

UNIVERSITATEA "POLITEHNICĂ" TIMIȘOARA

**FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ
ȘI
INGINERIA MEDIULUI**

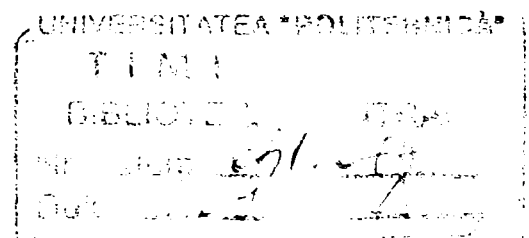
**BIOCHIMIST:
IULIAN IONESCU**

TEZĂ DE DOCTORAT

**PARTICULARITĂȚILE HOMEOSTAZIEI BIOCHIMICE A
ACIZILOR GRAȘI ÎN AFECȚIUNI NEURO-MUSCULARE**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC :
PROF. DR. ZENO GÂRBAN**

**BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"
TIMIȘOARA**



2002

Când îți propui un scop, timpul, în loc să crească, scade.
N.RIVAROL

Cuvânt înainte

Stimate Cititorule,

Am considerat util să structurăm lucrarea în cinci capitole distincte, urmând logica de drept a unei expuneri științifice.

Capitolul 1. *A fost dedicat punerii în temă a cititorului cu patologia afecțiunilor neuro-musculare cu determinism genetic. Datele prezentate poate sunt istorie, dar aceste maladii grave invalidante, descriu realitatea cotidiană, dură, a unor dintre semenii noștri. Din nefericire, cunoașterea insuficientă a domeniului afecțiunilor eredo-degenerative se reflectă în ultimul timp prin creșterea incidenței acestor maladii a căror terapie eficientă, definitivă, se va lăsa așteptată încă mulți ani.*

Am dorit să subliniem fără nici un pic de modestie, că școala românească de medicină a generat și în acest domeniu (ca de altfel în multe altele) nume de rezonanță, pe care comunitatea științifică le-a trecut în mod nedrept, prea repede în istorie.

Capitolul 2. *Este consacrat tehnicilor și metodologiilor de investigare. Am descris aici, metode curente de obiectivare a parametrilor biochimici pe fluide biologice. Determinările de acizi grași constituenți ai lipidelor biologice active, nu reprezintă din păcate teste curente în practica paraclinică. Din acest motiv, mare parte din domeniile de referință, tehnicile de separare și dozare se constituie ca rod a multor ani de căutări, a sute de mii de determinări. Stabilirea parametrilor de operare instrumentali, a domeniilor de referință populaționali, etc. au fost prezentate sintetic în acest capitol.*

Capitolul 3. *Evaluează implicațiile acizilor grași în patobiochimie și câteva domenii conexe. Am profitat de această ocazie pentru a introduce succint rezultate obținute de noi și în alte domenii decât patologia neuro-musculară.*

Capitolul 4. *Este o sumară trecere în revistă a conceptului de membrană biologică. Sunt prezentate succint câteva rezultate experimentale obținute pe membranele eritrocitare.*

Capitolul 5. *Prezintă în exclusivitate rezultatele obținute pe probe provenind de la pacienți afectați de maladii neuro-musculare.*

Bibliografia destul de numeroasă, a fost impusă prioritar de dorința autorului de a aminti cât de puțin de cei ce au deschis noi perspective cunoașterii umane. Este un act de dreptate și cred eu normalitate.

Autorul

CUPRINS

CAPITOLUL I

PATOBIOCHIMIA MUSCULARĂ – DE LA CONCEPT LA INVESTIGAȚIE CLINICĂ

1.1. GENEZA CONCEPTULUI DE PATOLOGIE NEURO-MUSCULARĂ	1
1.2. PROGRESE ÎN INVESTIGAȚIILE BIOCHIMICE ȘI ORIENTAREA CONDUITEI CLINICE	6

CAPITOLUL 2

METODE FIZICO-CHIMICE DE INTERES PENTRU INVESTIGAREA HOMEOSTAZIEI BIOCHIMICE A LIPIDELOR

2.1. SPECIFICUL METODELOR FIZICO-CHIMICE UTILIZATE LA INVESTIGAREA LIPIDELOR ÎN AFECȚIUNI NEURO-MUSCULARE	17
2.1.1. LIPIDELE ÎN BIOCHIMIE ȘI CHIMIA CLINICĂ - SINOPTIC	18
2.1.2. IZOLAREA COMPUȘILOR LIPIDICI	24
2.1.3. DETERMINAREA CLITATIVĂ A LIPIDELOR	25
2.1.4. APLICAȚII ÎN CHIMIA CLINICĂ	26
2.1.4.1. DETERMINAREA LIPIDELOR TOTALE	31
2.1.4.2. DETERMINAREA ACILGLICEROLILOR	32
2.1.4.2.1. METODE CHIMICE	33
2.1.4.3. DETERMINARE STERIDELOR	37
2.1.4.3.1. DETERMINAREA COLESTEROLULUI LIBER ȘI ESTERIFICAT	37
2.1.4.3.1.1. METODE CHIMICE	37
2.1.4.3.1.2. METODE ENZIMATICE	37
2.1.4.3.1.3. METODE GAZ CROMATOGRFICE	39
2.1.4.3.2. DETERMINAREA UNOR DERIVAȚI STERIDICI : ACIZI BILIARI	41
2.1.4.3.2.1. METODE CHIMICE	42
2.1.4.3.2.2. METODE ENZIMATICE	42
2.1.4.4. DETERMINAREA FOSFOLIPIDELOR	43
2.1.4.5. DETERMINAREA ACIZILOR GRAȘI	44
2.1.4.5.1. ACIZII GRAȘI TOTALI	44
2.1.4.5.2. ACIZI GRAȘI LIBERI	47
2.1.4.6. DETERMINAREA LIPOPROTEINELOR	49
2.1.4.6.1. DATE STRUCTURALE -GENERALITĂȚI	49
2.1.4.6.2. METODE DE INVESTIGARE A LIPOPROTEINELOR	50
2.1.4.6.2.1. METODA DE SEPARARE PRIN ULTRACENTRIFUGARE	50
2.1.4.6.2.2. METODA SEPARĂRII ELECTROFORETICE A LIPOPROTEINELOR SERICE	52
2.1.4.7. PARTICULARITĂȚI ALE INVESTIGAȚIEI LIPAZELOR	54
2.2. HOMEOSTAZIA BIOCHIMICĂ A METABOLIȚILOR LIPIDICI	57
2.2.1. HOMEOSTAZIA ȘI HETEROSTAZIA – ASPECTE SPECIFICE-	57

2.2.2. DISHOMEOSTAZIA ACIZILOR GRAȘI. CORELAȚIA REGLARE-ECHILIBRU	62
---	----

CAPITOLUL 3

EVALUAREA ROLULUI ȘI IMPLICAȚIILOR ACIZILOR GRAȘI ÎN PATOBIOCHIMIE: ASPECTE DOCUMENTARE ȘI CONTRIBUȚII

3.1. ACIZI GRAȘI POLINESATURAȚI CU IMPORTANȚĂ BIOLOGICĂ	65
3.2. EFECTELE BIOCHIMICE ȘI PATOBIOCHIMICE ALE ACIZILOR GRAȘI OMEGA 3	73
3.2.1. METABOLISMUL EICOSANOIZILOR	73
3.2.2. ASPECTELE MOLECULARE ȘI ASPECTELE EXPRIMĂRII GENETICE ÎN RELAȚIE CU EICOSANOIZII	74
3.2.3. EFECTELE HIPOLIPEMIANTE	75
3.2.4. ACȚIUNI ANTIATEROMATOASE	76
3.2.5. EFECTE ANTITROMBOTICE	77
3.2.6. EFECTE VASCULARE	77
3.2.7. EFECTE ANTIARITMICE	78
3.2.8. EFECTELE ASUPRA RESTENOZEI	79
3.2.9. EFECTELE ASUPRA LIPOPROTEINEI (A)	80
3.2.10. ALTE EFECTE	81
3.3. IMPLICAȚIILE BIOMEDICALE ALE ACIZILOR GRAȘI ESENȚIALI	82
3.3.1. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU AFECȚIUNI CORONARIENE	82
3.3.2. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU HIPERTENSIUNEA	90
3.3.3. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU AFECȚIUNI INFLAMATORII ȘI AUTOIMUNE	91
3.3.4. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU ARTRITA REUMATOIDĂ	92
3.3.5. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU PSORIAZISUL	93
3.3.6. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU CANCERUL	93
3.3.7. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU DIABETUL	93
3.3.8. ACIZII GRAȘI MODULEAZĂ FORMAREA OSULUI ȘI FUNCȚIA CARTILAJELOR	94
3.3.9. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU RETINITA	96
3.3.10. IMPLICAREA ACIZILOR GRAȘI ESENȚIALI ÎN TRATAMENTUL AFECȚIUNILOR CU DEFECT PEROXISOMAL GENERALIZAT	98
3.3.11. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU SCHIZOFRENIA	103
3.3.12. ACIZII GRAȘI TRANS-MONONESATURAȚI ȘI POLINESATURAȚI, FACTORI ALIMENTARI DE RISC	106
3.4. ACIZII GRAȘI POLINESATURAȚI CU CATENĂ LUNGĂ, COMPONENTE FUNCȚIONALE DETERMINANTE ALE CLASELOR LIPIDICE	111

CAPITOLUL 4

STUDIUL BIOCHIMIC AL MEMBRANELOR ERITROCITARE

4.1. EVOLUȚIA CONCEPTULUI DE MEMBRANĂ BIOLOGICĂ	122
4.1.1. MEMBRANA CELULARĂ	122

4.1.2. PARTICULARITĂȚI MORFOLOGICE ȘI TOPO BIOCHIMICE ALE MEMBRANEI ERITOCITARE	124
4.2. COMPOZIȚIA LIPIDELOR MEMBRANARE : ACIZII GRAȘI CARACTERISTICI	132
4.2.1. PROPRIETĂȚILE CHIMICE ȘI FIZICE ALE MEMBRANELOR	132
4.2.2. COMPOZIȚIA FOSFOLIPIDICĂ A MEMBRANEI ERITROCITULUI UMAN	134
4.2.3. ACIZII GRAȘI AI FOSFOLIPIDELOR DIN MEMBRANA ERITROCITARĂ	136
4.2.4. FACTORI CE INFLUIENȚEAZĂ COMPOZIȚIA ȘI DISTRIBUȚIA ASIMETRICĂ A FOSFOLIPIDELOR ÎN SEMISTRATELE MEMBRANEI ERITROCITARE	137
4.2.5. MODIFICĂRI PATOLOGICE ALE COMPZIȚIEI ȘI REDISTRIBUȚIEI FOSFOLIPIDELOR DIN MEMBRANA ERITROCITARĂ	138

CAPITOLUL 5

CERCETĂRI ANALITICE ÎN PATOBIOCHIMIA UNOR AFECȚIUNI NEURO-MUSCULARE

5.1. CARACTERIZAREA LOTURILOR EXAMINATE	140
5.2. VALORI NORMALE ȘI PATOLOGICE: DOMENII DE DECIZIE ÎN PATOBIOCHIMIE	149
5.3. INVESTIGAȚII ASUPRA ENZIMELOR ÎN PATOBIOCHIMIE	152
5.3.1. DISHOMEOSTAZIA ENZIMATICĂ ÎN AFECȚIUNI NEURO-MUSCULARE: ASPECT SINOPTIC	152
5.4. INVESTIGAȚII ASUPRA LIPIDELOR ȘI FRAȚIUNILOR LIPIDICE ÎN PATOBIOCHIMIE	180
5.5. DETERMINĂRI PE MEMBRANE ERITROCITARE	190

CONCLUZII	200
------------------	-----

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	203
--------------------------------	-----

CAPITOLUL 1

PATOBIOCHIMIA MUSCULARĂ DE LA CONCEPT LA INVESTIGAȚIE CLINICĂ

1.1. GENEZA CONCEPTULUI DE PATOLOGIE NEURO - MUSCULARĂ

“In aliis rebus alius est praestantior”
(*Publilius Syrus : Sententiae*)
(Cineva excelează, acolo unde alții greșesc)

Sub titlul “Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myosclérotique”, Archives générales de médecine, publica în toamna anului 1868 o suită de note referitoare la o nouă afecțiune. Autorul, Guillaume Benjamin Armand Duchenne de Boulogne (1805-1875), era de mult o notorietate în lumea medicală. Notele constituiau actul de naștere al unui nou capitol de patologie neurologică, un act de naștere *sui generis*, căci el consfințea un adevăr ancestral, pe care mulți îl observaseră, dar pe care nimeni până la Duchenne nu a avut intuiția de a-l decupa din monocromia faptului divers.



Retrospectiva istorică nu poate miza decât pe câteva relicve de plastică antică, dintre care h fi b li f l l reginei Hatcepsut (1500 î.H.), remarcabil prin justetea cu care sugerează, aproape fără echivoc, diagnosticul de distrofie musculară la femeia care, în ciuda lordozei monstruoase, s-a împodobit cochet pentru a-și urma soțul, fig.1-1.

Fig.1-1.
Basoreliev funebru din templul reginei Hatcepsut (1 500 î.H.).

Civilizația greacă nu a lăsat o replică morbidă pentru discobolul lui Miron. Elenilor, care zeificaseră pe Herakles, care își cronologaseră istoria în succesiunea olimpiadelor și își subordonaseră pasiunile politice spiritului olimpic, cultivând efebul ca ideal artistic, le repugna defectul trupesc, pe care îl asimilau viciului și pentru care asanarea însemna adesea Taiget.

Ambroise Paré în anul 1573, în al său tratat "Monstres et prodiges", descrie și desenează cazuri foarte asemănătoare cu ceea ce astăzi s-ar considera sindrom artrogriptic miogen.

De la mijlocul secolului următor, al XVII-lea, datează pânza maestrului iber, José de Ribera (1591-1652), cunoscută sub denumirea "Le pied bot" (fig.1-2), astăzi aflată în galeriile Louvre. Artistul surprinde cu o elocvență care lipsește adesea iconografiei moderne atitudinea forțată de falsă dezinvoltură, chemată să mascheze nesiguranța celui care pozează lipsit de sprijinul obișnuit al cârjei pe care o poartă pe umăr.

Probabil că primul raport detaliat asupra unui caz de "miopatie" – pentru a respecta termenul la prezentul istoric - aparține lui Meyron, care în 1852 se referă la "A form of granular degeneration of the voluntary muscles occurring to four brother". deși Charles Bell în anul 1830, Semmola în 1834 și apoi Coste și Gioja la 1838, relatează cazuri clinice sugerând distrofia musculară, iar Partridge între 1840-1842, sesizase metaplazia lipidică a mușchiului. Aceste manifestări sporadice de interes pentru leziunile mușchiului nu i-au fost desigur cunoscute lui Duchenne (fig.1-3), care nu le amintește nicăieri. Certitudinea sa asupra



...diului. ...f. c. t. u. ii muscula. ... s-a co. tu at t eptat, laborios și exigent, de-a lungul a două decenii de observații clinice atente, care au împletit tradiția cu inovația, hazardul unei clipe cu experiența unei vieți.

Fig. 1-2.

"Le pied Bot" (1642), José de Ribera (1591 – 1652)
Galeriile Louvre.

În ciuda prestigiului autorului, lucrarea *princeps* s-a impus cu multă greutate chiar în cerul de la Salpêtrière. În acest sens, comentariul lui Charcot exprimă un truism de permanentă actualitate: "Ciudată poveste descoperirea atrofiilor musculare de către Duchenne! Cum a ajuns la descoperirea unei boli care desigur există din timpurile hipocratice? "

El a realizat un admirabil exemplu de observație, tâlmăcind cazurile cu amiotrofii într-adevăr bizar!

Un ... h ... t ... f ... t ... d ...

unui aspect propriu medicini : "De ce un fapt permanent prezent se observă atât de târziu, de imperfect, de anevoios ? De ce trebuie repetat la nesfârșit, de 20 de ori, pentru a-l impune? De ce la prima comunicare orice fapt inedit este întâmpinat atât de glacial? Eu cred că totul rezidă din neîncrederea cu care privim tot ceea ce contravine ideilor clasice. Cu toții suntem, mai mult sau mai puțin ultraconservatori". Lumea medicală germană a fost aceea care s-a dovedit mult mai receptivă la ideile formulate de neurologul francez, idei pe care le-a analizat cu atenție și obiectivitate.

Friedreich în 1873 susține pentru prima dată originea intrinsec musculară a leziunilor miopatie, dar iconografia prezentată nu a avut darul de a convinge, iar ipoteza venerabilului maestru de la Heidelberg a rămas pentru moment un fiasco științific. Posteritatea i-a dat însă câștig de cauză. Discuțiile din jurul ipotezei lui Friedreich și deznodământul lor a atras atenția lui Wilhelm Erb (fig.1-4), personalitate chemată să aducă prețioase elucidări în acest domeniu controversat. Observator lucid, Erb distinge heterogenitatea clinică a distrofiilor musculare, descriind forma juvenilă ("die juvenile Form", în 1883), diferită de cea descoperită de Duchenne. În cei 20 de ani care separă pe Duchenne de Erb, s-au descris cel puțin tot

atâtea forme de miopatie, care, cu rare excepții (Landouzy și Déjerine, 1885), s-au dovedit efemere.

Erb și-a luat asupra sa ingrata sarcină de a face ordine în haosul care caracteriza deja capitoulul abia inaugurat, amenințat să cadă victimă modei desuete a "disecției" clinice excesive, care începe să m. scheze ignoranța patogenică.



Fig. 1-3.
Guillaume Benjamin Armand Duchenne de Boulogne (1805-1875).
În 1847, Duchenn, stabilea pentru prima dată tabloul clinic general al miopatiilor ce aveau să-i poarte numele.

Progresul euristic înregistrat din 1890 până astăzi ar fi fost de ne imaginat fără temelia atât de solid clădită de Erb. Desenele lui Erb prezintă aspectele clinice, pacientul, cu o fidelitate aproape fotografică, ca în figurile 1-5 și 1-6.

Un moment important al acestui progres este legat de numele lui Marinescu, care, în 1927, realiza o exhaustivă punere la punct a problemelor patologiei musculare în monografia "Maladies des muscles".

Înțelegerea fondului dismetabolic al distrofiilor musculare începe să se contureze o dată cu descoperirea tulburărilor în metabolismul creatininei de către Milhorat și Wolf în 1937. Un moment crucial îl constituie sesizarea deperdiției enzimatică care caracterizează numai mușchiul distrofic, fapt remarcat de Sibley și Lehninger în 1949, apoi de Schapira și Dreyfus în 1952, constatare cu remarcabile implicații teoretice și pragmatice.

Fig. 1-4.
Wilhelm Heinrich Erb (1840 - 1921)

În același context se înscrie și prezentarea celui mai perfect model experimental de distrofie musculară, sub forma distrofiei ereditare a șoarecelui, tulpina Bar Harbour, de către Michelson în 1955. Studiile de electromiografie ale lui Kugelberg în 1941 și mai apoi Buchthal în 1949, au pus bazele electrodiagnosticului proceselor miogene. Sosise momentul unei sistematizări pe baze clinico-genetice a bolilor musculare, realizată de Walton și Natras în 1954. Pearson în 1957, inițiază studiile asupra stadiului preclinic al distrofiilor musculare, iar Becker, în același ani, remarcă eterogenitatea fenotipului pseudohipertrof. recesiv X-cromozomal, prezentând p. m. l. c. azu. cu evoluție benignă. Ipoteza lui Lyon datând din 1962 și studiul vectoarelor realizat de Marton și Chung în 1960 ; Richterich în 1963, au contribuit esențial la cunoașterea geneticii afecțiunii. În fine, izolarea unei miopatii metabolice subtinsă de un defect enzimatic bine precizat-absența fosforilazei (Mc Ardle în anul 1952), ca și descoperirea miopatiilor "staționare", consecutive unor leziuni morfofiziologice specifice (central core disease -Shy și Magree (1956); boala mitocondrială autonomă - Luft (1962); nemaline myopathy (1966)



Shy, Engel și Sommers (1963); megaconical myopathy – Shy și Gonatas, (1964); pleoconial myopathy – Shy și Perez (1966); myotubular myopathy – Spiro în, centro-nuclear myopathy– Sher (1967), completează panorama atât de variată a patologiei musculare, ilustrând extinderea progresivă a spațiului prehensibil pentru cercetătorul acestui domeniu.

Pe un plan paralel, mai puțin spectaculos, dar la fel de util, se descrie reacția mio-tonică, Thomson în 1876; Steinert în 1909, iar prin contribuția unui lung șir de cercetători se conturează conceptele atât de disputate ale miopatiilor localizate (Hutchinson, 1879; Fuchs, 1890 ;Gowers,1902; Kiloh și Nevin,1951), miopatiei distale (Welander,1951;Biernond, 1955) și se separă formele pseudomiopatie neurogene (Kugelberg și Welander, 1956).

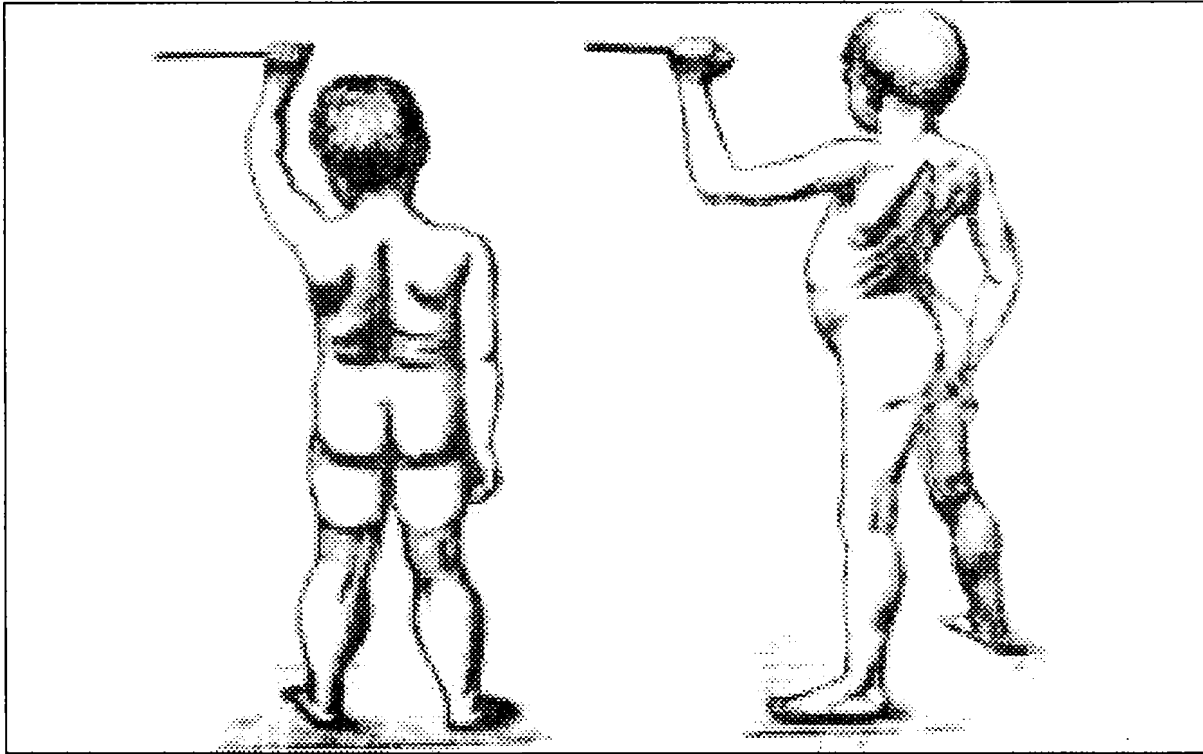
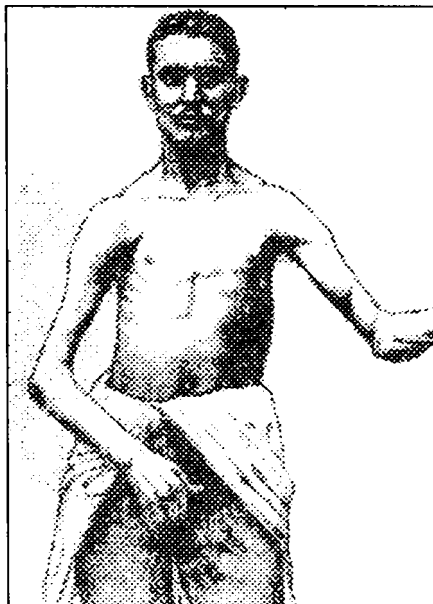


Fig.1-5.

Desen original al lui Erb (1891) reprezentând cazuri de miopatie Duchenne (după volumul " Symposium Wilhelm Erb", Heidelberg, 1965, sub redacția prof. Erich Kuhn, editat cu ocazia comemorării a 125 de ani de la nașterea neurologului german).

Acumularea de fapte nu a însemnat însă și descifrarea esenței procesului distrofic;



mândria cunoașterii nu a răsplătit umilința căutării. Lipsește însă moneda supremă, ipoteza explicativă verosimilă, nu numai din considerente de logică formală, ci și prin verificare experimentală. Faptul că la un secol de la apariție, în epoca geneticii moleculare, lucrările lui Duchenne și Erb sunt mai actuale decât în momentul elaborării lor, "impune în perspectiva istorică aceste două spirite inovatoare ca două stele fixe."

Fig. 1-6.

Desen original al lui Erb (1891) ilustrând un caz de formă "juvenilă" descrisă de el, azi omologată ca distrofie musculară de centură .

Cuprinzătoarea trecere în revistă a "Unui secol de patologie musculară" era prezentată de creatorul școlii

românești de patologie neuro-musculară, Dr. Horia RADU, la 24 aprilie 1968, la U.S.S.M., Filiala Timișoara, Clinica Universitară de Neurologie.

Născut la Ocna Sibiului în 1936, Dr. Horia RADU (fig.1-7.) își începe studiile la Universitatea de Medicină și Farmacie din Cluj-Napoca, dar terminarea lor o face la Universitatea de Medicină și Farmacie din Timișoara.

Personalitate de primă mărime a școlii medicale românești, dr. Horia RADU, a creat în anul 1965, în localitatea Vâlcele, județul Covasna, primul și singurul "Centru de diagnostic, cercetare și tratament al maladiilor redo-degenerative".

În perioada 1974-1975 a funcționat ca director de program la "Centro per gli Studi di Biologia e Fisiopatologia Muscolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche" din Padova, Italia. A fost primul care a demonstrat diminuarea activității sistemelor dependente de CoA în mușchiul distrofic, a elaborat un sistem original de detectare al vectoarelor de distrofie musculară progresivă Duchenne, a descris un nou tip de stocatoză : "miopatia cu acumulare de glicozamină, (sialo) glicani. A elaborat și fundamentat o nouă teorie referitoare la



transportul ionului calciu și activitatea bioelectrică a mușchiului denervat și miotonic.

A descris structura denumită "revers core" ca fiind semnul primar al denervării.

A demonstrat degenerarea în culturi celulare a miocitului, la a doua linie de multiplicare, fapt se pare uitat din păcate, de comunitatea științifică, care la acest moment ridică mari probleme celor ce se ocupă de terapia "genică" a distrofiilor musculare progresive.

Fig. 1-7.
Dr.Horia RADU (1936-1979) fondatorul școlii românești moderne de patologie neuro-musculară.

Ultima sa lucrare, de referință, "Patologia Unității Motorii", apărută în 1977, la Editura Medicală, din București, "o lucrare ce devansa prezentul și prevedea viitorul" sintetizează vasta experiență a autorului și aduce contribuții importante

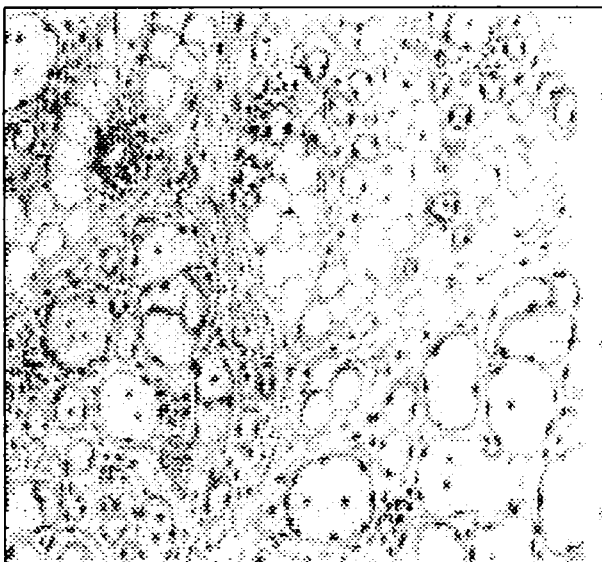
la cunoașterea structurilor și leziunilor biochimice primare implicate in afecțiunile eredo-degenerative.

A ars ca o flacără, radiind cunoaștere, încredere, împărțind cu generozitate din preaplina minții sale luminate. Trecerea sa în neființă la nici 42 de ani, a privat domeniul medicinei și spiritualității românești și universale, de un spirit novator, o "stea fixă" de primă mărime, a amânat din păcate cu câteva decenii primele tentative de terapie eficientă a maladiilor neuro-musculare.

I-au fost apropiați sufletului său generos "Toți cei care suferă și speră".

1.2. PROGRESE ÎN INVESTIGAȚIILE BIOCHIMICE ȘI ORIENTAREA CONDUITEI CLINICE

Termenul generic de "distrofie" provine din limba greacă (*dis*—anormal, defect și *trophykos*—aliment, factor nutritiv), deci termenul global de distrofie musculară definește cel puțin din punct de vedere etimologic, o stare de nutriție defectuoasă a celulei musculare (miocitului). Fiziologic vorbind termenul nu este exact, dar acest tip de afecțiuni sunt caracterizate de o diminuare a masei și implicit a forței musculare consecințe evidente a unui defect trofic. Grupul muscular afectat predominant sau distribuția diminuării masei musculare, este un criteriu de diferențiere între tipurile de distrofii musculare.

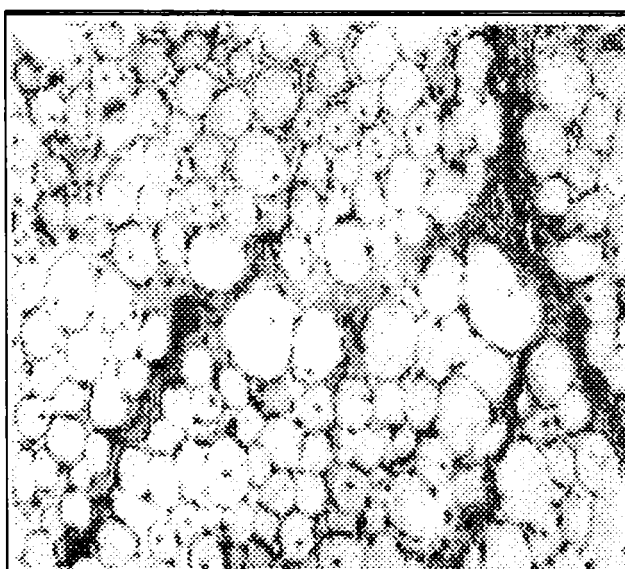


În unele cazuri cu incidență relativ scăzută, diminuarea masei musculare este localizată, ca de exemplu la mușchii oculari și ai feței. Atunci când sunt afectate mușchii membrelor apar relativ rapid atecări și ai altor grupuri musculare.

Fig. 1-8.
Desen original al lui Erb (1891) reprezentând aspectul microscopic al mușchiului distrofic (citate de Khun, 1965).

Figurile 1-8 și 1-9, "realizate" la aproape 100 de ani distanță prezintă aspecte morfologice specifice mușchiului distrofic. Încă o dată putem admira nu numai rigoarea științifică dar și simțul artistic a lui Erb.

În pofida diversității tipurilor manifeste de distrofii musculare toate au caracteristică diminuarea progresivă a masei și forței musculare. Există extrem de multe cauze care pot fi exprimate prin diminuarea masei și forței musculare pe care medicul este chemat să le excludă primar. Aceste cauze nu au un caracter genetic. De exemplu, diminuarea masei musculare poate fi cauzată și de afectarea traectului nervos aferent mușchiului sau grupeii musculare.



Acest fapt este notat în cazul poliomielitelor, există însă și alte tipuri de afecțiuni ce se pot manifesta prin același efect. Distrofia musculară nu este însă rezultatul afectării primare a traectului nervos ci a țesutului muscular.

Fig. 1-9.
Microfotografie după biopsia musculară a unui pacient afectat de distrofie musculară progresivă Duchenne. (colorație van Gieson x 120, piesă din histoteca Centrului de Patologie Neuro-Musculară "Dr. Horia RADU").

Diminuarea masei musculare comună tuturor tipurilor de distrofie are similar câteva aspecte. Uzual ea este simetrică. Acest fapt constă într-o afectare similară a ambelor părți ale corpului deși uneori acest lucru este aparent mai puțin evident. Diminuarea

masei musculare este progresivă, diferind de la un tip de distrofie la altul. Unele tipuri au ca perioadă de exprimare prima sau a doua copilărie și pot fi severe, cu o progrediență rapidă, pe când cele declanșate la vârste înaintate au o evoluție mult mai lentă. Adesea sunt notate variații clinice, cu diferențe patobiochimice și histopatologice între indivizii afectați de același tip de distrofie musculară chiar când ei provin din aceeași familie sau când vârsta de declanșare este relativ apropiată. Studii recente nu au reușit să ofere o explicație plauzibilă nici în cazul distrofiei miotonice nici chiar în cazul distrofiei Duchenne (care prezintă un tablou biomolecular și clinic oarecum mai omogen). Diminuarea masei și forței musculare este progresivă, chiar dacă există aparent perioade în care procesul progresează lent sau pare a se fi oprit. Evoluția și severitatea afecțiunii, prognosticul depinde esențial de tipul distrofiei care a afectează pacientul. Un diagnostic precis este esențial.

Aproape contemporan cu Guillaume Benjamin Armand Duchenne de Boulogne, Gregor Mendel (1822-1884), "semna" în 1866, actul de naștere al unei noi științe, **Genetica**.

Experiențele sale efectuate pe *Pisum sativum* (mazăre), au fost reunite și publicate în volumul "Versuche über Pflanzenhybriden" ("Cercetări asupra hibridilor la plante") și i-au permis lui Gregor Mendel (fig. 1-10.) să formuleze revoluționarele sale concluzii:

1. Fiecare caracter se transmite de la genitori la urmași prin intermediul unei perechi de "factori ereditari".
2. Fiecare pereche de factori ereditari segregă atunci când un individ, dintr-o specie oarecare, produce gameți,
3. Segregarea fiecărei perechi de factori ereditari se face independent de toate celelalte perechi de factori ereditari.

Următorul pas s-a făcut după ce progresele tehnicii microscopice și ale citologiei



de date, care i-au permis în 1903 lui Sutton să demonstreze că factorii ereditari sunt localizați pe cromosomi. Câțiva ani mai târziu, în 1909,

Fig. 1-10.
Gregor Mendel (1822-1884).

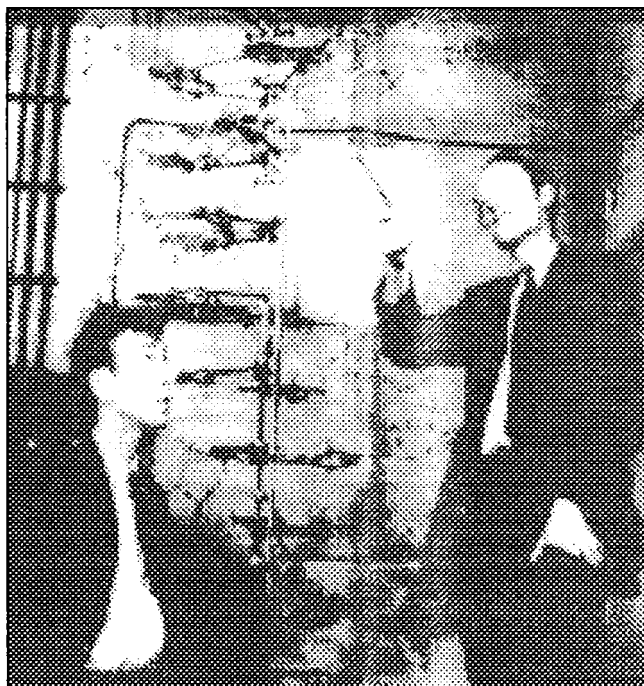
Johansen, propune înlocuirea termenului de factori ereditari cu cel de gene. Astfel, ia naștere teoria cromosomală a eredității, care consideră gena ca fiind, în același timp, unitatea de structură genetică (un segment de cromosom) și unitatea de funcție genică (o genă determină un caracter ereditar). După câțiva ani, în 1915 se

formează o echipă de cercetători geneticieni, cunoscută sub numele de "școala lui Morgan", care pe parcursul unui deceniu (1915-1925) au conceput și realizat noi metodologii de investigare în domeniul geneticii, care le-au permis să definească gena ca fiind în același timp atât unitatea de structură și funcție, cât și unitatea de recombinare și mutație.

În concepția școlii lui Morgan o genă este un segment de cromosom de o anumită lungime, ce este precis determinat, continuu și indivizibil (unitatea de structură) și care determină întotdeauna un anumit caracter fenotipic (unitatea de funcție). Deci, esența geneticii clasice poate fi redată în relația : O genă - un caracter. O genă ocupă întotdeauna pe un anumit cromosom un loc constant, poziție care se numește *locus*. Pe doi cromosomi omologi (o pereche de cromosomi) se găsesc față în față perechi de gene care determină același caracter fenotipic. Genele pereche pot să fie identice sau să fie variante ale unei și aceleiași gene, variante numite *alele*. Deoarece genele sunt dispuse liniar, una după alta, pe cromosom, în timpul diviziunii celulare ele se transmit de la o celulă la alta înălțuite (linkage)

de la un capăt la altul al cromosomului. Din acest punct de vedere cromosomul este un grup de înlănțuiri genice. S-a observat însă, că în profaza I are loc fenomenul de "crossing-over" (încrucișarea cromosomilor omologi), care duce la efectuarea unui schimb de gene care face ca pe același cromosom să se găsească gene diferite, unele provenind de la mamă, altele de la tată. Schimbul încrucișat de gene între doi cromosomi omologi se află la originea mecanismului de recombinare genetică, responsabil de variabilitatea extrem de mare a indivizilor unei specii. Gena este concepută, de către școala lui Morgan, ca fiind segmentul cel mai mic de pe un cromosom care poate fi schimbat prin crossing-over între doi cromosomi omologi, 'eci a fiin' unitatea de recombinare. Acest concept a permis efectuarea primei tentative de cartare genică, deoarece posibilitatea de recombinare crește proporțional cu distanța care separă două gene. În aceste hărți genetice distanța lineară dintre două gene se exprimă în procente de recombinare.

Fig. 1-11.
James Watson (stânga)
Francis Crick (dreapta).



Gena care codifică aceea variantă a unui caracter fenotipic, care este cea mai stabilă și mai avantajoasă se numește *alelă* sălbatecă. Încă în concepția geneticii clasice exista relația: o genă - un caracter. Cea mai mare parte a modificărilor (mutațiilor), care pot surveni în interiorul unei gene, se manifestă fenotipic într-un caracter ce diferă de cel codificat de alela sălbatecă și care este de cele mai multe ori accesibil observației. De aceea în concepția clasică gena este considerată ca unitate de mutație, fiind definită ca fragmentul cel mai mic de pe un cromosom care duce la apariția de variante noi ale unui caracter, după o modificare mai mică sau mai mare a structurii lui. În populațiile umane pentru cele mai multe gene există o serie, mai mare sau mai mică de variante, de alele, situație definită ca polialelie.

Epoca geneticii clasice începe odată cu Gregor Mendel și durează până în deceniul al treilea al secolului XX. Odată cu demonstrarea indubitabilă, de către Avery în 1941, a rolului genetic al ADN-ului, se poate considera că începe perioada geneticii moderne. Avery, Mcleod și Mcarty au repetat experiențele lui Griffith, dar în loc de pneumococi omorâți au adăugat în culturi ADN-ul purificat extras de la acești pneumococi, iar rezultatele au fost identice. Faptul că ADN-ul pur extras de la pneumococii S, capsulați ducea la transmiterea caracterului de patogenitate la pneumococii R, ne capsulați din culturi, care în acest fel produceau o septicemie letală pentru animalele de experiență, a demonstrat fără dubii că materialul genetic este macromolecula de ADN.

După numai câțiva ani, în 1944, Beadle și Tatum, care efectuau niște studii metabolice pe tulpini mutante de *Neurospora crasa*, au înlocuit ecuația de bază a geneticii "o genă - un caracter" cu "o genă - o proteină". Urmează, la intervale de câțiva ani, descoperirea de către Barbara McClintock, în 1952, a secvențelor de ADN mobile numite transpozoni, iar în 1952 elaborarea de către Watson, Crick și Wilkins, fig. 1-11, a modelului de structură în dublu helix al ADN-ului, care este una dintre pietrele de hotar nu numai a biologiei moderne, ci a cunoașterii umane în general. După elaborarea modelului în dublu helix al ADN-ului descoperirile în genetică se succed rapid, ceea ce face necesară o selecție

extrem de riguroasă a datelor pentru a nu transforma lucrarea în istorie. Astfel, unul, din momentele marcante a fost elaborarea de către G. Gamow în 1954 a conceptului codului genetic triplet și descifrarea lui de către Nierenberg și Matthei în 1961. În anul 1962, Jacob și Monod au elaborat modelul operonului, care explică reglarea adaptativă a biosintezei proteinelor.

Ulterior apar alte descoperiri importante, dar se poate spune că perioada modernă a geneticii a început promițător, iar încheierea ei a fost pe măsură: sinteza artificială a unei gene, realizată de Khorana în 1977 și descoperirea structurii discontinue a genelor la organismele eucariote, de către Gilbert și Tonegawa în 1978. Dacă la începutul perioadei moderne a geneticii ecuația de bază acceptată era "o genă - o proteină", pe parcurs aceasta s-a modificat în "o genă - un polipeptid", iar la sfârșitul perioadei a devenit "o genă - un produs specific", deoarece s-a descoperit că genele nu codifică doar sinteza unor polipeptide, ci și a speciilor de rARN și tARN.

Deci, gena era definită ca o secvență poliheteronucleotidică de pe o moleculă de ADN, care este suportul unui program (informație, mesaj) pentru sinteza unui produs specific. Aspectul general al unei "hărți genetice" este prezentat în fig.1-12.

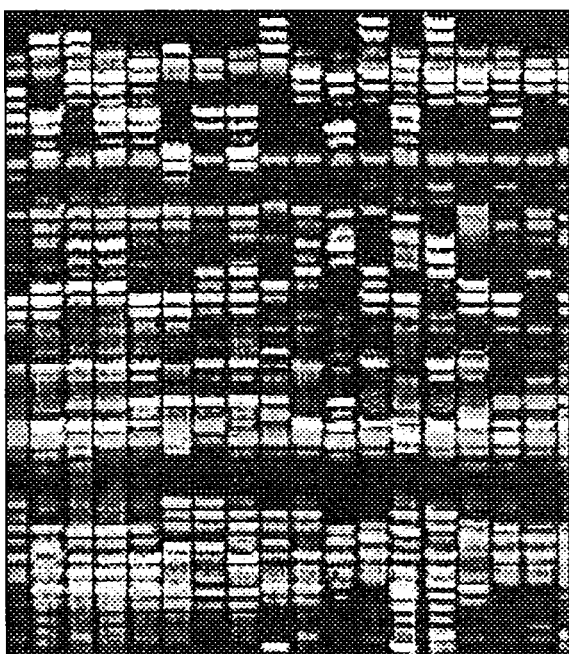


Fig. 1-12.
Hartă genetică

Odată cu începutul deceniului al optulea începe o nouă perioadă în genetică, perioadă caracterizată printr-o densitate nemaiîntâlnită a descoperirilor, de parcurgerea cu o viteză extraordinară a drumului de la ipoteză la descoperire, dar mai ales (pentru cei care nu și-au atrofiat capacitatea de a se mira) de senzația că unele realități ale geneticii pot fi de domeniul ficțiunii științifice. Pe baza noilor acumulări s-a născut "tehnologia ADN-ului recombinat" (ingineria genetică), au apărut tehnici noi, foarte rapide și exacte, de diagnostic a unor mutații, dar mai ales a "debutat" terapia genică pentru unele afecțiuni ereditare.

În 1990 a debutat programul american inițiat de Institutul Național de Sănătate Publică și Departamentul pentru Energie al S.U.A., în paralel grupuri de geneticieni europeni se lansau într-un minunat efort pentru decriptarea genomului uman. Primele rezultate erau așteptate în jurul anului 2005; luna februarie a anului 2001, avea însă să marcheze însă finalizarea acestui amplu program de cooperare internațional. În fapt inițial programul a fost francez, avându-i ca promotori pe Daniel Cohen și Jean Weissenbach, fig.1-13.

Motorul acestui superb efort științific, a fost eradicarea afecțiunilor grave ce macină societatea omenească. Rămâne acum, de văzut, dacă nobilul scop ce a animat inteligența planetei va fi un pas înainte spre binele umanității sau ca de obicei minți bolnave incurabil vor arunca specia umană în bezna degradării.

O amplă și exhaustivă analiză a factorilor geneticii moderne aparține prof. dr. V.I.Pop, șeful Catedrei de Genetică a U.M.F. Cluj-Napoca (1998), o lucrare care la nici trei ani de la apariție este prin voința minții umane și efortul comunității oamenilor de știință, deja istorie. O istorie ce se va repeta continuu chiar dacă reactualizarea informațiilor din lucrarea amintită a fost făcută în 2002.

Până la începutul deceniului al optulea gena era considerată ca un segment de ADN care conține codificată secvența aminoacizilor într-un polipeptid, precum și secvențe

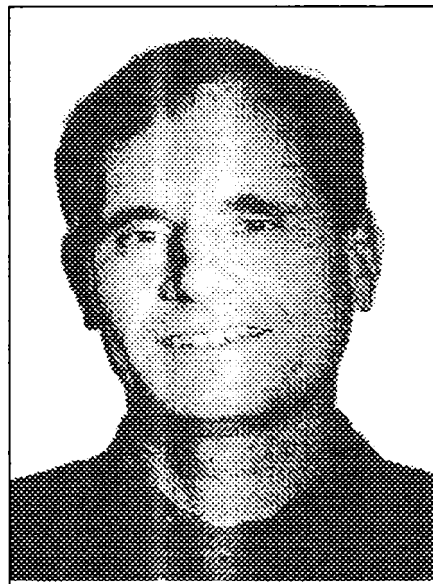
reglatoare care intervin în exprimarea ei. Ulterior s-a observat că marea majoritate a genelor de la celulele eucariote nu sunt traduse integral, ci numai pe segmente. Segmentele transcrise și traduse au fost denumite exoni, iar cele transcrise de dar netraduse au fost denumite introni. Eliminarea intronilor se face în timpul procesului de prelucrare al moleculei de mRNA primare, care este tăiată în puncte precise, apoi secvențele necodate sunt eliminate, iar secvențele codate (exonii) se reînădesc. În cele mai multe gene lungimea cumulată a intronilor este mult mai mare decât cea a exonilor.

Dacă genetica clasică definea gena ca un segment continuu de pe un cromosom, care codifică un caracter fenotipic, iar genetica modernă definea gena ca pe o secvență polinucleotidică care codifică în mod continuu sinteza unui produs specific, pentru genetica contemporană o genă este formată dintr-o secvență polinucleotidică care codifică în mod discontinuu programul de biosinteză a unui produs specific, pe care se găsesc și secvențe



care intervin în exprimarea genei.

Fig.1-13.
Daniel Cohen (stânga) și Jean Weissenbach (dreapta) cei ce au "desenat" harta genomului uman.



Dacă genetica clasică definea gena ca un segment continuu de pe un cromosom, care codifică un caracter fenotipic, iar

genetica modernă definea gena ca pe o secvență polinucleotidică care codifică în mod continuu sinteza unui produs specific, pentru genetica contemporană o genă este formată dintr-o secvență polinucleotidică care codifică în mod discontinuu programul de biosinteză a unui produs specific, pe care se găsesc și secvențe care intervin în exprimarea genei. Secvențele polinucleotidice adiacente unei gene conțin semnale moleculare cu semnificație de "start" sau "stop" pentru sinteza moleculelor de mRNA ce sunt copii negative ale genei respective. Secvențele polinucleotidice de la aceste nuvele sunt înalt conservate pe scara evolutivă. Astfel, la capătul 5' al genei se află secvența promotor, în care se găsesc secvențe înalt conservate, care permit atașarea moleculelor de ARN polimerază II pentru copierea informației de pe genă. Cu 25-30 Kb înaintea locului de start al sintezei mRNA se află secvențele "TATA", bogate în adenină și tiamină (de unde le vine și numele), al căror rol este important în legarea enzimei în vederea sintezei mRNA. O altă secvență de la capătul 5', înalt conservată este "CCAAT". Orice mutație care afectează secvențele "TAT" și "CCAAT" reduce mult rata de sinteză a proteinei codificate de gena respectivă. Ca exemplu se poate utiliza perturbarea sintezei β -globinei din β -talasemie.

În afară de secvențele amintite, care fac parte din regiunea promotor, în gene se pot găsi și secvențe care modifică eficiența transcrierii. Astfel în interiorul genelor, la câteva Kb față de promotor se află secvențe de amplificare a ratei de transcriere, numite "enhancers", sau secvențe de atenuare, numite "silencers". De aceea orice mutație care afectează aceste secvențe va modifica și rata de transcriere. La capătul 3' se află o secvență poliadenilică netradusă, care semnalizează sfârșitul mesajului și care este eliminat la maturarea moleculei de mRNA. Lungimea genelor este diferită, începând de la 2 Kb, așa cum este gena β -

globinei, până la 200 Kb, așa cum este, de exemplu, gena care codifică factorul VIII al coagulării.

În cazuri rare genele sunt mai mari, ca de exemplu gena distrofinei, care are o lungime de peste 2 000 Kb. Această genă este activă numai în celulele musculare, iar delețiile interstițiale sunt cauza unui grup de boli ereditare invalidante, cu speranța de viață redusă reunite în categoria nosologică a distrofiilor musculare progresive.

O cuprinzătoare evaluare a domeniului în discuție poate fi regăsită în lucrarea de referință, ce reunește experiența a câtorva (nu puține) decenii de laborioase cercetări a prof. dr. Z. Gârban, șeful Disciplinei de Biochimie și Biologie Moleculară a Universității Timișoara, "Biochimie. Tratat Comprehensiv," aflat după nici trei ani de la prima sa apariție (1996) la o a doua reactualizare informațională (1999) și desigur extrem de o necesară și dorită, a treia.

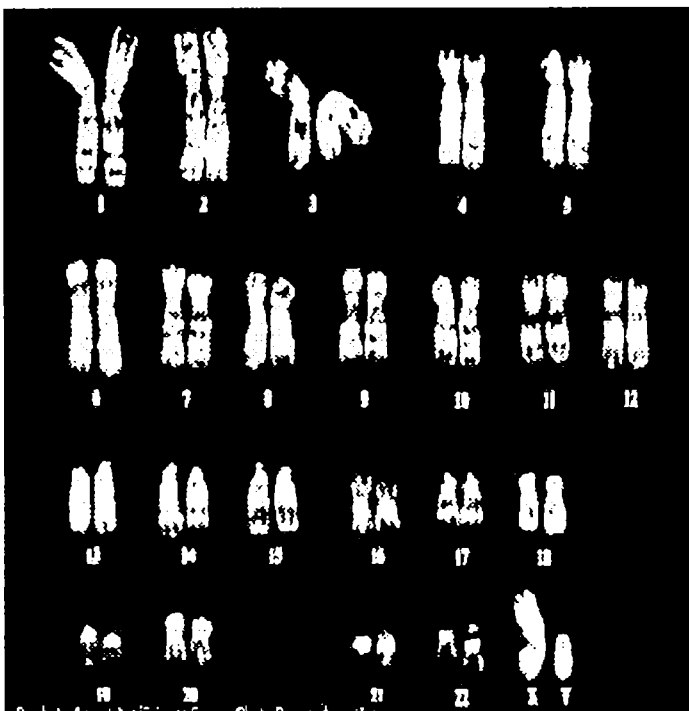


Fig. 1-14

Cariotipul unui bărbat, prezintă 23 de perechi de cromosomi tipici pentru celulele umane. Cromosomii marcați 1-22 sunt denumiți autosomi, și au un aspect similar atât la bărbați cât și la femei.

A 23-a pereche (dreapta jos), reprezintă cromosomii sexuali.

Femeile au 2 cromosomi sexuali identici marcați cu X, pe când bărbații au un singur cromosom X și un cromosom mic Y.

Descoperirea unor "corpuscule colorați" la celulele aflate în *mitoză*, de către Fleming în 1879, respectiv la diviziunea gametilor în timpul *meiozei*, de către Strasburger în 1879, numiți de către Waldayer, *cromosomi*, nu a fost asociată cu

legile lui Mendel, deoarece ele au fost total ignorate până în 1900, când au fost redescoperite de către trei cercetători, H. de Vries, C. Correns și E. von Tschermak, în mod independent. Asocierea cromosomilor cu "factorii mendelieni" (genele) s-a făcut rapid, în 1902, de către W. Sutton și T. Boveri, care au sesizat că segregarea "factorilor mendelieni" (genelor) se potrivește cu segregarea cromosomilor în *meioză*, deoarece :

- Cromosomii apar în pereche (*cromosomi omologi*) în mod similar cu perechile de alele (genotip);
- Cromosomii omologi și alelele segregă în mod egal în gameți;
- Perechile de cromosomi neomologi și perechile diferite de gene segregă în mod independent una de alta.

Din acest moment diferiți cercetători au emis ipoteza că genele sunt localizate pe cromosomi. Poziția unei gene pe un anumit cromosom a fost denumită cu termenul latin *locus*, iar referirea la pozițiile diferitelor gene cu pluralul *loci*. Acest fapt a permis interferența dintre citologie și genetică, ceea ce a avut ca rezultat apariția *citogeneticii*. S-a observat că există opt cromosomi, organizați în patru perechi omoloage la indivizii de sex feminin, pe când la indivizii de sex masculin apărea o pereche neomoloagă. Prin urmare, trei perechi erau identice la ambele sexe, iar a patra pereche era formată din doi cromosomi identici la sexul feminin, pe când la sexul masculin cromosomii din perechea a patra erau diferiți. Perechile de cromosomi comune la ambele sexe au fost denumiți *cromosomi autosomi* sau *autosomi*, iar perechea de cromosomi diferită, *cromosomi heterosomi* (*heterosomi* sau *gonosomi*) sau *cromosomi de sex*. La sexul feminin, cromosomii din a patra pereche

(formată din cromosomi identici sau omologi), au fost denumiți cromosomi X, pe când la sexul masculin a patra pereche era formată dintr-un cromosom X și altul diferit, care nu apărea la sexul feminin, numit cromosom Y. Acest fapt a venit în întâmpinarea teoriei cromosomiale a eredității, deoarece dovedea determinismul cromosomal al sexelor.

Figura 1-14, prezintă imaginea cariotipului uman.

Acidul dezoxiribonucleic (ADN) a fost descoperit în 1869, când a fost extras din leucocitele umane, dar funcția lui nu a putut fi identificată. Ceva mai târziu, când a fost izolat din nucleii diferitelor tipuri celulare, a fost denumit acid nucleic. Molecula de ADN este un macropolimer care are în compunere trei tipuri de molecule : acid fosforic, un glucid și baze azotate. Glucidul este o pentoză. În 1910, analiza chimică a permis separarea a două tipuri de acizi nucleici : acid dezoxiribonucleic și acid ribonucleic.

Genetica moleculară a transformat conceptele clinice referitoare la Distrofia Musculară Progresivă Duchenne (DMD) în câteva puncte critice:

- A. ***Această afecțiune poate fi definită ca o miopatie datorită mutației pe Xp21, un locus specific pe brațul scurt al cromosomului X. Ca o consecință imediată a acestei descoperiri, orice miopatie datorată unei mutații cromosomiale Xp21, poate fi considerată ca o variantă a distrofiei musculare progresive Duchenne și în consecință va trebui să aibă același produs genetic. Orice miopatie datorată unei mutații la un locus, altul decât Xp21, obligat va afecta alt produs genic.***
- B. ***Analiza ADN-ului devine investigația de elecție în stabilirea diagnosticului unei afecțiuni musculare.***
- C. ***Miopatiile Xp21, cu evoluție medie sau severă pot fi expresive la sexul feminin, fiind exprimate printr-un titru seric ridicat al creatinkinazei.***
- D. ***Retardarea mentală semnalată frecvent la afectați de Distrofie Musculară Duchenne este rezultatul unei mutații separate apropiate "geografic" de locusul responsabil de DMD.***

Aceste concepte au fost mai mult sau mai puțin afectate de izolarea produsului genic afectat, respectiv distrofina, rolul acesteia în mecanismul de declanșare și evoluția Distrofiei Musculare Progresive Duchenne (DMD) este încă controversat. Prima raportare a distrofiei a fost făcută în 1986, de către Anthony de Monaco, fig. 1-15.

Distrofia musculară X-recesivă Duchenne (fig. 1-16), cea mai severă dintre distrofiile musculare, este caracterizată de degenerarea progresivă a musculaturii scheletice, Walton (1974). Distrofia musculară progresivă Duchenne este cea mai frecventă dintre distrofiile musculare, incidența ei fiind de ordinul 33×10^{-5} , cifră raportată la numărul de nou născuți vii de sex masculin, prevalența este de aproximativ 2.8×10^{-5} , rata mutațională, discutabilă, este de ordinul $10^{-5} - 10^{-6}$, Radu (1978). În ultimii 30 de ani, au apărut câteva teorii asupra etiopatogenezei, distrofiilor musculare progresive în general, (asupra distrofiei musculare progresive Duchenne în particular) ce au fost testate, dezbătute iar unele dintre ele abandonate. S-a crezut că defectul fundamental, este legat de microcirculația musculară sau că afecțiunea este neurogenă și în acest caz s-au studiat proteinele musculare specifice (în special proteinele contractile și regulatorii, mioglobina) fără însă a se putea evidenția o anomalie specifică. Cu toate că aceste teorii se bucură în continuare de considerație, atenția a fost direcționată prioritar spre studierea membranelor celulare, în special a membranei celulei musculare.

Sintetic teoria membranei în distrofia musculară progresivă Duchenne poate fi redusă la : Produsul genetic anormal al distrofiei musculare progresive Duchenne este o enzimă sau o proteină structurală care sau lipsește sau funcționează defectuos.

Alterarea funcției acestei proteine se reflectă printr-o compoziție și funcționabilitate anormală a suprafeței membranei musculare și are drept consecințe două tulburări fundamentale ce caracterizează afecțiunea :

- A. Progrediența severă a afecțiunii.
- B. Degradarea progresivă a fibrelor musculare.

În sprijinul acestei teorii au fost aduse argumente importante :

1. Creșterea activității serice a enzimelor sarcoplasmice.
2. Alterarea morfologică a suprafeței membranei musculare.
3. Alterarea funcțiilor enzimelor legate de membrana sarcolemică.

La acest capitol trebuie menționată teoria avansată de Infante în 1986, asupra posibilei etiopatogeneze a distrofiilor musculare progresive și distrofiei *dy murinice*.

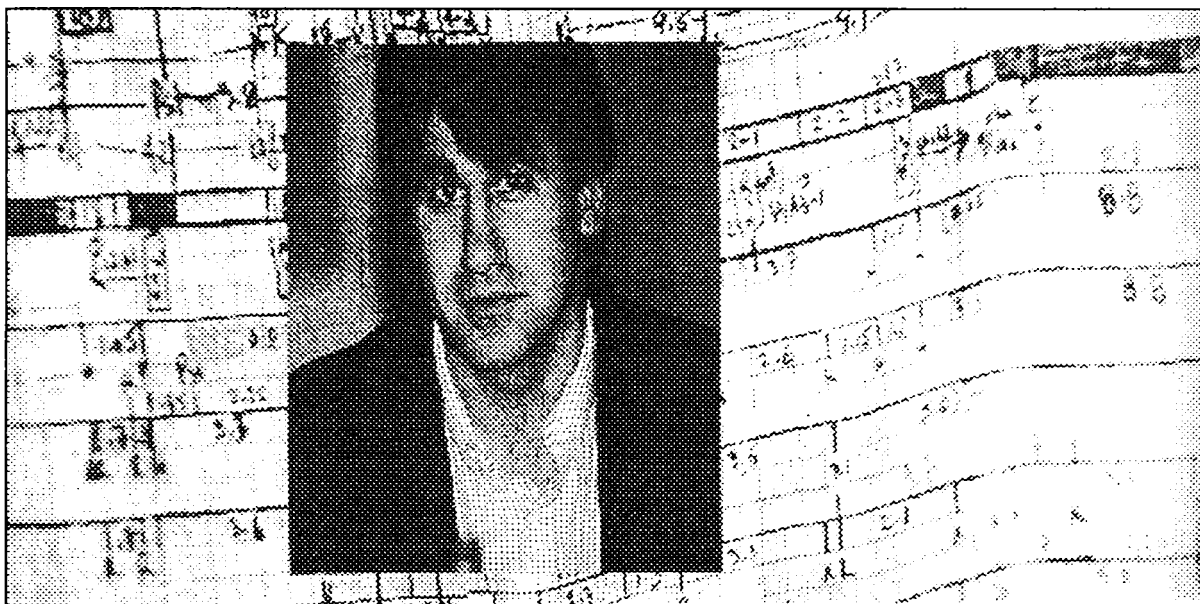


Fig.1-15.

Anthony Monaco, a caracterizat în anul 1986, gena responsabilă pentru distrofia musculară progresivă Duchenne.

În 1984, Infante investiga o nouă posibilitate biochimică de sinteză a speciilor moleculare specifice fosfatidilcolină și fosfatidiletanolamină. În aceste secvențe metabolice, intermediari în sinteza celor două specii moleculare, sunt glicerofosfodiesterii, glicerofosforilcolină (GPC–glycerophosphorylcholine) respectiv glicerofosforiletanolamină (GPE - glycerophosphorylethanolamine), Infante(1984). În afara acestor secvențe noi, a fost demonstrată prezența la nivelul musculaturii striate și calea de sinteză citidinică a glicerofosfodiesterilor. S-a constatat o scădere cu cel puțin 10% a concentrației GPC în mușchiul afectat de Distrofie Musculară Progresivă Duchenne, comparat cu țesutul normal, (Baranay1984; Chalovich 1979).

Studiile experimentale și simularea pe calculator au sugerat că sinteza fosfatidilcolinei și fosfatidiletanolaminei pe cale citidinică este neglijabilă pentru mușchiul striat diferențiat. Concomitent cu diminuarea concentrației GPC în mușchi există o scădere considerabilă a fosfatidilcolinei observată constant în stadiile de debut ale DMP-Duchenne, Hughes (1972); Kunze (1977). Studiile pe model animal efectuate de Mrak în 1982; Owens în 1970, și Pearce în 1980 au relevat o creștere semnificativă dar de mică amplitudine a concentrației de fosfatidiletanolamină în țesutul muscular total și reticulul sarcoplasmatic (RS) în paralel cu o diminuare acidului C22:6 ω 3 din fracția respectivă.

Studiile pe țesut muscular uman au fost extrem de puține necesitând timp extrem de îndelungat pentru finalizarea lor, deoarece de regulă aceste teste se practică pe piese de mici dimensiuni rămase de la examenul anatomopatologic. Un studiu efectuat de noi este în curs de finalizare datele fiind obținute într-un interval de aproape un deceniu, cu precauții deosebite (stadiu de boală oarecum apropiat, aspect histoenzimologic și biochimic comparabil, etc.).

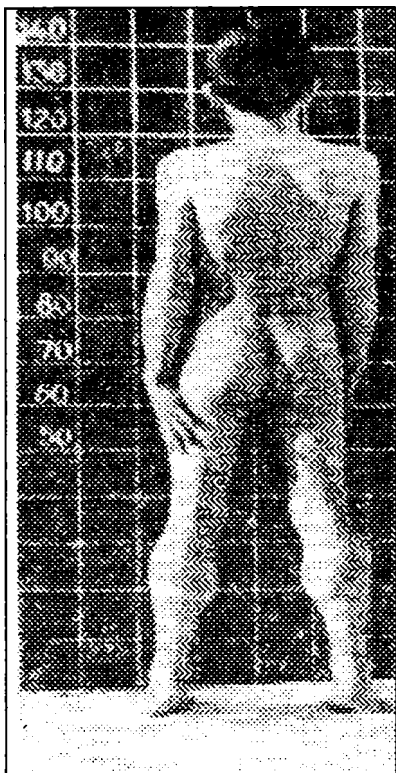


Fig. 1-16.
Distrofie musculară progresivă pseudohipertrofică X-cromosomală formă malignă. (caz din filmoteca Centrului de Patologie Neuro-Musculară "Dr. Horia RADU")

Diminuarea speciei C22:6 ω 3, din fosfatidilcolina reticulului sarcoplasmatic conduce evident la alterarea funcției de transport a ionului calciu. Acest defect de transport al Ca²⁺ în reticulul sarcoplasmatic (RS) este binecunoscut la subiecți afectați de distrofie musculară progresivă Duchenne. Defectul, favorizează creșterea nivelului Ca²⁺ citosolic, activând proteaza și fosfolipazele Ca²⁺ dependente, (Wrogemann, 1976). Activarea acestor enzime catabolice poate iniția procesele necrozante, conducând la creșterea nivelului sanguin al creatinkinazei și a altor proteine intracelulare. Urmând cale de sinteză propusă de Infante, dar în sens invers ar trebui să obținem rezultate terapeutice favorabile printr-un aport exogen de GPC și/sau GPE. Deoarece este extrem de dificil, chiar și la acest moment

obținerea membranelor musculare (sarcolemale) în stare pură, din mușchiul biptic al afectaților de Distrofie Musculară Progresivă Duchenne, mulți investigatori și-au îndreptat atenția spre alte tipuri de celule mai accesibile presupunând că anormalitatea are un caracter generalizat. Atenția a fost îndreptată spre celula roșie, atât datorită accesibilității ei cât și faptului că membrana eritocitară este relativ ușor de obținut și purificat.

Preocupările noastre începând din anul 1980, au fost strâns legate de perfecționarea unor tehnici de investigare complexă, biochimice, morfologice și biofizice a constituenților serici, musculari și membranari implicați primar sau colateral în etiopatogeneza afecțiunilor neuro-musculare degenerative, Ionescu (1985;1986; 1986;1988; 1990). Convingerea noastră motivată de o acumulare consistentă de observații experimentale și date biochimice directe, este că cel puțin în cadrul distrofiilor musculare primitive defectul biomolecular primar este situat în domeniul sintezei sau funcționării defectuoase a unui sau unor componente lipidici situați la nivel membranar.

Investigațiile noastre au fost structurate de:

- a.** Tipuri de afecțiuni, începând cu distrofiile tipice : distrofia musculară progresivă Duchenne, distrofia miotonică.
- b.** Grupe de vârstă. Această regulă de selecție s-a impus după un număr relativ mare de probe analizate.
- c.** Considerații morfopatologice și biochimice. Datele analitice obținute din probele de sânge (plasmă și eritrocite) au avut uneori corespondent muscular global, utilizându-se fragmente de masă musculară, rămase de la examenul morfopatologic. Biopsia musculară a fost efectuată strict în cazul în care actul diagnostic a impus acest examen traumatizant.

Aceste corelații au generat informațiile cele mai valoroase. Anterior dezvoltării tehnicilor de analiză a ADN-ului, diagnosticul de Distrofie Musculară Progresivă Duchenne, a fost privit ca cert și condiționările au fost considerate omogene. Totuși, au existat și există încă trei categorii de incertitudini referitoare la :

1. Retardarea mentală.
2. Forma manifestă a distrofiei musculare progresive Duchenne la sexul feminin.
3. Severitatea "atenuată" a distrofiei Becker.

Printre cazurile originale, descrise de Duchenne în 1868, unele dintre ele prezentau o retardare severă. Autorul nota cu acest prilej *"inteligenta este adesea obtuză, cuvintele tardive și articularea puțin lentă"*, formulând ipoteza conform căreia miopia este o consecință a unei atingeri cerebrale. În 1872, Duchenne, recunoștea retardarea intelectuală la 5 din 13 afectați. În studiul său din 1970, Dague reunea concluziile lui Gowers (1891); Erb (1891); Curschmann (1912); Bramwell și Addis (1913); Maas și Patterson (1937); care erau de acord că 17 din 29 de afectați de distrofie musculară progresivă Duchenne prezintă o atingere intelectuală medie sau severă. Cu același prilej, Dague, relua sublinierea lui Billings și Ravin din 1941 *"nu există nici o rațiune de a crede, că atrofia musculară este mai importantă decât retardarea intelectuală"*, legând pentru prima dată cele două semne clinice ale afecțiunii. Becker remarcă în 1953, că 12% din totalul celor afectați prezintă o retardare intelectuală severă. Au existat de-a lungul timpului, câteva tentative de a genera o explicație cât de cât plauzibilă constatării clinice, în marea lor majoritate ignorând fundamentele patobiochimiei și biologiei moleculare (uneori). Cohen, Molnar și Taft în 1968, afirmă probabilitatea ca factorii genetici să joace un rol important, determinant la acest subiect. Ei, justifică această opinie prin prezența unei deficiențe mentale (mai mult sau mai puțin marcată) la părinții afectaților precum și la frați, unchi materni, veri, o astfel de concordanță având o probabilitate de 1 la 1 000 de a fi datorată hazardului. De subliniat că această ipoteză a fost considerată la început pur teoretică. Există în acest caz patru posibilități de a explica implicarea geneticii concomitent în distrofia musculară progresivă și deficiența mentală:

- a. Prin existența a două gene totalmente diferite, una responsabilă de distrofia musculară progresivă cu nivel intelectual normal și alta cu nivel cu deficiență mentală.
- b. Prin existența unei singure gene responsabile de declanșarea distrofiei și retardării mentale ; această deficiență mentală "se actualizează", la subiecții care prezintă o predispoziție ereditară în relație cu nivelul intelectual mediocru al ascendenților.
- c. Prin existența a două gene distincte, dar vecine , localizate pe același cromosom, în așa fel încât afectatul poate să le moștenească pe ambele.
- d. Prin existența a două gene distincte, dintre care una este responsabilă de deficiența mentală, și va fi activată sau inhibată de alta, responsabilă de distrofia musculară.

La acest subiect există din punctul nostru de vedere o observație și anume distribuția gaussiană a Q.I. în populația distrofică și absența deficienței intelectuale la vecoare, frați și surori, în unele cazuri. La acest moment euristic se estimează că cel puțin o treime dintre cei afectați, prezintă deficiențe intelectuale majore. Concluzia a fost validată de amplul studiu elaborat de Dubowitz în 1977.

În 1979, Emery face o corelație între evoluția clinică a distrofiei musculare progresive Duchenne și abilitatea intelectuală făcând distincție între două tipuri de afecțiuni. La băieții cu retardare mentală afecțiunea pare a avea un debut târziu și o perioadă de mobilitate mai lungă, decât la cei cu inteligență normală. Totuși în afară de afectarea musculară, retardarea nu este progresivă și nu există se pare modificări patologice consistente ale creierului. Între retardarea intelectuală a copilului cu distrofie musculară progresivă Duchenne și alții neafectați de maladii eredo-degenerative dar cu degradare mentală, nu s-a putut stabili nici un punct de coincidență cauzală.

Există însă cel mai adesea, o relație inconstantă între retardarea intelectuală întâlnită în alte trei sindroame cu determinism Xp21. Dacă retardarea mentală nu acompaniază obligatoriu pierderea de ornitintrans carbamilază sau glicerol kinază, deficiența intelectuală nu pare a avea după unii autori un determinism clinic, ci mai degrabă unul socio-economic.

La acest subiect primii ani ai noului mileniu au adus date noi care au venit să consolideze observațiile clinice amintite anterior pe un fundament biochimic valoros, probabil

și realist, eliminând astfel, conceptele legate strict de mediul socio-cultural, în general tarat al copilului afectat. Moizard și colab. (2000), corelează reducerea severă a capacități cognitive la distrofici Duchenne cu realitatea genică, rearanjările localizate în al doilea segment al genei fiind se pare responsabile de aceasta. Analiza mutațională a transcripției Dp71, la 12 cazuri de distrofie musculară progresivă Duchenne, a fost corelată cu diminuarea coeficientului de inteligență (QI) sub 50. Blake (2000) asociază diminuarea capacității cognitive la distrofici Duchenne cu anormalitățile membranei neurale, consecință a pierderilor de distrofină. Hopkins (2000), Jay (2001) confirmă concluziile studiului citat.

O analiză atentă a geneticii distrofinopatiilor este făcută de Roberts (2001) relevând atingerea cognitivă a celor afectați de distrofie musculară progresivă Duchenne. Beauvais (2001), Cotton (2001), Hinton (2001), notează la rândul reducerea capacității cognitive a pacienților afectați de distrofie musculară progresivă Duchenne.

Al 6-lea Congres Mediteranean de Miologie din anul 2002, aduce în atenția lumii științifice, două aspecte extrem de interesante, de mare importanță în etiopatogeneza distrofinopatiilor : existența certă a unor procese oxidative anormale la nivel proteic și lipidic, Niebroj-Dobosz (2002), Askanas (2002) precum și posibilitățile patobiochimice ale retardării cognitive, în distrofiile musculare tipice, Berardinelli (2002), Serratrice (2002), Topaloglu (2002). Anderson în anul 2002, subliniază un aspect important al distrofiei Duchenne, dar care a primit mai puțină atenție și anume, influența absenței sau depleției distrofinei asupra funcționării sistemului nervos central (SNC). Autorul face un paralelism extrem de bine definit cu singurul model animal cert, exprimat la șoarecele *mdx*.

Studiile au demonstrat fără echivoc că afecțiunii de distrofie musculară progresivă Duchenne au o capacitate cognitivă redusă și un coeficient de inteligență (QI) ce atinge rar 85%. La băieții afectați de distrofie Duchenne există dovezi experimentale asupra anormalităților arhitecturale ale sistemului nervos central (modificări ale dendritelor și reduceri neuronale) toate asociate neuronilor ca expresie directă a distrofinei. Pe de altă parte, din punct de vedere biochimic, la subiecții afectați de distrofie musculară progresivă Duchenne, bioenergetica sistemului nervos central este alterată, existând o creștere a concentrației compușilor colinici, senzor relevant al stării patologice. Funcțional, examenul electroencefalografic al celor afectați, semnalează modificări în funcția sinaptică, consecință directă a lipsei distrofinei.

Șoarecele *mdx* prezintă o reducere a reflexelor condiționate pasive, precum și a memoriei. Modelul animal prezintă o reducere de până la 50% a numărului neuronilor și o scădere a masei neurale din regiunea corticală. Datele histologice au demonstrat că densitatea GABA (acid γ -amino butiric) în canalele "cluster" este redusă în celulele Purkinje și neuronii din hipocampus, CA1 provenind de la *mdx*. Bioenergetica modelului animal este alterată, notându-se creșteri ale concentrației fosfatului anorganic și derivaților colinici. Studiile electrofiziologice au demonstrat existența unei susceptibilități crescute la hipoxie a neuronilor din hipocampus la șoarecii *mdx*.

La acest capitol, deși după cum am văzut s-a acreditat ideea existenței unui gene separate pe cromosomul Xp21, specifică retardării intelectuale, considerăm că factorul de degradare biochimică, specific lipidică, este esențial. Suportul acestei afirmații poate fi susținută consistent de implicațiile acizilor grași polinesaturați în dezvoltarea intelectuală a copilului.

În mod indiscutabil defectul genetic în maladiile eredo-degenerative este în prima faza determinant, dar evoluția ulterioară este coincidentă cu procesele dishomeostazice ale acizilor grași polinesaturați și lipidelor biologic active, implicând dereglări esențiale, generalizate, la nivelul membranelor celulare.

CAPITOLUL 2

METODE FIZICO-CHIMICE DE INTERES PENTRU INVESTIGAREA HOMEOSTAZIEI BIOCHIMICE A LIPIDELOR

2.1. SPECIFICUL METODELOR FIZICO-CHIMICE UTILIZATE LA INVESTIGAREA LIPIDELOR ÎN AFECȚIUNI NEURO-MUSCULARE

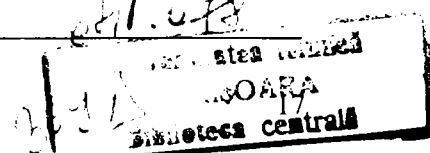
Istoric, momentul interferenței Chimiei și Biologiei în diferențierea stării normale (homeostazia biochimică) de cea patologică (dishomeostazia ca expresie a patobiologiei) este dificil de localizat. Prima demonstrație a corelației dintre fenomenul biologic și prezența bolii își are începutul în 1776, an când Sheele utilizează un test chimic, testul cu murexid, pentru identificarea acidului uric în calculii urinari (Partington, 1962). În mod sigur însă, investigația chimică, sistematică în scop diagnostic, își are începutul mult mai devreme. Un moment semnificativ al istoriei, domeniului interferențial ce se naște, Chimia clinică sau Biochimia clinică, este anul 1831, când o epidemie de holeră traversează continentul asiatic, ajungând până în Europa centrală. Este momentul când farmaciștii, spițerii (Apotheker) timpului încep să facă primele analize sistematice asupra fluidelor biologice ale pacienților sau celor decedați (Herman, 1831; Dulk, 1832; Wittstock, 1832).

„Apotheker” era specialist în chimia plantelor și mineralelor, extinzându-și acum domeniul de experimentare asupra analizei fluidelor și țesuturilor biologice.

Un început timpuriu, sistematic al corelării stării malade, cu semne chimice, poate fi identificat în „teoria *Chemismus*”, care apare o dată cu „*Naturphilosophie*” la sfârșitul secolului al XVIII - lea. Adepții acestei teorii considerau că alterarea balanței componentelor materiei organice, vii, (hidrogen, oxigen, azot, carbon) stau la baza afecțiunilor umane. Desigur, nu putea fi încă vorba de o analiză cantitativă și calitativă precisă, a continenților materiei vii, datorită lipsei unui „aparat” analitic perfecționat, dar la nivel speculativ se făcea un pas important în viitor. Perfectarea tehnicilor analitice realizată la începutul și mijlocul secolului al XIX-lea avea să confirme unele din speculațiile anterioare.

Alt moment de referință în evoluția Chimiei biologice este o descoperire clasică, în domeniul Biochimiei Clinice: demonstrarea faptului că acidul homogentisic urinar, marchează un defect metabolic congenital, deficitul unei enzime specializate în oxidarea acestui acid. Acest semn biochimic tipic al unei afecțiuni a fost descoperit de A. Garrod în 1908, considerat anul de „naștere” al Biochimiei genetice.

Chimia structurilor lipidice primește o atenție considerabilă în secolul al XIX-lea, datorită remarcabilelor lucrări ale lui Michel Chevreul (1786–1889). El demonstrează pentru



prima dată prin studii de saponificare, că grăsimile sunt compuse din acizi grași din care reușește să izoleze câțiva și din glicerol. Cel mai elegant și semnificativ studiu în domeniu provine totuși din laboratorul chimistului german Emil Fischer (1852–1919). El este cel ce avea să marcheze pentru multă vreme o epocă în care se fac primele corelații structurale între grăsimi, hidrați de carbon și proteine. Marelui chimist german îi revine indiscutabil onoarea de a studia și de a intui primul, rolul metabolic al lipidelor biologice active.

Generic "Lipidele" includ o varietate de substanțe cu hidrofobicitate crescută dar bine diferențiate din punct de vedere al structurii chimice. Datorită acestei heterogenități, care la fiecare clasă lipidică este extinsă în fapt, existând compoziții diferite în acizi grași, este evident că pentru completa separare și determinare a fiecărei fracțiuni se impune utilizarea unui complex de metode chimice și biochimice. Perfecționarea tehnicilor cromatografice și mijloacelor de detecție a adus date noi legate de structura și compoziția diferitelor clase lipidice.

2.1.1. LIPIDELE ÎN BIOCHIMIE ȘI CHIMIA CLINICĂ - SINOPTIC -

Lipidele se constituie ca un grup diferit de hidrați de carbon, proteine și acizi nucleici datorită heterogenității lor moleculare. Dacă hidrații de carbon, proteinele sau acizii nucleici prezintă o stare oligo sau polimeră a unor unități structurale mereu aceleași, apartenența la clasa lipidelor are la bază numai unele similitudini în cea ce privește proprietățile de solubilitate a membrilor ei.

Un sistem neconvențional de clasificare permite diferențierea lipidelor heterogene în două grupe :

I. **Lipide simple**

II. **Lipide complexe**

I. **Lipidele simple** cuprind :

1. **Gliceride** (acilgliceroli) – esteri ai *glicerolului* cu diverși acizi grași:

- a. Monogliceride
- b. Digliceride
- c. Trigliceride

2. **Ceride** – esteri ai unor alcooli alifatici monohidroxilați cu acizi grași

3. **Steride** – esteri ai acizilor grași cu alcooli ciclici superiori (steroli)

4. **Etolide** – esteri ai unor oxiacizi legați între ei

II. **Lipidele complexe** conțin în adăție la un acid gras cu catenă lungă, un polialcool, acid fosfatidic, o bază azotată (colină, etanolamină sau serină) și / sau hexoze.

Această grupă complexă poate fi structurată în :

1. **Glicerofosfolipide**

2. **Sfingolipide**

La rândul lor **Glicerofosfolipidele (1)** includ :

- a. **Acizi fosfatidici**
- b. **Colaminfosfolipide (cefaline)**
- c. **Colinfosfolipide (lecitine)**
- d. **Serin fosfolipide**
- e. **Inozitofosfolipide**
- f. **Acetalfosfolipide (plasmalogene)**

Sfingolipidele (2) funcție de constituția chimică includ :

- a. **Cerebrozide**
- b. **Ganglioizide**

c. **Sulfatide (Sulfocebrozide)**

Funcțiile biologice importante ale lipidelor includ:

α. Componente structurale ale biomembranelor

β. Forme de stocare și transport al combustibilului metabolic

γ. Rol de înveliș protector al suprafeței multor organisme

δ. Componente ale suprafeței celulare, implicate în recunoașterea celulară, în specificitatea de specie și imunitatea tisulară.

Valorile normale pentru diferite clase lipidice sunt derivate din determinările efectuate pe populații compuse din subiecți normali. În acest caz este esențial de a defini normalitatea printr-o atentă examinare medicală și includerea unui număr suficient de mare de subiecți care să permită o evaluare statistică relevantă. Valorile obținute în acest mod cuprind un domeniu de concentrații care este caracterizat de o valoare medie (\bar{X}) și o deviație standard. În cazul în care valorile determinate urmăresc o distribuție normală, 95% din totalul valorilor se situează în vecinătatea mediei ± 2 deviații standard. Diferența de 5% care nu se înscrie în această calculație poate fi privită ca valori patologice. Valoarea medie ± 3 deviații standard, va cuprinde 97% din valorile normale, dar în același timp va include valorile patologice de la interfața de suprapunere a domeniului normal cu cel patologic. În cazul în care valorile obținute nu corespund distribuției normale (distribuție Gauss), definirea domeniilor de "normalitate" se poate face și utilizând curbele de distribuție cumulative. Concentrațiile lipidelor tisulare sunt adesea raportate la diferiți factori : greutatea umedă, greutatea uscată, proteine totale, etc. Uneori se utilizează determinarea simultană a acidului deoxiribonucleic ca o măsură a numărului total de celule.

Lipidele plasmatică sunt în general raportate la 100 ml (1 dl) plasmă. Definirea valorilor lipidice plasmatică normale este un studiu relativ dificil de realizat deoarece rezultatele pot fi influențate de diferiți factori obiectivi. Concentrația colesterolului și fosfolipidelor variază în limite largi cu vârsta, crescând din a treia decadă până în a șasea decadă de viață, după care este urmată de o scădere. Valorile normale pentru vârste înaintate pot fi afectate de așa numitele afecțiuni "ascunse, liniștite", fără un aspect clinic manifest. Pe de altă parte concentrația lipidelor plasmatică variază cu cantitatea totală de grăsimi ingerate și cu compoziția în acizi grași a dietei. În aceste condiții este evident că la stabilirea valorilor normale se impune recoltarea probelor numai după o anumită perioadă (de regulă 3 săptămâni) de omogenizare a factorilor de dietă. Reprezentarea sinoptică a concentrației lipidelor plasmatică este prezentată în tabelul 2.1.

Valorile de mai jos sunt acceptate de ISSFAL (International Society for Study of Fatty Acids and Lipids) și în acord cu J.F. Zilva, P.R. Pannall , P.D. Mayene (1988). Valorile au fost testate și în Laboratorul de Gaz Cromatografie al Centrului Național de Patologie Neuromusculară "Dr.Horia RADU", au constituit obiectul unor investigații pe 350 de subiecți considerați clinic normal. Stabilirea unor domenii de variație normală, în general și în domeniul lipidelor în special, constituie un câmp de observație laborios, cu multe criterii de excludere, de la vârstă la factori de nutriție și areal de definiție al subiecților.

Fracția generic denumită " Fosfolipide" este compusă la rândul ei din specii diferite de lipide fosforilate.

Valorile prezentate în tabelul anterior, unanim, acceptate au ca sursă lucrările lui, Wagner H., Lang D. și Frosch din 1964. Ponderea procentuală în acizi grași, prezenții liber sau esterificați în plasmă a suferit în decursul timpului modificări continue, datorită perfecționării tehnicilor analitice de extracție, separare și dozare. Trebuie remarcate totuși lucrările W. Schrade și colab. care în 1960 au reușit să fundamenteze analitic și fiziologic o compoziție în acizi grași plasmatici. Importanța acestor lucrări departe de a fi numai "istorică", a reprezentat și reprezintă încă, primele studii de referință în cea ce privește compoziția în acizi grași a lipidelor plasmatică.

Tabel 2.1.
Concentrația plasmatică a lipidelor totale și fracțiunilor lipidice (după Wagner 1964)

Lipide și Frațiuni Lipidice	Concentrația plasmatică mg / 100 mL		% din Lipidele Totale
	Valori medii	Domeniu de variație	Valori medii
Acizi grași liberi	15	3.0 – 30	2.50
Trigliceride	95	50 – 150	15.80
Fosfolipide	210	150 – 250	35.00
Colesterol liber	40	40 – 50	1.16
Colesterol esterificat	220	140 – 300	39.10
Lipide totale	600	450 – 800	100

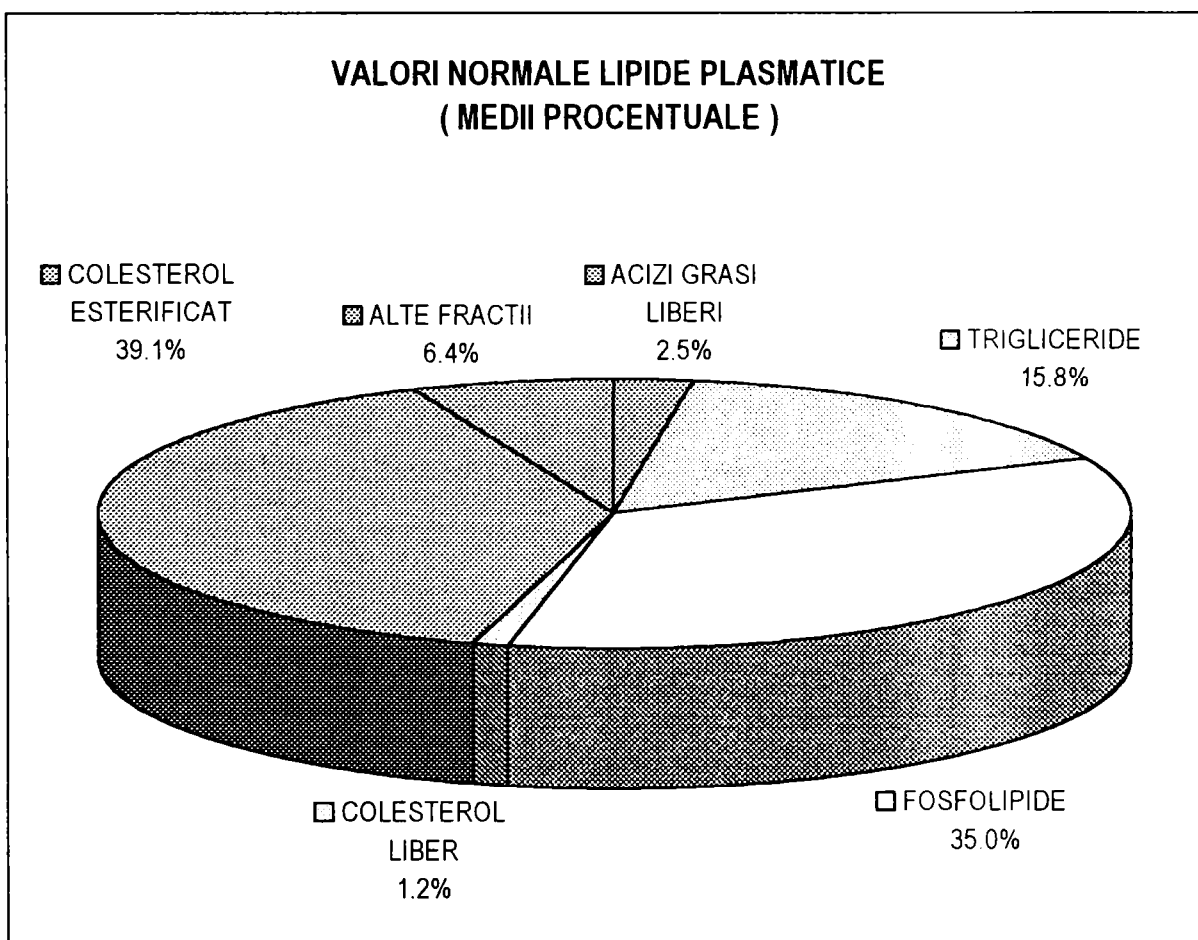


Fig.2-1.
Valorile normale ale lipidelor plasmatice.

Tabel 2.2.
Compoziția fosfolipidelor plasmatice (după Schrade 1960).

Specie	Fosfolipide plasmatic mg / 100 mL	% din Fosfolipide totale
Colinfosfolipide (Lecitine)	132 ± 38	66 ± 9
Sfingolipide	43 ± 12	22 ± 5
Lisocolinfosfolipide	19 ± 12	9 ± 7
Colaminfosfolipide (Cefaline)	6 ± 2	3 ± 1

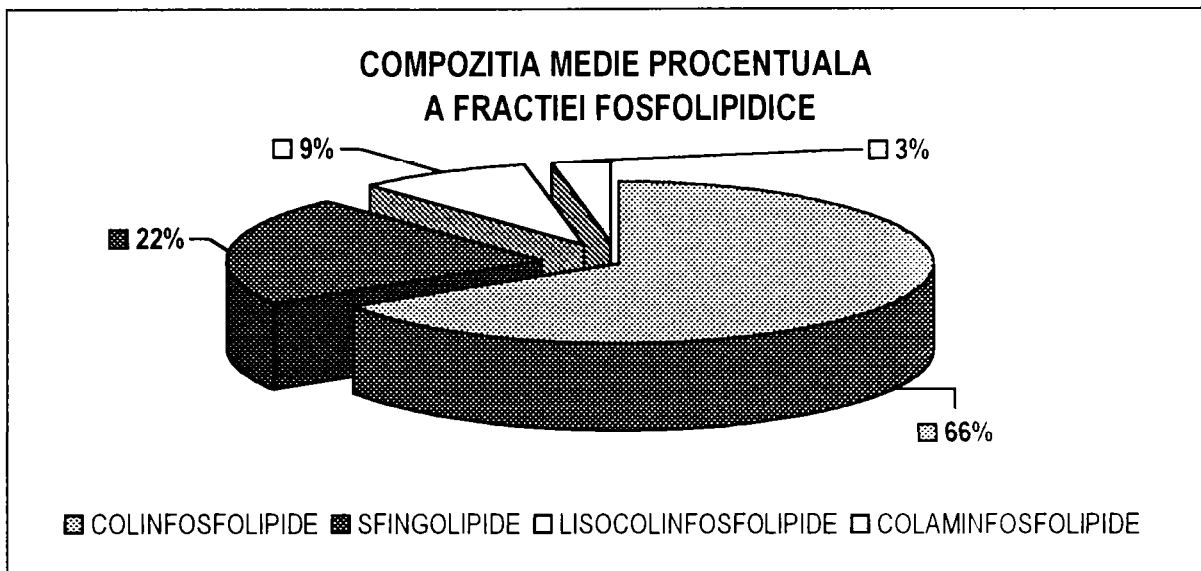


Fig. 2 - 2.
Compoziția medie procentuală a fracției fosfolipidice.

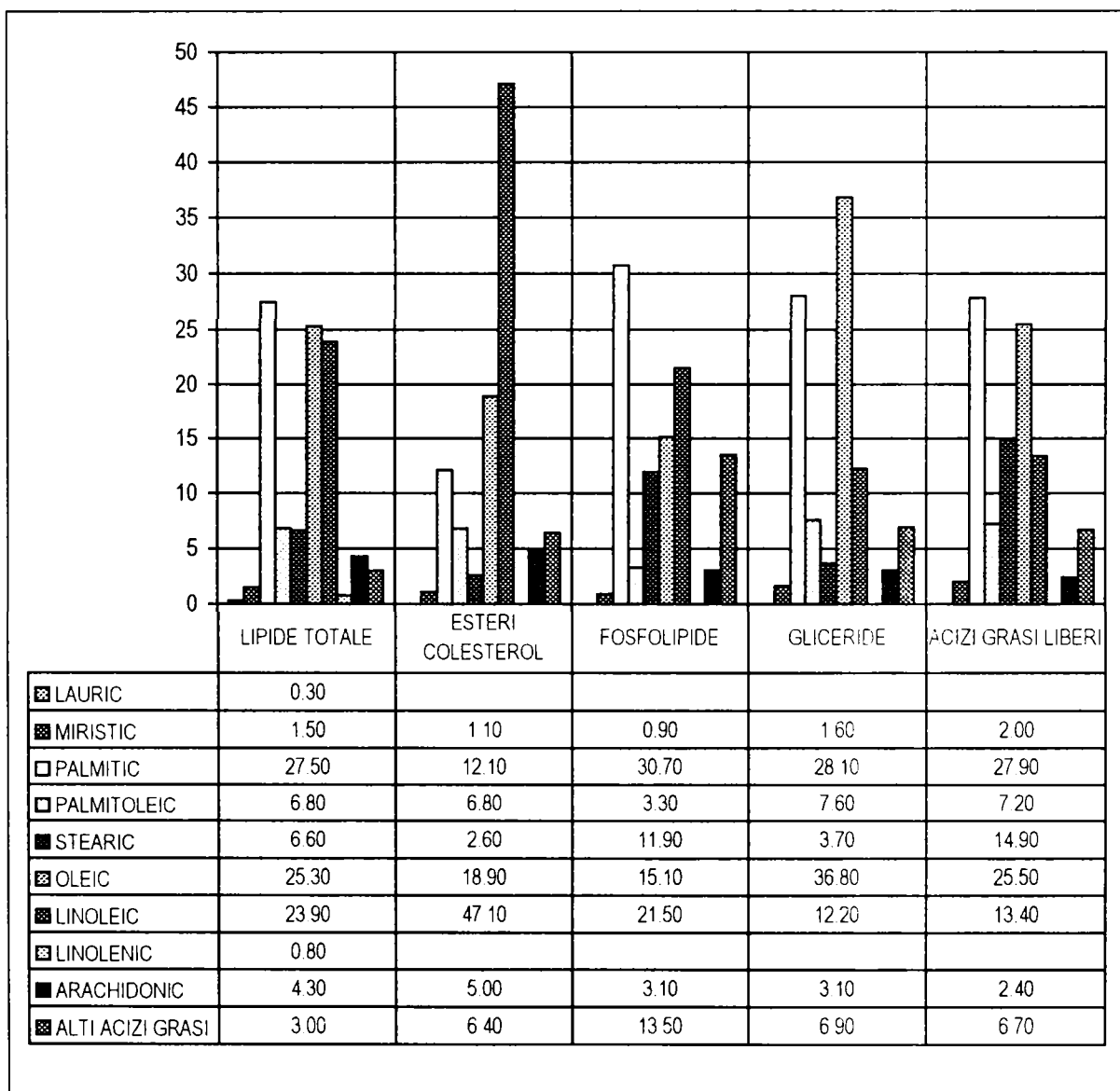


Fig. 2-3.
Compoziția procentuală normală a acizilor grași în lipidele totale și fracțiile lipidice plasmatice (după Schrade 1960).

Compoziția procentuală normală a acizilor grași în lipidele totale și în fracțiile lipide plasmatică este redată în figura 2-3., după Schrade și colaboratorii din 1960.

Separarea acizilor grași s-a realizat pe coloană cromatografică clasică cu umplutură. Procentual compoziția acizilor grași este ușor alterată, dar să nu uităm că, trecuseră numai două decenii de când James și Martin în 1941, enunțaseră principiile teoretice ale cromatografiei de gaze și un deceniu (1952) de la realizarea primului aparat. subiectul unor investigații lipidice atente.

Proporția dintre diferitele clase lipidice, mobilizarea grăsimilor de depozit precum și compoziția în acizi grași a acestora fac subiectul a numeroase studii în literatura de specialitate.

Implicarea acestor sisteme lipidice complexe în diferite procese patologice este un domeniu de studiu extrem de actual, cu reflecții ce cuprind procese metabolice, de sinteză și de nutriție.

