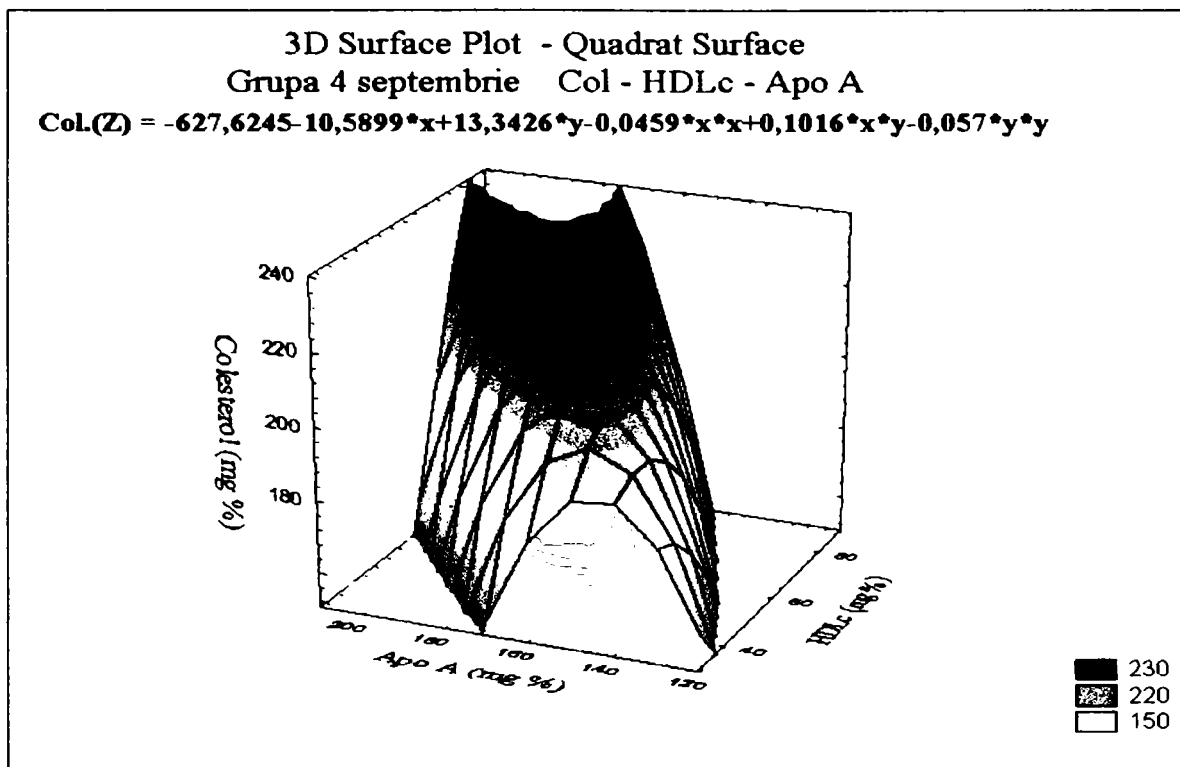
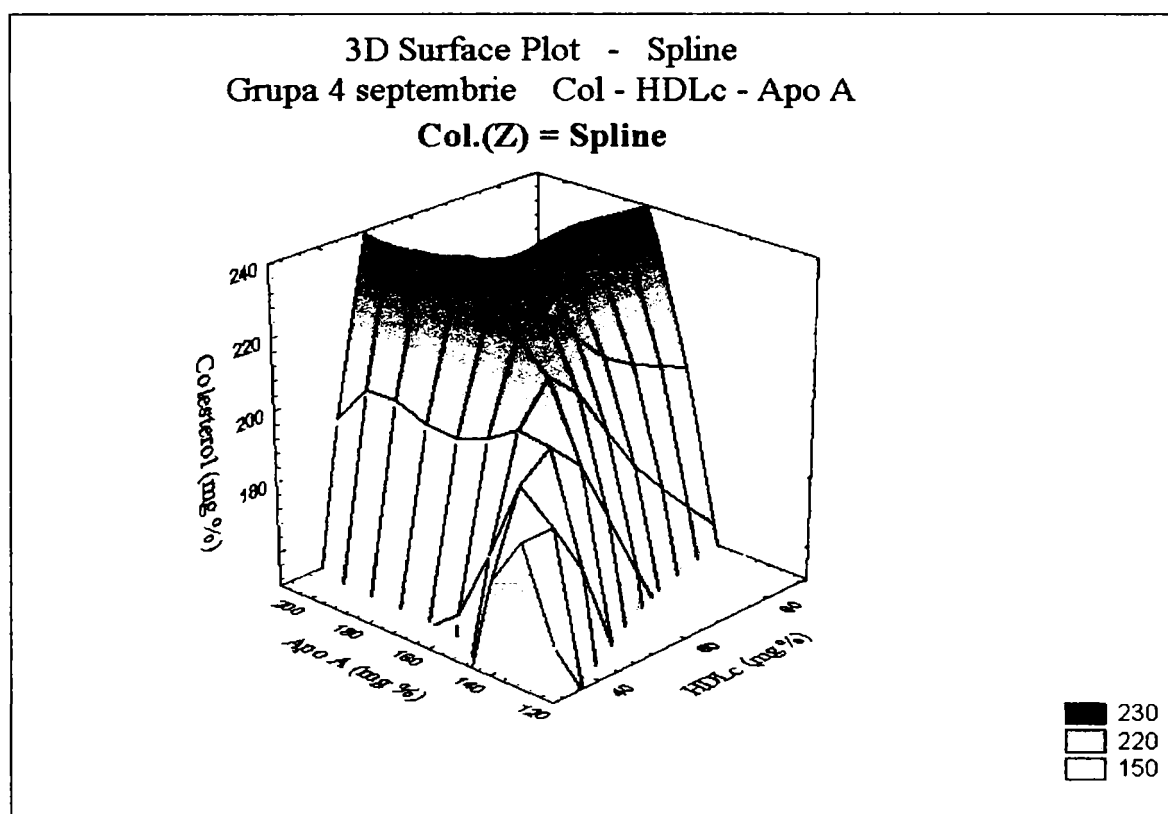


Fig. 6.124. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 4, septembrie) Quadratic surface areas



**Fig. 6.125. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 4, septembrie)
 Quadrat surface lines**



**Fig. 6.126. Variația colesterol-HDLc-apo A (grupa 4, septembrie)
 varianta – spline**

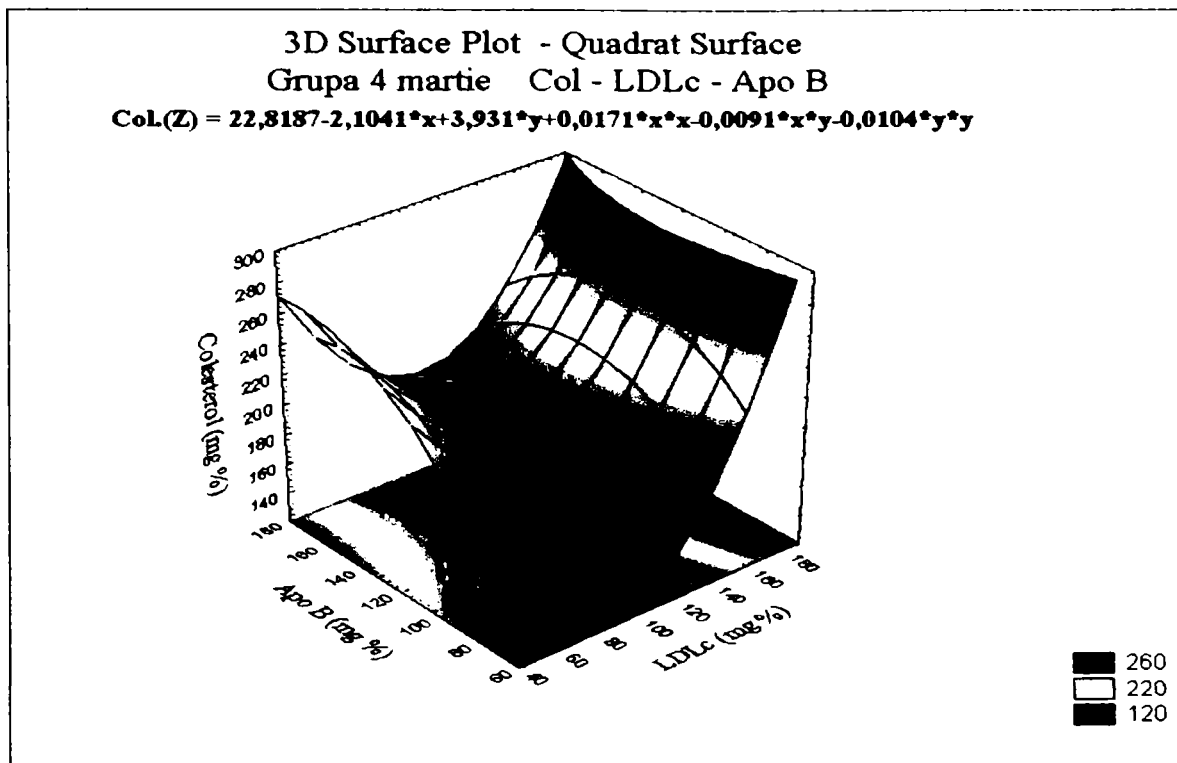


Fig. 6.127. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 4, martie)
Quadrat surface areas

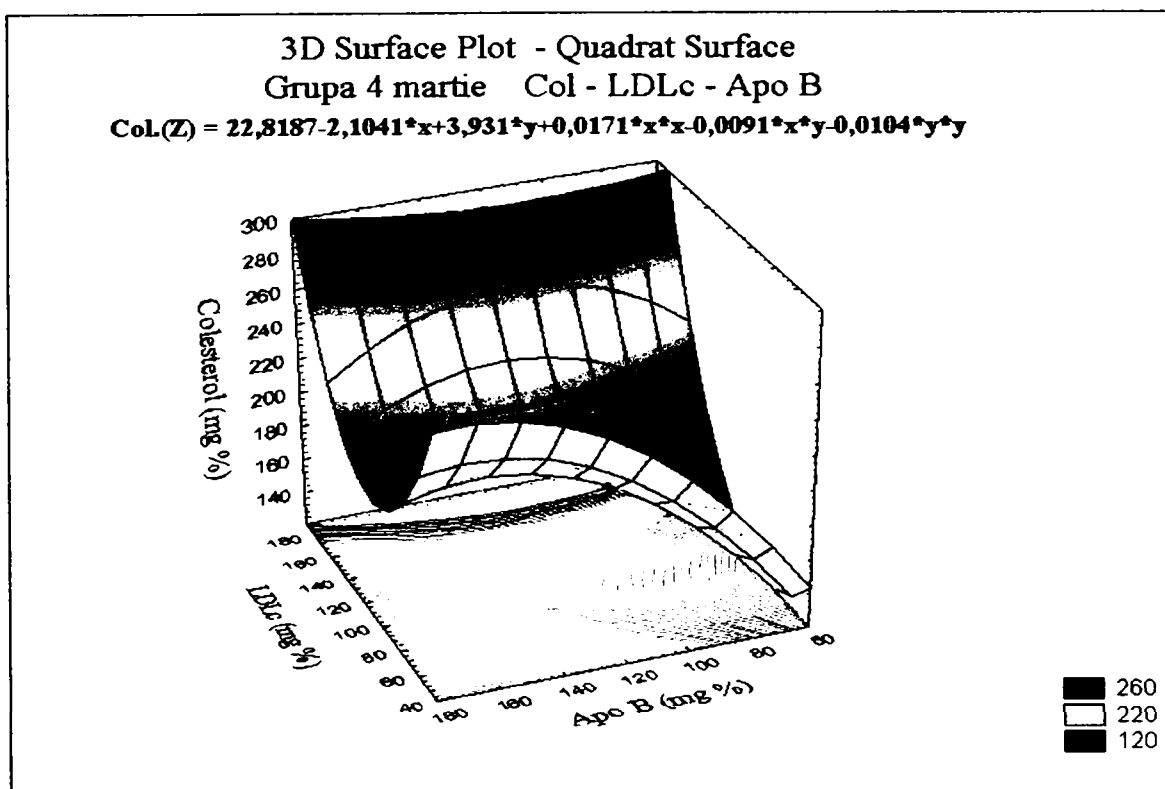


Fig. 6.128. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 4, martie)
Quadrat surface lines

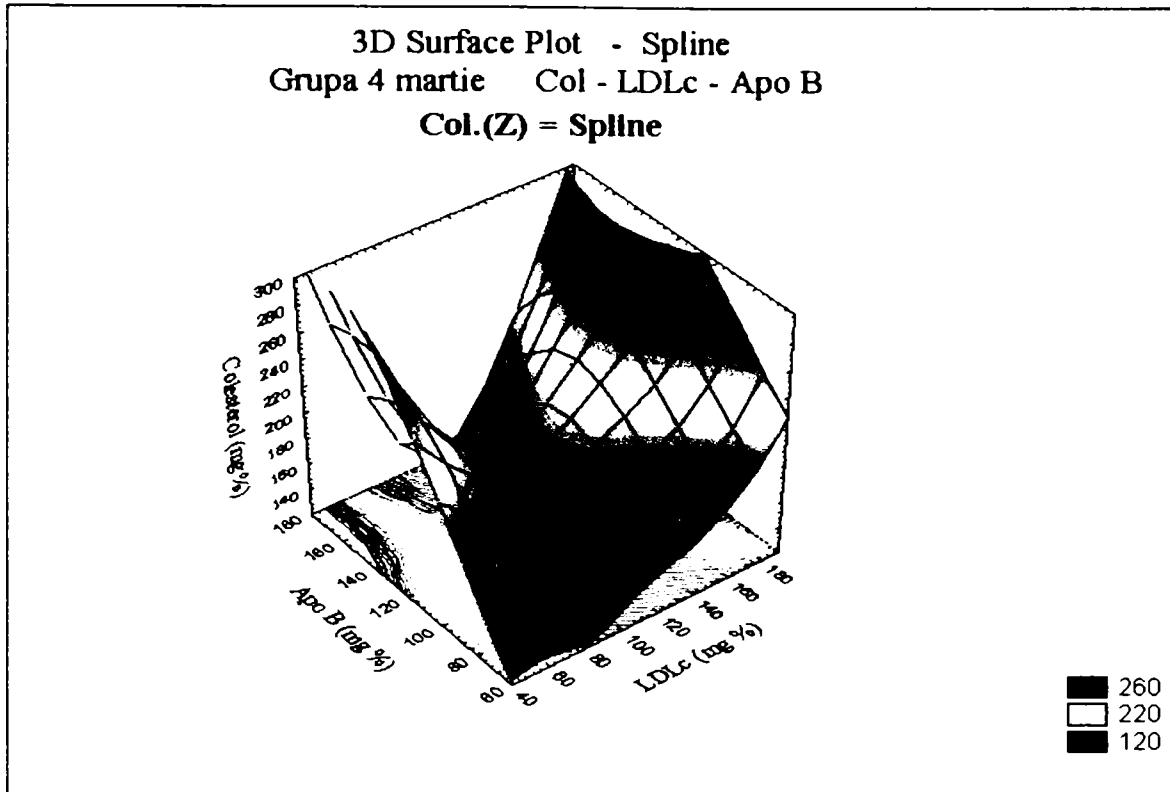


Fig. 6.129. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 4, martie) varianta – spline