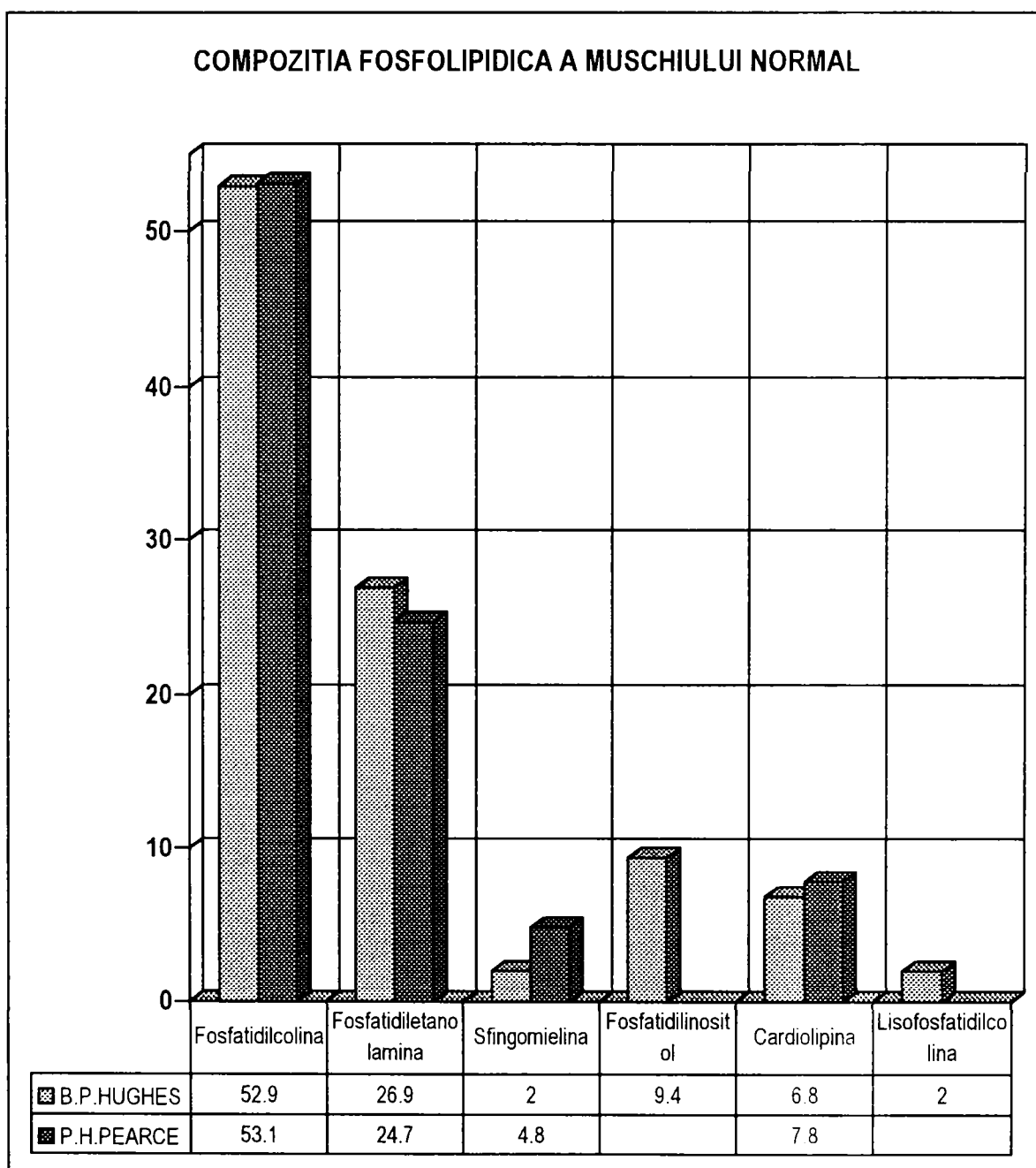


Fig.2-4.

Compoziția procentuală a fosfolipidelor extrase din mușchiul normal. Valorile sunt exprimate ca medii procentuale din fosforul lipidic total.

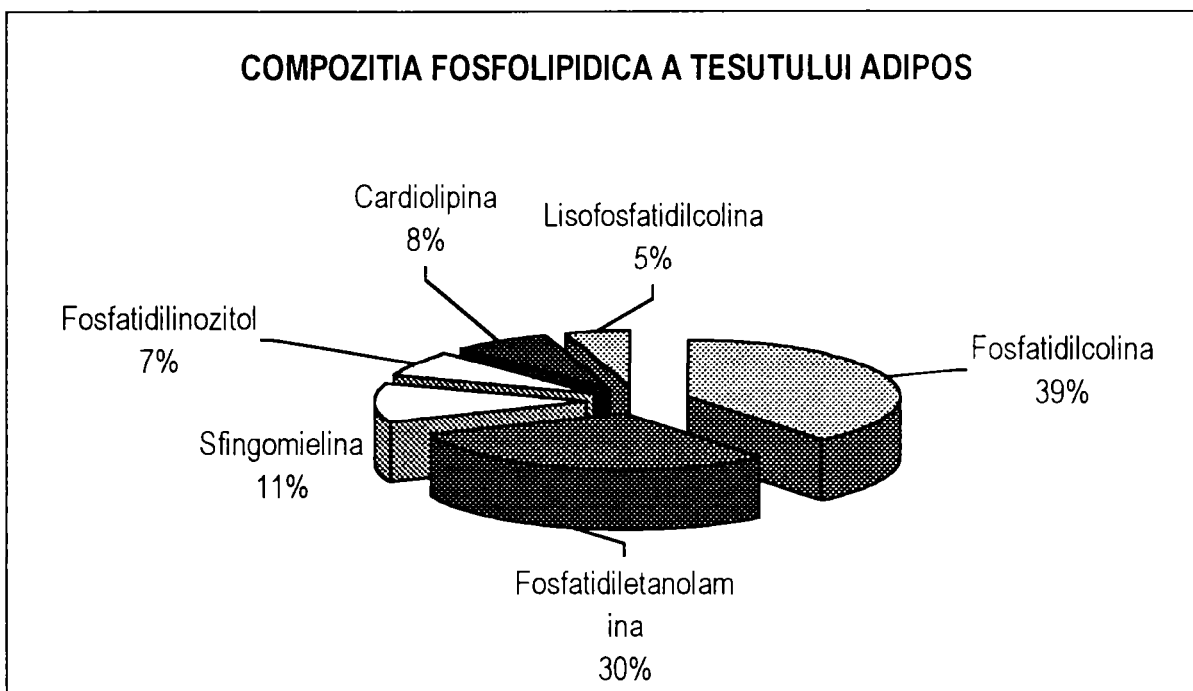


Fig. 2-5.
Compoziția procentuală a fosfolipidelor extrase din țesutul adipos normal.

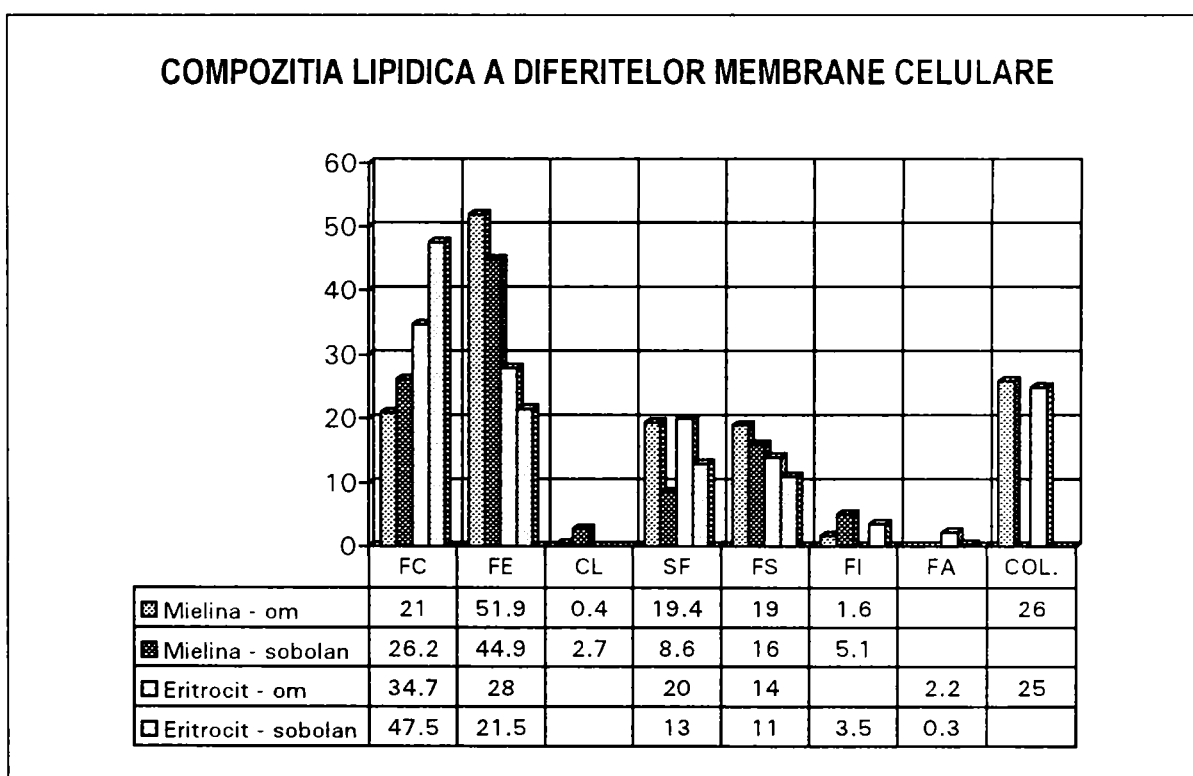


Fig.2-6.
Compoziția lipidică a diferitelor membrane celulare (după Benga, 1979).

Abrevierile din tabel sunt prezentate explicit mai jos.

FC	Fosfatidilcolina	FE	Fosfatidiletanolamina
CL	Cardioline	SF	Sfingomieline
FS	Fosfatidilserina	FI	Fosfatidilinozitol
FA	Acid Fosfatidic	COL	Colesterol

Investigațiile asupra compoziției acizilor grași esterificați în diferite fracții lipidice au demonstrat implicarea acestora în dezvoltare multor afecțiuni cronice, ce nu au ca principal aspect etiologic alterări ale homeostaziei sistemelor lipidice. Un domeniu important al cercetării biomedicale din ultimii ani este studiul interacțiunii radicalilor liberi cu acizii grași nesaturați, și aspectele patologice particulare caracterizate de aceasta. Lucrări fundamentate din ultimii 5 ani au demonstrat implicarea lipidelor biologic active în afecțiuni grave ca de exemplu : depresii, schizofrenie, scleroză multiplă, cancer, talasemie, etc. Figurile 2-4 și 2-5, prezintă proporția dintre diferitele fracții fosfolipidice extrase din mușchiul normal respectiv țesutul adipos. Datele au fost extrase din studiile efectuate de Hughes în 1973 și Pearce în 1981.

În evoluția materiei vii, membrana celulară prezintă prima fracțiune ultrastructurală celulară diferențiată, de aceea ea s-a perfecționat și diversificat mult în decursul acestui îndelung proces. S-au făcut numeroase studii pentru a defini variațiile în compoziția lipidică a diferitelor membrane și pentru a se încerca corelarea compoziției cu funcțiile membranei.

Figura 2-6, redă sinoptic rezultatul acestor studii. Datele au fost preluate din lucrarea prof. dr. Gh. Benga din 1979.

2.1.2. IZOLAREA COMPUȘILOR LIPIDICI

Izolarea cantitativă a lipidelor din țesuturi și plasmă presupune distrugerea complexelor lipoproteice întâlnite în materialele biologice. Pentru acest scop solvenții utilizați trebuie să fie suficient de polari pentru a rupe complexele lipoproteice și a denatura proteinele. Extracția completă a lipidelor se realizează prin adăugarea de solvenți cu caracter lipofilic.

Un amestec de solvenți frecvent utilizat este cloroform : metanol (2:1) deoarece această combinație are cea mai mare putere de extracție pentru fosfolipide și în special pentru sfingomieline. Studiile efectuate de noi au demonstrat însă că un amestec cloroform : izo-propanol (2:1), este mai eficient (randamentul de extracție superior. În plus se elimină în acest fel dezavantajele impuse de purificarea înaltă a metanolului). Amestecul etanol : eter (3:1) este utilizabil numai în cazul în care lipidele sunt compuse predominant din lipide neutre (gliceride, diverse steride).

În scopul unei extracții cantitative probele lipidice necesită un volum de solvent relativ mare, cel puțin 20 de volume cloroform-metanol. Lipidele din țesuturi se omogenizează și se extrag optim cu aproximativ 100 volume solvent de extracție pentru fiecare gram de material tisular. Pentru o extracție cantitativă, încălzirea chiar moderată deși este necesară este de dorit de a fi evitată pentru minimalizarea fenomenelor de oxidare dacă nu este posibilă asigurarea unei incinte cu atmosferă inertă. După filtrare, extractul lipidic este încă contaminat cu material non-lipidic. Pentru purificare extractul lipidic poate fi „spălat” cu apă sau cu soluții saline diluate iar faza apoasă eliminată. Acest procedeu este preferat evaporării în vid, urmată de redizolvarea în solvenți lipofili.

Extractul lipidic purificat poate fi concentrat prin distilare în vid. Concentrarea este recomandabilă dacă se preconizează separarea ulterioară a claselor lipidice prin tehnici cromatografice în strat subțire. Este obligatoriu asigurarea unei atmosfere protejate (gaz inert) în timpul procesului de evaporare a solventului pentru evitarea oxidării sau polimerizării acizilor grași nesaturați.

Metodele clasice de extracție, extrem de eficiente, dar consumatoare de timp, cu multe manevre analitice, au început să fie înlocuite cu procedee elaborate, moderne de extracție în fază solidă.

General vorbind extracția în fază solidă separă, concentrează și purifică compușii de interes în trei moduri :

1. **Extracție Selectivă** – Condițiile inițiale se selectează în așa fel încât impuritățile nu sunt reținute de umplutura coloanei de extracție, în favoarea compușilor de interes.
2. **Spălare Selectivă** – Spălare cu soluții suficient de puternice încât să elimine impuritățile dar suficient de slabe încât produșii de interes să rămână.
3. **Eluția Selectivă** – Eluarea compușilor de interes într-un solvent care lasă impuritățile puternic reținute pe suport.

Extracția în fază solidă permite izolarea directă, a unor grupe lipidice din ser, plasmă sau omogenat tisular, facilitând analiza ulterioară a componentelor.

În 1984, Hamilton, a elaborat o tehnologie de extracție în fază solidă, utilizând microcoloane (cartușe) de silicagel pentru separarea fosfolipidelor de lipidele neutre și acizii grași din ser, ficat de șobolan și mușchi striat. Cantitatea regăsită de esteri ai colesterolului, triacilglicerol, acizi grași și fosfolipide a fost mai mare de 95%. În 1985, Kaluzny, utilizând microcoloane (cartușe de extracție) aminopropil a separat probe de țesut adipos în șapte clase distincte: esteri ai colesterolului, triacilgliceroli, diacilgliceroli, monoacilgliceroli, colesterol, acizi grași liberi și fosfolipide. Cu această tehnică 10 mg "probă lipidică" poate fi complet separată în 1.5 ore, cu un randament mai bun de 95% ,fără riscul oxidării.

Extractele lipidice totale, purificate pot fi aduse la sec numai în cazul în care se apreciază că prelucrările ulterioare impun acest lucru. În mod curent probele vor fi stocate într-un solvent de tipul benzenului, cloroformului, acetonei la -30°C ., înfiolate în atmosferă de azot sau heliu. Metanolul și etanolul nu sunt recomandabile pentru stocarea extractelor lipidice purificate datorită proceselor de transesterificare ce pot duce la formarea esterilor metilici, respectiv etilici ai acizilor grași.

Extracția și purificarea lipidelor tisulare impune, unele procedee analitice speciale pentru evitarea „pierderii” unor fracțiuni de tipul ganglioizidelor, sulfatidelor și fosfoinozitelor.

Procedeul difuziei utilizat pentru purificarea soluțiilor lipidice în cloroform-metanol poate fi înlocuit printr-o metodă rapidă constând în trecerea extractelor printr-o coloană de gel dextrans modificat (Sephadex- LH).

Lipidele plasmatică pot fi co-precipitate cu proteinele și extrase ulterior din precipitat. O atenție deosebită trebuie acordată în acest caz agenților de precipitare pentru a evita degradarea lipidelor, materialele puternic acide sau puternic bazic vor fi excluse. Agenții de precipitare cei mai utilizați sunt fierul coloidal, acidul tricloracetic 5%, hidroxidul de zinc. Pentru a minimaliza oxidarea lipidelor nesaturate în timpul prelucrărilor analitice este recomandabilă utilizarea unor antioxidanți de tipul : hidrochinonă, butil hidrochinonă sau 2,6-di-tert-butil-p-cresol (BHT).

2.1.3. DETERMINAREA CALITATIVA A LIPIDELOR

Determinările calitative ale lipidelor din sistemele biologice au depășit de mult o practică în chimia clinică. Informațiile calitative nu mai sunt utile nici chiar în cele mai simple cazuri. Locul investigațiilor "orientative" a fost luat de determinări de mare performanță, menite să furnizeze clinicianului informații utile despre proporția diferitelor clase lipidice în fluidele biologice și țesuturi. Implicarea lipidelor biologic active în patogenia afecțiunilor umane se dovedește pe zi ce trece tot mai profundă.

Generic, *Lipidozele*, cuprind un *sumum* de afecțiuni la care deși se acceptă un determinism genetic, diagnosticul clinic este din ce în ce mai dependent de verdictul unui laborator de înaltă specialitate, laborator lipidologic.

Afecțiunile peroxisomale, au ca factor esențial de diagnostic o analiză cantitativă a unor acizi grași imposibil de evidențiat fără o separare gaz cromatografică pe coloană capilară. Cum oare poate fi evidențiată o afecțiune peroxisomală, caracterizată prin stocarea acidului fitanic (acidul 3,7,11,15-tetra-metil-hexa-decanoic) printr-un test calitativ ?

Controlul factorilor de dietă, păstrarea unei compoziții adecvate de constituenți lipidici : triacilgliceroli, acizi grași, colesterol, etc., constituie în marea majoritate singurul tratament eficient în cazul acestor dereglări ale metabolismului lipidic. Motivarea anterioară nu este însă completă fără a face vorbire despre aplicațiile stric legate de domeniul cercetării biomedicale. Compoziția lipidică a membranelor biologice este numai un exemplu. Aici este locul, unde prin similitudine, trebuie amintită remarcă d-ului prof. dr. Gheorghe Benga în lucrarea domniei sale "*Biologia celulară și moleculară*" : "Interesantă este și schimbarea denumirii unui prestigios manual având autor pe argentinianul *De Robertis* și colab. Edițiile dintre 1946-1965 au apărut ca "*General Cytology*", cele din 1970 și 1975 ca "*Cell Biology*", iar cea din 1980 sub titlul "*Cell and Molecular Biology*", ceea ce ilustrează perfect conținutul disciplinei contemporane".

Apariția unor laboratoare specializate cum este Laboratorul de Gaz - Cromatografie pe fluide biologice din cadrul Departamentului de Biochimie al Centrului Național de Patologie Neuromusculară "Dr. Horia RADU" s-a înscris în necesitatea adaptării tehnicilor analitice de vârf în chimia clinică. Adaptarea s-a datorat în primul rând nevoilor cunoașterii etiopatogeniei și evident terapiei. De aceea chiar și simpla enumerare a unor teste calitative lipidologice este un fapt ce nu mai are nici măcar istorie.

2.1.4. APLICAȚII ÎN CHIMIA CLINICĂ

Triacilglicerolii din țesutul adipos și din celelalte țesuturi reprezintă cel mai important depozit de rezerve energetice ale organismului. Aceste depozite se formează din grăsimile ingerate în exces sau sunt forma de stocare a surplusului de glucide. Transportul triacilglicerolilor alimentari și a celor sintetizați endogen la locurile de depozitare și apoi distribuția lor către organele consumatoare presupune un flux plasmatic continuu de triacilgliceroli și de alte categorii de lipide. Triacilglicerolii hidrofobi sunt transportați într-un mediu apos în asocieră cu lipide polare și cu proteine sub formă de lipoproteine. Aceste lipoproteine cuprind diverșii componenți în proporții relativ constante ceea ce denotă existența unor interacțiuni cu un înalt grad de specificitate. Legăturile prin care se realizează asociațiile lipide – lipide și lipide-proteine sunt în primul rând interacțiuni fizice, ca atracții ionice, forțe van der Waals, atracții polare, legături de hidrogen dar pot fi și interacțiuni chimice prin legături covalente.

Lipidele din sistemele biologice pot fi analizate, în principial prin două procedee :

1. Un prim procedeu de analiză constă în separarea lipidelor de proteine, după care componentele lipidice sunt fracționate. Dozarea fracțiilor separate se realizează fie instrumental (utilizând o proprietate fizică specifică), fie chimic (reacție specifică sau specifică în matrice).
2. Un alt mod de abordare a studiului lipidelor constă în separarea lipoproteinelor ca entități morfo-funcționale și cercetarea compoziției lor proteice și lipidice. Prin acest gen de analize s-a putut înțelege dinamica lipidelor plasmatică, geneza și modul lor de utilizare.

Metodele analitice pot fi împărțite în metode chimice și metode instrumentale. Metodele chimice se bazează pe diferite operații chimice folosind sticlăria uzuală de laborator formată din aparate simple. În general, în aceste metode se măsoară masa sau volumul. Metodele instrumentale implică utilizarea unui echipament sofisticat bazat pe

principii electronice, optice, termice. În aceste cazuri, se măsoară diferite proprietăți corelate cu compoziția probei. Cele mai bune rezultate ale unei metode analitice se obțin folosind cuplarea tehnicilor chimice cu cele fizico-chimice (instrumentale).

Avantajele metodelor instrumentale :

1. Determinarea este foarte rapidă (sub 1/100 s)
2. Pot fi utilizate probe mici
3. Pot fi cercetate probe complexe
4. Prezintă o sensibilitate ridicată
5. Dau rezultate sigure

Avantajele metodelor chimice :

1. Procedeele sunt simple și precise
2. În general, metodele se bazează pe măsurători absolute
3. Echipamentul necesar nu este scump

În prezent, principalele direcții de cercetare sunt orientate în domeniul perfecționării aparaturii, nu trebuie să se tragă concluzia că metodele instrumentale le-au înlocuit pe cele chimice. În practică, procedeele chimice constituie adeseori o parte integrantă dintr-o metodă instrumentală. Astfel, în orice analiză există etape ca : prelevarea probelor, dizolvarea, schimbări în starea de oxidare, îndepărtarea excesului de reactiv, ajustarea pH-ului, adăugarea de agenți de complexare, precipitarea, concentrarea, îndepărtarea impurităților, etc. Unele din acestea implică utilizarea metodelor de separare.

Chimia clinică, utilizează din ce în ce mai mult tehnicile analitice de vârf : spectrofotometria în ultraviolet și vizibil, spectrofotometria de absorbție atomică cromatografia în strat subțire, cromatografia de lichide de înaltă presiune și de gaze, etc. Toate aceste tehnici au fost dezvoltate de chimia analitică , aplicate rapid în chimia clinică chiar dacă granița dintre determinările de "rutină" și cercetarea fundamentală este relativ greu sau imposibil de marcat.

Analiza cromatografică joacă în cadrul analizei clinico - chimice a lipidelor un rol esențial. Prin combinarea corespunzătoare a diverselor tehnici cromatografice este posibilă astăzi determinarea compoziției complexe a lipidelor biologic active. Lipidele, substanțe organice, cu rol esențial în arhitectura lumii animale și vegetale, în general insolubile în apă, neavând un criteriu precis de definiție, din punct de vedere al polarității se distribuie de la hidrocarburi până la ganglioziide cu grupări funcționale extrem de numeroase. Primele sunt complet insolubile în apă, iar ultimele solubile atât în apă cât și într-o serie de solvenți organici. De aceea literatura privind separarea lipidelor prin metode cromatografice este așa de vastă încât practic este imposibil ca într-un spațiu limitat să încercăm să prezentăm chiar și schematic locul ocupat de metodele cromatografice în chimia clinică.

Spectrofotometria în ultraviolet, vizibil și infraroșu reprezintă la acest moment principala tehnică de dozare în chimia clinică. Aproape nu există tehnică analitică, care să nu își regăsească aplicabilitate în chimia clinică.

Separarea unui amestec complex de lipide plasmatiche, extracte tisulare sau extracte celulare (integrale sau constituenți al acestora), în componente poate fi realizată eficient și rapid prin diferite variante ale metodei cromatografice. Alte metode ca de exemplu fracționarea cu solvent nu dau rezultate satisfăcătoare. Calitatea și acuratețea metodelor cromatografice depinde de puritatea adsorbentului și solventului, de compoziția și cantitatea materialului procesat. Aceste aspecte au fost evaluate extensiv în decursul timpului de generații de cercetători. Acidul silicic (silicagelul) a fost și a rămas cel mai frecvent utilizat adsorbent pentru lipide. El a fost introdus de Börgström în 1952 utilizând ca solvent eluent un sistem binar hexan-benzen. Rezultate reproductibile, o metodă standardizată, obține Hirsch și Ahrens în 1958, apoi Hirsch în 1963. Separarea lipidelor poate fi realizată și prin eluție discontinuă, în gradient, cu solvenți nepolari de tipul eterului de petrol sau hidrocarburi

(hexan). Prin adiția de unor cantități variabile de eter sau benzen pot fi eluate : esterii colesterolului, triacilgliceroli, acizi grași liberi, colesterol liber, di- și monoacilgliceroli (enumerarea s-a făcut în ordinea de eluție). Lipidele fosforilate sunt puternic adsorbite și nu pot fi eluate după suport decât cu un solvent polar de tipul metanolului.

Glicerofosfolipidele sunt fracționabile pe coloană deschisă cu mult mai multă dificultate decât lipidele neutre. Se utilizează amestecuri cloroform/metanol, concentrația alcoolului metilic crescând până la 100%, fracționarea este incompletă, fiecare fracție fiind contaminată. Această contaminare impune un control calitativ sau cantitativ, de tipul : dozarea fosforului , determinarea lipidelor totale sau teste cromatografice în strat subțire.

Lipidele neutre sunt fracționabile pe silicat de magneziu (florisil), utilizând un sistem de solvenți eter-hexan. Coloanele de florisil au o capacitate mult mai mare decât cele cu acid silicic și uzual permit debite de eluție mai mari. Dezavantajul major este faptul că, glicerofosfolipidele nu pot fie eluate cantitativ din coloană. Separările cromatografice pot fi efectuate și în stat subțire de silicagel sau alți absorbenti depuși pe plăci de sticlă sau alți suportți (cromatografie în strat subțire). Această metodă standardizată de către Stahl și Weickler în 1959 și a fost prima dată aplicată pentru separarea lipidelor serice. Cromatografia în stat subțire este superioară cromatografiei pe coloană în cea ce privește viteza de separare, calitate și rezoluție. În plus funcție de grosimea stratului de fază staționară există posibilitatea aplicării acestei metode atât în scopuri analitice cât și în practica preparativă. Stratul subțire pentru separarea lipidelor se prepară prin depunerea unei suspensii de silcagel, florisil, gel dextranic, etc. și sulfat de calciu (acetat de magneziu) în apă pe suportți perfect degresați (uzual plăci de sticlă). Opțional materialul depus poate conține un indicator fluorescent. Plăcile sunt activate la 100 - 110° C, înainte de depunere a probei lipidice (dizolvate în cloroform, benzen sau hexan) sub formă de spot sau bandă. Toate procedeele de mai sus pot fi eliminate când se utilizează "cromatoplăci" furnizate de firme specializate. Pentru dezvoltare cromatoplăcile sunt introduse în tancuri de dezvoltare conținând faza lichidă. Când frontul de solvent ajunge la o anumită înălțime, plăcile sunt scoase și uscate. Pentru vizualizarea spoturilor separate, cromatoplaca poate fi pulverizată cu un colorant convenabil ales (Rodamină B, Diclorofluoresceină) sau reactiv (acid fosfomolibdenic , etc.) Lipidele mai pot fi vizualizate în cazul în care este necesară prelucrarea lor ulterioară în lumină ultravioletă fără nici un alt pretratament. Detectarea lipidelor cu vapori de iod trebuie evitată dacă interesează determinarea acizilor grași constituenți, deoarece sunt afectate dublele legături. În cazul în care interesează evidențierea unui material organic în general, pulverizarea cu acid sulfuric și încălzirea moderată este extrem de eficientă. Solvenții utilizați pentru dezvoltarea cromatoplăcilor pot fi singuri sau amestecuri. Dezvoltarea repetată cu același solvent sau solvenți diferiți, permite separarea unor subfracții. În acest mod a fost posibilă separarea lipidelor neutre de Freeman în 1966 și lipidele neutre plus fosfolipidele de Vogel în 1964 pe o singură placă cromatografică. Amenta în 1964, utilizând o tehnică asemănătoare reușește separarea cantitativă subsecventă a lipidelor reducându-le cu o soluție acidă de dicromat. Separarea lipidelor totale s-a realizat prin dezvoltarea cu un amestec de hexan/ eter de petrol/benzen/cloroform (sau dietil eter). Adiția de mici cantități de acid acetic este recomandată pentru o separare netă a acizilor grași. Clasele lipidice pot fi separate așa cum este arătat în figura 2-7. Rezoluția metodei este destul de bună pentru a permite obținerea unor separări nete, reproductibile.

Fracționarea lipidelor plasmatică s-a realizat în eter de petrol/dietil eter/acid acetic 85/15 /1 (v/v), vizualizare în lumină ultravioletă. După vizualizarea fracțiilor prin tratament non-distructiv sau pulverizare aria corespunzătoare fracției de interes era prelevată după placă și compușii separați eluați cu cloroform sau eter (lipidele neutre) și metanol/cloroform, metanol, metanol/acid acetic/apă (glicerofosfolipidele).

Materialul eluat putea fi procesat ulterior. Foarte puține determinări erau posibile în prezența fazei staționare (numai în cazul în care cromatoplaca nu conținea ca liant gips sau alt material ce putea reacționa cu reactivii specifici). Întreg procesul se desfășura într-o atmosferă inertă, iar de pe o cromatoplacă erau prelevate cel mult două spoturi ce puteau fi prelucrate ulterior. Fenomenele de autooxidare și de interacție oxidativă cu faza staționară erau frecvente și numai răbdarea și îndemnarea analistului permiteau obținerea unor rezultate reproductibile și realiste.

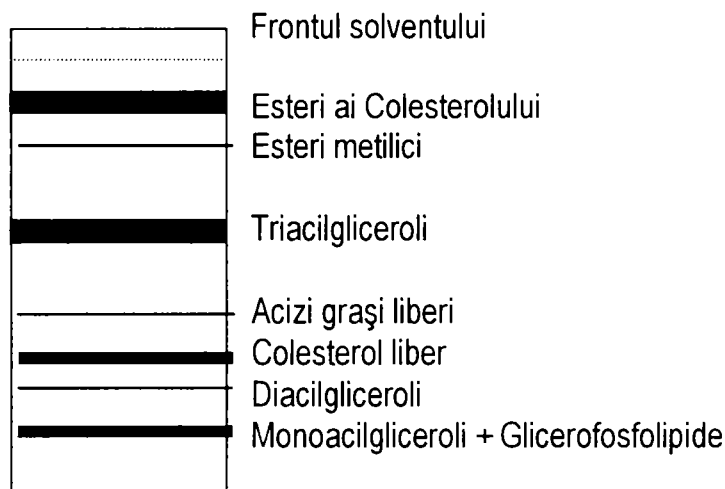


Fig. 2-7.

Separarea claselor lipidice pe o singură cromatoplacă (prezentare schematică).

Separarea acizilor biliari în forma lor fiziologică, conjugați cu taurina și glicina de alte lipide era o operație analitică extrem de dificilă. Prin tehnica cromatografiei pe coloană cu acid silicic acizii biliari eluau undeva în regiunea monoacilglicerolilor. Cromatografia în strat subțire cu sistemul eter etilic/eter de petrol/acid acetic, producea o fracție constând din glicerofosfolipide, monoacilgliceroli și acizi biliari. Numai distribuția în contra curent permitea separarea completă a tuturor substanțelor prezente în bilă. În contrast acizii biliari erau relativ ușor de izolat după hidroliza alcalină a amestecului lipidic, acidifiere și extracție cu eter. Lipidele contaminante din aceste extracte erau eliminate prin distribuție între 70% etanol și eter de petrol. De la aceste manevre analitice de mare precizie, rapiditate și nu de puține ori dependente de inventivitatea analistului până la extracția rapidă în fază solidă, filtrarea moleculară și fixarea pe suport specific, drumul a fost destul de lung, dar nu trebuie uitat că mulți chimiști analiști l-au parcurs în mai puțin de 15 ani. Procesele de extracție și purificare moderne nu mai amintesc decât rare ori de laborioasele tehnici ale "copilăriei" chimiei clinice. Fără toate aceste eforturi de care mulți analiști își mai aduc aminte azi, după o extracție și separare "dificilă și laborioasă" de 15-20 minute, multe procese metabolice și afecțiuni ale catabolismului lipidic rămâneau la aprecierea tardivă a clinicianului, ce constată boala atunci când ea este manifestă și când de cele mai multe ori manevrele terapeutice sunt limitate și nu de puține ori ineficiente.

Clasele lipidice obținute prin tehnicile cromatografice în multe cazuri nu sunt pure, de exemplu fosfolipidele obținute prin cromatografie în strat subțire utilizând solvenți nepolari sunt adesea contaminate cu monoacilgliceroli. Frațiile lipidice separate cu excepția colesterolului liber sunt amestecuri de substanțe diferite prin resturile de acizi grași.

Esterii colesterolului pot fi separați în acord cu gradul lor de nesaturare. În domeniul analitic cromatografia în strat subțire este preferată. Zöllner în 1965, a dezvoltat o metodă pentru separarea diferitelor specii de colesterol seric în acord cu gradul de nesaturare. Metoda are ca punct de plecare un extract lipidic total și utilizează dezvoltări repetate cu tetraclorură de carbon sau eter de petrol dopat cu 1% izopropil ester. După pulverizarea

plăcilor cu o soluție de tricolorură de antimoniu și încălzire apar spoturi colorate de la roșu la violet reprezentând esterii cu grade diferite de nesaturare. Figura 2-8., reprezintă schematic, un astfel de proces de separare.

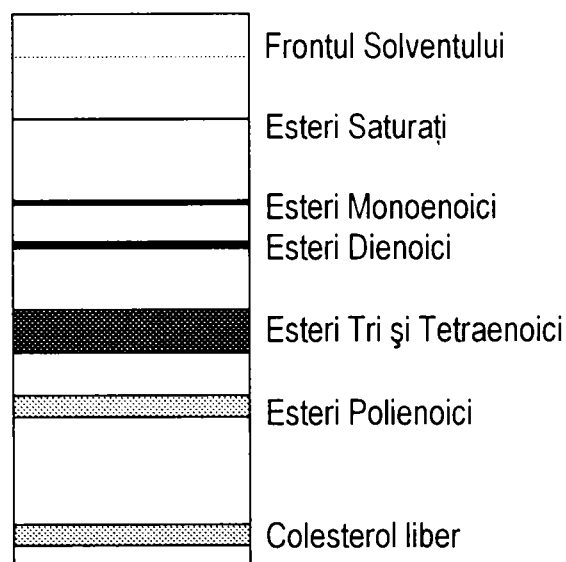


Fig. 2-8.

Separarea diferitelor specii de colesterol seric, funcție de gradul de nesaturare al acizilor grași care esterifică colesterolul (prezentare schematică).

Compoziția procentuală a amestecului se determină prin scanarea fotometrică a cromatoplăcii la 575 nm. Un procedeu semănător este dezvoltat pentru plăci acoperite cu silicagel și dopate cu azotat de argint sau un agent fluorescent.

Amestecurile complexe de esterii colesterolici sunt separabili prin cromatografie în strat subțire bidimensională, cromatografie de gaze sau cromatografie de lichide de înaltă presiune. Frația fosfolipidică separată, este constituită din diferite glicerofosfolipide și sfingolipide cu compoziții diferite de acizi grași. Subfracționarea este relativ dificilă, datorită fracțiilor ce pot co-migra dar și datorită fenomenelor de autooxidare ce alterează proprietățile de solubilitate. Cromatografia în strat subțire dă cele mai bune rezultate. Cromatoplăcile pot avea ca suport sticla, hârtia sau mai nou materiale plastice. Separarea se realizează prin dezvoltare în amestecuri de tipul cloroform/metanol/apă , subsecvent poate fi determinat conținutul de fosfor.

Fracționarea fosfolipidelor plasmatică este prezentată schematic în figura 2-9. Pentru scopuri analitice eliminarea lipidelor neutre nu este esențială. Metodele mono- și bi-dimensionale utilizând cloroform/metanol/hidroxid de amoniu permit fracționarea celor mai complexe amestecuri de fosfolipide, Abramson și colab. (1964); Saito și colab. (1983) ; Ando și colab. (1980); Macala și colab. (1983). Fosfolipidele pot fi fracționate funcție de gradul de nesaturare al acizilor grași, prin cromatografie în strat subțire , gaz cromatografie sau cromatografie de lichide de înaltă presiune. Sfingomielinele plasmatică, la rândul lor pot fi fracționate în sfingomieline esterificate preponderent cu acid palmitic și cu acizi grași cu catenă lungă (mai mare de C₂₀).

Dificultăți considerabile există în ce privește fracționarea acilglicerolilor. Parțial acilgliceroli (mono- și di-acilgliceroli) izomerizează pe suport. Trigliceridele sunt mai stabile dar cuprind o varietate de izomeri, separarea devenind foarte dificilă. Poate fi realizată numai prin cromatografie de lichide de înaltă presiune (HPLC). Mono și diacilgliceroli pot fi separați de triacilgliceroli prin cromatografie în strat subțire, pe suport impregnat cu ioni de argint, prin HPLC sau GLC (cu procedee laborioase de derivatizare).

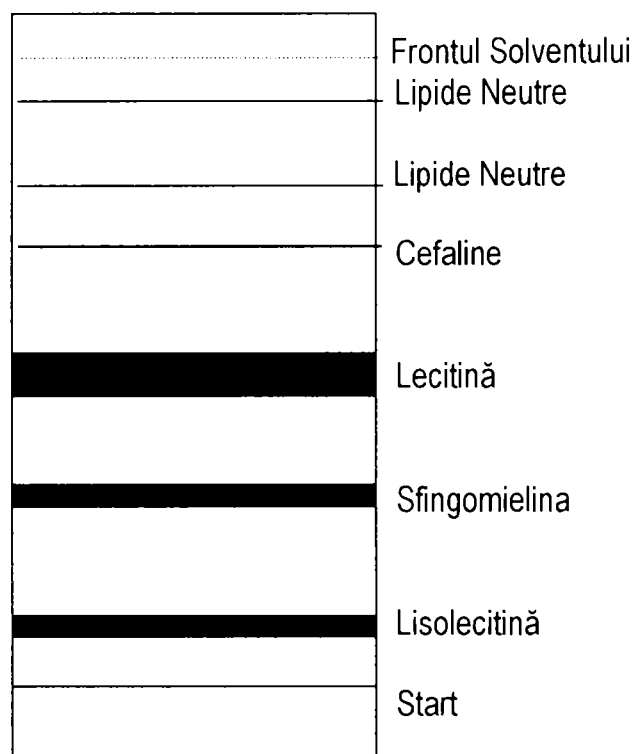


Fig. 2-9.
Fraționarea fosfolipidelor plasmatice (prezentare schematică).

Separarea acizilor grași se poate realiza în toată complexitatea lor prin tehnici gaz și lichid cromatografice. Procedeele analitice primare cuprind etape de extracție, derivatizare, separare propriu zisă, identificare. Primele două etape au fost supuse unor ample procese de înnoire, reformulare, funcție de acumulările tehnice din anii din urmă. Separarea și identificarea a făcut progrese considerabile, la acest moment în primul rând datorită perfecționărilor aduse coloanelor de separare (capilare, cu suport legat, film reactiv, etc.) dar și apariției tehnicilor hibride (gaz cromatografie-spectrometrie de masă, lichid cromatografie de înaltă presiune-spectrofotometrie în infraroșu). Tehnicile de prelucrare computerizată a semnalului analitic și-au adus la rândul lor aportul la simplificarea proceselor, creșterea reproductibilității și a preciziei determinărilor. Se poate acum vorbi de o metodologie eficientă, rapidă și precisă, ce permite luarea deciziilor în timp real.

Metodele de separare a acizilor biliari pot cuprinde cromatografia în strat subțire, gaz cromatografia și cromatografia de lichide de înaltă presiune. Dozarea acizilor biliari constituie un domeniu de viitor, datorită implicațiilor biomedicale ale acestora.

Redăm schematic în figura 2-10. separarea unui amestec plasmatic de acizi biliari conjugați. Sistem de eluție butanol/acid acetic/apă, 10/1/1, detecție cu acid fosfomolibdenic.

2.1.4.1. DETERMINAREA LIPIDELOR TOTALE

Majoritatea claselor lipidice pot fi cuantificate fără separarea prealabilă, pe baza caracteristicilor unor constituenți sau a proprietăților specifice. Dacă determinarea cantitativă este precedată de proceduri preparative specifice, sensibilitatea testelor poate fi crescută. Determinările directe pe plasmă fără o extracție anterioară pot fi afectate de erori. Determinările efectuate pe țesuturi presupun manevre analitice ceva mai complicate menite să elimine constituenți care pot interfera sau care nu prezintă interes.

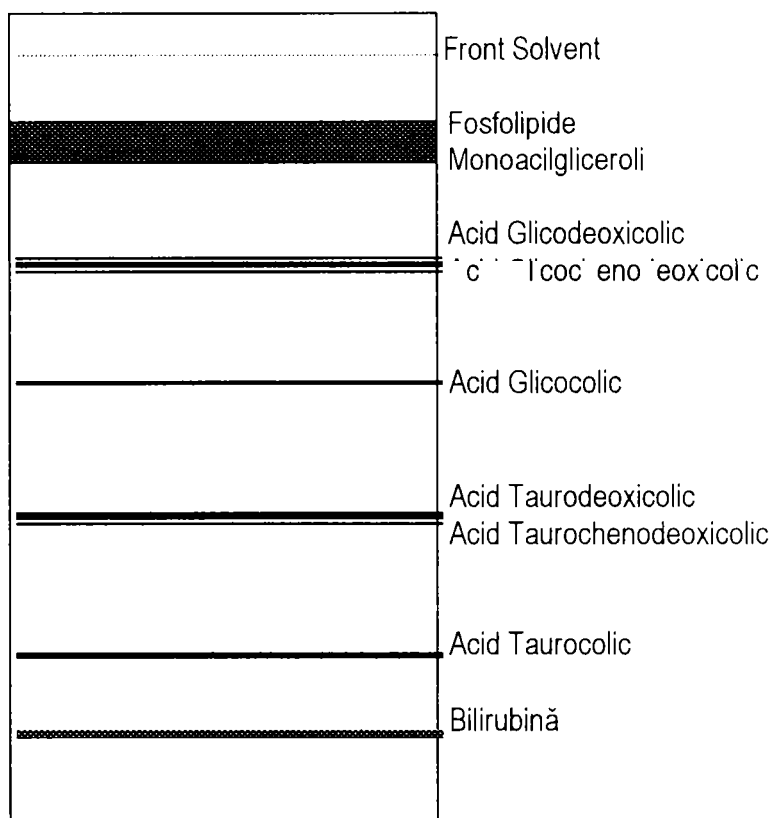


Fig. 2-10.

Separarea unui amestec de acizi biliari plasmatici, conjugați (prezentare schematică).

Indiferent de materialul biologic primar prelevat tehnicile de determinare sunt aceleași, cu modificări neesențiale. Poate diferi modul de raportare al rezultatelor, funcție de zona de interes și specificul determinărilor.

Dozarea lipidelor totale extrase din plasmă sau țesuturi se realizează rapid și eficient prin metode gravimetrice sau spectrofotometrice. Aceste metode s-au dovedit superioare altor procedee ca de exemplu oxidarea cu bicromat de potasiu propusă de Bloor (1914;1928), (în primul rând pentru faptul că proba rămâne relativ nealterată, utilizabilă pentru o eventuală procesare ulterioară, apoi nu sunt consumatoare de timp.

Metoda gravimetrică, constă în evaporarea solventului, „uscarea” și cântărirea unei probe alicote (de regulă 100 μ l) din extractul lipidic total purificat. Un studiu cuprinzător al acestei metode a fost dezvoltat de Sperry (1955). Metoda spetrofotometrică are la bază reacția de culoare a sulfofosfovanilinei cu dublele legături din structura lipoizilor plasmatici. Produsul de reacție, roz, este titrabil spectrofotometric la 530 nm. Metoda a fost introdusă și dezvoltată de Zöllner și Kirsch în 1962. Deoarece în această reacție diferitele lipide prezintă coeficienți de extincție diferiți, calibrarea prin raportare la procedeul gravimetric, este absolut necesară. Metoda este aplicabilă și direct pentru probele de plasmă, fără extracție.

Turbiditatea ce apare după adăugarea unei soluții de acid sulfuric diluat la un extract lipidic în dioxan permite determinarea lipidelor totale în probe foarte mici de ser, procedeul este cunoscut ca metoda Searcy (1963).

2.1.4.2. DETERMINAREA ACILGLICEROLILOR

Acilgliceroli sunt esteri ai glicerolului cu acizi grași. Ei constituie ponderea majoritară a grăsimilor de rezervă din organism. În cea mai mare parte se constituie din triesteri sau triacilgliceroli (trigliceride).

Monoacilglicerolii (monogliceridele) și diacilglicerolii (digliceridele) sunt intermediari de sinteză sau de degradare metabolică, fiind prezenți în urme. Acizii grași din acilgliceroli sunt liniari, cu un număr par de atomi de carbon. Acizii grași saturați au o catenă cuprinsă între 4 și 26 de atomi de carbon. Acizii inferiori se întâlnesc în grăsimea din lapte. În grăsimile de depozit, în acilglicerolii organelor și plasmei sanguine, acizii grași ce esterifică grupările hidroxil alcoolice au mai mult de 10 atomi de carbon. Principali acizi grași saturați sunt: acidul lauric (C₁₂), miristic (C₁₄), palmitic (C₁₆), stearic (C₁₈), arahidic (C₂₀), behenic (C₂₂) și lignoceric (C₂₄). Acizii grași nesaturați conțin una sau mai multe duble legături intramoleculare. Cei mai importanți acizi grași nesaturați cu rol fiziologic sunt: acidul palmitoleic (C_{16:1,Δ₉}), oleic (C_{18:1,Δ₉}), linoleic (C_{18:2,Δ_{9,12}}), linolenic (C_{18:3,Δ_{3,7,11}}), gadolenic (20:1,Δ₉), arachidonic (20:4,Δ_{5,8,11,14}), docosaheptaenoic (22:7, Δ_{4,7,10,13,16,19}), nervonic (24:1, Δ₁₅). Configurația acizilor grași nesaturați, fiziologic activi, este totdeauna *cis*. Înainte de 1950, acilgliceroli (sau în termeni uzuali în chimia clinică, trigliceridele) se estimau prin metoda substractivă, altfel spus:

Trigliceridele = Lipide totale – (Colesterol liber + Colesterol esterificat + Fosfolipide)

Pentru rezultate satisfăcătoare era esențial eliminarea substanțelor non-lipidice, ce puteau aduce un aport, alterând determinarea.

2.1.4.2.1. METODE CHIMICE

Metoda indirectă a fost înlocuită de procedee specifice de determinare a acilglicerolilor, care impuneau însă izolarea fracției sau măsurarea unui component specific. O metodă de izolare a acilglicerolilor plasmatici, globală, de eluție utilizând *Florisilul* a fost descrisă de Michaels (1962). Frația acilglicerolică, care în plus de triacilgliceroli (trigliceride) conține diacilgliceroli și majoritar monoacilgliceroli este cantitată ulterior spectrofotometric sub formă de hidroxamat feric.

O metodă cu o bună specificitate, utilizează cromatografia în strat subțire pentru izolarea selectivă a acilglicerolilor și cantitarea prin spectroscopie în infraroșu a fost propusă de Krell și Hashim, 1963. Determinarea cantitativă a triacilglicerolilor plasmatici prin mărirea spotului, măsurat după separarea prin cromatografie în strat subțire a fost descrisă de Schlierf și Wood în 1965. Componentul structural de bază al clasei acilglicerolilor este glicerolul, alcoolul trihidroxilic derivat de la propan. Metode de determinare a acilglicerolilor, ce au la bază dozarea cantității de glicerol eliberată în urma hidrolizei alcaline au fost descrise: de van Handel și Zilvermit (1957); Carlson și Wadström (1956); Randrup, (1960); Blankenhorn (1961). În aceste reacții, primul pas constă în extracția acilglicerolilor și eliminarea substanțelor ce pot interfera. Extracția se realizează cu solvenți de tipul metanol, etanol, izopropanol sau cloroform. Acești solvenți produc denaturarea proteinelor, disocierea acilglicerolilor din lipoproteine, în momentul extracției gliceridelor.

Substanțele ce interferă sunt eliminate prin:

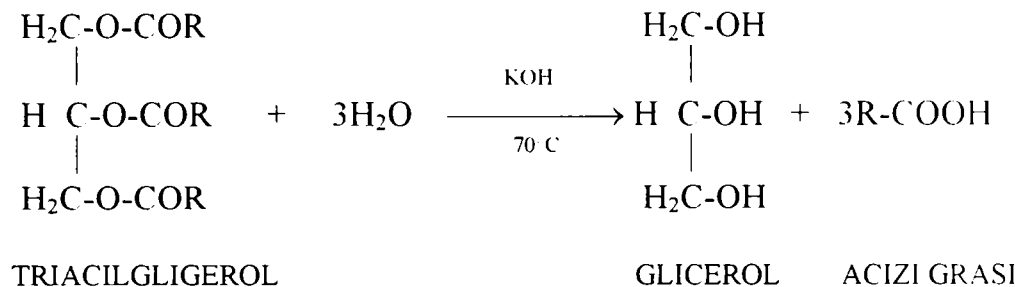
1. Partiția în solvent (nonan sau hexan)
2. Absorbant de tipul: zeoliți, acid silicic, florisil.

Principalele substanțe ce pot interfera sunt: fosfolipidele, glucoza, unii cromogeni și uneori glicerolul liber.

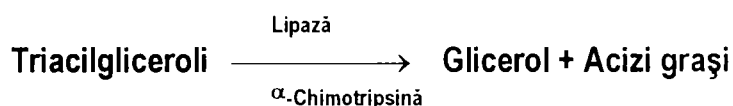
Al doilea pas în aceste proceduri este clivarea acilglicerolilor la glicerol și acizi grași, uzual cu:

- A. Hidroxid de potasiu în etanol, la temperatură relativ ridicată.
- B. Acilglicerolii serici pot fi hidrolizați și determinați cantitativ enzimatic. Lipazele hidrolizează triacilglicerolii numai în cazul în care substratul este prezent în stare

emulsionată. Desnuelle și Sarda în 1958 au demonstrat că activitatea lipazei este proporțională cu suprafața particulelor emulsionate.

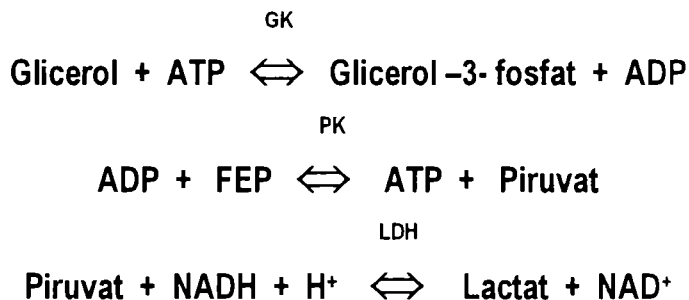


Triacilglicerolii serici sunt prezenți ca o quasi-soluție în care sunt legați de albumină; în consecință, nu s-a observat o clivare semnificativă atunci când s-a utilizat lipază pancreatică. Schmidt și Stork în 1970, au observat o hidroliză cantitativă a triacilglicerolilor serici când au utilizat lipaza extrasă din *Rhizopus arrhizus*. Bucolo și David (1972).



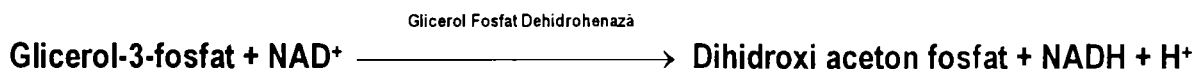
Al treilea pas cuprinde fie :

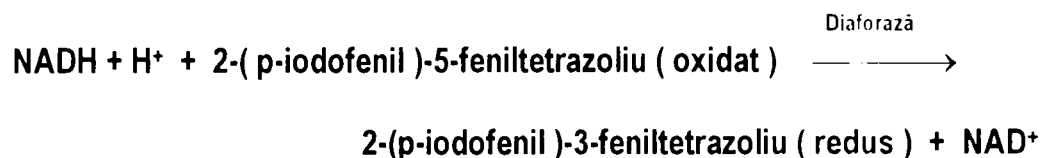
- A. Conversia enzimatică a glicerolului la glicerol-3-fosfat și ADP cu ATP și glicerokinază, GK (ATP:glicerol 3-fosfotransferază, E.C.2.7.1.30.). ADP reacționează cu fosfoenolpiruvatul (FEP) în prezența piruvatkinazei, PK (ATP:piruvat 2-O-fosfotransferază, E.C.2.7.1.40) formând piruvat, care este redus de NADH la lactat în prezența Lactatdehidrogenazei, LDH (L-lactat: NAD oxidoreductază, E.C. 1.1.1.27).



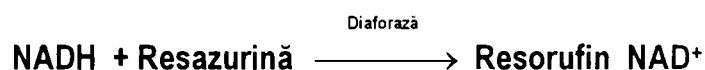
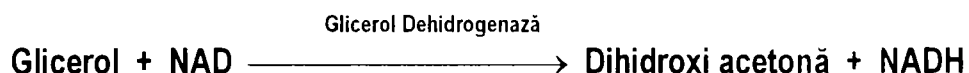
Glicerolul liber (determinat direct) este scăzut din glicerolul total măsurat după hidroliza alcalină a serului sau plasmei. Diferența corespunde glicerolului, triacilgliceridic (mol/mol). Mono și di- acilgliceroli sunt prezenți în plasmă în urme. Este măsurată scăderea densității optice la 334, 340 sau 365 nm., semnal corespunzător oxidării NADH, Eggstein și colab. (1971). Rietz și Guibault în 1977, au modificat procedeul în sensul măsurării fluorimetrice. Diminuarea fluorescenței NADH, determinată la 460 nm, după excitare la 355 nm, este proporțională cu concentrația glicerolului.

Metoda Megraw (1979), utilizează aceleași etape de obținere a glicerofosfatului, dar punctul final este evidențiat prin formarea formazanului, un compus intens colorat cu absorbție netă în domeniul 500-550 nm.





Glicerol fosfatdehidrogenază: L-Glicerol-3-fosfat NAD oxidoreductază, E.C.1.1.1.8.,
 Diaforază : Lipoamidehidrogenază, NADH₂ : lipoamid oxidoreductază, E.C.1.4.6.3.
 Metoda Winartasaputra, din 1980, utilizează Glicerol dehidrogenaza : D-Glicerol : NAD
 oxido-reductază, E.C. 1.1.1.6. și Diaforază:Lipoamidehidrogenază, NADH₂ : lipoamid
 oxidoreductază, E.C.1.4.6.3.



Fluorescența este măsurată la 580 nm după excitare la 548 nm.

Oxidarea glicerolului format la aldehydă formică, uzual această reacție este :



B. O alternativă la acest pas este reacția de alcoxi transesterificare, cu formare de glicerol și acizi grași, descrisă de Soloni (1971).

În pasul 4, formaldehida formată este determinată cantitativ prin diferite metode :

1. **Reacția Eegriwe** : formaldehida reacționează cu amestecul acid cromotropic-acid sulfuric, produsul de reacție este fotometrat la 570 nm.
2. **Reacția Schryver** : formaldehida reacționează cantitativ cu fenil-hidrazină hidroclorică - fericianură - HCl, determinarea se face la 540 nm.
3. **Reacția Pay** : un mediu de reacție conținând 3- metil-benzotiozolin-2-onă și clorură ferică, formează un produs de reacție ce absoarbe la 620 nm.
4. **Reacția Hantzsch** : formaldehida reacționează cu acetatul de amoniu și acetilacetona, punctul final al reacției este determinat spectrofotometric sau fluorimetric.

Dintre reacțiile de mai sus pentru determinarea glicerolului, reacția de condensare Hantzsch, este metoda non-enzimatică cea mai utilizată în chimia clinică.

În reacția de condensare Hantzsch are loc procesul :



Produsul galben format poate fi determinat spectrofotometric la 412 nm. sau fluorimetric (excitație primară 400 nm), măsurare la 400 nm.

Sumând determinarea chimică a acilglicerolilor cuprinde 4 etape :

1. Extracția acilglicerolilor, eliminarea substanțelor ce pot interfera.
2. Saponificarea acilglicerolilor la glicerol și acizi grași.
3. Oxidarea glicerolului la formaldehydă
4. Determinarea cantitativă a formalhidei.

Analiza cantitativă a triacilglicerolilor serici sau plasmatici după cum am văzut este un proces în două etape : hidroliza triglicerolilor, urmată de determinarea enzimatică sau chimică a glicerolului format. Glicerolul determinat nu aparține integral triacilgliceridelor ce are un aport datorat glicerolului liber. Din punct de vedere analitic, acest glicerol liber impune două procedee incomode: efectuarea a două determinări , una înainte și alta ulterioară hidrolizei sau separarea celor doi constituenți serici prin extracție, partiție în solvent sau extracție în fază solidă. O altă modalitate de a ține cont de glicerolul liber este de a corecta valoarea glicerolului total printr-un calcul simplu. În acord cu Eggstein.1966; o corecție acceptabilă în ecuația triacilglicerolilor este :

$$\text{Triacilgliceroli (mmol/litru)} = 0.088 + (0.828 \times \text{glicerol total mmol/l})$$

Experimental, s-a găsit că variația **glicerolului liber** se află în domeniul 0.07 mmol/litru când glicerolul total este cuprins între 0.0–0.5 mmol/litru și 0.13 mmol/litru, când valoarea acestuia din urmă aparține domeniului 5.5–6.0 mmol/litru. Mourad în 1973, evaluează valoarea medie a concentrației glicerolului liber la 0.11 mmol/litru. Stinshoff, în 1977, utilizând o distribuție logaritmică-normală, găsește pentru glicerolul liber o valoare medie de 0.12 mmol/litru, situată într-un domeniu 0.04-0.37 mmol/litru. Ei recomandă utilizarea unui factor de corecție pentru glicerolul liber :

$$\text{Glicerol liber} = (0.98 \times \text{glicerol total}) - 0.07 \text{ (mmol/litru)}$$

Care trebuie scăzut din glicerolul total pentru estimarea valori triacilglicerolilor. Studiile inițiate de Naito și David în 1984, au demonstrat existența unui nivel variabil al glicerolului liber, exprimat în special la subiecți supuși unui stres individual, de exemplu : pacienți în stare critică, pacienți cu afecțiuni ale ficatului sau rinichilor, subiecți diabetici. De remarcă, inexistența unei corelații dintre nivelul triacilgliceroli și glicerolul liber (ca procent din total), în cazul grupelor , normal ($r=0.56$), diabetici ($r = 0.62$), renali ($r = 0.60$), hepatici ($r = 0.66$).

Analizând sumar metabolismul triacilglicerolilor, apare evidentă modificarea nivelului glicerolului liber în anumite ocazii. Glicerolul provine primar, din țesutul adipos ca urmare a procesului de lipoliză a triacilglicerolilor de rezervă. Triacilglicerol lipaza, enzima ce reglează rata, scindării triacilglicerolilor în acizi grași liberi (FFA- Free Fatty Acids) și glicerol este sensibilă la intervenția factorilor hormonal. Hormoni de tipul epinefrinei, glicagonului, tiroxinei și hormonul de creștere (somatotropină) potențează activitatea acestei enzime, care va avea ca efect imediat creșterea concentrației acizilor grași și glicerolului sanguin. Este deci evident că în anumite situații de stress concentrația sanguină a glicerolului liber să prezinte valori ridicate. Cele prezentate reprezintă cazurile tipice :

1. Stări de stress (efect epinefrinic).
2. Perfuzii cu soluții conținând manitol.
3. Pacienți aflați sub tratament cu nitroglicerină.
4. Recipienți de recoltare filmați cu glicerol.
5. Unele afecțiuni hepatice.
6. Pacienți hemodializați.

În aceste cazuri pentru determinarea cu acuratețe a nivelului triacilglicerolilor se impune o dozare prealabilă a glicerolului liber.

2.1.4.3. DETERMINAREA STERIDELOR

2.1.4.3.1. DETERMINAREA COLESTEROLULUI LIBER ȘI ESTERIFICAT

Colesterolul, constituent esențial al lipidelor din organismului uman, prezent în membranele celulare ale tuturor țesuturilor și un cap de serie de biosinteză pentru hormonii organelor sexuale și adrenale. Colesterolul are o concentrație relativ ridicată în sânge, unde apare predominant esterificat cu acizi grași. Este eliminat de către ficat, majoritar sub formă de acizi biliari.

Determinarea colesterolului este de importantă pentru diagnosticul clinic, valori ridicate constituind factorul de risc pentru ateroscleroză și infarct miocardic.

Colesterolul liber și esterificat este prezent în majoritatea materialelor biologice.

Dozarea colesterolului a devenit "obsesia" secolului și nu totdeauna fără un suport real. Timpurile moderne, fac din acest compus un izvor al tuturor maladiilor generate de stress.

2.1.4.3.1.1. METODE CHIMICE

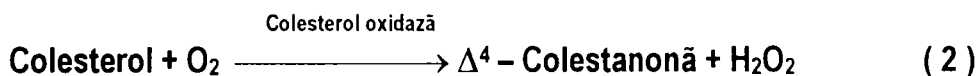
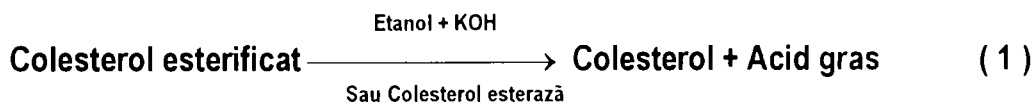
Determinarea cantitativă a colesterolului este bazată pe reacții de culoare, care deși nu sunt absolut specifice, sunt suficiente, colesterolul fiind sterolul predominant în majoritatea materialelor. Reacțiile de culoare includ : reacția Liebermann-Burchard cu acid sulfuric și anhidridă acetică, reacția Ciugaev cu clorură de zinc și clorură de acetil în acid acetic sau reacția Lifschütz cu clorură ferică în acid acetic și acid sulfuric. La aceste reacții participă atât colesterolul liber cât și cel esterificat. Metodele de determinare a colesterolului utilizate frecvent sunt: Schoenheimer-Sperry (1934); Sperry-Webb (1950); Zak și colaboratorii (1954); Zlatkis și colaboratorii (1953). Revizuirea acestor metode a fost făcută de Vanzetti în 1964. Datorită sensibilități ridicate metodele utilizând clorura ferică sunt recomandate. Acest reactiv permite determinarea cantităților de colesterol de ordinul nanogramelor în micrograme de țesuturi sau microlitri de ser, Glick și colab. (1964). Sulfatul feric poate fi substituit clorurii ferice.

Colesterolul liber este determinat după precipitare cu digitonină. Diferența dintre colesterolul total și cel liber corespunde fracției esterificate. Pentru estimarea esterilor colesterolului valoarea pentru esterul colesterolului este multiplicată cu factorul 1.67, derivat din greutatea moleculară medie a esterilor colesterolului cu acizi grași.

2.1.4.3.1.2. METODE ENZIMATICE

Metodele enzimatică, elimină riscul utilizării unor reactivi agresivi, simplifică procedeele analitice, cresc sensibilitatea și specificitatea. Analiza enzimatică este tehnica exclusiv utilizată în proiectarea și realizare analizoarelor automate de laborator. Metodele enzimatică utilizează colesterol oxigen oxidoreductaza, E.C.1.1.3.7. (colesterol oxidaza) extrasă din *Nocardia erythropolis*, eliminând necesitatea unui standard, concentrația colesterolului fiind calculată direct utilizând coeficientul molar de extincție al Δ^4 – colestanoinei (5 α -colestano-3-onă).

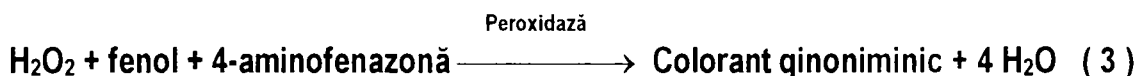
Principiul metodei enzimatică a fost descris de P. Röschlau în 1974, constă într-o reacție în două trepte (reacții cuplate) :



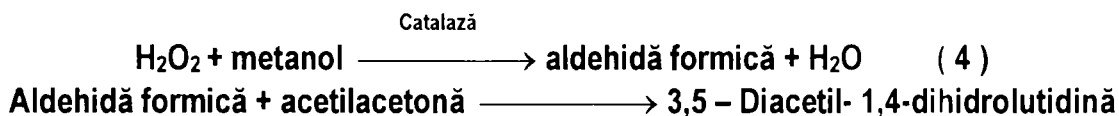
Colesterol esterază : Sterol-ester hidrolază E.C.3.1.1.13

Colesterolul esterificat este scindat în colesterol și acid gras, fie în prezența unei soluții KOH 33% în etanol, fie cu Colesterol esterază. Este posibil în acest mod determinarea colesterolului liber, colesterolului esterificat și colesterolului total (atunci când se utilizează procedeul cu colesterol esterază). Detectarea punctului final al reacției cunoaște câteva variante interesante din punct de vedere analitic, importante și notabile în primul rând pentru că au dus la progrese esențiale în automatizarea tehnicilor de investigație în laboratorul clinic:

- a. Formarea colestononei (5α -coleston-3-onă), este determinată spectrofotometric prin creșterea extincției la 240 nm., proporțională cu colesterolul prezent.
- b. Kumar și Christian în 1977 au utilizat acest pas în determinarea concentrației colesterolului măsurând amperometric rata scăderii oxigenului din sistem. Tehnica a stat la baza realizării de către firma Beckman Instruments (Palo Alto, CA, U.S.A.) a primului analizor automat comercial de colesterol, Cholesterol Analyser-II.
- c. Cuplarea reacției (2) cu un proces chimic din care să rezulte un produs colorat, proporțional cu unul din reactanți, constituie baza unor tehnici de dozare spectrofotometrice cu aplicabilitate în chimia clinică.



Sau



Reacția 3, introdusă de Trinder în 1969, în care se formează un colorant qinoniminic, este baza celor mai multe produse comerciale actuale pentru determinarea enzimatică a colesterolului.

Reacția 4, are avantajul de a fi eliberată de interferențele bilirubinei, a fost introdusă de Pesce și Bodourian în 1976.

Există o gamă largă de substanțe ce pot interfera în analiza colesterolului. Acestea pot fi : constituenți serici (datorați unei stări fiziologic anormale sau ingerați de individ) sau impurități ale reactivilor.

Pentru metodele folosind reactivi de tip Liebermann-Burchard, interferențele pot fi generate chiar de apă, bilirubină sau hemoglobină în concentrații relativ crescute, rezultând densități optice adiționale la cele date de colesterol și colesterolul esterificat, similar poate reacționa acidul glioxilic prezent ca impuritate a acidului acetic. Metodele bazate pe utilizarea ionilor de fier, sunt susceptibile aceluiași interferențe ca cele enunțate. la care se mai adaugă câteva ca de exemplu azida sau bromura de sodiu, în unele cazuri densitățile optice la anumite lungimi de undă nu sunt perfect diferențiate. O excelentă trecere în revistă a

interferențelor diferitelor substanțe medicamentoase a fost alcătuită de American Association of Clinical Chemists.

În procedeele enzimaticе interferenți majori sunt : bilirubina, hemoliza (chiar și aparent scăzută), lipemia și acidul ascorbic. Literatura de specialitate, listează un număr relativ ridicat de interferenți și modalitățile eliminării acestora.

Bilirubina este interferentul major în determinarea colesterolului. Bilirubina prezentă în matricea de reacție, reacționează cu reactivul Liebermann-Burchard sau cu reactivi ferici, fiind oxidată la forma stabilă, biliverdină. Absorbanta biliverdinei este mai mare decât a compusului format de colesterol, astfel apare o interferență pozitivă, datorată concentrației ridicate de bilirubină. Interferența este mai ridicată în cazul reacției Liebermann-Burchard decât în reacția cu ioni ferici. Minimalizarea interferenței este posibilă printr-un procedeu de purificare anterior reacției sau prin alegerea unei lungimi de undă optime.

Tot bilirubina interferă și reacțiile enzimaticе acționând ca un substrat competitiv, distrugând peroxidul format din reacția catalizată de colesterol oxidază, în acest caz interferența este negativă, concentrația colesterolului fiind mai mică decât cea reală.

2.1.4.3.1.3. METODE GAZ CROMATOGRAFICE

Cromatografia în fază gazoasă și în faza lichidă sunt două tehnici de separare și dozare ce au câștigat teren în chimia clinică datorită eficienței deosebite, eliminării aproape integrale a factorilor interferențiali, perfecționării mijloacelor de detecție și nu în ultimul rând datorită timpului de răspuns foarte scurt. Cele două tehnici de separare și dozare își au încă aplicabilitatea în domeniul cercetării bio-medicale și mai puțin în determinările curente, unde metodele chimice și enzimaticе sunt încă preferate. Steridele reprezintă o clasă de substanțe cu o foarte mare răspândire în regnul vegetal și animal. Din punct de vedere chimic, steridele posedă un nucleu de 1,2-ciclopentan perhidrofenantren (steran). Steridele se clasifică în funcție de natura substituenților și de gradul de nesaturare a nucleului tetraciclic. O clasă de importanță fiziologică de steride este formată din steroli și acizi biliari care au comun o grupare hidroxil în poziția 3 a nucleului steranic. Analiza directă, prin cromatografie de gaze din matrice complexă este dificilă din cauza grupelor polare hidroxilice, carbonilice și carboxilice. Derivatizarea acestor compuși s-a dovedit a fi esențială în scopul creșterii volatilității, reducerii polarității și micșorării tendinței de descompunere pe centri activi ai circuitului cromatografic. Obținerea coloanelor capilare cu suprafață inertă, sinteza de faze staționare lichide cu rezistență termică ridicată (faze staționare carbonice din seria Dexsil) și tehnicile de introducere a probei în stare lichidă direct în coloana capilară au permis separarea sterolilor chiar și fără derivatizarea grupărilor polare. Cu toate perfecționările aduse coloanelor capilare, separarea sterolilor prin cromatografie de gaze, derivatizarea continuă să ocupe un loc important.

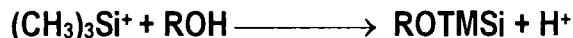
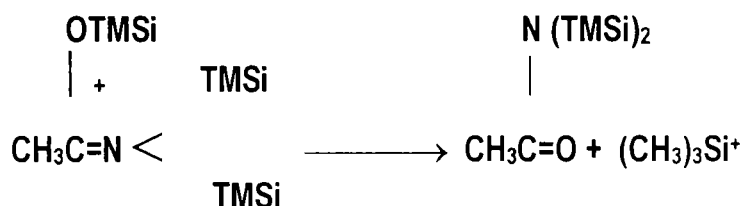
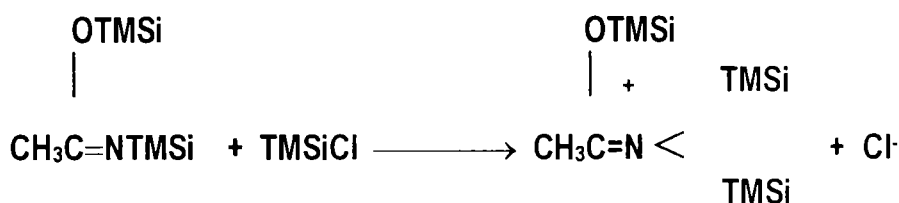
Derivatizarea sterolilor se poate realiza prin sililare, acilare sau alchilare, fiecare metodă fiind marcată de avantaje și dezavantaje.

Sililarea este metoda cu cea mai mare aplicabilitate la derivatizarea sterolilor și acizilor biliari. Derivații trimetilsililici se pot obține pentru grupele hidroxil și carboxil, și numai în condiții speciale pentru grupa carbonil. Uzual, sililarea este practică pentru gruparea hidroxil, iar pentru gruparea carboxil și carbonil se apelează la alte metode de derivatizare. Cei mai utilizați agenți de sililare sunt hexametildisilazan+trimetilclorosilan, bis (trimetilsilil) trifluoracetamidă+trimetilsililimidazol, trimetilsililimidazol, tetrametilsilazan +dimetilmonoclorosilan.

În condiții absolut generale procesul decurge conform reacției de mai jos :



Sterolii cu două sau trei grupe hidroxil pot forma prin sililare produși parțial trimetilsililați. Acest proces ce va genera peak-uri multiple poate fi evitat în cazul în care lucrează la temperaturi de reacție cuprinse între 60-149°C, la timp de reacție relativ lungi (20-80 ore) cu agenți silizanti energici de tipul trimetilsilimidazolului sau în prezența catalizatorului trimetilclorosilan. În condițiile de reacție date grupele hidroxil cu împiedicare sterică sterolici sunt total silanizați. Reacția a fost descrisă de către Horning în 1967 și chimismul ei deși încă incert poate fi descris:



Steroli care conțin o grupare carbonil ne protejată pot forma mai mulți produși de sililare din cauza echilibrul ceto-enolic care se stabilește în mediul de reacție. Echilibrul ceto-enolic se deplasează spre forma enolică în prezența unor catalizatori acizi de tipul trimetilclorosilanului. Derivații enolici trimetilsililați sunt sensibili la umiditate, au o stabilitate termică relativ scăzută. În afară de derivații trimetilsililici, steroli pot fi transformați atunci când se urmărește îmbunătățirea separării și identificarea prin spectrometrie de masă, în combinații alchil dimetilsililate.

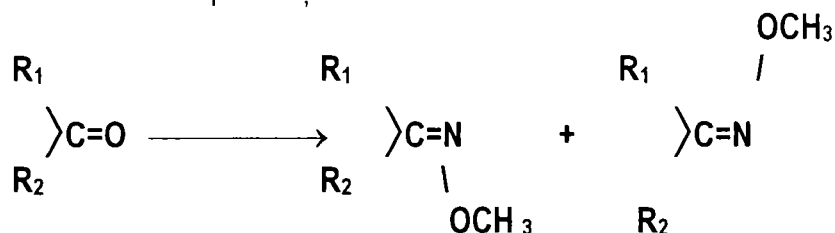
În cazul în care cromatograful este echipat cu un detector cu captură de electroni, este preferabil transformarea hidroxilului sterolic în grupare eterică (eteri halogenometil dimetilsililici). Acilarea steridelor se face pentru reducerea polarității grupei hidroxil. În cele mai multe cazuri, acilarea se realizează cu anhidride acide halogenate. Acilarea este utilă în cazul optimizării, creșterii sensibilității detectorului cu captură de electroni. Acilarea steridelor se face pentru reducerea polarității grupei hidroxil. În cele mai multe cazuri, acilarea se realizează cu anhidride acide halogenate. Studiind influența naturii și numărului de halogeni din anhidrida acetică asupra răspunsului detectorului cu captură de electroni, s-a constatat o scădere a răspunsului acestui detector în seria derivaților :

monoclor > diclor > monobrom > triclor > trifluor.

Acilarea grupelor hidroxil, sterolice se poate realiza cu cloruri acide și cloruri acide fluorurate. În cazul în care se supun acilării, steroli ce conțin în moleculă și o grupare carbonil, este posibilă formarea unui derivat enolic acilat. Separarea în acest caz devine dificilă, datorită izomerilor posibili. O posibilitate de transformare a grupărilor hidroxil sterolice este metilarea

în prezența : hidroxidului de tetrametilamoniu sau ioduri de metil în mediu de reacție fiind prezent carbanionul de metilsulfonil.

După cum s-a menționat, în multe cazuri este indicată protejarea grupării carbonil, anterior derivatizării grupelor hidroxil, scopul fiind eliminarea produșilor secundari de reacție ce pot face dificil procesul de separare și interpretare cromatografică. Uzual, gruparea carbonil poate fi transformată într-o oximă, prin reacția cu hidroxilamina, metoxilamina sau alte O-alchilhidroxilamine. Oximele astfel formate există în două forme izomere *sin* și *anti*, separabile prin cromatografia de gaze. Reacția de metoxilare a fost descrisă pentru prima dată de Fales și Luukkainen în 1965. Uzual, reacția are loc în piridină uscată iar amestecul este injectat direct în cromatograf. Împiedicarea sterică favorizează formarea unui singur izomer. O gruparea polară care poate cauza probleme în procesul de separare este gruparea carboxil (prezentă în acizi biliari), în acest caz, o soluție, este transformarea ei în grupare ester metilic în prezența diazometanului.



Tehnica de derivatizare este funcție de doi factori :

1. Polaritate fazei staționare și tipul coloanei disponibile.
2. Gradul de separare (rezoluția) necesară.

Separarea cu fază ne selectivă este dependentă în principal de mărimea și geometria moleculei decât de prezența grupelor funcționale specifice. Din acest punct de vedere separarea pe o fază non-selectivă poate fi asimilată cu o distilarea fracționată.

2.1.4.3.2. DETERMINAREA UNOR DERIVAȚI STERIDICI : ACIZI BILIARI

Bila hepatică este un lichid de culoare galben-oranj, iar bila veziculară – brun închis sau brun-verzui; greutatea specifică a bilei este de 0.990–1.008 și tensiunea superficială de 39.6–44.0 dyn cm⁻¹. Pe lângă substanțele anorganice și organice bila hepatică și bila veziculară conțin cantități însemnate de acizi biliari și săruri ale acestora. Toți acizii biliari posedă configurații de tip *cis* a inelelor A:B și grupări hidroxil în poziția α. Catena lor laterală este frecvent alcătuită din cinci atomi de carbon și se termină cu o grupare carboxil. Acizii biliari cei mai importanți pentru vertebrele superioare și pentru om sunt : acidul colic, acidul chenodeoxicolic, deoxicolic, litocolic, care se deosebesc între ei prin poziția grupărilor hidroxil. Acidul colic și acidul chenodeoxicolic sunt acizi biliari primari, fiind sintetizați în ficat direct din colesterol, în timp ce acizii deoxicolic și litocolic sunt acizi biliari secundari sintetizați în lumenul intestinal din acizii biliari primari sub influența bacteriilor intestinale. Sărurile acizilor biliari sunt substanțe tensioactive cu un puternic efect emulsionant asupra grăsimilor; ele activează, de asemenea, lipazele, exercitând pe ambele căi o influență considerabilă asupra digestiei și absorbției lipidelor. Peste 90% din cantitatea de acizi biliari, excretată zilnic în intestin și care constituie aproximativ 20-30 g, este în cazul organismului omenesc resorbită și recirculată în *ciclul enterohepatic*.

Determinarea cantitativă a acizilor biliari liberi sau conjugați se realizează prin eliminarea matricei lipidice și separarea lor individuală. Aceasta se realizează prin tehnici cromatografice. Dacă acizii liberi dihidroxicolanici sau conjugați nu pot fi separați complet prin tehnici cromatografice pe hârtie sau strat subțire, ei pot fi diferențiați prin reacții

specifice. Următoarele proceduri pot fi utilizate cu succes pentru determinarea acizilor biliari liberi, în cazul în care dotarea tehnică a laboratorului nu cuprinde un cromatograf de gaze performant.

2.1.4.3.2.1. METODE CHIMICE

- a. Reacția **Hammarsten**, cu acid sulfuric concentrat pentru determinarea acidului colic.
- b. Reacția **Szalkowski – Mader**, cu acid sulfuric și aldehydă salicilică pentru determinarea acidului deoxicolic.
- c. Reacția **Isaksson**, cu acetat de etil, acid sulfuric concentrat și anhidridă acetică pentru determinarea acidului chenodeoxicolic.

Toate aceste reacții sunt aplicabile și acizilor biliari conjugați. Metodele cantitative având la bază aceste reacții au fost dezvoltate pentru bilă de către Frosch și Wagener în 1964 iar pentru ser de către Frosch în 1965.

Tehnicile de cromatografie pe hârtie și în strat subțire au fost perfectate de Sjövall (1953, 1959); și Gänshirt (1960).

Determinările prin cromatografia de gaze a acizilor biliari își au începuturile în lucrările lui Sanderberg din 1965. Progresele cromatografiei de gaze fac aproape imposibil de citat numărul relativ mare de cercetători care deși nu au modificat esențial tehnicile de bază, utilizând, coloane capilare și faze staționare lichide performante au scurtat timpul de separare, crescând precizia determinărilor și reducând numărul manevrelor analitice. Cu toate acestea trebuie citată o tehnică extrem de rapidă și performantă de extracție și dozare a acizilor biliari dezvoltată de Ikawa (1977) și Makino (1974). Tehnica de separare gazcromatografică a fost elaborată de Almé (1977) ; Karlagnis (1978) ; Ikawa,(1979). Aplicarea acestei metode în studiul acizilor biliari implicați în Distrofia miotonică aparține grupului condus de Tanaka în 1982. Rezultatele excelente, reproductibilitatea și rapiditatea metodei au făcut ca ea să fie utilizată cu unele modificări și în Laboratorul de gaz cromatografie al Centrului de Patologie Neuromusculară "Dr. Horia RADU", Vâlcele, pentru studierea unor modificări ale metabolismului acizilor biliari în corelație cu Distrofia Miotonică și Distrofia Musculară Progresivă Duchenne.

2.1.4.3.2.2. METODE ENZIMATICE

Acizi biliari, chenodeoxicolic, deoxicolic, colic, se regăsesc conjugați în organismul uman cu glicina și taurina. Aceste amestecuri de substanțe pot fi determinate cantitativ prin oxidarea grupării 3 α -hidroxil comună tuturor acizilor biliari, cu 3 α -Hidroksisteroid Dehidrogenază din *Pseudomonas testosteroni* (3 α -Hidroksisteroid- NAD(P) Oxidoreductază, E.C.1.1.1.50.).

Acizii 3- α hidroxicolanici sunt oxidați la 3-ceto acizi. Dacă 3-ceto acizii sunt transformați în hidrazone, reacția este cantitativă la un mol de NADH corespunzând 1 mol de acid biliar. Anterior determinării extracția acizilor biliari este strict necesară. Extracția și deproteinizarea acizilor biliari serici se poate realiza cu amestec etanol/eter etilic, 30:10 v/v. După centrifugare supernatantul conține acizii biliari. Stratul organic după uscare la sec sub presiune scăzută sau în curent de azot, este spălat cu apă și acetat de etil, pentru eliminarea lipidelor non-polare contaminante. Acizii biliari rămân în stratul apos. Faza apoasă este extrasă rapid cu o soluție 5% Iodură de tetra N-heptilamoniu. Acizii biliari se regăsesc în faza organică. Din acest punct poate fi practică fie metode enzimatică fie metoda gaz cromatografică. Pentru studii speciale separarea acizilor biliari se poate face prin

cromatografie în strat subțire iar determinarea individuală se poate face enzimatic. Oxidarea cantitativă se realizează la pH = 9.5, cu adăugarea de hidrazină pentru a cupla oxoacizii formați. Metoda de determinare este spectrofotometrică la 340, 334 sau 365 nm. Valorile normale serice sunt cuprinse în domeniul < 0.005 μmol / ml. Valorile normale în bilă sunt cuprinse în domeniul : 20 – 40 μmol/ml., după studiile efectuate de Koss și colaboratorii (1974).

2.1.4.4. DETERMINAREA FOSFOLIPIDELOR

Fosfolipidele totale se determină prin titrarea conținutului de fosfor din extractul lipidic din care s-au eliminat lipidele non-fosforilate prin procedeele de purificare. În acest scop extractele cloroform-metanolice sunt supuse unei purificări prin difuzie, tehnica Folch din 1955.

Fosforul lipidic se determină în aliquote din acest purificat după o prealabilă mineralizare. Cele mai multe tehnici de dozare a fosforului au la bază sau sunt derivate din metoda Fiske-Subbarow din 1925 care utilizează conversia ionului fosfat la fosfomolibdat, urmată de reducerea celui din urmă la albastru de molibden, compus cu structură nedefinită, dar care poate fi detectat spectrofotometric. Modificarea acestei metode a fost descrisă de Lindberg și Ernster în 1955. O metodă extrem de convenabilă a fost descrisă de Bartlett în 1959.

Fosfolipidele totale sunt calculate multiplicând valorile fosforului lipidic cu 25. Aceste valori reprezintă o aproximație bună, deși fosforul nu reprezintă exact 4% din fiecare moleculă fosfolipidică.

Fosfolipidele individual sunt determinate în mod convenabil după separarea prin cromatografie în strat subțire. După dezvoltarea cromatoplăcilor, fosfolipidele pot fi vizualizate cu vapori de iod, coloranți fluorescenți (în cazul în care cromatoplaca nu are deja înglobat un astfel de colorant), albastru de bromtimol sau observare în lumină ultravioletă. Suprafețele conținând fosfolipide se prelevează după placă. Acest material poate fi utilizat direct pentru mineralizare sau poate fi extras cu metanol (izo-propanol) pentru prelucrări ulterioare. Dezavantajele majore ale acestei tehnici sunt legate de faptul că se lucrează de regulă în duplicat și pentru separarea ulterioară a acizilor grași utilizarea unei incinte cu atmosferă inertă (azot) este absolut necesară. Estimarea valorilor de referință a suportului de migrare (silica gel) și corecția de arie sunt absolut necesare. Valorile fosfolipidelor rezultate prin separare în strat subțire sunt prezentate în tabelul 2.3 și figura 2-11.

Tabel 2.3.
Compoziția procentuală normală a fosfolipidelor plasmaticice

Autor	Metodă	Cefaline + subst. Neidentificate	Lecitină	Sfingo-mielină	Liso-lecitină
GJONE (1959)	CC	6	66	18	9
VOGEL (1962)	PC	2	66	23	9
PHILLIPS (1958)	PC	3	67	21	9
MARINETTI (1959)	PC	3	67	21	9
WAGENER (1964)	TLC	3	66	21	9

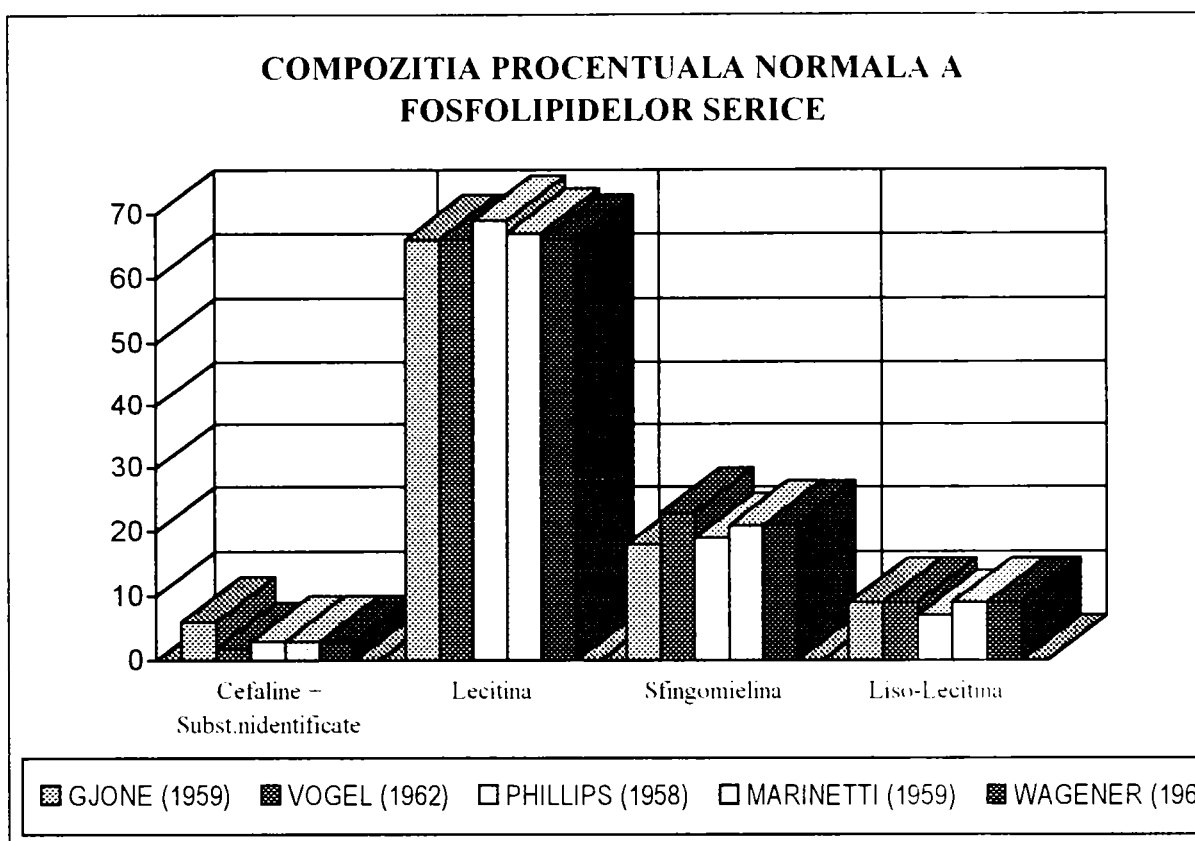


Fig.2-11.
Compoziția procentuală normală a fosfolipidelor serice.

2.1.4.5. DETERMINAREA ACIZILOR GRAȘI

Implicarea lipidelor biologic active într-o diversitate de stări patologice a impus perfecționarea unor tehnici de separare și dozare extrem de sofisticate din punct de vedere analitic, cu precauții drastice de prevenire a proceselor de autooxidare. Acizii grași nesaturați s-au dovedit a fi factori cu implicații majore în fiziologia celulei vii. Acizii grași ca unități biochimice determină.

2.1.4.5.1. ACIZI GRAȘI TOTALI

O metodă pentru dozarea acizilor grași totali, ideal trebuie să fie simplă, rapidă și cantitativă, în plus nu trebuie să genereze reacții secundare sau modificări structurale ne dorite. Metodele în care acizii grași sunt eliberați și apoi convertiți în produși separabil sau dozabili, implică mai multe etape, fiind afectate de multiple erori de manipulare, analitică, chimică, etc.

Metanoliza lipidelor este în mod normal efectuată catalitic în mediu alcalin sau acid. Au fost propuși și utilizați numeroși catalizatori ai reacției de alcooliză a grăsimilor și uleiurilor, unul dintre cei mai studiați a fost trifluorura de bor. O lucrare impresionantă prin volumul de experimente și modul extensiv de a trata această problemă a fost realizată de Morrison și Smith în 1964.

Trifluorura de bor a fost utilizată drept catalizator pentru esterificarea acizilor în forma unui complex de coordinație cu metanolul și relativ recent în mod empiric la conversia

lipidelor bacteriene (din mediile de cultură; domeniu de aplicație recent, de identificare a microorganismelor după amprenta de acizi grași) în esteri metilici. Alcoolatul trifluorurii de bor se comportă ca acizi puternici, deci este de așteptat ca ei să producă metanoliza lipidelor în mod similar cu HCl și H₂SO₄ adăugați metanolului, cu avantajul electropolarității extreme a BF₃.

Reacția de metanoliză se desfășoară într-o atmosferă protejată total, cu azot sau heliu. Metoda se pretează și a fost proiectată pentru cantități mici, extracte lipidice plasmatică, tisulare sau organite celulare. În cazul în care procesele anterioare de extracție au fost bine conduse și au fost eliminați factorii exogeni de autooxidare rezultatele ce se obțin cu acest procedeu sunt remarcabil de reproductibile. În plus studiul extrem de elaborat al celor doi autori citați permite, recomandă timpi de reacție maximali pentru diverse clase lipidice. Mediul inert azot sau heliu, temperatura de reacție 100°C. Reacția poate fi desfășurată în fiolă sau flacon de derivatizare etanșabil. Restricția sistemului de reacție este eliminarea etanolului sau propanolului din probă. A fost păstrată nomenclatura autorilor. Tehnica este extrem de sensibilă, pretabilă la prelucrarea micro probelor.

Figura 2-12, ilustrează compoziția în acizi grași totali a membranelor eritrocitare la subiecți normali, tineri (20–25 ani). Exemplele au comun utilizarea unei tehnici de metanoliză Morrison și Smith, condițiile și performanțele cromatografelor au fost oarecum comparabile. Datele au fost extrase din lucrările H.Heckers și colab ,1977; L. Alexander și colab.; 1985, I.Ionescu și colab.1995; 1994, 1989, 1990). Un studiu compozițional de mare amploare utilizând o tehnică de metanoliză Morrison și Smith, aparține lui W. Ruitenbeek din 1978.

Redăm alăturat în Tabelul 2.4. (păstrând nomenclatura autorului) câteva din concluziile sale referitoare la a compoziția în acizi grași a unor clase lipidice plasmatică la subiecți sănătoși. Tabelul 2.5., redă sintetic rezultatele obținute cu metoda citată asupra fracțiilor plasmatică.

Tabel 2.4.

Timpii de metanoliză totală a diferitelor clase lipidice.

Clasa lipidică	Timpi de reacție (minute)
Acizi grași	2
Monoacilgliceroli	10
Diacilgliceroli	10
Fosfatidiletanolamine	10
Fosfatidilserine	10
Fosfatidilcoline	10
Monofosfoinozite	10
Plasmalogeni colinici	30
Digalactozili gliceride	30
Steroli	45
Triacilgliceroli	30 – 45
Sfingomieline	90

Asupra rezultatelor compoziției lipidice și interacțiilor oxidative implicate în afecțiunile neuromusculare și unele boli autoimune se va revenii pe larg.

Rolul deosebit pe care acizii grași nesaturați îl au în păstrarea unui satatus oxidativ-proxidativ celular și implicațiile patologice vor fi analizate pe larg în referatul următor.

Metanoliza acizilor grași din lipidele biologic active în mediu alcalin, au fost oarecum puțin utilizate, nu numai în literatura de specialitate dar chiar de autori.

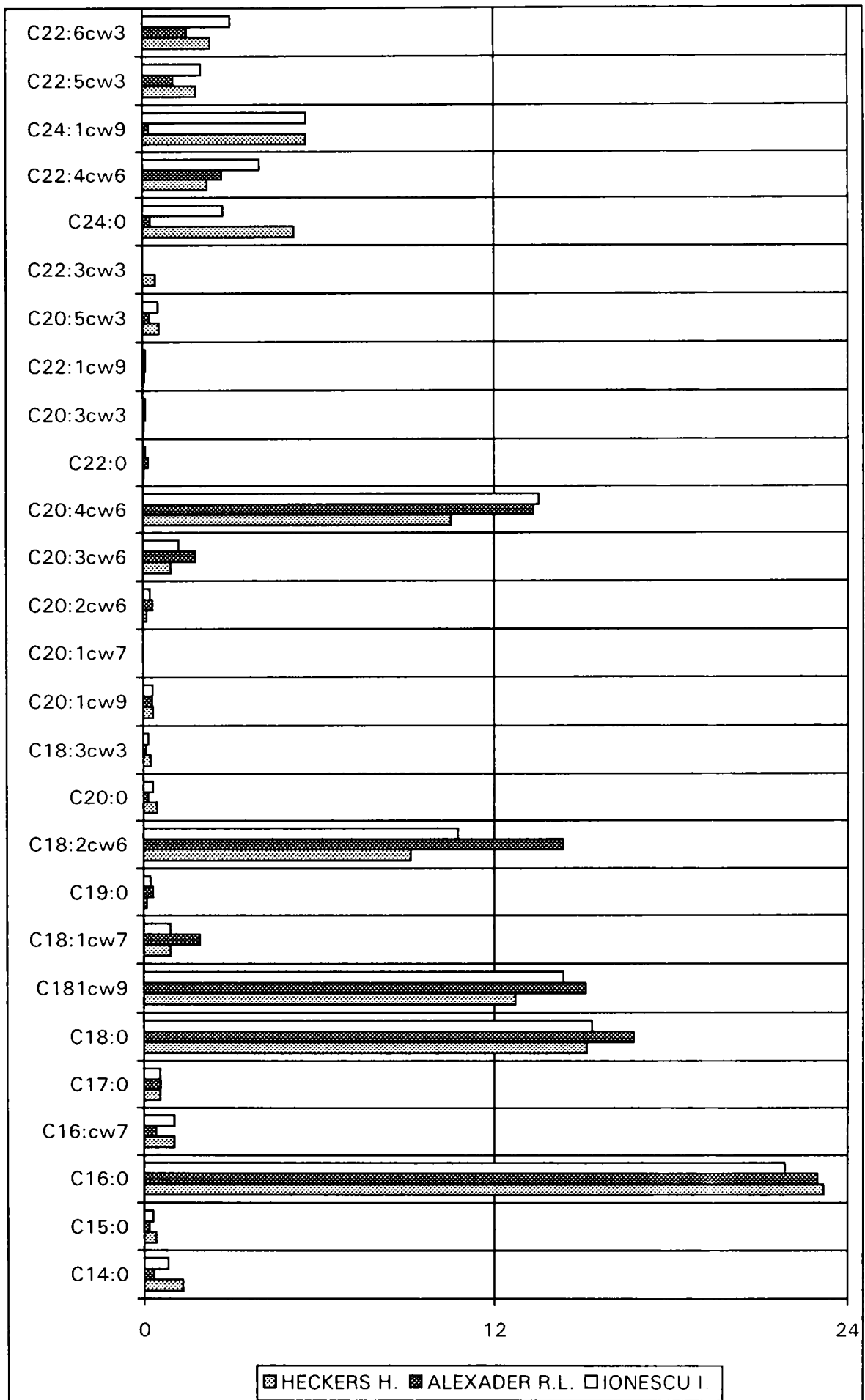


Fig.2-12.
Matricea acizilor grași totali fosfolipidici eritrocitari.

Tabel 2.5.
Compoziția în acizi grași a unor clase lipidice plasmatice la subiecți sănătoși

Acid	Fosfatidilcolină	Lisofosfatidilcolină	Sfingo- mielina	Fosfatidil Etanolamină
C14:0	1.0 ± 0.2	4.4 ± 0.4	3.3 ± 0.4	4.6 ± 1.0
C15:0	0.4 ± 0.1	1.9 ± 0.5	1.1 ± 0.2	1.8 ± 0.3
C16:0	26.9 ± 0.4	27.6 ± 2.4	24.4 ± 0.6	17.2 ± 2.6
C16:1cw7	1.6 ± 0.7	6.1 ± 1.5	3.5 ± 0.5	4.4 ± 2.0
C18:0	15.3 ± 0.5	23.8 ± 3.7	18.6 ± 2.3	25.9 ± 3.5
C18:1cw9	14.1 ± 0.5	17.8 ± 0.9	9.9 ± 0.8	15.5 ± 1.0
C18:2cw6	23.7 ± 0.8	7.0 ± 0.8	3.5 ± 0.4	8.1 ± 1.8
C20:2cw9	0.5 ± 0.2	1.5 ± 0.4	0.9 ± 0.4	2.2 ± 0.5
C20:3cw6	3.1 ± 0.2	0.4 ± 0.1	-	-
C20:4cw6	7.6 ± 0.5	0.7 ± 0.5	2.8 ± 0.8	5.6 ± 1.0
C24:0	n.d.	n.d.	5.0 ± 0.9	n.d.
C24:1cw9	n.d.	n.d.	6.5 ± 2.0	n.d.
C22:6cw3	2.1 ± 0.2	n.d.	6.5 ± 2.0	1.6 ± 0.5
Alți	3.4 ± 0.1	7.3 ± 0.0	12.5 ± 0.1	11.5 ± 0.01
C22:0	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.6	7.8 ± 0.8	1.6 ± 0.7
C24:0	n.d.	n.d.	5.0 ± 0.9	n.d.
C24:1cw9	n.d.	n.d.	6.5 ± 2.0	n.d.
C22:6cw3	2.1 ± 0.2	n.d.	6.5 ± 2.0	1.6 ± 0.5
Alți	3.4 ± 0.1	7.3 ± 0.0	12.5 ± 0.1	11.5 ± 0.01

2.4.5.2. ACIZI GRAȘI LIBERI

Acizii grași liberi sunt prezenți în materialul biologic numai în urme. Ei pot fi reluați cu eter etilic sau eter de petrol, după extracția menajată cu soluții apoase sau alcoolice alcaline, în care se regăsesc ca săruri alcaline. Eliberarea acizilor se poate face cu soluții diluate acide. Utilizarea soluțiilor alcaline diluate previne clivajul hidrolitic al acilglicerolilor sau glicerofosfolipidelor.