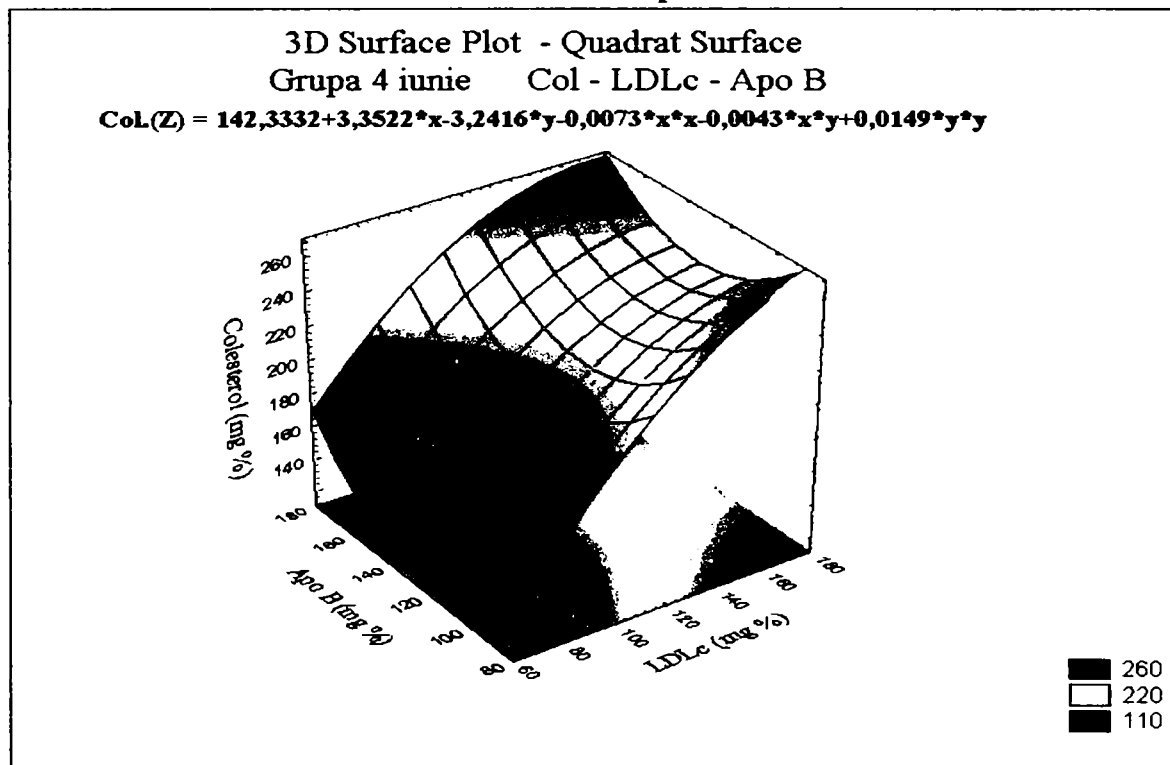
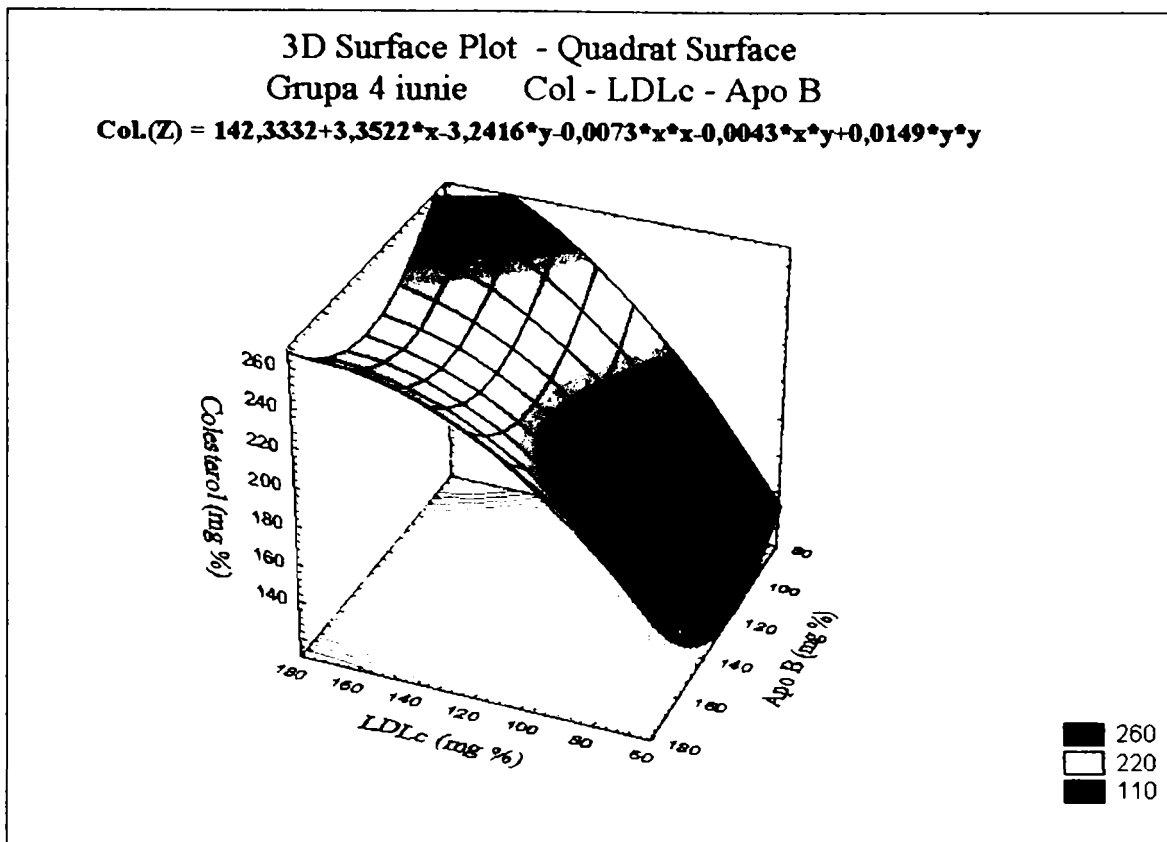
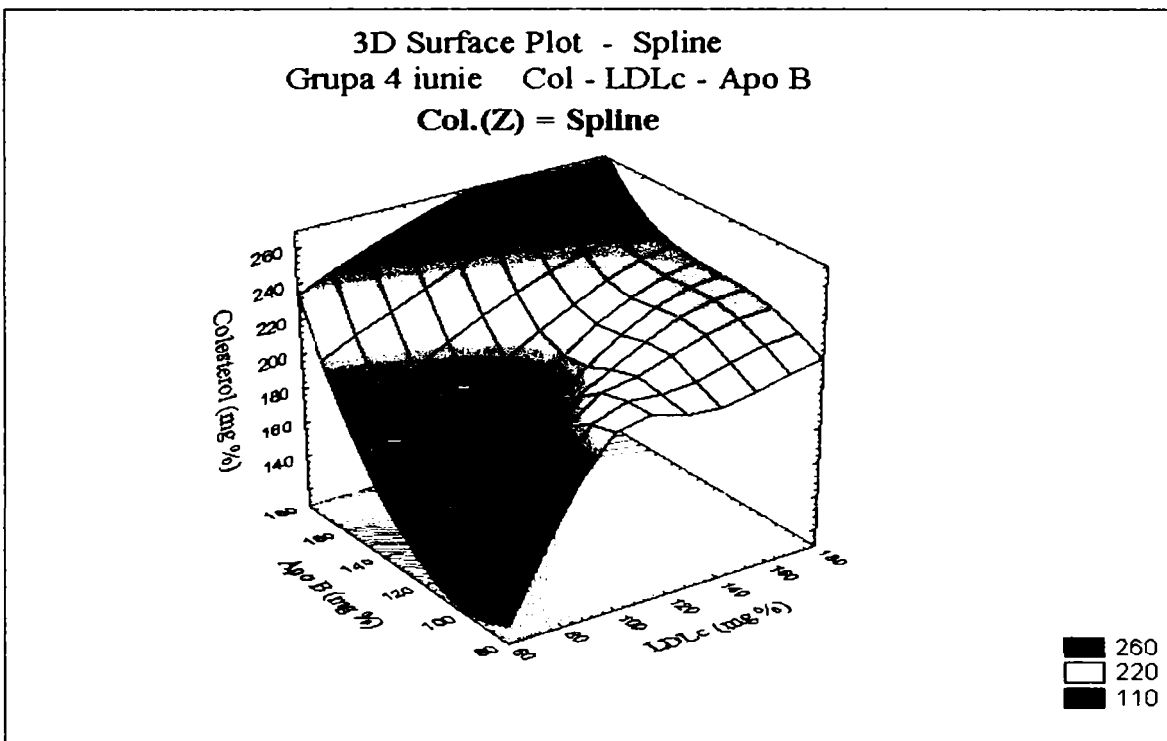


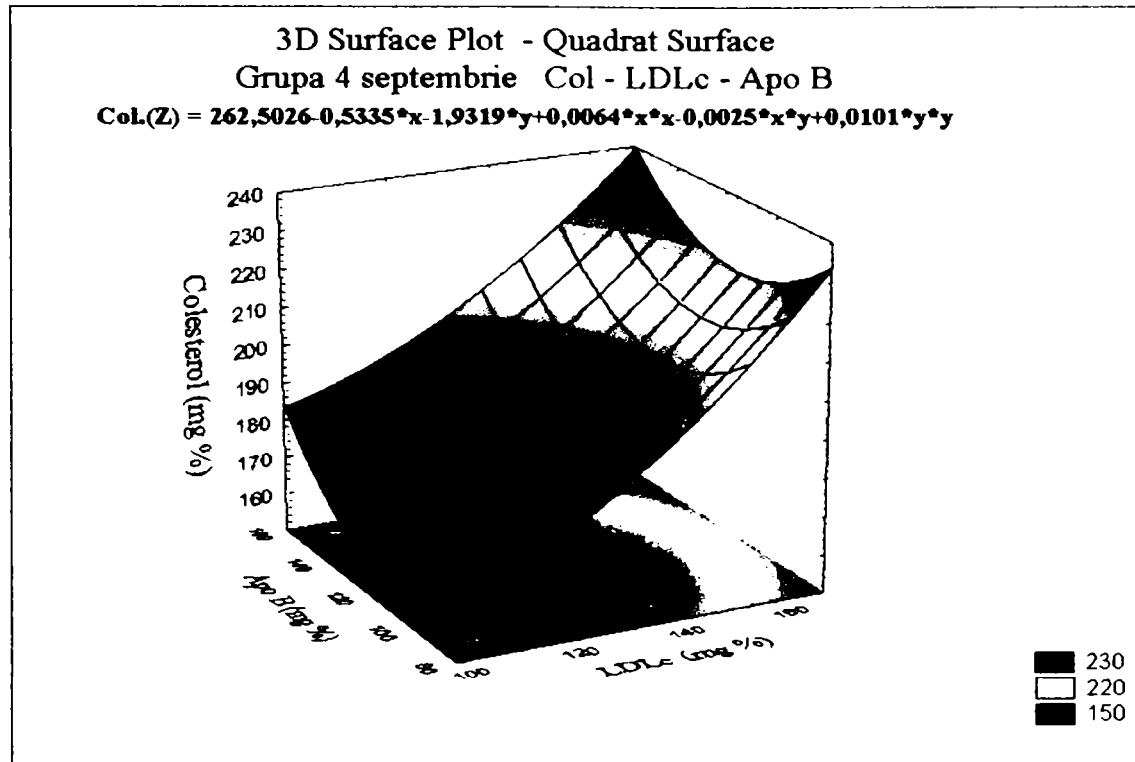
Fig. 6.130. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 4, iunie) Quadrat surface areas



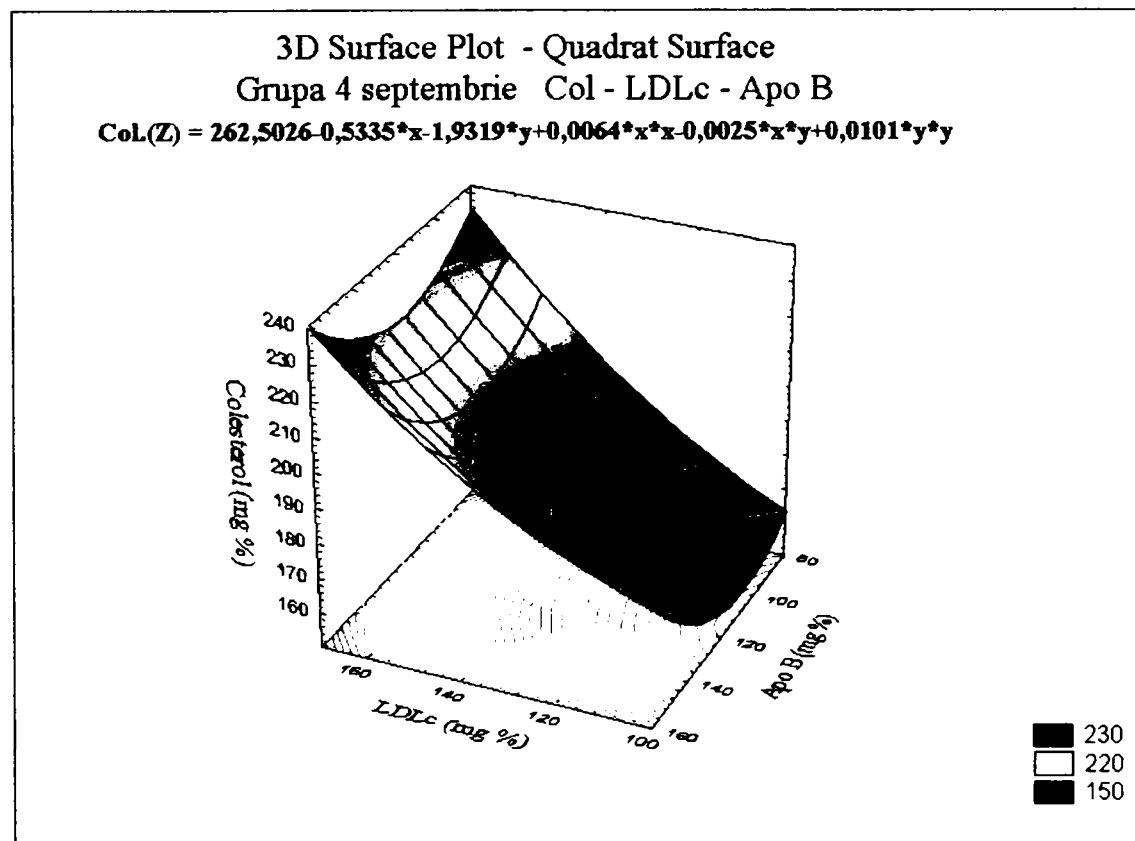
**Fig. 6.131. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 4, iunie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.132. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 4, iunie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.133. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 4, septembrie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.134. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 4, septembrie)
 Quadratic surface lines**

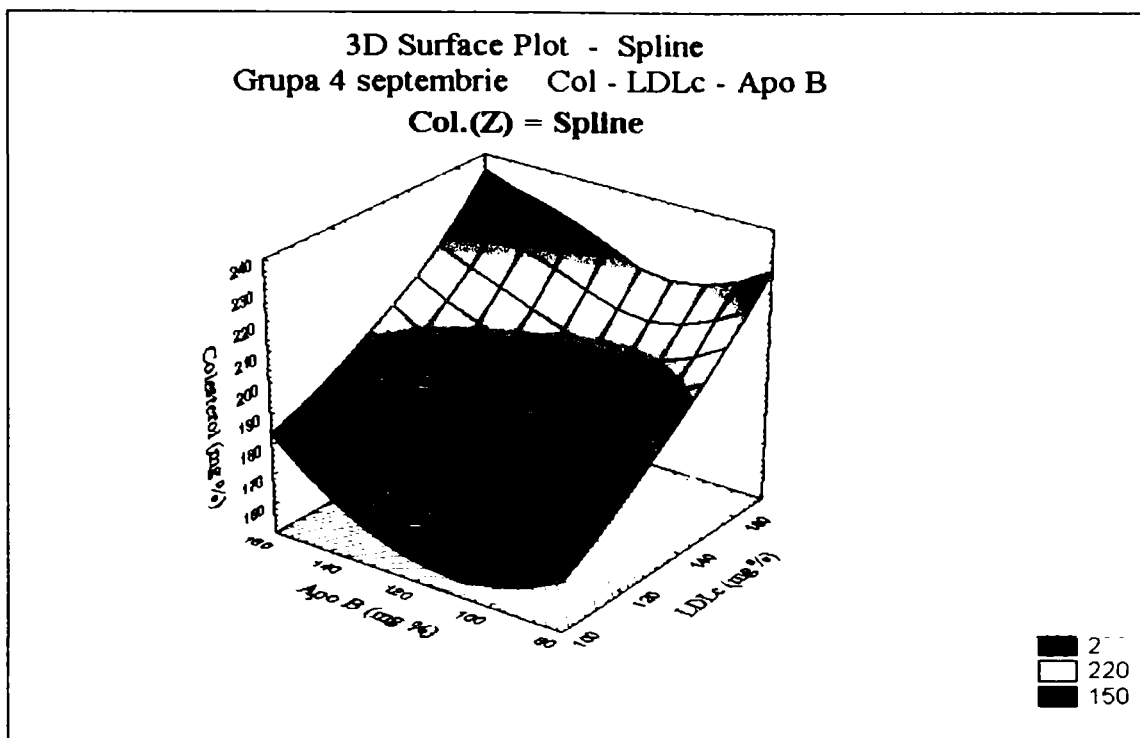


Fig. 6.135. Variația colesterol-LDLc-apo B (grupa 4, septembrie) varianta – spline

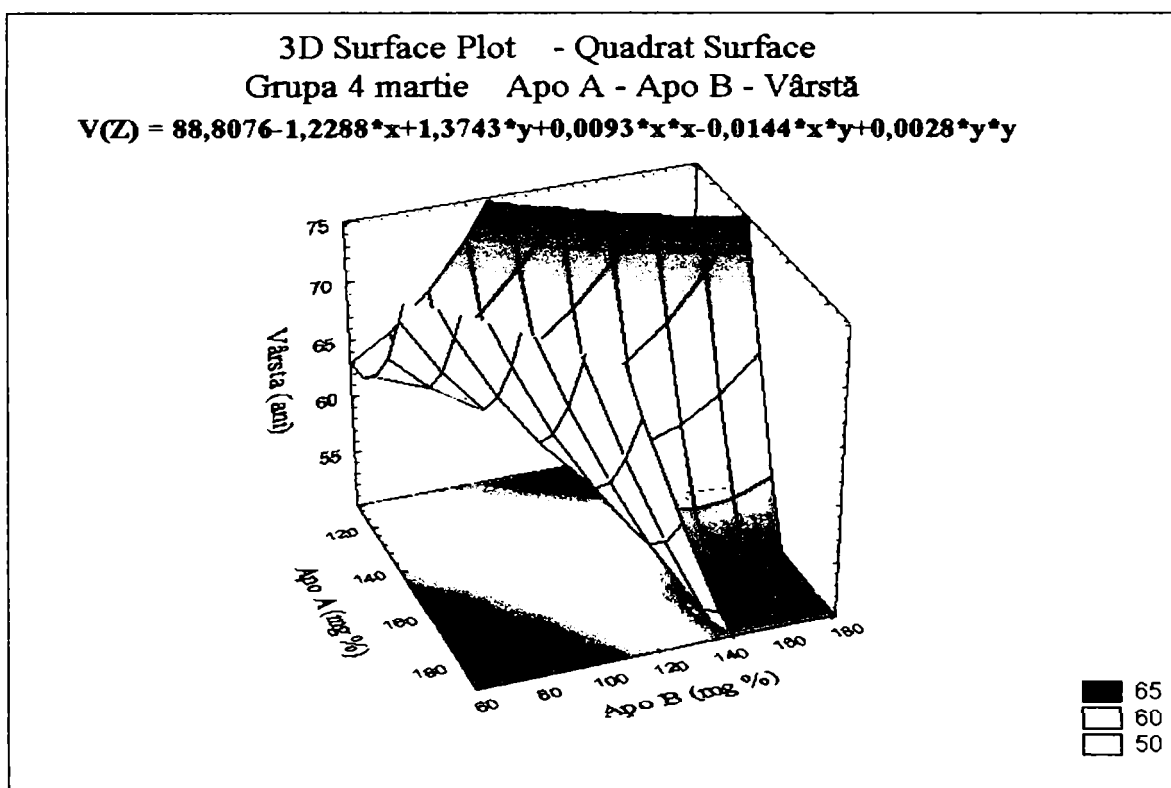
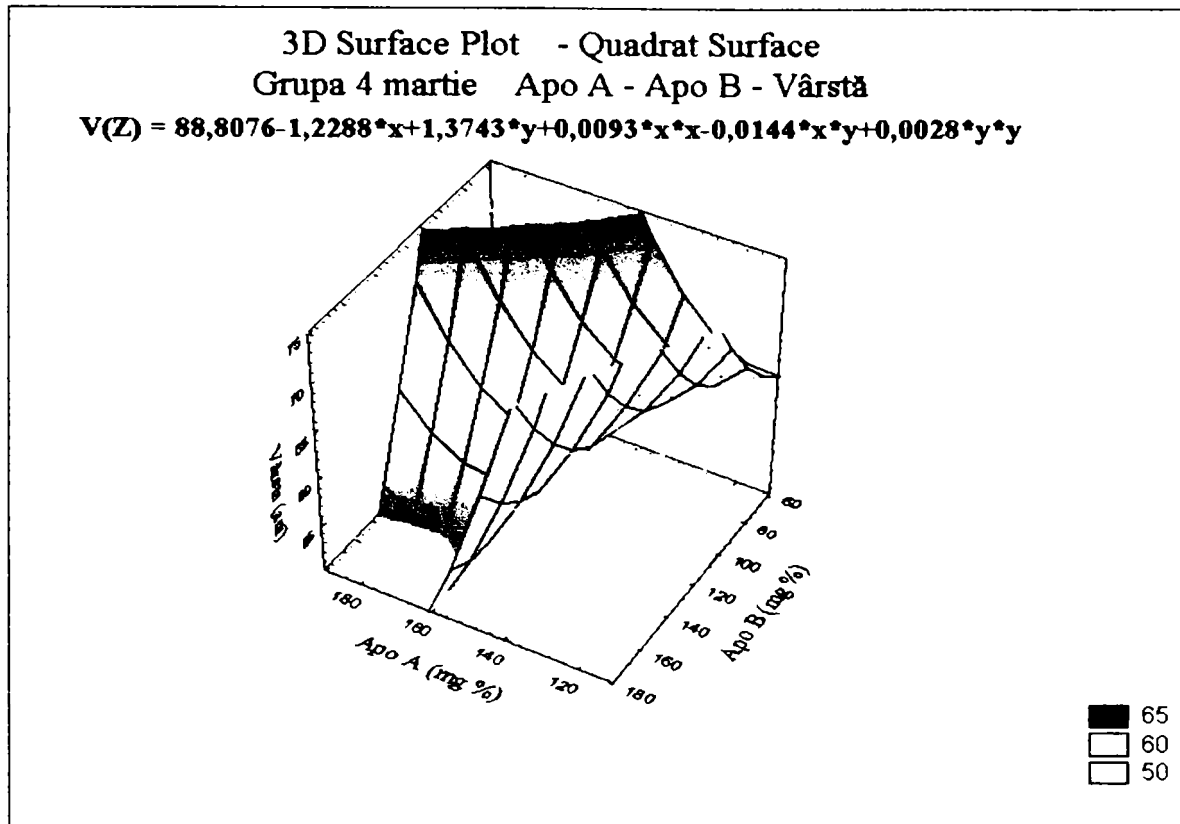
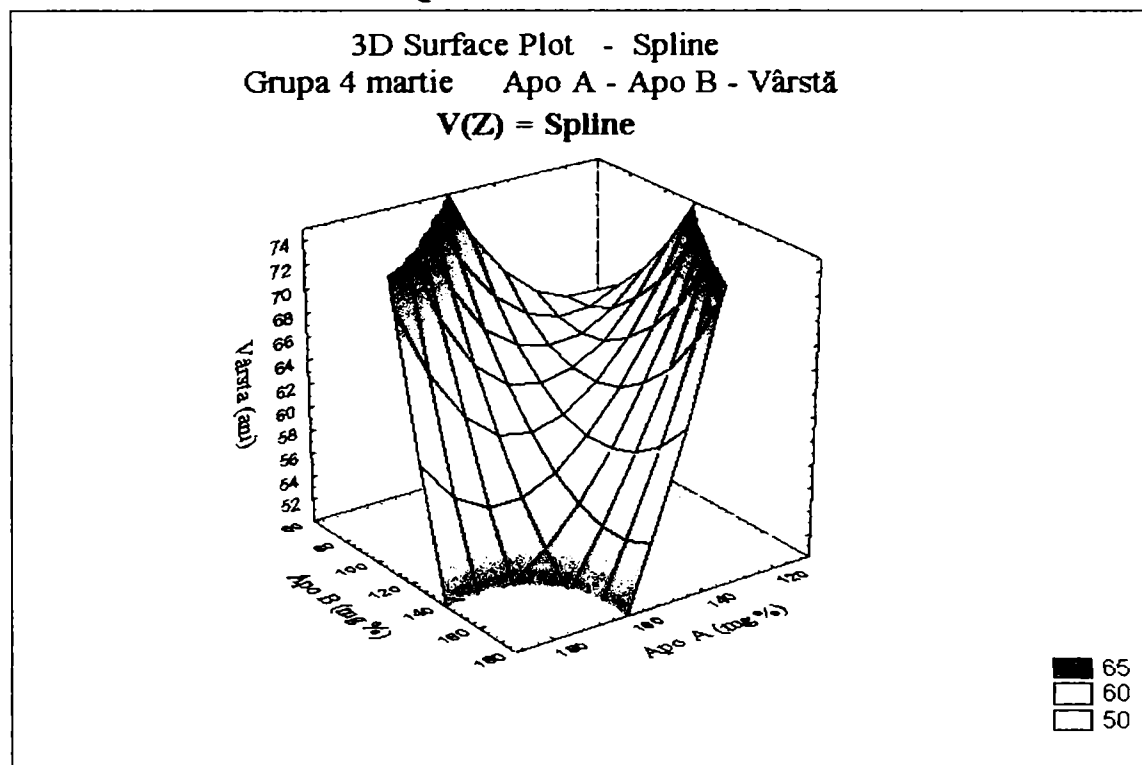


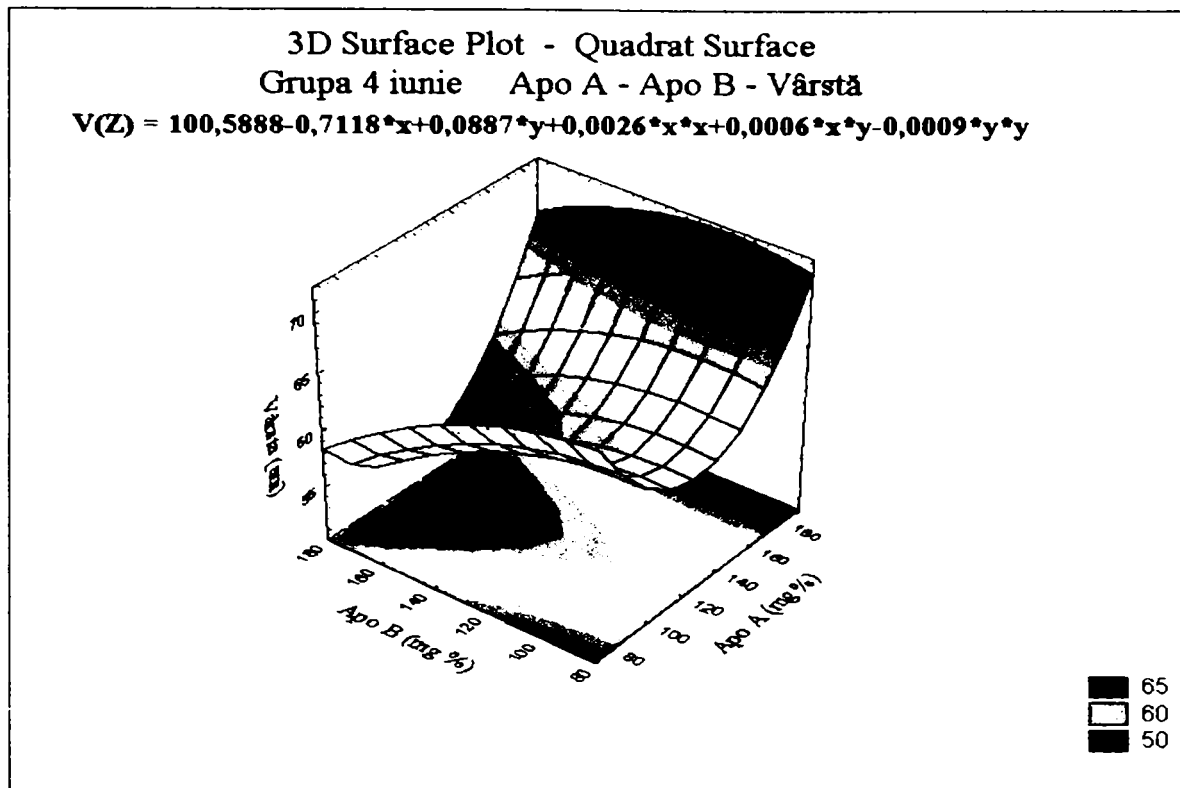
Fig. 6.136. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 4, martie) Quadrat surface areas



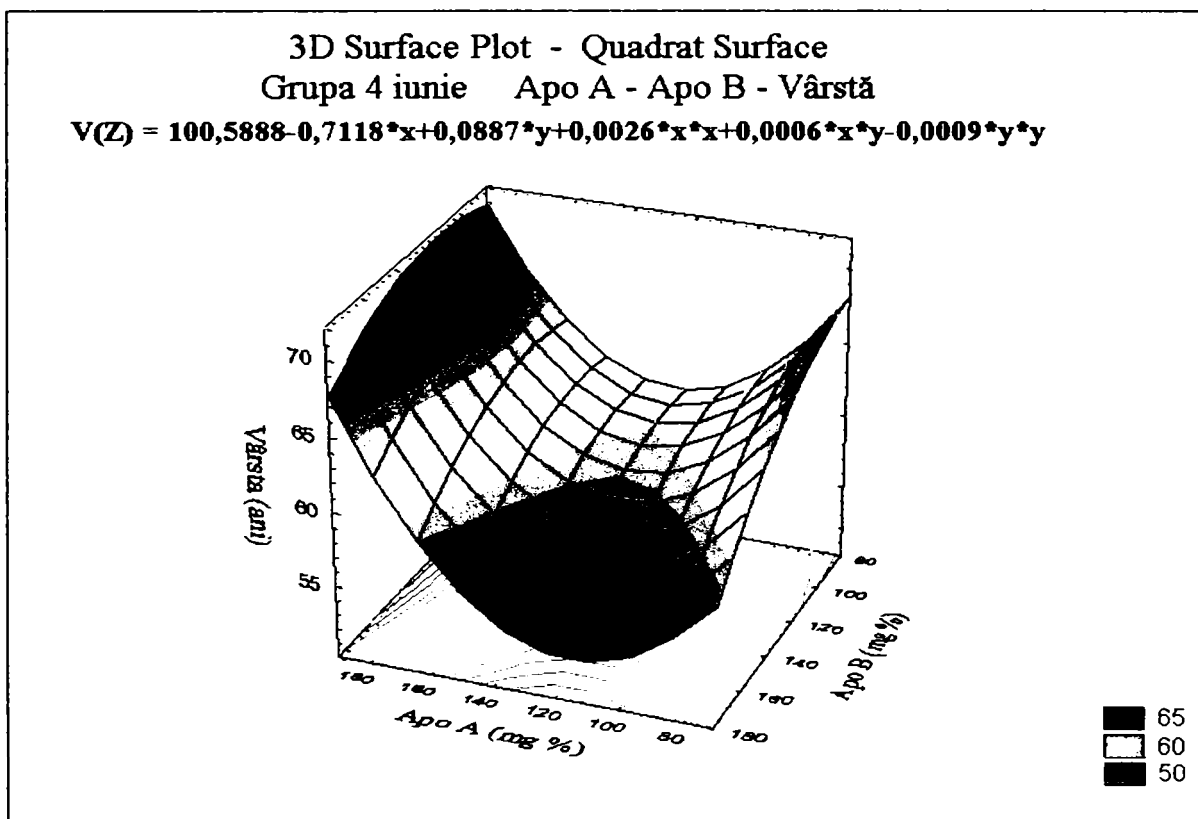
**Fig. 6.137. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 4, martie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.138. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 4, martie)
 varianta – spline**