Acizii grași liberi pot fi izolați prin adsorbție pe o rășină schimbătoare de ioni (cationit) după Hornstein și colab. din 1960. Datorită tendinței acizilor grași polinesaturați de a izomeriza este recomandabil să se lucreze cu adsorbenți ușor bazici. După izolare (eluare) acizii grași erau determinați titrimetric.

O metodă relativ convenabilă de determinare cantitativă a acizilor grași liberi din plasmă, amestecuri de incubare și țesuturi a fost descrisă de Dole în 1960. Acizii grași liberi sunt extrași direct din soluții acidulate cu un amestec izo-propanol / heptan. Adăugarea ulterioară de heptan și apă, duce la formarea a două faze nemiscibile. O probă alicotă din faza heptanică conținând acizii grași liberi este titrată cu o soluție apoasă de hidroxid de sodiu. Pentru eliminarea acidului carbonic (carbonaților) și fosfolipidelor extractul final heptanic este spălat cu acid sulfuric diluat. Din aceleași considerente s-a propus extracția plasmei liofilizate cu izo-octan și acid acetic. Liofilizarea nu mai era necesară dacă extracția se realiza cu un amestec izo-octan / anhidridă acetică / acid acetic / acid sulfuric. Dificultăților de extracție, le erau adăugate cele de titrare a unui sistem bifazic apă / heptan iar din acest motiv hidroxidul de sodiu a fost înlocuit de un amestec cu hidroxid de tetrabutilamoniu. Metoda Dole a fost adaptată ulterior, utilizând sărurile de cupru sau modificările de culoare ale roșului de fenol,

pentru determinări spectrofotometrice, metoda Itaya (1965). O micrometodă de dozare a acizilor grași liberi dezvoltată de Mahadevan (1969) utilizând ca agent de cuplare pentru săpunurile de cupru, 1,5-difenil-carbohidrazina în loc de dietilditiocarbamat utilizat de tehnica Duncombe. Această metodă a fost utilizată cu succes pentru studierea unor enzime lipolitice.

Novak în 1965, descrie un procedeu colorimetric în care cobaltul era utilizat în locul cuprului, pentru formarea sărurilor acizilor grași liberi, iar acesta era determinat cu α -nitroso- β naftol. Determinările enzimatică au fost la rândul lor la fel de laborioase mai ales în faza de detecție.

Determinarea acizilor grași liberi a fost o aplicație extrem de rapidă a cromatografiei de gaze, cu rezultate foarte precise și reproductibile.

O metodă rapidă pentru determinarea individuală a acizilor grași liberi plasmatici a fost descrisă de Sampson și Hensley în 1975. Standardul intern (acid heptadecanoic sau pentadecanoic) este adăugat direct plasmei (1.0 ml), apoi acizii grași sunt direct extrași cu un solvent organic. Extractul este evaporat la sec în curent de azot și reluat în 100 μ l n-heptan. O cantitate de 2 μ l din probă sunt injectați direct într-o coloană cu umplutură, 10% SP-1000 pe Chromosorb W-AW, 100/120 mesh sau 10% SP 216-PS pe Supelcoport 100/120. Se lucrează în regim izoterm la 280°C, detectorul la 300°C, iar injectorul la 300°C. Gazul purtător este azotul, la un debit de 25 ml/min. Rezultatele sunt prezentate în graficul de mai jos. Metoda este extrem de utilă și relativ rapidă. Din păcate nu am fost în măsură să reproducem aceste date.

Metoda ce s-a impus ca fiind extrem de rapidă a fost cea propusă de Pace-Asciak în 1989. O probă de 200 μ l de plasmă este procesată rapid cu metanol și 12 μ g acid pentadecanoic ca standard intern. După derivatizare cu diazometan, 1 μ l soluție hexanică este injectată în cromatograf. Se utilizează o coloană capilară de 60 m x 0.25 mm I.D., acoperită cu SP-2331.

Gazul vector este hidrogenul la un debit de 40 cm/sec.

Programul de temperatură a avut ca temperatură inițială 50°C, apoi cu o rată de 7°C/min. până la 165°C, la temperatura de 200°C se ajunge cu 1.6°C/min. unde se menține un palier de 5 min. Ulterior cu 0.3°C/min. se ajunge la 204°C, pentru ca apoi u 10°C/min. se ajunge la temperatura finală de 220°C. Injectorul și detectorul au fost menținute la 230°C. Cromatograful a fost cuplat cu un spectrometru de masă. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 2-13.

Tehnica utilizată de noi este însă cu mult mai rapidă, utilizează ca agenți de metilare BF₃/metanol., SILAR-10C (SP-2340), ca fază staționară. Coloana este 30 sau 60 m, programul de temperatură este diferit. Procedeu utilizat de noi a fost descris anterior.

Diferențele dintre mediile acizilor grași liberi exprimate în μ g/ml, pot provenii :

- Existența unor procese de autooxidare (creșterea acizilor grași saturați).
- Numărul relativ mic de cazuri analizate de Pace-Asciak (n= 3)
- Tehnica utilizată de noi este mult mai elaborată și mai rapidă, adaptată analizelor lipidelor de membrană.
- Variații legate de vârstă și modul de nutriție.

Pentru clinicianul al cărui domeniu include afecțiunile metabolice și de nutriție, bolile neurologice cu stocare lipidică (teaurizmoze, lipidoze) răspunsul laboratorului referitor la concentrația de acizi grași liberi plasmatici (normal cuprinsă între 3.0-30 mg/dl, 0.1-1.1 meq/l) nu este cel util. Aceasta este explicația pentru care s-au pus la punct tehnici de separare elaborate. Proporția dintre diferiții acizi grași liberi plasmatici este cel util, cel ce poate orienta diagnosticul și tratamentul.

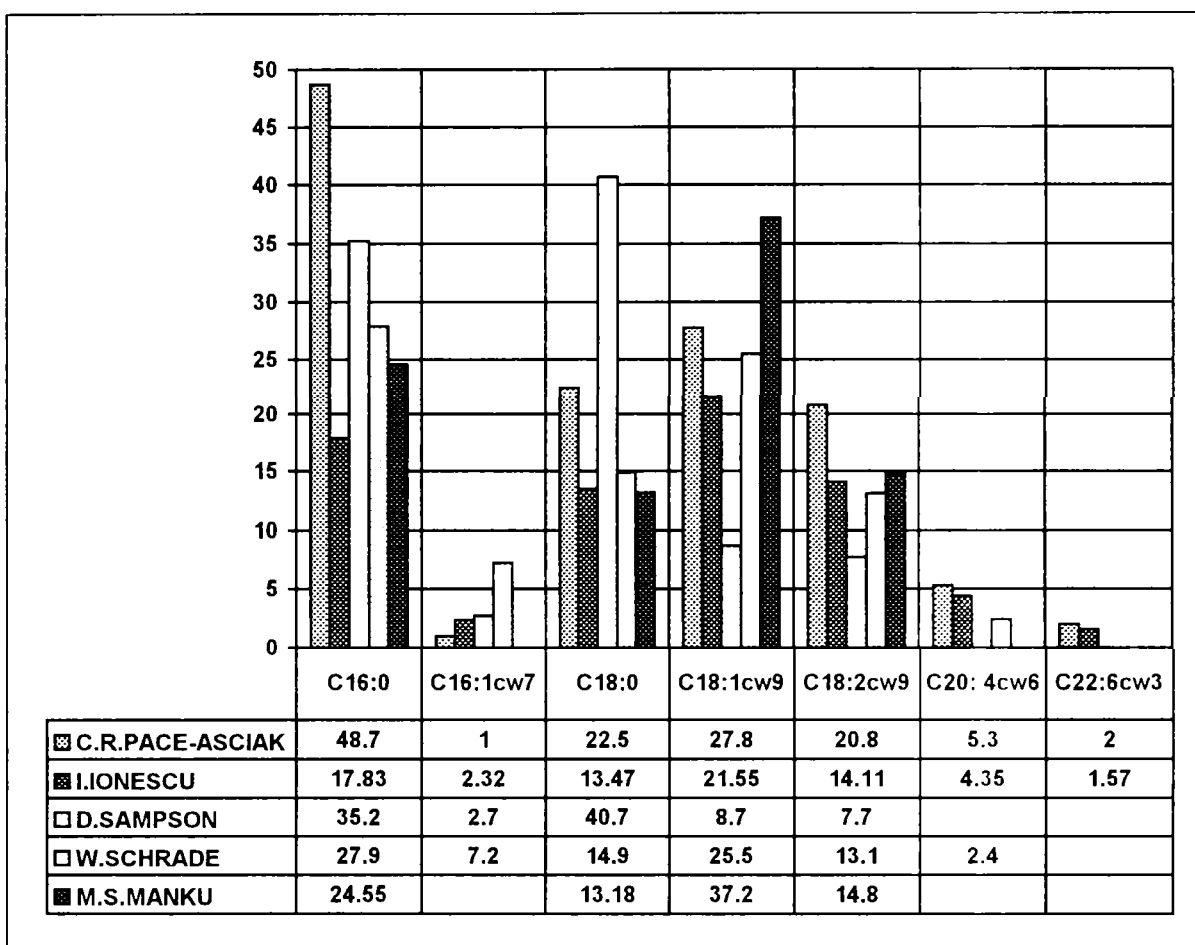


Fig. 2-13. Profilul principalilor acizi grași liberi plasmatici.

2.1.4.6. DETERMINAREA LIPOPROTEINELOR

Transportul lipidelor, (în general insolubile în apă) în plasmă (ser), lichide interstițiale și limfă este asigurată de lipoproteine.

2.1.4.6.1. DATE STRUCTURALE - GENERALITĂȚI

Lipoproteinele sunt produși de asociere ce se comportă ca niște proteine tipice, ei sunt solubili în mediu apos salin, au greutate moleculară ridicată, sunt amfoteri și posedă un punct izoelectric, sunt sensibili proceselor de denaturare ca orice proteină serică obișnuită. Proteinele specifice sunt denumite apoproteine.

Izolarea lor este relativ dificilă, datorită extremei lăbilității. Structura lor nu este bine definită la acest moment euristic. Alcoolul în concentrații ridicate scindează legătura dintre proteine și lipide. Combinația lipoproteică nu depinde de legături covalente, dar rezultă sarcini ionice, legături de hidrogen și forțe de atracție nespecifice. Lipoproteinele se găsesc în plasmă sub formă de miceli. Părțile hidrocarbonate non polare ale moleculelor lipidice sunt orientate către interiorul particulelor. La suprafața exterioară a miceliului există distribuite sarcini electrice provenind de la grupările ionizate și polare peptidice și ale moleculelor fosfolipidice. Sarcinile electrice asigură stabilitatea ansamblului lipoproteic, ele conferind miceliilor proprietatea de a include molecule de apă orientate. Principalele lipide transportate de particulele lipoproteice sunt triacilgliceroli și colesterolul provenite fie din factorii de dietă fie

din sinteza *de novo*. Lipoproteinele sunt compuse dintr-un miez lipidic (lipide neutre), înconjurat de apoproteine, fosfolipide și colesterol neesterificat, orientate în așa fel încât porțiunile lor polare sunt expuse la suprafața lipoproteinelor, conferind acestor particule solubilitate în apă și soluții saline. Apoproteinele asociate cu particulele lipoproteice au funcții diverse : servesc ca un component structural al particulelor, acționează ca situsuri de recunoaștere pentru receptorii de suprafață, sunt co-factori față de enzimele implicate în metabolismul lipoproteic.

Lipoproteinele înglobează aproximativ 39% apă, gradul relativ ridicat de hidratare este indispensabil stabilității complexului lipoproteic. Lipoproteinele au o stabilitate considerabilă între 0–5°C, dar sunt denaturate prin congelare la –25°C sau prin liofilizare.

2.1.4.6.2. METODE DE INVESTIGARE A LIPOPROTEINELOR

Dacă lipoproteinele nu pot fi izolate în stare pură, este însă posibilă separarea lor în clase menținându-le în soluție și utilizând metode fizico-chimice care comportă un risc minim de denaturare.

În prezent nu se poate nota o metodă simplă și rapidă pentru separarea, identificarea și determinarea cantitativă a lipoproteinelor. Procedeele bazate pe ultracentrifugarea analitică și preparativă au fost trecute în revistă și revizuite de : De Lalla în 1954; Gofman și Furman, (1964); Pezold (1961). Separarea prin precipitare fracționată este complicată, fără șansă de aplicare în chimia clinică, este concluzia la care ajunge Cohn și colab. în 1960.

Metode mult mai convenabile sunt cele bazate pe flocularea cu polizaharide sulfatate, Burstein (1961); Cornwall (1958); și imunoprecipitarea Burstein (1958); Heiskell (1961); Feldman (1964).

Tehnicile care s-au impus și generalizat sunt cele electroforetice și cromatografice. Electroforeza liberă, în mediu tamponat după Tiselius, demonstrează existența a două grupe lipoproteice, denumite α și β această nu este interesantă din punct de vedere clinic.

2.1.4.6.2.1. METODA DE SEPARARE PRIN ULTRACENTRIFUGARE.

În procedeul denumit flotație, se centrifughează la viteze ce realizează un câmp de ordinul a 100 000 x g, amestecuri de ser și soluții saline (NaCl, NaBr), constituindu-se astfel medii de densitate dorite. Greutatea specifică a peptidelor obișnuite este de ordinul 1.33–1.37 g/cm³, a lipidelor de 0.9-1.0. Dacă densitatea mediului este ajustată de o manieră convenabilă, proteinele banale sedimentează. Lipoproteinele, de greutate specifică mult mai mică au tendința de a se concentra la suprafața lichidului. Se ajunge astfel la separarea lipoproteinelor în grupe, caracterizate de densitatea lor în mediul în care ele manifestă tendința de rearanjare și de indicele specific de flotație în acel mediu. Indicele de flotație este exprimat în unități *Svedberg* (S_f). O unitate *Svedberg* S_f este egală cu 10⁻¹⁵ cm/s/dyne/g la 26°C.

O primă separare la o densitate de 1.063, separă două grupe de lipoproteine :

- a. Lipoproteinele de densitate scăzută, inferioară la 1.05 g /cm³ (1.006–1.063 g/cm³) desemnate ca LDL (Low Density Lipoproteins).
- b. Lipoproteine de densitate înaltă HDL (high density lipoproteins) care prezintă densități superioare 1.05 g/cm³ (1.063–1.21 g/cm³).

Modificând densitățile prin adăugarea de cantități diferite de sare, se poate ajunge la fracționarea grupelor primare.

- a. În ordinea descreșterii densităților distingem în cadrul clasei lipoproteinelor de densitate înaltă :

- Clasa HDL₃ : flotație la densitatea de 1.20
 - Clasa HDL₂ : flotație la densitatea 1.125
- b. Lipoproteinele de densitate scăzută se subdivid în patru clase care se desemnează fie prin densitatea lor în stare hidratată, fie prin indicele lor de flotație în mediu convențional de 1.748 molal NaCl, densitate 1.063.

Clasele cu densitatea și indicele de flotație S_f sunt :

- Clasa HDL₁ : densitate în jur de 1.05 ; S_f 0-2. Cu toată desemnarea HDL₁, fracția este de densitate scăzută. Ea nu se recuperează integral când separăm ansamblul lipoproteinelor de densitate scăzută prin flotație în mediu de densitate 1.063. Această clasă , cu o abundență scăzută poate fi neglijată.
- Clasa cu S_f 0 – 12 ; densitate hidratată : 1.063 – 1.019.
- Clasa S_f 12 – 20 ; densitate hidratată : 1.019 – 1.006.
- Clasa cu densitate foarte scăzută, VLDL (Very Low Density Lipoproteins) S_f 20 – 400 ; densitate hidratată 1.006 – 0.98.
- Clasa chilomicronilor, S_f 400 – 105 ; densitate hidratată 0.98 – 0.90.

Compoziția serică medie, este reprodusă în tabelul 2.6. Compoziția variază de la un individ la altul, chiar și la același subiect funcție de starea metabolică și de nutriție. Trebuie reamintit că cea ce numim generic clase lipoproteice sunt în esență ansambluri, cuprinzând probabil sute de individualități chimice. Într-o clasă, conținutul în proteine scade, în favoarea creșterii concentrației lipidice, implicit a indicelui de flotație. În clasele cu S_f 20 – 400 și $S_f > 400$, conținutul în acilgliceroli poate varia funcție de starea fiziologică. În plus cu cât concentrația glicerolilor crește colesterolul liber și esterificat se diminuează. Greutatea moleculară a lipoproteinelor de înaltă densitate se situează în jurul valorii de 100 000 pentru HDL₂ și 400 000 pentru HDL₃. Proteina acestor clase prezintă specificitate. Ea conține acid aspartic N-terminal și treonină C-terminal. Specificitatea antigenică este bine conturată.

Peptidele lipoproteinelor de densitate scăzută denotă compoziții extrem de variate. Ele sunt heterogene din punct de vedere imunologic. Amino acizii N-terminali variază, până în jur de S_f 100, predomină acidul glutamic, chiar și pentru fracțiile unde coexistă alături de serină. La S_f superioare peptidele prezintă terminal treonină, serină sau acid aspartic.

Tabel 2.6. Compoziția medie procentuală a lipoproteinelor serice.

Constituent	HDL	LDL după S_f		
		0 - 20	20 – 400	> 400
Proteine	35 - 60	20 - 25	10	2
Lipide totale	65 - 40	80 – 70	90	98
Colesterol esterificat	28	46	5	2
Colesterol liber	6	14	8	1
Fosfolipide	44	25	20	6 – 9
Gliceride	17	14	55	85 – 90
Acizi grași ne esterificați	≤ 6	≤ 1	2	< 1

Albuminele care nu flotează dar sedimentează la ultracentrifugare, conțin în jur de 30 mg % lipide. Acestea sunt compuse în proporție de 50% din acizi grași ne esterificați. Albuminele cuprind urme de fosfolipide și colesterol liber. Albuminele constituie modul de transport principal al acizilor grași ne esterificați.

2.1.4.6.2.2. METODA SEPARĂRII ELECTROFORETICE A LIPOPROTEINELOR SERICE

În investigațiile clinice curente, utilitate își dovedesc metodele electroforetice în diferite variante.

Electroforeza în gel de amidon. Nu cauzează denaturarea lipoproteinelor și mediul nu adsorbe produșii separați. Separarea este netă, pe întreaga suprafață. Se regăsește o fracție α_1 , o fracție β și adesea o fracție α_2 . Aceste fracții migrează la fel ca globulinele corespunzătoare. Chilomicronii nu se regăsesc ca fracție distinctă. Fracția α_1 , corespunde ansamblului HDL, iar fracția β (sau β_1) la LDL. Dacă fracția α_2 este vizibilă, ea corespunde LDL de greutate specifică foarte scăzută. Dacă sângele a fost recoltat după o masă bogată în grăsimi, chilomicronii se vor găsi în fracția β la fel ca și în α_2 .

Electroforeza pe hârtie. Datorită facilităților oferite de această tehnică, a fost multă vreme utilizată în chimia clinică. Migrarea este funcție de caracteristicile tamponului utilizat. În cazul utilizării tamponului veronal, pH 8.60 pot fi decelate două fracții. O fracție α net determinată. Ea corespunde practic lipoproteinelor HDL. O a doua fracție, β , apare bine individualizată dar localizarea ei este difuză, ea tinzând să formeze o zonă cu "coadă" în jurul punctului de aplicare (start). Fracția β , corespunde aproape în totalitate lipoproteinelor LDL.

La subiecți *à jeun*, s-a detectat o cantitate mică de material care a rămas pe linia de start. Dacă serul nu este prelevat *à jeun*, se poate observa la linia de start o a treia fracție constituită aproape în totalitate din triacilgliceroli, este corespunzătoare chilomicronilor.

Fracțiunile se detectează, prin colorare cu coloranți specifici lipidelor ca de exemplu: Sudan Black acetilat sau Oil Red O.

Este posibilă amestecarea serului de analizat cu colorantul înaintea procesului de separare electroforetic.

Estimarea cantitativă relativă a lipoproteinelor se face fie prin eluare și determinare spectrofotometrică, fie prin scanare (densitometrie) directă. De remarcat faptul că fixarea colorantului este influențată direct de compoziția lipidică a lipoproteinelor.

Lees și Hatch în 1963 au pus la punct un procedeu de electroforeză pe hârtie în tampon veronal, pH 8.60, la care au adăugat 1% albumină umană. În acest caz apare o separare netă între trei fracții lipoproteice: fracțiile obișnuite α , β , și o fracție pre- β , mai puțin intensă decât zona β , pe care o precede.

Fracția α corespunde HDL, fracția β , claselor LDL, fracția pre- β , respectiv LDL de foarte joasă densitate, bogate în acilgliceroli. După o masă bogată în grăsimi la punctul de start se decelează o fracție corespunzând chilomicronilor.

Lipoproteinele β , sunt sintetizate în mucoasa intestinală și mai ales în ficat sunt bogate în colesterol, mai ales esterificat.

Lipoproteinele pre- β , conțin o cantitate importantă de triacilgliceroli, dar spre deosebire de cele din chilomicroni, acești triacilgliceroli provin din sinteza endogenă la nivelul țesutului hepatic. Conținutul relativ ridicat în triacilgliceroli face ca la centrifugare să floteze mai intens ca β -lipoproteinele având valori S_f de 20 – 400 și fiind considerate ca lipoproteinele cu densitate foarte joasă (VLDL). La electroforeză pe hârtie sau în gel de agaroză aceste lipoproteine migrează înaintea β -lipoproteinelor, dar în gel de poliacrilamidă rămân în urma acestora.

Lipoproteinele α au un conținut ridicat de proteine și fosfolipide, sunt lipoproteine dense, iar la ultracentrifugare nu flotează ci sedimentează împreună cu proteinele plasmatiche. S-au evidențiat subfracții ale lipoproteinelor dense (HDL): HDL₁, HDL₂, HDL₃.

Particulele HDL sunt sintetizate în ficat și eliberate în sistemul circulator (sânge) prin procesul de exocitoză. Ele îndeplinesc în organism, un număr de funcții importante:

- a. Servesc ca un rezervor circulant de apo C-II, apoproteina care este transferată la VLDL și chilomicroni și utilizată ca un factor activator pentru *lipotein lipază*. E.C.2.3.1.43.
- b. Elimină colesterolul liber (nesterificat) din țesutul extrahepatic și esterificându-l, utilizând enzima plasmatică *fosfatidilcoline:colesterol acil transferaza* (PCAT, uzual cunoscută sub numele de LCAT "L" – de la lecitină). E.C.2.3.1.43.
- c. Transferă esterii colesterolului la VLDL și LDL, în schimbul triacilglicerolului.
- d. Transportă esterii colesterolului în ficat, unde HDL este degradat iar colesterolul este eliberat.

Proaspăt secretate HDL, sunt particule lenticulare (discoidale), conținând predominant colesterol ne esterificat, fosfolipide (în special fosfatidilcolină) și un număr de apoproteine, incluzând apoA-I, apoE și apoC. Lipoproteinele sunt rapid convertite la particule sferice datorită acumulării de colesterol. HDL sunt acceptori excelenți pentru colesterolul ne esterificat, atât de la suprafața membranei celulare cât și din lipoproteinele circulante. Colesterolul liber o dată captat, este esterificat imediat de către PCAT, o enzimă plasmatică, care este activată de apoA-I a HDL. Acidul gras de la carbonul 2 (β) al fosfatidil colinei este transesterificat direct colesterolului, eliminându-se lisofosfatidil colina. Colesteril esterul rezultat este atât de hidrofobic încât este efectiv absorbit în HDL și în foarte scurt timp transferat membranei. Singurul mecanism de eliminare al esterului colesterolului din HDL este transferul la VLDL sau LDL, printr-o proteină de transfer specifică. Esterul rămâne în LDL până este preluat de celulă. Două treimi din colesterolul plasmatic este esterificat cu acizi grași. În afecțiunile ficatului se marchează o scădere a colesteril esterilor, acest fapt este datorat se pare unei deficiențe de sinteză a fosfatidil colinei sau pierderi de PCAT (LCAT). Particulele HDL, nu servesc numai ca surse de apoproteine pentru alte tipuri de lipoproteine serice ci recuperează aceste proteine înainte de fixarea chilomicronilor remanenți și LDL la receptorii lor de pe suprafața celulară și endocitarea lor. Particulele sferice de HDL, sunt preluate de ficat, iar esterii colesterolului degradați. Colesterolul astfel eliberat poate urma trei căi metabolice : recaptat în lipoproteine, convertit la acizi biliari sau secretat în bilă, pentru a fi eliminat din organism. De remarcat că acizii grași liberi și lizolecitina sunt fixați direct de albuminele serice. Faptul că lipoproteinele β și pre- β , sunt precipitate de polianioni de tipul heparinei, sulfatului de dextran sau fosfotungstenatului de sodiu are importanță atât pentru obținerea izolată a acestor lipoproteine cât și pentru dozarea turbidimetrică a lipoproteinelor cu densitate joasă și foarte joasă.

Chilomicronii. Prezența acestor particule în limfă după ingestia unor alimente bogate în grăsimi îi conferă acesteia un aspect lactescent. Această soluție a fost denumită **chyle** (în opoziție cu **chyme**, denumirea masei semifluidă provenite din digestia incompletă a alimentelor în stomac, care ulterior pătrunde în duoden). Aceste particule au primit prin similitudine denumirea de **chilomicroni**. Serul normal conține totdeauna lipoproteine de densitate inferioară la 1.019 ($S_f \leq 12$). După ingestia materiilor grase, lipoproteinele de densitate foarte scăzută marchează o creștere semnificativă, în același timp în plasmă apar particule vizibile la ultramicroscop în câmp întunecat sau în contrast de fază. Aceștia sunt **chilomicronii**. Unele dintre aceste particule au diametrul în jur de 1.5 μm ., dar cea mai mare parte sunt cuprinși în domeniul 0.5 μm .–1.0 μm . Există o cantitate relativ restrânsă cu diametrul în jur de 0.1 μm . Greutatea moleculară a particulelor oscilează în domeniul 50 000 000 – 250 000 000. Conținutul proteic este scăzut dar este indispensabil, proteinele stabilizând particulele, distribuindu-se la suprafața acestora. Chilomicronii conțin majoritar acilgliceroli, iar în proporții scăzute colesterol și fosfolipide. În cazul în care chilomicronii sunt abundenți și au o "talie" relativ mare, serul capătă un aspect lactescent. Bierman și colab. în 1962 au demonstrat că hiperlipemia alimentară provoacă apariția succesivă în sânge a două specii diferite de chilomicroni. În cazul în care serul este examinat în primele 4 - 6 ore după

ingestia a 250 g. de unt sau ulei de porumb, iar proba este supusă electroforezei în gel de amidon, eluarea fracțiilor pune în evidență existența a două zone α_2 și β . Din aceste două zone se pot izola în mediu salin, chilomicroni. Chilomicroni α_2 sunt particule primare iar chilomicroni β sunt particule secundare. Numărul chilomicronilor primari crește în sânge în primele 6 ore după ingestie, scăzând ulterior. Deci, particulele se succed în timp.

Particulele primare (α_2) sunt identice particulelor lipidice limfatice prelevate din canalul toracic. Aceștia sunt chilomicroni de origine exogenă. Numărul lor este dependent de absorbția intestinală, scăderea lor presupunând eliminarea lor din sistemul circulator în principal prin ficat. Ficatul utilizează triacilgliceroli proprii pentru resintetizarea unor lipide modificate, pe care le eliberează în sânge sub formă de chilomicroni secundari (β). Triacilgliceroli particulelor secundare au la început o compoziție identică cu cea a grăsimilor de rezervă, dar această structură tinde să se apropie de cea a grăsimilor ingerate pe măsură ce se derulează procesul de digestie. Chilomicroni secundari sunt destinați țesutului adipos și organelor, acilgliceroli lor sunt de origine endogenă dar compoziția lor este funcție de grăsimile alimentare. Electroforeza pe hârtie nu separă aceste specii de particule, ele rămân localizate în zona de aplicare a probei.

Trebuie să admitem că hiperlipemia provocată induce formarea "particulelor terțiare" care se evidențiază în electroforeza pe hârtie, printr-o creștere a fracției pre- β – lipoproteice după Lees, Fredrickson și Hatch în 1963 au demonstrat că acilgliceroli acestei fracții sunt de origine endogenă. Bierman în 1962 a regăsit aceste particule anormale în sângele unor subiecți hiperlipemici, la care hiperlipemia a fost indusă printr-un regim bogat în glucide. Această natură glucidică confirmă natura endogenă a pre- β -lipoproteinelor.

Metodele uzuale la acest moment sunt cele de separare electroforetică, în geluri sau folii de acetat de celuloză.

Mobilitatea electroforetică a lipoproteinelor serice este reprezentată în figura 2-14.

O metodă extrem de eficace și relativ simplă permite evaluarea calitativă a lipoproteinelor în absența unor mijloace tehnice care ar permite separarea lipoproteinelor este metoda Havel, 1976.

2.1.4.7. PARTICULARITĂȚI ALE INVESTIGAȚIEI LIPAZELOR

Lipaza, *Triacilglicerol acilhidrolaza*, E.C.3.1.1.3., Schmidt și colab. în 1974, hidrolizează triacilgliceroli acizilor grași cu catenă lungă. Locul de acțiune al lipazei este situat la interfața dintre picătura de triacilglicerol și faza apoasă, astfel gradul de emulsificare, joacă un rol important în stabilirea concentrației de substrat activ. Aceasta face distincție între lipaze și esteraze, care reacționează cu substrat solubil în apă. Concentrația lipazei în ser este extrem de scăzută. O creștere marcată a activității lipazei este notată în pancreatita acută și carcinomul pancreatic, având aceeași semnificație diagnostică ca și α -amilaza.

Activitatea lipazei în pancreatita acută poate depăși de 200 de ori limita superioară a normalului, creșterea medie este de 20 ori. O creștere semnificativă a activității lipazei serice, este notată în afecțiunile renale acute sau cronice.

În serul patologic activitatea lipazei are origine pancreatică. În suc pancreatic și suc duodenal concentrația este de câteva ordine de mărime mai mare decât activitatea măsurată în ser. Lipaze există în țesutul adipos și în lapte. În cazurile de pancreatită nu au fost detectate activități enzimatică în urină.

Principial dozarea *Triacilglicerol acilhidrolaza*, E.C. 3.1.1.3, cuprinde o etapă de hidroliză, pas cu pas a unui substrat constituit dintr-o emulsie de ulei de măsline stabilizat.

Detectarea poate fi realizată :

1. Titrimetric : În fiecare pas de hidroliză este eliberat un mol de acid gras. Prin titrare, la un pH optim (8.9–9.0, pentru lipaza pancreatică) se determină eliberarea unui mol de

acid gras în unitatea de timp. În condițiile de mai sus răspunsul este liniar începând cu al doilea minut, până la al șaselea minut. Valorile normale în serul uman sunt cuprinse în domeniul 11–138 U/l.

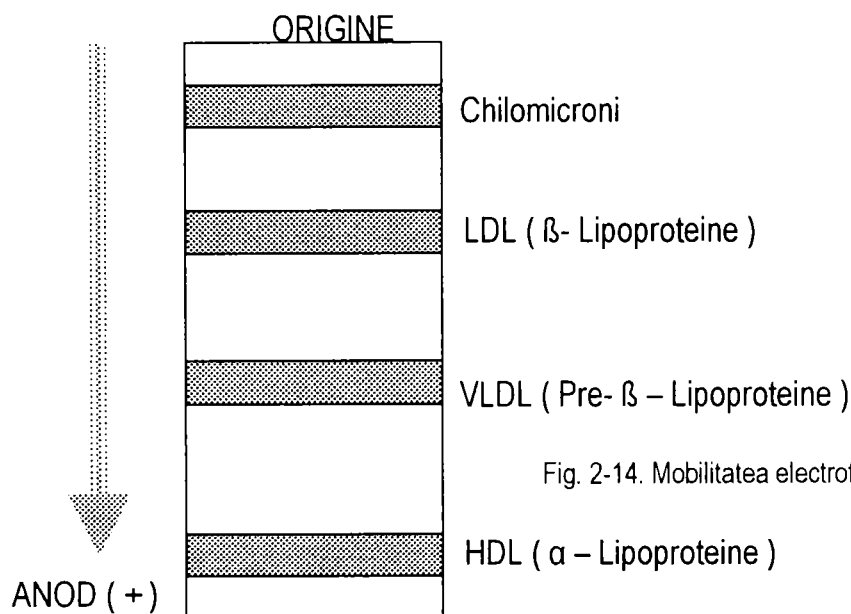
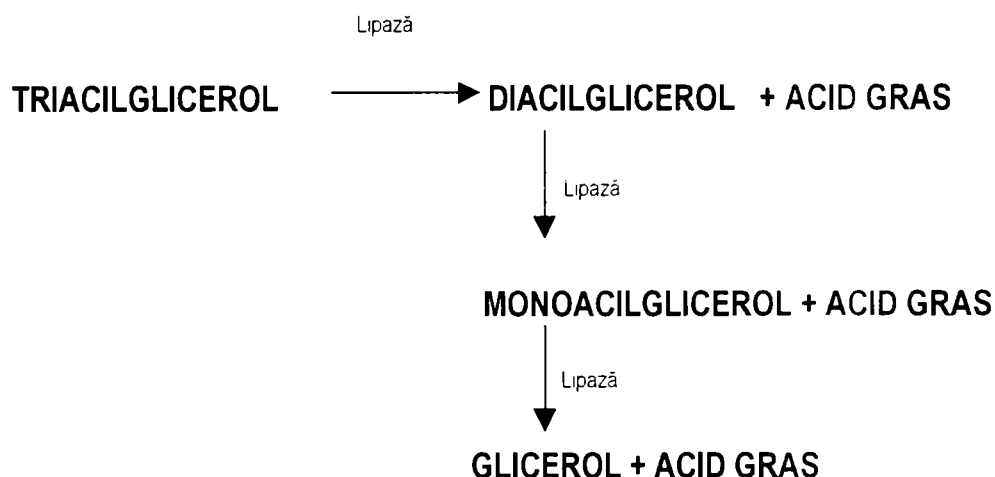


Fig. 2-14. Mobilitatea electroforetică a lipoproteinelor serice.



2. Spectrofotometric : Acizii grași sunt separați sub forma sărurilor de cupru, prin extracție în cloroform, iar cuprul se determină cu dietilditiocarbamat. Cantitatea de acid gras eliberată în unitatea de timp, este proporțională cu activitatea lipazei. Determinarea se realizează la 440 sau 436 nm. Valorile normale serice sunt distribuite în domeniul 50–300 U/l, cu o valoare medie 146 ± 89 U/l.
3. Gaz cromatografic : Acizi grași eliberați în urma procesului hidrolitic sunt extrași din sistem și separați. Cantitatea de acizi grași este proporțională cu activitatea enzimatică. Metoda este relativ laborioasă, necesită echipamente speciale dar este extrem de precisă. Are utilitate strict în domeniul investigațiilor biochimice de cercetare.

În 1943, Hahn, a demonstrat că injectarea intravenoasă a unei cantități mici de heparină activează într-o măsură considerabilă dispariția chilomicronilor apărute în urma hiperlipemiei alimentare. Studiul fenomenului Hahn, a demonstrat că injectarea heparinei provoacă apariția în sânge, a unui factor lipolitic datorat unei enzime, lipoprotein-lipaza sau factor clarificant (*clearing factor*), cu o acțiune specifică : el nu clivează acilglicerolii în stare pură, dar hidrolizează gliceridele care se găsesc în combinație, în lipoproteinele β sau în chilomicroni. Este scindată exclusiv legătura ester din poziția α și α' . Rezultă în acest caz monoacilgliceroli și acizi grași liberi. Pentru lipoprotein-lipaza (*clearing factor* : Postheparin

lipază), numele sistematic agreat de Enzyme Commission a I.U.B. este *Diacilglicerol acilhidrolază*, E.C.3.1.1.34. Factorul clarificant nu apare în sânge *in vitro* la adăugare de heparină. Este deci eliberat din țesut în timpul stării hiperlipemice, foarte probabil sub influența unui activator. Acțiunea lipoprotein lipazei permite înțelegerea modului în care grăsimile neutre, integrate în particule voluminoase, pot accede în spațiile celulare. Importanța lipoprotein lipazelor și rolul jucat de acestea a fost cuprinzător rezumat de Robinson în 1963. Enzima poate fi izolată din mușchiul cardiac, țesutul adipos, plămâni, peretele arterial, mușchi scheletic. Ficatul nu o conține. Parenchimul hepatic nu este separat de sângele care îl irigă decât printr-un spațiu limfatic bine marcat, delimitat de partea sanguină printr-o lamă conjunctivă foarte subțire și discontinuă. Se știe că lipoproteinele și chilomicronii pot străbate acest spațiu, venind în contact cu hepatocitele. Triacilgliceridele sunt foarte probabil absorbite de parenchim fie ca atare fie după o hidroliză ce are loc la suprafața celulară. Lipoprotein-lipaza nu pare să intervină la acest nivel. Din contra, chilomicronii și lipoproteinele de densitate scăzută, nu pot penetra cu viteză suficientă peretele capilar al țesuturilor extrahepatice. Triacilgliceroli în particular trebuiesc să fie modificate înainte ca ele să acceadă celulele organelor. Se admite că lipoprotein lipaza este normal localizată în peretele capilarelor. Atunci când este activată, acizii grași eliberați penetrează rapid organele. O mică parte din enzimă este deversată în sânge, atunci când eliberarea ei se face în exces. Lipoprotein lipaza induce în acest mod absorbția tisulară a acilglicerolilor din chilomicronii primari și secundari. Ea face să dispară rapid lactescența serului. Interesant de remarcat este că, activitatea enzimatică a lipoprotein lipaza este indusă de starea fiziologică. *À jeûne* activitatea sa crește în unele țesuturi, ca de exemplu mușchiul, miocardul. În țesutul adipos activitatea enzimatică manifestă o variație inversă, scăzând în timpul *postului*, pentru a nota creșteri semnificative în timpul procesului de nutriție. Corelativ, în țesutul adipos nu se depun *à jeûne* triacilgliceroli. Este aproape sigur că hidroliza triacilglicerolilor de către lipoprotein-lipază nu este un proces complet. Acest fapt subliniază că lipoprotein lipaza intervine ca un factor adjuvant în asimilația extrahepatică a lipidelor, nu este indispensabil. Caracterul parțial al hidrolizei poate avea și o altă explicație. Acțiunea sa specifică asupra legăturilor ester α și α' , trebuie să conducă la formarea monoacilglicerolilor, aceștia sunt caracterizați de o putere emulsifiantă considerabilă. O cantitate extrem de mică de monoacilgliceroli reduce mărimea particulelor complexelor lipidice, având ca efect absorbția rapidă a lipidelor, Gregoire (1997).

Utilizând trioleina ca substrat s-au izolat : diacilgliceroli (aprox. 9–30% 1,3 diacilgliceride, 70–91 % un amestec 1,2; 2,3–diacilgliceroli), monoacilgliceroli (51 – 87 % ca 1 sau 3–monoacilgliceroli, 13–49% ca 2–monoacilgliceroli), glicerol și acizi grași. Substratul utilizat pentru determinarea activității lipoprotein-lipazei este format din chilomicroni, ulei de nucă de cocos "activat" cu ser, emulsie comercială de triacilgliceroli de tipul Intralipid (AB Vitrum, Stockholm, 10% ulei de soia, 1.2 % fosfatide, 2.5% glicerol) sau Ediol (Serva, Heidelberg, 50% ulei de nucă de cocos și Tween 60 ca emulsificator). Titarea se realizează continuu cu o soluție de hidroxid de sodiu, pH-ul este astfel ținut constant. Valorile normale au fost cuprinse în domeniul 200–530 U / l dacă, serul a fost obținut la 10 minute după injectarea intravenoasă a heparinei.

Trecerea în revistă, succintă, a metodologiei de investigare a lipidelor biologic active din organismul uman s-a dorit o evaluarea nepretențioasă a utilului aparat tehnic, pus la punct de laboratorul clinic. Modul în care clinicianul știe sau nu să utilizeze aceste date spre folosul pacientului este altceva.

2.2. HOMEOSTAZIA BIOCHIMICĂ A METABOLIȚILOR LIPIDICI

2.2.1. HOMEOSTAZIA ȘI HETEROSTAZIA - ASPECTE SPECIFICE -

Un sistem viu se caracterizează prin permanente schimbări, printr-un veșnic dinamism. Fluxuri de substanță, de energie și de informație se desfășoară neîntrerupt între părțile componente ale sistemului (fluxuri interne), ca și între sistem și mediul său (fluxuri externe); neîncetate sunt și modificările de formă, de compoziție, de relații între părți, precum și variațiile de viteză ale acestor modificări. Cu toate acestea sistemul viu, rămâne el însuși. Este clasic cunoscut faptul că atomii din corpul unui individ animal sau uman nu mai sunt aceiași care-l alcătuiau cu câteva luni în urmă; totuși, individul a rămas el însuși. Toți copacii unei păduri se schimbă în decurs de câteva secole, dar pădurea rămâne aceeași.

Există ceva stabil în sistemele vii. Există în ele o constanță relativă a raporturilor dintre componente, o stabilitate realizată în și prin veșnică mișcare, așa cum în imaginea heeraclitiană valurile mereu curgătoare realizează constanța râului. Veșnica mișcare biologică își are regulile ei, se desfășoară între anumite limite, este dominată de o anumită ordine constantă.

Dubla îmbinare a acestor două aspecte contrare : constanța în mișcare și mișcarea constantă, iată ce caracterizează sistemele vii. Cannon a denumit această stabilitate "**homeostazie**", iar pentru latura ei dinamică a fost creat mai târziu termenul de "**homeodinamie**".

Homeostazia este o stare "*asemănătoare cu ea însăși*", dar **nu identică** cu ea însăși (nu este o **homostazie**).

Într-un univers în veșnică mișcare, un sistem "homostatic" ar însemna unul complet izolat de restul lumii – un sistem "fără mediu" – alimentându-și din energiile sale interne procesele sale absolut uniforme. Ar fi un perpetuum mobile, o absurditate.

Noțiunea de homeostazie este strâns corelată cu alte câteva concepte. Săhleanu (1972) a dat un tabel de corespondențe, în care ea apare, alături de "stabilitate", în coloana noțiunilor de ordin informațional, corespunzând conceptelor de ordin energetic "echilibru fluent" și "echilibru termodinamic" și celor de ordin substanțial "inertie" și "echilibru mecanic". O strânsă relație există între homeostazie și individualitate, în mijlocul unui mediu dinamic și el, decât dacă este homeostatat. Astfel, indivizii biologici, "cuantele de materie vie", după plastica expresie a lui Bogdanski (1979), s-ar dizolva în mediu. Nu cunoaștem sisteme naturale homeostatate în afara lumii vii, sau în orice caz nu cu o homeostazie de același tip, Pantin (1964); Strugren (1966). Pentru a cuprinde și sistemele ne-vii care prezintă oarecare constanță și capacitate de menținere a acesteia, a fost creat termenul de "**dinostate**" (sisteme cu echilibru de forțe), Bogdanski (1970, 1973). În cadrul acestora, "biodinostatele" s-ar distinge prin câteva caractere: dimensiunile lor spațiale și durata de existență permit influențe atât de la nivel atomic, cât și de la cel planetar, structura lor compactă permite transporturi de informație (interne) prin purtători materiali; tot structura compactă le asigură coerența, fără să fie nevoie de mișcări orbitale. ceea ce le conferă o mare libertate de mișcare; sursa de energie este dispersată în toate elementele componente. Se pare că există un consens cvasiunanim și în ce privește homeostatele tehnice: acestea modelează, dar nu creează o homeostazie de tip biologic, care rămâne, totuși, *altceva*. De

ce ? Nu există un răspuns unitar și exhaustiv. Se caută rădăcinile deosebirii în marea diferență de grad de complexitate. Aceasta este o deosebire cantitativă cu importante implicații calitative. Este vorba nu numai de numărul extrem de diferit al elementelor componente, ci și de acela al nivelurilor de reglare : sistemul viu este format din subsisteme, homeostate la rândul lor. Consecința este că numărul gradelor de libertate în procesul de autoreglare este mult mai mare în cazul sistemului viu decât în cazul sistemului tehnic. Din lista de mai sus a lui Bogdanski rămâne în picioare față de homeostatele tehnice numai ultima deosebire (caracterul dispers al sursei de energie). Credem însă că deosebirea esențială este totuși cea de mai sus, referitoare la gradul de complexitate. În cazul sistemului de maximă complexitate – organismul uman – numărul gradelor de libertate ajunge la infinit. Termenul acesta nu este, aici, o figură de stil: omul are la dispoziție un număr atât de mare de posibilități de a răspunde la influențele perturbante ale mediului prin reacții stabilizatoare, încât nu ajunge niciodată să le utilizeze pe toate.

Cercetări de ecologie, de fiziologie, de citologie și de biologie moleculară au arătat că homeostazia biologică are particularități diferite, în funcție de nivelul de organizare căruia ne adresăm. Se pare că nu s-a dat încă o explicație a acestui fapt și cum simpla referire la "specificul calitativ" al nivelului nu ne mulțumește, încercăm să mergem cu un pas mai departe, comparând, sub un anumit aspect, homeostazia organismului cu aceea a biocenozei.

Considerăm că viteza de reinstalare a ordinii într-un sistem deranjat printr-o perturbație a mediului este o măsură a gradului de homeostatare. În cazul organismului, cu cât aceasta este mai complex, cu atât gradul de homeostazie este mai ridicat (reechilibrările sunt mai rapide). În cazul unei biocenoze, se pare că, dimpotrivă, viteza reechilibrării scade cu creșterea complexității sistemului. Credem că aici este utilă introducerea unei mărimi noi, pe care propunem s-o numim "*indicele de structurare*" al sistemului. Acesta rezultă din raportul a doi parametri : "*gradul de organizare*" al sistemului, exprimat prin stringența legăturilor dintre părțile componente (am putea să-i spunem și "*grad de interdeterminare*") și *complexitatea*, exprimată prin numărul și diversitatea componentelor. În cursul evoluției biologice, cresc ambele componente ale relației. Dacă ar crește egal, indicele de structurare ar rămâne constant și la fel și capacitatea homeostatică, pentru că aceasta este, credem, în funcție de indicele discutat. Se pare însă că, la nivelul organismelor, "numărătorul" raportului (gradul de organizare) crește mai repede decât "numitorul" (gradul de complexitate) și astfel indicele crește; la nivelul biocenzelor, "numitorul" crește mai repede și astfel indicele de structurare scade, antrenând scăderea promptitudinii reglării.

Considerații matematice indică drept posibil faptul că ecosistemele dispun de posibilitatea de a-și regla gradul de complexitate, reducându-l la nevoie, remarca Coste în 1978. Bazându-ne pe aceasta, propunem următoarea ipoteză : la nivelul biocenozei sau al ecosistemului (spre deosebire de nivelurile celular și organismic), creșterea complexității nu merge paralel cu aceea a gradului de organizare (acesta din urmă fie nu crește deloc, fie mult mai încet decât complexitatea); pentru a-și putea menține un indice de structurare necesar pentru asigurarea homeostaziei, sistemul este nevoit să frâneze creșterea complexității.

Desigur, se poate obiecta că această creștere nu este o explicație a deosebirii dintre cele două nivele, considerațiile de mai sus nefăcând decât să deplaseze problema. Într-adevăr, aceeași întrebare poate fi pusă și aici; de ce evoluția biocenzelor ascultă - sub acest aspect - de o altă lege decât aceea a organismelor? Nu putem răspunde, dar credem totuși că schema de mai sus constituie o explicație. Pentru că adevărata explicație științifică deplasează de fapt problema în zone mai profunde, împingând-o până la limita dincolo de care investigația concretă nu are deocamdată acces.

S-au scris cărți despre homeostazie. Biologii sunt de acord în a o considera drept una dintre cele mai vaste, mai fundamentale și mai importante manifestări ale vieții. Există o cantitate imensă de date experimentale, privitoare la formele în care și la mecanismele prin care se realizează homeostazia. Există de asemenea numeroase lucrări teoretice care analizează de pe pozițiile ciberneticii fenomenele homeostaziei (teoria controlului și reglării, echilibrului dinamic al sistemelor deschise, etc.). Mai puține eforturi s-au făcut în vederea precizării conținutului acestei noțiuni complexe, precizare de așa natură. încât să permită aprecieri cantitative asupra *gradului de homeostazie* al unui sistem viu dat. O primă încercare a fost făcută de C. Wittenberger în 1966.

De la Claude Bernard încoace, domeniul homeostaziei în științele biologice s-a extins. Azi vorbim de homeostazie în fiziologie, citologie, embriologie, ecologie, etologie, imunologie, etc. Până și procesul însuși al evoluției pare a fi homeostatat, din observațiile lui Schmalhausen (1961). Totul pare să fie reglat și autoreglat, integrat și integralizat.

A fost exprimată și părerea că integralitatea (strâns corelată cu homeostazia) ar caracteriza numai nivelul organismic, poate și cel populațional; la nivele inferioare, ar exista numai un reglaj, la cele superioare numai echilibru, după Uschersohn, 1970. Deși nu împărtășim această părere (la nivelul metabolismului celular, de exemplu, se pot pune în evidență multe fenomene de echilibrare), credem că ea conține un sâmbure de adevăr, sesizând specificul manifestărilor de homeostazie la diferite nivele de organizare a structurilor vii.

O problemă interesantă și discutată este aceea a "*homeostaziei informaționale*", adică a acelei relații între homeostazie și informație, în care aceasta din urmă constituie obiectul celei dintâi. În diverse lucrări, Săhleanu, 1966, și-a expus concepția cu privire la "triada" universală : substanță, energie, informație, extinsă apoi la "tetradă". prin adăugarea "structurii". nu comportă dubii faptul că în lumea vie trei dintre elementele tetradei sunt supuse homeostaziei; constanța structurilor, este evidentă, homeostazia compoziției chimice este de ordin substanțial, sarcinile și fluxurile energetice sunt adesea strict reglate. Dar există oare și o homeostazie informațională? Mulți răspund afirmativ.

Ideea triadei (sau a tetradei) ni se pare utilă și aplicarea ei tentantă (de ce numai "triadă metodologică" și nu și ontologică?), dar necesitând circumspecție. Homeostazia informațională ar putea fi înțeleasă ca o constanță de stare (aspect predominant în homeostazia substanțială) sau ca una de flux (întâlnită cu precădere în domeniul energetic). Ni se pare evident că prima ipoteză trebuie respinsă. Nici un sistem biologic nu tinde către o constanță a *cantității* de informație pe care o conține; o asemenea tendință ar exclude evoluția, care, implicând complicarea sistemului, presupune și îmbogățirea acestuia de informație. Discuția se poate purta deci asupra homeodinamiei informaționale (a homeostaziei de flux). Aici însă ni se pare că nu se mai păstrează simetria celor trei componente ale triadei. Fluxul de substanță și de energie are, la orice sistem viu, două sensuri (influx și eflux), cu efecte opuse, de creștere, respectiv scădere, asupra "stocului" din interiorul sistemului. În domeniul informației avem un influx (prin receptori, în cazul organismului) și un eflux (de exemplu, prin grai); dar efluxul nu influențează stocul de informație acumulat (cunoștințele nu se șterg prin faptul că le comunicăm altora; informația genetică nu scade prin replicare). numai în cazul pierderii de către sistemul viu a unei părți din substanța sa structurată, se pierde, odată cu aceasta, și o parte din bagajul informațional; dar în acest caz a fost lezată homeostazia de substanță și de structură, nu numai cea de informație.

Dacă problema este pusă sub forma : este reglat influxul de informație? - răspunsul este fără îndoială afirmativ. Este însă vorba de o reglare limitativă unilaterală, o plafonare a influxului, în funcție de capacitatea de recepție și de prelucrare a sistemului respectiv. Dar aceasta nu este o homeostazie propriu-zisă, cu menținerea unei valori între două limite.

Autorii citați mai sus vorbesc de homeostazia informațională ca de ceva menit să ferească organismul de anumite informații (în fața unei scene groaznice. închidem ochii - spunea Săhleanu). Credem că aici este însă vorba de cu totul altceva. Homeostazia și homeodinamia oricărui parametru substanțial sau energetic se referă la valoarea acestuia, are deci un caracter cantitativ. În accepția ilustrată prin citatul de mai sus avem de-a face cu o apărare selectivă a organismului față de intrarea unei anumite informații, nu față de o anumită viteză a intrării. O astfel de apărare este un mecanism de secluziune iar aceasta singură, nu duce la homeostazie. (Tot ca un fenomen de "secluziune informațională" ar putea fi privită și rezistența față de idei străine, culminând în diverse forme de dogmatism. Deosebirea față de homeostazie, mai ales în ce privește semnificația biologică generală, ni se pare echivalentă).

Dar, poate, noțiunea de homeostazie ar trebui lărgită, astfel încât să includă și aspectul calitativ. Am vorbit atunci de trei aspecte fundamentale ale homeostaziei: de stoc (stare), de flux (mișcare) și de natură (calitate); fiecare din ele ar fi dominant într-unul din cele trei mari domenii : substanțial, energetic și informațional.

Credem că ar fi prematur să exprimăm o părere categorică. Acceptăm realitatea (ontologică) a triadei în lumea vie. Dar simetria totală, prea regulată, prea fără excepții, poate fi și o cerință a minții noastre. "Natura nu a fost totdeauna suficient de drăguță, pentru a face lucrurile așa de simple, cum ne-ar plăcea nouă" - spunea Dobzhansky.

În fond, noi știm foarte puțin despre informație. În lucrarea citată, Săhleanu înșiră o mulțime de tipuri și aspecte ale ei. O cunoaștem mai bine sub forma care se manifestă în gnoșis-ul uman și în comunicarea dintre indivizi, dar și aici punctele de vedere sunt încă foarte diverse și noțiunile de referință nu sunt totdeauna riguroase. Însuși faptul că se poate încerca cuprinderea într-o singură carte a tot ce se știe și se gândește azi despre informație ilustrează elocvent enorma discrepanță de ordin cognitiv dintre informație pe de o parte, substanță și energie pe de alta.

Când vom cunoaște informația la fel de bine cu substanța și cu energia, poate că și problema homeostaziei informaționale va primi o soluție mai limpede și, poate, cerința de simetrie, de regularitate - una dintre cele mai profunde, mai ciudate și mai fertile nevoi ale minții omenești - va fi încă o dată satisfăcută.

Homeostazia – ca stare și ca tendință sau proces – are semnificații general-teoretice, cu implicații filozofice.

Homeostazia înseamnă echilibru, homeostatarea înseamnă reechilibrarea sistemului perturbat de o influență a mediului. Dar echilibrul homeostatic înseamnă de fapt *ordine*. Când fizicianul Schrödinger – întrecându-i pe biologii gânditori în propriul lor câmp de gândire- a afirmat că "obiectele vii se hrănesc cu ordine", el a caracterizat de fapt un aspect, poate cel esențial, al homeostaziei : *echilibrarea antientropică*. În această expresie, accentul cade pe al doilea termen. Pentru că echilibrul desăvârșit, total, necuantificabil- este cel termodinamic; cel implică nivelarea energetică, oprirea oricărui flux, moartea termică. Judecat din punct de vedere termodinamic, rezultatul proceselor homeostatice este un *dezechilibru*. Polarizarea membranelor este un bun și foarte general exemplu al unei astfel de stări de dezechilibru energetic, de asimetrie ordonată și controlată homeostatic, Emerson (1954).

Homeostazia este procesul care duce către echilibre antientropice, opunându-se tendinței generale de decădere către echilibrul termodinamic. Există și o implicare în alt sens a dezechilibrului în procesele homeostatice. Ne referim la rolul pozitiv pe care-l pot avea "zgomotele", perturbațiile venite din mediu, acțiunile energetice sau informaționale care dezechilibrează pentru moment sistemul viu. Faptul a fost întrevăzut de multă vreme, inclusiv de oameni care nu operau cu noțiunile teoriei informațiilor. Miciurin când a vorbit despre necesitatea de "a zdruncina ereditatea plantei" pentru a o putea readapta la un mediu schimbat, el s-a referit, fără să știe, la rolul pe care "zgomotul", în sens cibernetic, îl poate

juca în îmbunătățirea funcționării unui sistem reglat. Considerații interesante în acest sens au făcut Pop și Săhleanu (1965), legate în special de problemele comportamentului uman și animal, și Peatnițchi (1969), Atlan (1974), formalizează matematic problema în discuție, demonstrându-se că efectul "organizator" sau distructiv al zgomotului informațional depinde de intensitatea acestuia și de structura sistemului.

Homeostazia înseamnă optimizare. Valorile diverșilor parametri nu se stabilizează la orice nivel, ci acela care este optim pentru sistemul respectiv în condițiile date. Oricare ar fi factorii care determină nivelul optim al parametrilor, mecanismele homeostatice "țin seama" de acesta. Mediul este însă și el variabil, ceea ce face să se modifice nevoile sistemului viu, deci și valorile optime odată fixate. De aceea, homeostazia poate fi optimizatoare numai cu condiția să fie și adaptativă. Cu alte cuvinte, să poată modifica "norma" parametrilor homeostatați.

Problematika adaptării – sau, mai general vorbind; a potrivirii sistemului viu la mediu – este extrem de vastă și de complexă. Sub un anumit aspect, adaptarea (adecvarea, potrivirea) constituie latura cea mai izbitoare și – categoric – cea mai puțin explicată a vieții. Ea constituie totodată "temelia pentru înțelegerea vieții", Jendrassik (1965).

Se consideră că nu există o deosebire de esență între cele două funcții ale homeostaziei: de echilibrare-stabilizare și de optimizare-adaptare. Orice sistem biologic alcătuiește împreună cu mediul său un sistem de ordin superior (chiar dacă pentru aceasta nu întotdeauna avem un nume special).

Optimizarea unui sistem înseamnă stabilizarea la nivelul celui supraordonat, care-l include pe cel dintâi împreună cu mediul său. Optimizarea proceselor dintr-o celulă în funcție de condițiile impuse de mediul intern al organismului înseamnă stabilizarea sistemului constituit din mediul intern cu celulele pe care le scaldă. Optimizarea unei biocenoză înseamnă stabilizarea, echilibrarea ecosistemului. Funcțiile de stabilizare și de optimizare care o pun în legătură și cu alte fenomene și stări biologice, cum sunt: regenerarea, restituția (odihna, vindecarea), sănătatea. Natura acestor relații ar putea fi și ea subiect de meditație.

Homeostatarea înseamnă autonomizare, iar aceasta înseamnă eliberare. A spus-o Claude Bernard în 1958, omul care a vorbit pentru prima dată explicit despre ceea ce numim azi homeostazie: "fixitatea" mediului intern este condițiunea unei vieți libere și independente. Acest adevăr profund și fundamental al biologiei a fost mereu redescoperit și reafirmat. Racoviță, definind secluziunea drept opoziția organismului față de mediu, ducând la eliminarea influenței unor factori externi, arată că aceasta este un "factor liberator și progresist", Codreanu (1964). Autonomia biologică limitează, fără s-o întrerupă, dependența sistemelor vii față de mediu. La nivel organismic, mediul nu este un sistem reglat în aceleași coordonate cu ființa (organismul), de aceea acțiunile sale asupra și din punctul de vedere al acestuia sunt mai mult sau mai puțin întâmplătoare, haotice. Autonomia nu înseamnă de fapt decât reglementare, organizarea calitativă și cantitativă a acestei dependențe. Această autonomie, care, într-un grad mai redus sau mai ridicat există totdeauna în lumea vie, constituie una din principalele caracteristici care fac ca mișcarea biologică să fie superioară formelor de existență din lumea ne-vie.

Ieșirea parțială din sfera influențelor haotice ale mediului nu înseamnă nicidecum ieșirea vieții din determinism. "Homeostazia – spune Săhleanu în 1967 – este tocmai drumul spre libertate. Dar relațiile unui asemenea sistem complex, autonomizat, deși determinante, scapă descrierilor *dinamice* curente. Legăturile statistice care *transced* legăturile dinamice nu sunt expresia interdeterminismului, ci aceea a libertății".

Din considerațiile de mai sus se vede că punem un deosebit accent pe relația dintre homeostazie, integralitatea sistemului și autonomie (libertate). Homeostazia este o trăsătură esențială a vieții, respectiv o noțiune centrală a biologiei. Poate, este cea mai esențială și cea mai centrală. Stabilitatea dinamică a vieții s-a relevat

oamenilor mult înainte ca aceștia să fi ajuns la conceptul clar și științific formulat care-i corespunde azi. Cu un secol înainte de apariția termenului de homeostazie și cu o jumătate de secol înaintea lui Claude Bernard, Goethe spunea că viața este *Dauer in Wechsel*, ceea ce s-ar traduce, liber dar fidel sensului, "persistență în schimbare".

Tendința homeostatică caracterizează mișcarea universală de la cea mai simplă manifestare de viață în sus. Toată lumea fenomenelor sociale se include aici.

După această punere în temă asupra fenomenului homeostatic, generos tratată de regretatul profesor clujan, C. Wittenberger (1981,) în ultima sa lucrare. "Eseuri de Biologie Teoretică", datele biochimice prezentate în capitolele anterioare apar în mod evident ca și consecințe imediate a proceselor de alterare ale homeostaziei organismului uman. Dishomeostazia unor componente biochimice, elementari, microscopici (cum este cazul acizilor grași), are o reflectare majoră și imediată la nivelul întregului organism, macroscopic; în acest mod judecând departajarea stării normale de cea patologică apare integrat și evident.

2.2.2. DISHOMEOSTAZIA ACIZILOR GRAȘI: CORELAȚIA REGLARE-ECHILIBRU

Metabolismul lipidelor este puternic influențat de starea funcțională a glandei tiroide. Hipertiroidismul determină un consum rapid al lipidelor în timp ce hipotiroidismul favorizează depozitarea lor. În cazul hipertiroidismului concentrația colesterolului și a lipidelor sanguine scad sensibil. Injectarea de hormon somatotrop animalelor hipofizectomizate sau animalelor tinere determină acumularea de acizi grași neesterificați în plasmă, ca urmare a unui proces de lipoliză la nivelul țesutului adipos. Administrarea îndelungată de hormon de creștere poate duce la apariția stărilor de cetonemie și cetonurie, ca urmare a degradării acizilor grași mobilizați din lipidele de rezervă. Se acceptă că acumularea acizilor grași neesterificați în plasmă constituie sursa energetică necesară biosintezei proteinelor. Se presupune că mobilizarea acizilor grași și creșterea concentrației lor în plasmă sunt rezultatul acțiunii unui factor lipomobilizant.

Substanțele cetonice (acetona, acidul acetoacetic, acidul β -hidroxibutiric) ce apar în sânge sunt excretate pe cale urinară. Compușii cetonici se formează în mod normal în procesele de ardere ale acizilor grași, însă în acest caz concentrația lor nu depășește nivelul de 1.5 – 2.0 mg %. Corpii cetonici se acumulează la nivel sanguin și în diabetul zaharat decompensat când cantitatea lor depășește cu mult posibilitățile de utilizare în celulă, este generată în acest caz starea de cetonurie și acidoză (diminuarea rezervei alcaline a sângelui).

Mecanismul lipidelor de depozit este puternic influențat de hormonul lipolitic. Procesele catabolice ale lipidelor tisulare și serice (oxidarea acizilor grași liberi, mobilizarea lipidelor din țesutul adipos, degradarea colesterolului cu formare de acizi biliari, etc.) sunt stimulate de hormonii tiroidieni, excesul acestora având un efect stimulator.

Observațiile experimentale au condus la elaborarea unui concept de interdependență dintre ciclul glucozei și al acizilor grași (Ciclul Randle).

Relațiile dintre glucoză și acizii grași pot fi :

1. Glucoza nu este utilizată normal de țesutul muscular datorită existenței în acesta a unei cantități de acizi grași proveniți din țesutul muscular și din țesutul adipos în urma procesului de lipoliză.
2. Acizii grași neesterificați trebuie să fie reîncorporați în acilgliceroli, ei sunt esterificați cu HS-CoA cu formare de acil-SCoA care ulterior reacționează cu glicerofosfatul din glicoliză rezultând triacilgliceroli.

3. Acizii grași sunt parțial oxidați cu formarea de corpi cetonici. atât în țesutul adipos cât și în țesutul muscular ; oxidarea acizilor grași și a corpiilor cetonici în țesutul muscular scade consumul tisular de glucoză.
4. În timpul procesului de lipoliză, glicerolul rezultat este eliminat în lichidul extracelular
5. Declanșarea proceselor de lipoliză în țesutul adipos inhibă transportul pe cale sanguină a acizilor grași; un efect similar a fost observat și în cazul corpiilor cetonici din ficat.

Sinteza acizilor grași și triacilglicerolilor (lipogeneza) este dependentă de precursorii lor acidul acetic, piruvic, glucoza .

Studiile efectuate de numeroase grupe de cercetători au demonstrat că acizii grași polinesaturați sunt implicați în controlul proliferării celulare. Studiile pe unele tipuri de celule și țesuturi au demonstrat efecte stimulatorii în timp ce pentru alte specii celulare și țesuturi efectele au fost inhibitorii. Există multe paradoxuri. Acizii grași esențiali sunt un suport pentru creșterea și dezvoltarea organismelor tinere, tumorogeneze pe de altă parte o deficiență a acizilor grași esențiali conduce la hiperplazie. Acidul oleic este atât un inhibitor de o mare toxicitate a proceselor proliferative și un inhibitor al tumorogenezei.

Prostaglandinele au efecte directe și indirecte (imunosupraveghere) asupra inhibiției proliferării tumorale și celulare. Antioxidanții inhibă proliferarea celulară printr-o varietate de efecte direct sau indirecte implicând peroxizii lipidici.

Acizii grași sunt oxidați printr-o varietate de reacții implicând radicali liberi la endoperoxizi ciclici (mecanismul prostaglandinic) și hidroxii peroxizi aciclici (mecanismul de peroxidare lipidic). Diferitele tipuri de peroxizi, derivații lor și radicalii formați în sintezei și metabolismului lipidic pot genera efecte atât negative cât și pozitive.

Domeniul cel mai studiat pare a fi cel legat de metabolizarea acidului arachidonic (C20:4cw6). Eliberarea acestui acid din membrane se face în urma acțiunii nespecifice a unor compuși cu structuri variate ca lectine (concavalină, fitohemaglutinină) . endotoxine. acizi grași care activează fosfolipazele A₂ și C, scindând fosfatidil inozitolul în acid arachidonic și diacilglicerol. Eliberat acidul arachidonic poate fi metabolizat prin diverse căi metabolice, funcție de necesitățile și/sau condițiile de mediu celular. Majoritatea izomerilor și derivațiilor acidului arachidonic dau reacție pozitivă pentru peroxizi, fiind substraturi pentru prostaglandine sau agenți chemotactici pentru leucocitele fagocitate. Balanța dintre prostaciline și trombociti joacă un rol deosebit în dezvoltarea aterosclerozei și a trombozei arteriale. Frecvența mult scăzută a bolilor coronariene la femei pare a fi datorată concentrației crescute de estradiol, care stimulează biosinteza prostacilinei (inhibitor puternic al agregării trombocitelor).

Chemiotactismul, prin care macrofagele și granulocitele migrează spre locul infecției a permis identificarea unui factor chemotactic alcătuit din acid arachidonic peroxidat legat de albumină. Celula fagocitată stimulată produce și eliberează leucotriene, compuși cu acțiune chemotactică. Biosinteza lor este strâns legată de acidul arachidonic și glutatationul redus din macrofag.

Lipoxigenaza din trombocite este inhibată de majoritatea medicamentelor antiinflamatoare (aspirină), modificându-se astfel biosinteza prostaglandinelor. Un produs al oxidării acidului arachidonic de către lipoxigenază, 15-hidroxiperoxid, inhibă proliferarea și maturarea leucocitelor.

Oxidarea acidului arachidonic este implicată în mitogeneză acționând ca un biosemnal. Este știut că prin legarea anticorpiilor sau a lecitinelor de suprafața limfocitelor se declanșează sinteza acidului dezoxiribonucleic, a mitogenezei și a modulării receptorilor de pe suprafața membranei. S-a constatat că în prealabil se produce o metilare a fosfolipidelor din membrane și o eliberare de acid arachidonic. Concomitent se modifică grupările SH de

pe suprafață determinând micșorare a receptorilor. Marea sensibilitate a limfocitelor la radiații este datorată capacității reduse de regenerare a glutationului și a grupărilor SH.

Procesele proliferative virale sunt strâns legate de labilitatea grupărilor SH. Astfel, astăzi se știe cu precizie că evoluția Sclerozei multiple, și SIDA sunt dependente de starea proxidativă celulară, de conținutul și /sau starea grupărilor SH. O direcție promițătoare o constituie descoperirea că în boli virale (Hepatita C, SIDA, Scleroza Multiplă) se produce o scădere dramatică a concentrației glutationului redus în plasmă și celulele limfoide.

Modificări majore ale metabolismului lipidic celular și membranar au fost semnalate în Distrofiile Musculare Progresive, afecțiuni aparent, cu determinism genetic, dar care nu exclud o agresiune primară, oxidativă asupra unei proteine constitutive sau/și asupra unui agent de transcripție genetică. Defectul generalizat de membrană nu este reflectat numai la simpli parametrii biofizici ca de exemplu permeabilitatea apei, studii aprofundate au demonstrat alterări majore ale compoziției agregatului lipo-proteic membranar, Benga și colab. (1989); Ionescu și colab. (1990). Alterări majore ale metabolismului lipidic par a marca și alte tipuri de afecțiuni cu reflectare neurologică, Ionescu și colab. (1998).

Procesele metabolice ale lipidelor biologic active sunt interdependente de lanțurile de sinteze celulare, dereglarea unei verigi are ca urmare sigură apariția stării patologice.

Biochimia, ca știință de graniță dintre lumea vie și lumea moleculelor formatoare de viață a evoluat în decursul timpului de la analiza cât mai exactă a constituenților până la înțelegerea proceselor vitale. Biochimia, unul dintre cele mai speculative domenii ale științei secolului nostru, încorporează nu numai totalitatea metodelor de analiză, totalitatea factorilor genetici dar și propria ei istorie.

Acceptarea de către comunitatea științifică a celulei, ca unitate structurală a vieții, este indiscutabilă. În schimb, cunoașterea și înțelegerea fenomenelor fizico-chimice care au loc la acest nivel sunt mult mai dificile și departe de realizare. Fenomenele care se petrec în celulă sunt deosebit de complexe, având o logică clară doar dacă le izolăm. astfel că legile fizicii se aplică modificat. Celula este sediul unor transformări complexe continue. al căror rezultat este menținerea integrității structurale și funcționale cu consum mic energetic și randament maxim.

Conform principiului al doilea al termodinamicii, orice sistem tinde să atingă, mai repede sau mai lent, o stare de repaus, de echilibru. Organismele vii se caracterizează printr-un echilibru aparent, dinamic, rezultat din cuplarea unor reacții exergonice cu cele endergonice, a unor reînnoiri continue a elementelor structurale, a unei lupte continue cu agenți distructivi interni și externi, atât la nivelul celular, cât și al întregului organism. În general, pentru ca viața să existe este necesar o anumită stabilitate chimică, desigur dinamică. Structurile subcelulare trebuie să aibă o stabilitate dar, în același timp o reînnoire a elementelor constitutive sau adaptare la agresiunile produse de agenții toxici (microbi, noxe, produși de degradare metabolică).

Studierea proceselor oxidative și de sinteză a lipidelor biologic active reprezintă în mod cert o restricționare a patologicului în favoarea stării de normalitate.

CAPITOLUL 3.

EVALUAREA ROLULUI ȘI IMPLICAȚIILOR ACIZILOR GRAȘI ÎN PATOBIOCHIMIE: ASPECTE DOCUMENTARE ȘI CONTRIBUȚII

Starea de sănătate a individului, în particular, și a unei populații, în general, este rezultatul interacțiilor dintre factorii genetici și mediul ambiant. Acest concept a fost interesant enunțat în jurul anului 480 î.H. de părintele medicinei, Hipocrate: *„O sănătate bună presupune în primul rând cunoașterea constituției umane (cea ce astăzi definim prin conceptul genetic) și apoi puterea diferitelor alimente, atât a celor naturale cât și a celor preparate de om (denumite astăzi alimente procesate). Alimentația nu este totul pentru un om sănătos, el are nevoie de un mod de a consuma puterea (energia) primită din hrană, o muncă fizică intensă, exerciții militare și sport sunt elementele absolut necesare dobândirii și menținerii unui trup armonios. Combinarea acestor două principii constituie regimul (sau cum definim astăzi, modul de viață) în care o atenție aparte trebuie dată alternanței anotimpurilor anului, schimbărilor de vânturi, vârstei individului și situației familiare. În cazul în care apare un dezechilibru între alimentație și exercițiul fizic, organismul va suferi, omul va fi bolnav .“*

Profilul genetic uman a rămas în general același, în schimb modificări majore sunt notate în modul de nutriție și în activitatea fizică.

3.1. ACIZI GRAȘI POLINESATURAȚI CU IMPORTANȚĂ BIOLOGICĂ

Acizii grași polinesaturați (PUFA–polyunsaturated fatty acids) cu importanță biologică includ două lanțuri hidrocarbonate cu 18 atomi de carbon, acidul linoleic (LA ; Linoleic Acid ; C18:2 ω 6) și acidul α -linolenic (LNA; α -Linolenic Acid; C18:3 ω 3), împreună constituie acizii grași esențiali (EFA–Essential Fatty Acids). Membri acestei clase biochimice cu lanțuri mai mari de 18 atomi de carbon sunt denumiți acizi grași polinesaturați cu catenă lungă (LCP-Long Chain Polyunsaturated fatty acids) sau alternativ acizi grași cu grad înalt de nesaturare. Recomandările de aport alimentar pentru LA și LNA sunt de 2, respectiv 0.5% din valoarea energetică nutritivă.

În tabelul 3.1.se prezintă valorile medii pentru PUFA, ca procente din acizii grași totali din carnea de vânat și plantele sălbatice. Datele sunt vehiculate de literatura de specialitate și reprezintă valori de referință pentru studiile de nutriție moderne, au fost analizate și revizuite de Eaton în 1998, constituind punctul de pornire a unor investigații ce corelează aportul alimentar de acizi grași cu incidența unor afecțiuni în linia evolutivă umană.

CAPITOLUL 3.

EVALUAREA ROLULUI ȘI IMPLICAȚIILOR ACIZILOR GRAȘI ÎN PATOBIOCHIMIE

Starea de sănătate a individului, în particular, și a unei populații, în general, este rezultatul interacțiilor dintre factorii genetici și mediul ambiant. Acest concept a fost interesant enunțat în jurul anului 480 î.H. de părintele medicinei, Hipocrate: „O sănătate bună presupune în primul rând cunoașterea constituției umane (cea ce astăzi definim prin conceptul genetic) și apoi puterea diferitelor alimente, atât a celor naturale cât și a celor preparate de om (denumite astăzi alimente procesate). Alimentația nu este totul pentru un om sănătos, el are nevoie de un mod de a consuma puterea (energia) primită din hrană, o muncă fizică intensă, exerciții militare și sport sunt elementele absolut necesare dobândirii și menținerii unui trup armonios. Combinarea acestor două principii constituie regimul (sau cum definim astăzi, modul de viață) în care o atenție aparte trebuie dată alternanței anotimpurilor anului, schimbărilor de vânturi, vârstei individului și situației familiare. În cazul în care apare un dezechilibru între alimentație și exercițiul fizic, organismul va suferi, omul va fi bolnav.”

Profilul genetic uman a rămas în general același, în schimb modificări majore sunt notate în modul de nutriție și în activitatea fizică.

3.1. ACIZI GRAȘI POLINESATURAȚI CU IMPORTANȚĂ BIOLOGICĂ

Acizii grași polinesaturați (PUFA–polyunsaturated fatty acids) cu importanță biologică includ două lanțuri hidrocarbonate cu 18 atomi de carbon, acidul linoleic (LA ; Linoleic Acid ; C18:2 ω 6) și acidul α -linolenic (LNA; α -Linolenic Acid; C18:3 ω 3), împreună constituie acizii grași esențiali (EFA–Essential Fatty Acids). Membri acestei clase biochimice cu lanțuri mai mari de 18 atomi de carbon sunt denumiți acizi grași polinesaturați cu catenă lungă (LCP-Long Chain Polyunsaturated fatty acids) sau alternativ acizi grași cu grad înalt de nesaturare. Recomandările de aport alimentar pentru LA și LNA sunt de 2, respectiv 0.5% din valoarea energetică nutritivă.

În tabelul 3.1.se prezintă valorile medii pentru PUFA, ca procente din acizii grași totali din carnea de vânat și plantele sălbatice. Datele sunt vehiculate de literatura de specialitate și reprezintă valori de referință pentru studiile de nutriție moderne. au fost analizate și revizuite de Eaton în 1998, constituind punctul de pornire a unor investigații ce corelează aportul alimentar de acizi grași cu incidența unor afecțiuni în linia evolutivă umană.

În acord, cu Eaton (1998), dieta în toată perioada paleolitică trebuie să fi conținut C18 PUFA, aproape de 21.5 g/zi, cu un aport vegetal (plante sălbatice) de aproximativ 73%. Aportul de LA este estimat la 8.84 g /zi, LAN la aproximativ 12.61 g /zi, cu un raport $\omega 6/\omega 3$, de 0.70 în categoria C 18.

Tabelul 3.2. sintetizează afirmațiile anterioare.

Tabel 3.1.

Profilul compușilor tip PUFA ca procente din acizii grași totali (după Eaton, 1998)

	N	18:2 ω 6	18:3 ω 3	20:4 ω 6	20:5 ω 3	22:4 ω 6	22:5 ω 3	22:6 ω 3
VĂNAT								
Mușchi striat	50	16.49	2.97	8.31	1.19	0.44	1.99	0.77
Creier	28	0.35	0.04	4.40	0.17	2.16	0.25	8.05
Ficat	42	10.19	1.61	10.45	1.45	0.37	3.42	3.98
Măduvă	3	7.08	0.86	0.16	0.08	0.07	0.06	0.07
Grăsime	12	7.85	3.73	0.37	0.00	0.03	0.00	0.07
PLANTE								
	20	12.33	32.82	0.64	0.60	0.32	0.15	0.26

Pentru PUFA cu catenă lungă (LCP sau acizi grași cu grad înalt de nesaturare, C20 și mai sus) sursa animală trebuie să fi furnizat mai bine de 94%, de altfel consumul diurn de LCP este estimat la 3.01 g., cu un raport $\omega 6/\omega 3$, pe întreaga categorie de 1.79.

Acidul arachidonic (ARA–Arachidonic Acid, C20:4 ω 6) a dominat cantitativ în LCP cu 1.81 g/zi, urmat de acidul docosapentaenoic (DPA -Docosapentaenoic Acid, C22:5 ω 6) cu 0.42 g /zi. Acidul eicosapentaenoic (EPA- Eicosapentaenoic Acid, C20:5 ω 3) a fost estimat la 0.39 g./zi, iar acidul docosahexenoic (DHA, C22:6 ω 3), 0.27 g/zi. Raportul ARA / ω 3 LCP s-a situat în jurul valorii 1.68. Raportul total $\omega 6/\omega 3$, pentru aportul exogen zilnic de PUFA a fost de 0.79.

Tabel 3.2.

Sursele de PUFA și aportul zilnic (g /zi) în perioada paleolitică (după Eaton, 1998)

PUFA		PLANTE	ANIMALE	APORT ZILNIC
LA	C18: 2 ω 6	4.28	4.56	8.84
LNA	C18: 3 ω 3	11.40	1.21	12.61
ARA	C20: 4 ω 6	0.06	1.75	1.81
EPA	C20 : 5 ω 3	0.14	0.25	0.39
DTA	C22 : 4 ω 6	0.00	0.12	0.12
DPA	C22 : 5 ω 3	0.00	0.42	0.42
DHA	C22 : 6 ω 3	0.00	0.27	0.27

Dieta în paleolitic era de 2–3 ori mai săracă decât cea contemporană, totuși aportul de ARA, precursorul metabolic ai eicosanoidelor proagregatorii de tipul tromboxanului (TxA₂) era destul de ridicat, remarca în 1992 Lands.

EPA și DHA, care contracarează efectele ARA, au fost la rândul lor constituenți importanți ai subzistenței civilizațiilor pre-agricole, modelul matematic desemnat să evalueze relația factori de dietă - risc de afecțiuni trombotice, mediate de eicosanoide $\omega 6$ sugerează că, în paleolitic aportul de LCP a condus la o prevalență ridicată a afecțiunilor aterosclerotice

și a altor suferințe conjugate cu factorii hemostatici, (Sinclair 1992,1996). Considerațiile evolutive nu reprezintă încă, un criteriu absolut pentru a face recomandări asupra dietei, dar permite evaluarea necesarului nutrițional al ființei umane în relație cu dezvoltarea copilului și adultului, cu apariția unor afecțiuni cronice, într-un cuvânt cu starea de sănătate a populației.

Studiile asupra aspectelor evolutive ale factorilor de dietă sugerează că schimbările majore au apărut numai în urma revoluției agricole survenite cu aproape 10 000 ani în urmă. Modificările apărute în modul de hrănire al animalelor, o dată cu domesticirea lor a adus schimbări importante, în particular, în conținutul de acizi grași esențiali ($\omega 6$ și $\omega 3$), de aici și până la mutațiile din organismul uman nu a fost decât un pas.

Alterarea factorilor de dietă, proprie societății moderne, industrializate, are ca efect imediat creșterea incidenței unor afecțiuni grave, care au de multe ori cauze aparent subiective. Termenul "subiectiv" face vorbire în primul rând la realitatea modernă, când aparent planeta nu mai poate hrăni pe toți locuitorii ei.

Planta integrală are un conținut ridicat de vitamina C și E, în comparație cu orice prelucrat al ei. Societatea modernă este caracterizată de un mod de viață sedentar sau cvasisedentar.

La începutul secolului, 30% din energie provenea din munca fizică, astăzi ea dacă atinge abia,1%. Pe de altă parte este evident că astăzi există un dezechilibru între EFA $\omega 6$ și $\omega 3$, și practic o deficiență în aportul de acizi grași esențiali $\omega 3$, la fel o balanță negativă a raportului dintre aportul energetic exogen (dietă) și activitatea fizică. Această schimbare în EFA provine în special din recomandarea absurdă de substituie a uleiurilor vegetale naturale ca de exemplu : uleiul de floarea soarelui, porumb și semințe de bumbac, cu grăsimi saturate. Aceste uleiuri vegetale au un conținut foarte ridicat în acizi $\omega 6$ și extrem de scăzut în $\omega 3$. Din tabelul 3.4. redat după Eaton (1988), se poate remarca că aportul exogen (dietă) de vitamina C, calciu și potasiu era mai mare decât cel actual.

Uleiul de porumb are un raport $\omega 6/\omega 3$ de 60/1, iar cel de floarea soarelui de 77/1. În plus, deoarece animalele sunt hrănite intensiv, carcasa lor conține cantități extrem de scăzute de acizi $\omega 3$ în schimb grăsimile saturate și acizi grași $\omega 6$ sunt preponderenți, Crawford (1963).

Ouăle și puii în avicultură, peștele în piscicultură, plantele în cultura intensivă, controlată cu adaosuri de creștere (steroide), conțin o cantitate mai scăzută de acizi $\omega 3$ decât puii ce își găsesc singuri hrana, peștele din râuri sau plantele cu regim apropiat de condițiile lor naturale de creștere (Tabelul 3.3., revizuit de Simopoulos și Salem în 1992). Datorită agriculturii intensive (agribusiness) și tehnologiei prelucrării alimentelor există, în alimentele, uzuale o creștere enormă a acizilor grași $\omega 6$.

Studiile efectuate în ultimii 15 ani pe animale de experiență, investigațiile epidemiologice și clinice prin tehnica dublu orb, pe om, au confirmat esențialitatea acizilor grași $\omega 3$, particular a acidului docosahexenoic (DHA) pentru retina normală și dezvoltarea cerebrală a nou născutului prematur, la fel pentru aspectele hipotrigliceridemice, inflamatorii, antitrombotice. Devine astfel extrem de importantă investigarea compoziției în acizi grași $\omega 3$ a factorilor de dieta ce sunt direct corelați cu scăderea ratei afecțiunilor cardiovasculare și cancer, Simopoulos (1986,1991); Galli (1989, 1994); Salem (1996).

Un studiu multidirecțional și polivalent, elaborat Keys în 1970, a cuprins populația din : insula Creta, Jugoslavia, Italia, Olanda, Finlanda, SUA, și Japonia. Punctul de start al acestui studiu a fost observarea incidenței scăzute a afecțiunilor cardiovasculare la populația insulei Creta, urmată de populația arhipelagului nipon. Investigatorii au avansat ca posibil cauză aportul alimentar crescut de ulei de măsline și o dietă relativ săracă în grăsimi saturate, caracteristicile „dietei mediteraneene“. Studiul nu a luat în discuție două aspecte : faptul că dieta grecească este bogată în grăsimi, 37% comparat cu alimentația niponă cu numai 11%, și conținutul în acizi grași ai factorilor nutriționali. S-a remarcat consumul ridicat de pește atât

în alimentația grecească cât și în cea niponă. Populația din Creta are un regim alimentar foarte sărac în vegetale, fructe, nuci, și legume, toate acestea bogate în folat, calciu, vitamine și minerale. Dieta cretană tradițională include plante sălbatice (ce nu se pretează culturii intensive cu adaosuri de creștere, unele fac parte chiar din flora spontană). Plantele sălbatice sunt o sursă extrem de bogată de acizi grași $\omega 3$ și antioxidanți.

Tabel 3. 3.

Caracterizarea factorilor de dietă și a modului de viață omului vânător-culegător comparată cu omul modern (după Simopoulos, 1992).

CARACTERISTICĂ	DIETĂ ȘI MOD DE VIAȚĂ	
	VÂNĂTOR – CULEGĂTOR	OMUL MODERN
Nivelul efortului fizic	Ridicat	Scăzut
Dietă		
Energie - Densitate	Scăzut	Ridicat
Aport Energetic	Moderat	Ridicat
Proteine :	Ridicat	Scăzut – Moderat
Animale	Ridicat	Scăzut – Moderat
Vegetale	Foarte Scăzut	Scăzut – Moderat
Hidrați de Carbon	Scăzut – Moderat (absorbție lentă)	Moderat (absorbție rapidă)
Fibre	Ridicat	Scăzut
Grăsimi	Scăzut	Ridicat
Vegetale	Foarte Scăzut	Moderat – Ridicat
Animale	Scăzut	Ridicat
Raport $\omega 6 / \omega 3$	Scăzut (2.4)	Ridicat (12)
A.linolenic / A. linoleic g/persoană/zi	Scăzut (3.3)	Ridicat (12.3)
Acizi grași cu catenă lungă (PUFA) $\omega 6$ și $\omega 3$	Ridicat (2.3)	Scăzut (0.2)
Vitamine (mg / zi)	Perioada paleolitică	Perioada modernă
Riboflavină	6.49	1.34 – 2.08
Folat	0.357	0.149 – 0.205
Tiamină	3.91	1.08 – 1.75
Ascorbat	604.00	77 – 109
Caroten (retinol echivalent)	5.56 (927.00)	2.05 – 2.57 -
Vitamina A	17.2	7.02 – 8.48
(retinol echivalent)	(2 870.00)	(1 170 – 429)
Vitamina E	32.8	7 – 10

Planta consumată frecvent în dieta grecească (cretană în particular) este un anumit tip de iarbă grasă, *Portulaca oleracea*, bogată în acid α -linolenic (400 mg/100g), vitamina E (12 mg/100g), vitamina C (27 mg/100g), glutation (15–20 mg/100 g.). Studiarea factorilor de dietă a condus la elaborarea unor concluzii extrem de interesante. Rezultatele comparative sunt sintetizate în tabelul 3.5. Similar autorul constată o diferență esențială în matricea acizilor grași și în celelalte componente nutriționale de bază : carne de pui, brânză, ouă, lapte, etc. Aportul alimentar diferit de acizi grași era evident să își găsească reflectarea la nivelul organismului uman.

În anii '50 mulți investitori își concentrau atenția examinând efectele uleiului extras din germeni de porumb și uleiului de pește, asupra organismului uman, determinând diminuarea concentrației colesterolului seric în special la pacienți afectați de ateroscleroză, Ahrens (1954,1959); Keys (1957,1957); Malmros, (1955).

Uleiul din germeni (acizi grași $\omega 6$), fără miros, clar, extras la rece, s-a demonstrat că are proprietatea de a scădea concentrația colesterolului seric.

Uleiul de sardine (acizi grași $\omega 3$), prezintă proprietăți similare dar în plus are capacitatea de a scădea semnificativ concentrația triacilglicerolilor serici. Acestor două constatări, fundamentate de altfel, nu li s-a dat la început întreaga considerație sau eventual au fost notați ca hipocolesterolemizanti.

Tabel 3.4.

Compoziția nutrienților umani în paleoliticul târziu și în epoca modernă (modificat de Eaton, 1988)

	PALEOLITICUL TÂRZIU	EPOCA MODERNĂ
Energia totală dietă %		
Proteine	33	12
Hidrați de Carbon	46	58
Grăsimi	21	30
Alcool	-	-
Raportul P:S*	1.41	1.00
Colesterol, mg.	520	300
Fibre, g.	100 – 150	30 – 60
Sodiu, mg.	690	1 100 – 3 300
Calciu, mg.	1 500 – 2 000	800 – 1 600
Acid Ascorbic, mg.	440	60

*P:S = Raportul grăsimilor polinesaturate / saturate

Acizii grași $\omega 3$, nu au fost considerați ca agenți de control importanți ai **afecțiunilor cardiovasculare** (CVD – CardioVascular Diseases) decât ceva mai târziu, prin lucrările lui Sinclair (1956), Bronte-Stewart (1957), Worne (1959), Nelson (1972). O dată cu consolidarea ipotezei lipidice, scăderea concentrației de colesterol seric a devenit principalul factor de control al **afecțiunilor cardiovasculare (CVD)** aceasta pentru că la acel moment euristic contribuția inflamatorie și trombotică nu era suficient investigată, aceste aspecte au fost studiate atent din anii '70, și până în prezent.

Prin anii '75, Bang, (1976) și Dyerberg, (1979), semnalau rata scăzută a afecțiunilor cardiovasculare și a cancerului la eschimoșii din Groenlanda, în pofida dietei lor extrem de bogate în grăsimi.

Studiul își va găsi confirmarea în Japonia, prin cercetările efectuate de Hirai în 1980 și Hojo în 1998. Ulterior studiile populaționale vor lua amploare motivate fiind de rolul important pe care îl are factorul nutrițional în starea de sănătate. În decembrie 2000, Yamada și colaboratorii finalizau în Japonia, un amplu studiu populațional pe 470 de subiecți, referitor la raportul dintre factorul nutrițional pe de o parte corelat cu incidența aterosclerozei. Au fost studiate două grupuri de subiecți. Un grup de 261, pescari, respectiv 209, fermieri. Rezultatele au demonstrat că populația consumatoare de pește (aport exogen crescut de acizi grași polinesaturați $\omega 3$) a prezentat o diminuare a fenomenelor aterosclerotice.

Dyerberg și Bang (1978,1979), sunt cei care aduc pentru prima dată observația esențială și pertinentă: **importanța acidului eicosapentaenoic (EPA) în prevenirea**

atacurilor cardiace, datorită efectelor antitrombotice, ridicând valoarea timpului de sângerare și diminuând concentrația colesterolului seric.

Tabel 3. 5.

Conținutul în acizi grași a unor plante (mg /g. greutate umedă) (după Keys, 1992)

ACID GRAS	IARBĂ GRASĂ	SPANAC	LĂPTUCĂ ROȘIE	LĂPTUCĂ GRASĂ	MUȘTAR
C 14:0	0.16	0.03	0.03	0.01	0.02
C 16:0	0.81	0.16	0.10	0.07	0.13
C 18:0	0.20	0.01	0.01	0.02	0.02
C 18:1 ω 9	0.43	0.04	0.01	0.03	0.01
C 18:2 ω 6	0.89	0.14	0.12	0.10	0.12
C 18:3 ω 3	4.05	0.89	0.31	0.26	0.48
C 20:5 ω 3	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
C 22:6 ω 3	0.00	0.00	0.002	0.001	0.001
Alți	1.95	0.43	0.12	0.11	0.32
TFA	8.50	1.70	0.702	0.60	1.101

* TFA – Conținutul Total de Acizi Grași.

Subsecvent alte studii epidemiologice confirmă aceste constatări de început. populațiile consumatoare de pește au o incidență scăzută a CVD.

În anul 1992, Dolecek a elaborat un studiu utilizând un lot impresionant (peste 6 000 de subiecți numai în grupul de control) , un aport diurn de la 0.0 la 0.66 grame acizi grași ω 3 polinesaturați, găsind o corelație inversă, semnificativă, între ingestia de ulei de pește și CVD, totalitatea bolilor cardiovasculare, rata de mortalitatea scăzând cu 40-50%. Investigațiile clinice și experimentele adiționale au confirmat câteva observații de o maximă importanță : **Când dieta este suplimentată cu acizi grași ω 3 aceștia au tendința de a înlocui în practic toate tipurile de membrane celulare (eritrocite, plachete (trombocite), celule endoteliale, monocite, leucocite, granulocite, celule neuronale, fibroblaști, celule retiniene, celule hepatice, neuroblaști) acizii grași ω 6.**

Acizii grași polinesaturați ω 3, modulează metabolismul prostaglandinic și descresc concentrația triacilglicerolilor. În concentrații relativ ridicate acizii grași ω 3 reduc concentrația colesterolului, au proprietăți antitrombotice și antiinflamatorii.

Acizii grași nesaturați sunt reprezentați de acizi mononesaturați și polinesaturați. Există două clase de PUFA : ω 3 și ω 6. Distincția dintre ω 3 și ω 6 este bazată pe localizarea primei duble legături, în ordine de la restul metilenic final al moleculei de acid gras.

Mononesturații sunt reprezentați de acidul oleic, care poate fi sintetizat de toate mamiferele inclusiv omul. Legătura sa dublă este situată între al 9-lea și al 10-lea atom de carbon. Acizii grași ω 3 și ω 6 sunt cunoscuți și sub denumirea de acizi grași esențiali (EFA– Essential Fatty Acids) deoarece organismul uman, ca toate mamiferele nu îi pot sintetiza, ei constituind-se exclusiv din aport exogen (dietă).

Acizii grași ω 6 sunt reprezentați de acidul linoleic (LA) și ω 3 de acidul α -linolenic (LNA). LA este prezent în majoritatea semințelor de plante, cu excepția nucii de cocos, cacao. LNA pe de altă parte este abundent în cloroplastele plantelor verzi. EFA sunt metabolizați la acizi grași cu catenă lungă, de 20, respectiv 22 de atomi de carbon. LA este metabolizat la acid arachidonic (ARA), LNA la acid eicosapentaenoic (EPA) și acid docosahexaenoic (DHA), prin procese de creșterea numărului atomilor de carbon (elongare) , respectiv mărirea gradului de desaturare, prin adăugarea de duble legături la gruparea carboxil.

Figura 3-1, prezintă membrii acestei clase de acizi grași nesaturați.

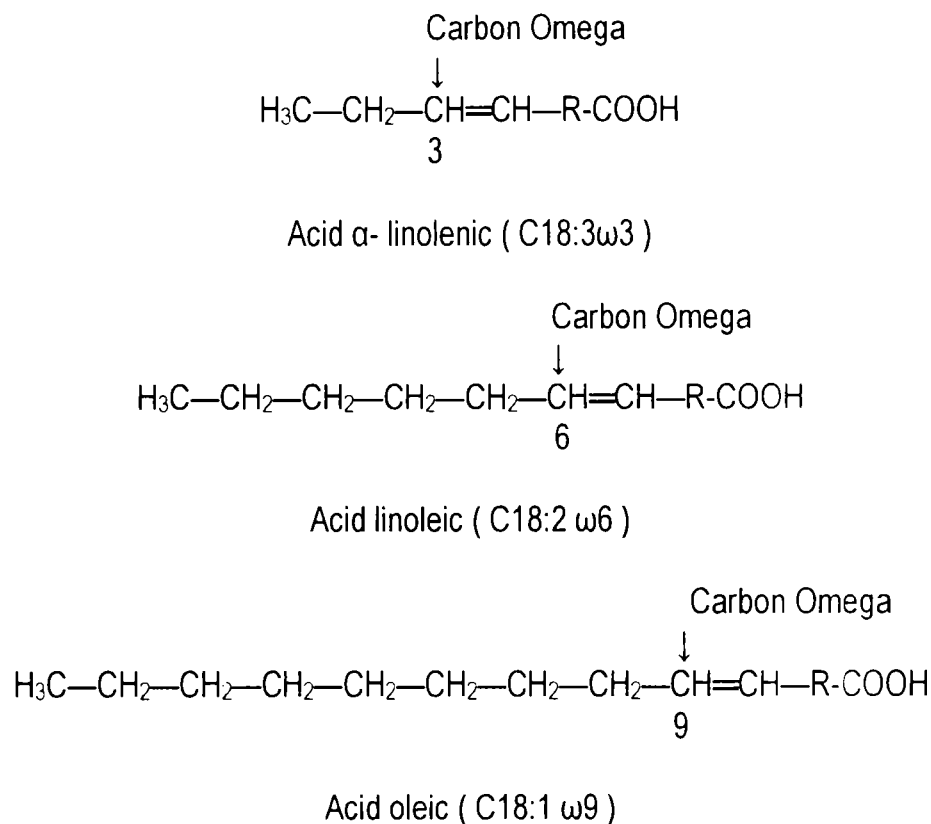


Fig. 3-1.

Formulele acizilor grași ω3 (α -linoleic), ω6 (linoleic) și ω9 (oleic).

Primul număr după (:) indică numărul atomilor de carbon din moleculă, al doilea numărul dublelor legături, ω3 , ω6 , ω9 , poziția primei duble legături.

Procesele sunt prezentate schematic în figura 3-2.