**Fig. 6.139. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 4, iunie)
 Quadratic surface areas**



**Fig. 6.140. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 4, iunie)
 Quadratic surface lines**

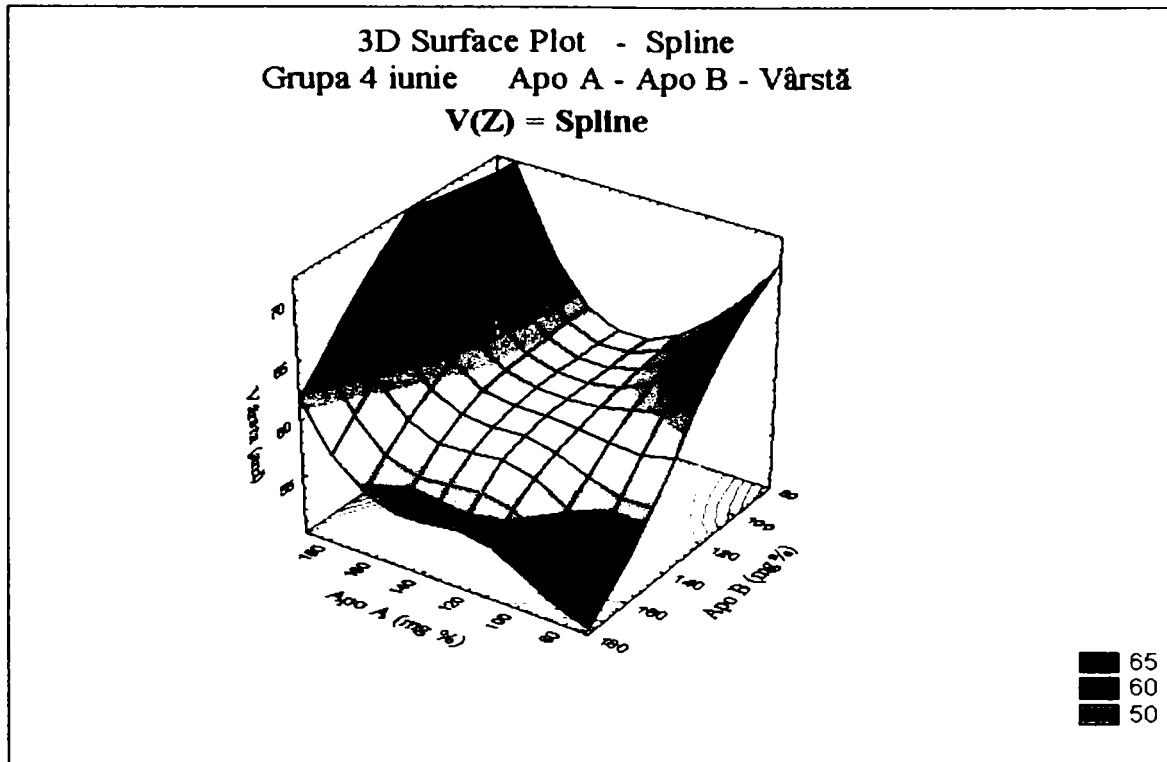


Fig. 6.141. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 4, iunie) varianta – spline

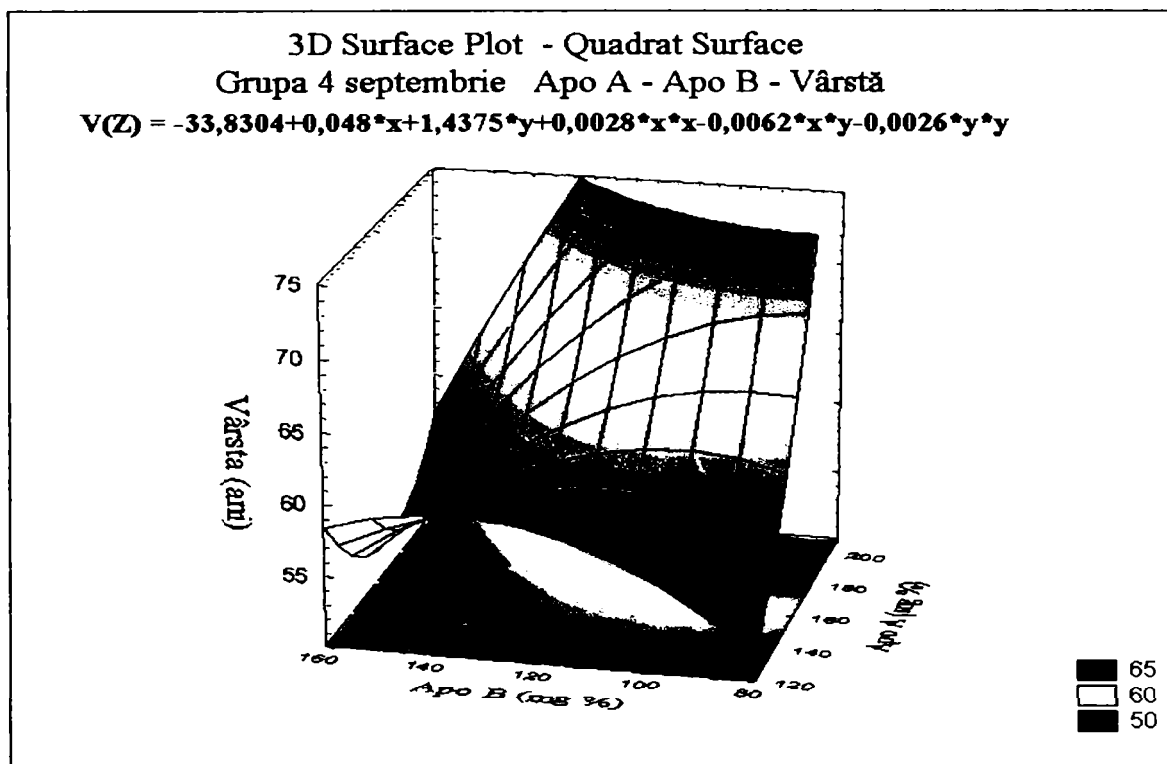
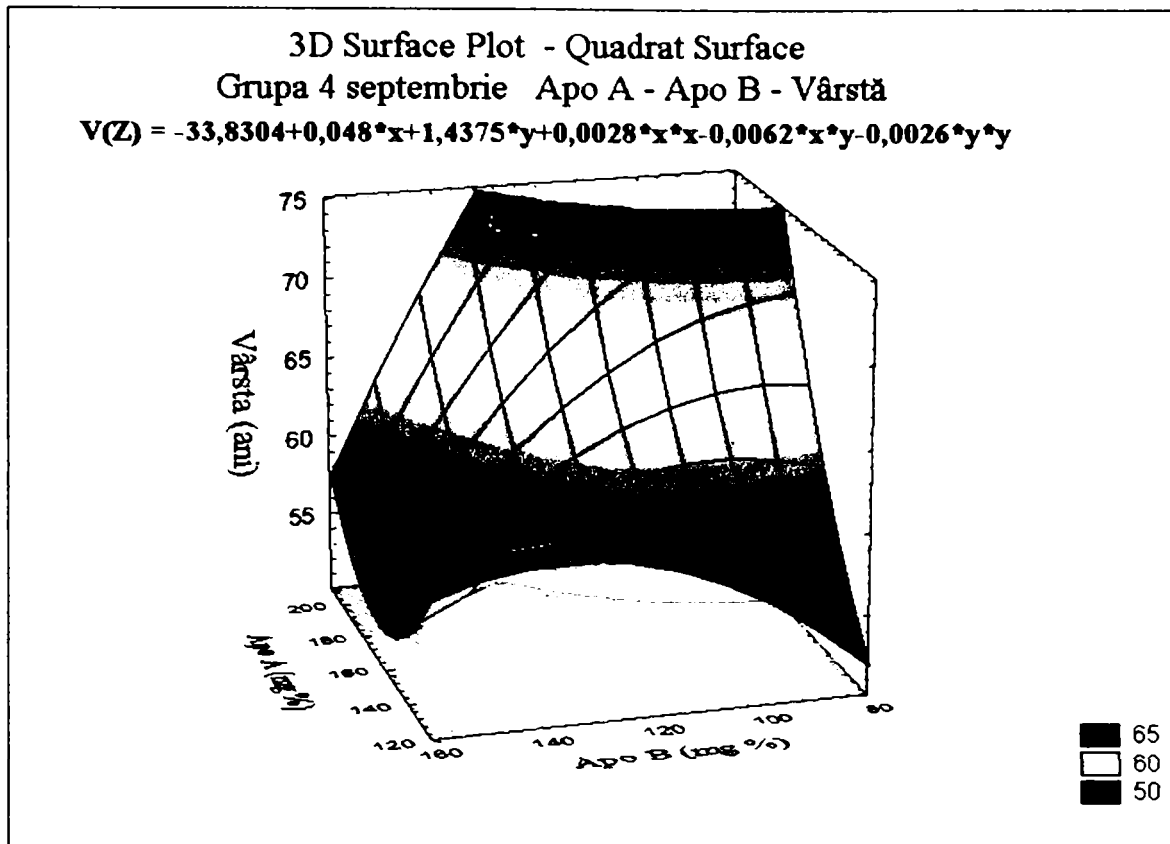
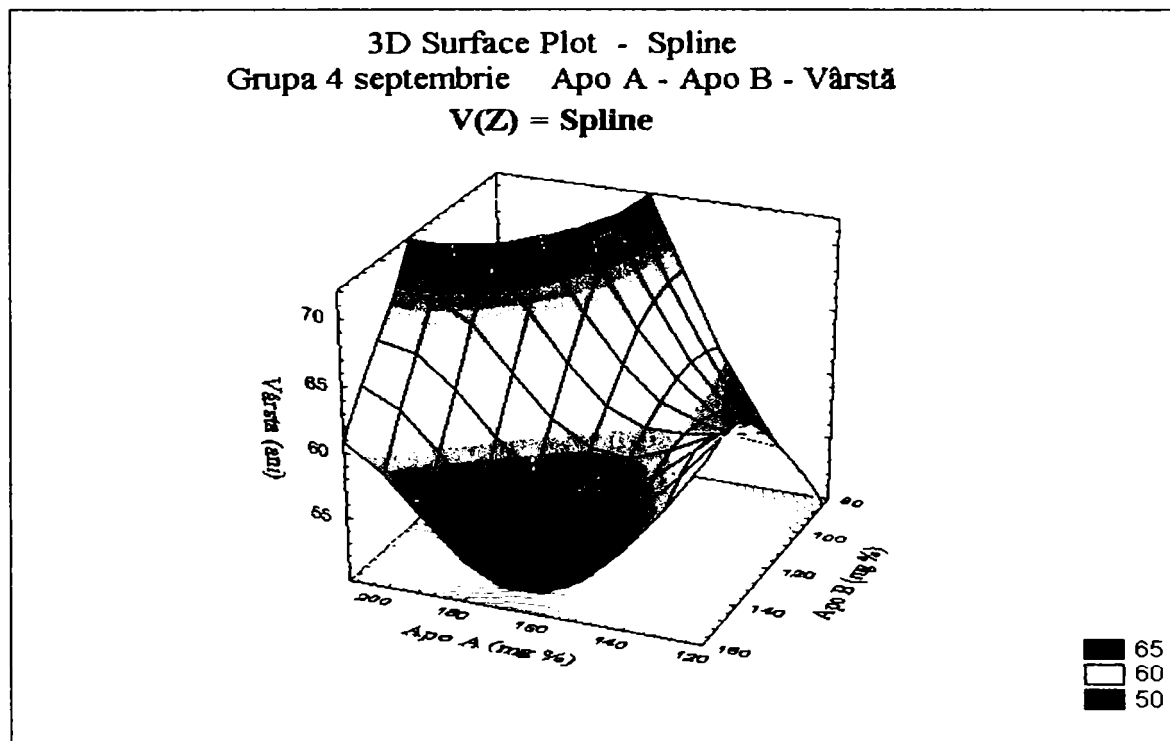


Fig. 6.142. Variația apo A-apo B-vârsta (grupa 4, septembrie) Quadratic surface areas



**Fig. 6.143. Variația apo A-apo B-vârstă (grupa 4, septembrie)
 Quadratic surface lines**



**Fig. 6.144. Variația apo A-apo B-vârstă (grupa 4, septembrie)
 varianta – spline**

Analizând rezultatele determinărilor fracțiilor lipidice, (fig.6.109-fig. 6.144), la grupa de femei, cu vârsta cuprinsă între 55 – 72 de ani, cu o medie de 62 de ani, se constată la prima determinare (martie), valori scăzute ale HDLc, între 33-45 mg % la un număr de 5 subiecți (41,66%), valori situate sub limita protectoare. La a doua determinare (iunie), 3 subiecți (25%) au prezentat valori scăzute ale HDLc, iar la ultima determinare (septembrie), un număr de 7 subiecți (58,33%) au avut valori ale HDLc sub limita inferioară a valorilor protectoare a aterosclerozei. Acest lucru ne arată că femeile care au vârsta peste 50 de ani (după instalarea climaxului) prezintă risc aterogen. Valorile diferite de la o determinare la alta sunt greu de explicat având în vedere influența a diverși factori endogeni și exogeni asupra organismului uman, cât și a tratamentului medicamentos.

Aceeași corelație s-a putut face, dar în sens invers cu valorile LDLc, care la subiecții cu valori scăzute ale HDLc au prezentat valori crescute ale LDLc, deci risc aterogen crescut.

Studiind corelația între valorile HDLc și apo A, se remarcă o concordanță între valorile scăzute ale HDLc și cele ale apo A, la subiecții de sex masculin. La subiecții de sex feminin s-au găsit valori mai crescute ale apo A, comparativ cu subiecții de sex masculin, la cazurile în care avem valori ale HDLc sub limita inferioară a valorilor normale, fără a putea oferi o explicație pertinentă.

Valorile determinate ale LDLc și Apo B la cele două loturi (bărbați și femei), arată că subiecți cu LDLc crescut (peste 65% din colesterolul total) s-au întâlnit la 60% din bărbați și la 55% din femei, la prima determinare (martie), valori care au scăzut la următoarele două determinări doar la 15% din subiecți. Aceste valori sunt concordante cu valorile Apo B care nu au prezentat diferențe semnificative la cele două sexe, dar care au rămas crescute la ultimele două determinări (iunie, septembrie), doar la 12% din subiecți. Această scădere a riscului aterogen s-a datorat controlului factorilor de risc, cât și a tratamentului cu statine.

Tratamentul modern a hiperlipoproteinemiilor (cu statine a hipercolesterolemiilor și cu fibrați ale hipertrigliceridemiilor) a condus la un control riguros al dislipidemiilor la subiecții studiați, ceea ce explică puținele cazuri la care s-au întâlnit valori foarte crescute ale fracțiilor aterogenetice (LDLc, apo B, trigliceride).

Acestea sunt standardizate în ghiduri terapeutice practice, care sunt utilizate la toți subiecții cu tulburări ale metabolismului lipidic.

CAPITOLUL 7

TESTAREA PERFORMANTELOR MODELELOR MATEMATICE STATISTICE OBȚINUTE

Atunci când dorim să comparăm un model teoretic cu unul experimental, apare întotdeauna problema concordanței dintre valorile teoretice și cele determinate experimental. În reprezentările obținute în capitolul 6, trebuie menționat de la început că suprafața de referință nu este o suprafață analitică (determinată prin modelul matematic clasic), ci este o suprafață determinată prin metode mai sofisticate de aproximare (funcțiile curbe și suprafețe spline). De aceea, se ia în calcul de la început problema unui prag de aproximare pe care să-l considerăm implicit. Deoarece obținerea datelor este afectată de erori, în modelul experimental este introdusă o anumită incertitudine, fapt ce conferă un caracter probabilistic.

Problema determinării pragului de aproximare care poate fi atins pe un model oarecare neclasic este o problemă în sine, dezbătută intens de teoreticieni și practicieni.

Deocamdată nu se cunoaște o metodă generală de calcul a gradului de aproximare a unui model. Se pune problema găsirii unor modele funcționale, mai ales că, din punct de vedere practic, apare întotdeauna problema costurilor legate de obținerea unui model.

După calcularea parametrilor modelului, este necesar să se efectueze o comparație între predicțiile modelului și datele furnizate de procesul real. Dacă modelul este adecvat, el poate fi acceptat cu condiția să nu poată fi simplificat, de pildă prin eliminarea unor termeni sau variabile importante.

Drept indicatori ai adecvantei modelului se pot folosi:

- **Dispersia de adecvanță σ^2**

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{i,exp} - y_{i,calc})^2}{n - m - 1} \quad (7.1)$$

în care:

n - numărul de seturi de date,

m - numărul de variabile independente,

$y_{i,exp}$ - valori experimentale.

$y_{i,calc}$ - valori determinate p.e baza modelului matematic

- **Indicatorul preciziei modelului R^2**

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{i,calc} - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{i,exp} - \bar{y})^2} \quad (7.2)$$

în care:

$y_{i,exp}$ - valori experimentale,

$y_{i,calc}$ - valori determinate pe baza modelului matematic,

\bar{y} - valoarea medie.

- **Raportul de corelație R**

$$R = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_{i,exp} - y_{i,calc})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{i,exp} - \bar{y})^2}} \quad (7.3)$$

7.1. Modele matematice statistice experimentale

Utilizând programul STATISTICA 6.0 s-au realizat reprezentările din capitolul 6, cu ajutorul cărora s-au determinat modele matematice, care sunt ecuațiile de aproximare a suprafețelor prin regresie neliniară, selectând modelul de aproximare **Quadrat Surface**, coeficientul de încredere setat la introducerea variabilelor fiind de 95%.

Corelațiile urmărite sunt **colesterol-apo A-apo B**, **colesterol-HDLc-apo A**, **colesterol-LDLc-apo B** și **apo A-apo B-vârstă**.

Modelele matematice pentru aceste corelații realizate la cele 4 grupe hipertensiune arterială, cardiopatie ischemică, bărbați și femei pentru cele 3 determinări (martie, iunie, septembrie) sunt prezentate în continuare:

Grupa 1 Hipertensiune arterială**Colesterol-apo A-apo B pentru martie, iunie, septembrie**

$$Col.(Z)=1057,2862-12,4518 \cdot x-1,099 \cdot y+0,041 \cdot x^2+0,0075 \cdot x \cdot y+0,0046 \cdot y^2 \quad (7.4)$$

$$Col.(Z)=139,2662+0,5318 \cdot x-1,3295 \cdot y+0,0088 \cdot x^2-0,0174 \cdot x \cdot y+0,0175 \cdot y^2 \quad (7.5)$$

$$Col.(Z)=40,9662+3,6694 \cdot x-3,1532 \cdot y-0,0042 \cdot x^2-0,017 \cdot x \cdot y+0,0261 \cdot y^2 \quad (7.6)$$

în care: x – valorile lui apo A
 y – valorile lui apo B
 z – valorile colesterolului

Colesterol-HDLc-apo A pentru martie, iunie, septembrie

$$Col.(Z)=1800,579+34,8467 \cdot x-35,2043 \cdot y-0,0432 \cdot x^2-0,2049 \cdot x \cdot y+0,1594 \cdot y^2 \quad (7.7)$$

$$Col.(Z)=122,7088+5,1862 \cdot x-1,739 \cdot y+0,0725 \cdot x^2-0,1158 \cdot x \cdot y+0,036 \cdot y^2 \quad (7.8)$$

$$Col.(Z)=734,3086-2,0238 \cdot x-5,697 \cdot y-0,0021 \cdot x^2+0,0147 \cdot x \cdot y+0,0131 \cdot y^2 \quad (7.9)$$

în care: x – valorile lui HDLc
 y – valorile lui apo A
 z – valorile colesterolului

Colesterol-LDLc-apo B pentru martie, iunie, septembrie

$$Col.(Z)=-55,1297-1,4534 \cdot x+4,5642 \cdot y-0,0066 \cdot x^2+0,0327 \cdot x \cdot y-0,0329 \cdot y^2 \quad (7.10)$$

$$Col.(Z)=126,6136-0,0832 \cdot x+0,3354 \cdot y-0,0028 \cdot x^2+0,0131 \cdot x \cdot y-0,0077 \cdot y^2 \quad (7.11)$$

$$Col.(Z)=336,2896-0,4605 \cdot x-2,7172 \cdot y+0,0008 \cdot x^2+0,0069 \cdot x \cdot y+0,0081 \cdot y^2 \quad (7.12)$$

în care: x – valorile lui LDLc
 y – valorile lui apo B
 z – valorile colesterolului

Apo A-apo B-vârsta pentru martie, iunie, septembrie

$$V(Z) = -39,2425 + 0,3285 \cdot x + 1,6188 \cdot y + 0,003 \cdot x^2 - 0,0115 \cdot x \cdot y - 1,0545 \cdot e^{-5} \cdot y^2 \quad (7.13)$$

$$V(Z) = 86,8703 - 0,1711 \cdot x - 0,1143 \cdot y + 0,0022 \cdot x^2 - 0,0035 \cdot x \cdot y + 0,0018 \cdot y^2 \quad (7.14)$$

$$V(Z) = -1,0481 + 0,3441 \cdot x + 0,6618 \cdot y + 0,0017 \cdot x^2 - 0,0061 \cdot x \cdot y + 0,0004 \cdot y^2 \quad (7.15)$$

în care: x – valorile lui apo A

y – valorile lui apo B

z – vârsta subiecților

Grupa 2 Cardiopatie ischemică**Colesterol-apo A-apo B pentru martie, iunie, septembrie**

$$Col.(Z) = 97,9958 + 0,5309 \cdot x - 1,6316 \cdot y + 0,0032 \cdot x^2 - 0,0004 \cdot x \cdot y + 0,0102 \cdot y^2 \quad (7.16)$$

$$Col.(Z) = -183,1673 + 3,1269 \cdot x + 1,7007 \cdot y - 0,0044 \cdot x^2 - 0,0109 \cdot x \cdot y + 0,0016 \cdot y^2 \quad (7.17)$$

$$Col.(Z) = 835,6192 - 1,2899 \cdot x - 10,9615 \cdot y - 0,003 \cdot x^2 + 0,0214 \cdot x \cdot y + 0,0363 \cdot y^2 \quad (7.18)$$

în care: x – valorile lui apo A

y – valorile lui apo B

z – valorile colesterolului

Colesterol-HDLc-apo A pentru martie, iunie, septembrie

$$Col.(Z) = -1494,87 - 22,68 \cdot x + 34,2404 \cdot y + 0,0304 \cdot x^2 + 0,1478 \cdot x \cdot y - 0,1578 \cdot y^2 \quad (7.19)$$

$$Col.(Z) = -110,7115 + 6,2175 \cdot x + 0,4217 \cdot y + 0,0258 \cdot x^2 - 0,0647 \cdot x \cdot y + 0,0161 \cdot y^2 \quad (7.20)$$

$$Col.(Z) = -300,8267 + 18,1984 \cdot x + 0,2473 \cdot y - 0,0449 \cdot x^2 - 0,0846 \cdot x \cdot y + 0,0122 \cdot y^2 \quad (7.21)$$

în care: x – valorile lui HDLc

y – valorile lui apo A

z – valorile colesterolului

Colesterol-LDLc-apo B pentru martie, iunie, septembrie

$$\text{Col.}(Z) = 37,1982 - 4,4297 \cdot x + 5,3839 \cdot y + 0,0128 \cdot x^2 + 0,0252 \cdot x \cdot y - 0,0321 \cdot y^2 \quad (7.22)$$

$$\text{Col.}(Z) = 8,5497 + 2,1904 \cdot x - 0,2711 \cdot y - 0,0003 \cdot x^2 - 0,0073 \cdot x \cdot y + 0,005 \cdot y^2 \quad (7.23)$$

$$\text{Col.}(Z) = 128,5439 + 3,3744 \cdot x - 3,8583 \cdot y + 0,0017 \cdot x^2 - 0,0272 \cdot x \cdot y + 0,0332 \cdot y^2 \quad (7.24)$$

în care: x – valorile lui LDLc
y – valorile lui apo B
z – valorile colesterolului

Apo A-apo B-vârsta pentru martie, iunie, septembrie

$$V(Z) = -109,8545 + 3,0939 \cdot x - 0,6205 \cdot y - 0,0124 \cdot x^2 + 0,0027 \cdot x \cdot y + 0,0011 \cdot y^2 \quad (7.25)$$

$$V(z) = 47,8463 + 0,3641 \cdot x - 0,0463 \cdot y - 0,0005 \cdot x^2 - 0,0027 \cdot x \cdot y + 0,0016 \cdot y^2 \quad (7.26)$$

$$V(Z) = 107,2678 - 1,3685 \cdot x + 1,2949 \cdot y - 0,0001 \cdot x^2 + 0,0124 \cdot x \cdot y - 0,0149 \cdot y^2 \quad (7.27)$$

în care: x – valorile lui apo A
y – valorile lui apo B
z – vârsta subiecților

Grupa 3 Bărbați**Colesterol-apo A-apo B pentru martie, iunie, septembrie**

$$\text{Col.}(Z) = -125,876 + 4,747 \cdot x - 1,7689 \cdot y - 0,0159 \cdot x^2 + 0,0019 \cdot x \cdot y + 0,009 \cdot y^2 \quad (7.28)$$

$$\text{Col.}(Z) = -45,0926 + 1,0252 \cdot x + 1,2919 \cdot y + 0,0091 \cdot x^2 - 0,0216 \cdot x \cdot y + 0,0089 \cdot y^2 \quad (7.29)$$

$$\text{Col.}(Z) = 647,565 + 1,8446 \cdot x - 11,8931 \cdot y - 0,0067 \cdot x^2 + 0,004 \cdot x \cdot y + 0,0522 \cdot y^2 \quad (7.30)$$

în care: x – valorile lui apo A
y – valorile lui apo B
z – valorile colesterolului

Colesterol-HDLc-apo A pentru martie, iunie, septembrie

$$Col.(Z) = -1624,29 - 19,878 \cdot x + 35,820 \cdot y + 0,0196 \cdot x^2 + 0,1375 \cdot x \cdot y - 0,1648 \cdot y^2 \quad (7.31)$$

$$Col.(Z) = 58,7721 - 0,8203 \cdot x + 2,0533 \cdot y + 0,0727 \cdot x^2 - 0,0624 \cdot x \cdot y + 0,0072 \cdot y^2 \quad (7.32)$$

$$Col.(Z) = 248,763 + 11,4902 \cdot x - 5,2448 \cdot y - 0,0979 \cdot x^2 + 0,0105 \cdot x \cdot y + 0,0127 \cdot y^2 \quad (7.33)$$

în care: x – valorile lui HDLc
 y – valorile lui apo A
 z – valorile colesterolului

Colesterol-LDLc-apo B pentru martie, iunie, septembrie

$$Col.(Z) = 37,8399 + 0,5077 \cdot x + 1,0219 \cdot y - 0,0073 \cdot x^2 + 0,0148 \cdot x \cdot y - 0,0084 \cdot y^2 \quad (7.34)$$

$$Col.(Z) = -35,6327 - 1,3724 \cdot x + 4,265 \cdot y + 0,0146 \cdot x^2 - 0,0076 \cdot x \cdot y - 0,0153 \cdot y^2 \quad (7.35)$$

$$Col.(Z) = -31,3739 + 1,4907 \cdot x + 1,1706 \cdot y + 0,0055 \cdot x^2 - 0,0167 \cdot x \cdot y + 0,0043 \cdot y^2 \quad (7.36)$$

în care: x – valorile lui LDLc
 y – valorile lui apo B
 z – valorile colesterolului

Apo A-apo B-vârsta pentru martie, iunie, septembrie

$$V(Z) = -102,659 + 2,7241 \cdot x - 0,2531 \cdot y - 0,0109 \cdot x^2 + 0,0019 \cdot x \cdot y + 7,6456 \cdot e^{-5} \cdot y^2 \quad (7.37)$$

$$V(Z) = 84,2493 - 0,4683 \cdot x + 0,0746 \cdot y + 0,0031 \cdot x^2 - 0,0021 \cdot x \cdot y + 0,0008 \cdot y^2 \quad (7.38)$$

$$V(Z) = 121,134 - 0,7771 \cdot x + 0,1184 \cdot y + 0,0012 \cdot x^2 + 0,0027 \cdot x \cdot y - 0,002 \cdot y^2 \quad (7.39)$$

în care: x – valorile lui apo A
 y – valorile lui apo B
 z – vârsta subiecților

Grupa 4 Femei**Colesterol-apo A-apo B pentru martie, iunie, septembrie**

$$Col.(Z)=338,9191-5,0201 \cdot x+1,7548 \cdot y+0,0282 \cdot x^2-0,0213 \cdot x \cdot y+0,0101 \cdot y^2 \quad (7.40)$$

$$Col.(Z)=-29,7944+0,1795 \cdot x+1,4945 \cdot y+0,0079 \cdot x^2-0,011 \cdot x \cdot y+0,0039 \cdot y^2 \quad (7.41)$$

$$Col.(Z)=-732,817+3,4626 \cdot x+9,3361 \cdot y+0,0145 \cdot x^2-0,0622 \cdot x \cdot y+0,0051 \cdot y^2 \quad (7.42)$$

în care: x – valorile lui apo A
 y – valorile lui apo B
 z – valorile colesterolului

Colesterol-HDLc-apo A pentru martie, iunie, septembrie

$$Col.(Z)=46,2164+10,1203 \cdot x-3,3856 \cdot y+0,0985 \cdot x^2-0,1638 \cdot x \cdot y+0,0516 \cdot y^2 \quad (7.43)$$

$$Col.(Z)=192,6632-4,7403 \cdot x+1,35 \cdot y+0,1224 \cdot x^2-0,0828 \cdot x \cdot y+0,0175 \cdot y^2 \quad (7.44)$$

$$Col.(Z)=-627,62-10,589 \cdot x+13,3426 \cdot y-0,0459 \cdot x^2+0,1016 \cdot x \cdot y-0,057 \cdot y^2 \quad (7.45)$$

în care: x – valorile lui HDLc
 y – valorile lui apo A
 z – valorile colesterolului

Colesterol-LDLc-apo B pentru martie, iunie, septembrie

$$Col.(Z)=22,8187-2,1041 \cdot x+3,931 \cdot y+0,0171 \cdot x^2-0,0091 \cdot x \cdot y-0,0104 \cdot y^2 \quad (7.46)$$

$$Col(Z)=142,33+3,3522 \cdot x-3,2416 \cdot y-0,0073 \cdot x^2-0,0043 \cdot x \cdot y+0,0149 \cdot y^2 \quad (7.47)$$

$$Col.(Z)=262,5026-0,5335 \cdot x-1,9319 \cdot y+0,0064 \cdot x^2-0,0025 \cdot x \cdot y+0,0101 \cdot y^2 \quad (7.48)$$

în care: x – valorile lui LDLc
 y – valorile lui apo B
 z – valorile colesterolului

Apo A-apo B-vârsta pentru martie, iunie, septembrie

$$V(Z) = 88,8076 - 1,2288 \cdot x + 1,3743 \cdot y + 0,0093 \cdot x^2 - 0,0144 \cdot x \cdot y + 0,0028 \cdot y^2 \quad (7.49)$$

$$V(Z) = 100,588 - 0,711 \cdot x + 0,088 \cdot y + 0,0026 \cdot x^2 + 0,0006 \cdot x \cdot y - 0,0009 \cdot y^2 \quad (7.50)$$

$$V(Z) = -33,8304 + 0,048 \cdot x + 1,4375 \cdot y + 0,0028 \cdot x^2 - 0,0062 \cdot x \cdot y - 0,0026 \cdot y^2 \quad (7.51)$$

în care: x – valorile lui apo A
 y – valorile lui apo B
 z – vârsta subiecților

7.2. Modul de operare în vederea testării

Pentru a verifica modelele matematice obținute și prezentate mai sus, se aleg alți 2 subiecți pentru fiecare grupă în parte, pentru care se determină valorile **colesterolului total, apo A și apo B**.