Organismul uman și animal (cu excepția leilor și pisicilor) poate converti LA la ARA respectiv, LNA la EPA și DHA, De Gomez, (1975). Această conversie a fost investigată de Emken în 1989 utilizând tehnica marcării izotopice. Între acizii grași ω3 și ω6 există o competiție față de enzimele de desaturare, cu o favorizare evidentă a clasei ω3 atât de către $\Delta\text{-4}$ cât și de $\Delta\text{-6}$ desaturază. Interesant de observat raportul invers dintre activitatea enzimatică a $\Delta\text{-6}$ desaturazei și vârstă. Este acceptat, faptul că sinteza $\text{C22:4}\omega\text{6}$ și $\text{C22:5}\omega\text{3}$ se realizează din precursori de acizi ω6 și ω3 în reticulul endoplasmatic. Sinteza acizilor $\text{C22:5}\omega\text{6}$ și $\text{C22:6}\omega\text{3}$, impune metabolizarea $\text{C22:4}\omega\text{6}$ respectiv $\text{C22:5}\omega\text{3}$. la $\text{C24:5}\omega\text{6}$ și $\text{C24:6}\omega\text{3}$ în reticulul endoplasmatic. Cei doi acizi grași cu 24 atomi de carbon sunt deplasați în peroxisomi pentru biodegradare parțială, deplasați ulterior în reticulul endoplasmatic în vederea utilizării ca substrat în biosinteza lipidelor membranare. Elucidarea controlului deplasării intracelulare a acizilor grași precum și a transportului acestora la microsomi, peroxisomi și mitocondrii este necesară în vederea clarificării căilor de sinteză și a modului în care diferitele țesuturi lipidice acumulează selectiv $\text{C22:6}\omega\text{3}$, Sprecher (1999). Studii elaborate, au demonstrat limitarea conversiei (în unele cazuri eliminarea) LNA la EPA și DHA, la prematuri, indivizi hipertensivi, unele cazuri de diabet. Această constatare are importanță atunci când se fac recomandările de dietă. Acidul eicosapentaenoic (EPA) și acidul docosahexaenoic (DHA) sunt abundenți în uleiurile de pește. în special pește gras (hering, macrou, crap, somn, morun, etc.). Acidul arachidonic (ARA) este prezent în cantități

apreciabile în fosfolipidele animalelor hrănite cu semințe. Acidul linoleic (LA), acidul α -linolenic (LNA), și derivațiilor cu lanțuri lungi de atomi de carbon sunt componente importante ale membranelor celulare animale și vegetale.

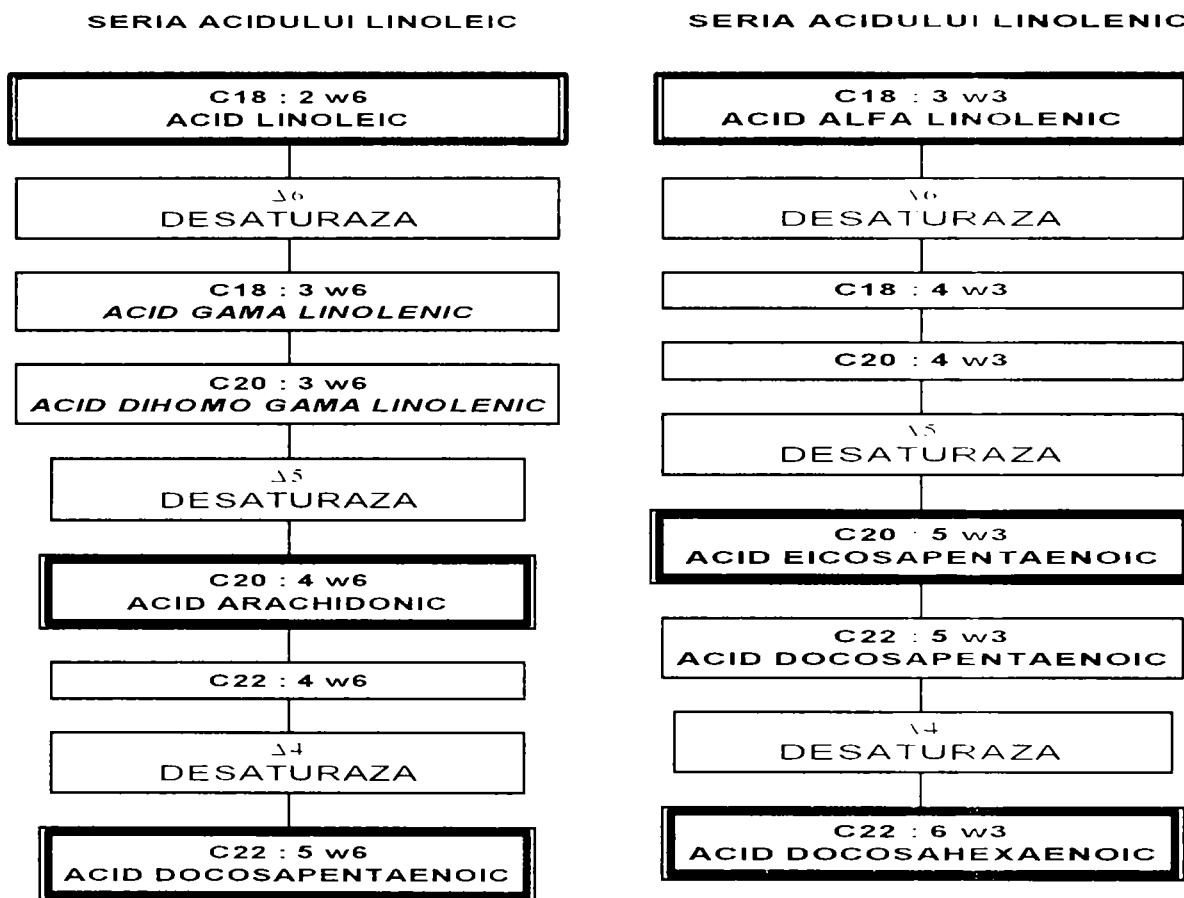


Fig. 3-2.

Metaboliții din seriile acizilor grași esențiali ω_3 , respectiv ω_6 .
Procesele de desaturare și elongare.

La mamifere și plante, acizii grași ω_3 , sunt distribuiți selectiv între diferitele clase lipidice. Acidul α -linolenic (LNA) este abundent în triacilgliceroli, colesteril esterii și cantități minore în fosfolipide. Acidul eicosapentaenoic (EPA), este semnalat în colesteril esterii, triacilgliceroli și fosfolipide. Acidul docosahexaenoic (DHA) este distribuit aproape exclusiv în fosfolipide, fiind prezent în cortexul cerebral (O'Brien, 1965), retină (Anderson, 1970), testicule și spermă, (Poulos, 1975). Acidul docosahexaenoic (DHA) este unul dintre cele mai abundente componente lipidice structurale ale creierului. Acidul docosahexaenoic (DHA) la fel ca și acidul eicosapentaenoic (EPA), poate deriva din ingestia directă sau prin biosinteză din EPA sau LNA. Efectele metabolice ale dietei cu acizi grași ω_3 sunt reunite în lucrarea lui Osmundsen (2000), care demonstrează că acidul docosahexaenoic este cel mai eficient în inducerea β -oxidării peroxisomale. Reducerea activității Δ -9 desaturazei hepatice precum și a nivelului mRNA sunt reținute tot în sarcina acestui acid gras polinesaturat. Este analizat efectul inhibitor al acizilor grași polinesaturați în general și al acidului docosahexaenoic în particular asupra β -oxidării mitocondriale.

3.2. EFECTELE BIOCHIMICE ȘI PATOBIOCHIMICE ALE ACIZILOR GRAȘI OMEGA 3

3.2.1. METABOLISMUL EICOSANOIZILOR

Acidul arachidonic (ARA) și acidul eicosapentaenoic (EPA) sunt precursori ai produșilor metabolici, constând din 20 de atomi de carbon, cunoscuți sub denumirea generică de eicosanoizi (prostaglandine, tromboxani și leucotriene). Descoperirea prostaglandinelor urmată de recunoașterea că ARA (acidul arachidonic) este precursorul celei de-a doua serii de prostanoizi (prostaglandine și tromboxani) și a seriei a 4-a leucotriene, a relansat cercetările asupra acizilor grași $\omega 3$ și $\omega 6$.

Acidul arachidonic este metabolizat prin două căi majore :

Ciclooxigenaza convertește ARA la endoperoxizi și apoi la prostaglandine, la prostaciclina sau PGI_2 în celulele endoteliale sau la tromboxan A_2 în plachete. Acești prostanoizi au efecte fiziologice variate, efecte regulatorii în celulele implicate în răspunsul imun și inflamatoriu. Tromboxanul A_2 (TXA_2) produs în plachete cauzează agregarea plachetară și vasoconstricția, în contrast cu prostaciclina sau PGI_2 care inhibă agregarea plachetară și dilată microcapilarele coronariene. Efectele antagonice ale TXA_2 și PGI_2 sunt astfel vitale pentru funcția cardiovasculară.

Lipooxigenazele din diferitele surse celulare, ca de exemplu din celule sanguine, plămânului, artere, piele sau ochi, convertește ARA, la hidroxiperoxizi ai acizilor grași, apoi la hidroxi acizi și în final la leucotriene. Efectele multora dintre hidroxi acizi sunt încă obscure, dar leucotrienele prezintă un număr de efecte de primă importanță biologică.

Leucotrienele sunt implicate major în reacțiile inflamatorii și de hiper-sensibilitate. Acidul gras $\omega 3$,EPA este un inhibitor competitiv a lipooxigenazei tisulare. EPA este un bun substrat pentru 5-lipooxigenază în neutrofilele umane, fiind convertit la leucotrienele seriei 5, LTB_5 .

Creșterea concentrației EPA, diminuează nivelul ARA în plachete și reduce sinteza de TXA_2 . Aceasta conduce la reducerea agregării plachetare (trombocitare) și diminuarea riscului de tromboză., TXA_2 inducând constricție coronariană trebuie diminuat pentru reducerea riscului de spasm coronarian și ischemie. Creșterea aportului exogen de EPA , trebuie să descrească conversia ARA la leucotriene, diminuând constricția coronariană și spasmul, facilitând micro-circulația, prin reducerea vâscozității sanguine. Efectul acizilor grași $\omega 3$ asupra producerii de radicali liberi și distrugerii celulare în timpul reperfuziei după episoade ischemice, este un domeniu destul de fluid la acest moment. existând date pro și contra. Creșterea disponibilității de EPA în celulele endoteliale, reduce conversia ARA la PGI_2 , diminuând astfel vasodilatarea coronariană.

Efectele acizilor grași $\omega 3$ asupra mușchiului cardiac nu sunt încă, bine cunoscute deși există o sumă de evidențe extrem de bine fundamentate. Creșterea disponibilului de acizi grași $\omega 3$ (EPA și DHA) alterează, compoziția în acizi grași a fosfolipidelor membranare, în detrimentul ARA și LA. Acest fenomen de înlocuire la membrană este studiat în conjuncție cu funcțiile membranei. Compoziția membranei influențează anumite proprietăți ale acesteia, cum ar fi : transportul ionic, proprietățile receptoare, stabilitatea și peroxidarea acizilor grași polinesaturați.

Descoperirea de către Needleman în 1979, a faptului că prostaglandinele derivate din EPA au proprietăți diferite de cele derivate din ARA, a stimulat studiile asupra influenței uleiului de pește și aspectelor nutriționale ale prostaglandinelor. Competiția dintre cele două

clase diferite de PUFA, este prezentă în formarea prostaglandinelor : EPA și DHA, concură împreună cu ARA pentru sinteza prostaglandinelor și leucotrienelor la nivelul ciclooxigenazei și lipooxigenazei. La ingestia de pește sau ulei de pește, EPA și DHA, exogen, au tendința de a înlocui parțial acizii grași ω_6 , în special ARA, în membranele plachetare, eritrocitare, neutrofile, miocite și celule hepatice.

Rezultatul imediat al aportului exogen de EPA și DHA este :

1. **Descrescerea producției metaboliților prostaglandinei E_2 (PGE_2).**
2. **Descrescerea concentrației tromboxanului A_2 , un potent agregator plachetar și vasoconstrictor.**
3. **Descrescerea formării leucotrienei B_4 , un inductor al procesului inflamator și un puternic inductor al chemotaxisului și aderenței leucocitare.**
4. **Creșterea concentrației tromboxanului A_3 , un agregator plachetar și vasoconstrictor slab.**
5. **Creșterea concentrației prostacilinei PGI_3 , conducând la o creștere generală a prostacilinelor, fără creșterea PGI_2 . PGI_2 și PGI_3 sunt vasodilatatoare active și inhibitori ai agregării plachetare.**
6. **Creșterea concentrației leucotrienei B_5 , un inductor inflamator slab și un agent chemotactic cu potențial scăzut.**

3.2.2. ASPECTELE MOLECULARE ȘI ASPECTELE EXPRIMĂRII GENETICE ÎN RELAȚIE CU EICOSANOIZII

Compoziția în acizi grași a claselor fosfolipidice și conținutul în colesterol al biomembranelor sunt determinanți critici ai proprietăților fizice ale membranelor. Studii aprofundate au demonstrat corelația dintre compoziției, proprietăți fizice. pe de o parte și funcțiile membranare pe de altă parte. Astfel modificările : activității enzimatică integrală, fenomenelor de transport, dispunerea receptorilor membranari de suprafață, sunt reflectări directe ale alterărilor compoziționale.

Posibilitatea alterării compoziției lipidice membranare și funcțiilor ei in vivo când aportul exogen prin dietă de EPA este riguros controlat, dovedește implicarea acizilor grași esențiali în procesul de creștere și metabolism (Galli, 1994). Ca o consecință directă a manipulărilor de dietă, au loc interacții complexe și deplasări ale acizilor grași ω_3 și ω_6 , la nivelul lipidelor plasmatică și celulare. Procesele intime ale activării celulare. ca de exemplu generarea fosfoinozitelor sunt induse de acizii grași exogeni, din dietă (Galli 1989).

Efectele acizilor grași din dietă asupra căilor de biosinteză și activare a inozitol fosfatului, indică că modificările PUFA la nivel celular, afectează activitatea enzimatică responsabilă pentru generarea mediatorilor lipidici, în plus formarea produșilor derivați direct din aceștia (eicosanoizi). Acest fapt dovedește implicarea grăsimilor din dietă în funcționarea celulară (Raclot, 1999; Charnock, 1999).

Rolul acizilor grași ω_3 în controlul exprimării genetice este un domeniu intens cercetat la acest moment, căutând să se elucideze modul de implicare al factorului de dietă. Este bine cunoscut faptul că nutrienții de tipul hormonilor, influențează și controlul exprimării genetice, iar rezultatele studiilor relativ recente demonstrează o implicare mult mai profundă, (Rucker, 1986). Acizii grași ω_3 administrați sub formă de ulei de pește scad activitate acid gras sintetazei din ficat, aceasta pare a fi consecința diminuării concentrației mRNA acid gras sintetazei (Clarke 1988). Acizii grași ω_3 au fost și sunt studiați extensiv în relație cu efectele lor hipolipemice, antiateromatoase, antiinflamatorii, antitrombotice, vasculare, etc., (Jump 1999).

De altfel acizii grași ω_3 sunt cei mai bine cunoscuți acizi grași din punct de vedere biochimic și fiziologic al organismului uman.

3.2.3. EFECTELE HIPOLIPIDEMIANTE

Prima reunire a rezultatelor studiilor asupra acizilor grași ω_3 din uleiul de pește și reflectarea modificărilor induse în lipidele și lipoproteinele serice a fost făcută de Harris în 1989. Aceste efecte au fost analizate atât la voluntari sănătoși cât și la pacienți afectați de hiperlipidemie primară, hipercolesterolemie izolată (tip IIa), hiperlipidemie combinată (tip IIb) și hipertrigliceridemie (tip IV și V).

Hipercolesterolemia a fost definită prin scăderea concentrației colesterolului din lipoproteinele de densitate scăzută (LDL) > 4.14 mmol/L și hipertrigliceridemia a fost caracterizată printr-o concentrație plasmatică a triacilglicerolilor excedând valorii de 2.26 mmol/l. Au existat variații relativ marcate în protocolul acestui studiu. Cantitatea de ulei de pește a variat de la 1.60 g/zi la 100 g/zi și concentrația acizilor grași ω_3 a fost cuprinsă între 0.5 și 25 g/zi. Durata studiului a fost cuprinsă între 2 săptămâni și 2 ani. S-au administrat acizi grași ω_3 atât în formă naturală (extract total din ficat de cod) cât și condiționat, metil esterii de acizi grași sau etil esterii EPA purificați.

Efectele asupra subiecților normali. Harris în 1989 nu a găsit o influență a acizilor grași ω_3 asupra concentrației colesterolului din LDL, dar a descris o ușoară creștere în cazul concentrației colesterolului din HDL (lipoproteine de mare densitate) (aprox. 3%) și o diminuare cu 25% a concentrației de triacilgliceroli. Alte studii au marcat rezultate similare. (Sunders, 1983; Mortensen, 1983; Nagakawa, 1983; Zuker, 1988).

Efectele asupra pacienților. La pacienți cu hiperlipidemie tip IIa, aportul exogen de acizi grași ω_3 nu modifică concentrația colesterolului total sau a colesterolului legat de LDL, crește neesențial HDL, în schimb scade marcat triacilglicerolii serici. În cazul subiecților cu hiperlipidemie combinată tip IIb, concentrația colesterolului total nu este afectată.

Colesterolul conținut de LDL, respectiv HDL, crește cu 5-7%, în timp ce concentrația triacilglicerolilor se diminuează esențial cu aproximativ 38%. Studii similare au confirmat aceste rezultate. La pacienți afectați de hipertrigliceridemie izolată, concentrația colesterolului total și triacilglicerolilor descrește cu 8%, respectiv 52%, în contrast cu colesterolul din LDL și HDL, care crește cu 30%, respectiv 10%. Descreșterea în colesterolul total este rezultatul scindării lipoproteinelor de foarte joasă densitate (VLDL). În cazul pacienților cu hiperlipidemie tip IV, concentrația de colesterol din LDL crește cu 20%. Acest studiu sugerează faptul că tipul hipolipidemiei studiate determină răspunsul la suplimentarea, alterarea, dishomeostazia, acizilor grași ω_3 .

Concluzionând, efectele acizilor grași ω_3 asupra colesterolului seric nu diferă esențial de cel al altor acizi grași polinesaturați.

Acizii grași ω_3 , când înlocuiesc acizii grași saturați în dietă, au tendința de a scădea concentrația colesterolului seric, în plus descreșc semnificativ triacilglicerolii serici, spre deosebire de acizii grași ω_6 (Philipson, 1985). Considerând aceste efecte ale acizilor grași ω_3 asupra concentrației colesterolului din LDL, întrebarea care se pune firesc este dacă această creștere a LDL, este sau nu semnificativă pentru majorarea riscului la ateroscleroză la pacienți afectați de hiperlipidemie tip II și IV, în conjuncție directă cu efectul, antitrombotic, antiinflamator și antivasorestrictiv al acizilor grași ω_3 . Există posibilitatea ca acest tip nou de LDL să nu fie aterogene sau efectul să fie extrem de diluat, în acest sens existând studii pe model, (Park, 1985, 1987, 1989; Connor, 1991). Teoretic, EPA și DHA pot altera rata sau calea oxidării LDL *in vivo* și astfel să aibă loc o reducere a potențialului aterogenetic, nereflectat până la acest moment sau chiar o creștere momentană a LDL.

Nestel în 1984 semnala un fapt de mare interes : **consumul moderat de ulei de pește (acizi grași ω 3), reduce concentrația colesterolului plasmatic, chiar în eventualitatea în care aportul de colesterol diurn în organismul uman este ridicat.** Această observație este consistentă în relație cu scăderea ratei afecțiunilor cardiovasculare la populațiile consumatoare de carne de pește. Subiectul va fi reluat cu o extremă rigurozitate de către Pirich și Mazier în 1999.

Studiile efectuate pe om au arătat că acizii grași ω 3, din uleiul de pește reduc rata secreției hepatice de triacilgliceroli din VLDL (Sanders ,1985; Harris ,1984; Nestel ,1984; Conor ,1986, Duriez,1999). La subiecții normo-lipemici, acizii grași ω 3 previne hipertrigliceridemia prin conversie rapidă la carbohidrați. În acest moment există suficiente probe, din studiile cinetice care să ateste că uleiul de pește (acizii grași ω 3) crește rata fracționării catabolice (FCR-facturing of cathabolic rate) a VLDL (Sanders ,1985; Harris 1984; Nestel ,1984; Conor ,1986).

Uleiul de pește scade efectiv concentrația lipidelor plasmatică și apolipoproteinei E, în cazul pacienților cu hipertrigliceridemie. Concentrația apolipoproteinei B, în acest caz crește aproximativ proporțional. Conținutul lipidic și apolipoproteic din VLDL descrește, în timp ce conținutul de colesterol și apo B din LDL, notează o creștere semnificativă. În concluzie tratamentul pacienților ce prezintă valori plasmatică ridicate ale triacilglicerolilor cu ulei de pește cauzează efecte diferențiate asupra subfracțiilor VLDL, diminuând legarea LDI la receptorii fibroblastici, care pot contribui în mod paradoxal la creșterea concentrației colesterolului cuplat de LDL (Hsu, 2000).

O altă considerație importantă este descreșterea concentrației triacilglicerolilor după un consum constant de acizi grași ω 3. În anul 2000, Roche studiind relația dintre compoziția VLDL și concentrația de LDL, ajunge la concluzia că un aport exogen 1g PUFA ω 3/zi, ar fi suficient pentru optimizarea metabolismului triacilglicerolilor, diluând astfel factorul de risc al afecțiunilor coronariene.

Subiectul de mare actualitate face la acest moment obiectul studiilor de anvergură menite să elucideze mecanismele de răspuns farmacologice.

3.2.4. ACȚIUNI ANTIATEROMATOASE

Acțiunile antiateromatoase ale acizilor grași ω 3, sunt susținute de un număr de studii, pe model animal.

La câini hrăniți cu o dietă bogată în acizi grași saturați și colesterol, suplimentarea cu ulei de pește previne hiperplazia indusă (Landymore, 1986). În cazul modelului, hiperlipemic porcin, suplimentarea dietei cu ulei extras din ficatul de cod reduce dezvoltarea aterosclerozei coronariene, fără o modificare semnificativă a concentrației lipidelor plasmatică la subiecți față de lotul de control. În cazul modelului primatelor, substituirea grăsimilor cu acizi grași ω 3, inhibă aterogeneza în aortă, carotidă și arterele femurale (Davis,1987).

Utilizând modelul ateriogenetic la iepure, Thiery și Seidel în 1987, demonstrează că uleiul de pește bogat în acizi grași ω 3, crește cantitatea de colesterol inducând aterogeneza, în contrast cu Zhu, care raportează în 1988 o inhibare a procesului aterosclerotic.

Factorii ce afectează aterogeneza și modul direct sau indirect în care acizii grași ω 3 influențează acest proces a fost sintetizat de în 1998 de Leaf în tabelul 3.6.

mult diminuată, vâscozitatea sângelui integral este redusă și fluiditatea membranei eritrocitare este crescută. A fost raportată o relație de direct proporționalitate între aportul de acizi grași ω_3 și concentrația activatorului plasminogenic, pe de o parte și invers proporționalitate cu inhibitorul plasminogenic, (Barcelli ,1985). Fibrinogenul are o scădere semnificativă după aportul alimentar de acizi ω_3 .

Studiile prin tehnica dublu orb au demonstrat o scădere a concentrației fibrinogenului, ulterioară ingestiei de acizi grași ω_3 , în hiperliproteinemia tip IV (Radack ,1989). O scădere a fibrinogenului a fost descrisă și în alt studiu dublu orb, efectuat pe 64 de bărbați, cu vârsta cuprinsă între 35-40 ani, distribuiți aleator în două grupuri, (Hostmark .1988). Au fost semnalate modificări plachetare cantitative și dimensionale, precum și alterări ale timpilor de sângerare. Supraviețuirea plachetelor nu a fost alterată. Datorită modificărilor de număr și dimensiune invers proporțional nu au fost semnalate modificări ale masei plachetare (Goodnight ,1986). După întreruperea aportului de acizi grași ω_3 , numărul plachetar revine la normal, în unele cazuri înainte de stabilizarea normală, apare un nivel superior cu 10-15% față de normal. Aceste efecte ale acizilor grași ω_3 asupra plachetelor și megacriocitelor nu este încă pe deplin elucidat , comportând foarte multe discuții și interpretări. Particular, aceste efecte ale acizilor grași ω_3 asupra creșterii timpului de sângerare pune o întrebare firească, asupra semnificației clinice, și al eventualelor efecte adverse.

În anul 1984, Saynor, și Archer în 1998 ,au investigat efectul acizilor grași ω_3 , în doze diferențiate asupra timpului de sângerare. Cu o doză de 1.8 g. EPA nu au fost semnalate modificări, la 4.0 g. timpul de sângerare crește numărul plachetar scăzând, fără însă a fii observate efecte adverse. În 1990, DeCaterina a urmărit comportamentul a 13 bărbați și 2 femei, care au primit pre-operator (grefă bypass coronariană) 3.0 g. EPA și 1.3 g. DHA zilnic, timp de 28 de zile. Lotul de control a cuprins 14 bărbați și 1 femeie, grup omogen ca vârstă cu pacienții, care au fost supuși aceluiași tip de intervenție chirurgicală. În afară de creșterea timpului de sângerare și creșterea PGI_2 , pierderea de volum sanguin intraoperator nu a fost crescută la grupul test. Efectele dietei bogate în acizi grași asupra factorilor de coagulare și fibrinolitik la subiecții sănătoși a fost extensiv studiat de Turpeinen (1999).

3.2.6. EFECTE VASCULARE

Investigații elaborate, au demonstrat că acizii grași ω_3 , inhibă producerea factorului plachetar derivat de creștere (PDGF–Platelet Derived Growth Factor), Fox, 1988 și măresc eliberarea factorului endotelial derivat de relaxare, (EDRF – Endothelium Derived Relaxing Factor) (Shimokawa ,1988).

Acizii grași ω_3 reduc producția de proteină PDGF, în celulele endoteliale bovine, ceea ce conduce imediat la inhibarea migrării și proliferării celulelor mușchiului neted, fibroblaștilor și macrofagelor în peretele arterial, după Fox (1988). Endoteliumul eliberează un EDRF, foarte probabil oxid de azot. Când modelele animale au primit ulei din ficat de cod, biochimic vorbind în fapt, EPA plus DHA., aceștia favorizează eliberarea factorilor de relaxare, care la rândul lor facilitează relaxarea în arterele mari și rezistența vasculară (Shimokawa, 1988). De asemenea în prezența EPA, în culturi de celule endoteliale, crește eliberarea factorilor de relaxare, indicând de fapt **un efect direct al acizilor grași asupra celulei.**

Este presupus că EDRF contribuie la efectul antitrombotic și antiaterosclerotic al acizilor grași ω_3 , relaxând vascularizația musculaturii netede și inhibând agregarea plachetară. Creșterea PGI_2 , a fost demonstrată pe fragmente tisulare din aortă, atrium și vena safă obținute de la subiecți tratați cu acizi grași ω_3 , (DeCaterina.1990). Această constatare este extrem de importantă deoarece se lărgeste câmpul informațional asupra efectelor acizilor grași ω_3 , în conjuncție cu peretele vascular uman, foarte diferit uneori ca

răspuns de modelul animal. Un bun exemplu, este faptul că la șobolan nu se formează PGI₃, după un aport de acizi grași nesaturați ω₃ (Hornstra, 1981; Clup, 1979), pe când organismul uman reacționează contrar (von Schacky, 1985). În acest context apare evidentă necesitatea utilizării studiilor pe om.

Tabel 3.6
Factori care afectează aterogeneza (după Leaf, 1998).

FACTORI	EFFECTUL A.G. ω ₃	FUNCȚIA	REFERINȚE
Tromboxan	↓	Agregare plachetară Vasoconstricție	Dyerberg (1976)
Prostaciclina	↑	Previne agregarea plachetară Vasodilatație	Von Schacky (1985)
Leucotriene	↓	Chemoattractant neutrofilic și agregator	Lee (1985)
Fibrinogen	↓	Factor de coagulare	Hostmark (1988)
Factor activator plachetar	↓	Activează plachetele	Sperling (1987)
Factor plachetar derivat de creștere,	↓	Chemoattractant și mitogen pentru mușchiul neted și macrofage	Fox (1988)
Superoxid format de leucocite,	↓	Distrugere celulară Crește captarea de LDL în macrofage	Fisher (1990)
Interleukina-1 și Factorul tumoral necrozant	↓	Exprimă aderența endotelială a moleculelor-1 Stimulatori PAF Inhibitori ai activatorului plasminogenic Stimulatori ai proliferării celulelor mușchiului neted Stimulează formarea superoxidului neutrofilic	Endres (1989)
Factorul derivat endotelial de relaxare	↑	Reduce răspunsul constrictor arterial Protejează suprafața endotelială	Shimokawa (1989), Malis (1991)
Activitatea fibrinolitică,	↑	Dizolvă cheagul sanguin	Brown (1991)

3.2.7. EFECTE ANTIARITMICE

Moartea cardiacilor este frecvent, o consecință a unei fibrilații ventriculare severe sau o aritmie cardiacă terminală. Studiile experimentale pe mușchi papilar izolat de șobolan și maimuță au indicat că susceptibilitatea la aritmie catecolaminică indusă la animale ce au primit acizi grași ω₃ este mult diminuată față de cele ce au primit ω₆ sau o dietă săracă în grăsimi (Charnok, 1991).

Indometacinul, (acidul p-(p-clorbenzoil)-5metoxi-2metilindol-3-metil-acetic) minimizează aceste efecte *in vitro*, sugerând un mecanism de operare apropiat eicosanoizilor

(prostaciclinelor). În studiile pe primare, hrănite câteva luni, cu o dietă bogată în ulei de pește, funcția cardiacă este mult îmbunătățită și vulnerabilitatea inimii la dezvoltarea aritmiei cardiace a fost mult redusă, când subiectul a fost supus la un stress ischemic. Burr a studiat în anul 1989, efectele intervenției dietei în prevenirea secundară a infarctului miocardic. Un aport cantitativ modest de acizi grași ω_3 , de 2-3 ori pe săptămână (3 g. ulei de pește zilnic) reduce în toate cazurile mortalitatea cu 29%, pe o perioadă de 2 ani, foarte posibil datorită prevenirii decesului prin aritmie.

Primele studii prin care s-a încercat explicarea mecanismului acțiunilor antiaritmice ale EPA și DHA, au fost inițiate de McLennan în anul 1985 apoi continuate în 1992 și 1993. Având confirmarea acestor studii de pionierat, Leaf (1998), a încercat să determine mecanismul în care acționează EPA și DHA, cercetările au fost efectuate pe cultură de miocite cardiace de șobolan. Concluziile studiului au fost surprinzătoare:

Aritmia stopează prompt când în mediul de cultură sunt adăugați acizi grași și revine imediat ce albumina extrage acizii grași din celule, dovedind că EPA sau DHA au nevoie numai de partiție ("dizolvare") de-a lungul lanțului acil al fosfolipidelor membranei celulare pentru exercitarea acțiunii antiaritmice, fără încorporare în fosfolipidele membranare sau legare covalentă la nici unul din constituenții membranare, în care caz ei nu ar mai fi putut fi extrași de BSA (Bovine Serum Albumin - albumina serică bovină) din celulă. Acest efect este datorat acizilor grași liberi care alcătuiesc PUFA și în nici un caz eicosanoizilor sau altor metaboliți.

În cazul în care s-a adăugat esterii etilici sau triacilglicerolii acizilor grași corespunzători nu s-a observat o depleție a fenomenului aritmic, numai acizii grași liberi manifestă proprietăți antiaritmice (Kang, 1994).

Structura biochimică necesară pentru un ca agent antiaritmice să se manifeste în maniera acizilor grași liberi, este o catenă lungă acil sau hidrocarbonată, cu mai mult de două duble legături nesaturate C=C, și un cap carboxilic liber. Urmărind acest raționament înseamnă că toți izomerii *trans* ai acidului retinoic manifestă această proprietate (Kang 1995; 1996).

În momentul în care investigatorii au găsit că acizii grași afectează canalele ionice din țesuturile excitabile cardiace, este de presupus că și celelalte țesuturi excitabile, mușchi, respectiv sistemul nervos, reacționează similar. Toate țesuturile excitabile utilizează același sistem de semnal electric, generat de curenții ionici prin canalele membranare de transport ionic.

3.2.8. EFECTELE ASUPRA RESTENOZEI

Aspectele antiateromatoase ale acizilor grași ω_3 , pe model animal sugerează posibilitatea utilizării lor în prevenirea restenozei la pacienți cu angioplastie. Cauza restenozei este obscură. Totuși, agregarea plachetară, proliferarea celulelor mușchiului neted, spasmul vascular coronarian, sunt considerate importante, determinante în restenoză. Rata favorabilă în angioplastie este ridicată, restenoza se întâlnește în 25-40% în leziunile dilatate după aproximativ 6 luni de la aplicarea procedurii. Studii minuțioase au dovedit că suplimentarea cu acizi grași ω_3 , înainte și după intervenția chirurgicală, este benefică, evoluția fiind mult mai favorabilă (Dehmer, 1988; Milner, 1988; Slack, 1987).

3.2.9. EFECTELE ASUPRA LIPOPROTEINEI (A)

Lipoproteina (a), [Lp(a)], este o proteină determinată genetic care are proprietăți aterogene și trombogene. Structura moleculară a Lp(a) este foarte asemănătoare plasminogenului.

Acizii grași ω 3 s-a dovedit a inhiba, inhibitorul activatorului plasminogenic, și astfel contribuind la fibrinoliză (Barcelli, 1985.) În acest caz era natural să se testeze efectul acizilor grași ω 3 asupra concentrației Lp(a), (Simopoulos, 1989). Aceste investigații au fost realizate pe 62 de pacienți, bărbați, care au avut un infarct miocardic cu 6 luni înainte de test. Ingestia de ulei de pește reduce concentrația triacilglicerolilor, reduce presiunea sanguină, conduce la o reducere semnificativă a Lp(a). Acest studiu este primul care evidențiază scăderea Lp(a), sub influența acizilor grași ω 3. Relativ recent Schmidt (1991), a arătat că acizii grași ω 3 reduc concentrațiile serice ale Lp(a), când cantitatea de Lp(a) este > 200 mg/L și nu există un efect notabil când este < 200 mg/L.

Ceva mai recent, Kostner și Herrmann, (1990) au comparat rezultatele obținute pe 35 de pacienți cu afecțiuni coronariene care au primit un concentrat de ulei de pește conținând 70%, ω 3 PUFA, cu un lot echivalent de control, care au primit ulei din semințe de cânepă. Au fost determinate: Lp(a), lipidele plasmatic, lipoproteinele și indicii hemostatici. Concentrația plasmatică a Lp(a), a fost redusă pentru lotul care a primit acizi grași ω 3, spre deosebire de lotul de control unde a rămas nemodificată. Concentrațiile colesterolului total, LDL-colesterol, apolipo-proteina B (apo B) au oscilat semnificativ pentru ambele loturi. HDL-colesterol și triacilgliceroli, descresc semnificativ numai în lotul tratat cu acizi grași ω 3 din ulei de pește. Nici unul dintre membri lotului cu ulei de pește nu au marcat o scădere a concentrațiilor plasmatic a Lp(a). Investigatorii au subdivizat participanții la acest studiu în două grupe : cei ce au răspuns și cei ce nu au răspuns la tratament. Două treimi din cei investigați au răspuns la tratament și au prezentat o scădere medie a Lp(a) cu aproximativ 24%. În acest studiu concentrația activatorului plasminogenic tisular a marcat o scădere în ambele grupuri cu aproximativ 16%. A existat concomitent o creștere nesemnificativă a PAI₂ (plasma activator inhibitor - activator plasmatic).

În anul 1990, Seed, a inițiat un studiu referitor la relația dintre concentrația serică a Lp(a) și apolipoproteina A (apo A) fenotip în afecțiunile coronariene cardiace (CHD – Coronary Heart Disease) , la pacienți cu hipercolesterolemie familială, arătând că “ nivelul median al lipoproteinei (a) la 54 de pacienți cu CHD, a fost de 57 mg/dl, valoare semnificativ crescută față de 18 mg/dl la 61 subiecți fără CHD.

Analiza funcțională discriminatorie, a arătat că nivelul lipoproteinei Lp(a), a fost cel mai bun factor de departajare (a variat dependent) între cele două loturi de subiecți (comparativi cu concentrația altor lipide și lipoproteine, vârstă, sex, și status “fumător-nefumător”). Autorii au concluzionat că “nivelul crescut al lipoproteinei (a) este un factor puternic de risc la CHD pentru pacienți cu hipercolesterolemie familială, și creșterea riscului este independentă de vârstă, sex, statusul fumător-ne fumător, și concentrația serică a colesterolului total”.

Un alt studiu asupra relației , apo A și CHD, la pacienți cu hipercolesterolemie familială, efectuat de Wiklund în 1990, are ca și concluzie finală **“Lp(a) are un determinism genetic, și poate fi utilă în identificarea în cadrul unui lot de subiecți cu hipercolesterolemie familială a celor cu risc, crescut la CHD.**

3.2.10. ALTE EFECTE

A fost demonstrat că acizii grași ω_3 în monocitele umane inhibă producția de factor activator plachetar PAF, (PAF–Platelet Activating Factor). Unul din efectele adverse ale PAF este activarea trombocitară, astfel contribuind la aterogeneză (Sperling, 1987).

Interleukina și factorul tumoral necrozant (TNF - Tumor Necrosis Factor) sunt reduse prin aportul exogen de acizi grași ω_3 . Amândouă, interleukina 1 (IL-1) și TNF sunt considerate aterogene deoarece ele stimulează sinteza moleculelor aderente, astfel cauzând aderarea monocitelor la celulele endoteliale. Ele activează trombocitele (plachetele), neutrofilele și monocitele.

În concluzie, multe studii indică faptul că acizii ω_3 par să diminueze sau să inhibe riscul și precipită factori, determinanți, în dezvoltarea afecțiunilor cardio vasculare. Acești factori au fost sumați de Simopoulos (1991) și sunt prezentați în tabelul 3.7. Noile acumulări în relație cu metabolismul interleukinei și expresia genetică, indică faptul că în adăție la efectele majore în metabolismul prostacilinei, acizii grași ω_3 au și alte valențe în comunicarea intra celulară. În aceste condiții apare evident efortul de cunoaștere și eventual de înțelegere a numeroșilor factorii inter și intracelulari, influențați de acizii grași ω_3 , precum și mecanismul lor de acțiune. Rămâne evident de demonstrat dacă este vorba de efectul terapeutic al acizilor grași ω_3 sau este un proces dishomeostatic.

Tabel 3.7.

Efectele acizilor grași ω_3 , exogeni și mecanismul implicat în dezvoltarea inflamației, aterosclerozei și răspunsului imun. (după Simopoulos, 1991).

REDUCE SAU INHIBĂ RISCUL ȘI/SAU PRECIPITĂ FACTORII	PRESIUNEA SANGVINĂ SAU/ȘI RĂSPUNSUL PRESIUNII SANGUINE
Acid arachidonic	Lipoproteine de foarte joasă și joasă densitate (VLDL, LDL)
Agregare plachetară	Triacilgliceroli
Formarea Tromboxanului A_2	Lipoproteină (a) [Lp(a)]
Funcționarea monocitelor sau/și macrofage	Fibrinogen
Formarea Leucotrienelor (LTB_4)	
Formarea factorului activator plachetar (PAF)	Vâscozitatea sângelui
Metaboliți toxici ai oxigenului	
Formarea Interleukinei 1 (IL-1)	Potențarea factorilor benefici sau /și protectivi
Formarea factorului necrozant tumoral (TNF)	Formarea Prostacinelor ($PGI_2 + PG_3$)
Factorul derivat de creștere plachetară (PDGF)	Leucotrienele B_5 (LTB_5) Interleukina 2 (IL-2)
Hiperplazia	Factorul endotelial derivat de relaxare (EDRF) Activitate fibrinolitice Deformabilitatea eritrocitară Lipoproteine de înaltă densitate

Sumând efectele fiziologice și farmacologice ale uleiului de pește, de fapt aport exogen de acizi grași nesaturați ω_3 putem concluziona :

- A. Descresc presiunea sanguină la subiecți normali și moderat hipertensivi, (Knapp, 1989).
- B. Descresc vâscozitatea sanguină (Terano ,1983).
- C. Descresc legarea albuminei vasculare la diabetici insulino-dependenți (Jensen 1989).
- D. Descresc concentrația triaciglicerolilor plasmatici (Phillipson ,1985).
- E. Descresc răspunsul vascular la norepinefrină (Lorenz ,1983).
- F. Descresc fibrilația ventriculară ischemică (McLennan ,1989).
- G. Descresc toxicitate glicozidelor cardiace *in vitro* (Billman ,1994).
- H. Descresc adeziunea plachetară, Lehr (1991).
- I. Descresc interacțiile leucocite/celule endoteliale (Wahlquist ,1989).
- J. Cresc complianța vasculară (Braden ,1990).
- K. Cresc activitatea trombolitică a ATP (Levine ,1989).
- L. Cresc supraviețuirea plachetară (trombocitară) (Cistola,1987).

3.3 . IMPLICAȚIILE BIOMEDICALE ALE ACIZILOR GRAȘI ESENȚIALI

3.3.1. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU AFECȚIUNI CORONARIENE

Volumul de informații referitor la efectele acizilor grași în general și acizilor grași ω_3 în particular în afecțiunile cardiovasculare este extrem de bogat. Suferința coronariană cardiacă, CHD este o afecțiune multifactorială cu determinism genetic, cu interacții multiple cu factorii de mediu, dieta și modul de viață contribuind la declanșarea sau /și agravarea ei. Toate hiperlipoproteinemiile amintite anterior au o componentă genetică semnificativă. S-a estimat că aproximativ 50% din variația concentrației colesterolului seric și 15% din variația concentrației fibrinogenului sunt datorate factorilor genetici.

Controlul normal și funcția cardiovasculară este reprezentată pe o arie extinsă pe suprafața genei, tehnici genetice laborioase de marcarea ADN-ului. fragmentarea - restricționarea polimorfă (RELP – Restriction - Fragment - Length Polimorphisms) și studiile de hibridizare *in situ* au dovedit acest lucru. Aceste noi tehnici de investigare genetică au fost utilizate în scopul evaluării factorului de risc pentru CHD, unul dintre cele mai importante aspecte ale strategiei prevenției și reducerii incidenței CHD. Identificarea precoce a indivizilor cu risc, genetic crescut constituie o strategie extrem de eficientă în prevenirea CHD.

În 1984, Goldstein, remarca că cele mai frecvente lipoproteinemii cu determinism genetic asociate cu CHD premature, includ: hiperlipidemia familială combinată (15%), hipertrigliceridemia familială (5%) și hipercolesterolemia familială (5%).

Ateroscleroza este o suferință complexă a arterelor și pereților arteriali. Interacția complexă a multor componente biochimice celulare și fizice au ca țintă finală peretele arterial. Dinamica celulară în ateroscleroză a fost evaluată de Faggiotto în anul 1986. care satutează că “ **ateroscleroza include un număr de procese patologice și prezintă multe aspecte ale afecțiunilor degenerative, inflamatorii și neoplasmului**”. În 1981, Ross publică cel mai important studiu asupra fenomenului aterosclerotic denumită “**Ateroscleroza : O problemă a biologiei celulelor peretelui arterial și interacția lui cu componentele**

sângelui”, în care sunt prezentate conceptele moderne asupra aterosclerozei. Ross în 1986 și Steinberg în 1989, fac o amplă analiză a subiectului, sintetizând și enunțând conceptele moderne asupra aterosclerozei, care pot fi rezumate în câteva cuvinte astfel : Primul pas în formarea aterosclerozei este o suferință nespecifică (funcțională) a endoteliului urmată de o acumulare a monocitelor și macrofagelor , ulterioare formării celulei și agregare plachetară (trombocitară). Plachetele eliberează factorul de creștere, care determină primar migrarea la mușchii neted și proliferarea. La acest moment colesterolul este depozitat în celulele mușchiiului neted și macrofagele în peretele vascular. Aceste evenimente conduc la formarea substanței bazale, eventual la formarea plăcii. Acizii grași $\omega 3$ exogeni sunt capabili să prevină creșterea componentelor celulare generate de aceste celule și interferează la diferite nivele în generarea și dezvoltarea proceselor aterosclerotice. Uleiurile vegetale, bogate în $\omega 6$ LA, s-au utilizat pentru scăderea concentrației colesterolului seric, factor considerat la un moment dat determinant în dezvoltarea CHD. Acumularea de noi cunoștințe asupra patofiziologiei procesului de tromboză coronariană a condus la ipoteza ca prevenirea activării plachetare și agregării sunt etape esențiale în prevenirea complicațiilor trombotice. Actualul context de cunoaștere sugerează că patofiziologia anginei instabile implică inducerea agregării trombocitare și tromboza.

Tabel 3.8.

Determinismul genetic și factorii ambientali de risc, implicați în CHD.

Determinanți genetici
Antecedente familiale de CHD la prima sau a doua copilărie
Concentrația colesterolului seric total, LDL și apo B
Concentrația HDL-colesterol, Apo A-I și Apo A-II
Lp(a)
Activitatea receptorului LDL
Tromboza și coagularea
Concentrațiile triacilglicerolilor și VLDL
REFLP în AND la locusul A-1/apo C-III și apo B
Alți markeri ai AND
Presiunea sanguină
Diabet
Obezitatea
Concentrația insulinei și răspunsul insulinic
Homocistinuria – stare de vector
Factori ambientali de risc
Fumatul
Sedentarismul
Dieta (excesul aportului energetic)
Aportul exogen ridicat de acizi grași lungi saturați
Aportul exogen scăzut de acizi grași $\omega 3$
Factori psihici
Personalitate de tip A
Clasa socială –factori economici

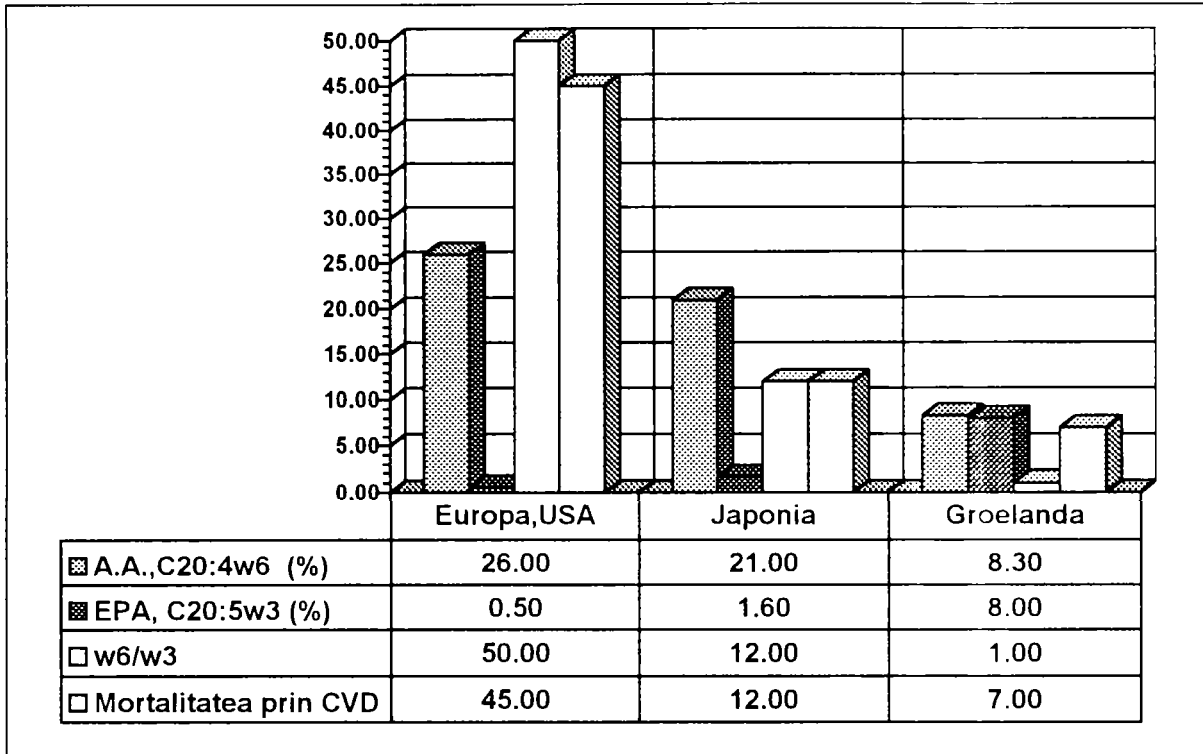


Fig. 3-3.
Diferențierea etnică în concentrația acizilor grași din fosfolipidele serice și frecvența afecțiunilor cardiovasculare (după Weber, 1989).

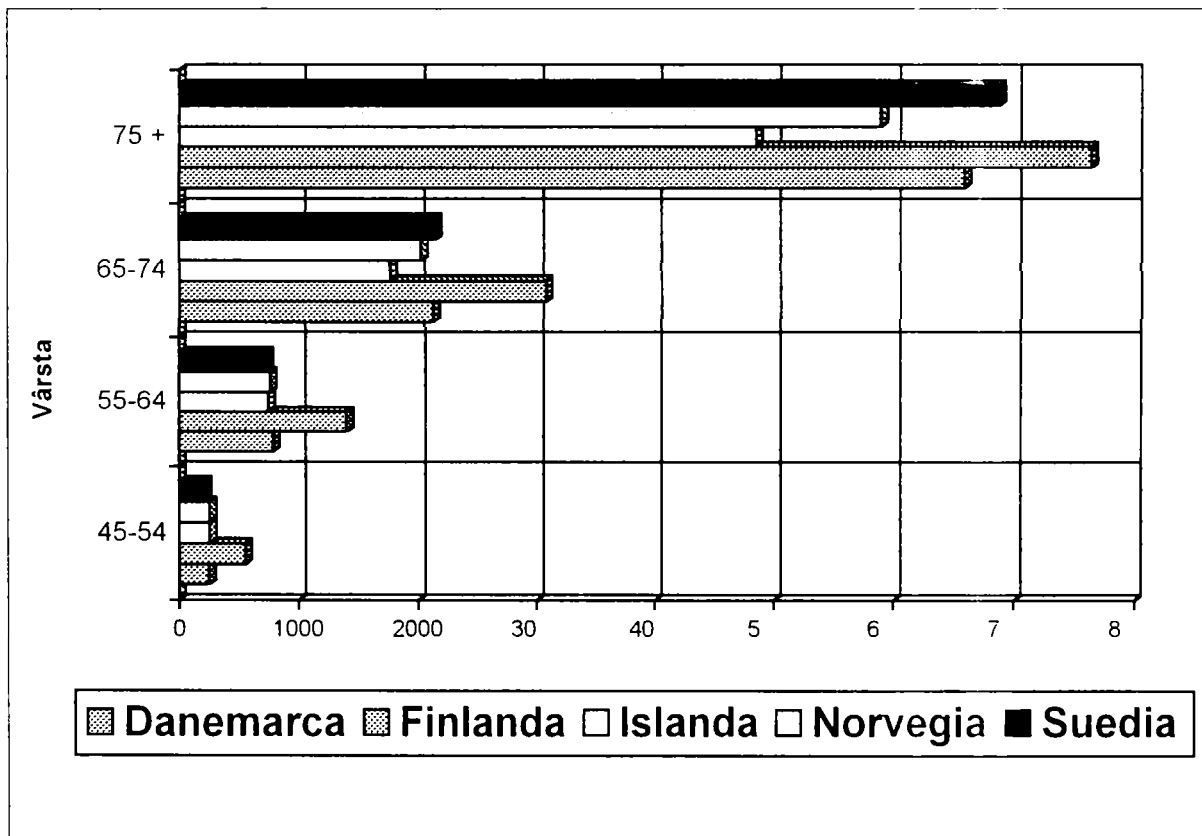


Fig.3-4.
Rata decesului (anual la 100 000 locuitori) datorat CVD în rândul bărbaților de vârste diferite între 1976-1980 în țările nordice (după Weber, 1989).

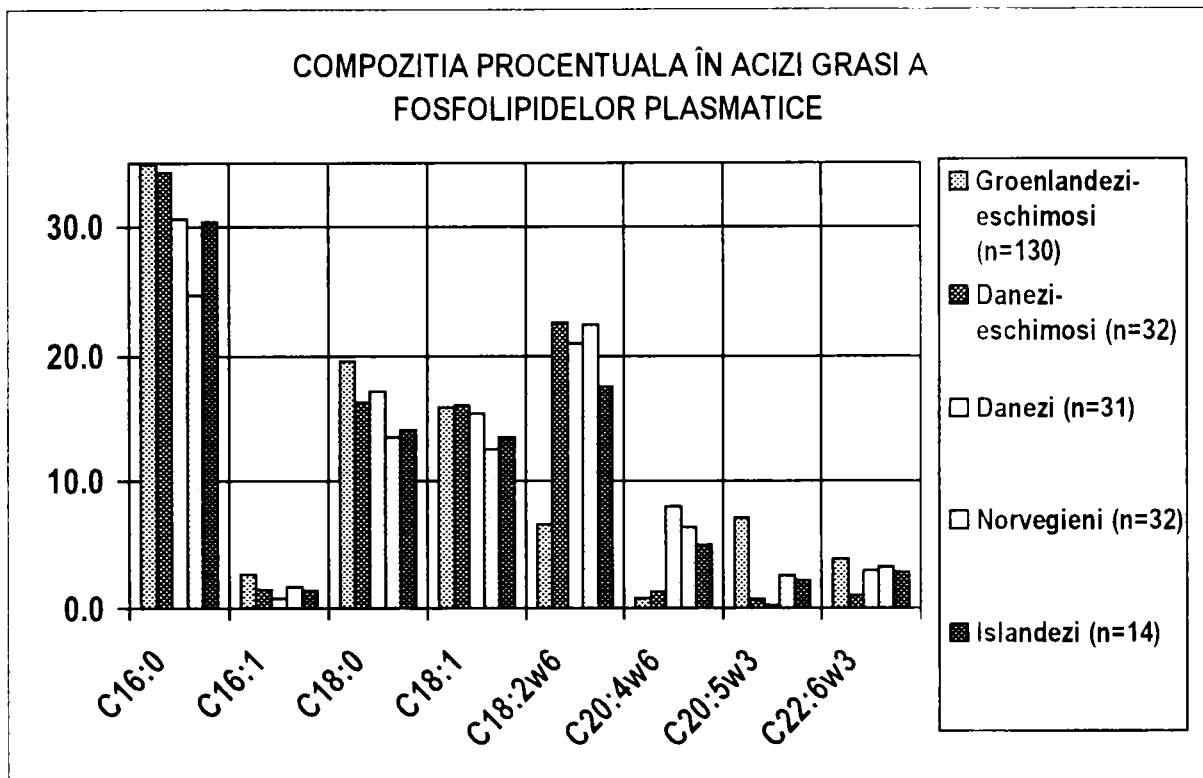


Fig.3-5.

Compoziția procentuală medie în acizi grași a fosfolipidelor plasmaticice la câteva tipuri de populații nordice (după Gudbjamson, 1989).

Studiile aprofundate au demonstrat implicarea activă a factorului de dietă în prevenirea și tratarea acestor afecțiuni, particular utilizarea extensivă a uleiului de pește. Evident, acizii grași ω_3 , uleiul de pește, singur nu este capabil să inducă eradicarea universală a aterosclerozei.

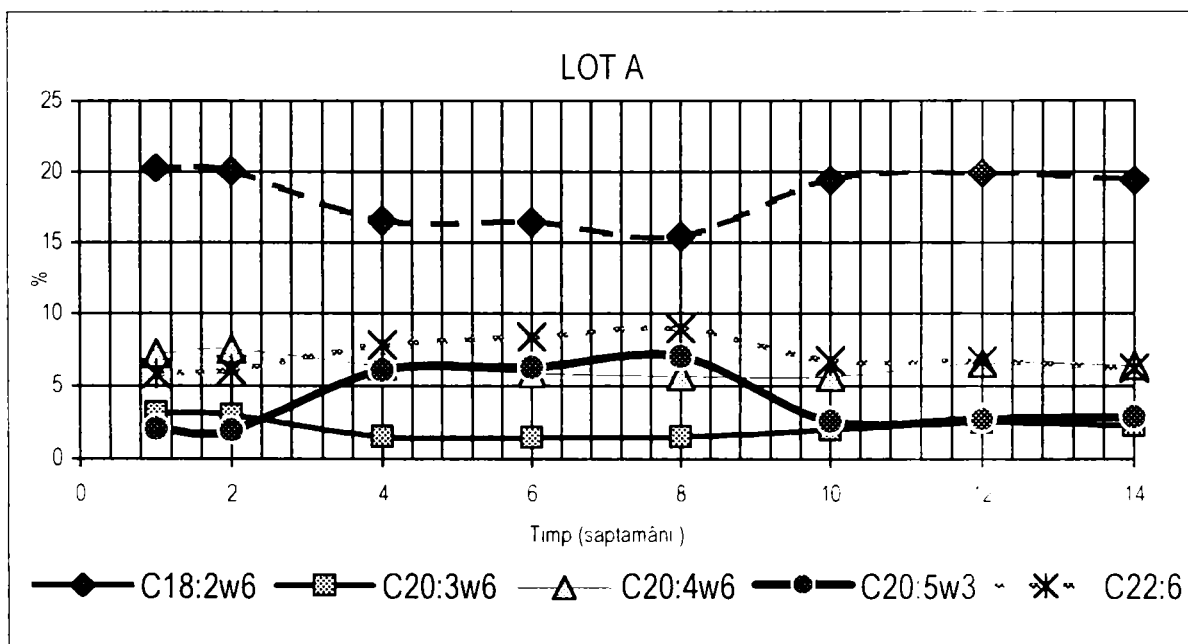


Fig. 3-6.

Variația medie procentuală a acizilor grași ω_3 și ω_6 din fosfolipidele plasmaticice la pacienții din lotul A.

Efectele favorabile ale acizilor grași ω_3 , semnalate de literatura de specialitate pot modifica incidența și cursul proceselor aterosclerotice.

În anul 1991, Dolecek și Grandis, au investigat factorii de dietă a unui grup cu risc, făcând distincție între aportul de acizi grași ω_3 și ω_6 ; au reușit corelația cu patru categorii de cauze de deces: CHD, CVD (în general), alte cauze și cancer. Între concentrația acizilor grași exogeni și factorii de deces s-a stabilit o relație invers proporțională. Cea mai scăzută rată de mortalitate a fost înregistrată pentru un aport mediu de 64 mg/zi (EPA sau DHA), când, comparând cu un aport exogen zero, mortalitatea pentru CHD, CVD, alte cauze cu a fost de 40%, 41%, respectiv 24% mai mică. O asociație inversă a fost semnalată între raportul C18:3 ω_3 /C18:2 ω_6 și mortalitatea datorată cancerului.

Populațiile mari consumatoare de pește ca eschimoșii și japonezii au o rată a infarctului miocardic, extrem de scăzută, figura și tabelul 3.3. adaptat după Weber 1989, ilustrează constatarea. Figura 3-3, sugerează profilul acizilor grași din fosfolipidele plasmatice în cazul a trei populații nordice, Danezi, Norvegieni și Islandezi, precum și la Eschimoșii trăitori în Groenlanda și Danemarca. De un interes particular este nivelul acizilor grași ω_6 și ω_3 , mai precis concentrația acizilor linolenic (LA), arachidonic (ARA), eicosapentaenoic (EPA) și docosahexaenoic (DHA). La populația eschimosă nivelul plasmatic al AA este extrem de scăzut. ARA este compensat de EPA și DHA și uneori de LA. Eschimoșii din Groenlanda și Danemarca au o concentrație plasmatică scăzută de ARA, sugerând implicarea atât a factorilor de dietă cât și a factorilor genetici. Populația eschimosă din Danemarca are un nivel relativ ridicat al LA, la fel ca restul ca și danezilor dar concentrația ARA rămâne scăzută, indicând reducerea desaturării LA și diminuarea conversiei LA la ARA. Studiile epidemiologice de durată lungă și medie au demonstrat descreșterea mortalității datorate CHD, la populații consumatoare a unor cantități relativ reduse de acizi grași ω_3 , (de preferat uleiul de pește) 0.5g/zi (1.5g ulei de pește) timp de 19 ani, respectiv 2 ani. Studiile farmacocinetice au stabilit cu destul de mare acuratețe relația doză-efect în cazul acizilor grași ω_3 . Interesant de menționat concluziile studiului efectuat de Gudbjarnson în 1989, referitoare la matricea acizilor grași ai fosfolipidelor plasmatice și incidența CVD. Un studiu multidirecțional elaborat de Skúladóttir (1990) a investigat amănunțit efectul acizilor grași ω_3 asupra pacienților afectați de infarct miocardic. Subiecții, bărbați cu infarct miocardic, au primit 20 ml ulei de ficat de cod (*Gadus morhua*) timp de 6 săptămâni. Protocolul studiului: Pacienții au fost divizați în două loturi, A și B. Grupa A a primit ulei de cod timp 6 săptămâni imediat după ieșirea din spital. Lotul B au primit un supliment de acizi grași ω_3 la 6 săptămâni după externare. Dieta, medicația și statusul fumător-nefumător au fost menținute pe cât posibil constant în această perioadă.

În timpul perioadei de administrare a uleiului din ficat de cod, concentrația EPA, și DHA, a crescut semnificativ în fosfolipidele, triacilgliceroli și esterii colesterolului plasmatice, în contrast cu LA, acidul dihomogama-linolenic (DHGLA-DiHomo-Gamma-Linolenic Acid, C20:3 ω_6) și acidul arachidonic, ARA, care au scăzut semnificativ în fracția fosfolipidică. Concentrația plasmatică a triacilglicerolilor a fost semnificativ scăzută în timpul administrării de acizi grași ω_3 . Concentrațiile colesterolului total, colesterolului legat de lipoproteinele de înaltă densitate (HDL), apolipoproteinele A1 și B, nu au fost afectate de aportul de acizi grași ω_3 . Surprinzător este modul în care acizii grași ω_3 substituie în fosfolipide acizii ω_6 . De fapt studiul elaborat de Skúladóttir în anul 1990 este nu numai o descriere biochimică cazuistică ci se constituie într-o investigație mult mai largă, biomoleculară și farmacocinetică generalizată. Este cu atât mai interesant de urmărit rezultatele obținute de cercetătorii islandezi cu cât se pot trage concluzii valoroase referitoare la cinetica procesului de substituție, poate fi privită ca o cinetică la doză repetată. Tabelul 3.9., redă variația acizilor grași în fosfolipidele plasmatice la pacienți cu antecedente de infarct miocardic în timpul tratamentului cu acizi grași ω_3 .

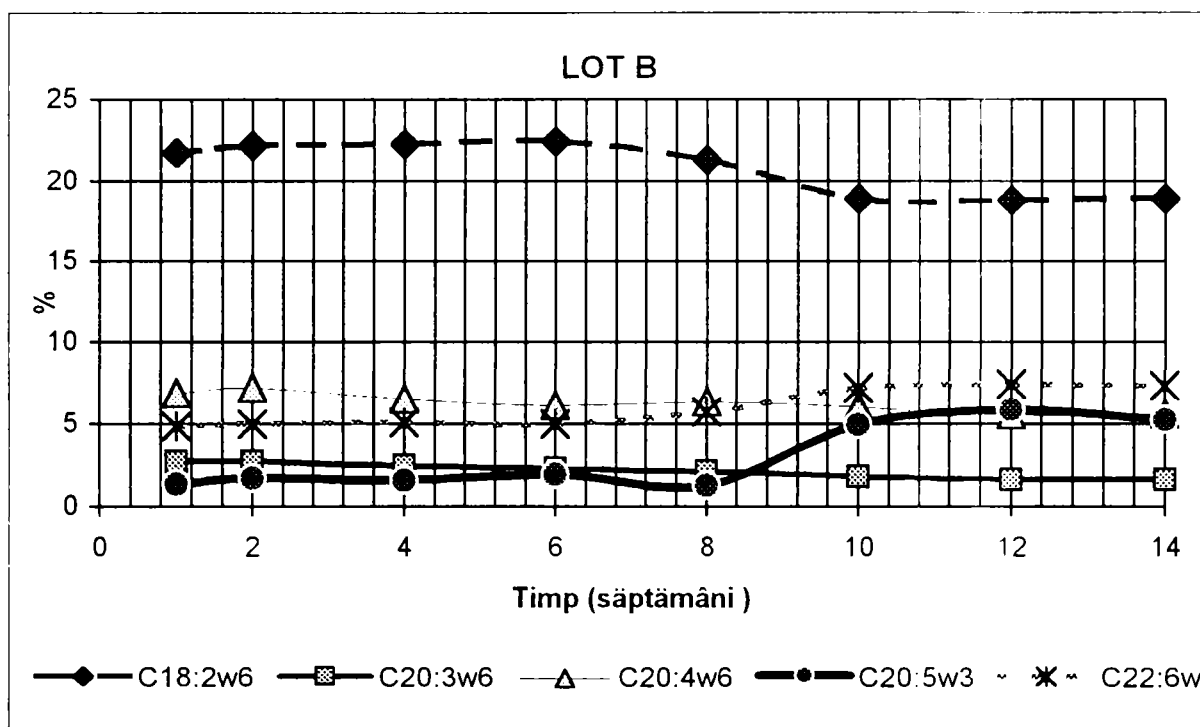


Fig. 3-7.

Variația medie procentuală a acizilor grași ω3 și ω6 din fosfolipidele plasmatice la pacienții din lotul B.

Analiza grafică a valorilor medii ale acizilor grași conținuți de fracția fosfolipidică este prezentată în detaliu în figurile 3-6.,3-7. Timpul T=1 corespunde la o săptămână după infarct, T=2 corespunde la 2 săptămâni după infarct (la externare). Timpul T = 1 corespunde la o săptămână după infarct, T = 2 corespunde la 2 săptămâni după infarct (la externare).

Analiza rezultatelor prezentate în tabelele 3.9. – 3.11. confirmă cele enunțate referitor la efectele acizilor grași ω3 în relație cu afecțiunile cardiovasculare, indubitabil poate fi luată în discuție fenomenul dishomeostatic indus dar și cel premergător stării patologice. Ca o observație interesantă, analizând matematic valorile medii obținute de Skúladóttir în 1990 atât pentru lotul A, cât și pentru lotul B, variațiile ascultă de o ecuație de forma :

$$y^{-1} = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4 + fx^5$$

coeficientul de corelație r^2 pentru valorile luate în analiză a fost cuprins între 0.80-0.95, denotând o corelație excelentă.

De remarcat raportul de invers proporționalitate. Factorii ecuației, au variat în limite strânse, fără a putea să le găsim o interpretare biomoleculară sau cinetică certă, este evident că cel puțin unul dintre ei descrie procesul de absorbție.

Importanța corelației matematice pentru valorile medii, chiar dacă terapeutic vorbind, medicul va acorda o atenție limitată și evident diluată acestui fapt, din punct de fiziologic, farmacologic și biochimic apar semne evidente de legătură cauzală tip doză-efect, ce ridică noi semne de întrebare dar generează și răspunsuri care într-un viitor apropiat vor fi la baza unor clase noi de produse medicamentoase. Caracteristicile esențiale ale acestor produse sunt spectrul larg și agresivitatea redusă față de organism.

Tabel 3.9.

Modificările procentuale ale acizilor grași din fosfolipidele plasmatice la pacienți cu infarct miocardic în timpul experimentului (după Skuladottir, 1990).

Acid Gras	7 zile după IM	La Externare	Timpul după externare (săptămâni)					
			2	4	6	8	10	12
FOSFOLIPIDE								
Lot A (n=8)								
18:2 ω 6	20.22 ± 0.86	20.05 ± 0.64	16.50 ± 1.86	16.44 ± 1.53	15.43 ± 1.40	19.39 ± 1.96	19.90 ± 0.66	19.39 ± 1.95
20:3 ω 6	3.18 ± 0.23	3.05 ± 0.32	1.53 ± 0.22	1.49 ± 0.35	1.55 ± 0.29	2.04 ± 0.27	2.55 ± 0.37	2.31 ± 0.32
20:4 ω 4	7.26 ± 0.58	7.56 ± 0.64	6.42 ± 0.55	5.91 ± 0.61	5.70 ± 0.33	5.63 ± 0.45	6.58 ± 0.43	6.45 ± 0.34
20:5 ω 3	2.07 ± 0.20	1.99 ± 0.29	6.09 ± 0.59	6.29 ± 0.58	7.03 ± 0.78	2.62 ± 0.46	2.72 ± 0.48	2.91 ± 0.71
22:6 ω 3	5.87 ± 0.31	6.10 ± 0.44	7.85 ± 0.60	8.36 ± 0.54	8.96 ± 0.76	6.77 ± 0.84	6.76 ± 0.65	6.23 ± 0.87
Lot B (n=5)								
18:2 ω 6	21.74 ± 1.35	22.19 ± 1.00	22.29 ± 0.89	22.46 ± 1.05	21.31 ± 1.23	18.95 ± 0.69	18.84 ± 0.58	18.95 ± 0.94
20:3 ω 6	2.70 ± 0.37	2.73 ± 0.25	2.44 ± 0.13	2.27 ± 0.16	2.11 ± 0.22	1.78 ± 0.18	1.61 ± 0.10	1.62 ± 0.16
20:4 ω 4	6.88 ± 0.81	7.19 ± 0.58	6.52 ± 0.38	6.16 ± 0.33	6.37 ± 0.34	6.04 ± 0.41	5.59 ± 0.33	5.60 ± 0.51
20:5 ω 3	1.34 ± 0.42	1.73 ± 0.62	1.57 ± 0.60	1.93 ± 0.54	1.27 ± 0.37	4.96 ± 1.77	5.89 ± 1.61	5.26 ± 1.43
22:6 ω 3	4.86 ± 0.23	5.00 ± 0.25	5.10 ± 0.53	4.98 ± 0.59	5.74 ± 0.62	7.20 ± 0.38	7.41 ± 0.28	7.32 ± 0.23

Marea majoritate a supraviețuitorilor unui infarct miocardic au prezentat una sau mai multe anomalități lipoproteice:

1. creșteri ale concentrației LDL-colesterolului,
2. creșterea concentrației chilomicronilor remanenti și lipoproteinei de densitate intermediară (IDL).
3. creșterea concentrației plasmatice a Lp (a).
4. scăderi semnificative ale concentrației HDL-colesterolului, uzual escortate de creșterea titrului triacilglicerolilor și VLDL.

Mecanismul precis prin care fiecare sau toate la un loc din aceste anomalități cauzează CHD, este încă în aria de interes a cercetătorilor, contribuția genetică a acestor lipoproteine suportă la acest moment discuții fără prea multe controverse. viitorul apropiat fiind menit să aducă lumină și în acest domeniu.

Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico (GISSI)-Prevezione Study, a generat și evaluat cel mai amplu proiect de studiu asupra influenței acizilor ω 3 în afecțiunile cardiovasculare.

Tabel 3.10.

Modificările procentuale în matricea acizilor grași din esterii colesterolului plasmatic la subiecți cu infarct miocardic în antecedente (după Skúladóttir, 1990)

Acid Gras	7 zile după IM	La Externare	Timpul după externare (săptămâni)					
			2	4	6	8	10	12
COLESTEROL ESTERIFICAT								
Lot A (n=8)								
18:2 ω 6	45.16 \pm 2.61	46.14 \pm 3.98	37.89 \pm 3.04	43.10 \pm 2.57	40.95 \pm 3.39	43.02 \pm 4.59	45.53 \pm 1.21	42.13 \pm 3.33
20:5 ω 3	1.78 \pm 0.21	1.81 \pm 0.23	6.97 \pm 1.10	6.2 \pm 1.08	7.20 \pm 0.59	3.23 \pm 0.66	3.00 \pm 0.67	2.86 \pm 0.88
22:6 ω 3	1.04 \pm 0.08	1.06 \pm 0.12	1.51 \pm 0.19	1.6 \pm 0.07	1.78 \pm 0.15	1.53 \pm 0.18	1.30 \pm 0.21	1.11 \pm 0.20
Lot B (n=5)								
18:2 ω 6	50.18 \pm 2.76	48.87 \pm 1.83	51.54 \pm 3.20	51.35 \pm 3.04	52.91 \pm 1.66	46.62 \pm 2.20	48.17 \pm 2.35	46.86 \pm 3.00
20:5 ω 3	1.20 \pm 0.13	1.21 \pm 0.12	1.18 \pm 0.27	1.77 \pm 0.44	1.43 \pm 0.14	4.38 \pm 1.59	5.71 \pm 0.53	5.64 \pm 1.05
22:6 ω 3	1.00 \pm 0.06	1.08 \pm 0.13	0.94 \pm 0.03	1.05 \pm 0.21	1.05 \pm 0.19	1.40 \pm 0.28	1.52 \pm 0.12	1.51 \pm 0.18

Studiul deschis, aleator, desfășurat din septembrie 1993 până în septembrie 1995, pe 11 324 de subiecți care au supraviețuit unui infarct miocardic cu cel puțin trei luni în urmă.

Tabel 3.11.

Modificările procentuale în matricea acizilor grași din triacilgliceroli plasmatici la subiecți cu infarct miocardic în antecedente (după Skúladóttir, 1990)

Acid Gras	7 zile după IM	La Externare	Timpul după externare (săptămâni)					
			2	4	6	8	10	12
TRIACILGLICEROLI								
Lot A (n=8)								
18:1 ω 9	33.55 \pm 1.62	33.94 \pm 3.03	29.20 \pm 1.53	28.64 \pm 2.07	30.35 \pm 3.12	29.12 \pm 3.43	31.01 \pm 3.07	31.69 \pm 3.04
20:5 ω 3	0.45 \pm 0.09	0.33 \pm 0.10	1.70 \pm 0.26	1.81 \pm 0.41	1.56 \pm 0.34	0.61 \pm 0.14	0.57 \pm 0.09	0.38 \pm 0.05
22:6 ω 3	1.80 \pm 0.32	1.18 \pm 0.23	3.51 \pm 0.42	3.26 \pm 0.36	3.61 \pm 0.47	1.98 \pm 0.34	1.75 \pm 0.23	0.98 \pm 0.08
Lot B (n=5)								
18:1 ω 9	33.81 \pm 0.27	33.94 \pm 0.63	32.82 \pm 2.15	30.46 \pm 1.86	31.00 \pm 3.26	30.84 \pm 1.64	28.88 \pm 2.17	29.14 \pm 1.19
20:5 ω 3	0.29 \pm 0.08	0.36 \pm 0.06	0.33 \pm 0.03	0.47 \pm 0.11	0.70 \pm 0.24	1.17 \pm 0.30	1.23 \pm 0.19	1.68 \pm 0.85
22:6 ω 3	1.05 \pm 0.18	1.18 \pm 0.09	0.98 \pm 0.17	1.42 \pm 0.19	1.48 \pm 0.08	2.64 \pm 0.39	3.77 \pm 0.95	3.76 \pm 1.17

Lotul observat a fost structurat după cum urmează : 2 836 de subiecți, au primit 1g (capsule de 875 mg, ulei de pește conținând 850-882 mg acid eicosapentenoic și docosahexaenoic) de acizi grași polinesaturați zilnic, 2 830 au primit 300 mg de Vitamina E zilnic, 2 830 au primit cele două produse farmaceutice. Lotul de control a fost format din 2 828 subiecți care nu au primit medicație timp de 3.5 ani.

Subiecții acestui studiu au fost monitorizați permanent clinic și biochimic, conform unui protocol prestabilit. Concluziile acestui studiu impresionant prin amploare și efort științific sunt extrem de complexe și de variate ca problematică, constituind subiectul multor comunicări, Franzosi (2001), Stone (2000), etc. . În mod indubitabil aportul exogen de acizi grași nesaturați ω 3 și rolul lor esențial în "dezvoltarea" CVD trebuie judecat nu singular ci în context, fiind extrem de dificil de departajat, un proces farmacologic (aport exogen de xenobiotic-medicament) de un proces avansat dishomeostazic.

Părerile celor mai mulți cercetători implicați în acest domeniu înclină indubitabil spre un proces dishomeostazic generalizat cu evidente implicări genetice primare sau secundare.

3.3.2. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU HIPERTENSIUNEA

Hipertensiunea este de asemenea o afecțiune multifactorială implicând așa cum remarca Williams în 1990, nu numai interacții de tip genă-factori de nutriție dar și interdependențe mult mai complexe. Aparent sunt implicate mecanisme diferite, operând în proporții variate funcție de organul implicat sau cauza hipertensiunii. Au fost raportate modificări esențiale în metabolismul eicosanoizilor, concentrațiilor reninei, reactivitatea vasculară, vâscozitatea sanguină, pierderi de sodiu, creșterea potasiului în mediul celular și descreșterea calciului intracelular (Williams 1990).

În 1983, două grupe de cercetători Singer și Lorentz au fost primii care adăugând la dieta pacienților cu hipertensiune moderată, macrou (*Scomber scomber*) au observat o scădere a presiunii sanguine. Ulterior un număr de studii au venit să confirme această constatare. În anul 1989, Knapp și FitzGerald au raportat un studiu controlat cu suplimentare de PUFA în hipertensiune. Acești investigatori au studiat presiunea sanguină și producerea de eicosanoizi la 32 de subiecți cu hipertensiune moderată care au avut o suplimentare a dietei cu grăsimi, timp de 4 săptămâni. O grupă 8 subiecți a primit între 3 g acizi grași ω 3, o altă grupă 15 g/zi acizi grași ω 3, altă grupă 39 g/zi acizi grași ω 6 sub formă de ulei de floarea soarelui, iar un lot a primit cantitatea medie de grăsimi a unei diete normale. Au fost măsurați metaboliți urinari pentru a evalua biosinteza eicosanoizilor. Bărbații care au primit doze ridicate de ulei de pește au prezentat o scădere medie a presiuni sistolice de 6.5 mm Hg și a presiuni diastolice de 4.4 mm Hg. Lotul care a primit o doză scăzută de acizi grași ω 3 nu a prezentat modificări semnificative ale presiunii sanguine, valorile fiind identice cu cele prezentate de grupul ce a primit acizi grași ω 6. Grupul care a primit o doză crescută de acizi grași ω 3 a prezentat inițial o creștere a sintezei prostaciclinelor vasodilatatoare (PGI_2 și PGI_3), care nu s-a menținut. Concentrația metaboliților tromboxanului A_2 scade, metaboliți ai tromboxanului A_3 , fiind detectați la subiecții care au primit ulei de pește.

Formarea PGE_2 , crește în timpul suplimentării cu ulei de floarea soarelui și are tendința de a scădea în timpul administrării de ω 3 dar nu au fost detectați metaboliți de PGE_3 . Aceste date demonstrează în mod indubitabil faptul că aportul exogen de acizi grași ω 3 (ulei de pește) acționează în sensul scăderii presiunii sanguine la indivizi hipertensivi.

În anul 1990 Bonna și mai recent Boa în 1998 au raportat scăderea presiunii sistolice cu 6 mm Hg, și cu 3 mm Hg a celei diastolice după suplimentarea dietei cu ulei de pește. Aceste investigații au monitorizat dieta și concentrația în acizi grași a fosfolipidelor

plasmatică pentru a determina relația dintre acizii grași și presiunea sanguină. Suplimentarea dietei cu acizi grași ω_3 , nu modifică media presiunii sanguine la subiecți ce consumă în mod normal carne de pește de cel puțin trei ori pe săptămână. Aceștia au o concentrație medie de acizi grași ω_3 în fosfolipidele plasmatică > 175.1 mg/L, sugerând existența unei relații de invers proporționalitate între presiunea sanguină și această specie de acizi grași. S-a acceptat ca explicație biomoleculară a acestei observații modificarea sintezei endogene a eicosanoizilor vasoactivi în urma aportului de acizi grași ω_3 . La aproape doi ani diferență, Fischer (1984) și Knapp (1986) au demonstrat că EPA alimentar este convertit în organismul uman la PGI_3 , dar nu suprimă formarea PGI_2 din ARA.

Un alt mecanism posibil include efectul acizilor grași ω_3 asupra funcției renale, diminuând vâscozitatea sanguină, și reducând răspunsul vascular la vasoconstrictorii sistemici (McMillan, 1989). Lorentz în 1983, a observat o creștere a concentrației sodiului urinar și o diminuare a activității reninei plasmatică la sfârșitul perioadei de suplimentare a dietei cu ulei de pește. Suplimentarea acizilor grași ω_3 s-a dovedit benefică asupra presiunii sanguine a subiecților supuși hemodializei, cu o funcție renală reziduală minimă, Hamazaki (1984). Subiecții normali nu au prezentat nici o modificare renală, chiar când a fost administrată o doză farmacologică de acizi grași ω_3 .

Șobolani cu funcția renală redusă (supuși nefrectomiei subtotale) și care au primit o dietă bogată în ulei de pește au prezentat o reducere a PGE urinar și a funcției renale, acompaniate de creșterea proteinuriei și a mortalității (Scharschmidt, 1987).

Studiile efectuate pe șobolan nu pot fi extrapolate la om deoarece șobolanii nu au capacitatea de sinteză a PGI_3 , (Hornstra, 1981; Culp, 1979; von Schacky, 1985). Efectele acizilor grași ω_3 asupra răspunsului renal mediat imun sunt extrem de complexe și la acest moment relativ controversate. Kelley, a raportat în 1985 că o dietă bogată în acizi grași ω_3 crește perioada de supraviețuire a șoarecilor ce dezvoltau nefrită lupică, pe când Westberger în 1989 nu a constatat nici un beneficiu. Studiile umane nu au fost favorabile.

Asocierea sinergetică acizilor grași ω_3 cu propranololul s-a dovedit a fi extrem de eficientă în scăderea presiunii sanguine, în plus ca un beneficiu secundar de loc de neglijat, nu a fost semnalată creșterea concentrației triacilglicerolilor plasmatici, fenomen ce acompaniază de regulă un tratament antihipertensiv.

Utilizarea acizilor grași ω_3 în cazul unor afecțiuni cardiovasculare și tratamentul anti hipertensiv apare extrem de util și benefic, deschizând noi perspective celor afectați.

3.3.3. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU AFECȚIUNI INFLAMATORII ȘI AUTOIMUNE

Efectele suplimentării exogene a acizilor grași ω_3 , asupra ciclurilor metabolice ale 5-lipoxigenazei au fost studiate în relație cu leucocitele polimorfonucleare și monocitele din sângele periferic pentru subiecți normali și pacienți afectați de artrite, psoriazis, colite ulcerative, lupus eritematos și astm. Aceste studii au fost stimulate de demonstrația lui Prickett din 1983, care a arătat că o dietă bogată în acizi grași ω_3 poate preveni afecțiunea renală autoimună, spontană și fatală la șoareci din specia controlată genetic *nzb*. De fapt efectul protectiv al lipidelor marine în afecțiunile renale autoimune reprezintă implicarea cea mai "spectaculoasă" a acizilor ω_3 .

Suplimentarea dietei cu acizi grași ω_3 (3.2 g EPA și 2.2 g DHA) la subiecți normali crește conținutul EPA din neutrofile și monocite de mai mult de 7 ori, fără a afecta cantitatea de ARA și DHA. Efectele antiinflamatorii ale uleiurilor de pește sunt parțial mediate de inhibiția ciclului 5-lipoxigenazic în neutrofile și monocite și inhibiția leucotrienei B_4 (LTB_4) mediator al funcției neutrofilice când crește producția de LTB_5 , (Lee, 1985; Kreme, 1987).

Studiile de după 1985 au demonstrat că acizii grași $\omega 3$ influențează metabolismul interleukinei diminuând, IL-1.

Studii experimentale au evidențiat că încorporarea de acizi grași alternativi în țesuturi pot modifica reacțiile inflamatorii și imune, acizii grași $\omega 3$ în particular posedă un potențial terapeutic ridicat ca agenți antiinflamatori.

3.3.4. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU ARTRITA REUMATOIDĂ

Aprofundarea cunoștințelor legate de metabolismul leucotrienelor, rolul lor în afecțiunile inflamatorii și autoimune au atras atenția cercetătorilor, motivați în plus de rezultatele spectaculoase obținute prin utilizarea în scop terapeutic a acizilor grași $\omega 3$, Kremer (1987). La voluntarii normali, lipidele marine deprimă producția de PAF din monocite, în plus, răspunsul chemotactic al neutrofilelor la agonști transmembranari este diminuat.

La pacienți cu artrită reumatoidă inhibiția producției de PAF este limitată la LTB_4 , sugerând inhibiția pasului epoxid hidrolazic și chemotaxisul neutrofilic este crescut prin aportul de ulei de pește mai mult decât este deprimat la subiecți normali. Aceste diferențe dintre comportarea subiecților normali și afectați de artrită reumatoidă, poate fi pusă în relație fie cu modificările specifice stării patologice, fie cu medicația pacienților (Robinson, 1991). S-a demonstrat faptul că acizii grași $\omega 3$ scad IL-1, pe model animal, la subiecți cu artrită reumatoidă și la voluntari clinic sănătoși (Enders, 1989; Kremer, 1989; Robinson, 1991).

În anul 1989, Kremer și colab. au realizat, un studiu dublu orb, întâmplător și în paralel un studiu placebo controlat. Trei grupe de subiecți au fost studiate timp de 24 de săptămâni, cu două doze diferite de acizi grași $\omega 3$ (ulei de pește) și una cu ulei de măsline, determinând indicii imunologici și clinici. Au fost constatate semne clinice net favorabile precum și diminuarea LTB_4 și creșterea LTB_5 , descreșterea semnificativă a producerii de IL-1, IL-2 a crescut semnificativ.

LTB_4 exercită un efect modulator pozitiv asupra controlului genetic al IL-1, foarte probabil la nivelul translațional cu citoplasma. Aceste efecte au fost confirmate de un număr de studii ulterioare.

Metabolismul lipidic excesiv și stress-ul oxidativ pot fi implicate cu consecințe nefavorabile în artrita reumatoidă.

Citokinele inflamatorii (de tipul IL-1) inhibă proliferarea condrocitară, (Balanco, 1995), și induce degradarea cartilagiului o parte din acest răspuns fiind mediat de PGE_2 . Producerea în exces de PGE_2 este legată de patologia articulației și este cunoscut că exacerbează răspunsul inflamator. Suplimentarea dietei cu acizi grași $\omega 3$ în conjuncție cu antiinflamatoare nesteroidice s-a dovedit a fi un tratament extrem de eficace la pacienți afectați de artrită reumatoidă în particular la vârste mai înaintate unde există și tendința de diminuare a afecțiunilor cardiovasculare (Geusens, 1994).

3.3.5. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU PSORIAZISUL

Constatarea că metabolismul acidului arachidonic este alterat în cazul psoriazisului se reduce imediat la inhibarea generării produșilor lipoxigenazici pro inflamatori [LTB_4 și acidului 12-hidroxi-eicosatetraenoic (12-HETE)], care sunt semnificativ crescute în leziunea psoriatică

(Ziboh,1991). Utilizarea acizilor grași $\omega 3$ ca adjuvanți în tratamentul consacrat al afecțiunii, produce o scădere în concentrația LTB_4 și 12-HETE (Lewis, 1986).

În alte studii, uleiul de pește a fost utilizat cu succes în combinație cu etretinatul (retinoid) în scopul diminuării hiperlipidemiei ca adjuvant fiind folosită fototerapia cu radiații ultraviolett B (UVB) (Allen,1991). Asocierea terapeutică în psoriazis, a acizilor grași $\omega 3$ cu ciclosporina, au demonstrat reducerea nefrotoxicității acestui medicament (Allen,1991).

3.3.6. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU CANCERUL

Numărul publicațiilor consacrate utilizării acizilor grași $\omega 3$ în cancer, pe model sau chiar la om a crescut exponențial în ultimii 5 ani. Modelele tumorale animale în care tumora a fost indusă de agenți cancerigeni și modelele cu transplant tumoral (sân, colon, pancreas și prostată) constituie un câmp vast de investigații. Rezultatele au demonstrat în mod consistent că acizii grași $\omega 3$ întârzie apariția tumorii, diminuează semnificativ atât rata de creștere cât și mărimea și numărul tumorilor. La aceste modele s-a dovedit că restricția calorică potențează efectele acizilor grași $\omega 3$ (Fernandes,1991; Cave,1991). În contrast cu acizii grași $\omega 6$, extrași din ulei de semințe (porumb, grâu, etc.) care favorizează formarea tumori, mărimea și numărul lor, (Cave, 1991; Karmali,1989). S-a constatat scăderea PGE_2 la animale hrănite cu acizi $\omega 3$ (Karmali,1989). Studiile, demonstrează că lipidele din dietă modifică metabolismul lipidic și un aport de acizi grași $\omega 3$ poate prevenii sau întârzia exprimarea neoplasmului. Alte studii implicând celule umane canceroase (cancer de sân) transplantate la șoarece, care au fost supuși unei diete bogate în acizi grași $\omega 3$, s-a constatat o diminuare a metastazelor pulmonare, descreșterea concentrației serice a estrogenilor și prolactinei, diminuarea PGE_2 în tumori și reducerea concentrației *c-myc* mRNA, oncogen în celulele tumorale. Nu aceleași efecte au fost constatate când s-a utilizat acizi grași $\omega 6$. Studiile pe model animal, utilizând acizi grași $\omega 3$ caută să elucideze mecanismele implicate, inclusiv modificările în producerea de prostaglandină, funcția imună, formarea radicalilor liberi, modificările de fluiditate membranară, modularea sistemelor de transport intra celulare, secreția hormonală, și exprimarea genetică, (Galli,1991).

3.3.7. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU DIABETUL

Diabetul este o afecțiune cronică, cu complicații incluzând hipercolesterolemie, hipertrigliceridemie, ateroscleroză, CHD și hipertensiune.

Studiile multi direcționale, biofizice și biochimice, de lungă durată, pe grupe de vârste, inițiate de Ionescu, și colab. (nefinalizate integral încă, rezultatele fiind publicate parțial, Preoteasa și Ionescu 198,1989,1990), asupra lipidelor serice și din membranele eritrocitare la subiecților diabetici, cu diabet tip I – IDDM (Insulin –Dependent Diabets Mellitus) și II – NIDDM (Non-Insulin-dependent Diabets Mellitus) cu vârsta cuprinsă între 16 și 70 de ani, au relevat rezultate interesante, comparate cu grupe de control, omogene ca vârstă. O sinteză a rezultatele investigațiilor efectuate este prezentată în tabelul 3.12. Au fost considerate și variațiile legate de vârstă.

Influențele asupra biofizicii membranei au fost raportate în lucrările citate anterior. Multe din aceste complicații sunt atribuite suferinței microvasculare. (Ruderman,1984). În anul 1989, Jensen utilizând un studiu cu un protocol, dublu orb încrucișate, a investigat efectele asupra permeabilității endoteliale, tensiunii sanguine și lipidelor plasmatică a unei suplimentări de 8 săptămâni a dietei diabetice cu acizi grași $\omega 3$ comparat cu o dietă bogată în $\omega 6$ (ulei de măsline) la 18 pacienți diabetici ce au prezentat o albuminurie > 30 mg/zi.

Pacienții care au primit acizi grași $\omega 3$ au prezentat o diminuare semnificativă a ratei de eliminare transcapilare a albuminei și tensiunii sanguine. Diabeticii ce au avut o suplimentare $\omega 6$ nu au prezentat abaterii de la linia de bază. Acizii grași $\omega 3$ au fost asociați cu o creștere semnificativă a HDL-colesterolului, plasmatic și cu o diminuare semnificativă a concentrației VLDL-colesterolului, respectiv triacilglicerolilor. Concentrația LDL-colesterolului nu a prezentat variații semnificative.

În 1989, Jensen concluziona că acizii grași $\omega 3$ au o acțiune directă asupra permeabilității vasculare care este independentă de efectul benefic asupra presiunii sanguine, și a postulat că această acțiune rezultă din diminuarea transferului lipoproteinelor la peretele vascular. În acest studiu concentrația glucozei sanguine a fost nemodificată. Alte studii utilizând acizi grași $\omega 3$ la diabetici non insulino-dependenți (NIDDM). (Glauber, 1988; Sechectman, 1988), și insulino-dependenți (IDDM), (Haines, 1986), au relevat creșteri ale glucozei sanguine, hemoglobinei glicozilate, colesterolului plasmatic total, LDL-colesterol și apo B serice. Magnitudinea acestor efecte este în general scăzută și modificările în metabolismul glucozei sunt asociate cu creșterea eliminării hepatice de glucoză și diminuarea secreției insulinice.

3.3.8. ACIZII GRAȘI MODULEAZĂ FORMAREA OSULUI ȘI FUNCȚIA CARTILAJELOR

Osul este un organ multifuncțional care consistă dintr-un cadru structural al unei matrice mineralizate și care conține o populație heterogenă de condrocite, osteoblaști, osteocite, osteoclaști, celule endoteliale, monocite, macrofage, limfocite și celule hematopoetice. Această varietate celulară produce o multitudine de regulatori biologici ai metabolismului osului. Hormonii sistemici calcitropici (hormonul paratiroidian (PTH), estrogenul, și Calcitonina, [Vitamina D₃-1,25(OH)₂], factorii autocrini și paracrini, incluzând prostaglandinele, citokinele și factorii de creștere orchestrează, activitățile celulare ale osului, modelând creșterea în lungime, diametru și forma oaselor lungi ale copilului.

Procesul de creștere al osului include activitățile de formare a matricei osoase, mineralizarea matricei și resorbția osului. Matricea osoasă este produsă și mineralizată prin activitatea osteoblaștilor, pe când resorbția matricei este realizată de celule mononucleate specializate denumite osteoclaști (Baron, 1993).

Activitățile combinate și cooperative ale osteoblaștilor și osteoclaștilor, au ca rezultat arhitectura osoasă, cu rol de suport mecanic și de regulator natural al nivelului normal al concentrației calciului și fosforului seric. Osteoblaști sunt celule mononucleate formatoare ale osului, a căror origine este localizată în trunchiul celulelor mezenchimale. Osteoblaști sunt responsabili de formarea osului sintetizând și secretând matricea organică a osului denumită "osteoid", care are în compoziție un complex și divers sistem proteic. După formarea sa, osteoidul normal, este supus unui proces de mineralizare rapid cu hidroxiapatită. În afară de sinteza matricei osoase, osteoblaștii, mențin o activitate ridicată a fosfatazei alcaline și generează numeroși factori regulatori ca prostaglandinele, citokinele și factorii de creștere. Aceste procese de sinteză locală stimulează formarea și resorbția osului (Baylink, 1993); Mundy, 1993; Raisz, 1993; Canalis, 1993).

Osteoclaști sunt celulele mari polinucleate ale resorbției osoase. Ele se formează pe situsurile scheletului din fuziunea precursorilor mononucleari transportați pe calea vasculară. În timpul procesului de resorbție osoasă, osteoclaști produc și eliberează enzime lisosomale, protoni și radicali liberi, în compartimentul resorptiv din vecinătatea osului, care dizolvă matricea minerală și matricea osoasă, Blair (1993).

Tabel 3.12 .

Dishomeostazia biochimică a unor constituenții lipidici serici și ai membranelor eritrocitare la subiecți afectați de diabet

PARAMETRU	SERIC	MEMBRANE	TIP DIABET
Acid Arachidonic	Scăzut	Scăzut	IDDM și NIDDM
Acid Docosahexaenoic	Scăzut	Ușor Scăzut	IDDM
Acid Eicosapentaenoic	Scăzut	Ușor Scăzut	IDDM și NIDDM
Acid Linoleic	Scăzut	Scăzut	IDDM și NIDDM
Acid Palmitic	Scăzut	Scăzut	IDDM
Acid Palmitic	Crescut	Crescut	NIDDM
Acid Stearic	Crescut	Scăzut	IDDM
Acizi grași polinesaturați ω 3	Ușor Crescut	Scăzut	IDDM
Acizi grași saturați	Crescut	Crescut	IDDM
Colesterol	Crescut	Crescut	IDDM
Colesterol / Fosfatidilcolină	-	Crescut	IDDM
Colesterol / Fosfolipide Totale	Crescut	Crescut	IDDM și NIDDM
Fosfatidiletanolamină	-	Scăzut	IDDM
Fosfatidiletanolamină /Fosfatidilserină	-	Crescut	IDDM și NIDDM
Fosfatidilinozitol /Acid fosfatidic	-	Crescut	IDDM și NIDDM
HDL-Colesterol	Ușor Crescut	-	
LDL-Colesterol	Crescut	-	
Sfingomielina	-	Crescut	IDDM
Triacilgliceroli	Crescut	-	

Notă :

IDDM – Diabet tip I, insulino- dependent

NIDDM – Diabet tip II, non-insulino-dependent

Osteoclaști activi sunt în contact cu suprafața mineralizată producând cavități resorbtive distincte cunoscute sub denumirea de "lagune Howship". Astfel, celule osoase sunt sub controlul regulator al factorilor sistemici și locali care modulează activitate lor, influențând procesele de modelare și remodelarea osoasă. În acest mod factorii lipidici pot influența procesele locale controlând sistemul osos.

Creșterea și modelarea sunt controlate de un complex de interacții dintre potențialul genetic al individului, influența mediului și modul de nutriție. Aceste interacții produc o arhitectură osoasă care balansează morfologia funcțională cu rolul scheletului în homeostazia calciului și fosforului. Oasele lungi al copilului cresc în lungime și diametru printr-un proces denumit modelare. Modelarea osului reprezintă un proces adaptativ generalizat și continuu de creștere și reformare (redimensionare) al osului guvernat de activitatea osteoblaștilor și osteoclaștilor până la atingerea structurii adulte a osului. Acest proces necesită o funcționare normală a celulelor osului. Modelarea osului este un proces distinct față de remodelare care descrie procesul local, cuplat de resorbție și formare care menține masa scheletală și morfologia la adult.

Investigații și studii clinice recente au sugerat că acizii grași antioxidanți influențează formarea osului și biologia cartilajelor. Pe model animal modelarea osului apare optimă atunci când acizii grași ω 3 moderează acizii grași ω 6.

În osteoporoză și artrita reumatoidă, activitatea excesivă osteoclastică contribuie major la distrucția osului. Date noi vin în sprijinul ideii că acizii grași și antioxidanții din dietă pot atenua activitatea osteoclastică reducând severitatea suferințelor osteolitice ale osului și

articulației. Adesea acizii grași ω_6 , pot agrava deficiența sistemelor enzimice antioxidante protective în cartilajul epifizal al oaselor lungi, (Xu,1995).

Citokinele și factorii locali de creștere produși de celulele imunocompetente și osteoblaști exercită un efect puternic asupra osului și cartilajelor așa cum reiese din tabelul 3.13. Analizele cartilajelor epifizale umane și a altor vertebre, au relevat o concentrație scăzută a acizilor grași ω_6 și 3-4% C20:3 ω_9 (Adkisson,1991). Acidul gras C20:3 ω_9 , nu a scăzut în cazul cartilajelor puilor care au primit o dietă bogată în C18:2 ω_6 , dar a crescut semnificativ atunci când hrana a fost îmbogățită cu C20:5 ω_3 și C22:c ω_3 (Xu,1995). Concluzia acestui studiu indică incorporarea unor acizi grași exogeni de către cartilajul epifizal, care este responsabil de creșterea longitudinală a osului.

Tabel 3.13.