Determinarea valorilor colesterolului total din modelele matematice se face prin introducerea valorilor apo A și apo B în programul de rezolvare a ecuațiilor matematice. Acesta calculează automat pe baza ecuațiilor suprafețelor, valoarea corespunzătoare de pe suprafața a colesterolului total.

Pe baza valorilor experimentale obținute pentru apo A și apo B se determină pentru 2 subiecți, la fiecare din cele două grupe, **hipertensiune arterială și cardiopatie** ischemică, valoarea colesterolului total de pe suprafață, notată colesterol calculat. Aceste date se compară cu cele obținute experimental, prin metode de laborator.

Pentru aceste valori calculate și experimentale ale colesterolului se calculează:

Dispersia de adecvanță σ^2

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2}{n - m - 1} \quad (7.52)$$

în care:

n - numărul de seturi de date,

m - numărul de variabile independente,

$\bar{y}_{i,exp}$ – valori medii experimentale,

$\bar{y}_{i,calc}$ – valori medii determinate pe baza modelului matematic.

Pentru cazul în care avem fiecare set de date cu două valori experimentale, respectiv calculate, se poate folosi relația:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2}{2n} \quad (7.53)$$

Abaterea standard S, calculată din dispersia de adecvanță, se determină cu relația:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2}{2n}} \quad (7.54)$$

Coefficientul de corelație r, al modelului matematic cu modelul real:

$$r = \sqrt{\frac{S_t - S_r}{S_t}} \quad (7.55)$$

în care: **S_t** – **deviația standard** care cuantifică împrăștierea datelor experimentale în jurul valorii medii cu relația:

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i, \text{ iar} \quad (7.56)$$

$$S_t = \sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2 \quad (7.57)$$

și **S_r** **deviația (abaterea) modelului față de experiment**, care se calculează astfel:

$$S_r = \sigma^2 \quad (7.58)$$

Coefficientul de corelație trebuie să tindă spre valoarea 1, pentru a da o corelație bună.

7.3. Calculele matematice efectuate în vederea testării

În urma determinărilor valorilor colesterolului total din modelele matematice, se compară aceste valori cu valorile obținute experimental pentru cele trei determinări (martie, iunie și septembrie). Cele două valori sunt prezentate în tabelul următor (tab. 7.1):

Tabel 7.1. Valorile colesterolului experimental și calculat pentru cele două grupe: hipertensiune arterială și cardiopatie ischemică, la cele 3 determinări (martie, iunie, septembrie)

Grupa	Număr subiect	Apo A	Apo B	Colesterol calculat martie	Colesterol experim. martie	Colesterol calculat iunie	Colesterol experim. iunie	Colesterol calculat septembrie	Colesterol experim. septembrie
Grupa 1	1	123	62	153	160	189	193	203	195
	2	101	56	213	222	164	170	177	181
Media				183	191	176,5	181,5	190	188
Grupa 2	3	143	77	181	170	194	200	196	203
	4	129	67	160	152	173	181	232	238
Media				170,5	161	183,5	190,5	214	220,5

Pentru aceste valori se poate calcula **dispersia de adecvanță, abaterea standard și coeficientul de corelație.**

Pentru grupa 1 - Hipertensiune arterială

Dispersia de adecvanță σ^2 :

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2}{2n}$$

$$\sigma^2 = 14$$

Abaterea standard S:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2}{2n}}$$

$$S = 3,74 \text{ mg\%}$$

Coeficientul de corelație r:

$$r = \sqrt{\frac{S_t - S_r}{S_t}}$$

$$S_t = \sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2$$

$$S_t = 84$$

$$S_r = \sigma^2 = 14$$

$$r = 0,912870$$

Valoarea lui r se apropie de valoarea 1, deci corelația aleasă este bună.

Pentru grupa 2 - Cardiopatie ischemică**Dispersia de adecvanță σ^2 :**

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2}{2n}$$

$$\sigma^2 = 30,25$$

Abaterea standard S:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2}{2n}}$$

$$S = 5,5 \text{ mg\%}$$

Coefficientul de corelație r:

$$r = \sqrt{\frac{S_t - S_r}{S_t}}$$

$$S_t = \sum_{i=1}^n (\bar{y}_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc.})^2$$

$$S_t = 181,5$$

$$S_r = \sigma^2 = 30,25$$

$$r = 0,930949$$

Valoarea lui r se apropie de valoarea 1, deci corelația aleasă este bună.

CAPITOLUL 8

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE

8.1. Concluzii generale

Graficele corespunzătoare corelațiilor dintre colesterolul plasmatic, fracțiile acestuia HDLc, LDLc și apolipoproteinele apo A și apo B, precum și modelele matematice și experimentale, reprezintă documente științifice fundamentale ale hiperlipoproteinemiilor.

Tema lucrării se înscrie în această direcție, aducându-și contribuții la optimizarea și îmbunătățirea performanțelor metodologiilor de investigare a hiperlipoproteinemiilor.

În vederea elaborării lucrării, au fost apelate cunoștințe și documentări din diferite domenii cum ar fi:

- biochimie;
- chimie analitică;
- chimie fizică;
- statistică;
- matematică (metode de calcul, ecuații de regresie)
- informatică (soft-uri Origin Lab 7.0, Statistica 6.0)
- optimizare (verificarea gradului de adecvanță și aproximare a modelelor matematice în raport cu cele experimentale).

În consecință, în lucrare s-au urmărit următoarele obiective:

- 1. Realizarea unei documentări bibliografice referitoare la lipoproteine (structura și clasificarea acestora), precum și la metodele și metodologia de măsurare a concentrației lipoproteinelor în sânge, cu specificarea principalilor componenți a căror concentrații trebuie determinate.**

Acest obiectiv s-a realizat prin studierea unui număr de 58 de referințe bibliografice, cele mai multe din ele de ultimă oră.

Principalii componenți care au fost determinați sunt colesterolul total plasmatic cu fracțiile sale HDLc și LDLc, trigliceridele și apolipoproteinele cu importanță majoră apo A și apo B. Pentru aceștia, au fost alese din datele de specialitate metodele și metodologia determinării lor.

2. Documentare referitoare la optimizarea sistemelor și utilizarea acestora la obținerea unor performanțe mai bune la metodele de investigare.

Pentru acest obiectiv s-au studiat 36 referințe bibliografice legate de modul de determinare a optimului, a coeficientului de corelație dintre diferiți factori și a calculelor statistice pentru determinarea optimului.

3. Alegerea metodei de măsurare și a metodologiei utilizate în cadrul părții experimentale, precum și a parametrilor care prin valorile lor redau cel mai corect conținutul de lipoproteine din sânge.

Unul din obiectivele propuse și atinse ale lucrării este determinarea fracțiilor plasmatic prezentate mai sus, a fracțiilor colesterolului total plasmatic (HDLc, LDLc), a trigliceridelor plasmatic (VLDL), cât și a unor fracții a lipidelor plasmatic circulante în sânge sub forma de apolipoproteine apo A (bogate în HDLc) și apo B (bogate în LDLc), ultimele fracții ale lipidelor plasmatic necesitând costuri ridicate pentru investigare.

S-a dat prioritate colesterolului total, a fracțiilor lui (HDLc, LDLc), a apo A și apo B, cât și a interpretării valorilor lor la cele 2 loturi de subiecți, deoarece se știe că colesterolul este elementul biologic central în apariția aterosclerozei. Această afecțiune medicală se dezvoltă la nivelul arterelor mari și mijlocii, sub forma depunerilor de colesterol sub intima acestor vase sangvine, la început sub formă de striatii, ulterior ele confluează în timp apărând plăcile de colesterol; ele au culoarea galbenă datorită colesterolului și sunt denumite plăci de aterom (din grecescul atheros = galben).

4. Prezentarea sistemului de măsurare ales și justificarea alegerii parametrilor măsurați.

Acest obiectiv s-a atins prin alegerea sistemului de măsurarea a valorilor colesterolului total plasmatic cu fracțiile sale HDLc și LDLc, a trigliceridelor și apolipoproteinelor cu importanță majoră apo A și apo B.

Pentru determinarea acestor parametri s-a folosit fotometrul STAT FAX 1904 PLUS.

Se determină fracțiile plasmatic prezentate mai sus a fracțiilor colesterolului total plasmatic (HDLc, LDLc), a trigliceridelor plasmatic (VLDL), cât și a unor fracții a lipidelor plasmatic circulante în sânge sub forma de apolipoproteine apo A (bogate în HDLc) și apo B (bogate în LDLc), ultimele fracții ale lipidelor plasmatic necesitând costuri ridicate pentru investigare. Creșterea valorilor lipoproteinelor plasmatic se constată cel mai

frecvent și cu implicații sociale cele mai grave, în ateroscleroză, care reprezintă de mai multe decenii "boala secolului". Această entitate patologică este vârf de morbiditate și mortalitate în țările industrializate, iar în țara noastră datele statistice sunt apropiate de cele din aceste țări.

Modificările lipoproteinelor reprezintă profilul biochimic al aterosclerozei, adică diagnosticul biologic al acestei afecțiuni medicale, alături de alte posibilități de diagnostic (examen clinic, EKG, ecocardiograma, etc).

5. Precizarea condițiilor în care se efectuează măsurătorile și rezultatele experimentale obținute.

Au fost luate în studiu 2 loturi de 15 subiecți aflați sub tratament:

- unul prezentând **cardiopatie ischemică** cu sau fără infarct miocardic, la care ateroscleroza reprezintă cauza anatomopatologică;
- altul cu **hipertensiune arterială**,

comparativ cu un lot martor de subiecți sănătoși, fără o afecțiune cardiacă.

La cele două loturi s-au determinat fracțiile lipidelor plasmatice: colesterol cu fracțiile (HDLc, LDLc), trigliceridele și apolipoproteinele apo A și apo B, efectuate în dinamică (trei determinări la interval de 3 luni – martie, iunie, septembrie -) pentru aceiași subiecți.

Repartizarea subiecților la cele două loturi s-a făcut pe cele două sexe și vârsta pacienților, la cardiopatie ischemică (46-71 ani), iar la hipertensiune arterială (55-75 ani).

De asemenea, s-a făcut repartizarea pe 2 loturi în funcție de sexul subiecților, cea a bărbaților cu 18 subiecți cu vârsta între 46-75 ani, iar cea a femeilor cu 12 subiecți, la care vârsta este cuprinsă între 55-72 ani.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 4.1-4.12.

6. Prelucrarea matematică a rezultatelor experimentale, determinarea ecuațiilor modelelor matematice statistice și compararea acestora cu modele teoretice.

Prelucrarea acestor date statistice s-a făcut cu programul Origin Lab 7.0. Acest obiectiv a fost atins prin realizarea corelațiilor **colesterol-apo A, colesterol-apo B, HDLc-apo A și LDLc-apo B**.

Corelația **colesterol-apoA** este necesară, deoarece hipercolesterolemia totală izolată reprezintă un risc pentru ateroscleroză și ea trebuie corelată cu valorile lui apo A, care este fracție apo, protectoare contra apariției aterosclerozei (fiind bogată în HDLc).

Același lucru este valabil pentru corelația între **colesterol - apo B**, care este fracția apo cu risc crescut de aterogeneză (fiind bogată în LDLc) care se găsește în compoziția plăcii de aterom.

Din aceleași considerente s-au făcut corelații între fracția **LDLc** și **apo A** (în compoziția căreia se află în proporție de 60%) și de asemenea, corelații dintre fracția **LDLc** și **apo B** (în compoziția căreia se află în proporție de 90%).

Considerentele care au stat la baza acestor determinări biochimice sunt variațiile oscilante ale aceleiași fracții la același individ, explicată de influențele endogene și exogene la care este supus organismul uman, atât sănătos, cât și cel care prezintă modificări de ateroscleroză; exemple: boli asociate, determinismul genetic, fumatul, stresul psihic, obezitatea, diabetul zaharat.

La subiecții cu ateroscleroză aceste variații ne permit a face aprecieri de ordin terapeutic (reducerea sau creșterea dozelor de statine în funcție de valorile găsite ale fracțiilor lipidice).

Pentru cele 4 corelații s-a utilizat regresia liniară cu calculul ecuației drepte, a coeficientului de regresie și a deviației standard. Deoarece se studiază un lot relativ redus de subiecți pentru fiecare grupă și fiind vorba de parametrii biochimici care pot fi influențați și de alți factori endogeni și exogeni pentru un calcul statistic eficient, coeficientul de regresie trebuie să fie mai mare de 0,4, iar deviația standard cât mai mică. Analizând datele obținute pentru cele 4 corelații, a coeficientului de regresie și a deviației standard se observă o corelație bună, iar valorile obținute conduc la o serie de concluzii din punct de vedere a diagnosticului aterosclerozei și a tratamentului medicamentos cu statine.

Aceste particularități legate de tipul de afecțiune cardiacă, de sexul sau vârsta subiecților, se regăsesc și în modificările diverselor fracții ale lipidelor plasmaticice.

Interpretarea valorilor fracțiilor lipidelor plasmaticice este supusă unor factori care par uneori paradoxali, mai ales dacă sunt corelați cu starea clinică a subiecților respectivi. Sunt o serie de factori care produc aceste modificări, hiperlipoproteinemii primare induse genetic: fumatul, alcoolismul cronic, diverse endocrinopatii, pancreatite cronice și care trebuie luate în bilanțul evaluării valorilor obținute la un moment dat, dar și în corelarea lor cu determinările efectuate dinamic

Un alt aspect al interpretării rezultatelor îl constituie analiza comparativă a informației apriorice și a informației rezultate din experimentul factorial. Se impune verificarea identității condițiilor de experimentare din punct de vedere al intervalului de variație și respectiv, din particularitățile metodelor de experimentare, care pot fi:

- unifactoriale (clasice);
- multifactoriale (moderne).

În concluzie, erorile de experimentare, respectiv de informare, precum și caracterul local al explorării spațiului multifactorial, și respectiv caracterul monofactorial al informației apriorice sunt aspecte de care trebuie să se țină

seama în interpretarea rezultatelor, și implicit în luarea deciziilor și eventual de prognozarea stării de sănătate a pacientului.

7. Determinarea relațiilor de interdependență dintre componentele determinante: colesterol – apo A – apo B, colesterol-HDLc-apo A, colesterol-LDLc-apo B, apo A-apo B-vârstă.

Luând în considerare cele expuse mai sus, s-a ajuns la concluzia că relațiile de dependență **colesterol-apo A-apo B, colesterol-HDL-apo A, colesterol-LDL-apoB și apo A-apo B-vârstă**, pot modela mai bine situația unui bolnav.

În continuare, s-a urmărit variația parametrilor **colesterol-HDL-apo A, colesterol-LDL-apoB, colesterol-apo A-apo B, apo A- apo B-vârstă** și compararea lor cu valorile normale.

Alegerea corelațiilor între valorile colesterolului total, cât și a celor 2 fracții ale sale (HDLc și LDLc) și a valorilor apo A și apo B este justificată de faptul că aceste fracții lipidice reprezintă markerii biochimici ai aterosclerozei. Așa cum s-a prezentat anterior, colesterolul este prezent în substratul anatomic a aterosclerozei, care sunt plăcile de aterom din pereții arterelor mari și mijlocii. Prezența la un individ a modificărilor anatomice de ateroscleroză poate fi documentată prin mai multe metode (clinice, EKG, angiografie, ecocardiografie, etc...), care nu fac obiectul tezei de față.

Lucrarea de față se ocupă de aspectul biochimic prin care putem documenta modificările de ateroscleroză, iar acestea sunt reprezentate de valorile colesterolului total și a fracțiilor sale (HDLc, LDLc), cât și a celor două apolipoproteine apo A și apo B, care conțin în structura lor fracțiile colesterolului.

Se știe că depunerile de colesterol în pereții arterelor începe la vârste tinere, ele evoluând în ani de zile, având o maximă incidență între 40 și 60 de ani la bărbați, iar la femei după vârsta de 50 de ani, când instalarea menopauzei nu îi mai conferă femeii protecția hormonală față de apariția aterosclerozei.

Prelucrarea datelor experimentale s-a făcut cu programul STATISTICA 6.0, la care s-au folosit metodele **Quadrat Surface și Spline**, cu un coeficient de încredere setat la introducerea valorilor experimentale de 95 %. Aceste reprezentări ne dau ecuațiile de aproximare a suprafețelor prin regresie multiplă neliniară, care vor fi folosite ca modele matematice în capitolul 7.