Răspunsul factorilor autocrini și paracrini în Os (după Watkins, 1998)

RĂSPUNSURI OBSERVATE IN Os	CITOKINE, EICOSANOID SAU FACTOR PEPTIDIC DE CREȘTERE ¹
Formarea Osului sau Producția Matricei	FGF, IGF, PGE, TGF- β
Resorbția Osului	EGF, IL, LT, PG, PDGF, TGF-a, TNF-a
Sinteze Coloagenice	PGF, IGF, TGF- β
EGF – Factor de creștere epidermal	PDGF – Factorul derivat de creștere plachetară
FGF – Factor de creștere fibroblastic	PGE2 – Prostaglandină E
IL – Interleucină	TGF-a, TGF- β –Factori transformatori de creștere
IGF – Factor de creștere insulenic	TNF-a – Factor tumoral necrozant
LT- Leucotriene	

Un capitol de studiu deschis de curând, este dedicat relației strânse dintre balanța peroxidării lipidice, biologia osului și afecțiunilor degenerative. De exemplu, condrocitele articulare normale, produc radicali reactivi de oxigen și intermediari reactivi (Rathakrishnan,1992), dar un eliberarea unui exces de oxigen radicalic agresiv, poate fi asociată cu patologia cartilajelor. Distrucția provocată de radicalii liberi oxigenați s-a dovedit a exercita un rol patogenetic primar în suferința reumatismală cronică (Peretz,1991). Este dovedit că Vitamina E, diminuează activitatea lactat dehidrogenazei și refacă sinteza colagenică în condrocitele îmbogățite cu C18:2 ω_6 . Aceste date sugerează că acidul linoleic și / sau produsele sale de oxidare induc distrucția celulară, afectând funcția condrocitului. Lipidele exogene și factorii nutritivi antioxidanți influențează stress-ul oxidativ în țesutul osos într-o manieră similară cu cea descrisă în cazul altor țesuturi.

3.3.9. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU RETINITA PIGMENTOASĂ

Retinita pigmentoasă (RP) este o familie heterogenă de afecțiuni degenerative cu determinism genetic, caracterizate de pierderea progresivă a fotoreceptorilor (bastonașe și conuri) retinieni. Pierderea inițială a bastonașelor localizată periferic în retină are ca prim simptom orbirea nocturnă. Aceasta este urmată imediat de degenerarea fotoreceptorilor conici adiacenți periferice, apoi progresiv, centric afectând țesutul responsabil de percepția culorilor. Distrugerea vederii periferice (efect "tunel") conduce treptat la pierderea totală a acuității vizuale.

Nu există un prognostic favorabil pentru această afecțiune, tratamentul este simptomatic și extrem de limitat.

Aspectul genetic al retinitei pigmentoase (RP) este descris de : o formă autosomal dominantă (ADRP), o formă autosomal recesivă (ARRP), o formă X-determinată (XLRP) și o formă digenică reclamând prezența a două gene nonaltele. "Microclimatul" membranelor influențează capacitatea funcțională a transducției luminii în retină. Acidul gras polinesaturat cu catenă lungă (LCPUFA – Long Chain PolyUnsaturated Fatty Acid), docosahexaenoic (DHA, C22:6 ω 3) se întâlnește în concentrație ridicată (cea mai ridicată) în lipidele membranelor din fotoreceptorul în formă de bastonaș, segmentul extern, al retinei (Fliesler,1983).

Acidul docosahexaenoic este unul dintre acizii cei mai nesaturați ai corpului omenesc. Această concentrație ridicată a celui mai nesaturat acid gras poate crește fluiditatea membranelor, (Chapman,1973; Stubbs,1984; Spector,1985), și la rândul ei modifică proteinele vitale și activitatea enzimelor retiniene. Îmbogățirea celulelor retiniene umane cu DHA, conduce la o mai mare mobilitate laterală, la suprafața membranei așa cum s-a demonstrat prin formarea dimerului fluorescent (Treen,1992). Aceste studii demonstrează că o concentrație ridicată a DHA în membranele celulare și creșterea fluidității laterale membranelor poate fi asociată cu activarea transportului factorilor nutritivi primari spre membrana celulară.

Studiile de deficiență nutritivă a acizilor grași ω 3 au dovedit importanța acestor compuși în transducția vizuală. Electroretinograma (ERG) reprezintă răspunsul electric al suprafeței retinei. ERG a fost anormal atât la șobolan (Wheeler,1975; Bourre,1989), cât și la maimuțe (Neuringer,1986), care au primit o dietă săracă în acizi grași ω 3. În 1990, Uauy, apoi în 1992, Birch și, Birch în 1992, au sesizat existența unei întârzieri în maturarea fotoreceptorului (celule bastonate), (răspunsul ERG întârziat) și acuitatea vizuală asociate cu reducerea nivelului DHA în lipidele sanguine la prematurii care au fost hrăniți cu formule comerciale de lapte praf, îmbogățit cu extrase lipidice din uleiuri de germeni (semințe) în comparație cu copiii ce au fost alimentați natural sau cu formule experimentale bogate în DHA (Uauy,1990; Birch,1992); Birch,1992). De altfel consecințele fiziologice ale deficienței de DHA sunt demonstrabile, interacțiunile DHA la nivel membranelor sunt funcții complexe biochimice și /sau biofizice în strânsă corelare cu gradul înalt de nesaturare al acidului gras. Conceptele asupra rolului DHA în dinamica membranei retiniale. implică de exemplu modificarea curburii membranei, impusă de distribuția spațială a capetelor polare ale moleculelor de fosfatidiletanolamină și fosfatidilcolin (Wiedmann,1983; Gibson,1991), caracteristicile de compresibilitate, (Dratz,1992), și diluarea gradului de reticulare datorat legăturilor de hidrogen de la suprafața membranei (Slater,1993), (diluare datorată gradului de nesaturare al acidului gras). La pacienții cu retinită semnele clinice sunt insidioase, ei fiind la modul general, sănătoși. Din punct de vedere biochimic s-au găsit anomalități calitative și cantitative ale lipidelor plasmatice la pacienți afectați de ADRP, XLRP și sindrom Usher, (Converse,1983; Anderson,1987; McLachlan,1990; Gong,1992; Holman,1994; Bazan,1986). Majoritatea studiilor asupra acizilor grași s-au concentrat asupra lipidelor din celulele roșii sanguine (RBC- Red Blood Cells) ca index primar al statusului acizilor grași. deoarece acizii grași eritrocitari sunt asociați lipidelor membranelor structurale și sunt cu corelați cu profilul acizilor grași din alte țesuturi (retină, țesut neural, etc.) (Carlson,1986; Connor,1993). În plus, lipidele din RBC sunt mai puțin sensibile decât lipidele plasmatice, fluctuațiilor factorilor de dietă, și faptul cel mai important sunt relativ accesibile, iar tehnicile de investigare sunt oarecum "standardizate", rezultatele generate fiind comparabile cu a altor grupe de investigatori.

XLRP este generic considerată forma cea mai severă a RP, deoarece prevalența este de a pierde vederea în preadolescență. Exprimarea afecțiunii este primordială la bărbați, dar femeile vechi pot fi afectate mai mult sau mai puțin. Din acest punct de vedere există o oarecare asemănare cu Distrofia musculară progresivă (DMP) Duchenne. XLRP este

prezentă aproape imediat după naștere dar este bine exprimată în jurul vârstei 4-6 ani (Birch, 1993). Relativ similar cu DMP Duchenne. Acești pacienți devin orbi în a doua sau a treia decadă de viață.

În anul 1995, Hoffman, analizând profilul acizilor grași totali din RBC ale pacienților afectați de XLRP, comparativ cu controlii, nu obține diferențe marcate între acizii grași totali nesaturați sau cei mononesaturați. Tabel 3.14.

Cantitatea de acizi grași $\omega 6$ din RBC la persoane afectate de XLRP a fost mai scăzută ($p=0.012$) decât la controlii. Concentrația acizilor grași $\omega 3$ a fost însă semnificativ scăzută ($p<0.0001$). Ca o consecință a acestei scăderi indicele de nesaturare în RBC provenind de la subiecții afectați de XLRP a fost redus semnificativ față de control. Această valoare reprezentând numărul total al dublelor legături din acizii grași poate fi corelată cu gradul de fluiditate al membranelor RBC. A fost raportată o diminuare cu aproximativ 38% a DHA-RBC la pacienți cu XLRP comparat cu normali; respectiv 2.46 față de 3.96% din acizi grași totali.

Valorile obținute de Ionescu I., Gârban Z., Boeriu F., Sârzea S., Dăncescu M., E.A. Preoteasa, Moșoiu L., pe trei cazuri (rezultate nepublicate încă) s-au înscris în domeniul de variație citat de Hoffman în anul 1995. Investigațiile noastre s-au înscris într-un context mai larg cuprinzând și alte tipuri de afecțiuni: distrofiile musculare progresive, anemii, diabet, miotonie, afecțiuni peroxisomale, etc. scopul acestor studii a fost de a stabili un domeniu de variație "normal" (circumscris) al matricei de acizi grași.

3.3.10. IMPLICAREA ACIZILOR GRAȘI ESENȚIALI ÎN TRATAMENTUL AFECȚIUNILOR CU DEFECT PEROXISOMAL GENERALIZAT

Peroxisomii sunt organite subceulare prezentând o singură membrană. sunt abundenți în organismele eucariote având roluri diferite funcție de tipul celulei. Pentru descrierea acestor organite au fost utilizate patru denumiri: peroxisomi, glioxisomi, "microbody" și microperoxisomi.

Caracterizarea biochimică a peroxosomilor provine din lucrările de pionierat ale grupului condus de Christian de Duve (1975), care subfracționând, fracția mitocondrială extrasă din ficat de șobolan au reușit să descopere lisosomii. În 1966, De Duve a definit prin termenul de "*peroxisom*" un organit subcelular, având ca enzime marker, uratoxidaza, catalaza și D-aminoacidoxidaza. Denumirea se referă la metabolismul apei oxigenate (peroxidul de hidrogen) și nu la peroxidaze. De altfel catalaza este capabilă de o peroxidare fiziologică semnificativă, în plus față de reacția catalitică, peroxidazele simple (glutacion, peroxidaza din hrean) nu sunt peroxisomale.

Cercetările asupra funcțiilor și implicațiile peroxisomilor în patologie au fost elegant sumate, de Duve (1966), Lazarow (1985), Schram (1986), Moser (1999).

Termenul de "*glioxisom*" a fost introdus de Breidenbach în 1967, pentru a descrie un organit descoperit la plante și care conținea cinci enzime aparținând ciclului glioxalatului. Ulterior s-a dovedit existența în acest organit a oxidazelor și catalazei, similar cu peroxisomi.

"*Microbody*" este un termen morfologic pentru o structură subcelulară înconjurată de o singură membrană, cu o matrice omogenă și un diametru general definit între 0.2–1.0 μm . Au fost observați de Johannes A.G. Rhodin în 1954, la microscopul electronic la puțină vreme de la inventarea acestuia.

Ulterior introducerii unei colorații histochimice pentru catalază, s-a descris o variantă a peroxisomilor, așa-numiții "*microperoxisomi*" de circa 0.2 μm , la care lipsește miezul central. Conțin aceleași enzime ca și peroxisomii și sunt prezenți în toate celulele mamiferelor, pe când peroxisomii mai mari se află numai în unele celule.

Inițial, singura funcție alocată peroxisomilor a fost aceea de eliminare de către catalază a apei oxigenate ce apare în ciclul respirator peroxisomal, însă chiar și acest rol era oarecum discutabil deoarece indivizii cu o deficiență moștenită de catalază sunt asimptomatici. La plantele superioare, fungi și protozoare, peroxisomii joacă un rol important în metabolismul celular, fiind implicați în conversia acizilor grași la hidrați de carbon, oxidarea alcoolilor la alchene, glicoliză și alte cicluri metabolice. Cercetări aprofundate au demonstrat clar că peroxisomii sunt esențiali pentru funcționarea celulei mamiferelor.

Aceste funcții includ:

1. **Catabolismul acizilor grași cu catenă foarte lungă. Prezența sistemului peroxisomal β -oxidativ al acizilor grași în ficatul mamiferelor a fost demonstrat de Lazarow și de Duve în 1976. Peroxisomii par a fi special echipați pentru "scurtarea" acizilor grași cu catenă lungă ($C > 22$), produșii de reacție fiind ulterior metabolizați în mitocondrii.**
2. **Catabolismul acizilor grași cu catenă foarte lungă. Prezența sistemului peroxisomal β -oxidativ al acizilor grași în ficatul mamiferelor a fost demonstrat de Lazarow și de Duve în 1976. Peroxisomii par a fi special echipați pentru "scurtarea" acizilor grași cu catenă lungă ($C > 22$), produșii de reacție fiind ulterior metabolizați în mitocondrii.**
3. **Biosinteza eter-fosfolipidelor (plasmalogeni și alchil-glicerofosfolipide), constituenți esențiali ai mielinei. Plasmalogenii conțin un alcool cu catenă lungă, 1,2 nesaturat, cuplat printr-o legătură eterică (vinil eterică) la restul glicerolic al unui fosfolipid, înlocuind legătura esterică cu un acid gras, convențional prezentă în orice moleculă fosfolipidică. Plasmalogenii constituie 5-20% din fosfolipidele membranare ale celulelor mamiferelor și 15% din lipidele mielinice. Două din enzimele necesare introducerii unei legături eterice în eter-fosfolipide, acil-CoA:hidroxiaceton fosfat acil-transferaza și acil-dihidroxiaceton fosfat sintetaza sunt localizate predominant în peroxisomi, Hajra (1982).**
4. **Biosinteza acizilor bilari.**
5. **Catabolismul acidului pipecolic.**
6. **Catabolismul acizilor dicarboxilici.**
7. **Catabolismul acidului fitanic.**
8. **Oxidarea poliaminelor.**

Rolul esențial al peroxisomilor în funcționalitatea celulară la om, poate fi descris de severitatea clinică a afecțiunilor generate de alterarea metabolismului peroxisomal. Afecțiunile au un determinism genetic iar prognosticul este dezolant.

Maladia Refsum (eredopatia atactică polineuriticiformă, afecțiune de stocaj a acidului fitanic) este o neurolipidoză cu transmitere autosomal recesivă (Refsum, 1945; 1946). Biochimic această maladie este caracterizată de o acumulare a acidului fitanic (acid 3,7,11,15-tetra metil hexadecanoic) în diferite țesuturi și lipide din fluidele biologice, datorită unei deficiențe enzimatică în degradarea acestui tip de acid gras cu catenă ramificată și 20 de atomi de carbon.

Acidul fitanic este un derivat al fitolului, un rest alcoolic al clorofilei, nesintetizat de organismul uman.

În 1963, Klenk și Kahlke, raportează asocierea maladii Refsum cu o concentrație crescută a acidului fitanic plasmatic. Majoritatea acizilor pot fi scindați prin β -oxidare dar datorită catenei ramificate (4 grupe metil) din acidul fitanic acest proces este obturat. Degradarea al acidului fitanic necesită primar un proces de α -oxidare. (Stokke, 1975) și abia ulterior atacul enzimatic specific β -oxidării va agresa lanțul hidrocarbonat al acidului gras, în caz contrar acidul 3,7,11,15-tetra metil hexadecanoic, are tendința de a se acumula.

Tabel 3.14.

Distribuția acizilor grași în lipidele RBC a pacienților cu XLRP și controlii normali (după Hoffman, 1995)

ACIZI GRAȘI	PROCENTE DIN ACIZII GRAȘI TOTALI	
	CONTROLI (N = 28)	XLRP (N = 18)
Saturați Totali ¹	36.20 ± 4.70	37.80 ± 1.60
Mononesaturați Totali ²	19.90 ± 1.60	21.60 ± 1.40
C20 : 3ω9	0.05 ± 0.03	0.10 ± 0.08*
C18 : 2ω6	11.70 ± 1.40	12.80 ± 1.90
C18 : 3ω6	0.16 ± 0.12	0.10 ± 0.03
C20 : 2ω6	0.34 ± 0.07	0.26 ± 0.05**
C20 : 3ω6	1.87 ± 0.39	1.66 ± 0.18
C20 : 4ω6	17.00 ± 2.20	15.30 ± 1.20*
C22 : 4ω6	4.79 ± 1.08	4.39 ± 0.48
C22 : 5ω6	1.05 ± 0.26	0.89 ± 0.16
Σ ω6	25.20 ± 3.50	22.60 ± 2.90
C18 : 3ω3	0.12 ± 0.03	0.15 ± 0.05*
C18 : 4ω3	0.02 ± 0.04	0.09 ± 0.10*
C20 : 5ω3	0.39 ± 0.25	0.36 ± 0.07
C22 : 5ω3	2.26 ± 0.43	1.86 ± 0.26*
C22 : 6ω3	3.96 ± 0.74	2.46 ± 0.55**
Σ ω3	6.80 ± 1.10	4.80 ± 0.60**
Index nesaturare	180 ± 16	164 ± 7**

Notă

¹ Include 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 24:0² Include 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1

* p<0.01 ** p<0.001

Valorile sunt : Medii ± 1 D.S.

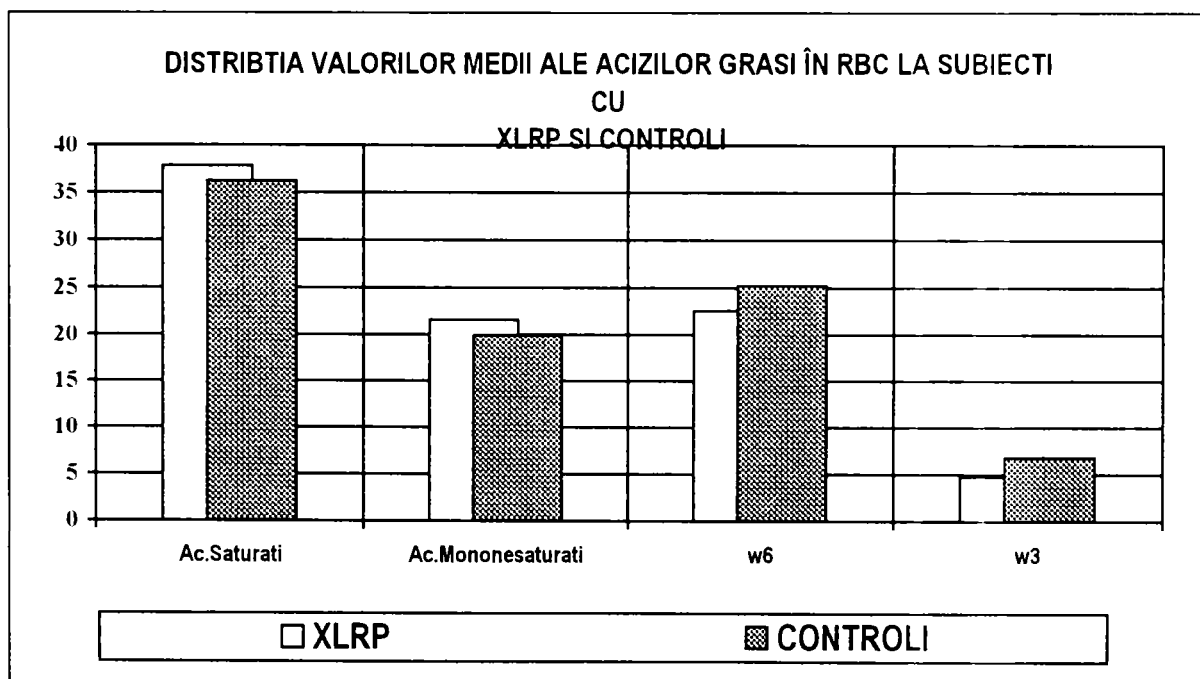


Fig. 3-8.

Reprezentarea grafică a valorilor medii prezentate în tabelul 3-14.

Tabelul 3.15., sumează afecțiunile peroxisomale manifeste la om.

Tabel 3.15.
Afecțiuni peroxisomale (după Schram și Tager, 1986)

A. AFECȚIUNI GENETICE CU IMPLICAREA UNEI SINGURE FUNCȚII PEROXISOMALE
1. Acatalasemia
2. Forma adultă a maladiei Refsum
3. Adrenoleucodistrofia X recesivă
B. AFECȚIUNI GENETICE CU IMPLICAREA GENERALĂ A FUNCȚIILOR PEROXISOMALE
1. Sindromul Cerebro-hepato-renal (Zellweger)
2. Forma infantilă a maladiei Refsum
3. Condrodisplazia punctata, tipul rizomelic
4. Adrenoleucodistrofia tipul neonatal
5. Acidemia Hierpipecolică

ω -oxidarea, procesul prin care un acid gras este metabolizat de la capătul catenei care nu conține adiacent o grupare $-\text{COOH}$, este o cale metabolică relativ minoră, care la mamifere este reprezentată de două sisteme: un sistem mitocondrial activ în conversia colesterolului la acizi biliari și o fracție microsomală care ω -oxidează câteva tipuri de acizi grași. În aceste condiții acceptând ω -oxidarea, ca proces fiziologic activ, ar fi normal ca cel puțin în urină să fie prezenți, resturi metabolice (de regulă acizi organici ramificați). Testele de încărcare artificială a subiecților afectați de maladia Refsum, cu produși hidrocarbonați cu catenă ramificată în vederea "vizualizării" locusului metabolic afectat au generat rezultate destul de heterogene, cu interpretări incerte. O sumare a aspectelor generale și modificărilor biochimice este prezentată în tabelul 3.16.

Analizând un caz familial de maladie Refsum, Ionescu I. și Moșoiu L., (1990), relevă câteva aspecte extrem de interesante din punct de vedere clinic și biochimic. Pacienta de 21 de ani, a provenit dintr-o familie cu o soră și un văr afectați, toți trei au prezentat diminuare progresivă bilateral a vederii nocturne. Semnele clinice tipice maladiei : neuropatia hipertrofică periferică, retinită pigmentară, ataxia cerebeloasă au fost descrise în raportul clinic la internare.

Electrofiziologic a fost semnalată o scădere marcată a vitezei de conducție la nervii motori și senzoriali de ordinul a 7-10 metri/secundă. Electromiograma efectuată pe mușchii tibial anterior și quadriceps femural a prezentat activități spontane (fasciculații) și potențiale de denervare. Traseul interferențial a fost redus iar potențialele individuale de acțiune au fost cuprinse în domeniul 2-5 mV.

Concentrația acidului fitanic a variat de la 37.80 mg% în plasmă la 0.94 mg% în lichidul cefalorahidian. A fost investigată, concentrația acidului fitanic în fracțiile lipidice plasmatică. Frația triacilglicerolilor au prezentat concentrația cea mai ridicată de acid fitanic, urmată de fosfolipide.

Semnalăm o diminuare semnificativă a DHA (C22:6 ω 3) în aproape toate fracțiile analizate. Acest acid gras este de regulă relaționat cu funcționarea fotoreceptorilor retinieni, numărul mic de cazuri analizate nu permite generalizarea concluziilor. Dacă se compară cu normalul se poate constata o creștere a concentrației acizilor grași cu catenă lungă și foarte lungă. Compoziția procentuală a acizilor grași totali plasmatici și din fracțiile primordiale sunt prezentate în tabelul 3.17.

Analiza gazcromatografică acizilor organici urinari a remarcat prezența acidului 3-metil adipic, în cantitate relativ crescută, produs de degradare ω -oxidativă a acidului fitanic.

Prin ω -oxidarea se pare că se elimină zilnic o cantitate de 5-11 mg acid fitanic. Dificil de explicat fiziologic este prezenta unei cantități moderat crescute de acid oxalic.

Tabel 3. 16.

Aspectele generale și modificările biochimice specifice ale afecțiunilor peroxisomale (după Schram și Tager, 1986)

Parametru	Sindrom Zellweger	Maladia Refsum infantil	Condro-Displazia Punctata Forma Rizomelică	Acidemia Pipecolică	Adreno Leuco Distrofia Neonatală	Adreno leuco distrofia X-recesivă	Maladia Refsum Adultă
Aspecte Generale							
Sex	M + F	M	M + F	M	M + F	M	M + F
Transmitere	Aut.rec.		Aut.rec.		Aut.rec.	X-recesiv	Aut.rec.
Speranță de Viață (ani)	< 1		< 2	< 2	1.5 - 10	Variată	Adult
Metaboliți în fluidele biologice							
Acizi grași cu catenă lungă C26/C22	crescut	crescut		crescut	crescut	crescut	normal (crescut)
Acid Pipecolic	crescut	crescut		crescut	crescut	normal	normal (crescut)
Intermediari de sinteză ai acizilor biliari	crescut	crescut		crescut	crescut	normal	normal
Acid Fitanic	crescut	crescut	Crescut		crescut	normal	crescut

Tratamentul instituit a fost indiscutabil bazat pe o dietă săracă în grăsimi bogate în acid fitanic și alimente sărace în fitol. Elaborarea dietei a necesitat dozări de acid fitanic în diverse alimente.

Relativ recent a fost semnalată o diminuare dramatică a DHA (C22:6 ω 3), în creier, rinichi și sângele subiecților afectați de maladii peroxisomale, (Martinez, 1989; 1990; 1992), acest fapt poate fi pus în relație cu dezvoltarea simptomatologiei retiniene ce excortează constant această categorie de afecțiuni.

Deficiența DHA în afecțiunile peroxisomale este incertă. În anul 1991, Voss, a propus o explicație plauzibilă asupra diminuării concentrației de DHA, la subiecți cu alterări evidente a proceselor de β -oxidare a acizilor grași cu catenă foarte lungă. În acord cu această cale de sinteză, DHA, este produs prin β -oxidarea unui acid cu catenă foarte lungă, acid tetracosahexaenoic (C24:6 ω 3). Acest mecanism de retroconversie pornind de la C24:6 ω 3, poate explica concentrația scăzută a DHA în afecțiuni cu defecțiuni peroxisomale generalizate. Este plauzibil ca numărul scăzut de peroxisomi să fie în relație cu un conținut normal de DHA, (Wanders, 1990).

Terapia cu DHA a avut efecte benefice în afecțiunile peroxisomale.

Tabel 3.17.

Compoziția procentuală a acizilor grași totali (uzual observați) din lipidele plasmatice: fosfolipide și trigliceride al afectați de maladia Refsum. (Ionescu 1990)

ACIZI GRAȘI	LIPIDE TOTALE	FOSFOLIPIDE	TRIGLICERIDE
C14: 0	0.70 ± 0.14	1.27 ± 0.20	2.08 ± 0.90
C16: 0	19.20 ± 1.20	22.75 ± 1.95	25.01 ± 2.60
C16: 1ω7	1.06 ± 0.80	2.50 ± 1.10	2.55 ± 0.32
Acid Fitanic	9.10 ± 1.20	9.20 ± 0.95	24.30 ± 2.55
C18: 0	4.03 ± 0.93	10.75 ± 1.35	2.10 ± 0.15
C18: 1ω9	19.45 ± 2.01	14.07 ± 2.35	22.75 ± 0.80
C18: 2ω6	26.90 ± 1.20	21.07 ± 2.09	7.60 ± 0.23
C20: 0	0.48 ± 0.33	1.00 ± 0.51	1.29 ± 0.35
C18: 3ω3	0.40 ± 0.19	0.25 ± 0.10	0.62 ± 0.12
C20: 3ω6	1.27 ± 0.25	2.05 ± 0.60	1.01 ± 0.56
C20: 4ω6	6.07 ± 1.92	7.29 ± 1.32	1.01 ± 0.10
C22: 0	1.98 ± 0.35	1.44 ± 0.22	2.00 ± 0.45
C20: 5ω3	0.76 ± 0.10	1.20 ± 0.30	1.00 ± 0.62
C22: 3ω3	0.45 ± 0.05	1.08 ± 0.25	0.38 ± 0.12
C24: 0	4.02 ± 0.23	2.10 ± 0.75	3.01 ± 0.12
C22: 4ω6	0.35 ± 0.02	0.25 ± 0.12	1.45 ± 0.51
C22: 5ω3	0.59 ± 0.11	0.44 ± 0.10	1.45 ± 0.52
C22: 6ω3	1.95 ± 0.05	1.75 ± 0.20	2.51 ± 0.48
C26: 0	2.45 ± 0.78	2.75 ± 0.30	3.15 ± 0.20
C24: 0 / C22: 0	2.03	1.46	1.50
C26: 0 / C22: 0	1.24	1.90	1.58

3.3.11. ACIZII GRAȘI ESENȚIALI ÎN RELAȚIE CU SCHIZOFRENIA

Schizofrenia este o suferință mentală cu o prevalență de aproximativ 1%. Tipic, schizofrenia se manifestă în adolescență sau la adultul tânăr, apoi urmează un curs spre cronicizare sau cu perioade de recădere. Simptomele schizofreniei sunt conceptual divizate în două grupe, cunoscute ca simptome pozitive și negative. Simptomele pozitive pot fi considerate ca adiționale ale comportamentului mental normal (exacerbarea unor funcții) și include unele tipuri de halucinații (de exemplu percepția vocilor când nu este prezent nimeni în preajma celui afectat) și deziluzii (idiosincrazie și adesea convingeri false bizare). Simptomele negative reprezintă un deficit al funcționării normale și includ aspecte ca pierderea motivației sau diminuarea dramatică a răspunsului emoțional. Cauza schizofreniei a rămas până în prezent necunoscută, dar este unanim acceptat că în procesul de declanșare și de evoluție al afecțiunii este implicat și alt ceva decât reacția psihiatrică.

Asupra etiologiei schizofreniei există două ipoteze prevalente : *ipoteza neurodevoltării* și *ipoteza receptorilor*. Aceste două puncte de vedere asupra etiopatogenezei nu se exclud reciproc, nu sunt mutual incompatibile. Predispoziția genetică al acestei afecțiuni este din zi în zi tot mai fundamentată. Natura acesteia nu este încă perfect definită dat ea implică mai multe locusuri de interacție cu influențele externe. Ipoteza

neurodezvoltării postulează existența unei predispoziții genetice la o neurodezvoltare anormală care este influențată de factori ca infecțiile virale în timpul sarcinii sau unele complicații la naștere. Persoanele cu predispoziție la schizofrenie au la naștere o circumferință redusă a capului, tulburări de comportament în timpul copilăriei, anormalități fizice minore, IQ relativ scăzut, creșterea ventriculelor cerebrale precede și pare declanșarea suferinței. S-a acceptat că modificările morfologice ale creierului care au loc la pubertate și adolescență pot face ca simptomele afecțiunii să devină manifeste la cei cu predispoziție. În esență ipoteza receptorilor acceptă posibile anormalități ale sistemelor neurotransmițătoare cerebrale, particulare cele în relație cu dopamina. Medicamentele antipsihotice acționând la acest nivel. Mecanismul de acțiune al acestor xenobiotice blochează receptorii dopaminei D2. Din nefericire, aceste produse medicamentoase sunt capabile să amelioreze simptomatologia schizofreniei fără a fi curative și cu efecte secundare considerabile (diminuarea masei musculare și tremor, asemănător celui descris în boala Parkinson). Medicația actuală are primar, efecte asupra simptomelor pozitive accentuând din păcate simptomele negative. Se încearcă la acest moment generarea unor noi clase de xenobiotice care să țină seama de acuzele teoriei receptorilor, rezultatele sunt din păcate puțin promițătoare.

Relativ recent, 1995, a fost enunțată o nouă ipoteză etiopatogenetică bazată pe defectul lipidic, ce integrează cauzal, teoria neurodezvoltării și ipoteza receptorilor, evaluând pozitiv mecanismele de acțiune ale medicamentelor în uz.

Punctul de start al ipotezei fosfolipidice a schizofreniei a fost constatarea depleției seriilor acizilor grași polinesaturați (PUFA) $\omega 3$ și $\omega 6$ din membranele celulare ale afecțaiților, tratați cu neuroleptice.

Peet în 1995, evaluând acidul arachidonic și docosahexaenoic din celulele roșii sanguine a evidențiat diferențe compoziționale semnificative. Rezultatele sunt prezentate sintetic în tabelul și figura de mai jos.

La pacienți, concentrațiile au o distribuție bimodală, Gleen în 1994. a demonstrat că nivelele reduse de acizi grași polinesaturați în membrana celulelor roșii sanguine, selectează pacienții cu simptomatologie negativă predominantă.

Diminuarea nivelului acizilor grași polinesaturați din seria $\omega 6$, la pacienți schizofrenici, a fost corelată cu concentrația substanțelor tiobarbiturice plasmatiche (TBARS), sugerându-se o creștere a activităților oxidative în sensul scindării acestora. Utilizându-se spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară s-a constatat scăderea concentrației fosfomonoesterilor paralel cu creșterea diesterfosfaților în cortex (zona frontală) la pacienții schizofrenici fără tratament medicamentos.

Tabel 3.18.

Compoziția în acizi grași polinesaturați a membranelor celulelor roșii sanguine la pacienți schizofrenici și controlii. Exprimat ca mg/100 mg. fosfolipid după Peet (1995).

ACID GRAS	SCHIZOFRENIE	CONTROLI	p
N	23	16	
C18:2 $\omega 6$	9.70 \pm 0.60	14.20 \pm 2.00	< 0.001
C20:4 $\omega 6$	11.90 \pm 6.20	17.30 \pm 3.60	< 0.002
C20:5 $\omega 3$	1.00 \pm 0.40	1.60 \pm 0.40	< 0.001
C22:6 $\omega 3$	3.70 \pm 2.40	7.20 \pm 1.30	< 0.01

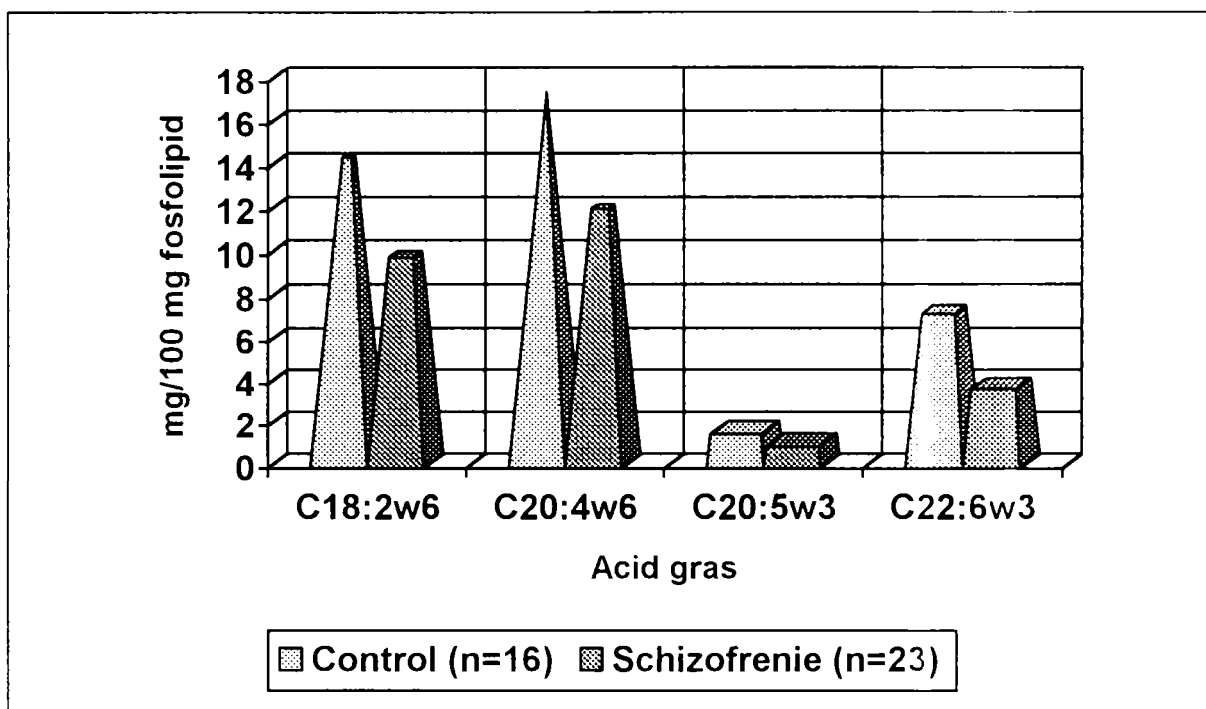


Fig. 3-9.

Compoziția în acizi grași polinesaturați a membranelor celulelor roșii sanguine la pacienți schizofrenici și controlii. Exprimată ca mg/100 mg. fosfolipid după Peet (1995).

În același timp, Pettegrew (1991), raportează diminuarea sintezei și/sau accelerarea proceselor de degradare (rupere) a fosfolipidelor din membrane. Dieckin (1994) corelează acest indice de scindare a fosfolipidelor cu severitatea simptomelor schizofreniei. Phillips (1993) și Kovaleva (1989), au semnalat o creștere semnificativă a concentrației de pentan în aerul expirat de pacienții schizofrenici, concomitent cu o creștere a ratei de degradare oxidativă a acizilor grași polinesaturați. Peet (1997), determinând TBARS într-un număr mare de probe de plasmă de la pacienți afectați de schizofrenie, fără medicație, provenind din India și Malaezia, a constatat o creștere semnificativă a concentrației acestora comparat cu subiecții de control.

Un mecanism care poate fi responsabil de degradarea lipidelor din membrană poate fi generat de creșterea activității fosfolipazei. Un raport de mare interes al lui Gattaz (1995) semnaleză o creștere semnificativă a fosfolipazei A2 citosolice (cPLA2) în trombocitele afectaților de schizofrenie. Există două rapoarte asupra anormalităților genetice la nivelul cPLA2 responsabile, la pacienții schizofrenici. Un grup de cercetători a raportat o diferență semnificativă referitoare la distribuția allelelor la schizofrenici și controlii la site-ul polimorfic al regiunii promotore al genei cPLA2. Relativ recent, Peet (lucrare ne publicată încă), a găsit un site dimorfic pe primul intron al genei cPLA2, cu un homozigot care este semnificativ reprezentat la populația schizofrenă comparativ cu populația de control echivalentă ca vârstă, sex, etnie, etc. Este deci perfect posibil, ca o anomalitate cu determinism genetic la nivelul fosfolipazei, să fie responsabilă de degradarea acizilor grași polinesaturați din membranele celulare la pacienți afectați de schizofrenie.

În cazul în care acceptăm existența unei perturbări metabolice a acizilor grași polinesaturați în schizofrenie, atunci la modul ipotetic ar însemna că depleția ar putea fi modulată prin dietă. Studii cu acest subiect fost deja începute iar rezultatele parțiale sunt mai mult decât încurajatoare.

3.3.12. ACIZII GRAȘI *Trans* - MONONESATURAȚI ȘI POLINESATURAȚI FACTORI ALIMENTARI DE RISC

Biochimic și fiziologic vorbind organismul uman este "pregătit" metabolic să utilizeze izomerii *cis* ai acizilor grași, cu balanță riguroasă a proteinelor, lipidelor și glucidelor alimentare. Alimentația omului modern este caracterizată, din păcate, de o creștere a grăsimilor în general, a grăsimilor saturate, a acizilor grași *trans*, și a acizilor grași esențiali $\omega 6$ (EFA) în special, dar o scădere dramatică a $\omega 3$ EFA (Eaton, 1985; Simopoulos, 1991). Raportul acizilor grași $\omega 6/\omega 3$ este 10 -20/1. Procesele de hidrogenare catalitică (producerea margarinelor de exemplu) conduc la introducerea în circuitul nutrițional a unor cantități mult crescute (după unii autori îngrijorător) de acizi grași *trans*. Studiile de nutriție au demonstrat că în condiții normale mai puțin de 2% (uneori chiar 0.5%) din energia necesară poate proveni din "prelucrarea" catabolică a acizilor grași *trans* fără un risc marcat pentru sănătatea organismului. Din nefericire studiile aprofundate, pe perioadă lungă de timp elaborate de Simopoulos, 1995 în SUA și Canada au demonstrat un aport alimentar de peste 10% acizi grași *trans*. Acizii grași *trans* sunt prezenți în margarine, uleiuri hidrogenate din adaosurile pentru salate (maioneze, sosuri, etc.) preambalate, cartofi prăjiți preambalați (chips), și în alte alimente procesate (Dupont, 1991; Litin, 1993).

Efectele adverse ale acizilor grași *trans* au fost trecute în revista cuprinzător de Simopoulos (1995).

Remarcabil este un Raport al Consiliului Nutrițional Danez, referitor la influența acizilor grași *trans* asupra stării de sănătate a populației. Studiul început în 1993, finalizat și publicat în 1995 a fost condus de Stender (1995).

Concluzia de o rigurozitate excepțională :

"ACIZII GRAȘI *TRANS* POT GENERA SAU ACCELERA PROCESUL ATEROSCLEROTIC DE O MANIERĂ ASEMĂNĂTOARE (DAR MULT POTENȚATĂ) GRĂSIMILOR SATURATE, IAR ÎN PLUS PREZINTĂ O TOXICITATE FOETALĂ RIDICATĂ".

A fost primul semnal de alarmă bazat pe studii epidemiologice minuțioase asupra pericolului prezentat de acizii grași *trans*.

Preocuparea față de rolul acizilor grași *trans* a făcut obiectul unor studii interesante și concluziile sunt îngrijorătoare, Thomas (1975, 1983) ; Mattson (1975) ; Mensink și colab. (1990, 1992, 1993); Zock (1992) ; Siguel (1993); Nestel (1992); Lichtenstein (1993) ; Willett (1993); Wood (1993); Judd (1994); Roberts (1994); Ascherio (1994), dacă ar fi să cităm numai câteva dintre acestea, selectate nu numai pe criteriul de primordialitate sau de rigurozitate științifică, ci și pe acel al curajului și dramatismului enunțului.

Acizii grași *trans* constituie între 0-30% din grăsimea margarinelor daneze, uzual procentul este mai crescut în cele industriale și evident ceva mai scăzut în cele de masă. Acizii grași *trans* conferă margarinelor un grad de compactare (solidificare) sporit la temperatura camerei, deci mult mai avantajos de stocat. În ultimii 5-6 ani au fost publicate o serie de studii cu privire la incidența afecțiunilor coronariene și impactul lipoproteinelor plasmatic. Concluziile investigațiilor demonstrează că un consum ridicat de acizi grași *trans* din margarine este responsabil de dezvoltarea fenomenelor arterosclerotice, într-o măsură mult mai mare decât cele datorate acizilor saturați. În plus este acum clar că prin transferul de fluide biologice de la mamă la făt sau sugar acesta este afectat în egală măsură. Dezvoltarea normală a fătului este afectată.

ÎN CONCORDANȚĂ CU ACESTE CONCLUZII S-A RECOMANDAT :

LIMITAREA CONSUMULUI MARGARINELOR ȘI ÎNLOCUIREA LOR CU GRĂSIMI NATURALE (UNT SPRE EXEMPLU).

Gravitatea acestor rezultate este cu atât mai mare cu cât în urmă cu 10-15 ani se milita pentru o "politică" nutrițională diametral opusă, de înlocuire a untului și derivatelor sale, altfel spus a produșilor naturali, cu produși vegetali cu grad ridicat de industrializare.

Izomerii geometrici și de poziție ai acizii grași mononesaturați se formează special în procesul de hidrogenare catalitică, (Dutton,1979), în contrast cu acizii grași *trans* polinesaturați care apar în procesul de deodorizare (Ackman,1974), și frigere (ardere), (Sebedio,1988). Aceștia se formează în special din C18:3 ω 3, dar și din C18:2 ω 6.

Dacă efectele fiziologice ale acizilor grași *trans* mononesaturați sunt bine documentate și studiate, (Nicolosi,1995), în literatura de specialitate există numai câteva date certe relativ la acizii grași *trans* polinesaturați. Cu 20 de ani în urmă, Ackman și colab. în 1979, au găsit că în uleiurile rafinate, acidul linolenic (9-*cis*, 12-*cis*, 15-*cis*- 18:3) este acompaniat de doi izomeri majori 9-*cis*, 12-*cis*, 15-*trans*-18:3 și 9-*trans*, 12-*cis*, 15-*cis*- 18:3. Au fost detectați în cantități minore (dar notabile) izomerul mono-*trans* în Δ -12 și di-*trans* Δ -9 și Δ -15. Aceștia nu au fost detectați în uleiurile nerafinate (extract crud, primar), evident ele apar în procesul de deodorizare. După această primă punctare a existenței lor izomerii acizilor linoleic și linolenic au fost detectați nu numai în uleiurile rafinate, (Wolf,1993; O'Keefe,1994), dar și în alimente cu valoare calorică scăzută, (Wolf,1991), margarine, (Ratnayake,1991), uleiuri de prăjire uzate, (Sebedio,1987), lapte matern, (Koletzko,1988; Boatell,1993); Chen,1995; Chardigny,1995), formule nutriționale pentru copii, (O'Keefe,1994; Chardigny,1996; Ratnayake,1997).

Doi izomeri majori sunt semnalati în toate uleiurile deodorizate: 9-*cis*, 12-*cis*, 15-*trans*-C18:3 și 9-*trans*, 12-*cis*, 15-*cis*-C18:3, așa cum este prezentat în tabelul 3.18. Aceștia reprezintă între 1.3-1.4% din totalul esterilor metilici ai acizilor grași dintr-o probă de ulei de canola (*Brassica Napus Canola*) comercializat. Izomerii di-*trans* au fost detectați numai în cantități minore. Este cunoscut, aceștia se formează în uleiurile care au fost supuse unor tratamente termice la temperaturi relativ ridicate, (Grandgirard,1987). În toate cazurile are loc o izomerizare minoră în poziția Δ -12 în așa fel încât cantitatea de 9-*cis*, 12-*cis*, 15-*trans*-C18:3 a fost mai mare decât 9-*trans*, 12-*cis*, 15-*cis* C18:3. În mod similar, cei doi izomeri majori ai acidului linolenic sunt izomerii mono-*trans* (9-*cis*, 12-*trans* și 9-*trans*, 12-*cis* C18:2), acidul gras di-*trans* (9-*trans*, 12-*trans*-C18:2), ei formându-se numai în uleiurile supuse unui tratament termic la temperaturi ridicate, (Sebedio,1988,1987). Determinarea gradului de izomerizare a acidului linoleic (DI 18:2) și a acidului linolenic (DI 18:3) indică faptul că C18:3, este mult mai sensibil izomerizării decât C18:2. Domeniul DI 18:2, este cuprins între 0.3-3.3, comparat cu DI 18:3, care variază de la 6.0 la 37.0.

O observație similară a fost făcută la analiza acizilor grași conținuți de laptele din formulele nutriționale pentru nou născuți. Rezultatele comparative sunt prezentate în tabelul 3.20.

Ca o consecință imediată a prezenței izomerilor geometrici ai acizilor grași C18:2 și C18:3, în uleiurile alimentare, (Ackman,1979; Wolff,1993; O'Keefe,1994), precum și în alte produse alimentare, (Wolff,1991; Ratanyake,1991), prezența lor a fost semnalată evident și în laptele matern. Tabelul 3.19. ilustrează acest lucru.

Acizii grași *trans*, majori din laptele matern sunt izomeri ai C18:1 (1- 10.3%), cea mai mică cantitate fiind semnalată în Spania și cea mai ridicată în Canada. Probele din Franța s-au situat la o valoare intermediară de 1.9%. Probele din Canada au prezentat o compoziție a izomerilor C18:1, asemănătoare cu cea din uleiurile parțial hidrogenate, în timp ce în probele din Franța, prezența într-o cantitate relativ ridicată a compusului Δ -11, pare a fi datorată grăsimilor provenite de la animalele rumegătoare. Cantități comparabile de izomer mono-*trans* a acidului linolenic au fost semnalate în laptele matern, în probe din țări diferite, pe când un singur izomer 9-*cis*, 13-*trans*- C18:2 a fost raportat ca izomerul major al clasei C18:2, în eșantioanele canadiene. Acest compus, este recunoscut, se formează în procesul

de hidrogenare catalitică, metoda de obținere a margarinelor. Izomerii geometrici ai acidului C18:3, au fost raportați numai în eșantioanele provenind din Franța.

Tabel 3.19.

Izomerii geometrici ai acizilor C18:2 și C18:3, prezenți în uleiurile vegetale rafinate (greutate %). Adaptat după Chardigny (1996).

ACIZI GRAȘI	SOIA		CANOLA	
	n = 8	N = 6	n = 7	n = 4
18:2 ct*	0.05 – 0.51	0.16-0.40	0.06-0.42	0.07-0.32
18:2 tc	< 0.40	0.17-0.41	0.01-0.35	0.05-0.27
18:2 cc	51.82– 55.05	53.30– 54.81	17.59 – 22.58	19.24-21.73
18:3 tct	< 0.27	0.04 – 0.09	0.01 – 0.34	0.03 – 0.27
18:3 cct**	0.04 – 0.77	0.21 – 0.89	0.34 – 1.46	0.46 – 1.21
18:3 tcc	0.04 – 0.77	0.15 – 0.82	0.27 – 1.31	0.37 – 1.04
18:3 ctc	< 0.11	0.02 – 0.10	0.04 – 0.28	0.05 – 0.22
18:3 ccc	5.26 – 7.13	6.10 – 6.82	5.74 – 9.46	7.45 – 9.03
DI 18:2	1.20 – 1.70	0.30 – 1.70	0.30 – 3.30	0.70 – 2.60
DI 18:3	15.20– 22.70	6.00 – 22.00	7.00 – 37.00	10.50– 26.90
Referințe	Ratnayake	Chardigny	Chardigny	Ratnayake
	(1997)	(1996)	(1996)	(1997)
* 9 cis, 12 trans – C18:2				
** 9 cis, 12 cis, 15 trans – C18:3				

Metabolismul acestor izomeri a constituit obiectul atenției unor grupuri numeroase de cercetători. Primele studii au fost inițiate de Blank și Privett în 1963 care au dovedit că esterul metilic al acidului 9-cis,12-trans-linolenic poate fi convertit într-un acid *trans* eicosatetraenoic. Studiile ulterioare, (Privett,1967; Berdeaux,1996; Ratnayake,1994), au demonstrat că cel puțin unul din izomerii *trans* ai acidului linolenic, 9-cis, 12-trans-C18:2, poate fi convertit la un izomer *trans* al acidului arachidonic, 5-cis,8-cis, 11-cis (14-trans-C20:4). În 1991, Beyers și Berdeaux, în 1996 au arătat că numai 9-trans,12-cis-C18:2, este elongat la 11-trans,14-cis C20:2, pe când Ratnayake în 1994, raportează că amândoi izomeri ai C18:2, pot fi elongați la C20:3 având o legătură *trans*. Berdeaux în 1996, demonstrează că 9-trans, 12-cis-C18:2, este convertit cu ușurință la izomerul *trans* al corespunzător al acidului arachidonic.

Studiile pe șoarece utilizând tehnica izotopilor marcați (în speță izomeri ai C18:2) utilizată de Beyers în 1991, au demonstrat că metabolii sunt încorporați în lipidele conținute în ficat, plasmă, inimă și creier.

Studiile pe șobolan, efectuate de Berdeaux, în 1996, au relevat încorporarea acidului arachidonic în diferite clase lipidice fără însă a afecta compoziția în acizi grași a fosfolipidelor. În fosfolipide cea mai mică cantitate de izomer 14-trans-C20:4, a fost observat în fosfatidiletanolamină care conține cea mai scăzută concentrație de C20:3ω9.

Cea mai mare cantitate de 14-trans-C20:4 a fost semnalată în fosfatidilinozitol, un fosfolipid care conține cantități însemnate de C20:3ω9.

Fosfatidilcolina prezintă o situație intermediară. 14 *trans*-C20:4 pare să se comporte analog cu izomerii acidului C18:3, (Wolff,1993). Acizii grași 9-cis, 12-trans și 9-trans, 12-cis nu sunt singurii membri *trans* ai clasei C18:2, care pot fi convertiți la un izomer C20:4 *trans*. În 1994, Ratnayake analizează posibilitatea ca izomerul 9-cis, 13-trans să fie desaturat și elongat la 5-cis, 8-cis,11-cis, 15-trans C20:4. În anul 1986, Chardigny și în 1989, Grandgirard, au arătat faptul că *in vivo* există posibilitatea ca izomeri geometrici ai C18:3 să

fie convertiți la isomeri *trans* C22:6. De exemplu printre izomerii ce pot apărea la tratarea termică a uleiurilor, 9-*cis*,12-*cis*,15-*trans*-C18:3, pare a fi substratul preferat pentru conversie la 5-*cis*,8-*cis*,11-*cis*,14-*cis* 17-*trans* C22:6 și la 4-*cis*,7-*cis*,10-*cis*,13-*cis*. 19-*trans* C22:6.

Tabel 3.20.

Izomerii geometrici din formulele nutriționale pentru sugari, Charigny (1996). (% din cantitatea totală de metil esterii ai acizilor grași)

ACIZI GRAȘI	A (N= 10)	B (N= 10)	C (N= 10)	C (N= 10)
18:2 tt			< 1.3	< 0.09
18:2 ct	0.05 – 0.23	0.04 – 0.52	0.13 – 0.29	0.09 – 0.71
18:2 tc	0.10 – 0.20	0.04 – 0.43	0.09 – 0.30	0.07 – 0.67
18:2 cc	14.4– 53.70	1.70 – 18.60	14.40 – 31.50	14.70 – 55.10
18:3 tct	< 0.02	< 0.02	< 0.07	< 0.10
18:3 cct	0.03 – 0.33	< 0.11	0.05 – 0.52	0.05 - 0.47
18:3 ctc		< 0.02	< 0.10	< 0.09
18:3 tcc	0.07 – 0.50	< 0.10	0.06 – 0.47	0.04 – 0.47
18:3 ccc	1.20 – 6.60	0.50 – 1.60	0.70 – 4.70	1.60 – 5.30
DI 18:2	0.30 – 2.00	0.30 – 4.50	1.90 – 3.80	0.60 – 3.30
DI 18:3	10.0–23.00	3.00 – 23.00	7.00 – 25.00	0.60 – 37.00
Referințe	O'Keefe	Chardigny	Ratanayke	Ratanayke
	(1994)	(1995)	(1997)	(1997)
	lichid	Pulbere	Lichid	pulbere

Alți izomeri geometrici C18:3, ca de exemplu 9-*trans*,12-*cis*,15-*cis* C18:3, și 9-*trans*,12-*cis*,15-*trans*-C18:3 pot fi la rândul lor convertiți la izomeri *trans* C20:5. Ca o observație importantă, conversia este superioară, preferată, dacă geometria legăturii etilenice Δ-9 este *cis*.

Tabel 3.21.

Izomerii geometrici ai acizilor C18:2 și C18:3 prezenți în laptele matern (g%) (după Sebedio (1988, 1987).

ACIZI GRAȘI	A (N= 15)	B (N= 38)	C (N= 155)	D (N= 10)
18:2 tt	0.09 – 0.25	0.07 ± 0.02	-	-
18:2 ct	0.09 – 0.24	0.11 ± 0.06	0.28 ± 0.13	0.15 ± 0.08
18:2 tc	0.03 – 0.25	0.11 ± 0.05	0.24 ± 0.12	0.12 ± 0.02
18:2 cc	5.58 – 21.65	12.70 ± 0.58	10.50 ± 2.51	14.67 ± 1.38
Alți izomeri 18:2			0.36 ± 0.13	-
18:3 tct				0.02 ± 0.02
18:3 cct				0.04 ± 0.02
18:3 ctc				-
18:3 tcc				0.03 ± 0.02
18:3 ccc	0.51 ± 1.12	0.47 ± 0.19	1.19 ± 0.36	0.70 ± 0.11
Referințe	Koletzko	Boatella	Chen	Chardigny
	(1988)	(1993)	(1995)	(1995)

Studiile *in vitro* asupra Δ -6 desaturării izomerilor *trans* ai acidului α -linolenic au demonstrat că 9-*cis*,12-*cis*,15-*trans*-C18:3, este convertit cu o rată scăzută în comparație cu acidul linolenic. Conversia acidului 9-*cis*,12-*cis*,15-*trans*-C18:3, marcat radioactiv, a fost scăzută în prezența 9-*cis*,12-*cis*,15-*cis* C18:3, se poate deci concluziona : izomerul mono *trans* este un inhibitor de conversie pentru acidul linolenic,(Chardigny,1997). Acești acizi grași *trans* n-3 poli nesaturați s-a dovedit a fi încorporați în structurile cerebrale și retină, (Grandgirard,1994; Chardigny,1994). Mai mult decât atât s-a relevat că sinaptosomi retinieni și microcapilarele cerebrale conțin cea mai mare cantitate de acid *trans*-C22:6. Acest acid gras este semnalat în mielină și nervul sciatic, în cantități moderate. Studiile amănunțite asupra sângelui uman au demonstrat că plachetele sanguine conțin izomerii *trans* ai acizilor C20:5 și C22:6, (Chardigny,1993). Aceștia reprezintă mai mult de 0.5% din esterii metilici totali ai acizilor grași.

În anul 1997,Sebedio a demonstrat că introducerea în alimentația umană a uleiului de semințe de cânepă, deodorizat, timp de 6 săptămâni a condus la încorporarea izomerilor geometrice ai C18:3, în diferite clase lipidice serice (triacilgliceroli, esterii sterolici) și în egală măsură 5-*cis*,8-*cis*,11-*cis*,14-*cis*, 17-*trans* -C20%, în fosfolipidele plachetare.

3.4. ACIZII GRAȘI POLINESATURAȚI CU CATENĂ LUNGĂ COMPONENTE FUNCȚIONALE DETERMINANTE ALE CLASELOR LIPIDICE.

Cercetătorii în domeniul lipidelor au realizat de multă vreme eterogenitatea compozițională a diferitelor țesuturi biologice, și faptul că o specie moleculară poate fi caracteristică unui organ sau unei particule subcelulare, iar acest lucru se conservă la specii diferite. În particular, abundența acizilor grași polinesaturați cu catenă lungă (Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids-PUFA), de tipul docosahexaenoic (C22:6 ω 3), eicosapentaenoic (C20:5 ω 3) și arachidonic (C20:4 ω 6), în diferitele tipuri de țesuturi biologice era cunoscută de multă vreme. Cu toate acestea funcția biologică a acizilor grași polinesaturați cu catenă lungă a rămas obscură până la descrierea biosintezei prostaglandinelor (PG) din acid arachidonic. Cunoștințele noastre despre funcțiile acizilor grași polinesaturați ω 3 în relație cu rolul lor specializat în membrană sau ca substanțe bioactive care rezultă din reacțiile de oxigenare sunt extrem de rudimentare. Este extraordinar ca o moleculă lipidică să conțină 5 sau 6 duble legături iar natura să investească un consum energetic atât de ridicat pentru biosinteza și menținerea ei. Evident, rolul acestor produși cu grad ridicat de nesaturare nu poate să fie decât unul major, unele din aceste funcțiuni fiind încă neelucidate.

În 1884, Thudichum publica lucrarea sa "Chemical Constitution of the Brain" unde făcea unele observații extrem de interesante: "Așa cum specia lecitică este caracterizată de prezența radicalului acidului oleic, specia cefalinică este definită de prezența unui acid particular, căruia i-am atribuit denumirea de acid cefalic. Acest acid este mai reactiv decât acidul oleic și imprimă calitățile sale tuturor compușilor în care este prezent. Dacă aceste acid gras (acid cefalic) care își pune amprenta prin caracteristicile sale particulare asupra tuturor cefalinelor și fără de care o substanță fosforilată nu poate prezenta proprietățile cefalinelor Formula constituțională a principiului cefalinic sau cefalo-stearo-neuroglicerofosfatului trebuie să fie C₄₃H₈₁NO₉". Aceasta a fost probabil prima descriere a fracției fosfolipidice conținând 22:6. Frația "cefalinică" la care face vorbire este probabil un amestec de fosfatidilserină (FS), fosfatidiletanolamină (FE) și fosfatidilinozitol (FI) neizolate la aceea dată. Acidul "cefalic" descoperit și caracterizat de el era indubitabil compus în principal din C22:6 ω 3. "Cefalostearo-neuro-glicerofosfatul" descris, reunea desigur speciile de fosfatidiletanol-amină și fosfatidilserină, esterificate cu C18:0. respectiv C22:6 ω 3, prezente în creier ("cefalin").

Separarea "cefalinei" în fracții fosfolipidice trebuia să aștepte tehnicile de fracționare ale lui Folch (1942), și prepararea în stare pură a fosfatidiletanolaminei, fosfatidilserinei, precum și metodele cromatografiei pe coloană ale lui Marinetti-Love (1958). Rouser (1967). Fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina hexaenoică au fost separate prin cromatografie în strat subțire dopat cu ioni argint de Arvidson (1965). Salem (1976, 1980), a dezvoltat tehnici similare pentru separarea și prepararea speciilor fosfatidilserinice monoenoice, respectiv hexaenoice.

Holub și Kuksis în 1971, au separat, fosfatidilinozitolul polienuic iar Morris în 1963, esterii hexaenoici ai colesterolului. Dezvoltarea tehnicilor cromatografice a permis analiza avansată a speciilor moleculare, compoziției și metabolismului acestora. Este de înțeles că C22:6 ω 3 precum și alți acizi grași din seria ω 3 au fost izolați primar din țesuturi biologice, nu liberi ci esterificați ca fosfolipide, triacilgliceroli sau colesterol.

În concentrații relativ ridicate acidul docosahexaenoic (C22:6 ω 3), de exemplu a fost regăsit de O'Brien (1965), în creier, în retină Anderson (1970), și spermă. Poulos (1973).

Concentrațiile cele mai ridicate de C22:6 ω 3 au fost semnalate în aminofosfolipide, unde este localizat în poziția sn-2 a scheletului glicerolic. Tinoco în 1982 a elaborat un studiu cuprinzător referitor la distribuția și concentrația acizilor grași ω 3 în general și a C22:6 ω 3 în special, din care cităm tabelul 3.21.

În creier, C22:6 ω 3 este asociat în concentrații relativ ridicate cu acid stearic (C18:0) în fosfatidil serină (FS) și fosfatidil etanolamină (FE) așa cum reiese din cercetările aprofundate elaborate de O'Brien (1965), Yabuuchi (1968), Salem (1976, 1980), Baker (1979), Horrocks (1981). Fosfatidil etanolamina și fosfatidilserina sunt specii moleculare localizate preferențial în materia cenușie raportat la mielină (substanța albă), așa cum au demonstrat studiile întreprinse de O'Brien (1965) și Salem jr. (1976, 1980).

Concentrații ridicate de specii hexaenoice sunt remarcate de Sun (1974), Breckenridge (1972), în membrana plasmatică sinaptosomală precum și de Breckenridge (1973), în veziculele sinaptice. De subliniat faptul că speciile hexaenoice aparțin claselor fosfatidilserină și fosfatidiletanolamină, dar nu și fosfatidilcolinei sau fosfatidilinozitolului. După cum remarcau, Horrocks în 1981 și Muller în 1980, acizii grași polinesaturați sunt adesea cuplați la forma alchenil a fosfogliceridelor. Sun și Sun observau în 1974, că în membranele plasmatiche sinaptosomale, din creierul șoarecelui, 42.7% din acidul docosahexaenoic este distribuit ca alchenil-fosfatidiletanolamină. Studiile comparative au relevat un fapt oarecum surprinzător, conținutul ridicat în acid hexaenoic în fosfatidiletanolamina din creier a peste 30 de specii animale diferite deși, modul de nutriție, (fosfatidiletanolamina din mediul nutritiv) și precum și fosfatidil-etanolamina hepatică sunt extrem de diferite. Un exemplu concludent demonstrează faptul, la 6 specii de rumegătoare, în fosfatidiletanolamina extrasă din ficat, concentrația C22:5 ω 3, este ridicată iar C22:6 ω 3 are un nivel diminuat, în aceeași specie moleculară extrasă din creier însă cel din urmă acid gras variază în limite extrem de strânse, 16-26%.

Retina mamiferelor este similară cu materia cenușii din creier, în cea ce privește conținutul ridicat de acid gras C22:6 ω 3, abundent în fosfatidilserină și fosfatidiletanolamină, relativ diminuat în fosfatidilcolină și fosfatidilinozitol, după studiile lui Anderson (1970, 1970). Membrana externă a celulelor retiniene prezintă o concentrație ridicată în acizi grași polinesaturați în conformitate cu determinările practice de Nielson (1970), Anderson (1971), Stone (1979), Miljanich (1979). Stone în anul 1979, a definit un domeniu de variație pentru acidul docosahexaenoic din celulele retiniene cuprins între 46.20 - 50.70 % în preparate purificate din surse bovină, batracieni și rozătoare (șobolan). Miljanich remarcă în 1979, prima dată existența unor fracții fosfolipidice disaturate respectiv dinesaturate, pe care reușea să le separe și să le analizeze. Autorul observa că sunt specii de fosfatidilcolină, fosfatidilserină și fosfatidiletanolamină, cu două resturi de C22:6 ω 3, ce coexistă alături de altele esterificate cu doi acizi polinesaturați, ce conțin în lanțul molecular 4-6 duble legături. Acidul arachidonic (C20:4 ω 6) este localizat la nivelul retinei, preferențial în fosfatidilinozitol, moderat în fosfatidiletanolamină, scăzut sau extrem de scăzut în fosfatidilserină, fosfatidilcolină și sfigomielină. Acest tip de repartiție diferențiat sau mai bine spus preferențial a fost observat în membrana plasmatică sinaptosomală, vezicule sinaptice, cerebel. Numeroase specii animale prezintă o concentrație ridicată de acizi grași polinesaturați cu 22 de atomi de carbon, în lipidele biologic active extrase din testicule, Bieri (1965) și în particular în spermă, Poulos (1975). Lipidele extrase din testiculele umane conțin în medie 8.5% acid docosahexaenoic, acidul C22:5 ω 6, este prezent dar într-o proporție extrem de scăzută. Șobolanul, hamsterul, iepurele și câinele prezintă o inversarea raportului, respectiv C22:5 ω 6 în proporție de 10.9-14%, C22:6 ω 3, prezent în urme, așa cum reiese din studiile efectuate în 1965 de către Bieri. Cei doi acizi grași polinesaturați sunt prezenți la șoarece și cobai în proporție considerabilă, coexistând cu acidul arachidonic, C20:4 ω 6. Interesant din punct de vedere fiziologic și metabolic este variația acestor acizi grași

polinesaturați cu vârsta; la pui C22:5 ω 6 și C22:6 ω 3, apar numai în urme, 10-12% fiind constituite din C20:4 ω 6 respectiv C22:4 ω 6. În acest caz acizii grași polinesaturați cu 22 de atomi de carbon, par a fi asociați cu spermatozoidii prezente în testicul, nivelul acestora crescând rapid în 6-7 săptămâni, la șobolanii maturi, în timpul perioadei de spermatogeneză. Rezultatele au fost semnalate și analizate de Bieri în anul 1965. Prezența acidului C22:6 ω 3 în concentrații apreciabile a fost semnalată și la alte specii. De exemplu, fosfolipidele totale extrase din sperma de taur, bou și om îl conțin în proporții de: 61.3%, 37.7%, respectiv 35.2%, cum reiese din lucrările lui Poulos (1973). Forma plasmalogenă a fosfatidilcolinei reprezintă 40-50% din fosfolipidele totale ale spermei, incluzând o concentrație ridicată de C16:0 și C18:0, în forma aldehydică, în conformitate cu studiile elaborate de Neill (1973) și Scott (1967). Interesantă este diminuarea dramatică a concentrației în acizi grași și fosfolipide în spermă în timpul ejaculării, Scott (1967) și Poulos (1973). A fost semnalată o pierdere de 25-50% din lipidele totale, acest fapt fiind explicat prin metabolizarea masei lipidice, pentru un aport suplimentar energetic, Neill (1973), Poulos (1973). Nivelul acidului docosahexaenoic rămâne relativ constant.

Acidul C22:6 ω 3, este un constituent important al unor clase lipidice extrase din țesuturile periferice așa cum descrie tabelul 3.21.

În mușchiul cardiac de șobolan, C22:6 ω 3, reprezintă aproximativ 12%, din acizii grași ai extractului fosfolipidic total, concentrat aproape exclusiv în aminofosfolipide.

Fosfatidiletanolamina conține aproximativ 23.4%, iar fosfatidilcolina 3.6% din acidul docosahexaenoic, raportat la cantitatea de acizi grași fosfolipidici totali. Important este faptul că C22:6 ω 3 fosfolipidic apare cu 50% mai ridicat în peretele atrial relativ la cel ventricular, iar concentrația sa este rezistentă la manipulările de dietă, remarca i-a aparținut lui Charnock (1983).

În sarcolema mușchiului striat de șobolan, în fracționatul din reticulul sarcoplasmic și mitocondrial concentrația de acid docosahexaenoic exprimată ca procente din acizii grași fosfolipidici totali este de 11.20, 25.20, respectiv 19.90, dar reprezintă mai puțin de 1.3 % din acizii totali ai lipidelor neutre. C22:6 ω 3, muscular este concentrat preponderent în fosfatidiletanolamină (36.1%), dar a fost semnalat în fosfatidilserină și fosfatidilinozitol (15.9%), fosfatidilcolina în schimb în conține esterificat numai în proporție de 5.2%.

La populația eschimosă din Groenlanda, extractele lipidice plachetare au relevat o concentrație de acid docosahexaenoic de 4 ori mai ridicată decât la populația daneză.

Există extrem de multe aspecte, din punct de vedere metabolic, neelucidate, legate de degradarea fracțiilor lipidice, mecanismelor regulatorii implicate în homeostazia compozițională a fosfolipidelor și acizilor grași. Matricea acizilor grași plasmatici și hepatici, răspunde extrem de rapid la manipularea factorilor nutriționali.

O dietă lipsită de grăsimi conduce la o creștere rapidă a concentrației C20:3 ω 9, o scădere a C18:2 ω 3, C20:4 ω 6, din plasmă, ficat, eritrocite și trombocite; acest proces dishomeostatic poate fi eliminat printr-un complex de factori nutriționali conținând acid linoleic. Subiectul a fost amplu analizat de Iritani (1984) și Walker (1967). Particular, concentrația plasmatică și hepatică de acid docosahexaenoic se diminuează când acidul linolenic din factorii nutriționali este scăzut și este înlocuit de C22:5 ω 6, atunci când sunt disponibili precursori de acizi ω 6, aceste concluzii au fost amplu descrise în lucrările lui Tinoco (1980) și Galli (1994), pentru ca apoi să fie reluate de mulți alți cercetători. Creșterea concentrației de acizi grași ω 3 prin aportul exogen al factorilor nutritivi, conduce la diminuarea acidului arachidonic din organism și în mod evident la ridicarea nivelului acidului docosahexaenoic din lipidele hepatice. Reciproc, o hrană abundentă în linoleat sau arachidonat crește concentrația acestor acizi grași și dacă nivelul lor este păstrat ridicat, conduce la diminuarea treptată a acizilor grași ω 3 din lipidele hepatice.

La om, suplimentarea cu ulei de pește a dietei conduce la o creștere marcată a acidului eicosapentenoic (C20:5 ω 3) și eicosahexaenoic (C22:6 ω 3) plasmatic și eritrocitar, proporțional cu diminuarea acidului arachidonic (C20:4 ω 6). Acest subiect, cu multe implicații asupra organismului uman a fost semnalat și analizat pentru prima dată de Sanders (1983), Dyerberg (1979), Lorenz (1983).

Eliminarea acizilor grași ω 3 din dieta șobolanilor adulți, are un efect moderat asupra conținutului de acid docosahexaenoic din creier și retină. Pe de altă parte la șobolanii hrăniți exclusiv cu linoleat sau arachidonat ca singură sursă lipidică, nu au fost semnalate scăderi esențiale ale acidului C22:6 ω 3, nici chiar după 100 de zile de dietă, studiul lui Mohrhauser a fost efectuat în 1963, pe loturi ample cu caractere controlate. În cazul în care este disponibilă o sură de acizi grași ω 6 (din dietă de exemplu), are loc o înlocuire a acidului C22:6 ω 3 cu acid C22:5 ω 6. Acest rezultat surprinzător a fost dovedit experimental de grupe diferite de cercetători, Eddy (1977), Gali (1971), Bourre (1984), Sanders (1984). Atunci când nu există o sursă de acizi grași ω 3 sau ω 6, acidul oleic (C18:1 ω 9), este metabolizat, generând o acumulare de C20:3 ω 9 în creier, particular în aminofosfolipide, observația aparține lui Sun (1974), și Galli (1970). Interesant de remarcat este faptul că ulterior aceste substituții, raportul dintre acizii grași polinesaturați și acizii grași nesaturați are tendința de a rămâne constant.

O dietă constantă, săracă în acizi grași esențiali (deficientă), timp de 9 luni conduce la o scădere a concentrației acidului docosahexaenoic în retină cu aproximativ 5%, a acidului arachidonic cu 63%, iar acidul C20:3 ω 9 înregistrează o creștere marcată de la 0% la 7.5%. Valorile sunt raportate procentual la cantitatea de acizi grași totali. Acestea au fost concluziile studiilor efectuate de Forrest în 1972.

În 1977, Tinoco și colaboratorii raportau, faptul că șobolanii hrăniți timp de două generații cu metil linoleat, au prezentat o concentrație a acidului C22:6 ω 3 retineal de 13%, la prima generație, respectiv de 2.70% la a doua generație comparativ cu 37.70% la lotul de control. Similar, țesuturile testiculare ale șobolanului sunt rezistente la depleția C22:5 ω 6, o astfel de depleție este dependentă însă de acizii grași ω 6.

Mecanismul de conversie a acidului C18:3 ω 3 la C22:6 ω 3, în cazul organismului uman pare a fi diferit decât în cazul modelului animal. Dyerberg și colab. au demonstrat experimental în 1978 că, nivelul acidului docosahexaenoic esterificat la triacilglicerolii și fosfolipidele plasmatice crește considerabil la un pacient ce a primit timp de o săptămână o dietă suplimentată cu ulei de cod (*Gadus morhua* sau *Gadus macrocephalus*, generic orice specie a familiei *Gadus*). Ei au demonstrat că suplimentarea dietei cu ulei extras din semințele de *Linum usitatissimum*, ce conține o cantitate de acid linolenic de cinci ori mai mare decât uleiul de cod dar nu are în compoziția sa reprezentanți superiori ai clasei ω 3, nu produce același efect.

În consecință este evident că rata desaturării-elongării acidului linolenic în organismul uman, la C22:6 ω 3, este extrem de scăzută.

Crawford în 1976, a observat că plasma maternă, sângele placentar, țesutul cerebral și hepatic obținut prin avort terapeutic în al doilea trimestru de sarcină au capacitatea de a converti acidul C22:5 ω 3 la C22:6 ω 3, dar cantitativ, mult diminuată, când s-a comparat cu țesuturile similare de cobai. S-a observat că țesuturile umane provenite de la indivizi cu un mod de alimentație vegetarian strict, laptele matern, precum și laptele de vacă au un conținut scăzut de C22:6 ω 3. Mai mult la vegetarieni se remarcă o creștere relativă a C22:5 ω 3, având ca urmare imediată, o modificare a raportului C22:5 ω 3/ C22:6 ω 3 în sensul creșterii acestuia. Aceste observații sugerează faptul că rata Δ -4 desaturării la specia umană este un proces lent, spre deosebire de șobolan. Observația pe șobolan îi aparține lui Sprecher și a fost făcută în 1977, în lucrarea "Polyunsaturated Fatty Acids" (Acizii grași polinesaturați) apărută

sub editarea lui Kunan și Holman. Lucrarea amintită se remarcă printr-o extraordinară actualitate la mai bine de 25 de ani de la apariția ei.

Acidul docosahexenoic găsit în organele umane provine foarte probabil din factorii nutritivi, de unde este preluat și apoi încorporat. Această teorie este susținută de observațiile lui Sanders (1981) și Dyerberg (1980), conform cărora cantități relativ scăzute de C20:5 ω 3 și C22:6 ω 3, pot fi preluate și încorporate rapid, alterând matricea de acizi grași mai mult decât concentrațiile ridicate de acid linolenic. În plus observația este susținută și de faptul că inducerea de concentrații crescute de acid docosahexanoic la nivel cerebral este urmată de o inhibiție semnificativă a procesului de Δ -4 desaturare.

Tabel 3.22.

Concentrația acidului docosahexanoic în diferite tipuri de țesuturi biologice (după Tinoco, 1982).

SPECIE	ȚESUT	CLASA LIPIDICĂ	% C22:6 ω 3	ALTE COMPONENTE IMPORTANTE	COMENTARIU
Berbec	Spermă	FC	77.3	16:0	Crescut în plasmalogenul colinic. Neill (1973).
Berbec	Spermă	FL	65.1	16:0	Neill (1973).
Bovină	Retină	FE	38.7	18:0	Bastonage, Anderson (1971).
Bovină	Retină	FS	37.7	18:0	Bastonage, Anderson (1971).
Bovină	Retină	Total	37.6	16:0,18:0	Bastonage, Nielson (1970).
Bovină	Retină	FE	29.5	16:0,18:0	Similar la câine, porc, oaie și iepure. Anderson (1970).
Bovină	Retină	FS	24.8	18:0,18:1	Similar la câine, porc, oaie și iepure. Anderson (1970).
Bovină	Retină	FC	18.5	16:0,18:0,18:1	Bastonage Anderson (1971)
Șoarece	Creier	FE	42.7	20:4	Fractie alchenil, Sun (1974).
Șobolan	Splină	FE	6.0	18:0, 20:4	Tinoco(1978)
Șobolan	Spermă	Total	<2.0	20:4, 22:5	20:4 și 22:5 ω 6 sunt 16-18%, David (1966).
Șobolan	Sarcolemă	FL	11.2	16:0,18:0,	David (1966).
Șobolan	Retină	Total	46.2	18:0	Bastonage, Stone (1979).
Șobolan	Mușchi	FE	36.1	18:0, 20:4	15.9% în FS + FI, Tinoco(1978)
Șobolan	Inimă	FE	23.4	18:0, 20:4	12.1% din totalul FL, Gudbjarnason (1978).
Șobolan	Ficat	FE	15.6	16:0, 18:0, 20:4	Tinoco (1978).
Șobolan	Ficat	FL	8.5	16:0, 18:0, 20:4	14.7% la vârsta de 16 zile, Sinclair (1975).
Șobolan	Creier	FS	37.0	18:0	Breckenridge (1973).
Șobolan	Creier	FS	34.1	18:0	Breckenridge (1972).
Șobolan	Creier	FE	32.4	18:0	Breckenridge (1972).
Șobolan	Creier	PE	30.6	18:0,20:4	Breckenridge (1973).
Șobolan	Creier	FC, FI	<6.9	16:0,18:0,20:4	Ridicat 20:4 în FI, Breckenridge (1973).
Șobolan	Creier	FC,FI	<4.7	16:0,18:0,20:4	Ridicat 20:4 în FI, Breckenridge (1972).

Umană	Trombocite	Total	5.8	16:0, 18:1	Eschimoși Groenlanda, Dyerberg (1979).
Umană	Trombocite	Total	1.5	16:0, 20:4	Populație Daneză, Dyerberg (1979).
Umană	Spermă	Total	35.2	16:0,18:0,	Poulos (1973).
Umană	Ser	FL	3.9	16:0,18:0. 18:2	Mest (1983).
Umană	Retină	FE	22.2	18:0,20:4	Anderson (1970).
Umană	Retină	FS	18.5	18:0,18:1	Anderson (1970).
Umană	Retină	FC,FI	<5.0	16:0,18:0, 18:1	Anderson (1970).
Umană	Plasma	FC	4.3		Omnivori, Sanders (1981).
Umană	Plasma	FC	1.3		Vegetarieni, Sanders (1981).
Umană	Lapte	Total	0.59		Sanders (1979).
Umană	Creier	FS	36.6	18:0, 18:1	C20:4 ω6 scăzut, sursa materie cenușie, O'Brien(195)
Umană	Creier	FE	24.3	18:0, 22:5	13.8% C20:4ω6, sursa materie cenușie, O'Brien (1965).
Umană	Creier	FS	5.6	18:0,18:1	18:0 și 18:1 fiecare 35-40%, materie albă, O'Brien (1965).
Umană	Creier	FE	3.4	18:1,22:5	18:1 aprox. 42%, materie albă O'Brien (1965).
Umană	Creier	FS,FC, FE	< 2.3	18:1	PUFA urme, O'Brien (1965).
Umană	Celule roșii	FL	6.0	18:0, 20:4	Tinocc(1978)

Abreviații utilizate în tabel

Total – Extract lipidic total	FI- Fosfatidilinozitol
FL – Frația fosfolipidică	FC –Fosfatidilcolină
FE – Fosfatidiletanolamină	FS-Fosfatidilserină
Valorile sunt exprimate ca procente din acizii grași totali	

Diminuarea Δ-4 desaturării este determinată de aportul exogen (din factorii nutriționali) la nivel cerebral al acidului C22:6ω3. Acest proces complex de preluare și încorporare, conform studiilor efectuate de Onuma în 1984, este un proces metabolic preferențial în detrimentul acidului arachidonic. Adesea concentrația polinesaturatului în placentă este mai ridicată decât în plasma maternă, indicând fie o încorporare preferențială fie un proces local de desaturare/elongare. Este foarte probabil ca mecanismul de elaborare cerebrală al C22:6ω3 să fie extrem de rapid într-o perioadă de dezvoltare a creierului, (ca organ) imediat după naștere, în timpul căreia procesele de desaturare/elongare și încorporare sunt accelerate. Rata de formare a polinesaturaților cu catenă lungă în țesutul hepatic este moderată la acest moment de dezvoltare.

Mecanismul regulator al desaturării este un proces complex influențat de competiția dintre acizii C18:1ω9, C18:2ω6 și C18:3ω3, produșii lor de reacție (care pot cauza inhibiția printr-un mecanism de "feedback") și reacțiile competitive, de exemplu transacilarea enzimatică, care pot modifica concentrațiile substraturilor. În plus, are loc retroconversia polinesaturaților, oferind suportul necesar unor reacții de terminarea a lanțului de biosinteză. De exemplu C22:5ω6, C22:4ω6, și C22:3ω6, sunt retroconverși la C20:4ω6, C20:4ω6, respectiv C20:3ω6. Aceste procese au fost amplu dezbătute de Verino (1964), Sprecher (1967, 1977) . A fost sugerată posibilitatea ca reconversia C22:6ω3, să joace un rol în

acumularea acizilor C20:5 ω 3 și C22:5 ω 3, în eritrocitele provenind de la copii hrăniți artificial, dar se pare că de acest fenomen este responsabil în mare măsură și rata extrem de scăzută a Δ -4 desaturării în organismul uman. Aceste studii demonstrează evident că țesuturile cu conținut ridicat de acid docosahexaenoic, îl rețin și funcție de dietă îl pot înlocui cu alți acizi polinesaturați cu 20 sau 22 de atomi de carbon, dacă condițiile metabolice o impun. A fost sugerat că există o perioadă de dezvoltare timpurie critică când acidul docosahexaenoic este preluat din dietă și încorporat în fosfolipide sau posibil, ca sistemele de elongare-desaturare să fie mai active în stadiile de dezvoltare timpurii (de exemplu foetale)

Întrebarea care apare în mod evident este : **"ACIZII Ω 3 ÎN GENERAL , ACIDUL DOCOSAHEXAENOIC ÎN PARTICULAR SUNT ESENȚIALI SAU NU?"**

Este un fapt unanim acceptat de lumea științifică că multe specii vii (pești, insecte, pulmonate) sunt dependente de prezența acidului linolenic, C18:3 ω 3, în anumite etape de dezvoltare. Când alimentația unor specii din familia Salmonidelor (*Salmo gairdneri*) , a fost privată de acidul linolenic acesta s-a dezvoltat mult mai lent, conversia hranei a fost mai puțin eficientă și a prezentat sindromul de șoc. După suplimentarea nutritivă cu C18:3 ω 3, sindromul de șoc dispare sau se atenuează rapid, funcția de conversie a hranei este treptat eficientă. Substituirea cu C18:2 ω 6 și C20:5 ω 3, reduce conversia hranei iar C18:2 ω 6 a fost mai puțin eficient decât cantitatea echivalentă de C18:3 ω 3, când a fost analizat factorul de creștere. Trebuie remarcat că C18:3 ω 3 și C20:5 ω 3 sunt constituenții minori ai acizilor grași totali din țesuturile Salmonidelor, spre deosebire de C22:6 ω 3, care este reprezentantul major al polinesaturaților ω 3. Yu și Sinnhuber în anul 1972, au semnalat că C22:6 ω 3 utilizat efectiv, ca înlocuitor al C18:3 ω 3, a acționat mai activ decât cel din urmă asupra factorului de creștere și capacității de conversie a hranei. Nivelul acidului docosahexaenoic în lipidele neutre și fosfolipidele tisulare ale Salmonidelor variază direct cu cantitatea de C22:6 ω 3 din dietă de la 0% la 1%. Suplimentarea cu C18:3 ω 3, a produs numai creșteri marginale ale concentrațiilor de C18:3 ω 3, C18:4 ω 3, C20:5 ω 3 și C22:5 ω 3, dar și concentrații mult superioare de C22:6 ω 3, în comparație acizii ω 3 liberi din dietă. Aceste studii au demonstrat că acidul docosahexaenoic poate fi asociat cu deficiența de polinesaturați ω 3, mai mult C22:6 ω 3 este esențial chiar și în condițiile în care acidul linolenic este prezent, dar conversia lui necesită un oarecare timp.

Întrebarea critică este : **LA CE NIVEL DE DEZVOLTARE SUNT ESENȚIALI ACIZII GRAȘI POLINESATURAȚI Ω 3, LA MAMIFERE (EVIDENT ÎN PRIMUL RÂND LA OM) ; LA NIVEL CELULAR, LA NIVELUL ORGANELOR SAU ÎNTREGULUI ORGANISM ?** Răspunsurile sunt evident dificil de enunțat, ele fac obiectul unor interpolarări sau coordonări de informații referitoare la modul în care lipidele din dietă pot influența stările patologice.

Una dintre cele mai importante și interesante observații la acest subiect, este aceea a lui Holman și colaboratorii (1982). O pacientă în vârstă de 6 ani, supusă unei intervenții chirurgicale de eliminare a unei porțiuni, din intestinul gros, a fost hrănită exclusiv parenteral, cu o dietă săracă în acid linolenic. După 5 luni de dietă, pacienta a început să prezinte episodic, deficiențe motorii, parestezie, oboseală, inabilitate la mers, durere în membrele inferioare și tulburări de vedere. Analiza acizilor grași din fosfolipidele serice a arătat diminuarea ușoară a C20:6 ω 3 și C22:6 ω 3, dar o scădere dramatică a acizilor grași polinesaturați (PUFA - polyunsaturated fatty acids), indicelui numărului dublelor legături, acizilor totali ω 3, acizilor cu 22 de atomi de carbon, paralel cu o creștere a produșilor reacțiilor de Δ -6 și Δ -9 desaturare. La introducerea acidului linolenic în alimentație, semnele neurologice au dispărut treptat în decursul a 12 săptămâni. Analiza ulterioară a acizilor grași, după reevaluarea dietei, a demonstrat că deficitul de ω 6, a fost recuperat parțial, iar anormalitatea indusă la nivelul ω 3 a fost corectată integral; concentrația C20:4 ω 3 și C22:6 ω 3, a crescut semnificativ față de normal. Holman a concluzionat în acest caz " acidul

linolenic este un constituent absolut necesar al dietei umane iar acizii grași polinesaturați $\omega 3$ sunt elemente esențiale pentru dezvoltarea normală a funcției nervoase."

Trebuie să reamintim aici observațiile din 1962 ale lui Menkes și colaboratorilor săi, care semnalau pentru prima dată o afecțiune cunoscută apoi ca " boala părului creț", caracterizată printr-un aspect particular, alb al părului, degenerescență cerebrală și cerebeloasă, retardare severă, suferință neurologică majoră în primele două luni de viață, semne ce evoluează rapid spre decerebrare. Afecțiunea a fost descrisă ca o encefalopatie degenerativă progresivă, cu transmitere recesivă legată de sex, cu evoluție letală până la vârsta de 2-3 ani. Simptomatologia caracteristică bolii apare devreme, printr-o încetinire a creșterii în greutate, icter tranzitoriu, instabilitate termică, cu tendință la hipotermie, hipotonie și mioclonii, tulburări neurologice până la letargie; părul friabil, depigmentat, de aspect sărmos, de unde și denumirea de "kinky hair syndrome", care se evidențiază numai la câteva săptămâni după naștere; disfuncție bulbară progresivă; osteopatie asemănătoare celei din scorbut, arteriopatie generalizată, cu ocluzii arteriale și fragmentări ale lamelei elastice interne. Concentrația cuprului, crescută în mucoasa intestinală, este un argument în favoarea unui defect de transport al Cu prin peretele intestinal spre sânge, având drept consecință scăderea concentrației de Cu în sânge și ficat, creșterea excreției urinare, cu un nivel normal de Cu eritocitar, și scăderea activității ceruloplasminei și a oxidazelor cuprice. Conținutul sulfhidril liber în păr crește de 9 ori. Cercetarea activității cuproenzimelor în serul bolnavilor, găsesc normală activitatea superoxidismutazică și absența dopamin β -hidrolazei. Administrarea orală a acidului Cu-nitriloacetic, deși crește concentrația de Cu în sânge și țesuturi, nu restabilește activitatea dopamino- β -hidrolazei, ceea ce ar presupune ca posibil mecanism patogenetic și un defect în fixarea selectivă a Cu, în stocarea și utilizarea sa posibil la nivelul sistemului nervos central.

Distribuția claselor lipidice și acizilor grași în creierul autopsiat a fost normală, cu excepția lui C22:6 ω 3, care a fost semnificativ scăzut în fosfatidilserină și fosfatidiletanolamină, constatarea îi aparținea lui O'Brien (1966). Pierdere selectivă de acid docosahexaenoic, C22:6 ω 3, asociată cu suferințele neurologice majore, indică faptul că degenerescența neuronală, are loc o dată cu diminuarea concentrației acidului gras polinesaturat, și este determinată de aceasta.

O evaluare prin studii neurohistologice a asocierii depleției acidului C22:6 ω 3, cu modificările neuronale, pe model animal, nu a fost efectuată, după cunoștința noastră până în acest moment euristic. Totuși, deficiența esențială de acid gras, cu diminuarea masei cerebrale, proces reversibil, la suplimentarea exogenă cu C22:6 ω 3 a fost asociată cu prezența respectiv absența acestuia. Paoletti (1972) și Sinclair (1973), au remarcat acest fapt.

Diminuarea concentrației de C22:6 ω a fost semnalată, asociată cu alte stări malade sau anormale în marea lor majoritate cu manifestări neurologice severe.

Malnutriția proteică sau deficiența severă de lizină și treonină, în stadiile timpurii de dezvoltare, conduce la scăderea concentrației de acid docosahexaenoic cerebral.

Diminuarea concentrației de acid C22:6 ω 3 cu 54%-93%, a fost semnalată de Pullarkat în 1978, în glicerolipidele plachetare la patru pacienți cu forma juvenilă a cerioidlipofucinozei neuronale. Părinții acestor copii au prezentat devieri în același sens dar atenuate. Autorii au sugerat că defectul metabolic este unul cu implicare directă a acizilor grași $\omega 3$, deoarece clasa $\omega 6$ a variat în domeniul normal iar ipoteza defectului metabolic moștenit nu a putut fi infirmată.

În 1975, Svennerholm a descris un tip de encefalopatie progresivă în care semnala o diminuare a acidului docosahexaenoic cu precădere în aminofosfolipidele cerebrale, excortată de o creștere a concentrației de acid arachidonic.

Implicarea acizilor grași în etiopatogeneza sclerozei multiple a fost și este un domeniu de studiu extrem de stringent, ce a polarizat atenția de-a lungul timpului, a multor grupuri de cercetători. Primul semnal în această direcție a fost dat de Gerstl și colaboratorii în 1965, care au raportat o scădere marcată a concentrației acizilor grași polinesaturați la pacienți afectați de scleroză multiplă. Ulterior și alte grupe de cercetători au semnalat scăderi semnificative ale acizilor grași polinesaturați din mielina pacienților afectați de scleroză multiplă, unul dintre aceștia fiind și Gerstl în 1965.

În mod normal mielina (materia albă) a pacienților cu scleroză multiplă conține mai puțin acid docosahexaenoic decât controlii. Surprinzător însă, țesutul demielinizat al subiecților afectați are de două ori mai mult C22:6 ω 3 și C20:4 ω 6, comparat cu domeniul de referință. Observația primară și globală la acest subiect a fost făcută de Kishimoto în anul 1967. Această observație a condus la observația lui Bernsohn (1967), importantă dar incompletă, conform căreia scleroza multiplă ar implica o deficiență a acizilor grași polinesaturați ω 3 în stadiile timpurii de dezvoltare cerebrale. Studiile epidemiologice dezvoltate de McAlpine (1963), au sugerat existența unei corelații între incidența afecțiunii și carența de acizi grași polinesaturați ω 3 din dietă. De exemplu, în Japonia, China și insulele Norvegiene, unde consumul de carne de pește marin este ridicat, incidența sclerozei multiple pare a fi diminuată. La polul opus incidența este crescută în Europa centrală și de nord, precum și în estul continentului. Interesant de notat observația autorului care remarcă faptul pentru subiecții care migrează dintr-o zonă de risc ridicat într-o zonă cu risc scăzut, la o vârstă de până la 15 ani, predispoziția la afecțiune este diminuată. De aici speculația conform căreia scleroza multiplă are drept cauză o carență de acid docosahexaenoic sau de precursori, necesari dezvoltării cerebrale. Această speculație aparținând lui Nussbaum (1971), a fost susținută de un experiment pe model animal (șoarece) o modificare genetică cu deficiență majoră de mielină, cu o concentrație anormală de C22:6 ω 3. La vârsta de 16 zile există un conținut extrem de scăzut de C22:6 ω 3 în fosfatidiletanolamina cerebrală. Ei au de asemenea un defect în glicolipide, unde conținutul de acizi grași cu catenă lungă este redus. În anul 1997, Di Biase și Salvati, remarcă că mielinogeneza este un proces dependent atât de proprietățile intrinseci ale celulei cât și de semnalele extracelulare. În creierul de șobolan, dezvoltarea melinei este un proces esențial post natal și interferențele externe pot afecta major sinteza melinei. Nutriția are un rol important deoarece malnutriția severă și deficiența de acizi grași esențiali (EFA – Essential Fatty Acids) cauzează hipomielinizare. Chiar dacă efectele dietei sunt mai pronunțate în perioada postnatală, când alimentația este aproape exclusiv formată din laptele matern, afectarea procesului de mielinizare continuă și după aceasta dacă se păstrează carența de acizi grași. Șobolanii cu o dietă bogată în acizi grași ω 3 prezintă o scădere relativă a cantității de proteină mielinică bazică (MBP- myelin basic protein) precum și a activității CNP-azei (2',3'- Nucleotide ciclic 3'-fosfohidrolază) indicând o întârziere în depunerea melinei și/sau o instabilitate structurală a acesteia. Studii recente au indicat că dietele cu acizi grași pot fi implicate pozitiv în controlul mielinogenezei în sistemul nervos central (CNS - central nervous system).

Mielinogeneza creierului uman poate fi și ea afectată de factorii externi. Deficiența acizilor grași esențiali este bine studiată mai ales în raport cu rolul acidului docosahexaenoic în dezvoltarea acuității vizuale. Observația conform căreia acizii grași din dietă pot afecta compoziția membranelor celulare a condus la elaborarea unor factorii nutritivi ce s-au dovedit eficienți în multe cazuri de afecțiuni ale sistemului nervos central. Este deja în practica terapeutică suplimentarea formulelor nutritive pentru prematurii cu deficiențe vizuale, cu C22:6 ω 3, rezultatele tratamentului sunt benefice și stabile. Administrarea de C22:6 ω 3, a fost aplicată și în cazul pacienților cu afecțiuni de biogeneză peroxisomală, știut fiind că în creierul acestora concentrația de acid docosahexaenoic este foarte scăzută. În timpul tratamentului, conținutul de acid gras a crescut în celulele roșii și mai mult ca probabil în

membranele cerebrale, cu o reflectare neurologică și electrofiziologică pozitivă. Un amestec de gliceriltriurecat și gliceriltrioleat a fost testat în Adrenoleucodistrofie, o afecțiune ce implică stocarea anormală a acizilor grași cu catenă foarte lungă (VLCFA–Very Long Chain Fatty Acids) în țesuturi și fluidele biologice. Rezultatul este oarecum discutabil deși concentrația plasmatică a VLFA s-a diminuat mult, eficiența pentru degradarea mielinei nu a fost probată.

Scleroza multiplă ca posibilități de tratament , ulterior și ca dovezi etiopatogenetice a preocupat și preocupă un grup românesc de cercetare.

S-a pornit de la necesitatea elaborării unui mecanism credibil de acțiune terapeutică a produsului RODILEMID® produs de SICOMED S.A. – București, care să înlocuiască aberația postulată de “autorii” protoprodusului, ce s-a dovedit a avea o eficiență condiționată în tratamentul sclerozei multiple. Elaborarea teoriei “modulatorilor de oligoelemente” în 1994-1995, de către Băcanu I., Thomas St., Băcanu Ș., Ionescu I., Sârzea S. . a dat o explicație mecanismelor de “funcționare” a acestor tipuri de xenobiotice , conducând la generarea unor scheme de tratament eficiente și net, diferite de cele cunoscute până atunci. Aparent, drumul se înfunda pentru că rezultatele obținute clinic în urma tratamentului. nu concordau cu nici una din ipotezele etiopatogenetice acceptate ale afecțiunii. S-a observat faptul că rezultatele clinice erau dependent de o anumită compoziție a dietei, fiind maxime când aceasta era bogată în anumiți nutrienți. Un aport exogen de acizi grași polinesaturați. cu catenă lungă, paralel cu reducerea concentrației de acizi grași saturați s-a dovedit eficient în tratamentul pacienților afectați de scleroză multiplă, deși s-a notat o scădere a concentrației plasmatice și eritrocitare de acid linoleic. Rezultatul extrem de bine obiectivat și monitorizat a fost o reducere a severității și frecvenței atacurilor.

Era primul pas important în demontarea teoriei aberante, fără nici un suport biochimic și biomolecular a “chelaterapiei non toxice”.

Studiile ulterioare dezvoltate în paralel în România și Germania, de către o echipă formată din Ionescu I., Sârzea S., Sârbu Alex., Boeriu F., și apoi lucrările efectuate de Meister (1991); Stacey (1989); Eck (1989); Droge (1990, 1991); Kinscherf (1994); Deber (1991); Mai (1990), au venit să susțină existența unui stress oxidativ în cazul sclerozei multiple, ce poate fi ulterior unei infecții virale. În plus modificările biochimice constatate se regăsesc și în cazul infecției cu virusul HIV.

Rezultatele obținute de Ionescu I., Sârzea S., Boeriu F. (2000), referitor la obiectivarea unui stress oxidativ și consecințelor acestuia în scleroza multiplă au fost întregite și confirmate de Syburra și Passi în 1999. Anterioritatea celor din urmă este incontestabilă, deoarece publicarea rezultatelor noastre a fost stopată de caracterizarea fizico-chimică, testarea în fază preclinică și brevetarea unui produs farmaceutic activ în condiții de stress oxidativ.