Reprezentarea corelațiilor colesterolului total, a fracțiilor sale (HDLc, LDLc) cu apolipoproteinele principale apo A și apo B, s-a făcut la cele 3 determinări efectuate la un interval de 3 luni (martie, iunie, septembrie) pentru cele două grupe de boli, **hipertensiune arterială și cardiopatie ischemică**, și apoi pe cele două grupe obținute prin împărțirea pe sexe a subiecților – **bărbați și femei**. Din aceste reprezentări s-au evidențiat o serie de concluzii referitoare la relevanța determinărilor.

Se constată, că la majoritatea subiecților cu hipertensiune arterială (grupa 1) se găsesc valori puțin modificate față de cele normale, deși vârsta subiecților este destul de ridicată, atât la cei de sex masculin cât și la cei de sex feminin. Acest lucru sugerează faptul că hipertensiunea arterială are mecanisme patogenetice proprii, unele dintre ele prezente și în determinismul formelor clinice de ateroscleroză, dar fără ca să fie obligatorie modificarea profilului biochimic a fracțiilor lipidice, așa cum le întâlnim în ateroscleroză. Trebuie să subliniem că aceste modificări ale profilului biochimic al lipidelor plasmatic, care uneori nu se corelează cu afecțiunea subiectului, cu vârsta sau sexul subiecților, este influențată și de constanța acestora. Controlul valorilor tensionale la lotul de subiecți cu hipertensiune arterială face ca această suferință să nu mai aibă același impact negativ asupra evoluției acestor subiecți, această boală nemaiprezentând un factor de risc pentru apariția unei forme clinice de ateroscleroză.

La subiecții cu cardiopatie ischemică (grupa 2) se desprind următoarele concluzii:

- la unii subiecți, valorile diverselor fracții lipidice au fost diferite la cele 3 determinări efectuate la interval de 3 luni, ceea ce concordă cu considerente teoretice expuse anterior, privind evoluția dinamică a acestor valori;
- analiza valorilor apolipoproteinelor efectuate la lotul de subiecți cu cardiopatie ischemică, sugerează o concordanță la majoritatea cazurilor, între valorile crescute ale apo A și cel al HDLcolesterol, ceea ce sugerează un prognostic evolutiv favorabil al afecțiunii cardiace. Din contră la subiecții cu apo B crescut s-au întâlnit valori ale LDLcolesterol-ului, cu mici excepții, crescute ceea ce are ca valoare predictivă, o evoluție nefavorabilă a acestor subiecți;
- în general, aceste date prezentate s-au corelat cu prezența la subiecții cu apo B crescut și LDLc crescut, a unor factori de risc aterogenetic (fumat, obezitate, stres psihic, etc).

Determinarea valorilor trigliceridelor serice la subiecții cu cardiopatie ischemică nu a evidențiat modificări semnificative, doar la 2-3 subiecți fiind valori puțin peste valorile normale maxime admise. De altfel, hipertrigliceridemia reprezintă un factor de risc aterogenetic cu valoare mai redusă comparativ cu modificările colesterolului plasmatic și a fracțiilor sale. Hipertrigliceridemiile situate la valori foarte crescute (3-4 ori față de valorile normale) sunt considerate ca având o corelație cu dezvoltarea unei forme clinice de ateroscleroză și acestea, de obicei, sunt hipertrigliceridemiile primare induse genetic.

Tratamentul modern a hiperlipoproteinemiilor (cu statine a hipercolesterolemiiilor și cu fibrați ale hipertrigliceridemiilor) a condus la un control riguros al dislipidemiilor la subiecții studiați, ceea ce explică puținele cazuri la care s-au întâlnit valori foarte crescute ale fracțiilor aterogenetice

(LDLc, apo B, trigliceride). Acestea sunt standardizate în ghiduri terapeutice practice care sunt utilizate la toți subiecții cu tulburări ale metabolismului lipidic.

8. Testarea performanțelor modelelor matematice statistice obținute.

Utilizând programul STATISTICA 6.0 s-au realizat reprezentările din capitolul 6, cu ajutorul cărora s-au determinat modele matematice care sunt ecuațiile de aproximare a suprafețelor prin regresie neliniară, selectând modelul de aproximare *Quadrat Surface*, coeficientul de încredere setat la introducerea variabilelor fiind de 95%..

Corelațiile urmărite sunt **colesterol-apo A-apo B, colesterol-HDLc-apo A, colesterol-LDLc-apo B și apo A-apo B-vârstă**.

Pentru a verifica modelele matematice obținute și prezentate mai sus, se aleg alți 2 subiecți pentru fiecare grupă în parte, pentru care se determină valorile colesterolului total, apo A și apo B.

Determinarea valorilor colesterolului total din modelele matematice se face prin introducerea valorilor apo A și apo B în programul de rezolvare a ecuațiilor matematice. Acesta calculează automat pe baza ecuațiilor suprafețelor, valoarea corespunzătoare de pe suprafață a colesterolului total.

Pe baza valorilor experimentale obținute pentru apo A și apo B se determină pentru 2 subiecți, la fiecare din cele două grupe: hipertensiune arterială și cardiopatie ischemică, valoarea colesterolului total de pe suprafață, notată colesterol calculat. Aceste date se compară cu cele obținute experimental prin metode de laborator.

Pentru aceste valori calculate și experimentale ale colesterolului se calculează:

- Dispersia de adecvanță σ^2 ;
- Abaterea standard S;
- Coeficientul de corelație r.

Valoarea lui r se apropie de valoarea 1, deci corelația aleasă este bună.

8.2. Contribuții originale

Contribuțiile personale originale în realizarea acestei teze de doctorat, constau în abordarea originală a metodelor de investigare a hiperlipoproteinemiei și încercarea îmbunătățirii performanțelor acestora. În acest sens, s-au abordat metode computerizate de calcul statistic și de optimizare a valorilor obținute experimental, și compararea lor cu modele matematice statistice.

Utilizând tehnica de calcul avansată se ușurează atât desfășurarea calculului matematic, cât și a cercetărilor experimentale, soft-urile utilizate (Origin Lab 7.0 și Statistica 6.0) permițând scurtarea duratei de timp și mărirea preciziei în efectuarea cercetărilor.

În consecință contribuțiile originale sunt:

1. Determinarea fracțiilor plasmatice, a **colesterolului total plasmatic** și **fracțiilor sale (HDLc, LDLc)**, a **trigliceridelor plasmatice (VLDL)**, cât și a unor fracții a lipidelor plasmatice circulante în sânge sub forma de **apolipoproteine apo A** (bogate în HDLc) și **apo B** (bogate în LDLc), ultimele fracții ale lipidelor plasmatice necesitând costuri ridicate pentru investigare.

S-a dat prioritate colesterolului total, a fracțiilor lui (HDLc, LDLc), a apo A și apo B, cât și a interpretării valorilor lor la cele 4 loturi de subiecți, deoarece se știe că colesterolul este elementul biologic central în apariția aterosclerozei.

2. Prelucrarea matematică a rezultatelor experimentale și determinarea ecuațiilor liniare ale modelelor matematice statistice și compararea acestora cu modele teoretice. Prelucrarea acestor date statistice s-a făcut cu programul Origin Lab 7.0 . S-au realizat următoarele corelații: **colesterol-apo A, colesterol-apo B, HDLc-apo A și LDLc-apo B.**

Corelația **colesterol-apo A** este necesară deoarece hipercolesterolemia totală izolată reprezintă un risc pentru ateroscleroză și ea trebuie corelată cu valorile lui apo A, care este fracție apo, protectoare contra apariției aterosclerozei (fiind bogate în HDLc).

Același lucru este valabil pentru corelația **colesterolul - apo B**, care este fracția apo cu risc crescut de aterogeneză (fiind bogate în LDLc), care se găsește în compoziția plăcii de aterom.

Din aceleași considerente s-au făcut corelații **HDLc - apo A** (în compoziția căreia se află în proporție de 60%) și de asemenea corelații **LDLc - apo B** (în compoziția căreia se află în proporție de 90%).

Pentru cele 4 corelații (fig.4.1-4.41), s-a utilizat regresia liniară cu calculul ecuației drepte, a coeficientului de regresie și a deviației standard. Analizând datele obținute pentru cele 4 corelații, a coeficientului de regresie și a deviației standard, se observă o corelație bună, iar valorile obținute conduc la o serie de concluzii din punct de vedere a diagnosticului aterosclerozei și a tratamentului medicamentos cu statine.

3. S-au urmărit corelațiile de dependență **colesterol-apo A-apo B, colesterol-HDL-apo A, colesterol-LDL-apoB și apo A-apo B-vârstă**, care pot modela mai bine situația unui bolnav.

Prelucrarea datelor experimentale s-a făcut cu programul STATISTICA 6.0, la care s-au folosit metodele **Quadrat Surface și Spline**, cu un coeficient de încredere setat la introducerea valorilor experimentale de 95 %. Aceste reprezentări ne dau ecuațiile de aproximare a suprafețelor prin regresie multiplă neliniară, care vor fi folosite ca modele matematice.

Reprezentarea corelațiilor colesterolului total, a fracțiilor sale (HDLc, LDLc) cu apolipoproteinele principale apo A și apo B, s-a făcut la cele 3 determinări efectuate la un interval de 3 luni (martie, iunie, septembrie) pentru cele două grupe de boli, **hipertensiune arterială și cardiopatie ischemică**, și apoi pe cele două grupe obținute prin împărțirea pe sexe a subiecților – **bărbați și femei**. Din aceste reprezentări s-au evidențiat o serie de concluzii referitoare la relevanța determinărilor.

4. Testarea performanțelor modelelor matematice statistice.

Utilizând programul STATISTICA 6.0 s-au realizat reprezentările grafice 6.1-6.144, cu ajutorul cărora s-au determinat modele matematice care sunt ecuațiile de aproximare a suprafețelor prin regresie neliniară, selectând modelul de aproximare **Quadrat Surface**, coeficientul de încredere setat la introducerea variabilelor fiind de 95%.

Corelațiile urmărite sunt **colesterol-apo A-apo B, colesterol-HDLc-apo A, colesterol-LDLc-apo B și apo A-apo B-vârstă**.

Pentru a verifica modelele matematice obținute și prezentate mai sus, se aleg alți 2 subiecți pentru fiecare grupă în parte, pentru care se determină valorile **colesterolului total, apo A și apo B**.

Determinarea valorilor colesterolului total din modelele matematice se face prin introducerea valorilor apo A și apo B în programul de rezolvare a ecuațiilor matematice. Acesta calculează automat pe baza ecuațiilor suprafețelor valoarea corespunzătoare de pe suprafața a colesterolului total.

Pe baza valorilor experimentale obținute pentru apo A și apo B se determină pentru 2 subiecți la fiecare din cele două grupe, **hipertensiune arterială și cardiopatie ischemică**, valoarea colesterolului total de pe suprafață, notată **colesterol calculat**. Aceste date se compară cu cele obținute experimental prin metode de laborator.

Pentru aceste valori calculate și experimentale ale colesterolului s-a calculat:

- Dispersia de adecvanță σ^2 ;
- Abaterea standard S;
- Coeficientul de corelație r.

Pentru grupa 1 – Hipertensiune arterială valoarea coeficientului de corelație este $r = 0,912870$, iar pentru grupa 2 – cardiopatie ischemică valoarea este $r = 0,930949$.

Valoarea lui r se apropie de 1, ca urmare corelația aleasă este bună, deci valorile sunt reproductibile și pot ajuta la diagnosticarea hiperlipoproteinemiilor și în tratamentul ulterior al subiecților cu probleme aterosclerotice.

5. Conceperea unui program care să permită calculul colesterolului (z) funcție de valorile corespunzătoare ale apo A (x) și apo B (y), care se poate extinde la orice tip de corelație prin introducerea în program a ecuațiilor modelelor matematice 7.4-7.51. Aceste valori pot fi comparate cu cele experimentale, iar valorile calculate a indicatorilor de adecvanță pot preciza dacă valorile sunt reproductibile și pot conduce la o serie de concluzii din punct de vedere a diagnosticului aterosclerozei și a tratamentului medicamentos cu statine.

BIBLIOGRAFIE

1. Albrink M.I., Man E.B., Peters J.P. – J. Clin. Invest., 1955, 34, 147
2. Ancău M, Nistor L. – Tehnici numerice de optimizare în proiectarea asistată pe calculator, Ed. Tehnică, București, 1996
3. Angerwall G. – Acta medical scandinavien, 1964, 76, suppl. 424, 60.
4. Austin GE, Maznicki E - Automated turbidimetric assay of serum apolipoprotein A-1 using the Cobas-Bio centrifugal analyzer. Clin. Biochem. 16:338, 1983
5. Azrolan N, Gavish D, Breslow JL - Plasma lipoprotein (a) concentration is controlled by apolipoprotein (a) [apo (a)] protein size and abundance of hepatic apo (a) mRNA levels in cynomologus monkey model, J Biol Chem 1991, 266: 13866-13872
6. Beaumont J.L., Carlson L.A., Cooper G.R., Fejfar Z., Fredrickson D.S., Strasser T. – Bull. Wld. Hlth. Org., 1970, 43, 891.
7. Bellman R.E., Dreyfus S.E. - Programare dinamică aplicată. Editura Tehnică. București, 1967
8. Beveridge G.S., Schechtei C.S. - Optimization: Theory and Practice. McGraw Hill, New York, 1970
9. Berg K.G. – Acta Pathological microbiological scandinavien, 1963, 59, 369
10. Berg K - A new serum type system in man-the Lp system. Acta Pathol Microbiol Scand 1963; 59: 369-382
11. Bersot TP Mahley RW - Clinical classifications of lipid abnormalities in: Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds) Atherosclerosis and coronary artery disease Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, 1996, 163-169
12. Bierman E.L., Gordis E., Hamlin J.T. – J. Clin. Invest., 1962, 41, 254
13. Bostom AG, Gagnon DR, Cupples LA, Wilson PW, Jenner JL, Ordovas JM, Schaefer EJ, Castelli WP - A prospective investigation of elevated lipoprotein (a) detected by electrophoresis and cardiovascular disease in women. Circulation 1994; 90: 1688-1695
14. Bottalico LA, Keesler GA, Fless GM, TABAS I - Cholesterol loading of macrophages leads to marked enhancement of native lipoprotein (a) and, apoprotein (a) internalization and degradation. J Blot Chem 1993; 268: 8569-8573.
15. Braunwald E., Zipes D.P., Libby P. – 6th Edition Heart Disease, Harcourt International Edition, 2001

16. Breslow J - Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Baudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) The metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases New York, McGraw-Hill, 1995: 2031-2049
17. Brewer HB jr, Santamarina-Fojo S. Hoeg JM. - The molecular biology of the human plasma apolipoproteins, lipoprotein receptors and lipoprotein lipase. In Steiner O, Shafir E, eds. The Hyperlipidemias. New York: McGraw-Hill, Vol.II, Primary Hyperlipidemias, 1991
18. Brunzell JD - Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. in: Scriver CR, Baudet AL, Sly WS, Valle D (eds), The Metabolic and Molecular Basis of inherited Diseases New York, McGraw-Hill, 1995; 1913-1927
19. Burstein M., Fine J.H. – Revue française. Etudes clinico-biologiques, 1964, 9, 420
20. Carlson LA, Holmquist L - Evidence for deficiency of high density lipoprotein Lecithin: cholesterol acetyltransferase activity (LCAT) in fish-eye disease. Acta Med.Scand.1985; 218: 189-196
21. Cicală E. F. – Metode de prelucrare statistică a datelor experimentale, Ed. Politehnica, Timișoara, 1999
22. Collatz L., Wetterling W. Optimierungsaufgaben. Springer Verlag, Berlin, 1971
23. Cristea M. V., Agachi Ș. P. – Elemente de teoria sistemelor, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2002
24. Curievici I. – Optimizări în industria chimică, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1980
25. De Bruin TWA., Cazebas MC, Dallinga-Thie G, Erkelen S - Familial combined hyperlipidaemia - do we understand the pathophysiology and genetics? In: Betteridge J Lipids and lipoproteins, Martin Dunitz Ltd., 1996: 101-114
26. De Gennes J.L.; Hamburger J.M., Pequignot H. – Presse medicale, 1966, 74, 261
27. De Meester CA, Bu X, Puppione D, Gray RM, Lusic AJ, Rotter JL - Genetic variation in lipoprotein (a) levels in families enriched for coronary artery disease is determined almost entirely by the apolipoprotein (a) gene locus, Hum Genet 1995; 56: 675-679
28. Dogaru C., Dragoș D. - Biochimie – Metode de laborator, Ed. Mirton Timișoara, 1998.
29. Dogaru C., Rusu V., Belengeanu V., Moldovan I., - Biochimie clinică, Ed. Mirton Timișoara, 1998.
30. Dogaru C., David Dana, Sfrijan Felicia, Caraion Cristina – Biochimie clinică, vol. III, Ed. Eurostampa, Timișoara, 2002
31. Drăgan I. Tehnici de bază în programarea liniară. Editura tehnică, București 1976