La acest moment euristic, este bine cunoscut și fundamentat faptul că celulele sistemului nervos pot fi supuse cu ușurință, unui stress oxidativ datorită concentrației interne scăzute de antioxidanți, în special enzimatici, precum și prezenței în structura membranoasă a acizilor grași polinesaturați superiori (PUFA – Polyunsaturated fatty acids). Investigarea statusului oxidativ sanguin (plasmă, eritrocite și limfocite) la pacienți afectați de scleroză multiplă, realizată în paralel cu martori indemni ca vârstă a condus la rezultate extrem de interesante. Analiza multiparametrică a cuprins atât teste enzimatiche cât și non-enzimatiche, s-a titrat astfel : Vitamina E (Vit.E), glutationul redus și oxidat (GHS, GS-SG), superoxid dismutaza (SOD), glutation peroxidaza (GPX), catalaza (CAT) , totul în conjuncție cu matricea acizilor grași fosfolipidici totali. Atunci când rezultatele patologice au fost comparate cu cele normale s-a evidențiat, diminuarea concentrației de vitaminei E în plasmă și limfocite precum și glutation peroxidazei eritrocitare. Acest status antioxidant caracteristic (deficient) pentru probele biologice ale pacienților afectați de scleroză multiplă au fost asociate cu

concentrațiile anormale de acizi grași polinesaturați plasmatici și eritrocitari în special cu C20:3 ω 6 și C20:4 ω 6. O observație particulară a fost diluarea concentrației de grupărilor tiolice libere plasmaticice.

Concluzia acestor studii a generat convingerea eficienței unei terapii asociate, antioxidanți (Vitamina E., generatori de grupări tiolice libere, acid ascorbic) cu un control strict al dietei respectiv titrarea aportului exogen de acizi grași polinesaturați. Testele clinice cu protoprodusul amintit au confirmat afirmate de noi. Suma experimentelor noastre a condus la elaborarea și brevetarea unor produse medicamentoase cu toxicitate extrem de redusă (terapia afecțiunii este de lungă durată) dar extrem de eficiente. Testările ulterioare pe culturi celulare l-au dovedit eficiența și în infecția cu virusul HIV.

CAPITOLUL 4

STUDIUL BIOCHIMIC AL MEMBRANELOR ERITROCITARE

4.1. EVOLUȚIA CONCEPTULUI DE MEMBRANĂ BIOLOGICĂ

4.1.1. MEMBRANA CELULARĂ

Este greu de dat o definiție completă membranelor biologice. Acestea sunt structuri continue bidimensionale (foițe), compuse în principal din proteine și lipide, ce realizează compartimentarea materiei vii, având proprietăți caracteristice de permeabilitate selectivă.

Se pot distinge mai multe categorii de membrane celulare :

1. Membrana citoplasmatică (plasmalema, membrana plasmatică) de circa 60-100 Å grosime, separă conținutul celulei de mediul înconjurător, având în principal funcția barieră celulară. În același timp, membrana citoplasmatică permite trecerea selectivă – influxul- a metaboliților de la exterior spre interior, precum și invers, - efluxul - din celulă spre exterior. La plante și uneori la bacterii, plasmalema este dublată de o a doua barieră, peretele celular.
2. Membranele organitelor celulare, care sunt mai subțiri de circa 60 Å, includ :
 - a) Membrana dublă a mitocondriilor (fig 4-1.).
 - b) Membrana lizosomilor, a cărei integritate asigură menținerea enzimelor lizosomale în stare inactivă, "latentă".
 - c) Reticul endoplasmatic, reprezintă o rețea de canale ce traversează întreaga celulă, ca un aparat circulator intracelular, se compune din reticulul neted și rugos (cu ribosomii atașați, fig4-2.)).
 - d) Aparatul Golgi, (fig.4-3.) compus din vezicule și cisterne ce se află în relație de continuitate cu reticulul endoplasmatic. Cu toată continuitatea compoziția chimică și enzimatică este diferită, după cum au arătat studiile efectuate de prof. Dr. George Emil Palade (1953,1975,1985). Prin fragmentarea celulei în cursul omogenizării și al centrifugării diferențiale, membranele reticulului endoplasmatic formează vezicule numite microsomi.
 - e) Membrana nucleului este dublă și prevăzută cu pori. Membrana externă nucleară se continuă cu reticulul endoplasmic.
3. Membrane speciale :
 - a) Teaca de mielină, care înconjoară axonii neuronilor, produsă de celula Schwann

- b) Discurile segmentului extern al celulelor cu bastonașe din retină, se formează prin pliarea membranei citoplasmatică, urmată de detașarea discurilor, care se așează unul peste celălalt ca un fișic de monede.

Cuprinzătoarea trecere în revistă a tipurilor de bio-membrane realizată prof. Dr. Gh. Benga în 1979, ilustrează marea lor diversitate morofuncțională, structurală, compozițională.

Membranele din surse biologice diferite par a avea comun multe particularități fizico-chimice. Acestea includ: o rezistență electrică ridicată, dimensiuni ce variază într-un domeniu extrem de îngust și o compoziție chimică dominată de sistemele lipoproteice. Aceste aspecte comune sunt absolut necesare funcției comune : compartimentarea selectivă pentru procesele celulare vitale, esențiale.

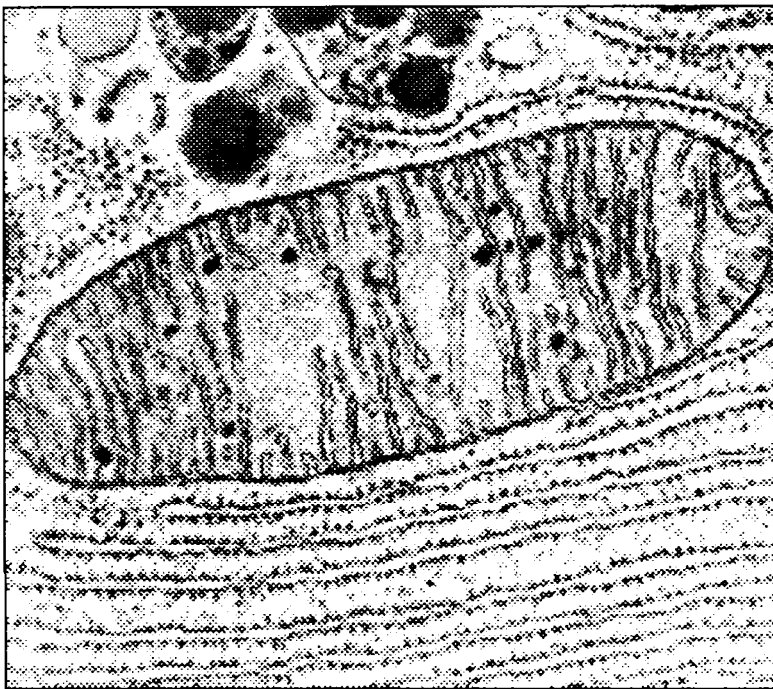


Fig. 4-1.
Mitocondriile sunt organele specializate în producerea energiei necesară activităților celulei eucariote; energia eliberată prin oxidarea unor substanțe este convertită în energie chimică (ATP) prin procesul de fosforilare oxidativă. Ele sunt localizate în celulă acolo unde sunt necesare cantități crescute de ATP. Procesele metabolice localizate în mitocondrii pot fi încadrate în două clase : metabolism energetic și metabolism material (dominat de anabolism).

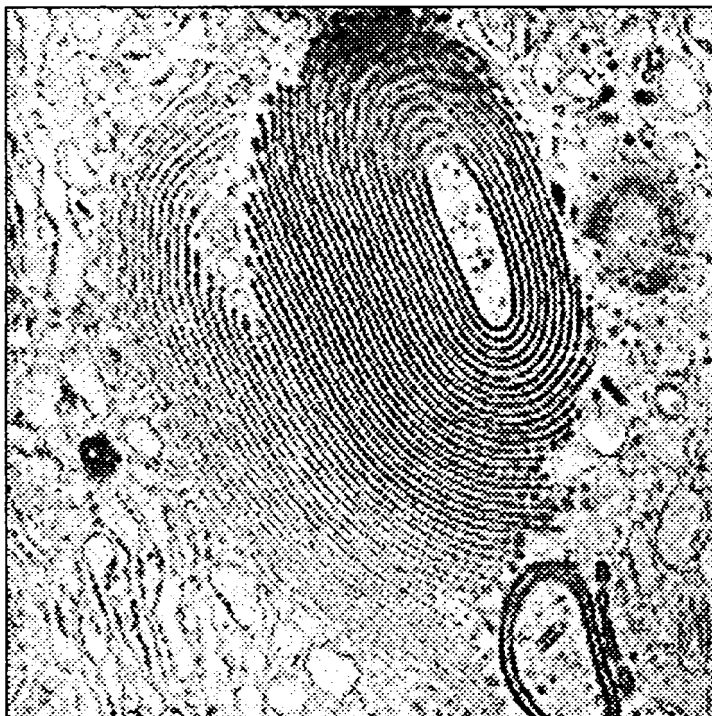
La nivel celular, membrana plasmatică se constituie ca o barieră selectivă care permite celulei să mențină intern, un mediu metabolic favorabil și în același timp se constituie într-un complex sistem de comunicare între interiorul celular și mediul extern, înconjurător. Unele molecule sunt eliminate, pe când alte substanțe și produși metabolici se schimbă continuu între interior și exterior. La nivel subcelular, compartimentarea selectivă de către membrane permite diferitelor funcțiuni celulare să fie organizate în domenii discrete.

Fig. 4-2.
Ribozomii : sediul biosintezei proteinelor. Au un rol esențial în coordonarea traducerii codului genetic, interacționând cu mRNA și cu celelalte molecule necesare în biosinteza proteinelor. La eucariote pot fi liberi în citoplasmă ori atașați reticulului endoplasmatic ; aceștia din urmă au fost numiți multă vreme "granulațiile lui Palade", după numele savantului de origine română *George Emil Palade*.



Fiecare domeniu prezintă un mediu discret pentru o funcție particulară dar nicidecum nu interacționează ci integrează celula. Natura sistemelor membranare este atât de specializată încât anumite aspecte pot fi asociate chiar cu noțiunea de membrană.

Aceasta conduce la variații de structură și compoziție a membranelor provenind din surse diferite. Membrana apare ca o matrice complexă, sediul în care au loc reacții enzimatice specializate. O particularitate importantă al acestor reacții este caracterul lor vectorial. De exemplu membrana plasmatică poate prezenta o permeabilitate selectivă față de ionii sodiu și potasiu, dar în anumite condiții poate realiza o concentrare de ioni potasiu intracelular raportat la exteriorul celulei. Modificările de permeabilitate ale membranei în raport cu ionul potasiu joacă un rol primordial în procesul de transmitere a potențialelor de acțiune. La nivel subcelular, organele celulare prezintă la rândul lor o selectivitate în raport cu deplasarea ionilor prin membrane. De exemplu la nivel mitocondrial o asemenea selectivitate este o



metodă de control a substratului anionic.

Fig. 4-3.
Aparatul Golgi – A fost descris de Camillio Golgi, ca un "aparat reticular intern", datorită aspectului de rețea perinucleară.

Mecanismul intim, prin care reacțiile asociate membranei mitocondriale transformă energia liberă, oxidativă în substanță "utilă", ca de exemplu sinteza ATP, este până la acest moment euristic insuficient cunoscut, dar pare a fi (indubitabil) legat de reacțiile ce diferențiază fața internă de cea externă a complexului membranar.

O serie de reacții vectoriale proprii, sistemului membranar asociat, pot fi considerate cu certitudine unele reacții în corelație cu metabolismul lipidic unde funcția membranei se reduce, general vorbind, numai la crearea și menținerea unui mediu cu o anumită hidrofobicitate.

4.1.2. PARTICULARITĂȚI MORFOLOGICE ȘI TOPOBIOCHIMICE ALE MEMBRANEI ERITROCITARE

În 1665, la vârsta de 29 de ani, Robert Hooke publică "Micrographia", carte în care utilizează pentru prima dată concomitent cu denumirea "pori microscopici", termenul celulă (*cellula*) în sensul său biologic referindu-se la structura microscopică a plutei. El, era un adversar declarat a lui Newton, căruia de altfel îi va furniza prin lucrările sale date utile în formularea legii gravitației universale și studiului dispersiei luminii.

Abia în 1824, R. J. H. Dutrochet prezintă primele observații care indirect, pot fi considerate drept atestarea existenței unei frontiere celulare, demonstrând că menținerea laolaltă a celulelor globulare se efectuează prin forțe adezive. Alt eveniment important se produce în 1831, când Robert Brown observă, în interiorul celulelor vegetale, nucleul, pentru ca în 1838-1839 colaborarea dintre Mathias Schleiden și Theodor Schwann (dar îndeosebi prin contribuția ultimului) să conducă elaborarea teoriei celulare, cea mai importantă generalizare din istoria biologiei. În anul următor (1839) T. Schwann va publica istorica sa aserțiune : "**partea elementară a țesuturilor sunt celulele, similare în general dar diverse ca formă și funcție. Esențialul vieții constă în formarea celulelor**". Universalitatea celulei drept component al structurilor vii, unitate fundamentală a acestor

structuri a propulsat enorm cercetarea biologică și medicală a timpului. Astfel încât, curând, în 1855, Karl W. Nägeli, observând diferențe în penetrarea pigmentilor la celulele vegetale normale în comparație cu cele alterate, examinează periferia celulei pe care o denumește membrană plasmatică. Termenul de membrană a fost derivat din latinul "*membrana*", cu sensul de înveliș, coajă, dar și pergament. K. W. Nägeli este deopotrivă și un precursor al geneticii, descoperind în nucleu niște formațiuni denumite bastonașe, cromozomii de mai târziu (denumiți astfel în 1888 de către H. Sorby de Sheffield), cărora cercetarea timpului nu era pregătită să le descifreze importanța, deși Gregor Mendel își începuse meticuloasele studii. Tot K.W. Nägeli va pune în evidență va pune în evidență împreună cu K. Cramer în 1855, surprinzătoare modificări ale celulelor vegetale, denumite plasmoliză și deplasmoliză. Peste puțin timp, Hugo de Vries va relua experimentul, constatând apariția plasmolizei la celulele vegetale introduse în soluții saline concentrate, sau soluții concentrate de zaharoză. Protoplasma se retracta în mijlocul celulei, pierzând contactul cu peretele celular celulozic. S-a ajuns astfel la supoziția că în jurul protoplasmei se află o membrană fină semipermeabilă. Aceste experiențe clasice sunt importante, deoarece au eliminat o confuzie: peretele celulozic al celulelor vegetale, vizibil fără probleme la nivelul microscopului optic, era considerat drept membrană celulară. Anul 1858 reprezintă un alt moment important : Rudolf Virchow, pornind de la celebrul său principiu "*omnis cellula e cellula*", (orice celulă provine din altă celulă), va dezvolta ideea generală atât de actuală în prezent că orice boală este în ultimă instanță o boală a celulelor. Urmează, în 1861 elaborarea de către Max Schultze a unei definiții esențiale: "**celula este o acumulare de substanță vie sau protoplasmă delimitată definit în spațiu și posedând membrană celulară și nucleu**". Conceptul lui Schultze a fost analizat ulterior din punct de vedere științific și filozofic de Levin (1969) și Harrison (1980). În 1869, Julius Bernstein afirmă că nervul și fibrele nervoase posedă ioni pozitivi în exces la exterior și un exces de ioni negativi în interior.

Anul 1890, poate fi considerat un moment deosebit în istoria cunoașterii biomembranelor, deoarece Wilhem Pfeffer – botanist german - definește, pornind de la experimente, extrem de clar și de concis conceptul de membrană biologică :

1. celula este înconjurată de membrana celulară,
2. membrana este o barieră universală, în afara trecerii apei și a solviților.

Stabilirea faptului că membrana plasmatică reprezintă o barieră majoră de permeabilitate a stimulat o serie de studii referitoare la pătrunderea substanțelor în celule.

Existența anumitor forme de strat dublu lipidic în membranele naturale, ca o barieră selectivă pentru moleculele mici ale neelectroliților a fost studiată pentru prima dată de Charles Overton (1895–1900) . A obținut rezultate interesante pe celule animale și vegetale : substanțele lipofile (hidrocarburi, solvenți organici, eteri, alcooli) pătrund mult mai rapid în celule decât substanțele polare, hidrofile. A precizat, că acțiunea rapidă a anestezicelor asupra celulelor nervoase este consecința penetrării lor în țesuturi, determinată de proprietățile lipofile, de solvenți ai grăsimilor. Aceste rezultate i-au sugerat *natura lipidică* a biomembranei, sau în expresia sa "*lipoidală*", autorul denumind grăsimile "lipoizi". Modelul membranei Overton, poate fi considerat ca prima reprezentare intuitivă, având ca bază date experimentale.

Primul model membranal conturat clar, a fost elaborat în 1925, doi olandezi, E. Gortner și F. Grendel, de la Universitatea din Leida, care au extras lipidele din globulele roșii, etalându-le apoi în balanța inventată în 1917 de Irving Langmuir, astfel devenind posibilă măsurarea ariei unui strat monolipidic. După etalarea lipidelor în monostrat, în cuvele Langmuir ei au constatat că suprafața obținută reprezintă dublul suprafeței totale a eritrocitelor utilizate, de unde concluzia că lipidele se dispun în membrană sub formă de strat dublu. Conceptul de strat bimolecular de fosfolipide de la nivelul membranei rezistă până astăzi. În 1925, Fricke deduce din măsurători ale impedanței electrice că bariera

hidrocarbonată ar trebui să aibă o grosime de aproximativ 33 Å. Reprezentarea membranei de către Gortner și Grendel constituie primul model lamelar dintr-o întreagă serie de modele concepute în perioada 1925-1950.

În 1933, doi cercetători finlandezi, P. Collander și H. Barlund măsoară permeabilitatea celulelor algei *Chara ceratophylla* pentru diferiți neelectriți în corelație cu coeficientul de partiție al acestor substanțe. Ei constată că solubilitatea ulei/apă a substanțelor este direct proporțională cu gradul de permeabilitate al membranei pentru aceste substanțe. Un fapt extrem de important este exprimarea cantitativă a acestei permeabilități în mol/cm²/oră/mol/litru. Aceasta le-a permis să observe că moleculele mici pătrund în celulă mai rapid decât le-ar permite-o solubilitatea în ulei, ceea ce l-a condus pe P. Collander la o concluzie fundamentală: **“moleculele de dimensiuni medii și mari penetrează membrana plasmatică doar când sunt dizolvate în lipide, cele mai mici pot pătrunde și pe o altă cale. Astfel membrana plasmatică pare a acționa deopotrivă ca un solvent selectiv și o sită moleculară”**. În consecință, imaginea membranei devine mai complexă, un mozaic conținând zone lipidice și pori accesibili pentru apă (era primul semnal intuitiv referitor la acvaporine).

În 1939 vor începe lucrările în domeniul studiului biomembranelor James Danielli, de la Princeton University și Hugh Davson, de la University College of London. Primele lucrări efectuate de J. Danielli constau în realizarea unei cuantificări pronunțate a datelor obținute de P. Collander, extinzând experimentele de măsurare a permeabilității și la bacteria *Beggiatoa mirabilis*. Ajunge la concluzia că traversarea membranei depinde în primul rând de diametrul moleculei și evaluează chiar dimensiunea medie a unui por, comparabilă cu diametrul unei molecule de sucroză (aprox. 8.8 Å). Ulterior, J. Danielli începe colaborarea cu H. Davson și împreună vor lua în considerare experimentele efectuate de Cole, Harvey și Shapiro, care probau că modelul Gortner-Grendel nu poate explica tensiunea superficială redusă de la nivelul suprafeței celulare. Astfel a fost măsurată direct tensiunea superficială a celulelor cu un tensiometru Lecomte du Noüy, determinând forța de atracție între suprafața celulei și un mic inel de platină cu care aceasta era pusă în contact. În mod surprinzător tensiunea superficială era mult mai slabă (1-2 dyne/cm²) decât cea a straturilor de ulei (7-15 dyne/cm²). Devenea clar că biomembranele nu puteau fi alcătuite numai din lipide. Se mai știa că adăugarea de proteine la ulei (albuș de ou adăugat la ulei extras din macrou, de exemplu) scade tensiunea superficială la valori comparabile cu cea măsurată la suprafața celulelor. Se contura, deci, ideea că proteinele sunt un component al biomembranelor.

În 1934, J.F. Danielli, împreună cu Newton Harvey, publică prima lucrare din cele două, cu adevărat istorice, în care se sugerează că dacă proteinele ar fi adsorbite la nivelul stratului lipidic tensiunea stratului de suprafață a lipidelor s-ar reduce. A doua lucrare, publicată împreună cu H. Davson conține și mai clar ideea formulată anterior: dacă proteinele sunt adsorbite pe lipidele membranare, poate fie explicată tensiunea superficială redusă de la suprafața celulelor. Astfel a fost conceput primul model *paucimolecular* (*paucus*, plural *pauci*, semnificând în latină: puțin, puțin numeros) denumit: **modelul Danielli-Davson**. În această primă variantă se consideră că membrana este alcătuită dintr-un strat subțire de lipide (lipoizi), probabil, dar nu necesar, dispuse în dublu strat, pe care au fost adsorbite pelicule de proteine presupuse globulare. Interesant de observat că în primul model paucimolecular a fost complet ignorată bariera bilipidică, demonstrată de Gortner și Grendel (1925).

În varianta următoare se consideră că există în imediata apropiere a dublului strat lipidic o peliculă de proteine desfășurate, iar la suprafață un strat de proteine globulare. Este drept, că în 1938 nu se știa nimic despre structurile conformaționale ale proteinelor, difracția cu raze X abia începea să fie utilizată.

În zona centrală a membranei se află dublu strat de fosfolipide descris de Gorter și Grendel. Moleculele lipidice sunt contrapuse prin resturile lor de acizi grași, legătura lor fiind asigurată de forțe de atracție slab polare, hidrofobe, în principal de tip Van der Waals. Deoarece se formează un mare număr de legături între resturile metilen ale lanțurilor lungi de acizi grași, ansamblul biomolecular format este coerent. În 1938, J.F.Danielli și H. Davson concep modelul ce va deveni celebru, de aceea el merită o descriere detaliată. Această "foiță" centrală este cuprinsă "în sandwich" între două straturi de proteine cu configurație fibrilară. Lanțurile polipeptidice conțin numeroase resturi de aminoacizi având o funcție secundară ionizată (resturi de acizi glutamic, aspartic sau de lizină) și ca urmare la suprafața proteinelor există numeroase sarcini electrice de semne opuse ale capetelor polare de fosfolipide. În acest mod se stabilesc legături electrostatice care unesc lipidele și proteinele.

Membrana devine un complex molecular, cu o zonă centrală hidrofobă de circa 40 Å grosime, intercalată între cele două zone periferice, hidrofile, unde se află proteinele și capetele polare ale fosfolipidelor. Ansamblul are, în medie, 75 Å grosime și este coerent, datorită caracterului amfipolar al moleculelor de fosfolipide care asigură tranzițiile între zonele de polaritate diferită, așa cu apare din studiile lui Mazliak, (1971); Danielli (1975,1982) Benga (1979). În 1956, J.F.Danielli aduce câteva modificări modelului original, în scopul asimilării unor noi descoperiri alături de proteinele fibrilare se adaugă proteine globulare în acord cu asimetria membranelor și existența unor enzime la nivelul acestora; fosfolipidele conțin lanțuri de acizi grași cu structură ce nu este rigidă, ci dezordonată; la nivelul stratului bimolecular lipidic se pot glisa steroli, sau alte lipide neutre se adaugă pori apoși tapetați, de proteine și traversând grosimea stratului bilipidic, persistă legătura, electrostatică de tip polar între lipide și proteine, existând și legături de tip hidrofob între aceleași molecule. Începând din anul 1950 se dezvoltă intensiv adaptarea la studiul biomembranelor (în general a *membranologiei* - termen propus de Teorell în 1966) a tehnicilor de microscopie electronică și difracția cu raze X obținându-se astfel imagini directe ale acestor structuri.

Primele imagini ale membranelor plasmatică au fost evidențiate cu microscopul electronic convențional de transmisie (fig.4.5.), pe ultrasecțiuni celulare fixate și contrastate cu tetroxid de osmiu (OsO_4) sau permanganat de potasiu (KMnO_4). S-a constatat că membrana prezintă 3 straturi care diferă prin opacitatea lor la fasciculul electronic, este imaginea denumită plastic "șine de cale ferată". Se poate constata ușor că între această imagine obținută direct prin microscopie electronică și modelul Danielli-Davson există o surprinzătoare corespondență, cu toate că modelul a fost conceput numai pe baza unor probe indirecte. Straturile negre de pe micrografii corespund zonelor opace pentru electroni din membranele examinate la microscop, iar stratul clar, zonei mai transparente la electroni. Metalele grele din fixatori se depun în regiunile polare, unde se stabilesc legături electrostatice între atomii metalici și sarcinile proteinelor sau fosfolipidelor.

Stratul central, mai clar, are o grosime de circa 30-35Å (3.5 nm.), în medie, mărginit de o parte și de alta de două straturi mai electrono-dense (întunecată), de aproximativ 20-25 Å fiecare. Conform modelului Danielli există depunere metalică de o parte și de alta a stratului central hidrofob, care corespunde lanțurilor de acizi grași și acest fapt se traduce prin imaginea trilaminară. De aceea, la un moment dat s-a crezut în consacrarea definitivă a modelului Danielli-Davson. Au început să fie vizualizate cele mai diverse tipuri de membrane celulare, acest fapt i-a permis lui Elbers în 1964 sinteza rezultatelor morfologice obținute pe câteva sute de biomembrane obținute din diferite țesuturi diferite, constatând că în marea majoritate a microelectronografiilor se regăsea imaginea în trei straturi (sau tripartită) a membranei celulare. Deosebit de importantă a fost constatarea, prezenței membranelor și la

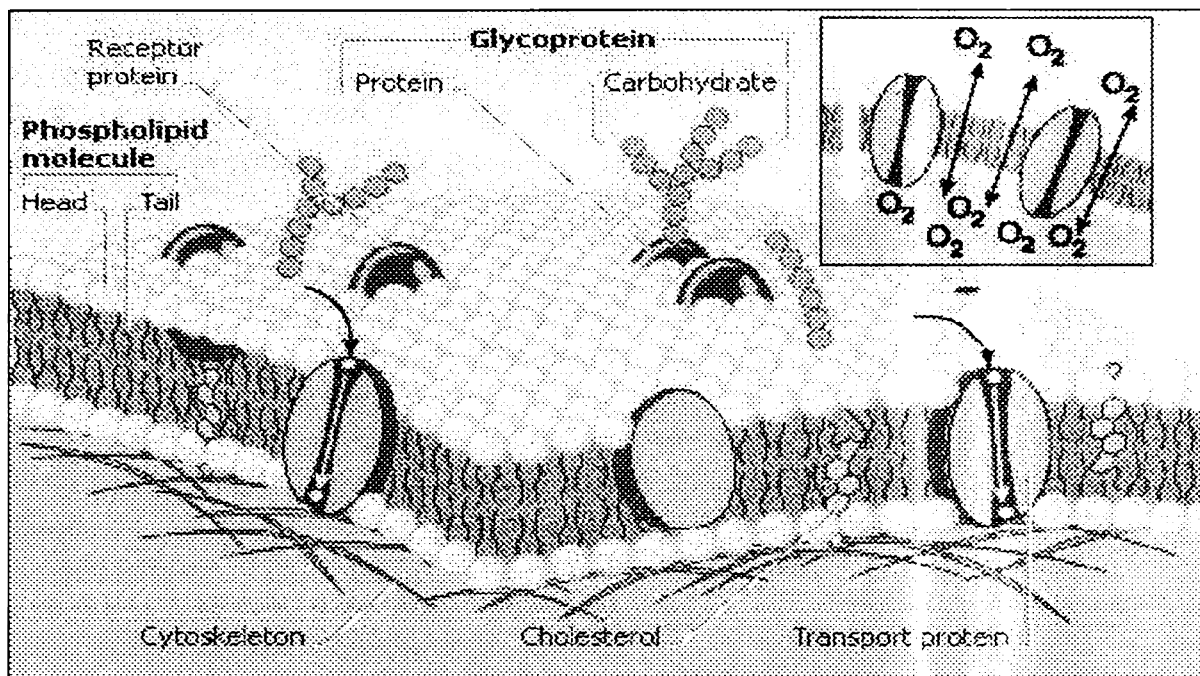


Fig.4-4.
Modelul membranelor modern derivat din conceptul Danielli-Davson (după Davson, 1982))

nivelul unor formațiuni din compartimentul citoplasmic, care se prezentau, sub forma unor imagini trilamelare.

S-au raportat variații doar în ceea ce privește grosimea membranei, care a avut în ansamblu un domeniu de definiție cuprins între 7.5 și 15 nm., stratul central clar a fost constant între 2.5–3.5 nm.

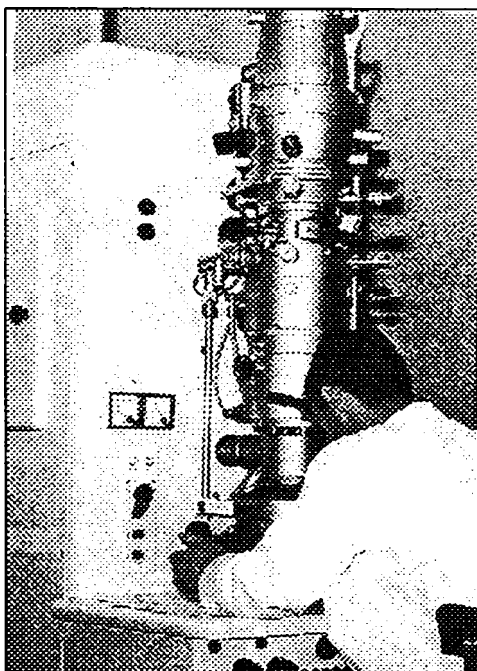


Fig. 4-5.
Microscop electronic suport tehnic de elită în investigarea membranelor biologice.

Aspectul electronmicroscopic al diferitelor tipuri de membrane l-a condus pe J.D.Robertson (1972) la ideea elaborării modelului "membranei un-tare". Termenul original utilizat de autor a fost de "unit membrane" și se poate traduce prin "membrană de bază" sau "unitate membranală". Cea mai importantă idee susținută de J.D.Robertson este considerarea membranelor drept structuri asimetriche. Asimetria biomembranelor a fost sugerată de reactivitatea diferită a celor două fețe ale biomembranelor în raport cu de fixatorii utilizați: OsO_4 se localizează preferențial pe fața internă a membranei, iar KMnO_4 pe fața externă. Acest fenomen este în mare măsură o preluare a variantei Danielli-Davson, unde straturile proteice sunt reprezentate de o parte și de alta a biomembranei. Pe măsură ce tehnica de investigare se perfecționează, profunzimea observației crește. Un exemplu este prezentat în figurile 4-6, 4-7.

O ultimă încercare de continuare a modelelor lamelare aparține lui Hecher, care ia în considerare rolul apei în structura membranei.

Straturile de proteine situate de o parte și de alta a dublului strat de lipide ar fi alcătuite din unități proteice hidrofille între care se află straturi de apă. Forma unităților proteice ar fi de discuri la membrana polarizată și globulare în momentul depolarizării, când ar fi posibilă trecerea apei și ionilor prin membrană.

Tehnicile de investigare a componentelor biochimice și structurii biomembranelor au fost perfectate în perioada 1960 - 1970. Au fost obținute foarte multe date care probează că modelele lamelare, cu punctul lor terminus, exprimat în varianta Danielli-Robertson nu exprimă decât parțial structura și funcțiile biomembranelor. În consecință va urma un deceniu de căutări mai mult sau mai puțin fructuoase, exprimate în primul rând prin apariția unor modele în care membrana nu mai este considerată ca având o structură lamelară determinată de stratul dublu lipidic continuu, ci este alcătuită din subunități micelare lipidice, ori din subunități lipoproteice. Primul model micelar, elaborat de Parqart și Ballentine a apărut înainte de conceperea modelului "membranei unitare", autorii utilizează o serie de date obținute prin studiul biofizic al dispersiilor de fosfolipide în apă. În 1952, Parqart și Ballentine, propun un model conceptual diferit de cele anterioare, în care masele proteice globulare sunt dispersate într-un mediu fosfolipidic.

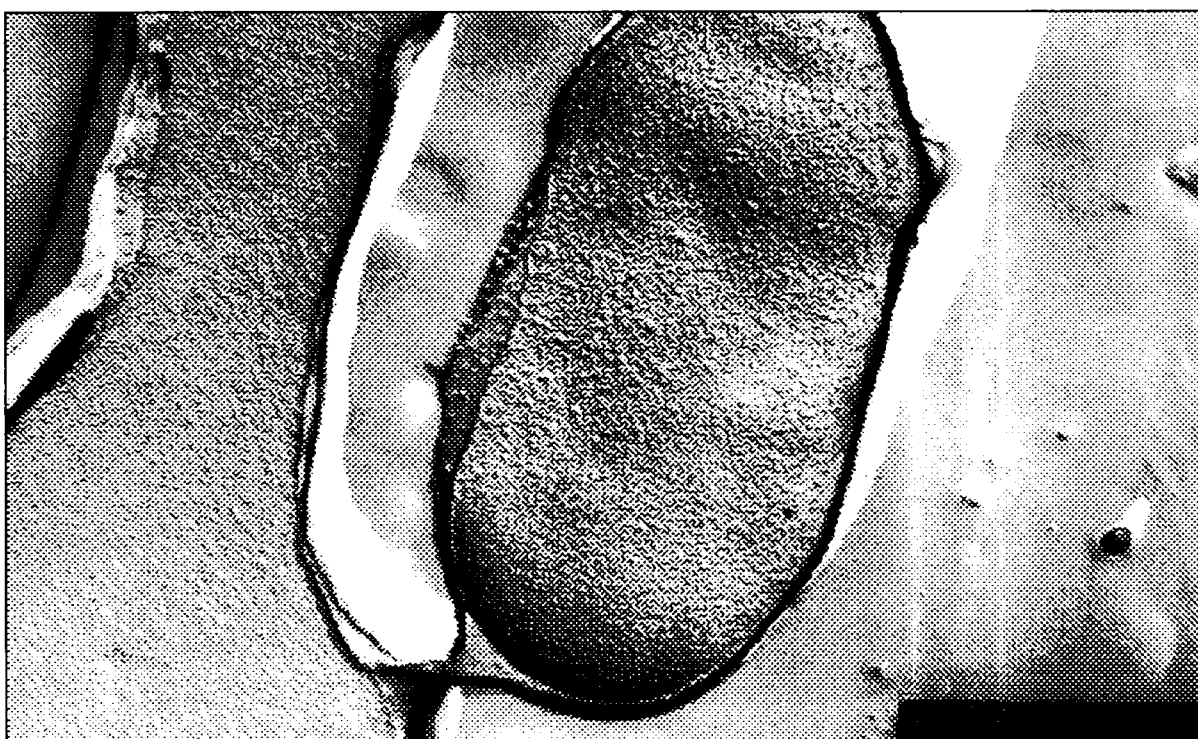


Fig. 4-6.

Menținerea structurii tridimensionale a materialelor biologice a impus dezvoltarea unor tehnici de microscopie electronică elaborate, precum congelarea urmată de crio fracturarea replicii (*cryofracture method*).

Hematie umană normală, 3 x 22 000.

Imagine realizată de prof. Dr. Gh. Benga și prof. Dr. V.I. Pop, la Colegiul Cheslea Univ. din Londra în colaborare cu prof. dr. Anthony Brain. (Imagine primită din partea autorilor).

Unele fosfolipide (lecitine și 50% din cefaline) sunt legate electrostatic de proteine, alte lipide se organizează în dispersie stabilă în apa de îmbibație. Un astfel de model acceptă posibilitatea existenței unor pori apoși membranari, necesar în explicarea difuziunii ionilor iar conformația globulară a proteinelor permitea, într-o măsură, explicarea activităților enzimactice ale membranei, care începeau să fie cunoscute. Ideea organizării micelare a membranei va fi frecvent reluată după 1960-1965, în primul rând de cercetătorii preocupați de studiul conversiei energiei la nivelul membranelor mitocondriale și cloroplastelor.

În continuitate cu primul model micelar se află modelul Lucy și Glauert (1964), în elaborarea căruia s-a pornit de la observarea dispersiilor de lipide în apă la microscopul electronic, prin tehnici de colorație negativă. Prin această tehnică a fondul întunecat, câmpului explorat este opac pentru electroni, de aceea structurile examinate apar clare, luminoase pe un fond întunecat.

Dispersiile de lipide existente în membrană erau observate la microscop sub forma unor imagini clare hexagonale sau elicoidale, care au fost interpretate drept un argument în

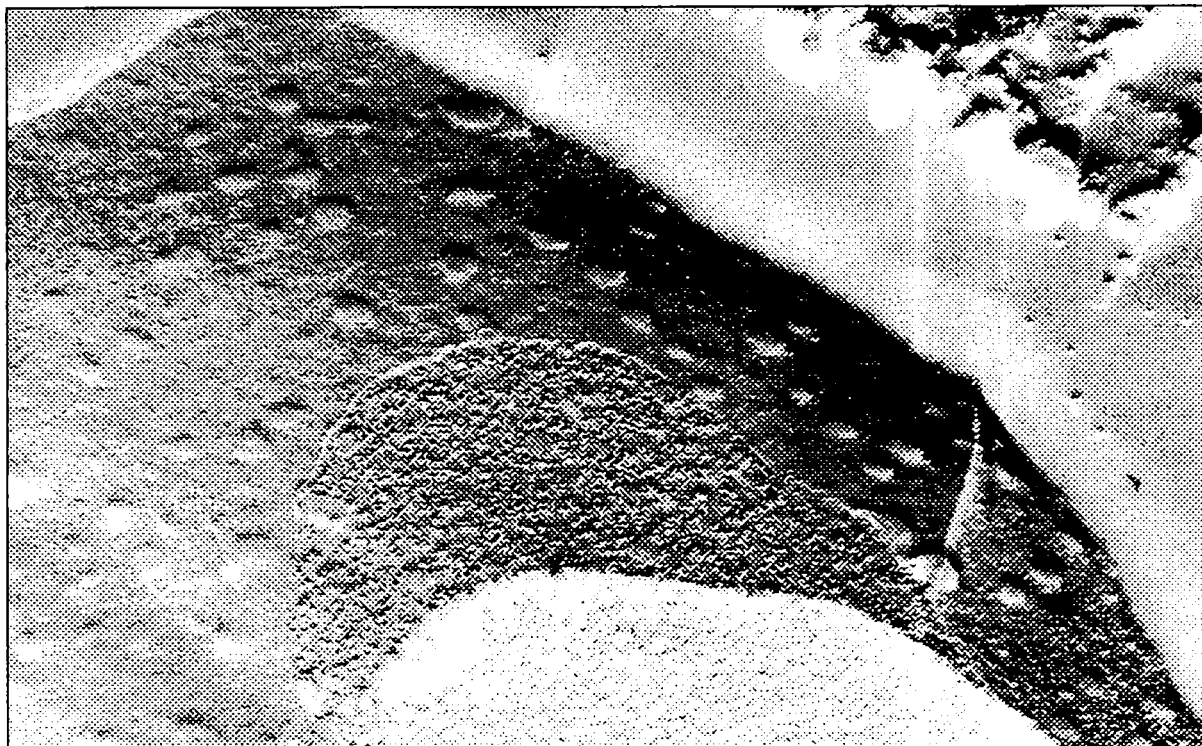


Fig.4-7.

Replică a membranei hematiei umane înghețată și fracturată, prezentând distribuția particulelor intramembranare. 3 x 27 000. Imagine realizată de prof.Dr. Gh. Benga și prof. Dr. V.I.Pop la Colegiul Cheslea Univ. din Londra, în colaborare cu prof.dr. Anthony Brain. (Imagine primită din partea autorilor).

favorizarea dispunerii amestecurilor de lipide în micelii globulare sau sferice. Ca urmare, Lucy și Glauert au conceput membrana ca fiind alcătuită din micelii juxtapuse, cu diametrul de 4 nm., plonjate într-un strat de proteine, sau glicoproteine asupra căruia nu ofereau detalii. Unele micelii lipidice puteau fi totuși înlocuite de proteine globulare de aceeași talie, iar între micelii se delimitau pori apoși, cu raza de circa 0.4 nm. Care explica permeabilitatea pentru apă și diferiți metaboliți solubili. În plus, autorii afirmau existența unei flexibilități și deformări constante a ansamblului, prin glisarea subunităților unele pe altele. Se revenea din nou la probe biofizice indirecte, constând în esență, din studiul comportării suspensiilor de lipide în apă. În anul 1960, Fernandez-Moran, utilizând tehnica colorației negative a reușit evidențierea creștelor mitocondriale pe suprafața internă a membranei mitocondriale interne. Pornind de la descoperirea Fernandez-Moran, șase ani mai târziu, D.E.Green și J.F.Perdue (1966), elaborează un nou model membranar total diferit de conceptul Danielli.

Conform acestui model, fiecare subunitate este un complex lipo-proteic în care proteinele structurale și enzimatică, pe de o parte, și fosfolipidele, pe de altă parte, sunt în esență reunite prin legături hidrofobe. Proteinele sunt prezente în forma globulară, fiind astfel posibile modificările conformaționale. Joncțiunile dintre diferitele unități sunt interacțiuni de tip hidrofob. Cu toate că inițial, observațiile lui Green se refereau la mitocondrie, modelul unităților repetitive a fost extins și la alte tipuri de biomembrane dotate cu proprietăți de

transport activ și, prin urmare, conținând ATP-aze. Ulterior, conceptul a fost modificat de autor, adoptând modelul "cristalin" al membranei mult mai apropiat de imaginea actuală.

Un moment crucial ce va aduce progrese decisive în cunoașterea compoziției, structurii și funcțiilor biomembranelor, este utilizarea tehnicilor de microscopie electronică de criofracturare în vid înaintat. H. Moor (1964), H. Moor, K. Mühlethaler, H. Waidner și H. Frey-Wyssling (1971), au perfectat o tehnică în care celule nu mai suferă o prelucrare chimică, eliminându-se astfel artefactele. Utilizând această tehnică, pentru prima dată au fost vizualizate, proteinele, considerându-se că ele formează straturi compacte la nivelul membranei (fig. 4-7). Apărea cert că unele proteine traversează integral membrana, iar altele sunt situate fie îndeosebi la nivelul feței externe, fie pe fața internă. Se obținea astfel una dintre probele relevante, certe, referitoare la asimetria edificiului membranelor.

Urișul volum de date experimentale acumulate a permis conturarea la începutul anului 1966, a unui concept de membrană denumit generic mozaicul lipido-proteic globular (Lipid-Globular Protein Membrane Model). S.J.Singer și G.L.Nicolson în 1972, publică în revista "Science" argumente coerente a ceea ce atunci înainte se va numi "*modelul mozaicului fluid*" al structurii membranei celulare, în care dispunerea proteinelor în matricea dublului strat lipidic este comparată cu pozițiile aisbergurilor ce plutesc într-un ocean. Foarte curând acest concept va fi acceptat și se generaliza în lumea științifică de specialitate. Interesantă a fost și este dinamica acestui proces de definire, descriere din punct de vedere fizico-chimic și morfofiziologic, al biomenbranelor. Acest proces de elaborare - reelaborare, continuă și în prezent, fluiditatea procesului este însă marcată de consistența datelor și argumentelor. Exhaustiva prezentare istorică a evoluției conceptului de membrană biologică, a fost generos realizată și prezentată într-o lucrare de referință aparținând autorilor Rusu, Baran, Brănișteanu (1988).

Evident, ar fi nedrept încheierea acestui capitol fără menționarea expresă a patru grupuri de cercetători români ce și-au adus și își aduc un aport important la întregirea acestui domeniu de studiu.

Primele două grupuri de cercetare conduse de prof. Dr. Gh. Benga și respectiv prof. Dr. C. Tarba, la Cluj-Napoca, deși au abordat studiul biomembranelor din puncte de vedere aparent diferite au avut și au rezultate congruente. Colectivul prof. Dr. C. Tarbă a abordat studiul membranelor sintetice și recombine, fenomenele de transport ionic. Indiscutabil meritul celei dintâi monografii, dedicată exclusiv biomembranelor și implicațiilor lor bio-medicale îi revine prof. Dr. Gh. Benga, în 1979. Numărul mare de studii experimentale efectuate în ultimii 20 de ani i-au permis prof. Dr. Gh. Benga publicarea unor monografii (1979, 1984, 1985, 1988, etc.) de referință ce au reunit în paginile lor contribuții ale celor mai proeminente personalități științifice mondiale din domeniul membranologiei. Pentru a întregii prezentarea acestui grup de cercetare, (căutând a elimina pe cât posibil, factorul emoțional, inerent, datorat formării mele la această școală, în mijlocul acestui colectiv de mare probitate profesională) vom aminti aici numai câteva din multitudinea titlurilor articolelor și comunicărilor realizate de-a lungul ultimilor ani : "Membrane defect affecting water permeability in human epilepsy", "Irreversible inhibition of water diffusion through erythrocyte membranes by fluoresceinmercuric acetate", "Effect of chlorpromazine on proteins in human erythrocyte membranes as inferred by spin labeling and biochemical analyses", "Water exchange through erythrocyte membranes: nuclear magnetic resonance studies of the effects of inhibitors and chemical modification of human membranes", "Membrane proteins involved in water permeability of human erythrocytes and pathological changes of this transport process", "Water permeability of human erythrocytes : identification of membrane proteins involved in water transport", "Studies of water permeability and proteins of erythrocytes membranes in patients with Duchenne Muscular Dystrophy". Din cele câteva titluri enumerate se poate observa cu ușurință preocuparea nu numai pentru studierea

proceselor fundamentale, dar și a relației dintre acestea și diferite afecțiuni. Poate și din acest ultim motiv, Cluj – Napoca a fost ales de două prestigioase forumuri internaționale, (FEBS, respectiv ICRO) pentru desfășurarea cursului internațional cu tema "Biomembranes and Diseases" la un interval suficient de timp (zece ani, 1986, 1996, 1999) pentru revizuirea și fundamentarea datelor experimentale obținute în acest răstimp.

Un alt grup de cercetare, de această dată din București, a avut ca reprezentanți de marcă pe prof. Dr. V. Vasilescu și Dr.D.G. Mărgineanu (1979), ce și-au îndreptat atenția spre studiul membranei neuronale. Conferințele internaționale "Apa și ionii în sistemele biologice" desfășurate trianual la București, sub egida UNESCO, au devenit, prin înaltul nivel științific momente de referință în prezentarea celor mai noi date obținute în studiul biomembranelor.

Rezultate interesante privind circuitul normal și patologic intracelular al calciului, mai ales la nivel mitocondrial au fost obținute și de prof. Dr. I. Diculescu în colaborare cu prof. Dr. L.M.Popescu. Dezvoltarea studiilor de biologie moleculară a cunoscut un avânt deosebit după ființarea, Institutului de Biologie și Patologie Celulară, sub înaltul patronaj științific al prof. Dr. G. E. Palade și condus de regretatul prof. Dr. N. Simionescu.

Un alt grup de cercetare în domeniul biomembranelor, este cel de la Iași avându-i ca principali animatori pe prof. Dr. Brănișteanu, prof. Dr. Rusu, prof. Dr. Baran, prof. Dr. Cotrutz, prof. Dr. Nechifor.

Existența acestui mediu concurențial, stimulat, a permis inițierea și a unor studii de caracterizare biochimică compozițională mai ales în cea ce privește structura acizilor grași și lipidelor biologic active implicate, în alterarea funcției membranare corelată cu afecțiunile neuro-musculare.

4.2. COMPOZIȚIA LIPIDELOR MEMBRANARE.

ACIZII GRAȘI CARACTERISTICI

4.2.1. PROPRIETĂȚILE CHIMICE ȘI FIZICE ALE MEMBRANELOR

Organizarea structurală a membranelor este strâns legată de proprietățile fizico-chimice ale lipidelor membranare deoarece forțele interacțiilor moleculare în membrane, primar implică formarea unor legături non-covalente. Acestea pot fi clasificate ca ionice, de hidrogen sau legături liofobe (ori, în soluție apoasă legături hidrofobe). Aceste legături relativ mai slabe comparate cu legătura covalentă, dar o orientare particular complementară între molecule, maximalizând numărul acestor interacții are ca efect realizarea unor asociații stabile sau favorizate energetic.

Moleculele sunt solubile dacă interacțiile cu solventul sunt mai puternice decât interacțiile cu alte molecule de solut. Grupările moleculare ionice și polare, vor avea tendința de hidratare, mai precis vor interacționa cu dipoli apei. În cazul în care acești constituenți polari predomină, molecula se va dizolva. Regiunile moleculelor mari care au în structura lor grupări polare se vor asocia cu regiunile non polare a altor molecule formând micelii. În interiorul acestor micelii, moleculele sunt orientate astfel încât expunerea grupărilor nepolare la dipolii apei să fie minimă, sau formulând reciproca, interacțiile grupărilor polare cu apa sunt maximalizate.

Moleculele lipidelor complexe și proteinelor au caracter amfifilic, altfel formulat pe același rest hidrocarbonat sunt prezente atât grupări polare cât și resturi nepolare.

Moleculele amfilice în soluții apoase vor avea tendința de a forma agregate sau în cazul macromoleculor, se vor plia în așa fel încât să sechestreze regiunile hidrofobe într-un volum minim. Interacțiile hidrofobe sunt recunoscute ca un factor major, determinant pentru stabilitatea asociațiilor proteine-lipide (Tanford, 1973). Lipidele complexe, componente ale membranelor, sunt caracterizate printr-o segregare distinctă a grupărilor polare de cele nepolare în cadrul aceiași molecule. Astfel, fosfatidele pot fi reprezentate ca având un “cap” polar, format dintr-un rest de ester glicerofosforil și o “coadă” compusă din două catene de acizi grași. Emulsiile apoase de fosfolipide sunt constituite din câteva mii de molecule care alcătuiesc agregate mai mult sau mai puțin sferice (micelii), “capetele” polare fiind în contact cu mediul apos iar “coada” hidrocarbonată fiind orientată spre interior. O dată cu creșterea concentrației, miceliile vor condensa generând complexe multi - strat (multi-lamelare), denumite uneori liposomi. Structuri similare se obțin prin adăugarea unor cantități mici de apă fosfolipidelor în stare solidă. Unitatea structurală de bază a acestor “figuri mielinice”, este un strat dublu fosfolipidic, moleculele fiind orientate cu “capetele” polare spre exterior, în contact cu mediul apos iar “cozile” hidrocarbonate în interior, mai mult sau mai puțin perpendiculare pe planul dublului strat lipidic. Un strat lipidic formează o barieră hidrofobă între fazele apoase celulare, iar proteinele conferă selectivitatea necesară proceselor de transport. Datorită acestor două cerințe, este de așteptat o variație a proporției relative dintre cantitatea de lipide și proteine, funcție de proveniența membranei și de rolul acesteia, acest fapt a fost demonstrat de Korn (1968). Raportul cel mai scăzut dintre proteine și lipide (aproximativ 0.3) este notat în mielină, un tip de membrană ce funcționează esențial ca un izolator lipidic. Raportul proteine/lipide are se pare, o relație de directă proporționalitate cu complexitatea membranei. Pentru membranele plasmatice ale celulelor animale, cu o matrice enzimatică relativ bogată, acest raport este plasat undeva în jurul valorii de 1.5, în contrast cu un sistem complex, cum este membrana mitocondrială internă unde media oscilează foarte aproape de 3.0. O exemplificare pe diferite tipuri de biomembrane este prezentată în tabelul 4.1. Redarea grafică a datelor tabelate este prezentată de figura 4-8.

Tabel 4.1.

Compoziția chimică a biomembranelor (după G. Guidotti 1986)

MEMBRANĂ	PROTEINE %	LIPIDE %	GLUCIDE %	PROTEIN E/ LIPIDE
Mielină	1	79	3	0.23
MEMBRANE CITOPLASMATICE				
	33 – 42	51 – 58	7.50	0.70
Celule hepatice de șoarece	46	54	2 – 4	0.85
Bastonașe retiniene (bovine)	51	49	4	1.00
Eritrocit uman	49	43	8	1.10
Membrană mitocondrială externă	52	48	2 - 4	1.10
Ameobă	54	42	4	1.30
Celule hepatice de șobolan	58	42	5 – 10	1.40
Limfocite	60	40	5- 10	1.50
Celule HeLa	60	40	2.4	1.50
Reticul sarcoplasmic	67	33		2.00
Bacterii Gram-pozitive	75	25	10	3.00
Membrană purpurie de Halobacterium halobium	75	25		3.00
Membrană nucleară (ficat, pui de găină)	73	21		3.20
Membrană mitocondrială internă	76	24	1- 2	3.20

Creșterea conținutului proteic o dată cu complexitatea funcțională ar putea fi explicată la modul general, prin creșterea numărului proteinelor catalitic active. Diversitatea constituenților lipidici ai membranelor ce provin din surse diferite fosfogliceride, sfingolipide și colesterol este destul de dificil de explicat la fel ca și tipologia lor. De exemplu, din membranele animale și bacteriene au fost izolate peste 15 tipuri de fosfoacilgliceroli, iar dacă acceptăm marea varietate a structurilor catenare prezentate a acizii grași naturali, este evident că numărul fosfolipidelor este mult mai mare.

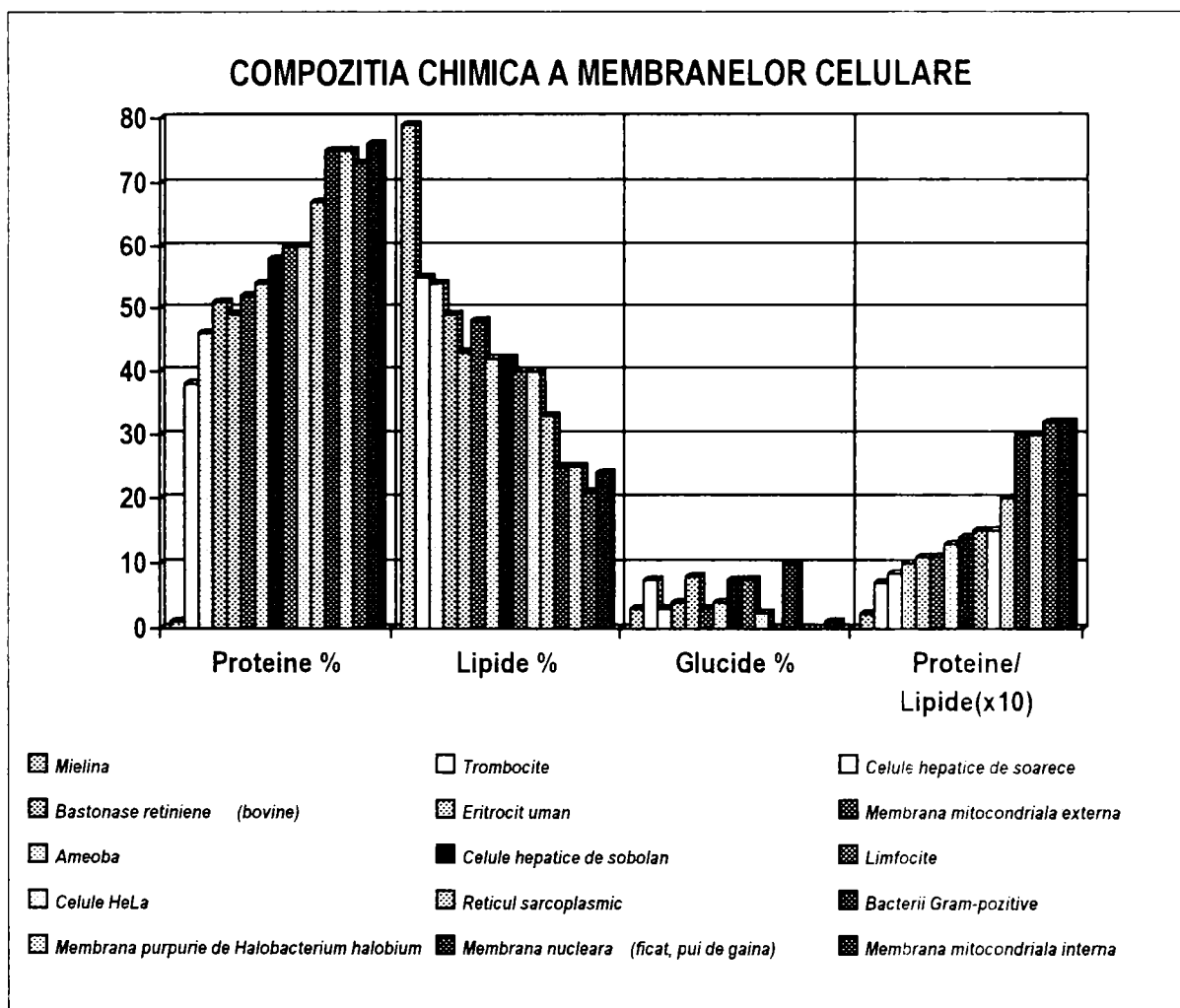


Fig. 4-8.

Compoziția chimică a membranelor celulare. (după G. Guidotti 1986).

4.2.2. COMPOZIȚIA FOSFOLIPIDICĂ A MEMBRANEI ERITROCITULUI UMAN

Membrana eritocitară prezintă o diversitate de specii moleculare lipidice, cu capete polare și lanțuri hidrofobe ale acizilor grași extrem de diferite.

Analiza proprietăților fizice a biomembranelor și comportamentul lor în condiții normale și patologice sunt funcție directă de structura lor chimică, mai precis de lungimea lanțurilor alifatiche și gradul de nesaturare al acizilor grași din structura fosfoacilglicerolilor.

În anul 1992, Devaux arată că în prezența proteinelor, fosfolipidele se distribuie neuniform în planul membranelor, iar Colleau (1991) precum și Geldwerth (1993) demonstrează că activitatea unei translocaze generează o distribuție asimetrică a fosfolipidelor în planul transversal al membranelor. Într-un ml. de eritrocite împachetate se

găesc 10^{10} celule, ce conțin 5.0 mg lipide, din care fosfolipidele reprezintă aproximativ 60%. Cantitativ fosfolipidele sunt cea mai importantă fracțiune lipidică din membrana eritocitară umană, o celulă conținând între $2.7-3.2 \times 10^{-10}$ mg fosfolipide.

Clasele de fosfolipide includ atât glicerofosfolipide, cât și sfingofosfolipide.

Glicerofosfolipide au esterificați doi acizi grași, în poziția 1(α) a glicerolului un acid gras saturat, iar în poziția 2 (β) de regulă un acid gras nesaturat. În poziția 3 este esterificată o moleculă de acid fosforic, care la rândul ei este esterificată cu o grupare variabilă, ce poate fi : etanolamină, colină, serină sau inozitol. Această grupare variabilă este cea care permite distincția între clasele fosfolipidice. Hidroliza enzimatică a unuia din cei doi acizi grași duce la formarea de lisoglicerofosfatide. Dintre sfingofosfolipide cea mai importantă este sfingomielină ce conține un aminoalcool, sfingozina în loc de glicerol. Sfingozina leagă un lanț de acid gras la gruparea amino.

În membrana eritrocitului se găsesc fosfolipide majore și minore. Fosfolipidele majore se găsesc în următoarele proporții medii: fosfatidilcolină 30%, fosfatidiletanolamină 25–30%, sfingomielină 25% și fosfatidilserină 12-15%. Fosfolipidele minore sunt reprezentate și distribuite după cum urmează : fosfatidilinozitol 0.5-2%, acid fosfatidic 0.5-2%, lizofosfatidilcolină 1%. Kuypers și colaboratorii în 1993 în urma unor studii elaborate opină asupra unei distribuții exacte a claselor fosfolipidice în membrana eritocitară de tipul prezentat în figura 4-9.

Rezultatele obținute de noi nu diferă esențial decât prin faptul că au fost raportate cu un număr de ani anterior autorilor citați. În anul 1992, Williams și Maunder constată că în eritrocite susceptibilitatea relativă a claselor fosfolipidice la modificările induse de dietă este următoarea : fosfatidiletanolamină > fosfatidilcolină > fosfatidilinozitol, dar modificările se referă la speciile din interiorul fiecărei clase, proporția claselor de fosfolipide rămânând relativ constantă. Această constatare este se pare numai parțial adevărată existând și alte opinii.

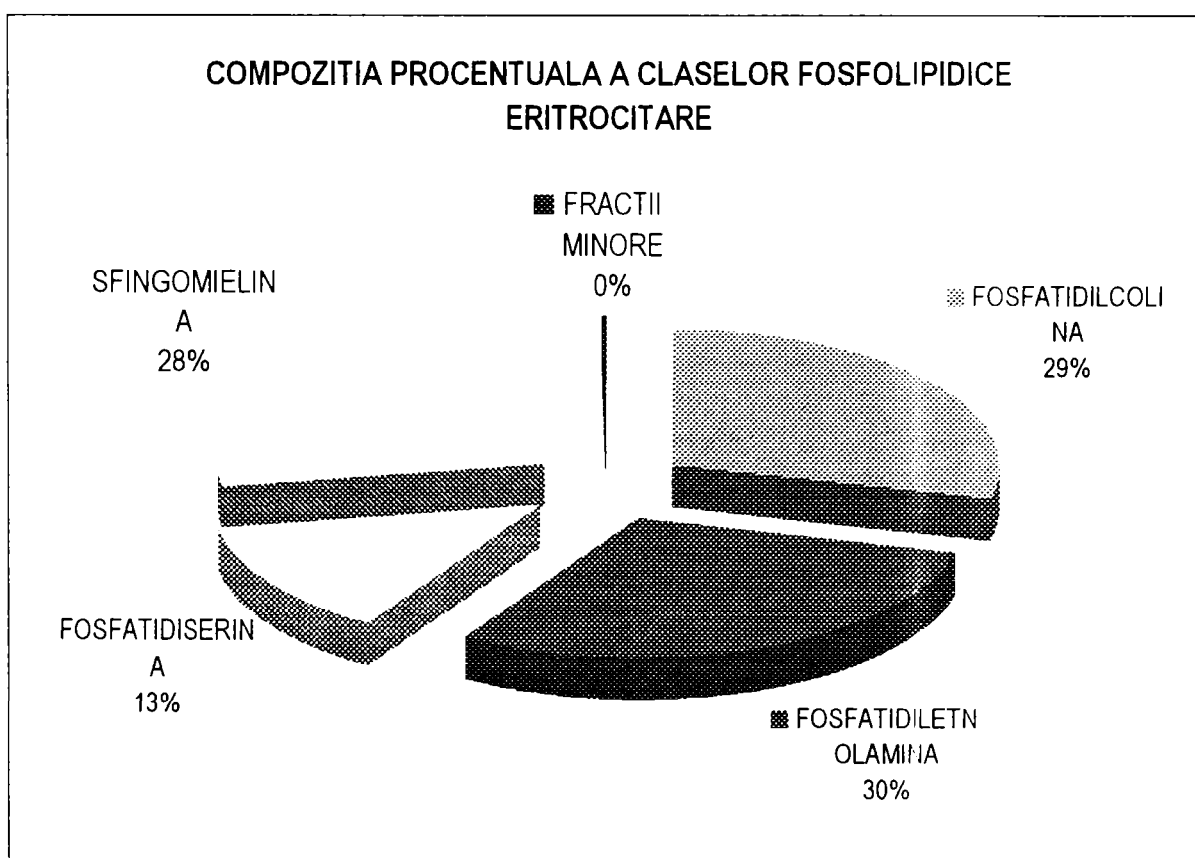


Fig. 4-9.

Distribuția procentuală a claselor fosfolipidice din membrana eritocitară. (după Kuypers, 1993)

4.2.3. COMPOZIȚIA ÎN ACIZI GRAȘI A FOSFOLIPIDELOR DIN MEMBRANA ERITROCITARĂ

Acizii grași sunt constituenți majori (ca masă moleculară) ai fosfolipidelor. Poziția 1 (α) a glicerolului este esterificată de acizi grași saturați cu catena formată dintr-un număr par de atomi de carbon, iar în poziția 2 (β) există acizi grași nesaturați. În aceste condiții clasa fosfolipidelor cuprinde o mare diversitate de specii moleculare. În glicerofosfolipide, acizii grași sunt legați prin legături esterice, pe când în sfingofoasolipide, acizii grași sunt atașați prin legături amidice de sfingozină.

Prin cromatografie în fază gazoasă sau lichidă de înaltă presiune a fost posibilă determinarea lungimii lanțului hidrocarbonat și gradul de nesaturare al acizilor grași esterificați în molecula de fosfolipidă.

Rezultatele medii acceptate de literatură sunt prezentate în Fig.4-10.

Pentru simetria redactării am utilizat următoarele notații convenționale : AG = Acid Gras, FL-totale = FosfoLipide totale, FC=FosfatidilColină, SM=SfingoMielină, FE=Fosfatidil-Etanolamină, FS=FosfatidilSerină.

În membrana eritocitară umană au fost semnalati și separati cu certitudine aproximativ 36 de acizi grași .

În fosfatidilcoline speciile dominante sunt acidul palmitic (C16:0), acidul oleic (C18:1cis, ω 9) și acidul linoleic (C18:2cis, ω 6). Fosfatidilserina este caracterizată de prezența acidului stearic (C18:0) și arachidonic (C20:4cis, ω 6). În molecula de sfingomielina sunt prezenți preponderent (62 % din totalul acizilor grași) doi acizi grași cu peste 20 de atomi de carbon, acidul lignoceric (C24:0) și acidul nervonic (C24:1cis, ω 9). Fig.4-10., prezintă valorile medii procentuale ale acizilor grași din clasele fosfolipidice din membrana eritocitară umană.

Colinfosfolipidele, fosfatidilcolina și sfingomielina sunt distribuite preponderent în semistratul extern, pe când aminofosfolipidele, fosfatidiletanolamina și fosfatidilserina sunt distribuite cu prioritate în semistratul intern. Această distribuție asimetrică ridică întrebări cu privire la biogeneza membranei eritrocitare în timpul eritropoezei, precum și la mecanismul de menținere a asimetriei în cursul vieții eritrocitului. Distribuția fosfolipidelor în membrana eritocitară a fost determinată utilizând tehnici ce implică includerea de fosfolipide în unul din semistratele membranei, precum și marcarea fluorescentă, cu marker de spin sau radioactiv a lipidelor. Marinetti și Crain (1978), Roelofsen și colab. (1989), arată că, de la stadiul de eritroblast până la cel de monoblast, fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina sunt distribuite întâmplător în membrana eritrocitului. Deci, distribuția asimetrică a fosfolipidelor are loc în timpul procesului de enucleere sau imediat după aceea. Roelofsen și colab.(1989); Connor și colab.(1992); Verhoven și colab.(1992); Belezny și colab.(1993), care au investigat depleția de ATP a eritrocitelor combinată cu marcarea radioactivă a fosfolipidelor majore, au demonstrat că distribuția asimetrică a lipidelor necesită o translocare continuă a aminofosfolipidelor din semistratul extern spre cel intern. Astfel, după 21 de ore, 25-35% din fosfatidilcolină și 10% din sfingomielină trec în semistratul intern. În ceea ce privește fosfatidilserina și fosfatidiletanolamina, după 3 ore, ambele se acumulează în semistratul intern, prima în proporție de 85-95%, iar a doua în proporție de 60-80%.

În 1992, Connor și colab. constatau că difuziunea transversală a fosfolipidelor nu are aceeași valoare la o anumită clasă de fosfolipide, variația fiind în corelație cu lanțurile celor doi acizi grași esterificați la fiecare specie moleculară.

Astfel, speciile diferitelor clase fosfolipidice ce conțin acizi grași nesaturați cu două duble legături au o rată de difuziune transversală mult mai înaltă decât celelalte. De exemplu, C16:0-C18:0-fosfatidilcolina difuzează de circa cinci ori mai rapid decât C18:1cis, ω 9-

C18:1cis,ω9-fosfatidilcolina, pe când C16:0-C20:4cis,ω6-fosfatidil-colina are o treime din mobilitatea C18:2cis,ω6-C18:2cis,ω6-fosfatidil-colină.

Difuziunea speciilor de fosfatidilcolină și fosfatidiletanolamină cu acid oleic (C18:1 cis,ω9) în poziția 1 este lentă, pe când speciile cu acid arachidonic (C20:4cis,ω6) prezintă o difuziune foarte rapidă. Așa cum arată Devaux (1992); Schwichtenhovel și colab. (1992); Colleau și colab. (1992), și Geldwerth și colab.(1993), cauzele acestei distribuții asimetrice constau în primul rând în existența unor amino-fosfolipid-translocaze. ATP-dependente, ce crește foarte mult rata de difuziune transversală a fosfolipidelor, dar se pare că nici proteinele citoscheletale nu sunt străine de unele interacțiuni ce favorizează rămânerea în semistratul intern a amino-fosfolipidelor.

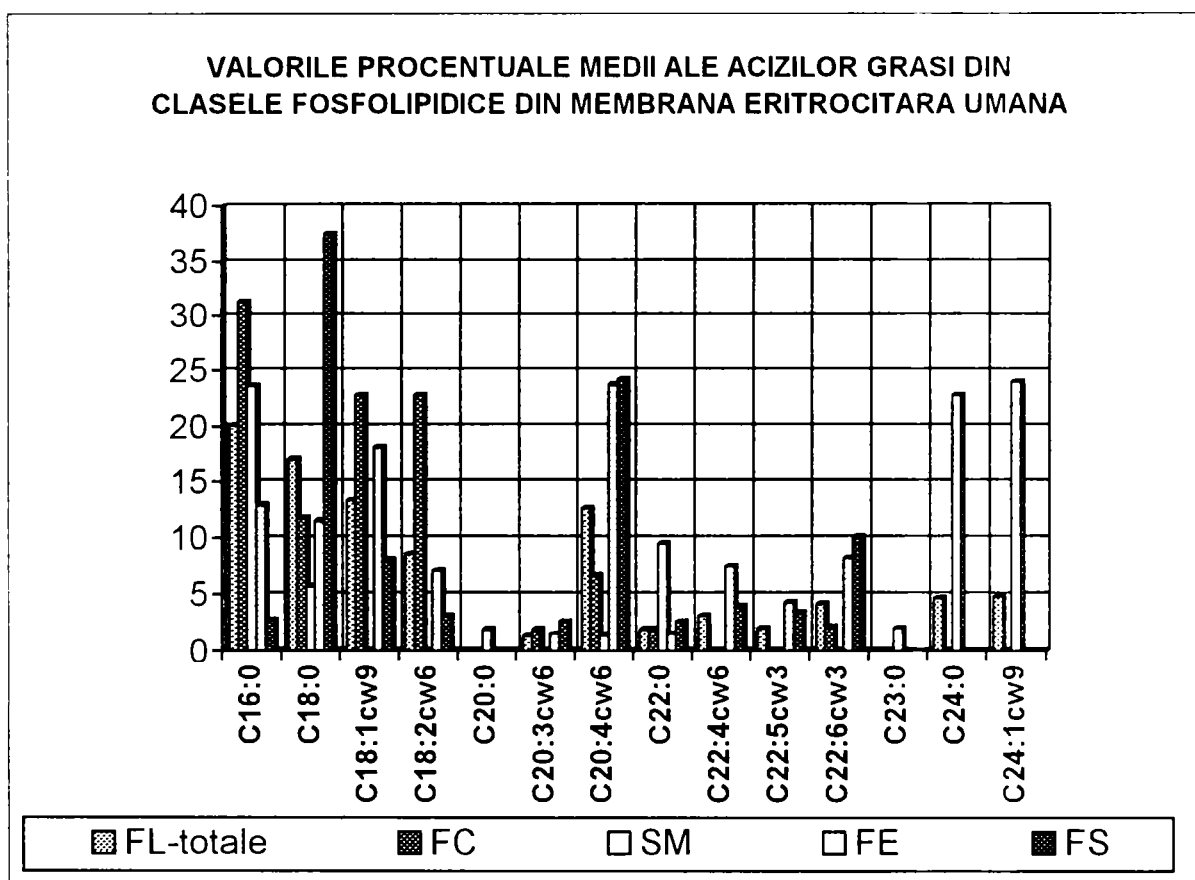


Fig. 4-10.

Valorile procentuale medii ale acizi grași din clasele de fosfolipidice din membrana eritrocitară umană.

4.2.4. FACTORI CE INFLUENȚEAZĂ COMPOZIȚIA ȘI DISTRIBUȚIA ASIMETRICĂ A FOSFOLIPIDELOR ÎN SEMISTRATELE MEMBRANEI ERITROCITARE.

1. **LIPIDELE.** Influența acizilor grași constă în special în modificarea gradului de nesaturare, deci a speciilor unei anumite clase de fosfolipide, fără a modifica semnificativ raportul dintre clasele de fosfolipide din membrana eritrocitară. Astfel, din studiile de calorimetrie diferențială și RMN cu ^{31}P , s-a observat că atât mono-, di-, cât și tri-acilgliceroli modifică temperatura de tranziție, efectele maxime fiind marcate în cazul stearinei. De asemenea, acizii linolenic (C18:3 cis,ω3) și docosohexenoic (C22:6 cis,ω3) la concentrații egale în dublul strat lipidic, în faza de cristal lichid, amplifică procesul de fuziune de membrane,

precum și permeabilitate lor. La fel acționează acizii : oleic (C18:1cis,ω9), linoleic (C18:2 cis,ω6), ecosanoic (C20:1cis,ω9) și arachidonic (C20 :4 cis,ω6), administrați prin dietă. Modificând raportul speciilor moleculare din interiorul unei clase de fosfolipide, schimbând compoziția membranei și prin aceasta influențând activitatea enzimatică.

2. PROTEINELE din membrana eritrocitului, precum și cele citoscheletice influențează distribuția unor specii moleculare de fosfolipide prin imobilizarea lor selectivă. De exemplu, o moleculă de proteină integrală perturbă tranziția de fază la 20-60 molecule lipidice. Datele obținute de Maneri și Low (1989), demonstrează că acidul stearic (C18:0) reprezintă 14 % din acizii grași totali ai membranei eritrocitare, dar se regăsește în proporție de 68 % din acizii grași izolați cu B3. De asemenea, B3 mai este asociată cu acid linolenic (C18:3 cis,ω3) în timp ce acizii stearic (C16:0) și oleic (C 18:1cis,ω9) se regăsesc în proporții foarte mici. În schimb glicoforina este purificată cu un conținut ridicat de fosfatidilserină, iar B4.1 asociază 65–70 % din totalul fosfatidilinozitolului din membrana eritrocitară.

3. VITAMINA E, crește fluiditatea membranei eritrocitare în mod similar cu alți acizi grași polinesaturați, dar prin proprietățile sale antioxidante protejază lipidele contra agenților peroxidanți.

4. AGENȚII PEROXIDANȚI. Procesul de peroxidare a lipidelor membranei eritrocitare are ca substrat acizi grași polinesaturați, rezultând un produs natural, malonildialdehida. Studiile de calorimetrie diferențială, RES (Rezonanță electronică de Spin) și RMN (Rezonanță Magnetică Nucleară) arată că produsul de peroxidare se localizează în semistratul extern, unde crește fluiditatea locală, iar la concentrații înalte induce distrugerii majore ale membranei eritrocitare.

5. CATIONII DIVALENȚI. Studiile cu marckeri de spin al fosfolipidelor sugerează o schimbare a distribuției lipidelor din membrana eritrocitului sub acțiunea Ca^{2+} , sub forma unor domenii de membrană formate din fosfatidilcolină și fosfatidilserină. Deci nivelul înalt al Ca^{2+} intraeritocitar duce la activarea căilor ce influențează redistribuția fosfolipidelor din membrană în ambele sensuri, abolind asimetria. Un alt cation, Cu^{2+} , prin deficit, duce la schimbări ale profilului acizilor grași din clasele fosfolipidice. În plus deficitul de Cu^{2+} conduce la scăderea semnificativă a raporturilor molare Col-FL și Col-proteine din membrana eritrocitului de șobolan.

6. ȘOCUL OSMOTIC duce la redistribuirea fosfolipidelor între cele două semistraturi ale membranei. Prin studii de rezonanță electronică de spin (RES) s-a constatat că 15 % din fosfatidilserină trece în semistratul extern, iar 15 % din sfingomielină trece în cel intern, ceea ce modifică interacțiunile Fosfatidilserină-proteine în semistratul intern și sfingomielină-Col sau sfingomielină-sfingomielină în cel extern.

4.2.5. MODIFICĂRI PATOLOGICE ALE COMPOZIȚIEI ȘI REDISTRIBUȚIEI FOSFOLIPIDELOR DIN MEMBRANA ERITROCITARĂ

În membrana eritrocitară umană s-au semnalat modificări ale compoziției și redistribuției fosfolipidelor în diverse situații patologice, printre care enumerăm :

a. **ANEMIILE HEMOLITICE EREDITARE**, în care uneori crește cantitatea de fosfolipide.

În sferocitoza ereditară distribuția fosfatidiletanolaminei și fosfatidilserinei în interiorul semistratului intern este foarte lentă.

b. **HIPERTENSIUNILE ARTERIALE ESENȚIALE.** În 1992, Fu , studiind în paralel efectul dietei bogate în acizi grași ω3 asupra compoziției lipidice a membranei eritrocitare umane constată o creștere la nivelul C22:6ω3 și C20:5ω3, în timp ce C18:1ω9 scade semnificativ în fosfatidilcolină și fosfatidiletanolamină., C20:4ω6, crește în fosfatidilcolină, la lotul cu

hipertensiune arterială esențială față de lotul de control. Această constatare a fost ulterior confirmată și de alte grupuri ce cercetători. Un alt studiu a constatat modificarea profilului compoziției în acid oleic, C18:1 ω 9, a claselor fosfolipidice la persoanele supuse la o dietă cu ulei de măsline. La femeile însărcinate hipertensive crește semnificativ raportul colesterol/fosfolipide (1.2 ± 0.3 față de 0.8 ± 0.1 ; $p > 0.01$). Este un posibil factor patogenetic, dar poate fi utilizat și ca martor biochimic în vederea unui diagnostic precoce.

c. **HIPERLIPIDEMILE.** Analizând compoziția în specii moleculare ale fosfolipidelor din membrana eritocitară umană la normo și hiperlipidemici, Engelman (1992) constată că 16:0–20:4–fosfatidilcolina, 16:0–20:4–fosfatidiletanolamina și 18:1–20:4–fosfatidiletanolamina cresc la hiperlipemici față de normolipemici, iar plasmalogenii cu fosfatidiletanolamină scad cu 20% la hiperlipemici. În aceste cazuri alterarea procentuală a speciilor moleculare de fosfatidilcolină și fosfatidiletanolamină în hiperlipidemie, arată alterarea funcției de transport a fosfolipidelor în membrana eritocitară.

d. **DEFICITUL EREDITAR DE LIPOPROTEIN LIPAZĂ.** În acest caz, în membrana eritocitară este modificat raportul fosfatidilcolină/ sfingomielină, a fost constatat pe 16 cazuri.

e. **DEFICITUL EREDITAR DE LECITIN-COLESTEROL-ACILTRANSFERAZĂ (LACAT).** Este însoțit de creșterea raportului : colesterol/fosfolipide, fosfatidilcolină/fosfatidil-etanolamină fosfatidil-colină /sfingomielină, în membrana eritocitară umană. În ceea ce privește compoziția în acizi grași a speciilor de fosfolipide, crește ponderea acidului linoleic, C18:2 ω 6, și scade cea a acidului oleic, C18:1 ω 9. Aceste modificări se repercutează asupra proprietăților fizice ale membranelor, care devin mai rigide, diferența fiind evidentă între normali, heterozigoți și homozigoți, la examinarea spectrelor rezonanță electronică de spin.

f. **DIABETUL.** Hiperglicemia duce la pierderea asimetriei fosfolipidelor din membrana eritocitară.

g. **ALCOOLISMUL.** La concentrații mici alcoolul crește posibilitatea de formare a defectelor tranzitorii în bariera hidrofobă a membranei eritocitare, iar la concentrații mari induce modificări în proteinele citoscheletului cu anihilarea asimetriei lipidice a membranei.

h. **AFECTIUNI RENALE CRONICE.** În studii pe eritrocite provenite de la loturi semnificative (50, 60 de cazuri) s-a constatat creșterea cantității de acid oleic, C18:1 ω 9, la cei supuși la dializă peritoneală ambulatorie și a cantității de acid arachidonic C20:4 ω 6, la cei supuși la hemodializă.

i. **MALARIA.** (*Plasmodium malariae*) induce în membrana eritocitului modificarea raportului fosfatidilcolină / fosfatidiletanolamină.

CAPITOLUL 5

CERCETĂRI ANALITICE ÎN PATOBIOCHIMIA UNOR AFECȚIUNI NEURO-MUSCULARE

5.1. CARACTERIZAREA LOTURILOR EXAMINATE

Miopia este prin definiție, o maladie primară și specifică a musculaturii, cu simptome tipice, musculare, ce nu apar drept consecință a unei tulburări funcționale a sistemului nervos central sau periferic. Vitalitatea și întreținerea mușchiului sunt condiționate de integritatea traiectului nervos.

Nu pot fi incluse în categoria miopatiilor asteniile și atrofiile musculare subsecvente inactivității rezultat al distrucției cortexului motor, leziunilor medulare, tulburărilor de neuron motor ale cornului medular anterior sau maladiile nervilor periferici. Definirea categoriei nosologice permite eliminarea din rândul miopatiilor propriu zise a atrofiilor și tulburărilor musculare ce excortează diversele stadii de malnutriție sau unele afecțiuni ale glandelor endocrine. Unele maladii ale metabolismului glucidic au o componentă miopatică, avem aici în vedere afecțiunea McArdle, alte tipuri de glicogenoze precum și intoleranța la fructoză.

O clasificare, primară, ce ține seama de acumulările etiopatogenetice ale momentului ar putea fi :

1. Distrofii musculare progresive
2. Miopatii congenitale
3. Miotonii
4. Paraliziile periodice familiale
5. Miopatii de etiologie diversă.

G.B. Duchenne de Boulogne a fost primul care a descris o miodistrofie progresivă, dar Erb este cel care a demonstrat că nu există o dependență de leziunea nervoasă.

Distrofia musculară progresivă Duchenne a fost semnalată în trei variante clinico-genetice :

1. Un tip dependent de o genă, recesivă, determinată de sex, cu evoluție severă (tip ascendent A după Becker).
2. Un tip transmis egal ca o anomalitate recesivă legată de sex, cu o evoluție benignă (tip ascendent B după Becker).
3. Un tip legat de o genă autosomă afectând ambele sexe, cu evoluție în general benignă, dar care uneori poate fi malignă.

Forma A (după Becker), este cea mai frecventă, corespunde distrofiei musculare progresive Duchenne tipice (singura descrisă de G.B. Duchenne de Boulogne), iar prognosticul este defavorabil. Celelalte două forme se disting printr-un debut tardiv și o evoluție generală mai puțin gravă. Debutul clinic al afecțiunii se este insidios, plasat



temporal în prima copilărie (2-5 ani), excepțional în jur de 10 ani, afectând specific sexul masculin. Sexul feminin este afectat extrem de rar.

Fig.5-1.
Hipertrofia moleților (Filmoteca
Centrului de Patologie Neuro-
Musculară "Dr.Horia RADU")

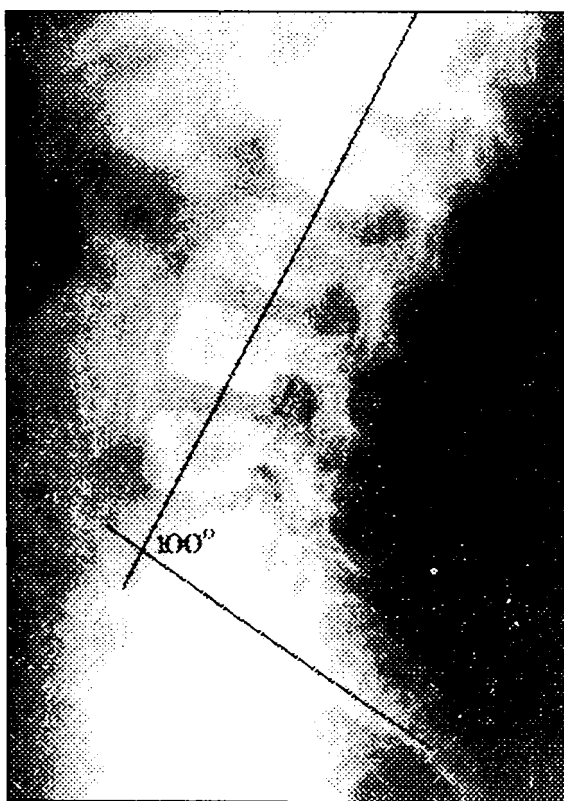
Debutul biomolecular este situat cert încă din faza intra uterină (datorită caracterului genetic al maladiei).

Debutul clinic este marcat de

treptelor, etc. Aceste tulburări sunt rezultatul unei atrofii simetrice a mușchilor centurii pelviene și coapselor ; această atrofie se va extinde gradual asupra musculaturii trunchiului, centurii scapulare și membrilor inferioare. Mușchii mâinilor, feței și toracelui rămân un timp relativ lung neafecțați sau afectați minor.

Mersul este nesigur, legănat: mușchiul quadriceps nu este capabil de a întinde gamba, bolnavul este obligat să se proiecteze înainte. Pacientul culcat sau așezat nu se poate ridica decât prin manevre succesive. El dezvoltă o hiperlordoză lombară, care în timp poate devenii excesivă (fig. 5-2).

Tulburările se agravează după o imobilizare relativ îndelungată la pat (ca urmare a unei afecțiuni infecțioase de exemplu). La debut este posibil ca unele grupe musculare să prezinte un aspect hipertrofic. Este adesea cazul musculaturii moleților și deltoizilor, excesul de volum al acestora contrastând cu aspectul atrofic al vecinătății (fig. 5-1) .



Explicația anatomică a acestui aspect rezidă în înlocuirea treptată a țesutului muscular cu țesut conjunctiv și adipos.

Fig. 5-2.
Hiperlordoză lombară (aspect radiologic, Filmoteca
Centrului de Patologie Neuro-Musculară "Dr.Horia
RADU")

Progresiv, deformările scheletice se accentuează și contracturile condamnă bolnavul la imobilizare. Finalul, dramatic, este situat în rare cazuri în jurul vârstei de 20 de ani.

Sunt notate anomalii electrocardiografice, tahicardie, aritmie sinusoidală extrasistole. Decompensarea cardiacă este accidentul terminal cel mai frecvent. Scheletul este afectat de osteoporoză, diafizele oaselor sunt modificate, consecințe probabile imobilizării. Unii autori descriu aceste modificări osoase ca fiind proprii distrofiei musculare progresive.

Electromiograma relevă o diminuare a duratei amplitudinii potențialelor de acțiune a unităților motorii, în strânsă relație cu o diminuare a numărului de fibre musculare din unitățile

motorii ce intră rapid în interferență. În formele rapid evolutive au fost descrise trasee simple cu frecvență crescută de potențiale scurte. În 4% din cazuri se pot întâlni semne de tip neuropatic (activitate spontană, potențiale de acțiune de lungă durată, cu amplitudine mare, polifazice. Figurile 5-3, 5-4. VCM și VCS sunt normale – Popescu, 1989).

Gena anormală este localizată pe un heterocromozom X, (Xp21), pacienții fiind practic totdeauna de sex masculin. Prima referire la modul de transmitere a fost făcută de J.Pereyara-Käfer abia în 1957. Acesta observă cazul unei vechoare, cu trei copii afectați din trei căsătorii diferite. Extrem de rar au fost citate semne clinice la vechoare.

Fig.5-3.
Taseu interferențial miogen la diferite grade de contracție.

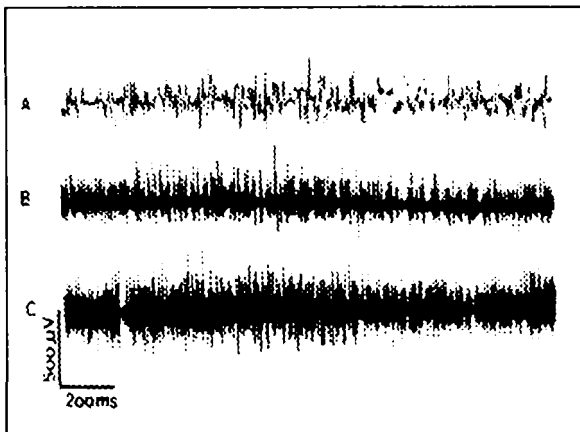
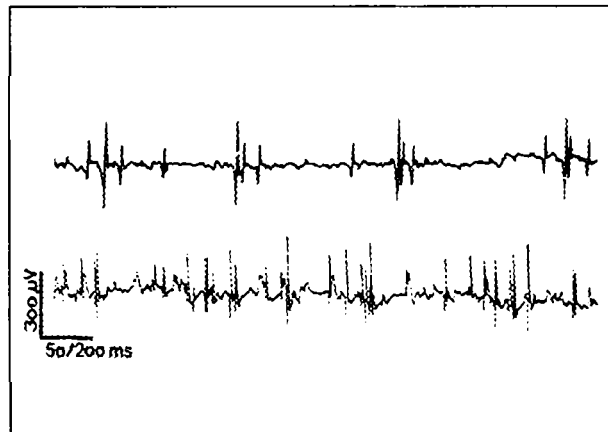


Fig.5-4.
DMP-Duchenne, traseu intermediar obținut la contracția voluntară maximă, cu semne de tip neuropatie



(Înregistrări din colecția Centrului de Patologie Neuro-Musculară "Dr. Horia RADU")

Heterozigotismul poate fi suspectat și confirmat cu certitudine după semne biomoleculare (analiza enzimatică, secvențare de ADN).

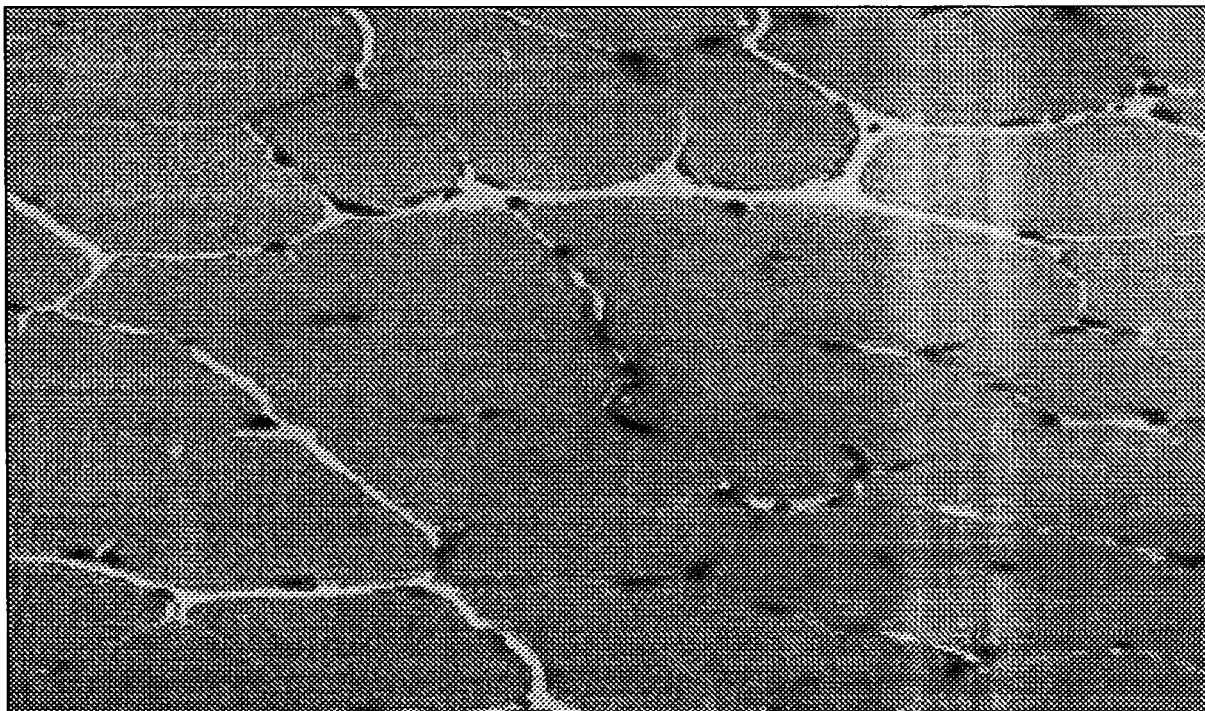


Fig. 5-5.
Aspect muscular normal HE, secțiune transversală. (Histoteca Centrului de Patologie Neuro-Musculară "Dr. Horia RADU")

Variabilitatea de expresie la femei este explicată de teoria lui Lyon : schița embrionară a mușchilor provine dintr-un număr mic de celule, iar gena mutată este conținută de un singur cromosom; în fiecare celulă un cromosom X din doi este inactivat prin heteropicioză ; gravitatea maladiei este proporțională cu numărul de X mutații, non inactivați. La femei maladia este indecelabilă, se traduce însă prin semne biomoleculare sau semne clinice extrem de difuze, funcție dacă procentajul de cromosomi X anormali și activi este scăzut, mediu sau crescut. Trebuie remarcat aici că mutațiile spontane sunt extrem de frecvente.

Distrofia musculară progresivă facio-scapulo-humerală (FSU) această miopatie descrisă de Landouzy și Déjerine în 1885, se transmite ca o anomalie autosom dominantă. Debutul este situat clasic, în cursul celei de-a doua copilării sau adolescenței, foarte rar la vârstă adultă. El este probabil totdeauna precoce, dar primul semn clinic, ocluzia incompletă a pleoapelor în timpul somnului, precum și alterarea mușchilor faciali sunt adesea recunoscute tardiv. Atrofia și astenia musculaturii faciale, omoplaților, membrilor superioare sunt caracteristice. Alterările celor trei teritorii musculare nu apare simultan și se manifestă într-o ordine aleatoare. Atrofia musculaturii faciale conferă *faciens*-ului un aspect imobil și inexpressiv tipic. Copilul nu poate schița surâsul.

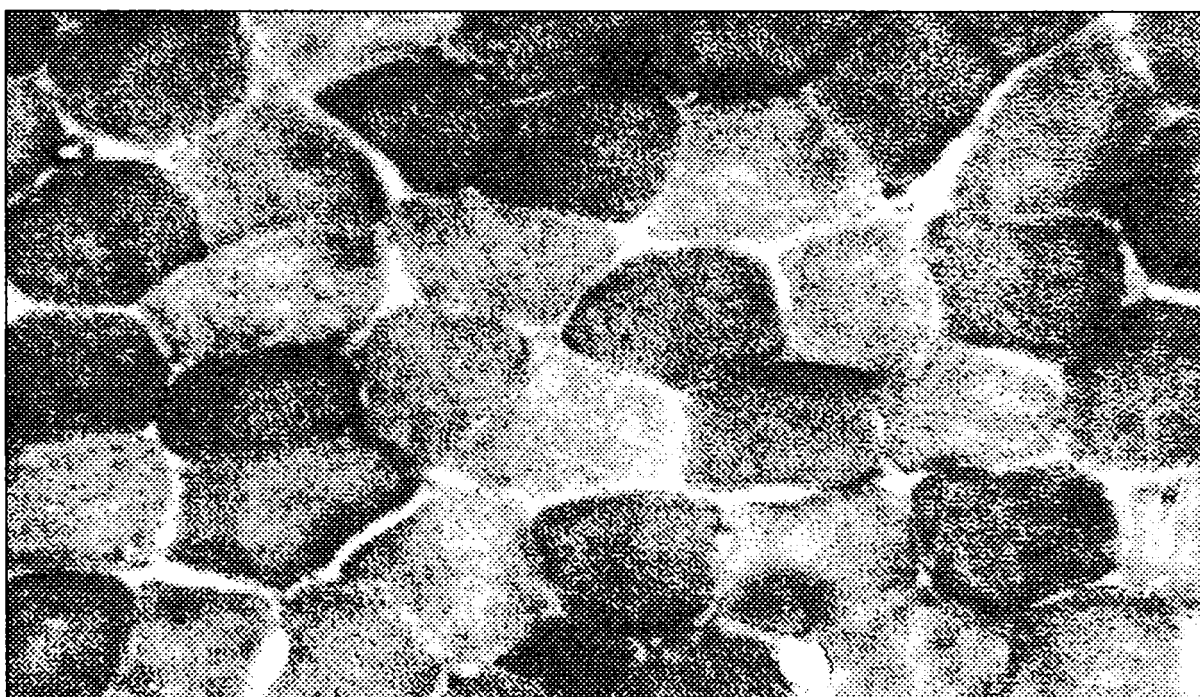


Fig. 5-6.
Reacție histoenzimologică normală (DPNH, secțiune transversală, Histoteca Centrului de Patologie Neuro-Musculară "Dr. Horia RADU).

Atrofia mușchilor orbicularilor antrenează dificultăți în închiderea pleoapelor și alterări în mobilitatea buzelor : copilul nu poate fluiera sau rotunji gura. Mimarea râsului este extrem de dificilă. Atrofia musculaturii centurii scapulare și brațelor, cuprinde ne selectiv mușchii trapezi, deltoizi, bicepsi, tricepsi, brahiali anteriori și pectorali. Datorită atrofiei celor din urmă fața anterioară a toracelui se prezintă ca o suprafață plană în formă de trapez. Mușchii antebrățelor sunt afectați destul de târziu. Pacientul ridică brațele cu dificultate, nu este capabil să le întindă lent. Pseudohipertrofiile sunt rare. Contracturile și deformările scheletice nu survin decât rar și în stadiile avansate ale afecțiunii. Evoluția este variabilă, cel mai adesea benignă. Maladia prezintă adesea perioade relativ lungi de remisie. Afecțiunea generează o invaliditate limitată, compatibilă cu o perioadă de supraviețuire lungă. Prognosticul este defavorabil numai la pacienți la care atrofia facială se manifestă foarte

precoce și care prezintă atingerea centurii pelviene la începutul vârstei adulte, caz în care apar multiple complicații iar *exitusul* este consecința insuficienței mușchilor respiratori.

Distrofiile musculare de centură, afectează ambele sexe. Modul de transmitere este autosom recesiv. La 60% din pacienți, afecțiunea are un caracter net ereditar. În acest caz heterozigoții sunt totdeauna afectați (penetrare completă), dar de o manieră variabilă (expresivitate inconstantă). În 40% din cazuri maladia apare de manieră sporadică; se poate vorbi de o mutație spontană sau de o modificare de penetranță prin mijloace genotipice. Primele simptome apar în general între 10-20 de ani, dar un debut la 20 - 50 de ani nu este un fapt excepțional. Atingerea inițială se manifestă la nivelul uneia din cele două centuri,

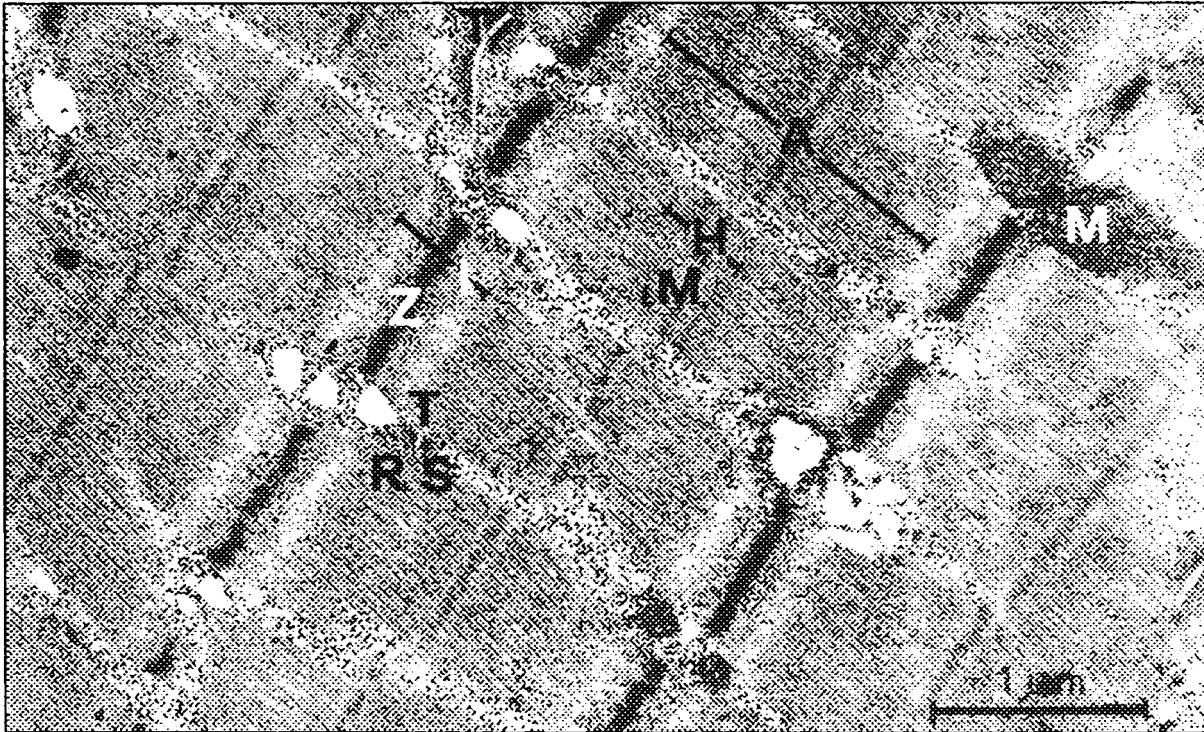


Fig. 5-7.

Ultrastructură, fibră musculară normală, (secțiune longitudinală, OsO₄). M - Mitocondrie, LM - Linie M, RS - Reticul sarcoplasmatic, T - Sistem T, Z - Disc Z. (Histoteca Centrului de Patologie Neuro-Musculară "Dr. Horia RADU).

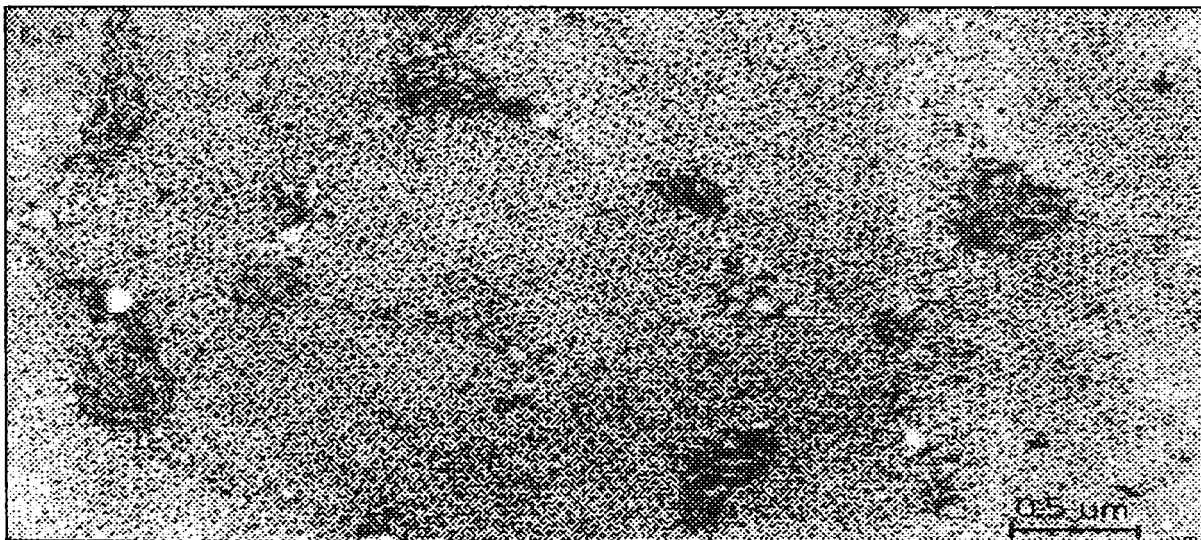


Fig. 5-8.

Ultrastructură, fibră musculară normală, (secțiune transversală, OsO₄. Histoteca Centrului de Patologie Neuro-Musculară "Dr. Horia RADU)

pentru ca apoi relativ rapid să o cuprindă și pe cealaltă. La debut atrofia musculară poate fi asimetrică. Abducția și ridicarea brațelor devine în timp dificilă. Atrofia musculaturii coapselor împiedică fixarea genunchiului; bolnavul nu poate urca o scară, nu se poate ridica de pe scaun decât cu ajutorul mâinilor, pe care le deplasează apoi de-a lungul coapselor.

Musculatura antebrățelor și moleții rămâne indemnă. Evoluția este relativ lentă, comportând adesea perioade lungi de timp de stagnare. După vârsta de 20-30 de ani, contracturile și retracțiile tendinoase încep să se manifeste la membrele inferioare. Imposibilitatea de a merge se instalează treptat. Moartea survine prematur. Din punct de

vedere histopatologic, când distrofia musculară a devenit netă, toate fibrele sunt atinse într-un grad mai mare sau mai mic.

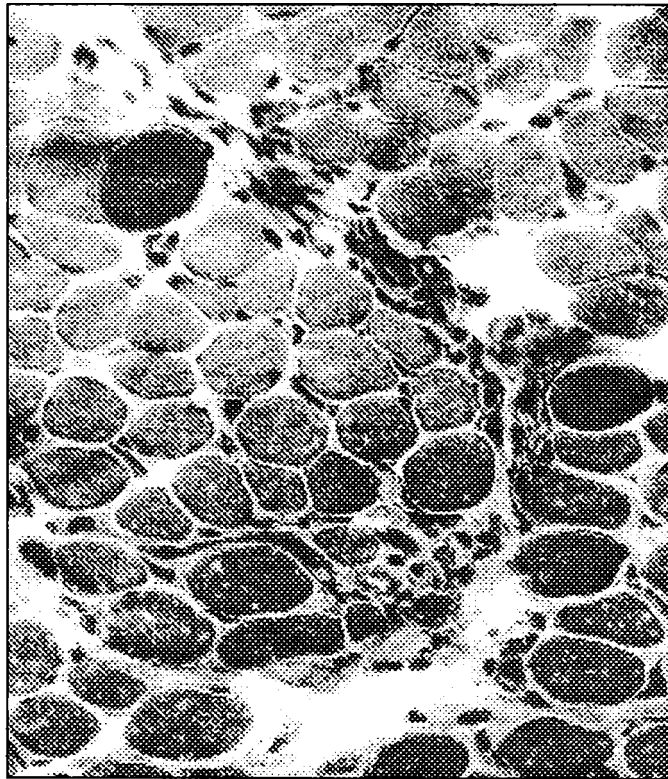


Fig. 5-9.
Distrofie musculară progresivă Duchenne, stadiul inițial. Fibre musculare organizate în fascicule, inegalitate morfometrică marcată, fibre rotunde, opace, fagocitoză, proliferarea țesutului conjunctiv endotelial. (Secțiune transversală, HE, Histoteca Centrului de Patologie Neuro-Musculară "Dr.Horia RADU).

La început o inflamare difuză modifică aspectul celulei musculare; în secțiune transversală, conturul nu mai este poligonal ci rotunjit; diametrele fibrelor devin inegale, unele celule apar hipertrofice în timp ce altele sunt în regresie. Alterările celulare esențiale constau în: diminuarea striatiunilor,

vacuolizare și hialinizarea sarcoplasmului. Nucleii care se găsesc normal în sarcolemă au tendința de a migra în centru. Fibrele musculare sunt distruse gradual și înlocuite de țesut fibros și adipocite. Degradarea evolutivă a tabloului anatomopatologic, este redată în figurile 5-9, 5-10, 5-11, 5-12, 5-13.

Cu bună știință am eliminat din prezentare aspectele clinice generale ale miopatiilor distale și miopatiilor oculare, care nu fac la acest moment obiectul prezentării noastre.

Fig.5-10.
DMP- Duchenne, stadiu intermediar - fibre rotunde cu inegalități morfometrice, nuclei interni și centrali, splitting-uri conturate. (secțiune transversală - HE, Histoteca Centrului de Patologie Neuro - Musculară "Dr.Horia RADU)



În cazul maladiei Duchenne, infiltratul fibro-adipos poate înlocui țesutul muscular fără o pierdere de volum. În cazul celorlalte tipuri de distrofii musculare progresive, în difi..., dispariția fibrelor, sunt procese mai lente și de amplitudini relativ reduse.

Examinarea prin tehnici de microscopie electronică nu a relevat un tip de leziune, specifică, patognomonică.

Este de remarcat că în cazul atrofiilor musculare neurogene, examinarea mușchiului a arătat coexistența fibrelor musculare atrofile și acelor normale. Primele corespund unor neuroni lezați în contrast cu celelalte corespunzătoare unor inervații intacte. Infiltratul colageno-lipidic este mult mai puțin abundent în cazul atrofiei neurogene

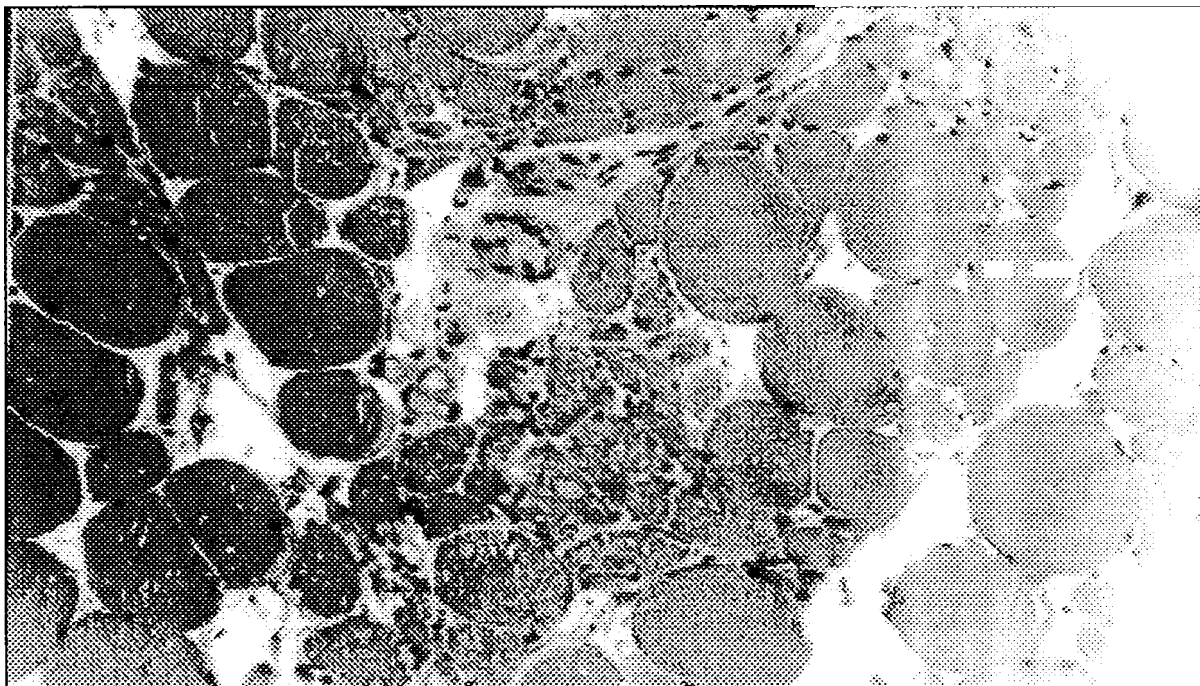


Fig 5-11.

Distrofie musculară progresivă Duchenne, stadiu intermediar, variații morfometrice, fibre hipertrofice, resturi de fibre, apariția unor zone de necroză, fagocitoză, țesut conjunctiv abundent (secțiune transversală-HE, Histoteca Centrului de Patologie Neuro - Musculară "Dr.Horia RADU).

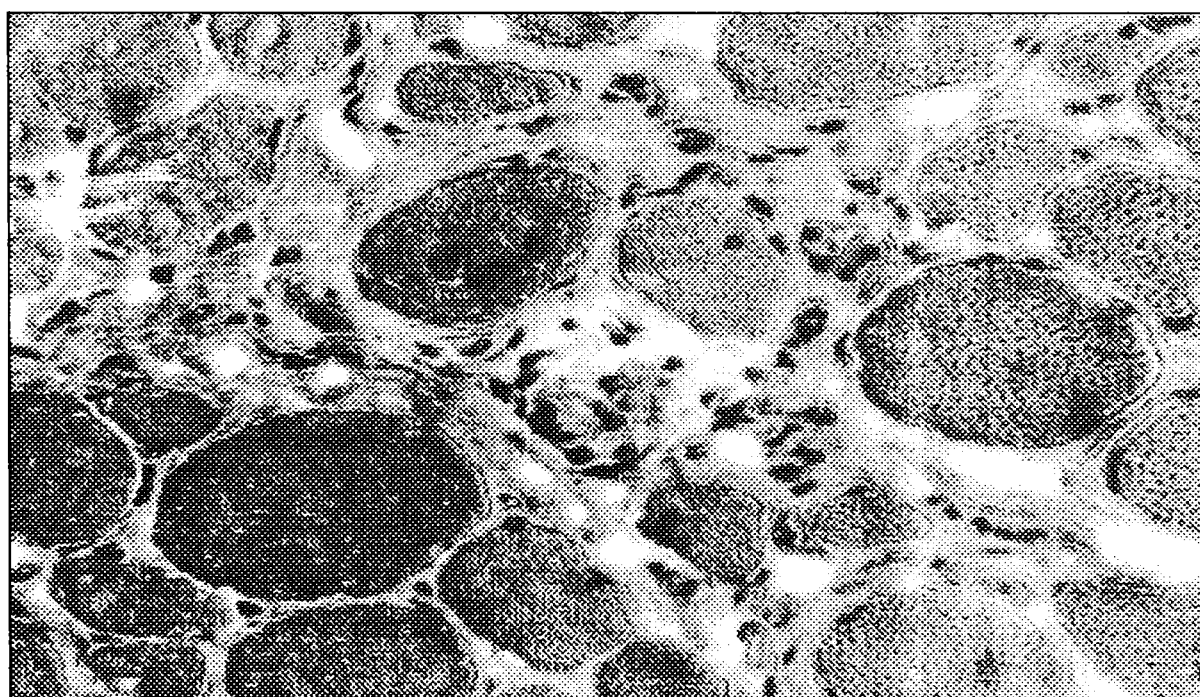


Fig 5-12.

Distrofie musculară progresivă Duchenne, stadiu intermediar, variații morfometrice, a fibrelor musculare, nuclei cu tendință de internalizare, infiltrat celular (secțiune transversală-HE, Histoteca Centrului de Patologie Neuro - Musculară "Dr.Horia RADU).

În polimiozitele sunt prezente leziunile de necroză segmentară și infiltrat celular. Durerile sau paresteziile care acompaniază o atrofie musculară indică o atingere nervoasă. Este vorba de polinevrite, miozite sau de o afectare medulară și nu de o distrofie tipică cum s-a făcut vorbire până anterior.

Amiotofia peroneală neurogenă, este un complex simptomatic caracterizat prin amiotrofii distale simetrice, ce interesează musculatura lojei antero-externe a gambelor și mușchii mici ai piciorului, cu progredientă lentă, tulburări de sensibilitate și simptome supraspinale, determinismul genetic putând îmbrăca toate modalitățile de transmitere ereditară, cea mai comună fiind transmisia autosom dominantă. Descrisă pentru prima dată de Charcot și Marie în 1866 și de Tooth în mod independent ca o nouă afecțiune cu caracter ereditar, cercetări ulterioare (morfologice, electrofiziologice, genetice) definesc existența a două subtipuri lezionale, periferic și neuronal, corespunzătoare celor două variante morfologice : hipertrofică și neuronală. Din punct de vedere nosologic se acceptă unicitatea fenotipurilor implicate (Charcot-Marie-Tooth, Déjérine-Sottas, Roussy-Lévy) aceasta fiind argumentată de coexistența lor în aceeași familie.

Transmisia genetică autosom dominantă cea mai comună pentru amiotofia peroneală neurogenă de tip Charcot-Marie-Tooth, presupune o penetranță și o expresivitate constantă în aceeași familie, penetranța calculată a genei fiind de 83%, prevalența variind de $2-13 \times 10^5$.

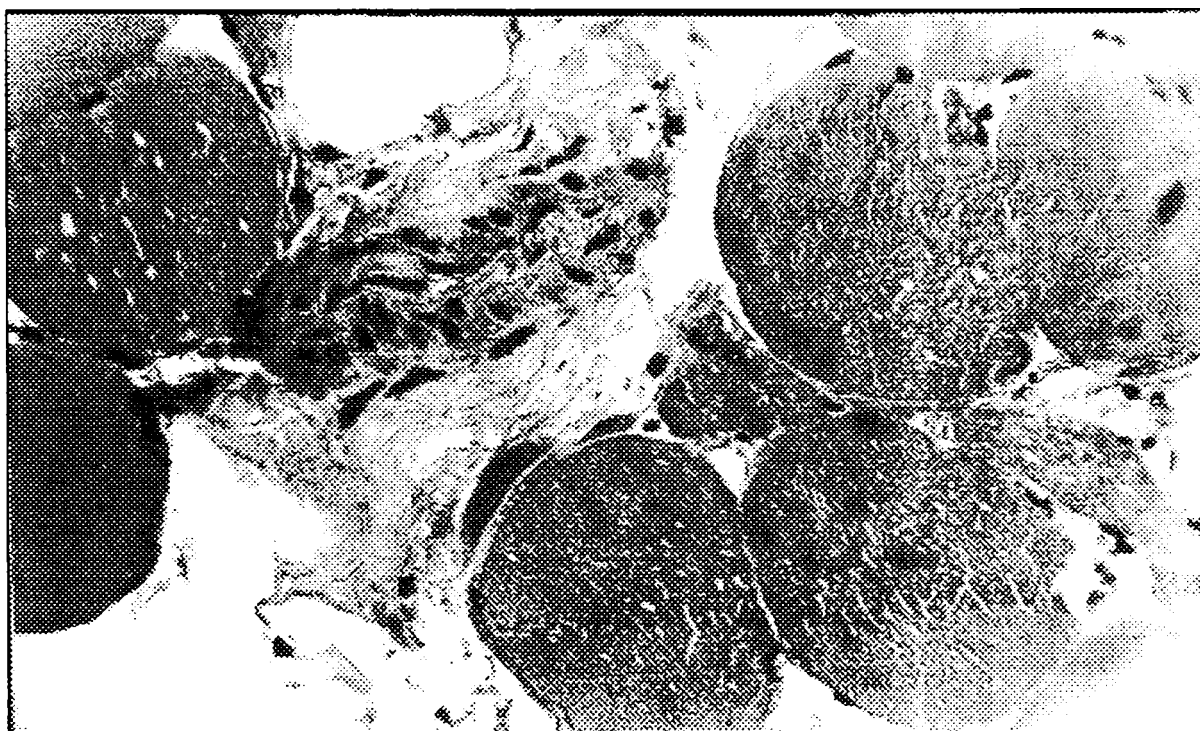


Fig. 5-13.

Distrofie musculară progresivă Duchenne, stadiu final, fibre rotunjite, inegalități morfometrice fibrilare marcate, degenerescență lipidică, țesut conjunctiv abundent (secțiune transversală-HE, detaliu, Histoteca Centrului de Patologie Neuro - Musculară "Dr.Horia RADU).

Transmisia autosom recesivă este o formă cu evoluție mai malignă decât cea dominantă, caracterizată printr-un sindrom senzitiv subiectiv foarte frecvent, bolnavul imobilizându-se după al doilea deceniu de evoluție, cazurile de consangvinitate fiind mult peste nivelul mediu din populație. Formele de transmitere de tip X-recesiv și X-dominant sunt incomplet definite din cauza numărului redus de cazuri cunoscute și a datelor clinice și evolutive incomplete. În aceste forme există o discretă predominanță la sexul masculin.

Numărul mare de cazuri sporadice constante este numai aparent, deoarece investigarea celorlalți membri ai familiei arată heterozigoți cu anomaliile ale VCM (Viteză de

conducere motorie). Cadrul nosologic al sindromului Roussy-Lévy a fost disputat de nenumărați autori; în prezent autonomia acestui sindrom este contestată datorită incosistenței sale genetice și analogiilor electrofiziologice și morfologice cu amiotrofiile peroneale neurogene, Dyck și Lambert încadrându-l în tipul de neuropatie hipertrofică senzitivă motorie. O ultimă evaluare clinico-genetică a domeniului în literatura românească de specialitate a fost făcută în 1989 de Popescu.

Rațiunea includerii maladii Charcot-Marie-Tooth, în acest studiu biochimic a avut ca suport necesitatea existenței unui factor de comparație care evident să nu conțină numai domeniul de referință "normal"

În acest cadru clinic, genetic, morfologic și biochimic, au fost selectate loturile de investigație după cum urmează:

Tabel 5.1. Compoziția loturilor studiate biochimic și enzimologic.

TIPUL DE AFECȚIUNE	NR. CAZURI (n)	VÂRSTĂ (ANI)	
		DOMENIU	MEDIE ($X \pm DS$)
DISTROFIE MUSCULARĂ PROGRESIVĂ BECKER-KIENER	44	10 - 50	28.43 \pm 9.75
DISTROFIE MUSCULARĂ PROGRESIVĂ DE CENTURĂ (DMC)	138	3 - 64	29.56 \pm 16.58
DISTROFIE MUSCULARĂ PROGRESIVĂ DUCHENNE (DMD)	80	3 - 30	9.20 \pm 3.52
DISTROFIE MUSCULARĂ PROGRESIVĂ DUCHENNE (VECTOARE) (DMDv)	38	6 - 39	29.41 \pm 7.16
DISTROFIE MUSCULARĂ PROGRESIVĂ FACIO-SCAPULO-HUMERALĂ (FSU)	85	3 - 61	33.16 \pm 16.47
MALADIE CHARCOT-MARIE-TOOTH (CMT)	191	4 - 75	31.13 \pm 14.19
TOTAL CAZURI	576	3 - 75	27.57 \pm 15.58

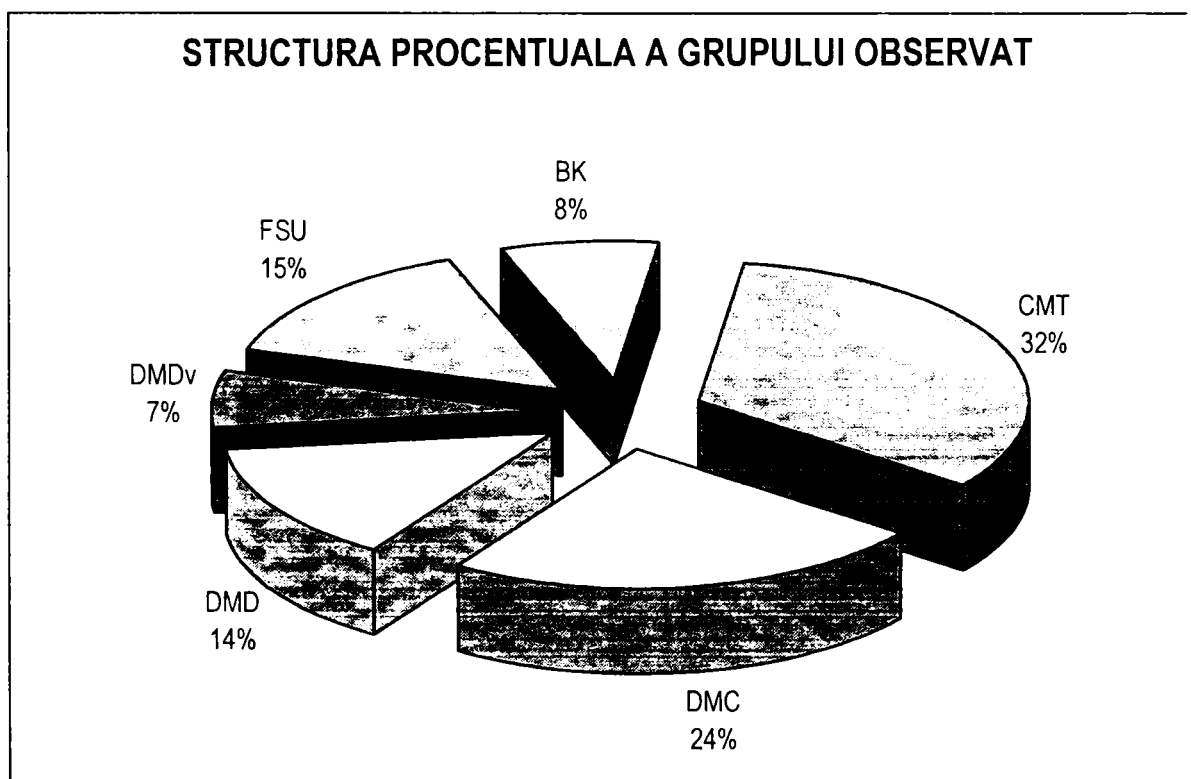


Fig. 5-14.
Compoziția procentuală a loturilor observate biochimic și enzimologic

5.2. VALORI NORMALE ȘI PATOLOGICE: DOMENII DE DECIZIE ÎN PATOBIOCHIMIE

Prima corelație dintre fenomenul biochimic și prezența afecțiunii este plasată fără dubii în 1776 când Sheele utilizează testul cu murexid la identificarea acidului uric dintr-un calcul urinar.

Conceptul de valori de referință (valori normale), a fost introdus în biochimie și chimia clinică de Gräsbeck și Saris în 1969. Cunoașterea valorilor normale și patologice este de maximă importanță pentru orientarea conduitei clinice. Deci se poate afirma cu certitudine că aceste valori, prezintă "domenii de decizie" în patobiochimie.

Valorile normale sunt prezentate de obicei fără o referire directă asupra domeniului populațional ce îl reprezintă. Altfel spus, nu se face nici o precizare asupra : selecției subiecților , stării fiziologice înainte și în timpul prelevării probelor, colectare, tratament și stocare, controlul acurateții procesului analitic, și un factor extrem de important în unele cazuri arealul geografic. Arealul geografic al populației din care se selectează subiecții ce vor fi investigați, reprezintă un factor de primă importanță, știut fiind faptul că modul de nutriție specific își pune amprenta major asupra unor parametrii metabolici, variațiile deși sunt mici au o implicare maximă asupra evaluării domeniilor de decizie în patobiochimie.

Cel mai adesea reprezentarea biochimică și biomoleculară a valorilor extreme observate sau determinate statistic, rămâne obscură, la fel ca și centrarea acestor domenii. Cu alte cuvinte distribuția gaussiană a valorilor în jurul unei valori mediane nu ascultă totdeauna de logica biochimică a proceselor metabolice normale sau patologice.

Noțiunea "valori normale" este asociată tradițional și simplist "stării de sănătate", cuvântul normal fiind de altfel în acest caz un termen ambiguu, desemnând un *status* uzual, frecvent, gaussian, non-patologic. Valorile derivă adesea de la subiecți, tineri, ambulatorii, sănătoși, dar sunt utilizate și la evaluarea rezultatelor obținute de la pacienți vârstnici, suferinzi.

La acest capitol trebuie remarcată filozofia ce conectează conceptele de sănătate, respectiv cel de boală. Așa cum s-a descris anterior trebuie precizată starea de sănătate individuală. Starea de sănătate pentru marea majoritate a oamenilor este descrisă de sofismul " *lipsa unei afecțiuni-prezența bolii*", sau altfel spus, " *nu mă doare nimic, deci sunt sănătos*". Deoarece o valoare neuzuală a unui parametru biochimic, nu indică în mod necesar o afectare, o decizie clinică trebuie să reflecte o cunoaștere cel puțin bună, a conceptului de "sănătos" în relație cu indivizii ce sunt circumscrisei arealului. Altfel spus, este necesară cunoașterea indivizilor sănătoși precum și a celor cu afecțiuni tipice.

Gräsbeck în 1983, discuta problema stării de sănătate și bolă, în relație cu filozofia valorilor de referință. Pe scurt, autorul consideră că definiția stării de sănătate acceptată de Organizația Mondială a Sănătății este o utopie, un concept ne realist. Gräsbeck este de părere că: " *Sănătatea (ca stare) este un complex minim, subiectiv de stări afective și semne obiective ale maladiei, relaționate direct cu situația socială a subiectului precum și cu scopul activității medicale iar în sensul absolut este o stare ideală, imposibil de atins.*"

Starea de sănătate poate fi comparată cu temperatura organismelor vii, poate fi conjunctural, mai ridicată sau mai scăzută dar este prezentă totdeauna atâta timp cât subiectul este în viață. Nu există un individ ideal, perfect din punct de vedere biomolecular, fiecare membru al unei populații are un defect, o imperfecțiune " *naturală*" mai mult sau mai puțin manifestă.

În medicina preventivă se încearcă determinarea unui nivel biochimic minim de risc. În practica clinică se relaționează la pacientul suferind, și unul din scopurile testelor de laborator este în acest caz acela de a discrimina între starea normală și cea patologică. În acest caz valoarea asociată stării de sănătate este importantă, dacă nu sunt cunoscuți parametrii uzual asociați pacientului, echilibrarea acestuia se face prin aproximare la o medie a indivizilor considerați sănătoși.

Noțiunea de "nivel de decizie" este valoarea cu care ar trebui să opereze clinicianul. Figura 5-15, prezintă o situație care ar trebui să illustreze baza logică a nivelelor de decizie.

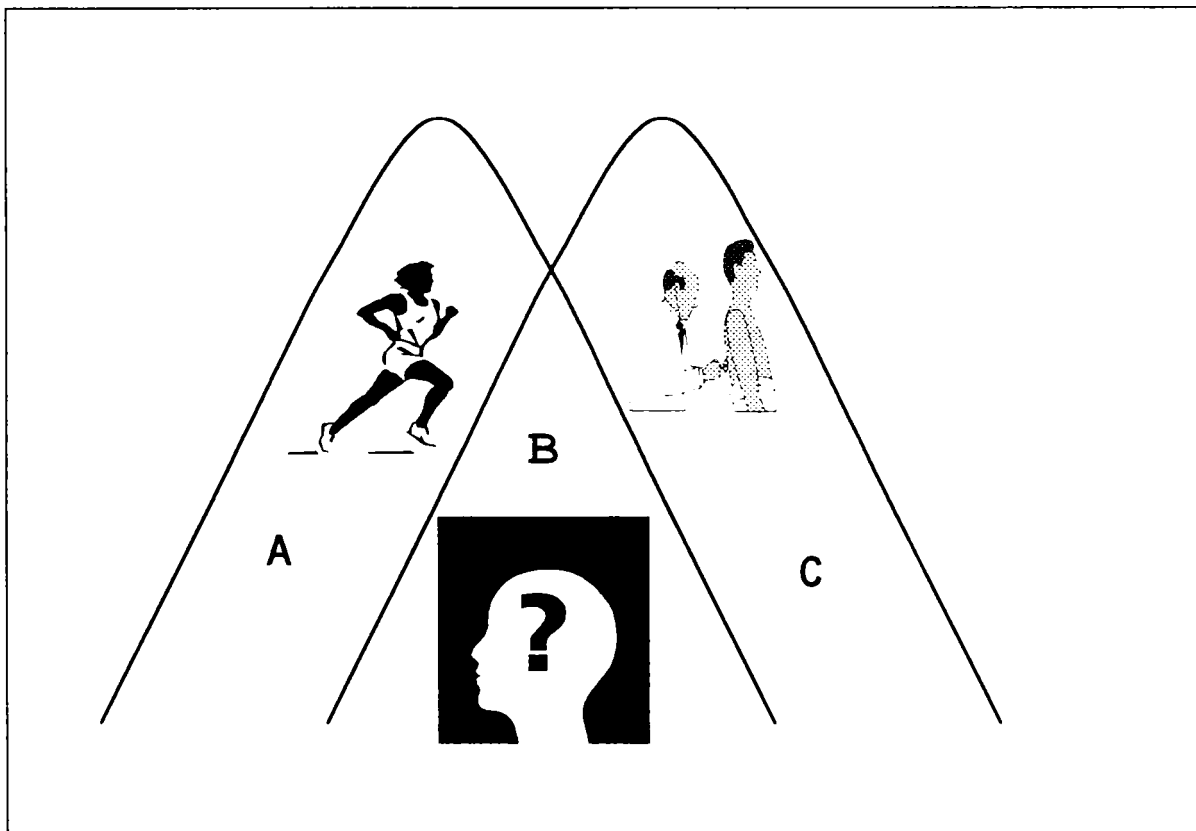


Fig. 5-15.

Distribuția valorilor unei determinări, în a două categorii clinice "A" și "C".

Să presupunem existența a două clase clinice relevante denumite "A" și respectiv "C". Clasa "A" de subiecți, este un grup de indivizi sănătoși iar clasa "B" cuprinde subiecți cu probleme de sănătate ce au fost supuși unei terapii oarecare.

Distribuția valorilor este gaussiană, simetrică, monotonă, prevalența echivalentă. În mod evident în afara celor două domenii nete, există un subdomeniu "B", în care valorile sunt suprapuse, juxtapuse, altfel spus reprezintă intersecția mulțimilor de valori "A" și "C". Mai precis, o valoare particulară poate exista în unul din cele trei intervale : definit A, definit C sau incert. Intervalul valoric în care toate determinările sunt definit A va fi notat cu "ND₁", iar cel în care sunt definit B cu "ND₂". Abreviația "ND" provine de la termenul "Nivel de Decizie". Decizia poate fi luată funcție de valoarea (modul) determinării. Când valoarea este plasată în domeniul "ND₁", posibilitatea ca individul să aparțină grupului "C" este exclusă. În acest mod "ND₁", funcționează ca o limită de excludere. În acest caz clinicianul avizat comunică pacientului : "Prognosticul nu este afectat de posibilitatea de a aparține grupului "C". Exemple de constatare a acestei stări pot fi :

1. Copilul dumneavoastră, nu este afectat de hipotiroidism congenital, titrul seric al tiroxinei este în afara limitei specifice afecțiunii.

2. Copilul dumneavoastră, nu va fia afectat de o suferință respiratorie, valoarea surfactanților din lichidul amniotic exclude această maladie.
3. Nu prezentați semne tipice diabeticilor, deoarece valoarea determinării glucozei plasmatice, este situată într-un domeniu ce exclude acest tip de maladie.

Contrar, dacă valoarea determinării este plasată în domeniul "ND₂", diagnosticul ca aparținând mulțimii "C", este confirmat; presupunând că nu există și altă categorie în afară de "A" și "C". În termenii modelului valorii predictive, valoarea "ND₁" furnizează 100% sensibilitate diagnostică, altfel spus toți indivizii care sunt membrii mulțimii "C", vor prezenta valori diferite de "ND₁". Analog, valoarea "ND₂" poate fi considerată ca având 100% specificitate diagnostică, deci toți indivizii care nu au afecțiunea (membrii ai mulțimii "A"), vor avea valori exterioare domeniului "ND₂". Evident, presupunem că în cazul în care pacientul aparține definit mulțimii "C", vor exista câteva acțiuni terapeutice sau/și diagnostice. Trebuie notat aici existența unui domeniu de incertitudine închis și mărginit, între "ND₁" și "ND₂". Valorile acestei mulțimi aparțin în mod egal, mulțimilor (claselor) "A" și respectiv "C". Să definim această mulțime "B".

În cazul în care valoarea determinării aparține mulțimii "B", clinicianul atent și avizat, are la dispoziție posibilitățile:

1. Să solicite teste adiționale în vederea plasării pacientului din punct de vedere biomolecular în clasa corectă. Este posibil ca un nou set de determinări de laborator să-l conducă la o încadrare corectă. Un bun exemplu în acest caz ar fi redozarea THS seric, care să decidă dacă valoarea tiroxinei serice este sau nu în domeniul patologic.
2. Să decidă o conduită terapeutică, chiar dacă pacientul nu aparține mulțimii "C". Pacientul suspectat de o infecție bacteriană, cu un diagnostic incert va fi supus unei terapii cu antibiotice. Rațiunea acestui act terapeutic constă în evaluarea riscului administrării antibioticului (preventiv chiar) în raport cu trecerea pacientului în mulțimea certă "C".

Să analizăm și o altă ipoteză ilustrată în figura 5-15. Presupunem că rezultatele experimentale biomoleculare definesc două clase clinice "A" și "C". Clasa "A" este alcătuită din mulțimea subiecților sănătoși iar clasa "C", cuprinde mulțimea pacienților afectați de o maladie oarecare. Aceste mulțimi nu au un domeniu jxtapus, de suprapunere.

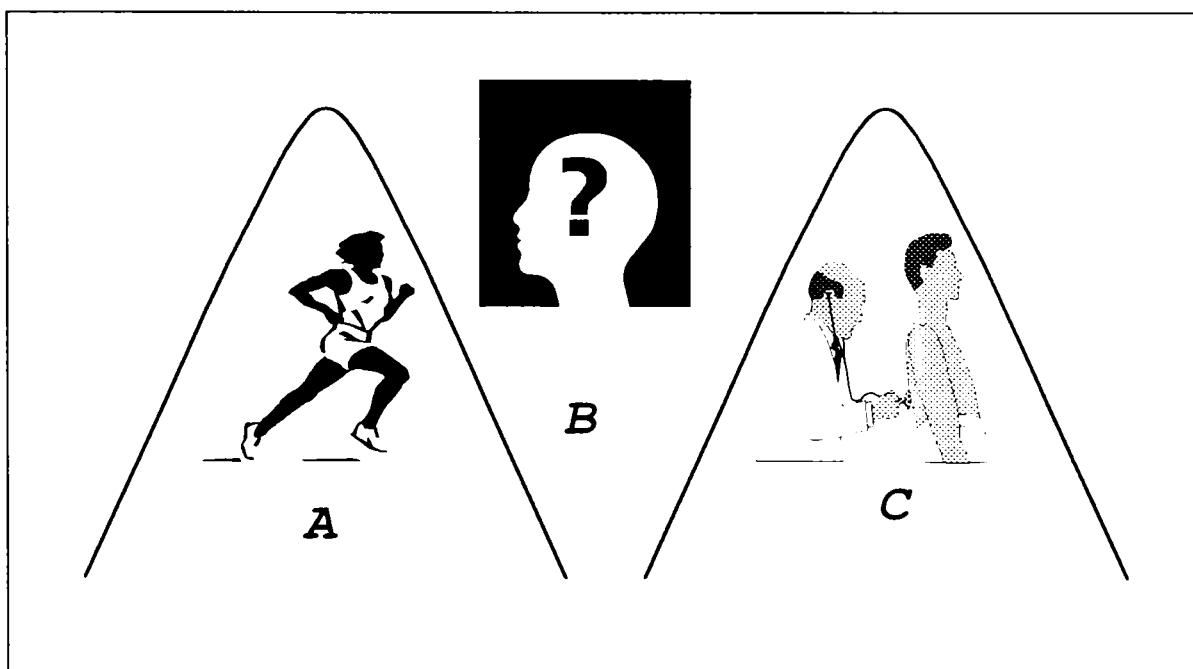


Fig.5-16.
Două clase clinice disjuncte "A" și "C".

Există un domeniu de valori distinct în care toți subiecții aparțin clasei "A" și unul în care toți subiecții aparțin clasei "C". Cele două mulțimi definesc un domeniu de incertitudine între limita superioară a domeniului "A" și limita inferioară a domeniului "C". În acest caz se definește un singur nivel de decizie "ND₁", mărginit la dreapta (închis) de limita inferioară a mulțimii patologice "C", reprezentând momentul de alertă că "subiectul" poate să aparțină clasei "C".

În acest ultim caz pot fi date ca exemplu : alanin aminotransferaza serică, calciul seric, etc.

Pentru o mai bună înțelegere a acestui concept să urmărim raționamentul elaborat în 1983 de Statland. Actul clinic are în acest caz trei personaje : clinicianul, (bio) chimistul clinician și evident pacientul. Clinicianul primește din partea (bio) chimistului clinician, rezultatul unei determinări cantitative a unui parametru provenind de la pacient și trebuie să reacționeze (să își construiască conduita terapeutică), funcție de acesta. Medicul clinician poate să nu reacționeze în nici un mod, rămânând în expectativă sau să decidă asupra următoarelor trei opțiuni :

1. Să colaboreze cu (bio) chimistul clinician în vederea efectuării de teste adiționale care să fundamenteze și să susțină prima concluzie.
2. Să modifice tratamentul pacientului.
3. Să elaboreze un prognostic evolutiv individual al pacientului.

Din lipsă de timp (număr prea mare de pacienți), comodate sau necunoaștere (cel mai adesea), clinicianul solicită de regulă, laboratorului ca domeniu de referință (evoluție) normal al parametrilor de interes, două valori izolate, lipsite de relevanță clinică (de cele mai multe ori). Acesta este pasul important în care decizia clinică (de cele mai multe ori bazată pe acuze subiective) elimină cu bună știință obiectivarea biomoleculară. Este momentul în care cu bună știință clinicianul, elimină evoluția subclinică a afecțiunii, faza clinic manifestă a bolii coincide uneori cu faza cronică, când manevrele terapeutice sunt costisitoare și de cele mai multe ori tardive.

5.3. INVESTIGAȚII ASUPRA ENZIMELOR ÎN PATOBIOCHIMIE

5.3.1. DISHOMEOSTAZIA ENZIMATICĂ ÎN AFECȚIUNI NEURO-MUSCULARE: ASPECT SINOPTIC

Studiile sistemice asupra activităților enzimatică în miopatii au început să fie descrise din 1962. În decursul anilor studiile enzimatică sistematice au inclus peste 40 de enzime cu implicate mai mult sau mai puțin în procesele metabolice ale mușchiului normal sau patologic.

O analiză pertinentă este prezentată în tabelul următor bazat în mare parte pe observații biochimice și histoenzimologice desfășurate pe parcursul a aproape 25 de ani.

Activitățile acestor enzime variază semnificativ în serul afectaților de diferite forme ale distrofiei musculare progresive, dar distrofia Duchenne este un sumum al acestor anormalități.

Modificări enzimatică semnificative și specifice sunt semnalate în distrofia Becker-Kiener, de centură, facio-scapulo-humerală) în acest mod testele enzimatică sunt un instrument indispensabil diagnosticului diferențial al afecțiunilor.

Evoluția tabloului enzimatic al distrofiilor musculare progresive este dependent de stadiul și tipul afecțiunii. În pofida faptului că procesele catalizate enzimatic au specificitate, se poate aparent considera că între diferitele enzime serice nu ar exista o corelație. Această constatare, peste care un clinician trece cu destulă ușurință, interesul său fiind dirijat (de regulă) numai spre valorile extreme ale domeniului de referință nu reflectă o realitate biomoleculară. Știut fiind însă că aceste afecțiuni au un stadiu preclinic determinant atât pentru diagnostic, sfat genetic dar și pentru tratament conservativ, s-a încercat și reușit o corelație între aldolaza (1-6) serică (ALD), creatin fosfoKinaza (FCK), transaminaza oxalică (TGO) și cea piruvică (TGP). Rezultatele, surprinzător au o specificitate de peste 90% în diferite tipuri de distrofii musculare.

Formalismul matematic redă corelația prin expresia :

$$K = 4.08 \ln TGO + 2.53 \ln TGP + 2.90 \ln ALD + 1.81 \ln FCK$$

Tabel 5.2. Activități enzimatică în mușchi și sânge, la subiecți afectați de maladii neuro-musculare

ENZIMĂ	MUȘCHI	SÂNGE /SER	OBSERVAȚII
1	2	3	4
Aconitaza (E.C. 4.1.1.3.)	Normală		M: Scăzută / greutate țesut umed
Adenilat deaminaza (E.C. 3.5.4.2.)	Scăzută	Normală	
Aldolaza ,fructoză 1,6-difosfat (E.C.4.1.2.13.)	Scăzută	Crescută	M: Scăzută chiar și în cazuri preclinice. S : în special în Duchenne, unde este crescută și în urină
Aldolaza ,fructoză 1-fosfat (E.C. 4.1.2.7.)		Normală	S: Tendință de creștere semnificativă în DMD
Arilsulfataza (E.C.3.1.6.1.)	Scăzută		M: crește chiar în cazurile preclinice. Nu crește în atrofiile neurogene
ATP-aza (E.C. 3.6.1.3.)	Normală (Scăzută)	Normală	M: Scăzută și în Duchenne
Catepsine (proteaze, peptidaze)	Mult crescute		
Citocrom c	Scăzută		
Citocrom oxidaza (E.C.1.9.3.1.)	Normală		M: Scăzută / greutate țesut umed
Citocrom reductaze (NAD; NADP, subgrupa 1.6.2.)	Scăzute		M: NAD-cit-R intens scăzută
Colinesteraza (E.C. 3.1.1.8.)		Normală (ușor crescută)	S: sugerează că funcțiile hepatice nu sunt alterate
Creatin fosfokinaza (E.C.2.7.3.2)	Scăzută	Mult crescută	S: Valoarea diagnostică Diagnostic diferențial.
Creatin fosfokinaza (izoenzime)	Normal	Normal	S: 2-3 benzi electroforetice
Enolaze (E.C.4.2.1.11.)	Scăzute	Normale	M: Scăzute la debut și imediat după.
Fosfataze acide	Crește	Normale	S: Creșteri periodice
Fosfataze alcaline	Normale	Normale	M:substă β-glicerofosfat

1	2	3	4
Fumaraze	Scăzute	Ne detectat	M : variații ne semnificative față de subiecți indemni
Gliceraldehidă-3-fosfat dehidrogenază	Normală sau scăzută	Ușor scăzută	M: scăzută în stadiile incipiente (la debut)
Glucoză-6-fosfat dehidrogenaza	Crescută	Normal sau crescută	
Glutamat dehidrogenaza	Crescută	Ușor Crescută	
Glutation reductaze (NAD, NADP)	Ușor scăzute	Crescute	
GOT- izoenzime	normal	Normal	
Hexokinază	Normală		
ICDH-izoenzime	Lipsește ICDH-2		
Izo-Citrat Dehidrogenaza	Normală	Crește	M: inițial semnificativ crescută
Lactat Dehidrogenaza (LDH)	Scăzută	Crește	M: inițial semnificativ crescută S: semnificativ crescută în Duchenne
LDH-izoenzime	LDH-4; LDH-5 scăzute LDH-5 poate lipsi	LDH-1,2,3 crescute LDH-5 crescut	
Lizozime	Ușor scăzute		
Malat Dehidrogenaza (MDH)	Inițial normală scade funcție de stadiul bolii	Crescută	S: semnificativ crescută și în Duchenne
MDH-izoenzime	Normală		
Miokinaza (Adenilat Kinaza)	Scăzută	Crește	M: inițial crește S: este afectată de hemoliza chiar ușoară
NAD, NADP		Normală	
Ornitin-carbamil transferaza		Normală	
Transaminază oxaloacetică (GOT)	Normală sau scăzută	Crește	M: scade numai în stadiile avansate S: mult crescute în Duchenne
Transaminază piruvică	Normală sau scăzută	Crește	S: mult crescute în Duchenne
α -Hidroxitiriat Dehidrogenaza	Descrește	Crește	
β -Gucuronidază (E.C.3.2.1.31.)	Crescută		M: crește în fazele preclinice
Fosfofructo kinază	Ne detectată		
Fosfoglucomutaza	Scăzută	Crește	S: la debut
6-Fosfogluconat Dehidrogenaza	Crește	Crește	
Fosfogluco izomeraza	Normal	Crește	
Fosfoglicerat Kinaza	Scade		
3- Fosfoglicerat Mutaza	Scade		
Fosforilaza I (a,b)	Mult scăzut	Ne detectat	
Piruvat kinaza	Descrește		M: inițial crește semnificativ
Ribonuclează	crește		S: Deoxiribonucleaza normală
Succinat oxidază	Normal		

1	2	3	4
Tans ketolaza	Scăzut	Normal	
Trioză fosfat Izomeraza	Scăzută	Crește	M: descrește în Duchenne la debut.

Notă : M : Mușchi, S : Sânge

Utilizarea acestui gen de corelații este benefică în principal din două puncte de vedere :

1. Permite evidențierea rapidă a procesului bioanalitic.
2. Generează pentru clinician un pachet de informații înalt prelucrate, gata de a fi utilizate.

Un sinoptic al variației activităților enzimice funcție de vârsta pacientului este redat în continuare.

Metodele biochimice de monitorizare și investigare sunt mijloace efective nu numai pentru diagnosticul diferențial al diferitelor maladii ci și agenți cauzativi relevanți care indică modul eficient de tratament. La acest moment euristic, există o vastă literatură în domeniul patobiochimiei distrofiilor musculare progresive, marea majoritate reunind informații din ultimii cinci ani. Totuși, rezultatele nu sunt uniforme, multe dintre ele fiind controversate. Această heterogenitate este datorată în primul rând erorilor generate de metodele de obiectivare, materialul observat, insuficienta cunoaștere a valorilor de decizie normale și patologice. În conexiune cu distrofia musculară progresivă sunt cunoscute anomalități ale metabolismului hidraților de carbon, proteinelor și lipidelor.

O afectare (fie ea și secundară defectului genetic primar) a metabolismului lipidic celular este la acest moment din ce în ce mai serios luată în considerație, deoarece în mușchiul distrofic grăsimile se acumulează excesiv, înlocuind gradual (progresiv) țesutul muscular în primul rând, iar apoi datorită anomalităților mentale, puse în mod cert în sarcina modificărilor de acizi grași polinesaturați cu catenă lungă evidențiate la nivel cerebral.

Metabolismul proteic este afectat în special în cazul distrofiei musculare progresive Duchenne. Conținutul amino acidic muscular este considerabil diminuat iar excreția renală a acestora este crescută. Un aspect clasic, cunoscut de relativ multă vreme, este modificarea creatinuriei în sensul creșterii excreției creatinei, care nu este specifică distrofiilor musculare, fiind semnalată în mai toate afecțiunile neuro-musculare. Se acceptă în general că un nivel ridicat al creatinuriei urinare este patobiochimic pentru activitatea proceselor polimiozite iar normalizarea concentrației în acest caz sunt un indicator al eficienței terapiei steroidice. Variațiile enzimelor este mult mai redusă raportat la individul sănătos, iar specificitatea patobiochimică este indiscutabil mai ridicată față de creatinină a cărei excreție maximă se situează normal în jurul valorii de 300 mg / 24 h. Se notează concentrații crescute ale creatinuriei urinare în distrofia musculară progresivă, polimiozită, mielopatie, atrofie cerebeloasă, pielonefrite cu schizofrenie și agranulocitoză cu psoriazis. Creatinuria nu este deci un simptom patobiochimic al distrofiei musculare progresive. Similar în ser concentrația creatinei poate fi crescută în timp ce creatinina este scăzută. Sinteza creatinei are loc în ficat, rinichi și pancreas și este de regulă normală în cazul distrofiei musculare progresive. Concentrațiile patologice din ser și urină sunt adesea consecințe a diminuării masei musculare iar în acest mod există o perturbare a metabolismului creatinei. În cazul distrofiei musculare testul la creatină a fost totdeauna pozitiv: la administrarea perorală a 10-30 mg/kg greutate corporală de creatină, 70-100% din aceasta a fost reținută în timp ce la indivizi miopatici cea mai mare parte a fost excretată prin rinichi. În mușchi, capacitatea de reținere și metabolizare a creatinei este mai mult sau mai puțin afectată. Aceasta este foarte probabil o consecință a funcționării defectoase a segmentului metabolic de fosforilare a creatinei cu ATP la fosfocreatinină în prezența creatinfosfokinazei, speculându-se astfel concentrațiile semnificativ diminuate ale acestei enzime la nivel muscular. Pentru diagnosticul diferențial

este extrem de important dozarea enzimelor serice și musculare. La acest moment eurisitc sunt cunoscute aproximativ 80 de enzime musculare care sunt curent examinate seric în conexiune cu distrofiile musculare progresive.

Deși faza de localizare a defectului genetic pe ramura scurtă a cromozomului Xp21, a fost depășită, diagnosticul patobiochimic utilizează aproape exclusiv titrul enzimatic

5.3.2. REZULTATE ALE INVESTIGAȚIILOR ASUPRA UNOR AFECȚIUNI NEURO-MUSCULARE

Cunoștințele noastre asupra pachetului enzimatic din organismele vii în general, se rezumă de regulă la determinarea cantitativă a activității în condiții optime și în unele cazuri fericite la secvențele metabolice pe care acestea le catalizează. Frecvent cu valoare diagnostică pentru clinician sunt studiate : ALD (aldolaza), GOT (transaminaza oxalacetică a acidului glutamic), GPT (transaminaza piruvică a acidului glutamic), CPK (fosfocreatin Kinaza), LDH (lactat dehidrogenaza), MDH (malat dehidrogenaza). Activitățile acestor enzime interesează diagnosticul diferențial al distrofiilor musculare progresive. În cazul particular al distrofiei musculare progresive Duchenne, creșterile activităților sunt semnificative. În distrofia musculară progresivă Duchenne, activitățile enzimatiche cele mai ridicate sunt notate în primii ani de viață, ca o consecință a existenței stadiilor preclinice ("tăcute") de evoluție, urmate de o descreștere mai mult sau mai puțin monotonă.

Tabel 5.3. – Variația activităților enzimatiche, serice, funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofiei musculare progresive Duchenne

VÂRSTA Ani 1	ALD mu/ml 2	FCK UI/L 3	LDH UI/L 4	CHE UI/L 5	TGO UI/L 6	TGP UI/L 7	K 8	HBDH UI/L 9
3	Nr.	2	2	2	2	2	2	2
	X.	11.25	2308.5	1498.0	3932.5	115.00	216.50	52.49
	D.S.	9.546	992.07	562.86	378.3	49.50	184.56	0.663
4	Nr.	2	2	2	2	2	2	2
	X.	2.585	45.000	192.0	5697.7	121.84	172.93	35.40
	D.S.	0.799	0.00	0.00	3255.9	158.17	233.24	16.70
5	Nr.	2	2	2	2	2	2	2
	X.	15.24	1628.5	1437.2	1999.8	153.66	167.97	51.68
	D.S.	9.252	924.19	813.71	1159.1	101.05	130.17	10.17
6	Nr.	5	5	5	5	5	5	5
	X.	7.573	535.00	912.53	6211.2	63.57	96.984	35.58
	D.S.	7.078	560.46	838.45	3686.0	76.45	127.06	18.33
7	Nr.	6	6	6	6	6	6	5
	X.	7.633	2321.5	1698.1	2965.0	215.16	179.52	53.28
	D.S.	1.73	1132.7	681.87	654.59	140.21	73.89	4.66
8	Nr.	11	11	11	11	11	11	11
	X.	5.75	1700.7	1031.7	7370.9	127.15	123.15	47.76
	D.S.	1.267	883.64	506.03	5966.0	122.66	98.16	7.256
9	Nr.	18	18	18	18	18	18	18
	X.	9.153	2509.9	952.42	6500.9	132.23	136.45	51.32
	D.S.	2.35	1051.7	402.42	3411.5	86.62	74.30	4.62
10	Nr.	10	10	10	10	10	10	10
	X.	4.83	3294.0	1032.3	4170.0	89.22	111.00	49.30
	D.S.	1.26	195.62	90.75	548.51	14.83	17.20	1.277

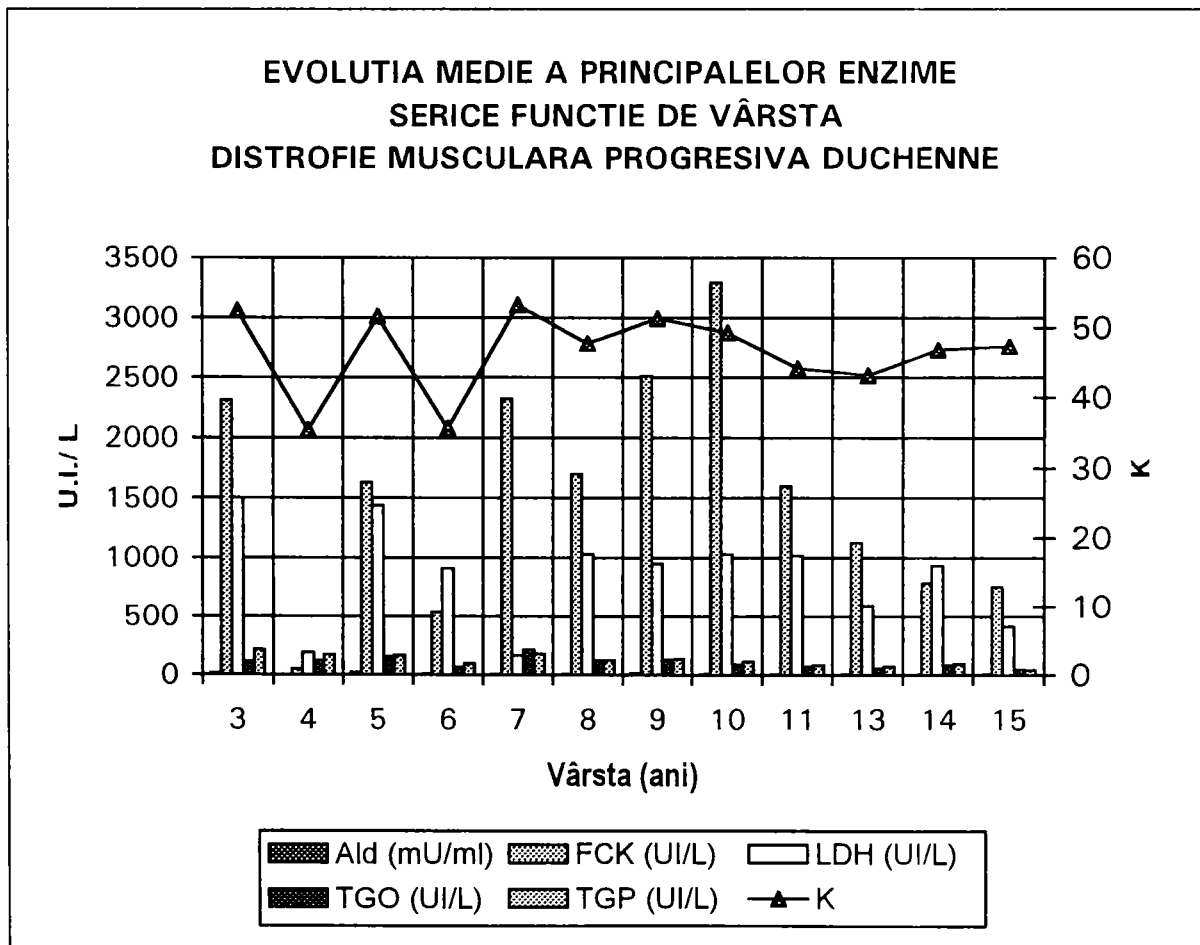
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
11	Nr.	10	10	10	10	10	10	10	9
	X.	3.935	1603.5	1016.0	2632.5	70.20	83.88	44.14	914.00
	D.S.	0.929	1003.1	462.79	173.24	33.03	45.64	6.51	432.31
13	Nr.	6	6	6	6	6	6	6	6
	X.	4.386	1126.4	586.38	4846.5	50.68	73.57	43.15	420.36
	D.S.	0.637	442.54	180.13	982.52	15.306	41.52	3.65	138.87
14	Nr.	3	3	3	3	3	3	3	3
	X.	7.65	785.8	934.53	6401.3	81.667	96.03	46.88	526.37
	D.S.	0.007	0.009	0.004	120.03	35.80	58.18	3.43	25.370
15	Nr.	2	2	2	2	2	2	2	2
	X.	4.050	758.05	418.29	3540.8	45.815	43.480	37.82	331.45
	D.S.	1.273	55.225	196.99	2091.9	50.65	50.176	11.21	45.120

Notă :

X.	VALOARE MEDIE	CHE	COLINESTERAZĂ
NR.	NUMĂR DE CAZURI	TGO	TANSAMINAZĂ OXALACETICĂ
D.S.	DEVIATIE MEDIE STANDARD	TGP	TRANSAMINAZĂ PIRUVICĂ
ALD	1,6 ALDOLAZĂ	K	FACTOR DE CORELAȚIE
FCK	FOSFOCRATIN KINAZĂ	HBDH	α -HIDROXIBUTIRAT DEHIDROGENAZĂ

Fig. 5-17.

Evoluția medie a principalelor enzime serice la pacienți afectați de Distrofie musculară progresivă Duchenne.



Tabel 5.4. – Variația parametrilor biochimici, serici, funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofiei musculare progresive Duchenne

VÂRSTA ANI		CHO MMOL/L	TRI MMOL/L	FLP MMOL/L	HDL-C MMOL/L	LDL-C MMOL/L	UA μMOL/L	CRE μMOL/L	BIT μMOL/L
3	Nr.	2	2	2	2	2	2	2	2
	X.	4.72	1.276	3.13	0.777	1.166	248.71	145.8	22.153
	D.S.	0.025	0.187	0.29	0.003	0.015	10.45	10.25	3.45
4	Nr.	2	2	2	2	2	2	2	2
	X.	6.43	1.496	3.560	1.11	4.95	255.45	130.33	23.458
	D.S.	0.35	0.499	0.78	0.25	1.150	12.45	12.375	3.125
5	Nr.	5	5	5	5	5	5	5	5
	X.	4.593	1.143	2.895	0.627	2.908	270.45	100.1	23.440
	D.S.	0.25	0.20	0.045	0.06	0.976	11.14	2.69	1.195
6	Nr.	5	5	5	5	5	5	5	5
	X.	4.593	1.145	2.895	0.627	2.908	295.75	98.85	21.34
	D.S.	0.034	0.022	0.04	0.025	0.009	12.14	9.144	2.083
7	Nr.	6	6	6	6	6	6	6	6
	X.	4.484	1.173	2.829	0.557	2.9414	333.20	97.85	19.405
	D.S.	0.268	0.072	0.163	0.171	0.0082	25.786	8.451	1.102
8	Nr.	11	11	11	11	11	11	11	11
	X.	3.955	1.145	2.6104	0.758	2.79	276.70	56.53	19.45
	D.S.	0.49	0.148	0.124	0.192	0.522	60.526	5.69	3.191
9	Nr.	18	18	18	18	18	18	18	18
	X.	3.91	1.181	2.772	0.791	2.882	281.53	55.75	18.562
	D.S.	0.229	0.217	0.003	0.07	0.243	31.69	7.33	2.051
10	Nr.	10	10	10	10	10	10	10	10
	X.	4.35	1.127	2.748	0.588	3.207	213.65	97.78	20.44
	D.S.	0.629	0.372	0.218	0.009	0.567	43.559	2.373	2.952
11	Nr.	10	10	10	10	10	10	10	10
	X.	4.009	1.105	2.822	0.7502	2.693	289.94	81.22	21.873
	D.S.	0.148	0.121	0.394	0.0032	0.228	94.65	4.934	2.145
13	Nr.	6	6	6	6	6	6	6	6
	X.	4.07	1.096	2.782	0.833	2.373	376.50	84.05	19.305
	D.S.	0.176	0.1156	0.002	0.004	0.005	38.72	6.433	6.371
14	Nr.	3	3	3	3	3	3	3	3
	X.	3.697	1.042	2.782	1.012	2.276	327.79	83.12	10.610
	D.S.	0.04	0.175	0.005	0.229	0.224	58.2	5.68	3.972
15	Nr.	2	2	2	2	2	2	2	2
	X.	3.328	0.786	2.351	0.8412	2.215	355.28	85.45	13.439
	D.S.	1.227	0.164	0.61	0.13	0.897	31.05	6.44	4.45

Notă :

CHO COLESTEROL SERIC
 TRI. TRIACILGLICEROLI
 FLP. FOSFOLIPIDE
 HDL-C COLESTEROL DIN HDL

LDL-C COLESTEROL DIN LDL
 UA ACID URIC
 CRE CREATININĂ
 BIT BILIRUBINĂ TOTALĂ

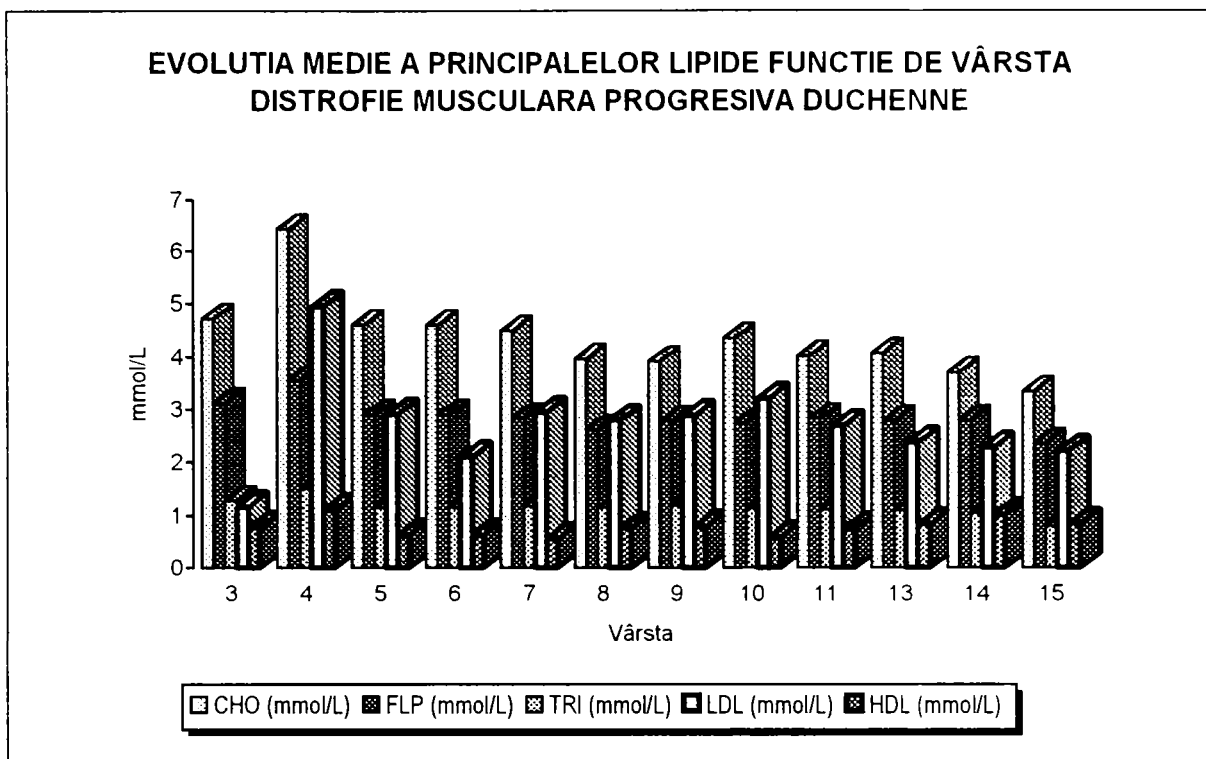


Fig. 5-18.

Evoluția valorilor medii a principalelor lipide plasmatice funcție de vârstă subiecților afectați de Distrofie Musculară Progresivă Duchenne

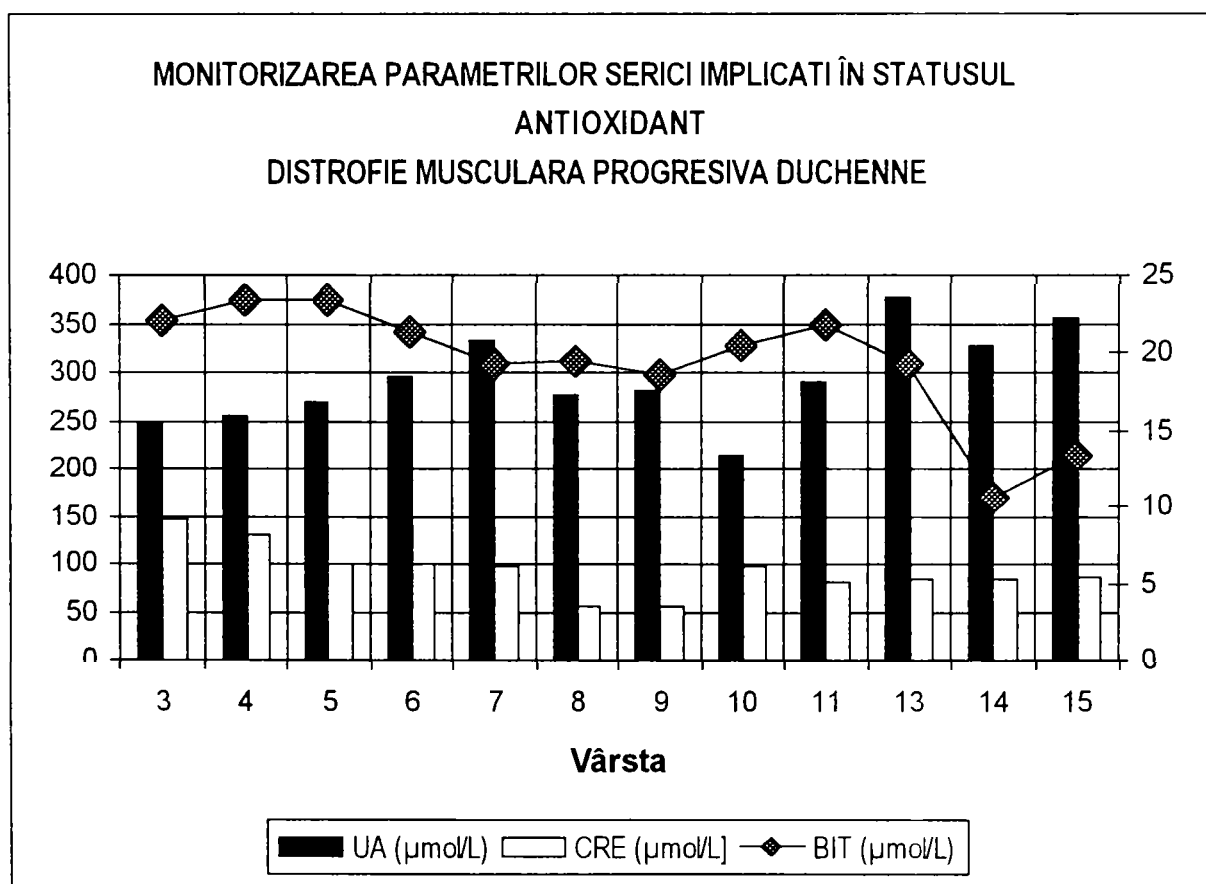


Fig.5-19.

Monitorizarea parametrilor serici implicați în statusul antioxidant la pacienții afectați de Distrofie Musculară Progresivă Duchenne.

Tabel 5.5. Variația activităților enzimice serice, funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofiei Musculare Progressive Becker-Kiener.

VÂRSTA ANI		ALD mu/ml	FCK UI/L	LDH UI/L	CHE UI/L	TGO UI/L	TGP UI/L	K	HBDH UI/L
16.3 ± 2.50	Nr.	10	10	10	10	10	10	10	10
	X.	5.016	1175.0	582.4	4082.1	72.67	78.43	42.77	308.85
	D.S.	2.387	249.03	380.5	812.23	78.16	81.74	7.37	221.78
23.92± 2.84	Nr.	13	13	13	13	13	13	13	13
	X.	3.83	960.50	447.7	5151.3	65.36	55.26	41.02	236.06
	D.S.	0.70	209.0	71.63	3003.7	49.49	30.84	7.12	48.61
37.13 ± 5.54	Nr.	23	23	23	23	23	23	23	23
	X.	3.89	965.54	444.5	4985.9	45.85	42.84	39.14	248.16
	D.S.	0.524	223.09	32.84	1860.7	32.59	31.15	6.25	24.60

De altfel nivelul activităților enzimice serice este dependent chiar și în stadiile clinic evidente manifeste, de progrediența afecțiunii, de severitatea procesului de distrucție musculară. În aceste condiții apare evidentă necesitatea titrării activităților enzimice atât în masa musculară cât și în ser.

Aldolaza (ALD) a fost multă vreme utilizată pentru determinarea paraclinică a stării de vectorare în distrofia musculară Duchenne și de centură. Modificarea activității fosfocreatinkinazei serice (CPK) a fost considerată caracteristică proceselor patobiocimice musculare. Activitatea enzimatică serică și eliberarea ei din celula musculară este controlată de starea de repaos sau de efort a țesutului muscular. La început s-a considerat activitățile enzimice crescute în distrofiile musculare ca fiind o stare patognomonică acestor afecțiuni. Analiza ulterioară a demonstrat că un mare număr de afecțiuni miogene prezintă această caracteristică, (ca de exemplu: scleroza amiotrofică laterală, atrofia musculară spinală și neurală, poliomielitele, poliradiculitele, polineuropatiile, lupusul eritematos, etc.) gradul de severitate evolutivă fiind reflectat fidel de evoluția tabloului enzimatic. Fapt de altfel ilustrat și de datele prezentate de noi în tabelele alăturate.

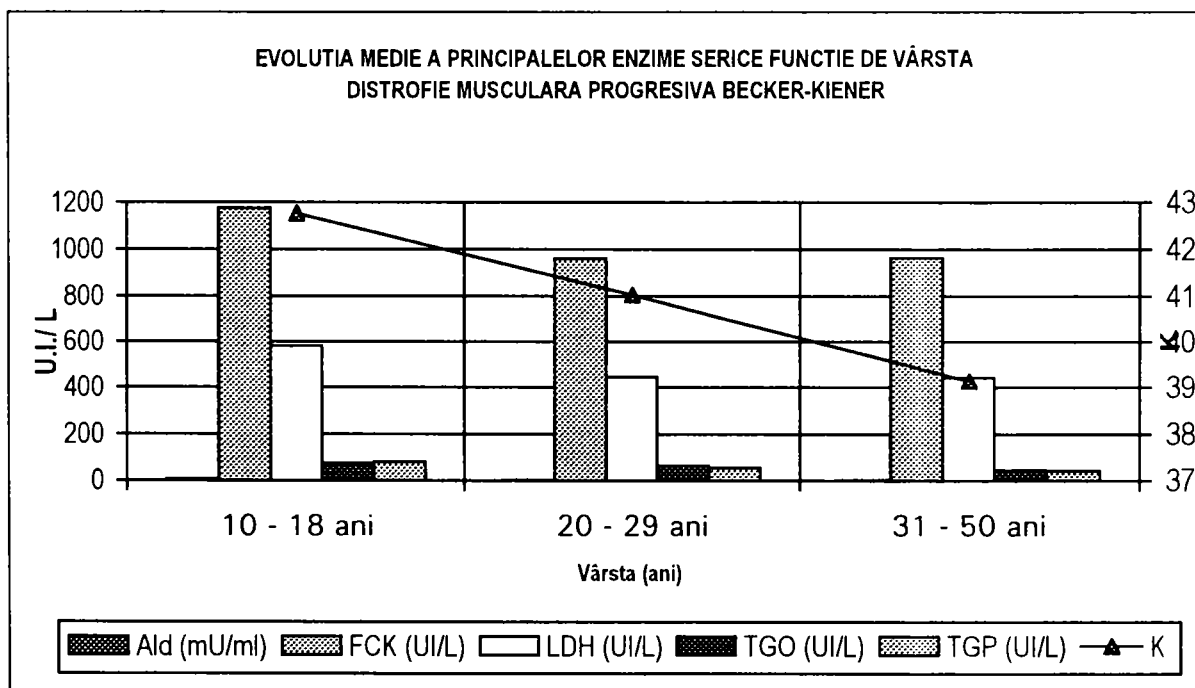


Fig. 5-20.
Evoluția medie a principalelor enzime serice la pacienți afectați de Distrofie Musculară Progresivă Becker-Kiener

Tabel 5.6. Variația parametrilor biochimici, serici, funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofie Musculară Progresivă Becker-Kiener

VÂRSTA ANI		CHO MMOL/L	TRI MMOL/L	FLP MMOL/L	HDL-C MMOL/L	LDL-C MMOL/L	UA μ MOL/L	CRE μ MOL/L	BIT μ MOL/L
16.3	Nr.	10	10	10	10	10	10	10	10
\pm	X.	4.41	0.90	2.81	1.008	3.206	230.3	98.80	11.25
2.50	D.S.	0.78	0.21	0.36	0.16	0.58	29.33	1.03	0.35
23.92	Nr.	13	13	13	13	13	13	13	13
\pm	X.	4.52	0.95	2.954	1.53	3.39	246.7	99.38	11.63
2.84	D.S.	0.47	0.09	0.036	1.89	0.31	25.72	0.90	2.99
37.13	Nr.	23	23	23	23	23	23	23	23
\pm	X.	4.78	1.04	3.06	1.40	3.50	239.6	99.13	11.13
5.54	D.S.	0.61	0.20	0.30	1.76	0.36	20.44	9.03	1.18

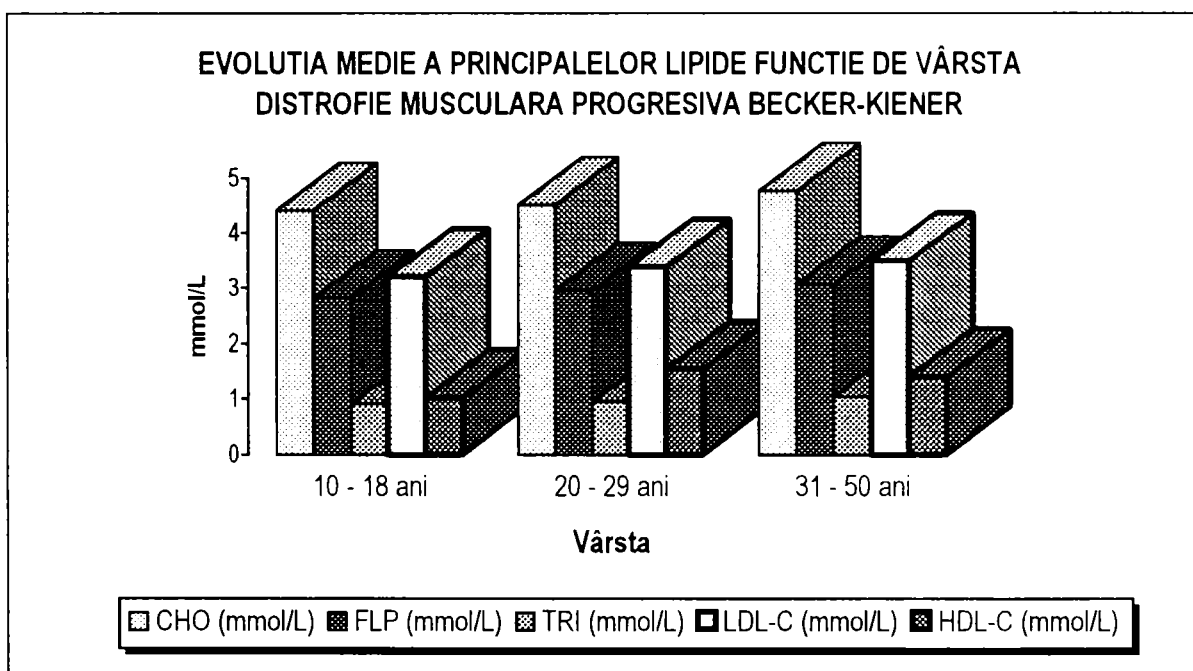


Fig. 5-21.

Evoluția valorilor medii a principalelor lipide plasmatică funcție de vârsta subiecților afectați de Distrofie Musculară Progresivă Becker-Kiener

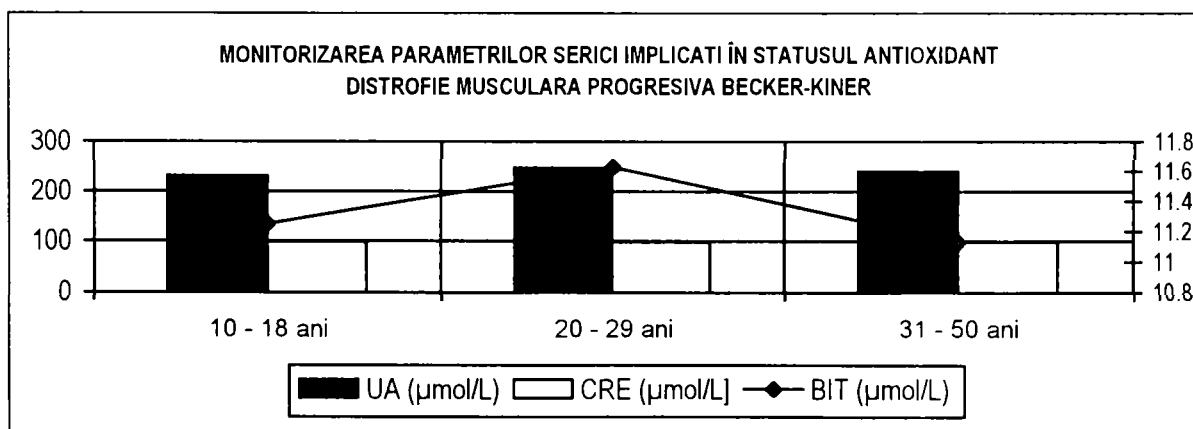


Fig.5-22.

Monitorizarea parametrilor serici implicați în statusul antioxidant la pacienții afectați de Distrofie Musculară Progresivă Becker-Kiener.

Tabel 5.7. Variația activităților enzimice serice, funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofiei Musculare Progressive de Centură, la pacienți de sex feminin.

VÂRSTA ANI		ALD mu/ml	FCK UI/L	LDH UI/L	CHE UI/L	TGO UI/L	TGP UI/L	K	HBDH UI/L
9.13 ± 3.05	Nr.	16	16	16	16	16	16	16	16
	X.	3.45	832.24	495.2	6073.7	31.63	26.05	36.19	299.52
	D.S.	1.43	467.54	95.00	2596.9	16.67	16.48	6.03	70.08
20.38 ± 3.38	Nr.	13	13	13	13	13	13	13	13
	X.	3.10	769.04	448.0	5342.7	39.92	35.60	34.96	292.36
	D.S.	0.37	391.82	109.2	1809.6	36.69	34.17	9.43	76.47
39.00 ± 6.83	Nr.	32	32	32	32	32	32	32	32
	X.	3.15	820.02	489.8	5802.3	29.12	23.32	35.88	322.76
	D.S.	0.46	209.93	75.36	2252.3	13.91	11.82	4.83	42.98

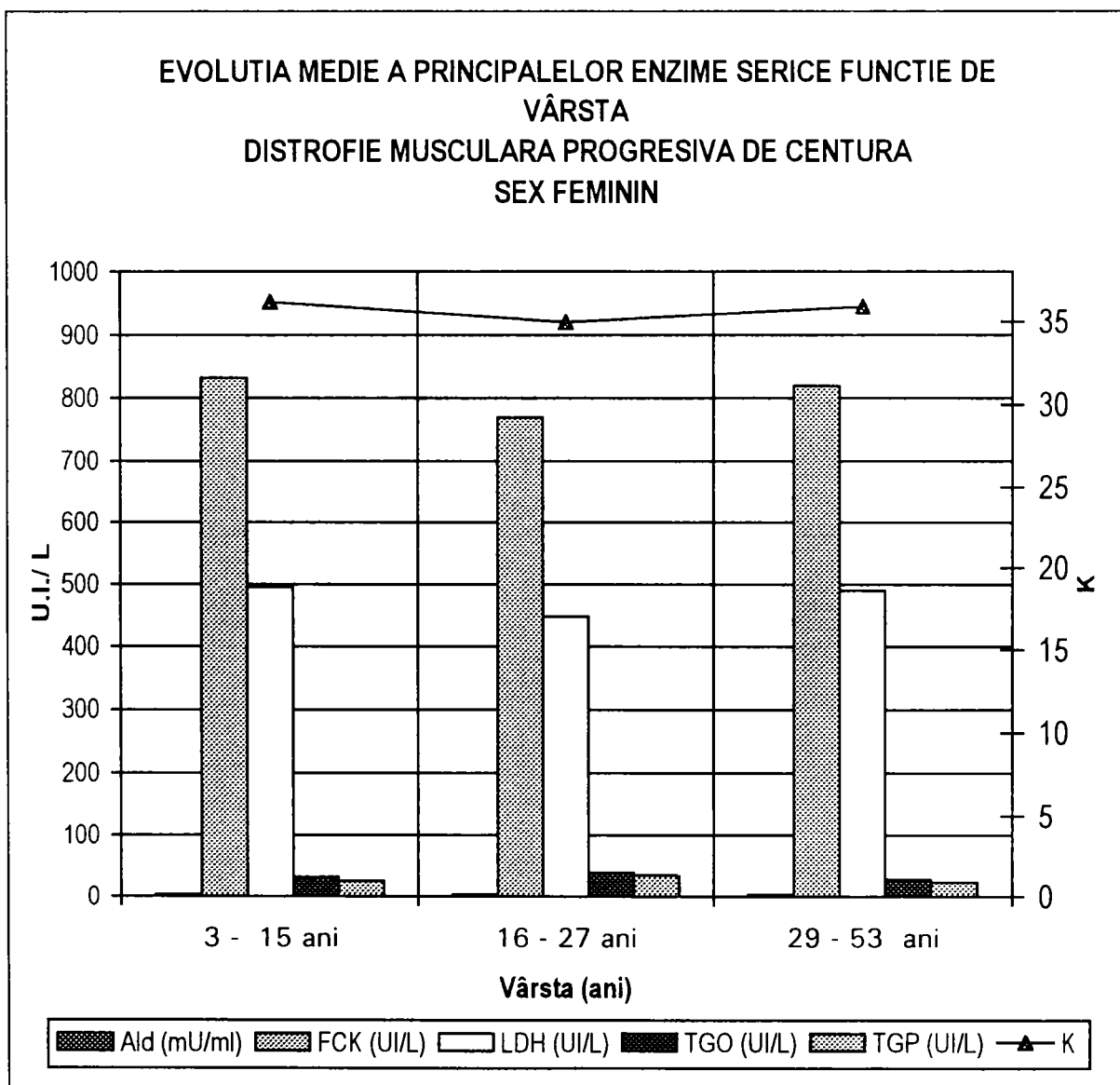


Fig. 5-23.

Evoluția medie a principalelor enzime serice la pacienți afectați de Distrofie Musculară Progresivă de Centură. Sex feminin.

Tabel 5.8. – Variația parametrilor biochimici, serici, funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofie Musculară Progresivă de Centură. Sex feminin.

VÂRSTA ANI		CHO MMOL/L	TRI MMOL/L	FLP MMOL/L	HDL-C MMOL/L	LDL-C MMOL/L	UA μMOL/L	CRE μMOL/L	BIT μMOL/L
9.13 ± 3.05	Nr.	16	16	16	16	16	16	16	16
	X.	3.97	0.955	2.48	0.85	2.82	351.9	128.4	13.49
	D.S.	0.39	0.06	0.15	0.19	0.28	18.02	0.09	1.95
20.38 ± 3.38	Nr.	13	13	13	13	13	13	13	13
	X.	4.12	0.93	2.53	0.98	2.86	349.7	126.5	13.30
	D.S.	0.06	0.004	0.05	0.24	0.15	26.77	7.005	1.08
39.00 ± 6.83	Nr.	32	32	32	32	32	32	32	32
	X.	4.17	1.00	2.55	0.92	2.96	348.7	130.1	12.76
	D.S.	0.30	0.08	1.10	0.08	0.30	27.40	22.37	0.94

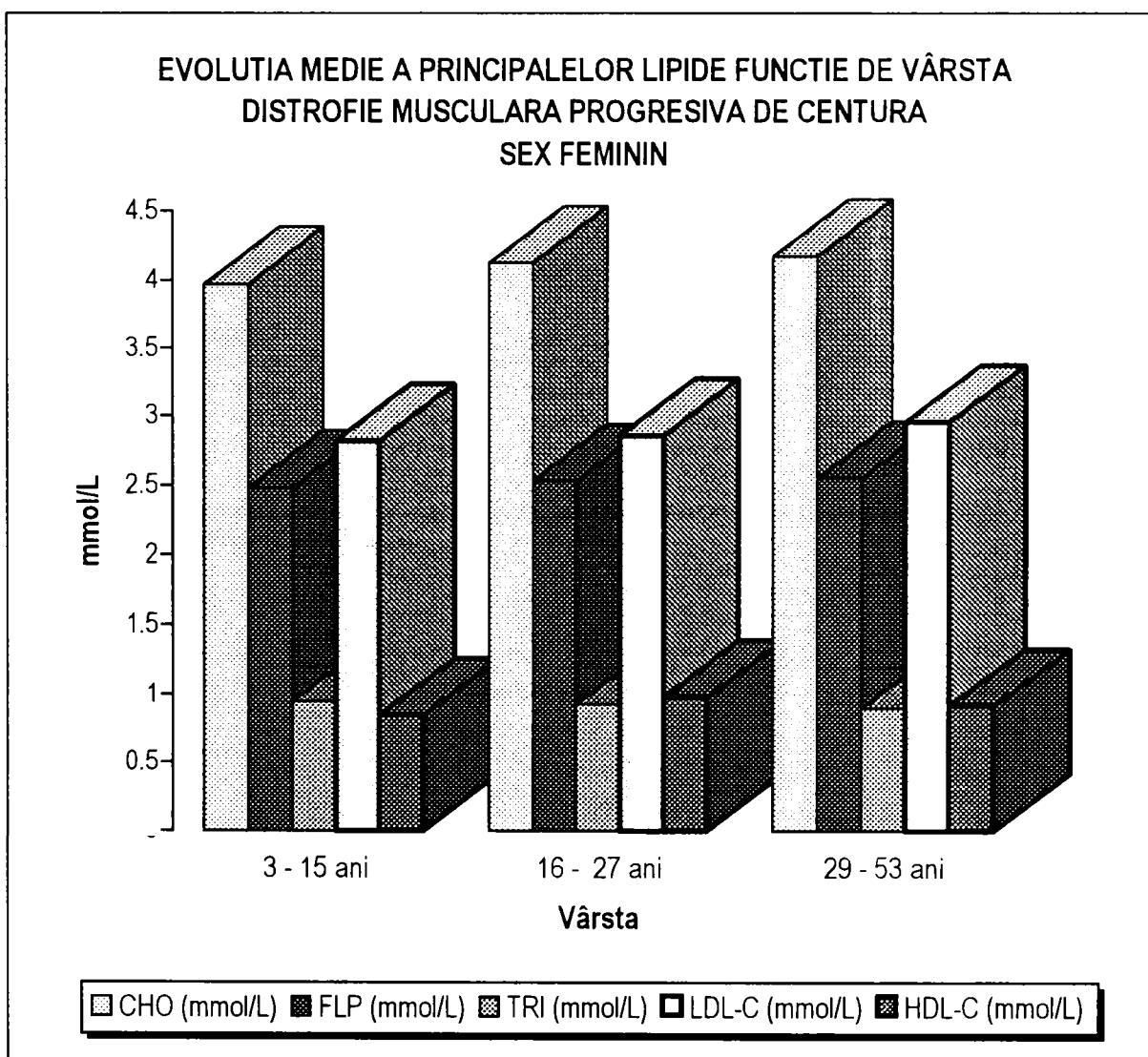


Fig. 5-24.

Evoluția valorilor medii a principalelor lipide plasmatice funcție de vârsta subiecților afectați de Distrofie Musculară Progresivă de Centură. Sex feminin.

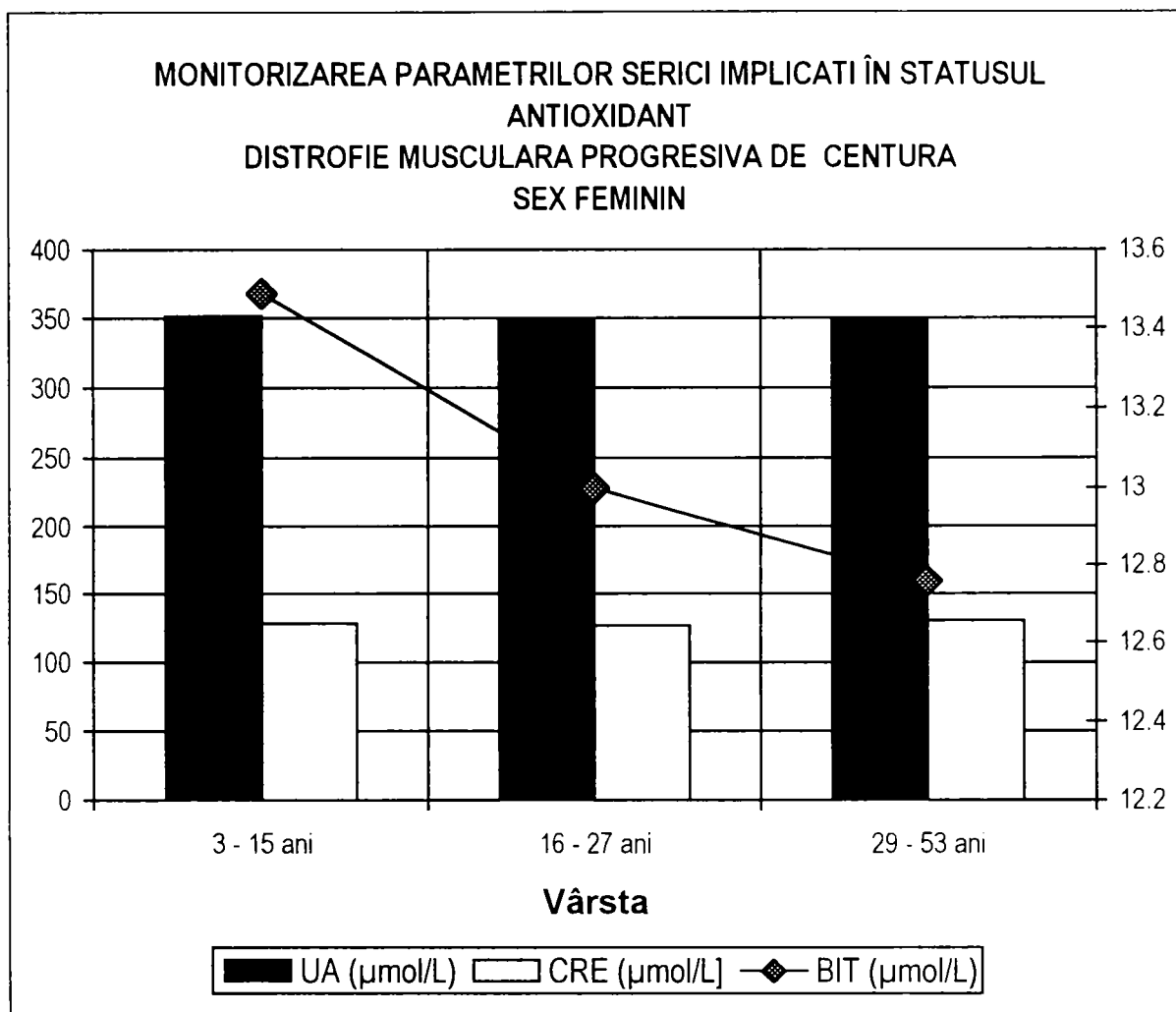


Fig.5-25.

Monitorizarea parametrilor serici implicați în statusul antioxidant la pacienții afectați de Distrofie Musculară Progresivă de Centură. Sex feminin.

Tabel 5.9. – Variația activităților enzimice serice funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofie Musculară Progresivă de Centură. Sex masculin.

VÂRSTA ANI		ALD mu/ml	FCK UI/L	LDH UI/L	CHE UI/L	TGO UI/L	TGP UI/L	K	HBDH UI/L
10.21 ± 3.61	Nr.	19	19	19	19	19	19	19	19
	X.	3.15	772.49	493.1	6700	43.21	38.33	34.87	274.26
	D.S.	1.40	672.20	252.3	2261	52.00	50.12	9.56	117.9
21.57 ± 2.99	Nr.	21	21	21	21	21	21	21	21
	X.	3.82	981.16	552.7	4761.8	81.21	71.39	42.81	375.35
	D.S.	1.78	601.6	178.0	1564.2	54.66	45.95	6.079	150.58
37.29 ± 6.57	Nr.	21	21	21	21	21	21	21	21
	X.	3.20	845.38	490.1	5820.2	33.82	29.58	37.56	321.86
	D.S.	0.33	90.75	47.24	1918.3	16.92	14.85	3.57	43.61
57.39 ± 5.49	Nr.	18	18	18	18	18	18	18	18
	X.	3.15	824.36	487.6	4995.6	43.62	42.15	38.90	327.82
	D.S.	0.56	61.10	36.31	1648.0	34.83	31.31	3.85	16.07

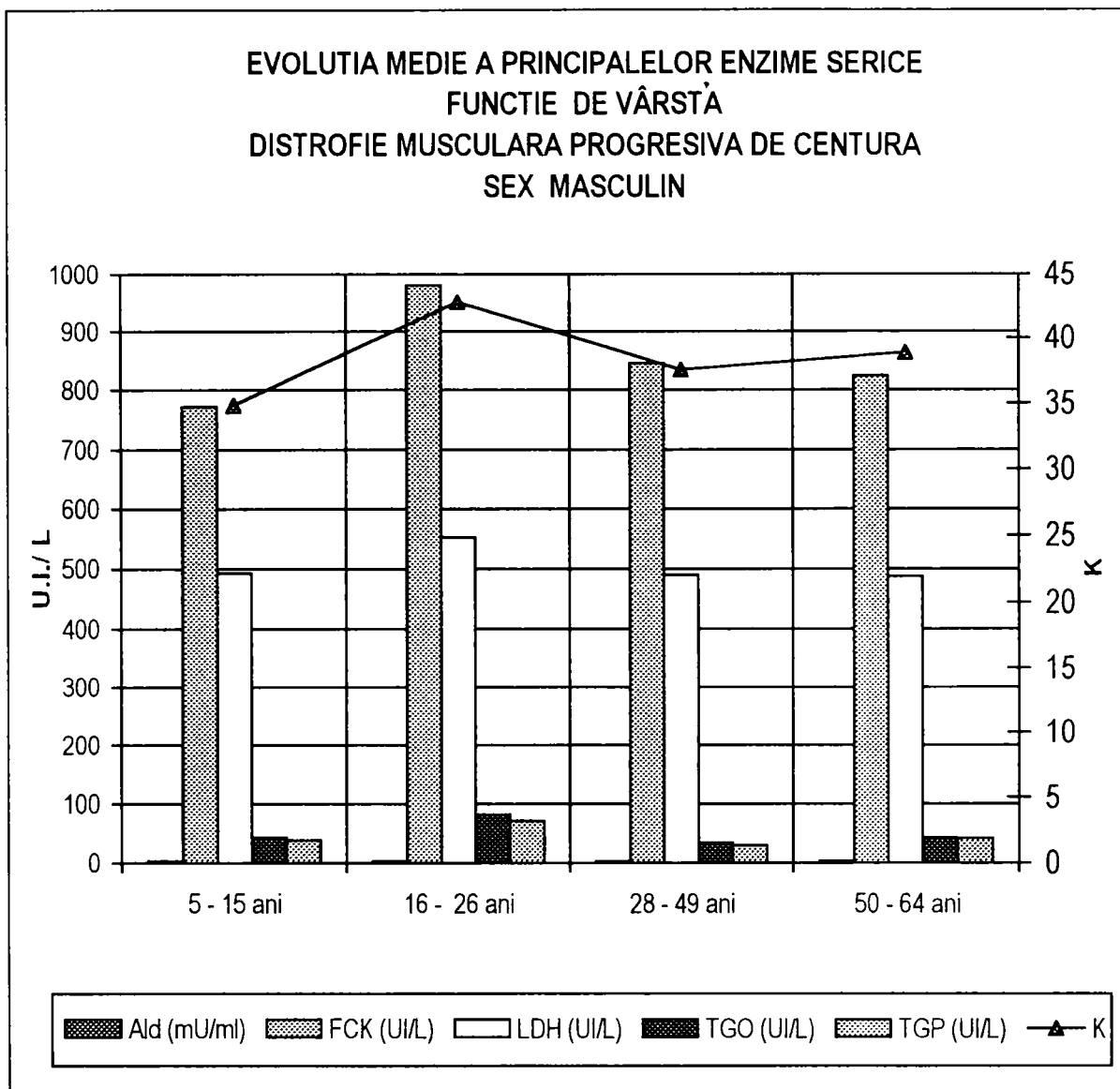


Fig. 5-26.