32. Dubois C., Armand M., Mekki N., Portugal H., Pauli A. M., Bernard P. M., Lafont H., Lairon D. - Effects of increasing amounts of dietary cholesterol on postprandial lipemia and lipoproteins in human subjects, *J. Lipid. Res.*, 1994, 35 (11), 1993-2007.
33. Dumitru V. - Programare neliniară. Editura Acad. R.S.R. București, 1975
34. Dyeberg J., Hjørne N. – *Acta medical scandinavien*, 1972, 191, 413
35. Erfurth H., Just G. - Modellierung und Optimierung chemischer Prozesse, VEB, Leipzig, 1973
36. Feuer G., Iglesias F. – *Molecular Biochemistry of human diseases*, vol.I, C.R.C. Press Inc., Boca Raton, 1985
37. Forrow L., Calkins D.R., Allhouse K., Horowitz G., Delblanco T.L. - Evaluating cholesterol screening. The importance of controlling for regression to the mean, *Arch. Intern. Med.*, 1995, 155, 2177-2184
38. Fredrickson D.S., Lees R.S. – *Circulation*, 1965, 31, 321
39. Gârban Z. – *Tratat Elementar de Biochimie*, Vol. 1, Part. 1, Ed. Mirton, 1993
40. Gârban Z., Riviș A., Precob V., Gâțlan Doina, Avacovici Adina, Neamțu Lucia, Orjanu Loredana – The action of alcoholic beverages in occasional and chronic consumption in experimental animals – *Lucrările Științifice, Semicentenar U.S.A.B. Timișoara*, Ed. Eurobit, Timișoara, 1995, p. 155-158
41. Gârban Z., Riviș A. – Particularități ale relației structură chimică-activitate biologică la apolipoproteine - *Lucrările Simpozionului "Științe, procese și tehnologii agroalimentare"*, Zilele academice timișene, Ed, a VI-a, 27-28 mai 1999, Timișoara, p. 143-148
42. Genest J Jr, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, Silberman SR, Wilson PWF, Schacifer EJ - Prevalence of lipoprotein (a) [Lp (a)] excess in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1991; 67: 1039-1045
43. Gofman Breckenridge W.C., Patten R.I. – *Disorder's of lipidic metabolism*, P. 457-475 in "Applied Biochemistry of Clinical Disorder's" (Ed. by Gernall A. G.), J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1986
44. Goldstein JL, Brown MS. - Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th edition. New York: McGraw-Hill, 1989, 1215-1250
45. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR - High density lipoprotein as a protective factor against coronary artery disease: The Framingham study. *Am. J Med.* 62:707, 1977
46. Gotto A. M. Jr. (Ed) - Plasma Lipoproteins, in "New Comprehensive Biochemistry" (Neuberger A., van Deenen L.L.M.) Elsevier, Amsterdam, 1987

47. Glomset J - The plasma lecithin cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res.* 9:155, 1968
48. Glueck CJ, Glueck HI, Tracy T, Speirs J, McCray C, Stroop D - Relationship: lipoprotein (a), lipids, apolipoproteins, basal and stimulated F regulators, and D-dimer. *Metabolism* 1993; 42: 236-246
49. Glück A. - Metode matematice în industria chimică. Editura Tehnică, București, 1971
50. Grainger DJ, Kirschenlor HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP, Lawn RM - The proliferation of human smooth muscle cell is promoted by lipoprotein (a). *Science* 1993; 260: 1655-1658
51. Hatch F.T., Lindgren F.T., Adamson G.L., Jensen L.C., Wong A.W., Levy R.I. - *J. Lab. Clin. Med.*, 1973, 81, 6.
52. Havel R.J., Eder H.A., Bragdon J.H. - *J. Clin. Invest.*, 1955, 34, 184
53. Havel R.J. - Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. In Schettler FD, ed. *Atherosclerosis VI*. Berlin: Springer-Verlag, 1983:480
54. Havel RJ, Hamilton RL. - Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* 1988, 8, 1689-1704
55. Hoffmann U., Hofmann H. - Einführung in die Optimierung. Verlag Chemie GmbH, 1970
56. Iammarino R.M., Humphrey M., Antolik P. - *Clin. Chem*, 1969, 15, 1218
57. Jenner JL, Ordovas JM, Lamon-Fava S, Schaefer MM, Wilson PW, Castelli WP, Schaefer EJ - Effects of age, sex, and menopausal status on plasma lipoprotein (a) levels: The Framingham Offspring Study. *Circulation* 1993;87: 1135-1141
58. Kafarov V.V. - Méthodes cybernétiques et technologie chimique. Ed. Mir, Moscov 1974
59. Kottke BA, Zinzmeister AR, Holmes DR, Kneller RW, Hallaway BJ, Mao SJ - Apolipoproteins and coronary artery disease. *Mayo Clin. Proc.* 61:313, 1986
60. Kraft HG, Kochl S, Menzel JH, Sandholzer C, Utermann G - The apolipoprotein (a) gene: A transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein (a) concentration. *Hum Genet* 1992; 20 : 220-230
61. Kukiia H, Hiwada K, Kokubu T - Serum apolipoprotein A-1,A-2 and B levels and their discriminative values in relative ofpatients with coronary artery disease. *Atheroscler.* 51:261, 1984
62. Lawn RM, Scanu AM - Lipoprotein (a). In: Fuster V, Ross R and Topol El (eds) *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996. Von Rijn H, Kimmel C, Gimpel JA, Kortland W, Bruinse HW Does Lp (a) act as an acute phase reactant in healthy young women who underwent cesarian section? *Clin Chem Enzyme Commun* 1993; 5: 157-162
63. Lees R.S. - *J. Clinic Invest.*, 1965, 44, 1, 968.

64. Lees R.S., Hatch F.T. – J. Lab. Clin. Med., 1963, 61, 518
65. Lindgren J. W., Elliott H. F.T... - J. Biol. Chem. 1949,179: 973-979
66. Lindhal G, Gersdorf E, Menzel HL, Seed M, Humphries SE, Utermann G - Variation in the size of human apolipoprotein (a) is due to a hypervariable region in the gene. Hum Genet 1990; 80: 563-567
67. Liteanu C., Rîcă I. – Optimizarea proceselor analitice, Ed. Academiei, București, 1985.
68. Lucaci A. I., Agachi Ș. P. – Optimizarea proceselor din industria chimică, Editura Tehnică, București, 2002
69. Maciejko JJ, Holmes DR, Kottke BA, Zinzmeister AR, Dinh DM, Mao SJ - Apolipoprotein A-I as a marker of angiographically assessed coronary artery disease. N Engl. J Med. 309:385, 1983
70. Malenge J.P. - Optimisation, curs postuniversitar ținut în Franța, 1968.
71. McGlasshan D.A.K, Pilkington T.R.E. Clinical Chemical Acta., 1968, 22, 646
72. Mihail R. - Introducere în strategia experimentării cu aplicații în tehnologia chimică. Editura științifică și enciclopedică, București, 1976
73. Mincu I, Popescu Aurora, Ionescu Târgoviște C. - Elemente de Biochimie și Fiziologie a nutriției, Ed. Medicală, București, 1985.
74. Mincu I., Hâncu H. - Lipidologie clinică - Dislipidemii, Ed. Medicală, București, 1976
75. Naito HK - The clinical significance of apolipoprotein measurements. J Clin. Immunoassay, 9:11, 1986
76. Nelson G.J. – J.Lipids., 1967, 2, 64
77. Nichici A, Cicală E. – Prelucrarea datelor experimentale, Ed. Politehnica, Timișoara, 1996
78. Ostrowski G.M., Wolin J.M. - Methoden zur Optimierung chemischer Reaktoren, Akademie Verlag, Berlin, 1973
79. Palabrica TM, Liu AC, Aronovitz Mi, Furie B, Lawn RM, Furie BC - Antifibrinolytic activity of apolipoprotein (a) in vivo: Human apolipoprotein (a) transgenic mice are resistant to tissue plasminogen activator-mediated thrombotysis. Nature Med 1995; 1
80. Perju Delia – Automatizarea proceselor în industria chimică, IPTVT, Timișoara, 1981.
81. Perju Delia – Automatizarea utilajului tehnologic în industria chimică, IPTVT, Timișoara, 1983.
82. Perju Delia - Automatizări și optimizări din industria chimică, IPTV Timișoara, 1983.
83. Perju Delia, T. Todincă – Automatizarea proceselor chimice – Ed. Politehnica Timișoara, 1995.
84. Perju Delia, Geantă M., Șuta M., Rusnac Carmen – Automatizarea proceselor chimice, Ed. Politehnica Timișoara, 1998

85. Perju Delia, Şuta M., Rusnac Carmen – Echipamente de automatizare pneumatică de joasă presiune, Ed. Politehnica, Timișoara, 2003
86. Perju Delia, Todincă T., Şuta M., Rusnac Carmen – Echipamente de automatizare pneumatică de joasă presiune - aplicații, Ed. Politehnica, Timișoara, 2001
87. Phillips ML, Lembertas A, Schumaker V, Lawn RM, Shire S, Zioncheck TF - Physical properties of recombinant apolipoprotein (a) and its association with LDL to form an Lp (a)-like complex. *Biochemistry* 1993; 32: 3722-3728
88. Rader DJ, Cain W, Zech LA, Usher D, Brewer HB Jr. - Variation in lipoprotein (a) concentration among individuals with the same apolipoprotein (a) isoform is determined by the rate of lipoprotein (a) production, *J Clin Invest* 1993; 91:443-447
89. Rider A.K., Levy R.I., Fredrickson D.S. – *Circulation*, 42, Supplement III: 10, 1971
90. Rifai N - Lipoproteins and apolipoproteins: Composition, metabolism, and association with coronary heart disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110:694, 1986
91. Rifai N, King ME - Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, A-1, A-2 and B in serum. *Clin. Chem.* 32:957, 1986 Stein EA: Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins. In *Textbook of Clinical Chemistry*, NWTietz, Editor, Saunders, Philadelphia, 1986, p 846
92. **Riviş A.** – Metode de laborator în determinarea colesterolului seric total - Cercetări științifice, Procese și tehnologii agroalimentare, Ed. V, 1999, p. 291-292 , Ed. Agroprint Timișoara.
93. **Riviş A.**– Structura lipoproteinelor și considerații terapeutice în hiperlipoproteinemii - Cercetări științifice, Procese și tehnologii agroalimentare, Ed. V, 1999, p. 293-296 , Ed. Agroprint Timișoara.
94. **Riviş A.** – Metode de investigare a hiperlipoproteinemiilor. I. Metode electroforetice, *Lucrările simpozionului „Științe, procese și tehnologii agroalimentare”*, Zilele academice timișene, ediția a VII-a, 2001, Ed. Eurostampa Timișoara, p. 262-266
95. **Riviş A.** – Metode de investigare a hiperlipoproteinemiilor. II. Metode ultracentrifugale, *Lucrările simpozionului „Științe, procese și tehnologii agroalimentare”*, Zilele academice timișene, ediția a VII-a, 2001, Ed. Eurostampa Timișoara, p. 267-272
96. Riviş I., Burghină D., Dogaru C., Precob V., Vasiluță Deliana, **Riviş A.**, Severineanu V., Ștefănescu Mihaela, Mihalaș Minodora – Our clinic experience in quantifying myocardial reperfusion of acute myocardial infarction thrombolysed with streptokinase or urokinase – 2nd International Congress on Coronary artery disease, Florence, Italy, october 18-21, 1998, p. 384

97. Riviş I., Drăgulescu S. I., Gavrilescu D., Burghină D., Slovenski M., Popa R., Mihalaş Minodora, Ciobotaru Gabriela, Vasiluţă Deliana, Domide C., Ţunea Oana, Riviş A. - The coronary repercussion after using different thrombolytic agent in treatment of acute myocardial infarction – 9th International Congress on cardiovascular pharmacotherapie; Salvador- Bahia, Brasil, 27-30 martie 2000
98. Roberts S.M. - Dynamic Programming in Chemical Engineering. Academic Press, New York, 1964
99. Roehring L. Karla – Carbohydrate Biochemistry and Metabolism, Avi Publishing Company Inc., Westport Connecticut, 1984
100. Rudd D.F. Watson Cr. - Strategy of Process Engineering. John Wiley, New York. 1968.
101. Scanu AM, Fless GM. - Lipoprotein (a) - Heterogeneity and biological relevance. J Clin Invest 1990;85:1709-1715
102. Scanu A, Pfaffinger D, Edelstein C Postprandial Lp (a): - Identification of a triglyceride-rich particle containing apo E. Chem Phys Lipids 1994; 67/68:193-198
103. Seidel D., Agostini B., Muller P. – Biochemistry and biophysic Acta, 1972, 260, 146
104. Smigelschi O., Woinaroschy A. Optimizarea proceselor în industria chimică. Editura tehnică, Bucureşti, 1978
105. Smith CL, ş.a. - Formulation and Optimization of Mathematical Models. International Textbook Comp., 1970
106. Stein E.A. – Lipids, lipoproteins and apolipoproteins, in Textbook of Clinical Chemistry, NWTietz, Editor, Saunders, Philadelphia, 1986, p. 846
107. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL - Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 1989, 320, 915-924
108. Stone M.C., Thorp J.M., Mills G.L., Dick T.B.S. – Clinical Chemical Acta, 1971, 31, 333
109. Thompson GR - Primary hypertriglyceridaemia. In: Carlson L, Illingworth DR, Stein E, Utermann G (eds): A handbook of Hyperlipidaemia. Current Science, Ltd., London, 1989, 101-113
110. Tiron M. – Prelucrarea statistică şi informaţională a datelor de măsurare, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1976.
111. Todincă T., Perju Delia, Şuta M. – Optimizări în industria chimică, vol. I, Ed. Mirton, Timişoara, 1993.
112. Todincă T, Geantă M. – Modelarea şi simularea proceselor chimice, Ed. Politehnică, Timişoara, 1999
113. Walker MK, Liggins GL - Determination of expected concentration ranges for lipoproteins A1 and B in human serum samples. Clin. Chem. 28:1595, 1982
114. Wilcox H.G., Davis D.C., Heimberg M. – J. Lipid Res., 1971, 12, 160

115. Wilde D.J., Beightler C.S. - Foundations of Optimization. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1967
116. Williams JK, Bellinger DA, Nichols TC, Griggs FR, Bumol TF, Fouts RL, Clarkson TB - Occlusive arterial thrombosis in cynomolgus monkeys with varying plasma concentrations of lipoprotein (a) *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 548-554
117. Wilkinson J, Higgins J. A., Fitzsimmons C., Bowyer D. E. – Dietary fish oils modify the assembly of VLDL and expression of the LDL receptor in rabbit liver – *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18 (9), p. 1490-1497, 1998
118. Winkelman J., Ibbott F.A., Sobel C., Wybenga D.R. – *Clinical Chemical Acta.*, 1969, 26, 33
119. Woinaroschy A., Smigelschi O. – *Ingineria sistemelor și optimizarea proceselor chimice*, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1983
120. Woinaroschy A., Mihai A., Isopescu R. – *Optimizarea proceselor din industria chimică, exemple și aplicații*, Ed. Tehnică, București, 1990