Evoluția medie a principalelor enzime serice la pacienți afectați de Distrofie Musculară Progresivă de Centură. Sex masculin.

Tabel 5.10.

Variația parametrilor biochimici, serici, funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofie Musculară Progresivă de Centură. Sex masculin.

VÂRSTA ANI		CHO MMOL/L	TRI MMOL/L	FLP MMOL/L	HDL-C MMOL/L	LDL-C MMOL/L	UA μMOL/L	CRE μMOL/L	BIT μMOL/L
10.21	Nr.	19	19	19	19	19	19	19	19
±	X.	4.12	0.925	2.543	0.90	2.93	325.4	126.9	11.94
3.61	D.S.	0.075	0.006	0.048	0.085	0.125	55.89	6.57	2.53
21.57	Nr.	21	21	21	21	21	21	21	21
±	X.	4.01	0.89	2.53	1.00	2.80	341.5	130.7	13.06
2.99	D.S.	0.293	0.087	0.07	0.21	0.26	27.50	10.14	0.29
37.29	Nr.	21	21	21	21	21	21	21	21
±	X.	4.18	1.02	2.59	0.903	2.952	360.5	128.4	37.56
6.57	D.S.	0.251	0.446	0.236	0.24	0.333	51.63	10.76	3.57
57.39	Nr.	18	18	18	18	18	18	18	18
±	M.	4.08	0.894	2.48	0.86	2.91	354.2	125.9	13.34
5.49	D.S.	0.32	0.109	0.21	0.27	0.272	49.07	10.50	1.18

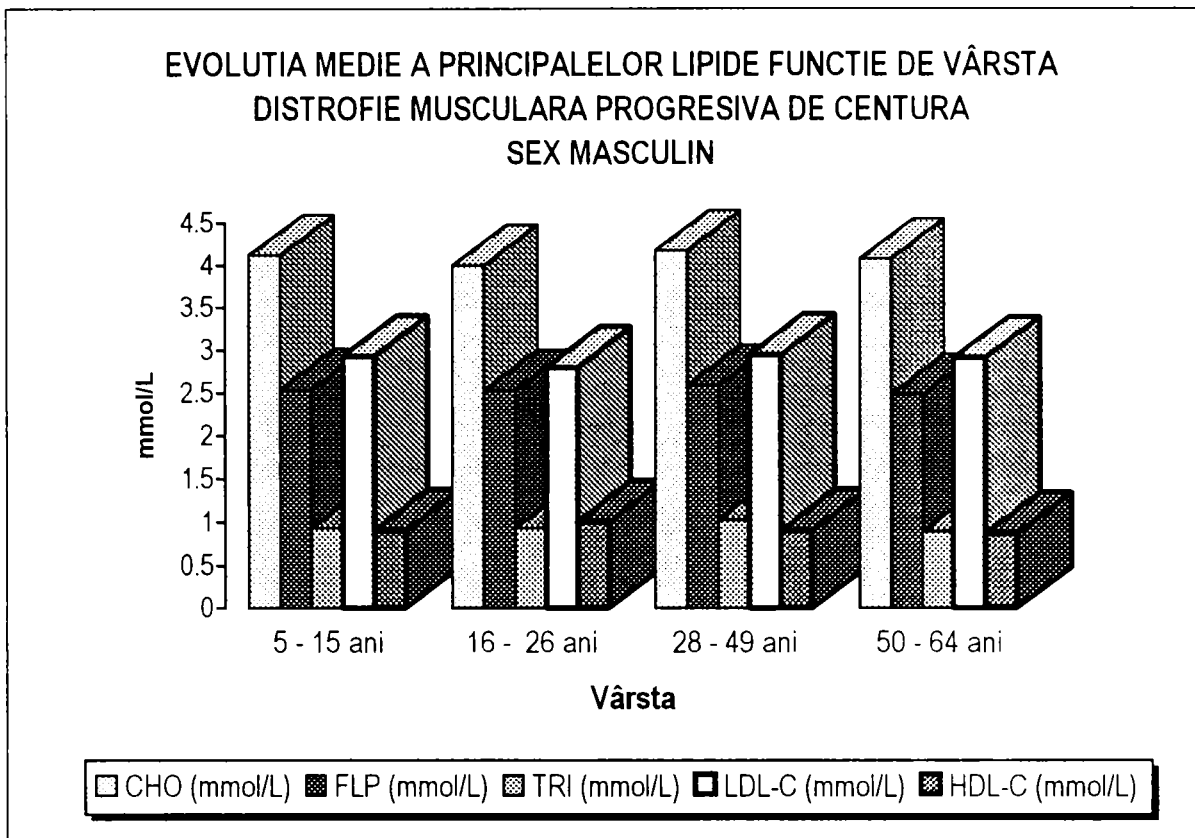


Fig. 5-27.

Evoluția valorilor medii a principalelor lipide plasmatiche funcție de vârstă subiecților afectați de Distrofie Musculară Progresivă de Centură. Sex masculin.

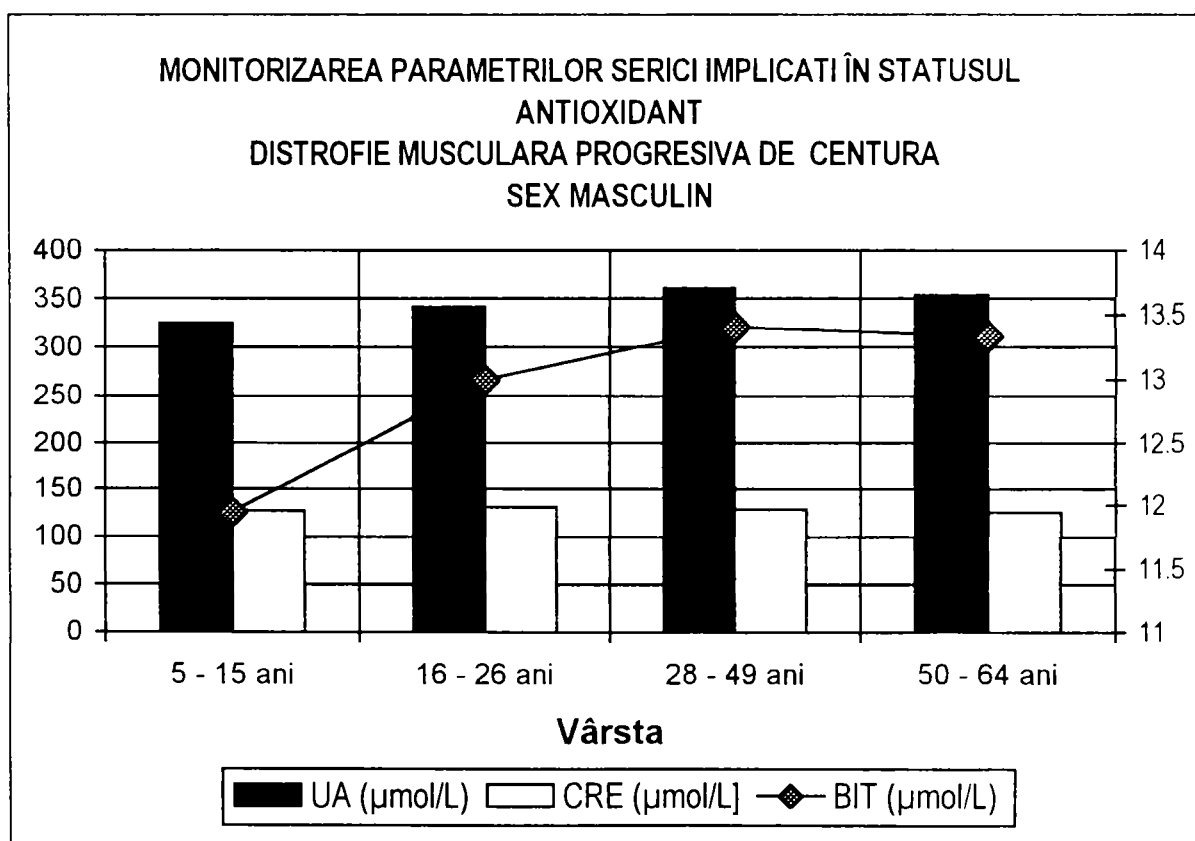


Fig.5-28.

Monitorizarea parametrilor serici implicați în statusul antioxidant la pacienții afectați de Distrofie Musculară Progresivă de Centură. Sex masculin.

Tabel 5.11.

Variația activităților enzimice serice funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex feminin.

VÂRSTA ANI		ALD mu/ml	FCK UI/L	LDH UI/L	CHE UI/L	TGO UI/L	TGP UI/L	K	HBDH UI/L
10.44	Nr.	9	9	9	9	9	9	9	9
±	X.	1.62	292.62	314.9	4362.8	21.57	15.88	27.53	162.0
5.17	D.S.	0.803	279.7	92.00	1469.8	11.11	7.57	7.27	74.53
29.12	Nr.	17	17	17	17	17	17	17	17
±	X.	1.965	208.99	202.2	4405.8	17.47	12.08	29.00	116.4
4.96	D.S.	1.195	129.77	104.2	502.84	8.63	6.08	3.79	15.61
48.00	Nr.	10	10	10	10	10	10	10	10
±	X.	1.12	139.7	261.5	5292	32.67	18.53	29.14	129.15
6.63	D.S.	0.42	10.25	23.18	1038.3	29.12	16.16	9.32	22.11

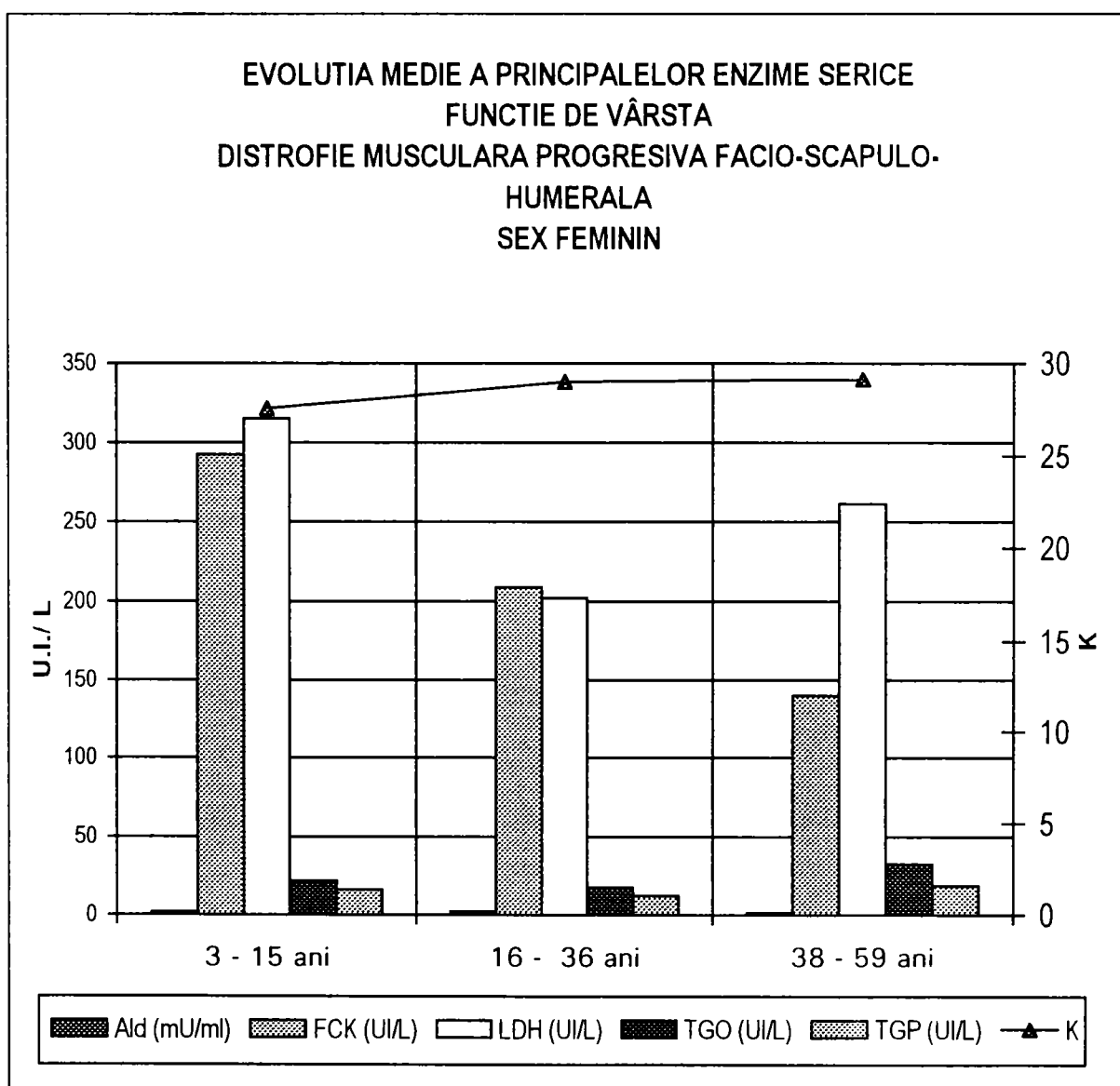


Fig. 5-29.

Evoluția medie a principalelor enzime serice la pacienți afectați de Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex feminin.

Tabel 5.12.

Variația parametrilor biochimici, serici, funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex feminin.

VÂRSTA ANI		CHO MMOL/L	TRI MMOL/L	FLP MMOL/L	HDL-C MMOL/L	LDL-C MMOL/L	UA μMOL/L	CRE μMOL/L	BIT μMOL/L
10.44	M.	3.070	0.862	2.442	0.730	2.086	315.2	108.7	27.53
±	Nr.	9	9	9	9	9	9	9	9
5.17	D.S.	0.190	0.312	0.073	0.28	0.409	93.07	12.74	7.27
29.12	M.	4.876	1.168	2.852	1.343	2.960	310.9	102.0	29.00
±	Nr.	17	17	17	17	17	17	17	17
4.96	D.S.	1.685	0.450	0.372	0.504	0.930	163.6	23.23	3.787
48.00	M.	1.333	1.363	3.446	1.444	4.300	330.1	100.5	17.28
±	Nr.	10	10	10	10	10	10	10	10
6.63	D.S.	0.494	0.329	0.845	0.630	1.700	52.14	9.77	4.22

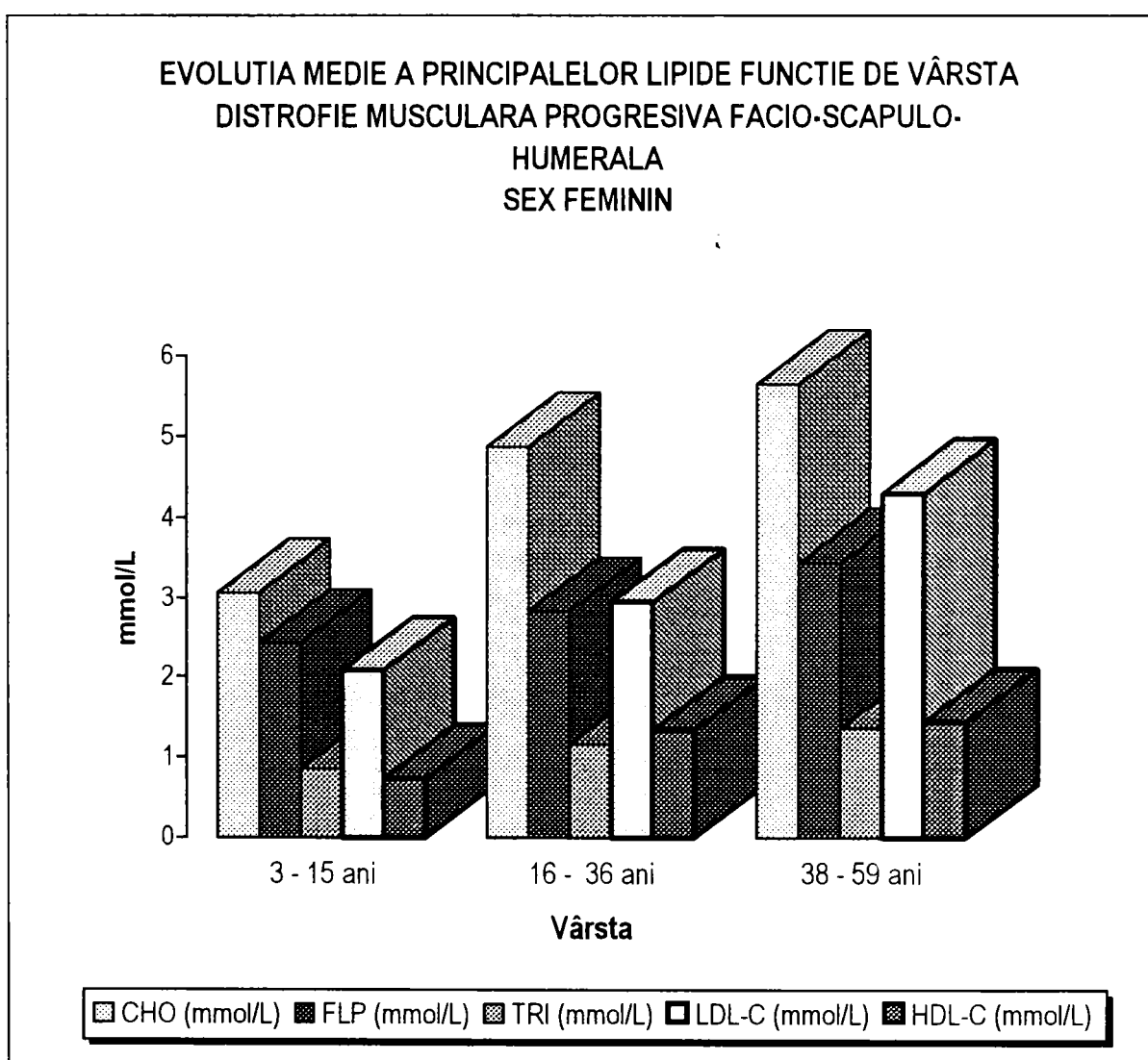


Fig. 5-30.

Evoluția valorilor medii a principalelor lipide plasmatice funcție de vârsta subiecților afectați de Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex feminin.

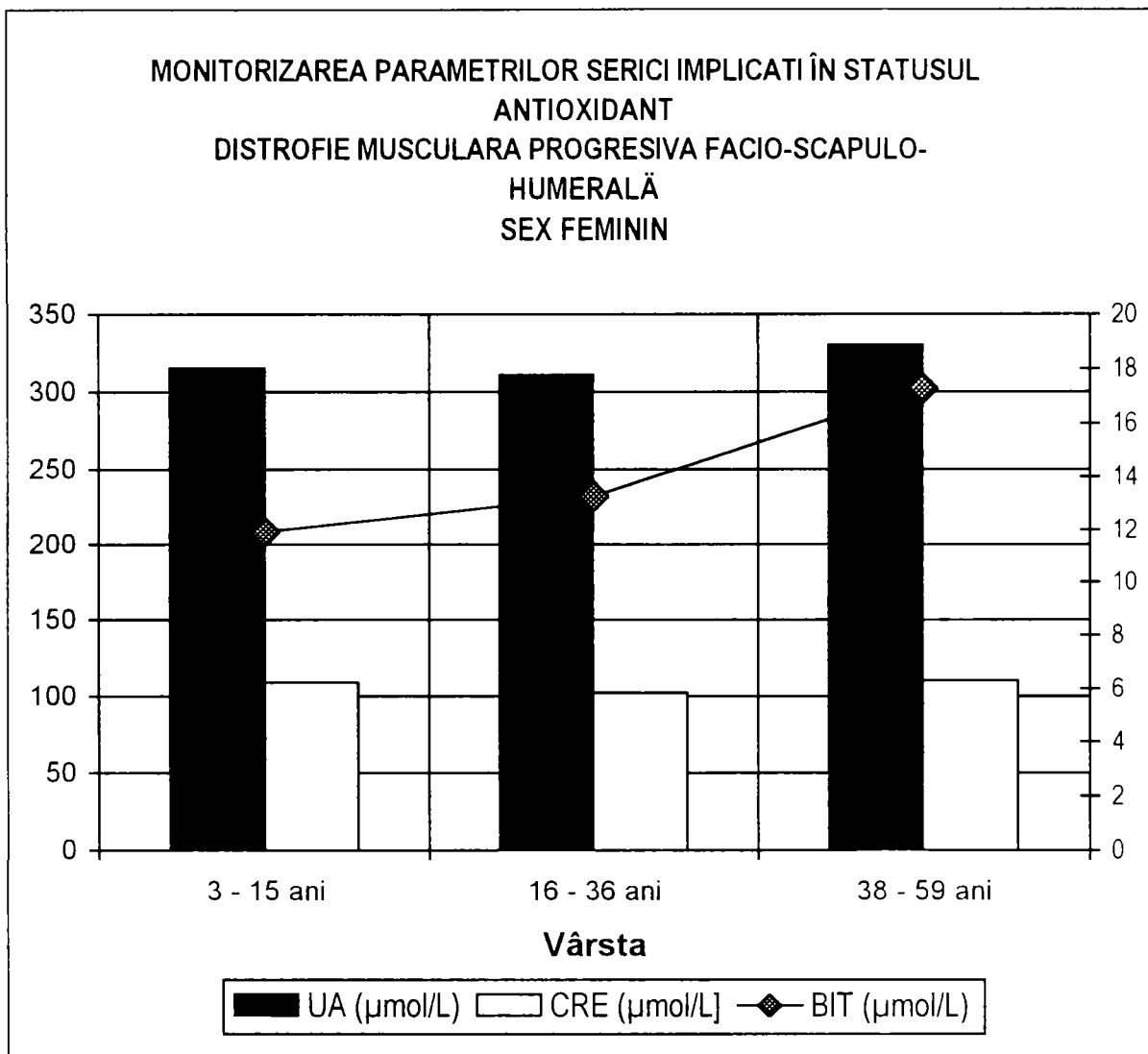


Fig. 5-31.

Monitorizarea parametrilor serici implicați în statusul antioxidant la pacienții afectați de Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex feminin.

Tabel 5.13.

Variația activităților enzimice serice funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex masculin.

VÂRSTA ANI		ALD mu/ml	FCK UI/L	LDH UI/L	CHE UI/L	TGO UI/L	TGP UI/L	K	HBDH UI/L
12.00	Nr.	11	11	11	11	11	11	11	11
±	X.	1.704	162.87	279.8	5315.3	20.00	12.73	21.57	218.7
2.93	D.S.	0.872	134.09	120.0	497.00	17.37	13.21	4.88	97.24
28.89	Nr.	18	18	18	18	18	18	18	18
±	X.	2.810	320.00	455.1	6380.0	36.09	29.32	37.02	195.00
5.17	D.S.	1.428	34.175	114.6	4848.1	20.49	15.23	3.68	15.27
52.16	Nr.	25	25	25	25	25	25	25	25
±	X.	1.740	251.23	421.3	7107.9	31.07	24.58	32.82	143.32
5.79	D.S.	0.990	211.34	208.6	7808.7	26.17	17.06	4.44	4.83

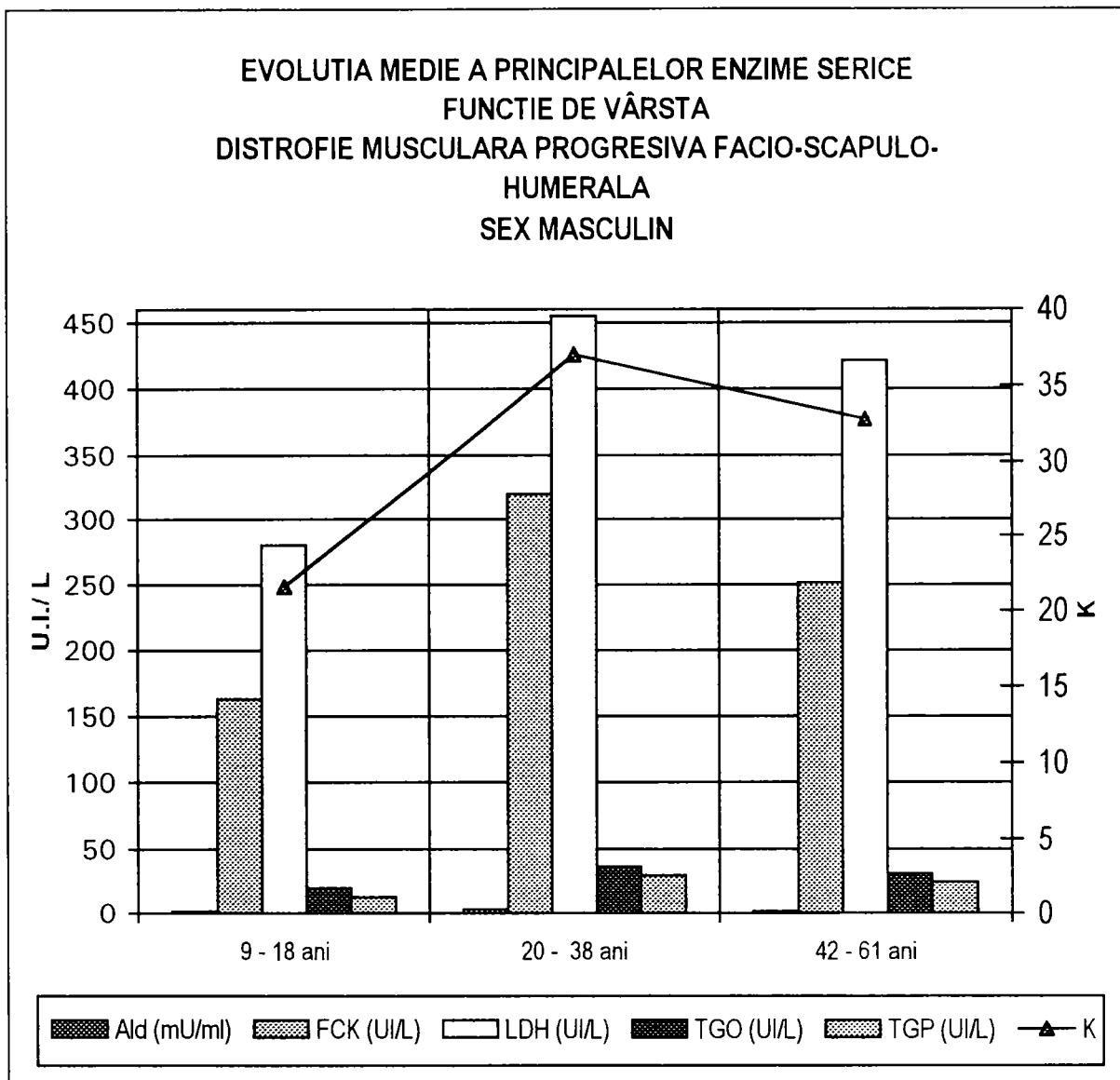


Fig. 5-32.

Evoluția medie a principalelor enzime serice la pacienți afectați de Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex masculin.

Tabel 5.14.

Variația parametrilor biochimici, serici, funcție de vârsta pacientului în cazul Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex masculin.

VÂRSTA ANI		CHO MMOL/L	TRI MMOL/L	FLP MMOL/L	HDL-C MMOL/L	LDL-C MMOL/L	UA μMOL/L	CRE μMOL/L	BIT μMOL/L
12.00	Nr.	11	11	11	11	11	11	11	11
±	X.	3.741	0.962	2.588	1.167	2.258	396.0	120.5	17.44
2.93	D.S.	7.070	0.477	0.383	0.326	0.872	90.40	25.78	10.25
28.89	Nr.	18	18	18	18	18	18	18	18
±	X.	4.184	1.632	2.821	1.012	2.115	216.7	190.8	17.577
5.17	D.S.	0.470	0.300	0.694	0.662	1.294	149.7	90.45	10.293
52.16	Nr.	25	25	25	25	25	25	25	25
±	x.	5.190	1.954	3.504	1.349	3.432	308.5	113.2	8.710
5.79	D.S.	1.063	1.377	1.010	1.393	0.916	52.19	82.14	7.985

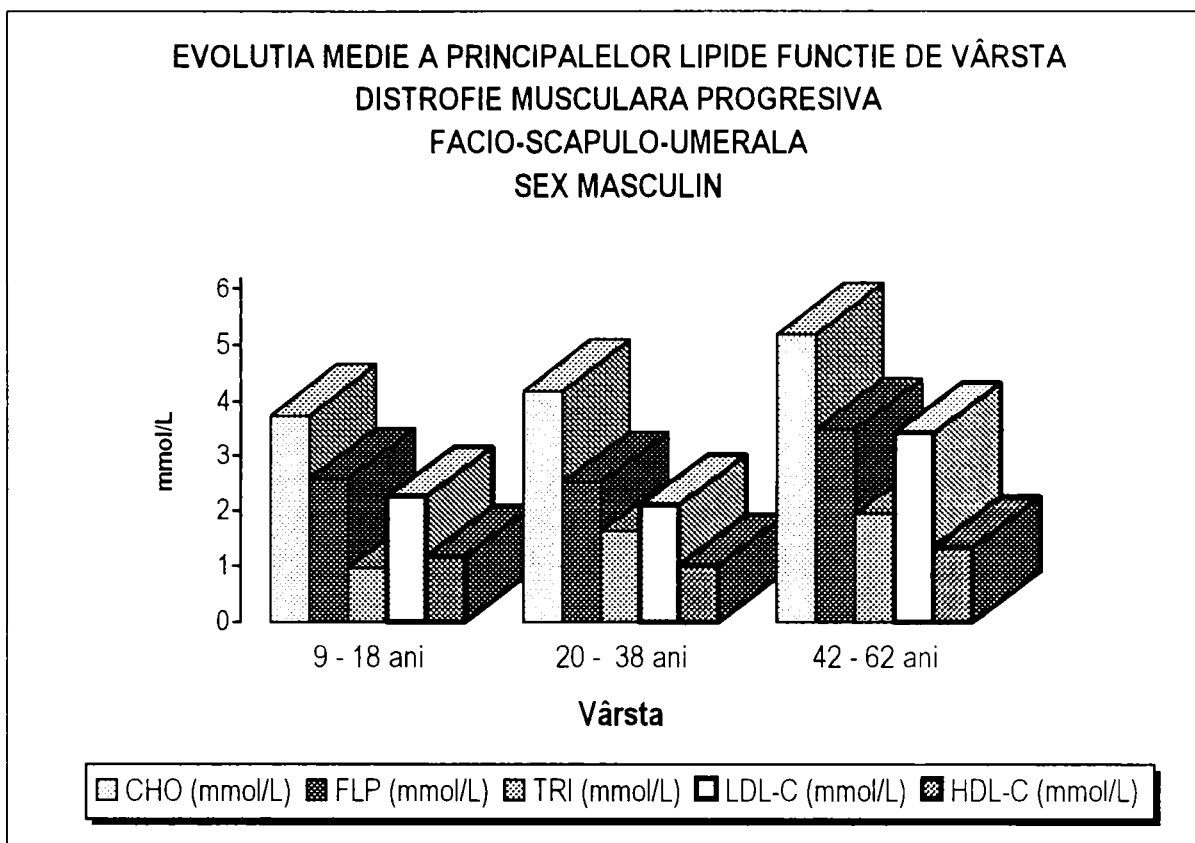


Fig. 5-33.

Evoluția valorilor medii a principalelor lipide plasmatică funcție de vârstă subiecților afectați de Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex masculin.

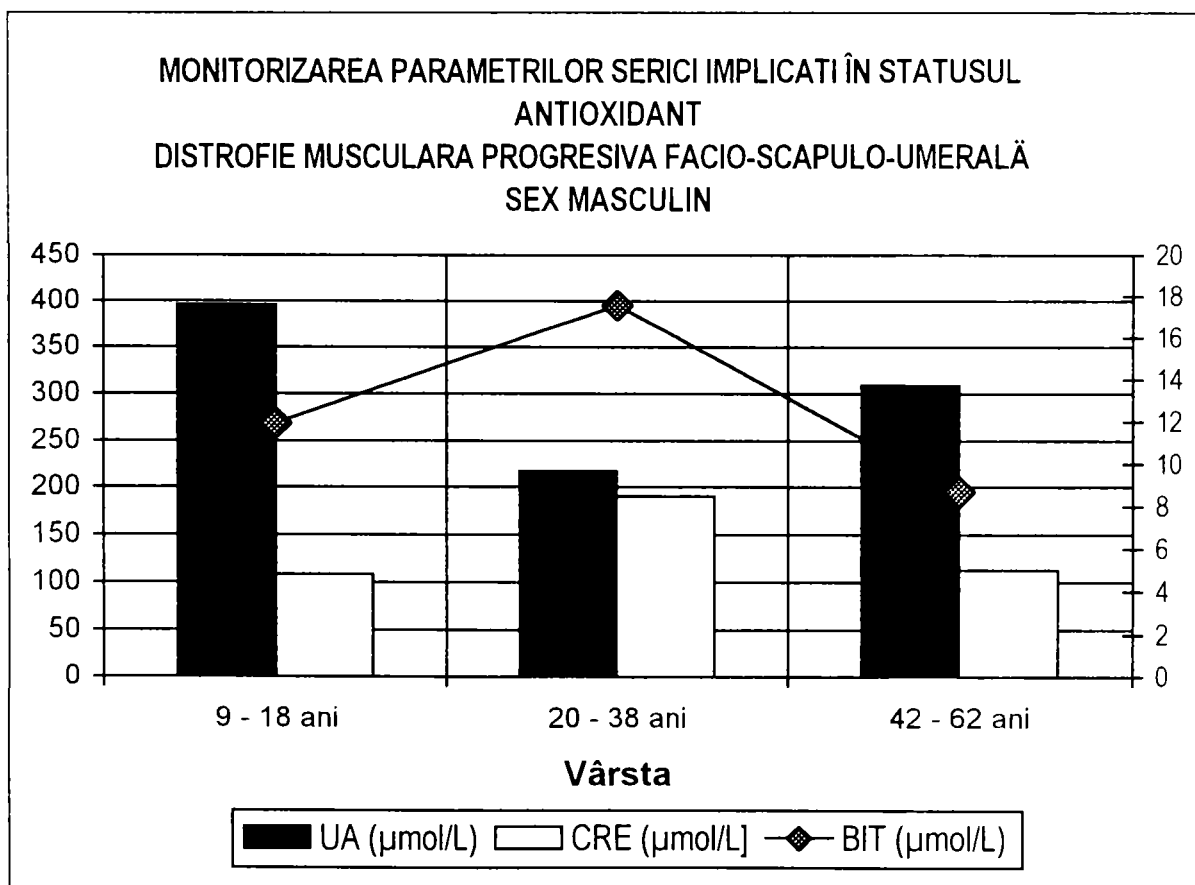


Fig. 5-34.

Monitorizarea parametrilor serici implicați în statusul antioxidant la pacienții afectați de Distrofie Musculară Progresivă Facio-Scapulo-Humerală. Sex masculin.

Tabel 5.15.

Variația activităților enzimice serice funcție de vârsta pacientului în cazul afecțiunii Charcot-Marie-Tooth.
Sex feminin.

VÂRSTA ANI		ALD mu/ml	FCK U/I/L	LDH U/I/L	CHE U/I/L	TGO U/I/L	TGP U/I/L	K	HBDH U/I/L
8.53	Nr.	15	15	15	15	15	15	15	15
±	X.	1.753	191.87	266.4	5964.7	18.87	13.10	24.65	140.94
3.64	D.S.	0.175	56.18	75.75	3035.0	13.92	10.07	9.07	15.19
21.15	Nr.	33	33	33	33	33	33	33	33
±	X.	1.711	228.38	228.4	6078.4	16.40	14.35	26.26	137.21
3.36	D.S.	0.188	92.07	44.76	2449.7	9.65	11.32	6.27	5.36
36.43	Nr.	56	56	56	56	56	56	56	56
±	X.	1.734	223.75	240.3	5736.5	17.73	14.26	16.04	137.01
6.52	D.S.	0.259	39.63	30.44	2455.4	9.82	9.63	5.33	20.55

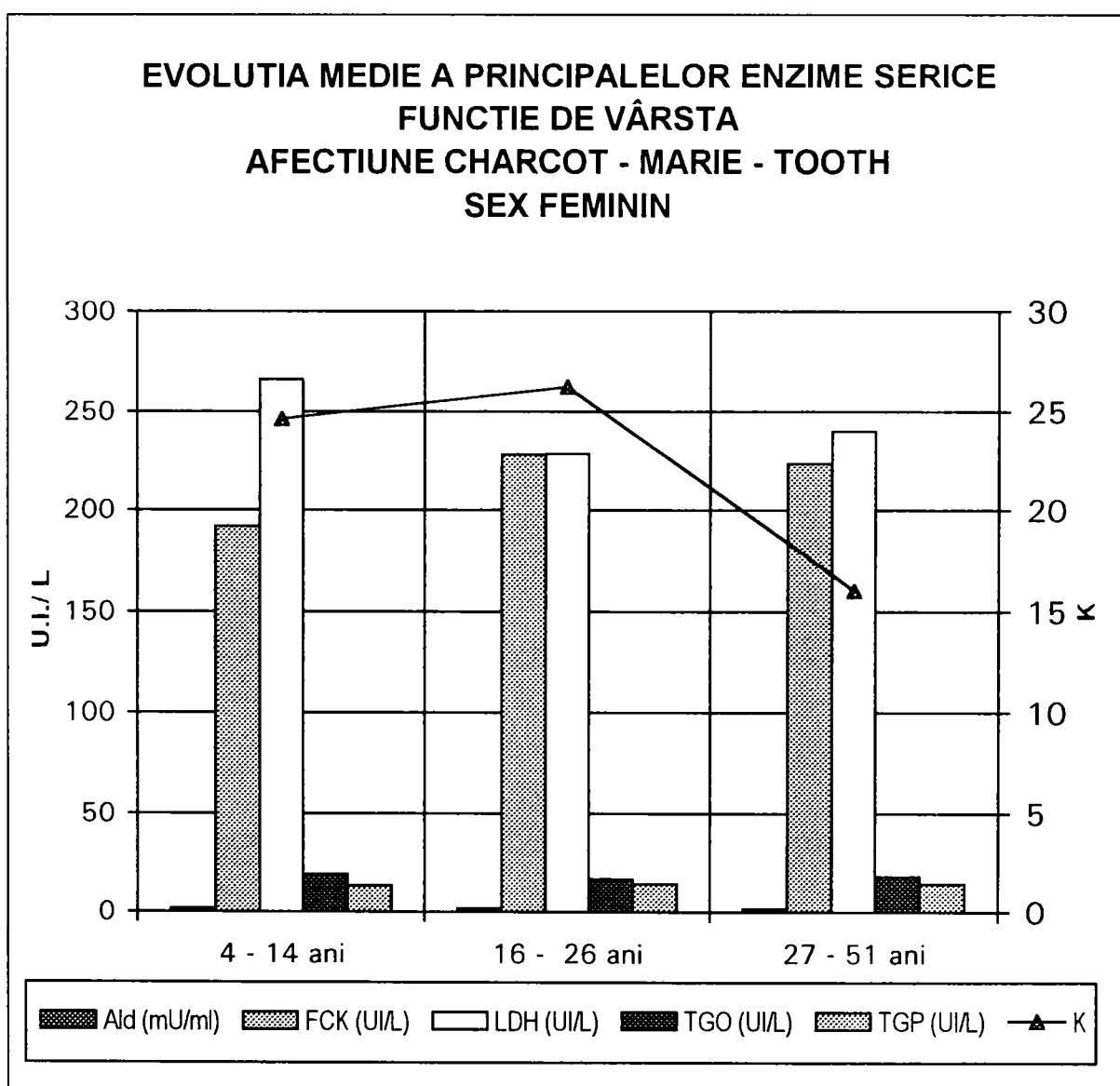


Fig. 5-35.

Evoluția medie a principalelor enzime serice la pacienți afectați de afecțiune Charcot-Marie-Tooth. Sex feminin.

Tabel 5.16.

Variația parametrilor biochimici, serici, funcție de vârsta pacientului în cazul afecțiunii Charcot-Marie-Tooth. Sex feminin.

VÂRSTA ANI		CHO MMOL/L	TRI MMOL/L	FLP MMOL/L	HDL-C MMOL/L	LDL-C MMOL/L	UA μ MOL/L	CRE μ MOL/L	BIT μ MOL/L
8.53	Nr.	15	15	15	15	15	15	15	15
±	X.	4.392	0.945	3.067	1.115	3.025	328.3	117.4	9.73
3.64	D.S.	0.494	0.285	0.339	0.314	0.482	31.77	5.046	0.163
21.15	Nr.	33	33	33	33	33	33	33	33
±	X.	4.254	0.8311	3.017	1.080	2.846	339.0	117.1	10.008
3.36	D.S.	0.903	0.3411	0.536	0.400	0.954	45.41	7.000	1.781
36.43	Nr.	56	56	56	56	56	56	56	56
±	X.	4.530	1.078	3.098	1.196	3.033	329.4	115.7	9.452
6.52	D.S.	0.936	0.456	0.590	1.312	0.721	39.97	13.95	1.628

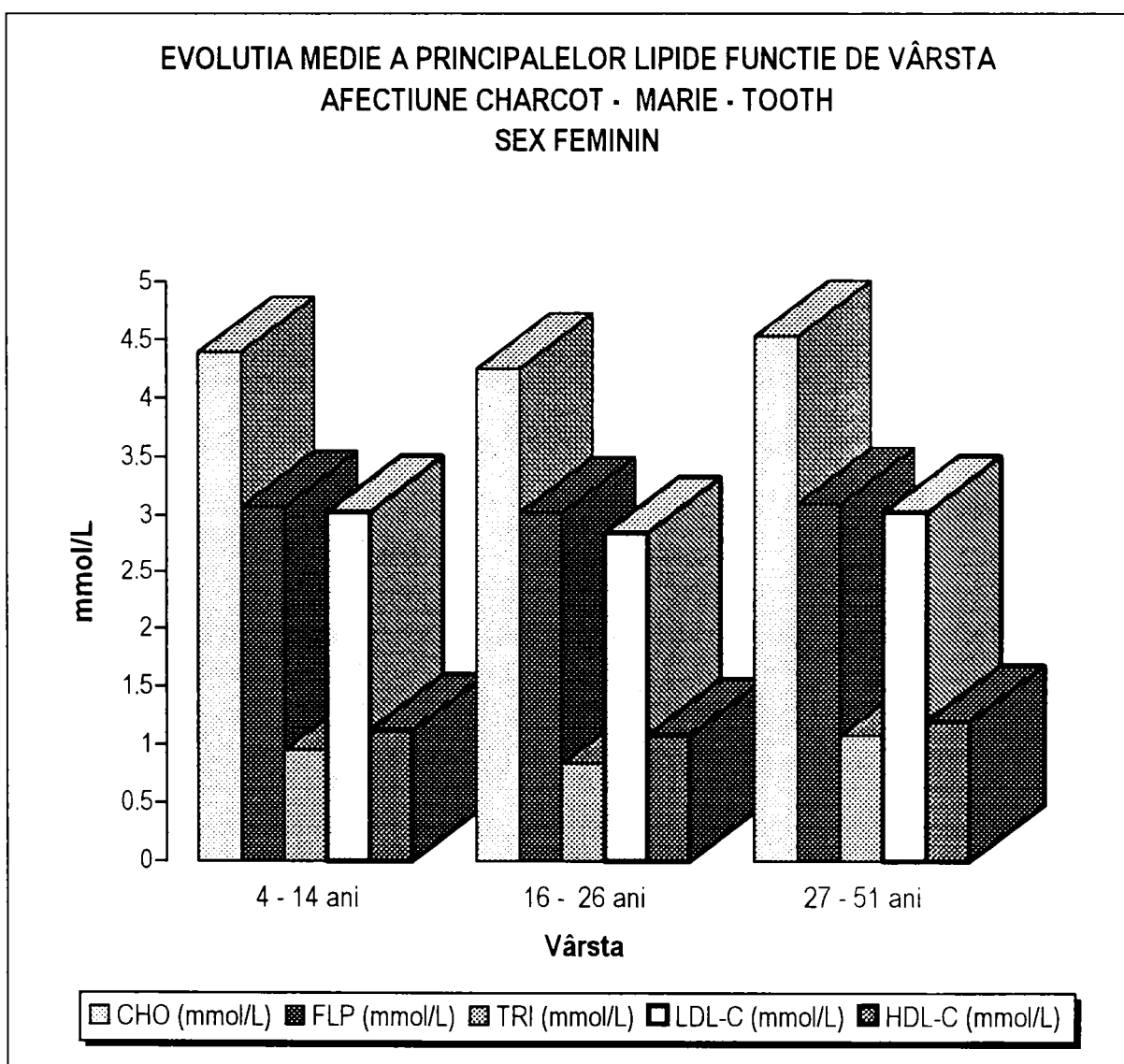


Fig. 5-36.

Evoluția valorilor medii a principalelor lipide plasmatice funcție de vârsta subiecților afectați de afecțiunea Charcot-Marie-Tooth. Sex feminin.

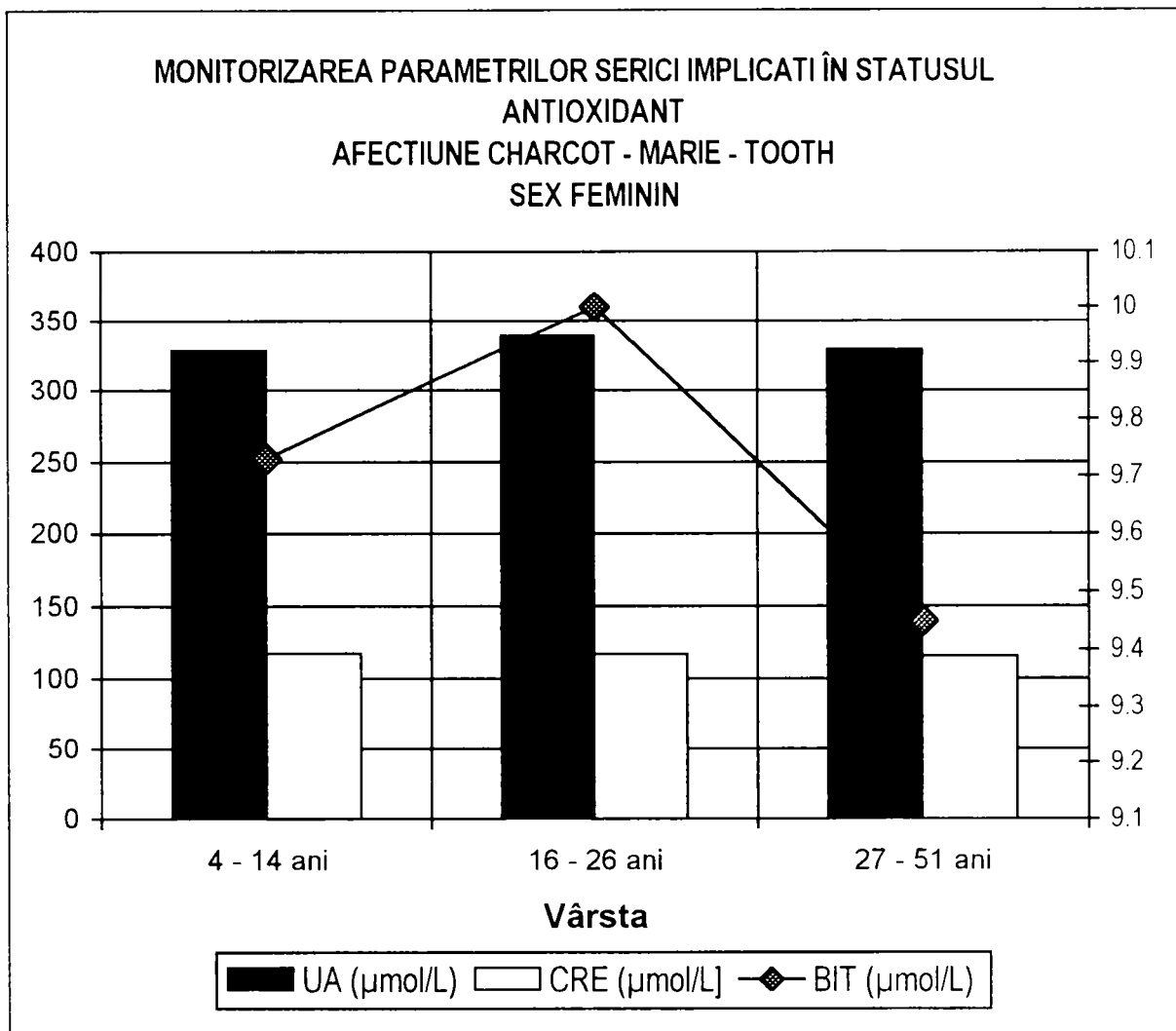


Fig. 5-37.

Monitorizarea parametrilor serici implicați în statusul antioxidant la pacienții afectați de afecțiunea Charcot-Marie-Tooth. Sex feminin.

Tabel 5.17.

Variația activităților enzimice serice funcție de vârsta pacientului în cazul afecțiunii Charcot-Marie-Tooth. Sex masculin.

VÂRSTA ANI		ALD mu/ml	FCK UI/L	LDH UI/L	CHE UI/L	TGO UI/L	TGP UI/L	K	HBDH UI/L
10.40	Nr.	10	10	10	10	10	10	10	10
±	X.	1.785	214.81	253.4	5420.7	25.53	23.70	32.48	133.21
3.44	D.S.	0.163	11.53	36.41	1713.4	18.09	21.86	3.45	12.03
22.00	Nr.	18	18	18	18	18	18	18	18
±	X.	1.762	220.82	232.0	6105.9	29.59	19.45	32.93	137.01
3.24	D.S.	0.121	10.03	41.68	2552.4	11.04	9.28	3.42	50.44
38.16	Nr.	51	51	51	51	51	51	51	51
±	X.	1.720	218.86	244.6	5282.0	23.06	18.12	30.02	135.76
6.47	D.S.	0.120	57.45	27.03	1208.7	10.54	8.75	3.44	8.97
68.00	Nr.	8	8	8	8	8	8	8	8
±	X.	1.40	150.45	215.2	6481.0	24.38	22.96	22.45	170.25
5.90	D.S.	0.22	10.15	15.45	1567.1	18.80	12.78	2.44	10.25

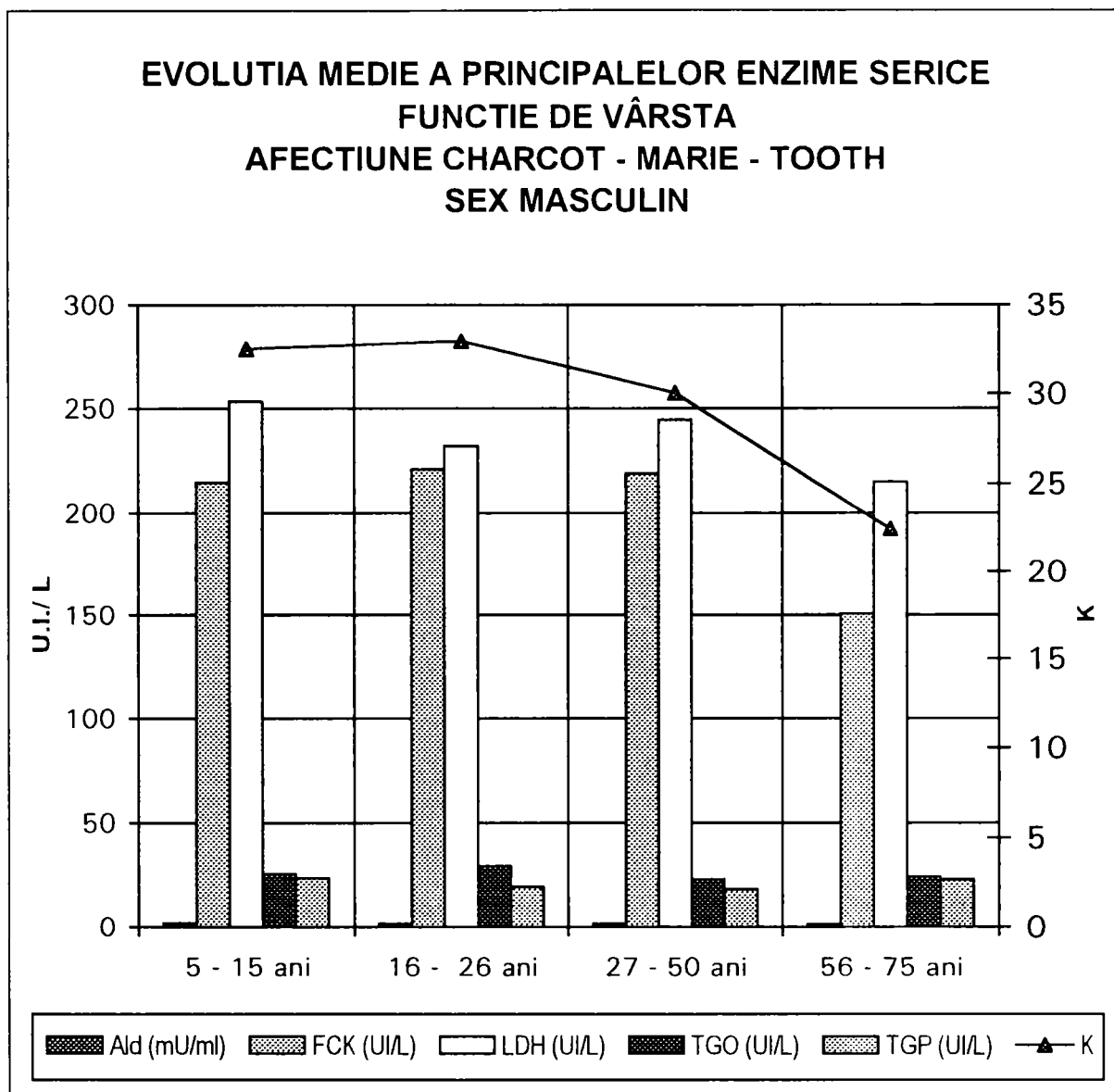


Fig. 5-38.

Evoluția medie a principalelor enzime serice la pacienți afectați de afecțiune Charcot-Marie-Tooth. Sex masculin.

Tabel 5.18.

Variația parametrilor biochimici, serici, funcție de vârsta pacientului în cazul afecțiunii Charcot-Marie-Tooth. Sex masculin.

VÂRSTA ANI		CHO MMOL/L	TRI MMOL/L	FLP MMOL/L	HDL-C MMOL/L	LDL-C MMOL/L	UA μ MOL/L	CRE μ MOL/L	BIT μ MOL/L
10.40	Nr.	10	10	10	10	10	10	10	10
\pm	X.	3.702	0.667	2.848	0.894	2.605	309.8	115.8	9.811
3.44	D.S.	0.518	0.286	0.336	0.323	0.556	78.00	8.92	0.133
22.00	Nr.	18	18	18	18	18	18	18	18
\pm	X.	4.312	0.885	2.764	0.808	3.161	337.1	114.9	9.770
3.24	D.S.	0.945	0.258	0.454	0.288	1.000	53.27	18.25	2.550
38.16	Nr.	51	51	51	51	51	51	51	51
\pm	X.	4.681	1.627	3.181	1.146	3.191	341.7	120.6	9.969
6.47	D.S.	1.142	1.072	0.598	1.117	0.928	50.88	10.42	1.160
68.00	Nr.	8	8		8	8	8	8	8
\pm	X.	5.028	1.020	3.508	1.068	3.553	320.5	147.9	9.770
5.90	D.S.	0.636	0.1622	0.799	0.691	0.927	41.42	43.13	4.442

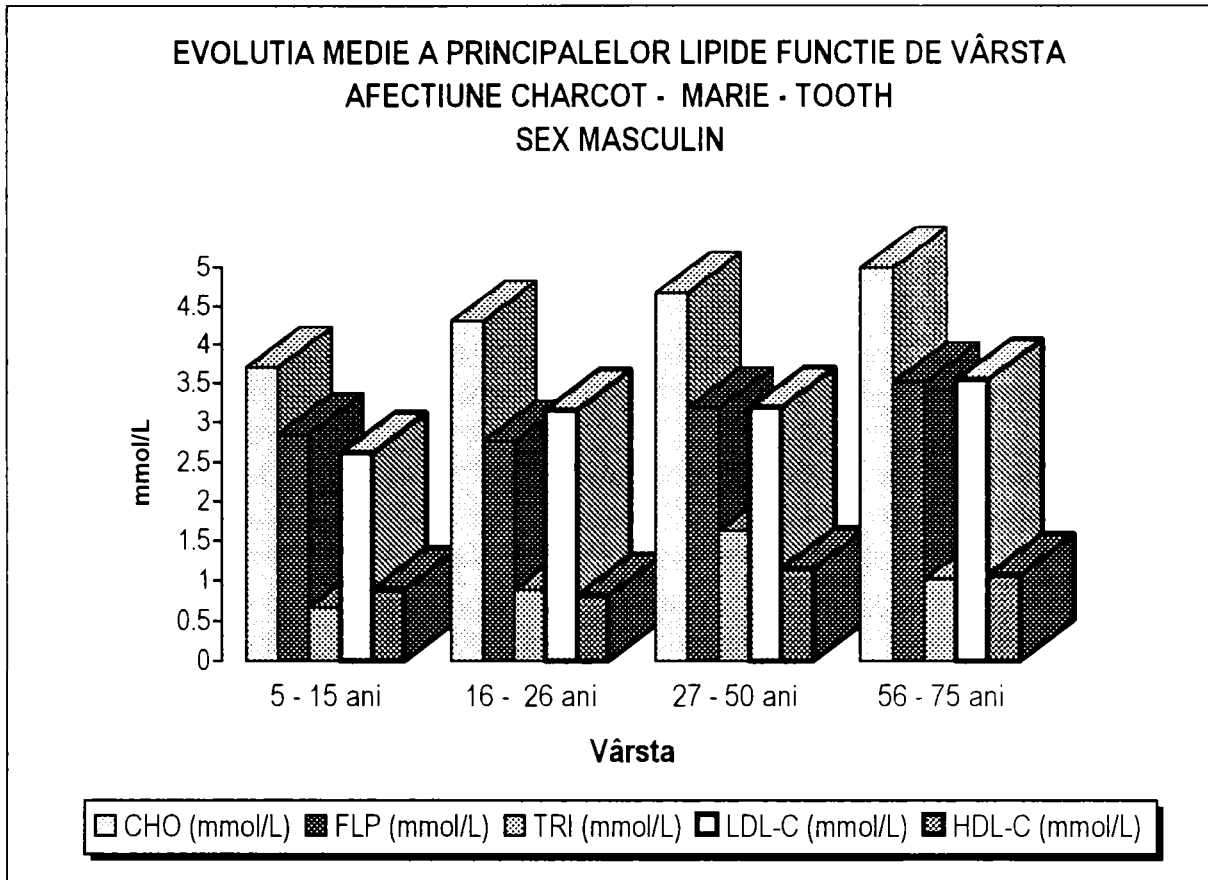


Fig. 5-39.
Evoluția valorilor medii a principalelor lipide plasmatice funcție de vârstă subiecților afectați de afecțiunea Charcot-Marie-Tooth. Sex masculin.

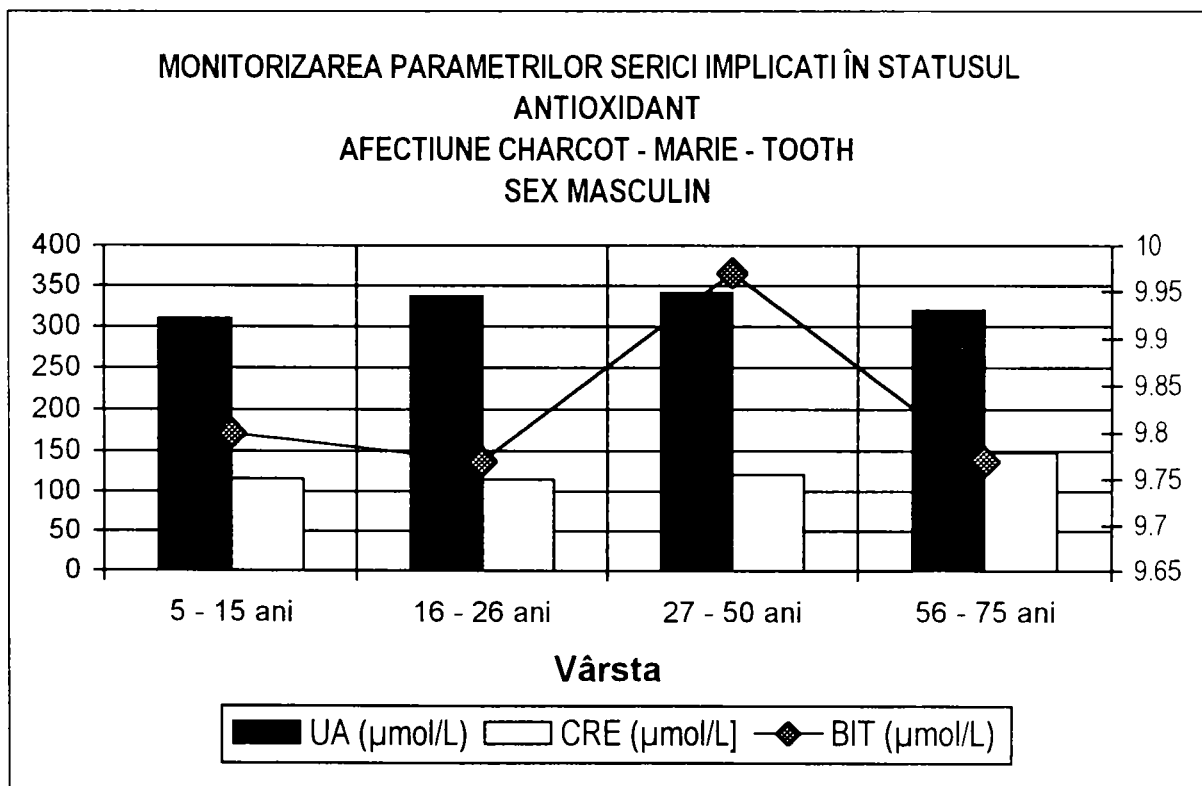


Fig. 5-40.
Monitorizarea parametrilor serici implicați în statusul antioxidant la pacienții afectați de afecțiunea Charcot-Marie-Tooth. Sex masculin.

Din rezultatele obținute pe serii mari de subiecți s-a concluzionat : atunci când nivelul CPK este de aproximativ de 10 ori mai mare decât media standard populațională, atunci existența unui proces neurogen este puțin probabilă. Din contra un nivel al CPK normal nu exclude un proces miogen. Activitatea enzimelor serice este afectată de numeroși factori : vârstă și sex, hormoni (în special estrogeni), ingestie, efort fizic, șoc operator, terapie actinică, terapie steroidică sau fenotiazinică. Un traumatism muscular minor de tipul tratamentului injectabil sau un examen electromiografic are ca urmare aproape imediată o creștere a activității fosfocreatin kinazei (CPK) serice. Nu am citat aici modificările generate de suferințele cardiace, extrem de specifice funcției mușchiului cardiac. Modificările lactat dehidrogenazei serice (LDH) și izoenzimelor sale sunt indici de valoare în diagnosticul diferențial al afecțiunilor eredo-degenerative.

Stress-ul oxidativ este un termen generic ce desemnează o situație fiziologică sau patofiziologică în care procesele oxidative exced apărării antioxidative a unui organism. Această definiție generală cuprinde o mare varietate de afecțiuni, procese metabolice normale, în care stress-ul oxidativ joacă un rol esențial. Termenul generic de stress oxidativ este bipolar incluzând excesul de substanță sau procese oxidative dar și deficiența sistemelor de apărare antioxidative. Cei mai importanți oxidanți sunt speciile moleculare reactive derivate ai oxigenului (specii oxigen reactive, SOR) sau ai azotului (SNR). Majoritatea acestor specii moleculare sunt reactivi liberi. Speciile oxigen reactive pot avea drept țintă diferite molecule cu importanță biologică majoră. Acestea includ: lipidele - care pot fi degradate rapid datorită posibilității de atac a radicalilor liberi la dubla legătură din lanțurile de acizi grași esterificați, proteinele – unde degradarea poate conduce la pierderi funcționale, conducând la eliberarea ionilor metalici legați de proteină, potențând procesul de degradare, în ultimă instanță chiar ADN-ul poate fi degradat. Degradarea indusă de stress-ul oxidativ poate afecta funcțiile celulare, conducând nu numai la disfuncția celulară dar chiar moartea acestora pe calea apoptotică și necroză.

Factorii exogeni care contribuie la stress-ul oxidativ sunt speciile oxigen reactive (SOR), azot reactive (SNR) sau catalizatori de tipul metalelor tranziționale. Metalele tranziționale pot fi eliberate în cursul unor procese endogene (de exemplu procesul inflamator).

Stress-ul oxidativ endogen este provocat, atât de mitocondrie cât și de reticulul endoplasmatic, care pot pierde în anumite circumstanțe specii oxigen reactive, dar și de propriul sistem celular de (de exemplu superoxidul, peroxidul de hidrogen, acidul hipocloros, etc.). În aceste condiții, ionii metalelor tranziționale (fier sau cupru) eliberate sunt capabili să potențeze degradările, catalizând descompunerea hidroxiperoxizilor. Procesul poate conduce la formarea radicalilor.

Implicațiile stress-ului oxidativ – la acest moment este recunoscută implicarea stress-ului oxidativ într-un număr de afecțiuni degenerative. Acestea includ : ateroscleroza, diabetul, afecțiuni renale, artrita reumatoidă, maladii neurodegenerative. În multe cazuri procesele inflamatorii și stress-ul oxidativ concură la patogeneza afecțiunilor amintite.

În practica clinică este important, accesul la informațiile privind stress-ul oxidativ la care este supus organismul pacientului. În afară de culturi celulare, este virtual imposibil de accesat direct stress-ul oxidativ într-un organism viu. În acest caz s-a căutat măsurarea unor parametri indirecti, capabil să furnizeze informațiile necesare. Acești parametri includ : concentrațiile unor antioxidanți circulanți, concentrațiile unor produși de oxidare ai lipidelor și proteinelor, sensibilitatea la oxidare a lipoproteinelor sau nivelul anticorpilor antibiomolecule oxidate. Acești parametri pot fi influențați de funcțiile lor biologic normale din organism, ce nu au nimic comun cu dishomeostazia patologică. Este în posibil ca supravegherea lor dinamică să caracterizeze indirect stress-ul oxidativ.

Măsurarea stress-ului oxidativ și peroxidarea lipidică. În general există trei posibilități de măsurare a stress-ului oxidativ și peroxidării și lipidice (P.O.L). Titrarea directă a radicalilor liberi nu este normal posibilă *in vivo*, dar progresele realizate în domeniul rezonanței electronice de spin (RES) aduce speranțe. Tehnica este studiată pe modele animale dar nu a intrat încă în strategia investigațiilor paraclinice curente. Alternativ, pot fi măsurăți produși ai stress-ului oxidativ și peroxidării lipidice sau capacitatea unui organism de a rezista S.O.

Determinarea produșilor stress-ului oxidativ și peroxidării lipidice. Determinarea F₂-izopropanilor (F₂-iP) urinari sau plasmatici reprezintă testul de elecție al S.O. F₂-iP este un produs de oxidare al acidului arachidonic (C₂₀:4 ω 6) și un indicator al reacțiilor P.O.L. Cuantificarea F₂-iP este oarecum laborioasă și scumpă, necesitând echipamente specializate de spectrometrie de masă (gaz cromatografie/spectrometru de masă sau lichid cromatograf de înaltă presiune / spectrometru de masă), standarde de referință deuterate. Din aceste motive aplicația clinică este relativ restrânsă. Metodele imunologice (tip ELISA) dezvoltate pe acest segment sunt discutabile și cu o specificitate diluată.

Un alt parametru măsurabil este concentrația peroxizilor formați în procesul P.O.L. în această direcție au fost dezvoltate câteva metode de determinare. Cele mai utilizate includ detectarea luminometrică, și colorimetrică a hidroxiperoxizilor, sau complexometrică. Avantajul acestor tehnici, constă în flexibilitatea lor și modul relativ facil de practicat. Obiecția esențială constă în faptul că pot fi determinați numai un spectru restrâns de peroxizi formați. Nivelul S.O. și P.O.L., poate fi determinat, măsurând produșii de reacție ai P.O.L. cu acidul tiobarbituric. Substanțele reactive cu acidul tiobarbituric sunt aldehide (T.B.A.R.S.). Cea mai importantă în acest tip de determinare este dialdehida malonică (M.D.A.). Testul TBARS este o tehnică relativ simplă, metodă de dozare este colorimetrică dar produșii separați prin cromatografie de lichid de înaltă presiune (HPLC), își pierd specificitatea. Tehnica este utilă numai ca metodă de "screening". Separarea cromatografică necesită un echipament sofisticat și restrânge determinarea la laboratoare înalt specializate. Determinarea TBARS a contribuit semnificativ la cunoașterea stress-ului oxidativ și proceselor de peroxidare lipidică.

Determinarea statusului antioxidant. A treia strategie este măsurarea capacității antioxidante a țesutului și fluidelor organismului. Acest tip de determinări pot fi afectate de dieta zilnică și de alte modificări exogene. Alternativ, rezistența la oxidare a plasmei și lipoproteinelor poate conduce la informații de substanță. Determinarea antioxidantului poate fi simplă în cazul substanțelor acva-solubile de tipul ascorbat și urat, dar antioxidanții lipofilici necesită separare prin tehnici cromatografice cu toate fazele de extracție și purificare aferente. În decursul timpului au apărut și alte tehnici de determinare a capacității antioxidante. Acestea au la bază abilitatea probei de a rezista oxidărilor. Acești indici sunt frecvent utilizați în practica clinică. Utilizarea lor este un compromis prin nespecificitate, ne având o țintă (pato) fiziologică relevantă a sursei de S.O., ca o consecință imediată aceste tehnici sunt limitate la studii comparative.

S-a sugerat că statusul antioxidant poate fi caracterizat de raportul glutatation (GSH) / glutatation disulfid (GSSG) sau cu alte cuvinte glutatation redus/glutatation oxidat. Glutatationul este privit ca un antioxidant intracelular, cu masa moleculară cea mai scăzută iar concentrația lui este un indicator al stării redox celulare. Când acționează ca antioxidant, glutatationul este oxidat la disulfitul GSSG; din acest motiv raportul acestora identifică stress-ul oxidativ tisular. Crucial, determinant pentru validitatea raportului GSH/GSSG, este prevenirea oxidării accidentale a glutatationului pe tot parcursul procedurii datorată în mare parte faptului că se operează la concentrații extrem de reduse. Este necesară "blocarea" GSH într-o stare care să nu îi permită oxidarea la GSSG, în timpul prelucrării sau determinării. Aceasta se realizează printr-o pretratare a probei cu N-etilmaleimidă (NEM), glutatationul poate fi ulterior determinat prin metoda cu glutatation-S-transferază. Pentru determinarea disulfitul, GSSG, probele sunt tratate cu NEM (fie prin adăugare în fluidele biologice sau omogenizare în

prezeța acesteia), derivatizare cu dinitrofluorobenzen și analizare prin cromatografie de lichide de înaltă presiune (HPLC). Alternativ, electroforeza capilară poate fi utilizată pentru determinarea simultană a GSH și GSSG.

Valoarea raportului GSH/GSSG a fost legată de stress-ul oxidativ în câteva cazuri incluzând : efortul fizic prelungit, maladia Alzheimer, dezvoltarea tumorală, HIV, Scleroză multiplă, etc.

Abilitatea lipoproteinelor plasmatice de joasă densitate (LDL) de a fi oxidate este utilizată ca o măsură a capacității antioxidantilor lipofilici. În procesele de oxidare ale acizilor grași polinesaturați se formează diene conjugate. Formarea acestor produși de reacție poate fi monitorizată prin spectrofotometrie în ultraviolet. Dezavantajul major al acestei metode rezidă în necesitatea separării laborioase a LDL prin ultracentrifugare. Prepararea probei a fost relativ de curând simplificată printr-o tehnică de marcarea fluorescentă, care permite determinarea P.O.L. în plasmă.

Altă posibilitate pentru a urmări peroxidarea lipidică este măsurarea chemiluminiscenței, intensitatea acesteia fiind direct proporțională cu rata peroxidării lipidice. Dezavantajul acestei tehnici este că substanțele ce absorb în ultraviolet prezente în concentrații crescute în fluidele biologice interferează în determinare.

Este posibilă determinarea concentrației LDL oxidate (oxLDL) în plasmă utilizând metoda ELISA.

În ultimul timp bateriile paraclinice de investigare a statusului oxidativ total al organismului includ printre alte determinări : glutation reductaza, transferina, feritina, acidul uric, bilirubina și albumina.

În acest context am urmărit evoluția acidului uric și bilirubinei în afecțiuni eredo-degenerative ale mușchiului. Rezultatele deloc surprinzătoare au demonstrează gruparea valorii medii la capătul inferior al domeniului de definiție. Deviația medie standard a fost mică, îndreptând concluzia că în cazul distrofiei musculare Duchenne există o alterare a statusului oxidativ. Această concluzie a fost un suport remarcabil pentru rezultatele obținute în determinarea matricei acizilor grași.

5.4. INVESTIGAȚII ASUPRA LIPIDELOR ȘI FRAȚIUNILOR LIPIDICE ÎN PATOBIOCHIMIE

Investigațiile lipidice au fost practicate pe loturi considerabile, din acestea prezentăm numai o parte. Compoziția loturilor este prezentată în tabelele de mai jos.

S-a considerat util și necesar stabilirea unor domenii de variație normală, specifice, deoarece este unanim acceptat existența unor variații majore de compoziție lipidică funcție de modul de nutriție al populației. Mai mult probele analizate au fost prelevate de la pacienți după o spitalizare de minimum 3 săptămâni.

După separarea primară a fracțiilor lipidice plasmatice și transmetilarea lor printr-o tehnică modificată Morrison-Smith (1964), s-a procedat la separarea, identificarea și dozarea acizilor grași, prin cromatografie de gaze de înaltă rezoluție, utilizând o coloană capilară, acoperită cu o fază staționară polară, cianopropilsiloxanică. Tehnica laborioasă de separare a inclus în primul rând măsuri extrem de severe de prevenire a fenomenului de autooxidare, oxidare pe suport, saturare microcatalitică pe suport și pe circuitul de introducere al probei.

Identificarea acizilor grași s-a făcut prin comparare cu standarde de compoziție și structură cunoscută, (standarde furnizate de AOCS și ISFAL), prin determinare matematică (calculul timpilor de retenție, factorilor de corecție, etc.) față de etaloane perfect titrate prin spectrometrie de masă.

Probele au fost separate pe un gaz cromatograf, Hewlett Packard, model 5840 A. Întregul proces de separare (regimul temperaturilor, presiunilor, etc.) a fost asistat de calculator. Coloanele de separare au avut lungimi cuprinse între 30 și 100 m., au fost standardizate și testate anterior utilizării în vederea analizei probelor biologice.

Tehnica utilizată de noi este însă cu mult mai rapidă, utilizează ca agenți de metilare $\text{BF}_3/\text{metanol}$, SILAR-10C (SP-2340), ca fază staționară. Coloana este 30 sau 60 m, programul de temperatură este diferit. Procedeele utilizate de noi a fost descris anterior.

Diferențele dintre mediile acizilor grași liberi exprimate în $\mu\text{g/ml}$, pot provenii :

- a. Existența unor procese de autooxidare (creșterea acizilor grași saturați).
- b. Numărul relativ mic de cazuri analizate de Pace-Asciak (n= 3)
- c. Tehnica utilizată de noi este mult mai elaborată și mai rapidă, adaptată analizelor lipidelor de membrană.
- d. Variații legate de vârstă și modul de nutriție.

Pentru clinicianul al cărui domeniu include afecțiunile metabolice și de nutriție, bolile neurologice cu stocare lipidică (teaurizmoze, lipidoze) răspunsul laboratorului referitor la concentrația de acizi grași liberi plasmatici (normal cuprinsă între 3.0-30 mg/dl, 0.1-1.1 meq/l) nu este cel util. Aceasta este explicația pentru care s-au pus la punct tehnici de separare elaborate. Proportia dintre diferiții acizi grași liberi plasmatici este cel util, cel ce poate orienta diagnosticul și tratamentul.

O descriere amănunțită a tehnicilor utilizate poate fi regăsită în capitolul referitor la metodologia de separare. Rezultatele individuale (pentru fiecare acid gras) au fost medii a trei determinări (pe aceeași probă), iar testele au fost repetate ori de câteori s-a considerat necesar.

Tabel 5.19.
Valorile de referință ale principalilor constituenți lipidici plasmatici

Frațiune lipidică	mg /dl		% din greutatea lipidelor totale	mmol/l	Acizi grași din compoziția fracțiunii lipidice (valori medii)	
	Valori medii	Domeniu de variație	Valori medii	Valori medii	mg/dl	mEq/l
Acizi grași liberi (F.F.A.)	12	4.5 – 25.5	2.18	0.47	12.00	0.47
Colesterol Liber	40	40 – 50	7.27	1.16	-	-
Triacilgliceroli	90	40 – 165	16.36	1.00	89.10	3.00
Fosfolipide	210	150 – 250	38.18	2.72	150.00	5.44
Colesterol Esterificat	230	150-250	41.82	3.78	104.5	3.78
Lipide Totale	550	450 - 800	100	9.13	355.6	12.69

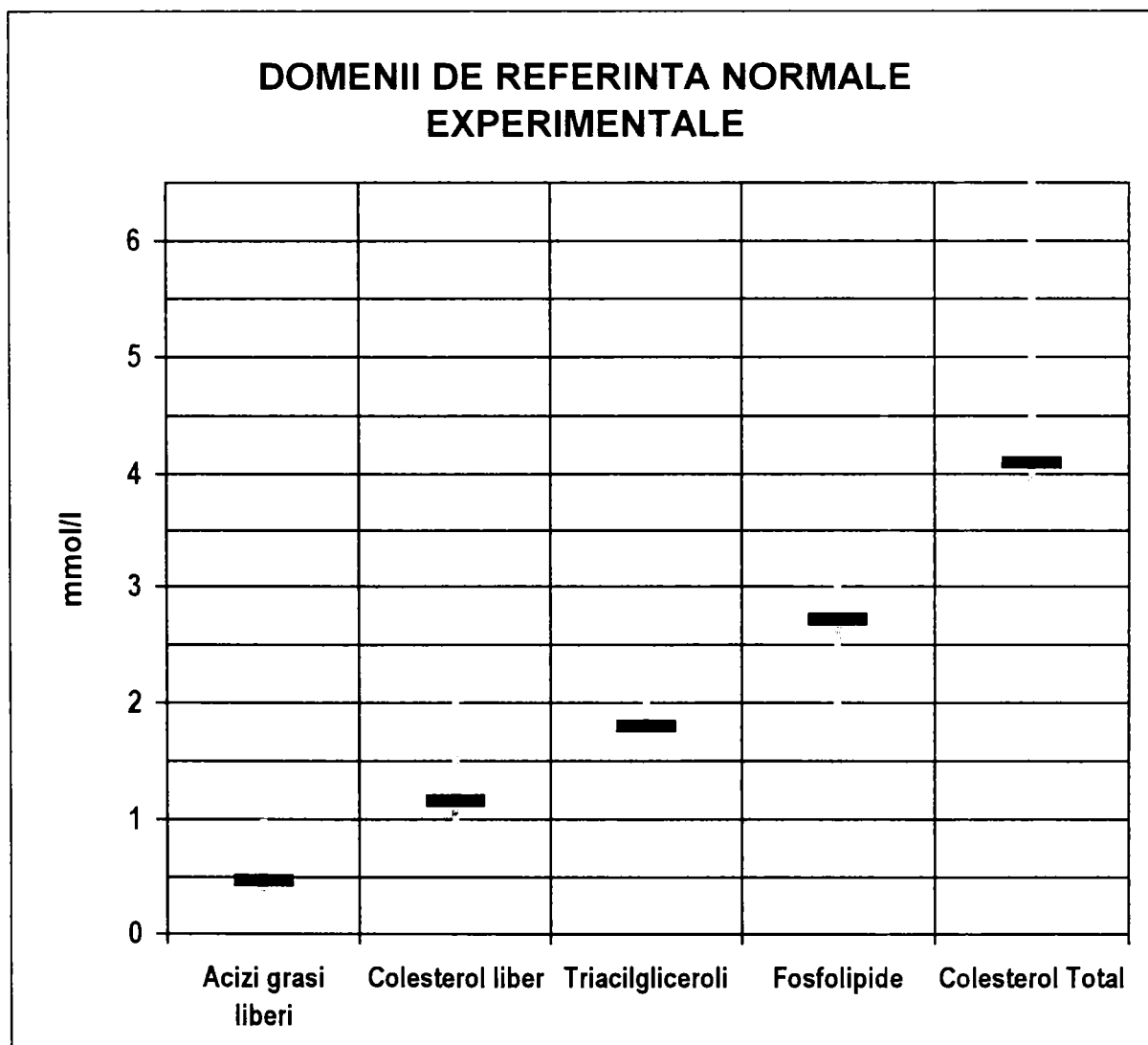


Fig. 5-41.
Domeniile de referință normale. Studiul ține cont de modul de nutriție specific teritoriului României. Valorile aparțin Departamentului de biochimie al Centrului de Patologie neuro-musculară "Dr. Horia RADU".

Tabel 5.20.

Principalii conștuenți lipidici plasmatici la pacienți cu DMP Duchenne.

	DMP-D	Control	Vectoare	Control	p
Număr de subiecți	20	20	10	10	
Vârstă (ani)	10.50 ± 2.60	10.20 ± 2.80	24.30 ± 3.50	24.10 ± 3.20	-
Acizi grași liberi (mmol/L)	0.491 ± 0.10	0.451 ± 0.105	0.606 ± 0.090	0.644 ± 0.08	-
Colesterol Esterificat (mmol/L)	3.624 ± 0.05	3.582 ± 0.05	4.092 ± 0.09	4.15 ± 0.08	< 0.001
Colesterol Liber (mmol/L)	0.867 ± 0.13	0.862 ± 0.124	1.073 ± 0.143	1.10 ± 0.083	-
Colesterol Total (mmol/L)	4.34 ± 0.054	4.413 ± 0.09	5.172 ± 0.106	5.16 ± 0.07	< 0.001
Fosfolipide (mmol/L)	2.545 ± 0.07	2.178 ± 0.066	2.500 ± 0.08	2.306 ± 0.17	< 0.05
Triacilgliceroli (mmol/L)	0.890 ± 0.043	0.784 ± 0.042	1.078 ± 0.025	1.069 ± 0.034	-

Tabel 5.21.

Separarea acizilor grași totali din fracția fosfolipidică plasmatică

Acizi Grași	DMPD (n=20)	Control (n=20)	Vectoare (n=10)	Control (n=10)	P
C14: 0	0.47 ± 0.35	0.50 ± 0.25	0.60 ± 0.20	0.65 ± 0.24	
C15: 0	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.2 ± 0.04	0.19 ± 0.04	
C16: 0	20.88 ± 4.20	21.89 ± 5.25	21.05 ± 4.74	22.89 ± 4.95	
C16: 1ω7	2.79 ± 0.88	2.07 ± 0.85	1.38 ± 0.80	1.45 ± 0.89	
C17: 0	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.05	0.09 ± 0.05	
C18: 0	8.44 ± 1.47	10.00 ± 1.32	12.44 ± 1.28	11.64 ± 1.30	< 0.001
C18: 1ω9	11.48 ± 1.99	13.98 ± 2.75	12.95 ± 2.00	14.42 ± 2.65	< 0.001
C18: 2ω6	22.31 ± 3.00	20.35 ± 2.89	19.88 ± 2.74	19.07 ± 2.74	< 0.001
C20: 0	1.11 ± 0.55	1.20 ± 0.65	1.80 ± 0.50	1.79 ± 0.55	
C18: 3ω3	0.10 ± 0.04	0.15 ± 0.08	0.05 ± 0.08	0.10 ± 0.07	
C20: 2ω6	0.44 ± 0.10	0.50 ± 0.10	0.44 ± 0.10	0.35 ± 0.10	
C20: 3ω6	2.45 ± 0.35	2.06 ± 0.60	2.55 ± 0.44	2.54 ± 0.52	
C20: 4ω6	14.79 ± 1.52	11.05 ± 2.00	12.67 ± 0.78	11.36 ± 1.67	< 0.001
C22: 0	3.03 ± 0.46	1.98 ± 0.55	2.10 ± 0.51	2.02 ± 0.55	< 0.001
C20: 5ω3	0.83 ± 0.28	1.01 ± 0.36	0.78 ± 0.31	0.79 ± 0.33	
C22: 3ω3	0.32 ± 0.15	0.60 ± 0.20	0.40 ± 0.10	0.55 ± 0.17	< 0.001
C24: 0	3.01 ± 0.38	3.50 ± 0.44	3.66 ± 0.40	3.77 ± 0.42	< 0.001
C22: 4ω6	1.22 ± 0.33	0.70 ± 0.36	0.88 ± 0.24	0.66 ± 0.44	< 0.001
C24: 1ω9	1.02 ± 0.22	0.85 ± 0.24	0.80 ± 0.19	0.80 ± 0.20	
C22: 5ω3	0.75 ± 0.04	1.00 ± 0.08	0.70 ± 0.18	1.00 ± 0.20	< 0.001
C22: 6ω3	2.11 ± 0.74	3.44 ± 0.89	2.99 ± 0.64	3.67 ± 0.70	< 0.001
C26: 0	0.56 ± 0.10	0.79 ± 0.07	0.83 ± 0.04	0.88 ± 0.05	< 0.001

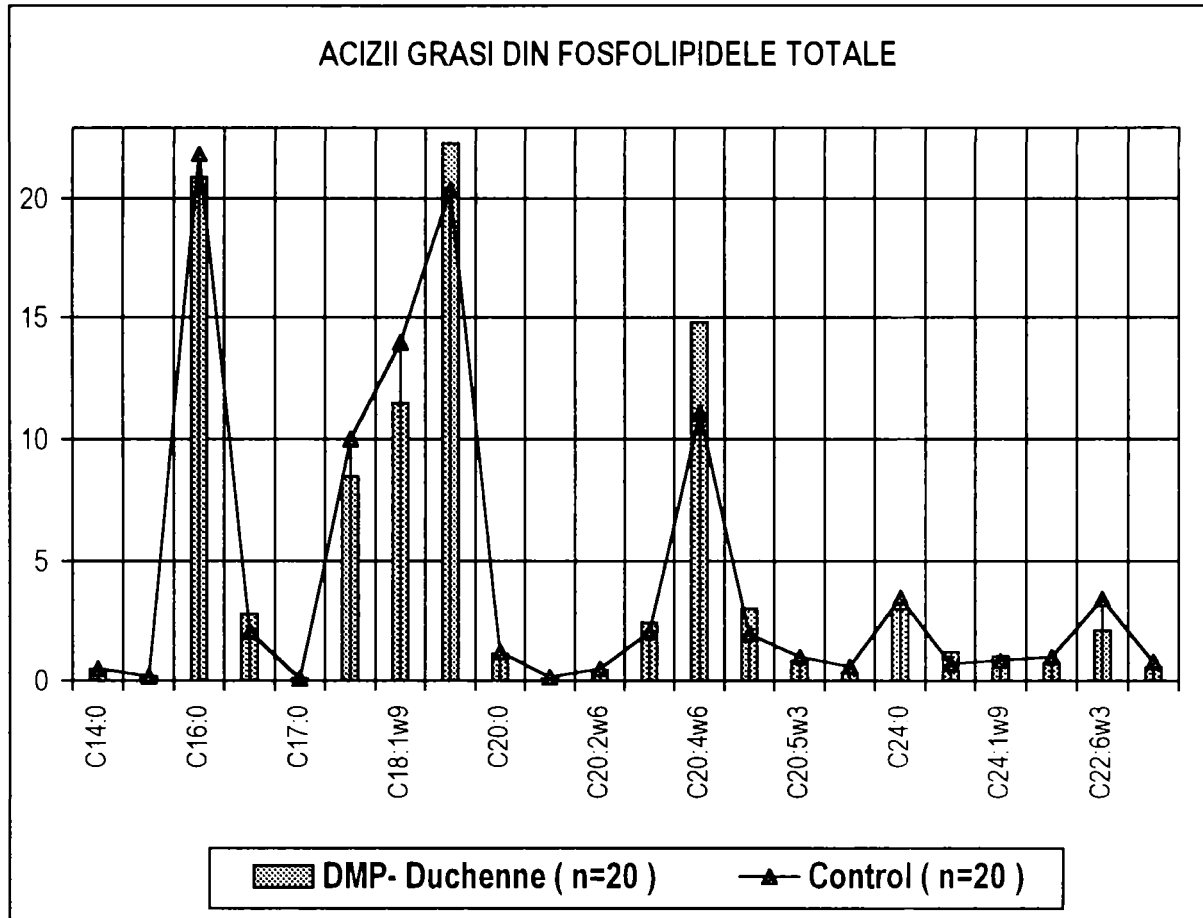


Fig-5-41.
Acizii grași din fosfolipidele totale. Seria DMP-Duchenne și subiecți de control.

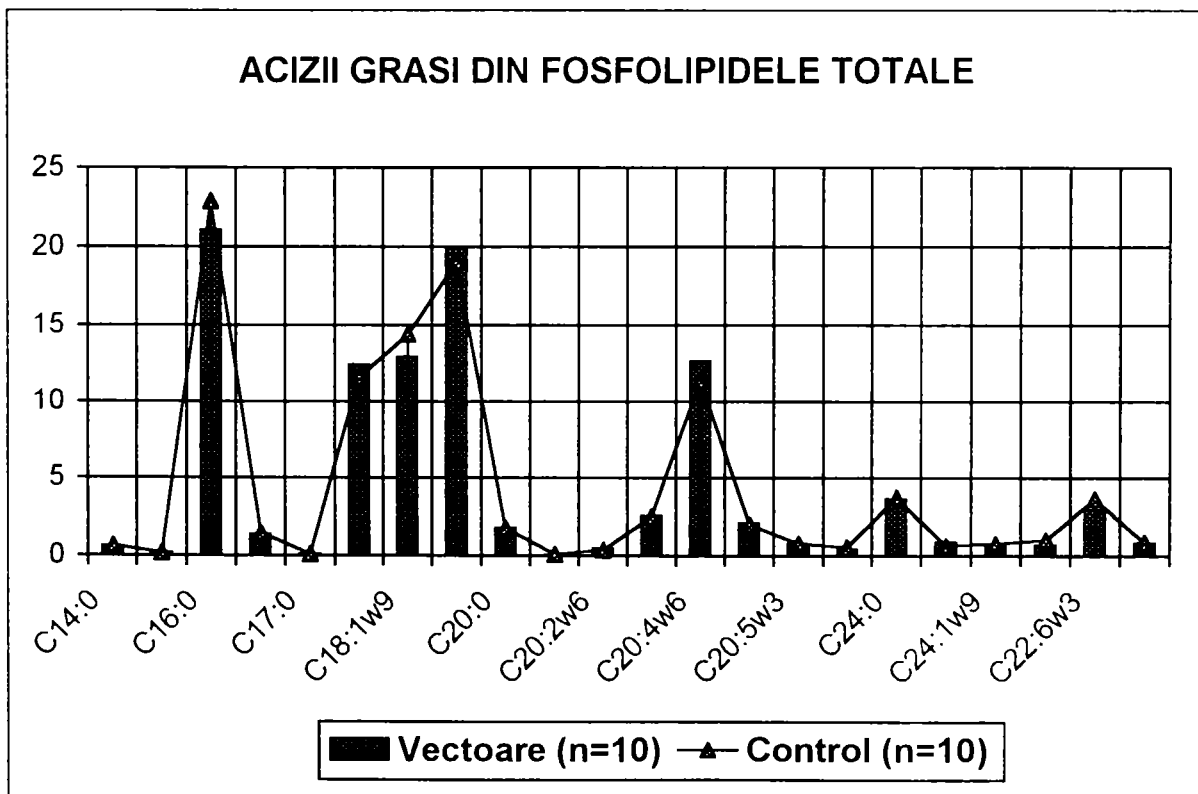


Fig-5-42.
Acizii grași din fosfolipidele totale. Seria Vectoare DMP-Duchenne și subiecți de control.

Tabel 5-22.
Compoziția în acizi grași a fracției fosfatidilcolinice

Acizi Grași	DMPD (n=20)	Control (n=20)	Vectoare (n=10)	Control (n=10)	p
C14: 0	0.94 ± 0.33	1.00 ± 0.20	0.48 ± 0.10	0.50 ± 0.20	
C15: 0	0.29 ± 0.10	0.30 ± 0.10	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01	
C16: 0	24.97 ± 1.20	24.91 ± 1.61	26.81 ± 1.41	26.81 ± 1.41	
C16: 1ω7	1.79 ± 0.30	1.52 ± 0.52	1.32 ± 0.32	1.32 ± 0.32	
C17: 0	0.40 ± 0.20	0.41 ± 0.21	0.40 ± 0.20	0.40 ± 0.20	
C18: 0	12.40 ± 0.32	13.60 ± 0.45	14.90 ± 0.24	13.80 ± 0.35	< 0.001
C18: 1ω9	13.66 ± 1.07	13.74 ± 1.27	12.98 ± 0.87	13.04 ± 1.07	
C18: 2ω6	23.44 ± 2.78	22.07 ± 3.04	23.01 ± 2.09	23.07 ± 3.04	
C20: 0	0.56 ± 0.20	0.65 ± 0.10	0.60 ± 0.10	0.65 ± 0.10	
C18: 3ω3	0.10 ± 0.04	0.15 ± 0.05	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.05	
C20: 2ω6	0.97 ± 0.14	0.88 ± 0.21	0.68 ± 0.01	0.68 ± 0.11	
C20: 3ω6	3.55 ± 0.65	3.12 ± 0.73	2.50 ± 0.51	2.52 ± 0.53	< 0.001
C20: 4ω6	8.39 ± 0.88	7.61 ± 0.90	6.51 ± 0.40	6.71 ± 0.80	
C22: 0	0.19 ± 0.09	0.20 ± 0.10	0.19 ± 0.10	0.20 ± 0.10	
C20: 5ω3	0.54 ± 0.32	0.55 ± 0.33	0.96 ± 0.23	0.97 ± 0.23	
C22: 3ω3	0.14 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.01	
C24: 0	1.69 ± 0.25	2.11 ± 0.45	2.10 ± 0.33	2.10 ± 0.35	< 0.001
C22: 4ω6	1.65 ± 0.10	1.03 ± 0.12	1.0 ± 0.03	1.08 ± 0.02	
C24: 1ω9	0.55 ± 0.12	0.60 ± 0.11	0.60 ± 0.00	0.60 ± 0.01	
C22: 5ω3	0.49 ± 0.21	0.98 ± 0.34	0.80 ± 0.21	0.90 ± 0.24	< 0.001
C22: 6ω3	1.60 ± 0.45	3.61 ± 0.80	3.21 ± 0.40	3.31 ± 0.50	< 0.001
C26: 0	0.89 ± 0.52	1.02 ± 0.55	1.00 ± 0.35	1.00 ± 0.35	< 0.001

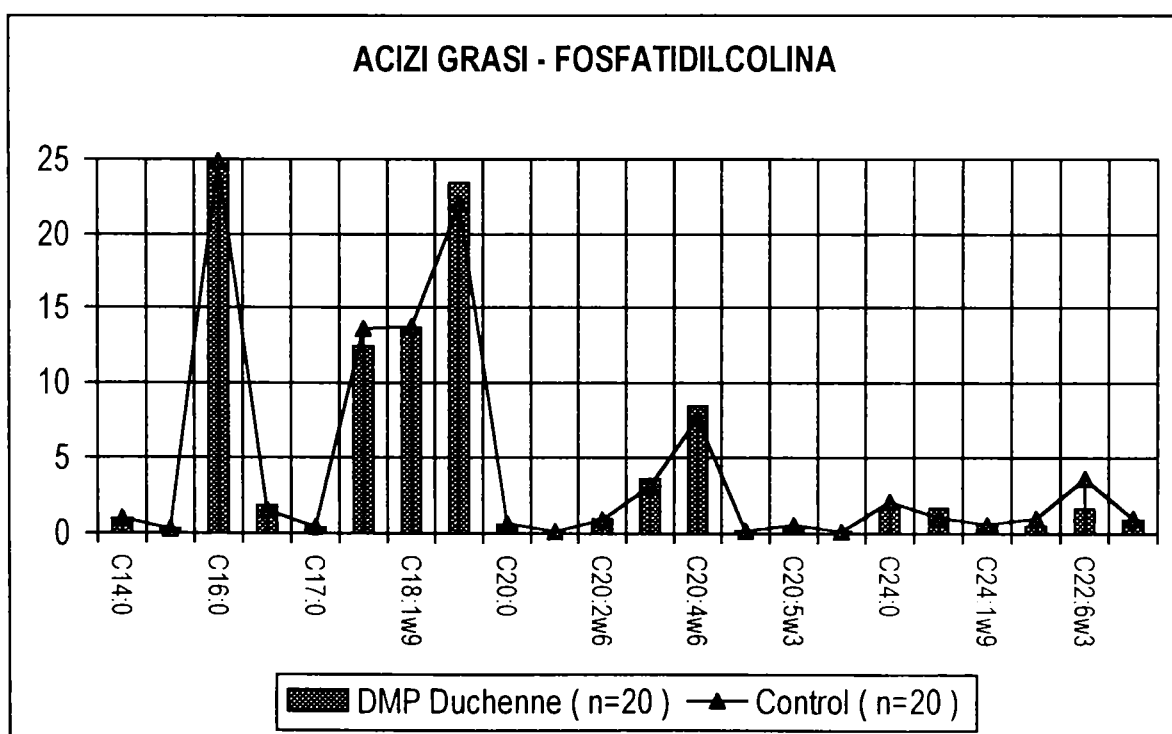


Fig. 5-43.
Acizii grași din fracția fosfatidilcolinică. DMP-Duchenne și subiecți de control.

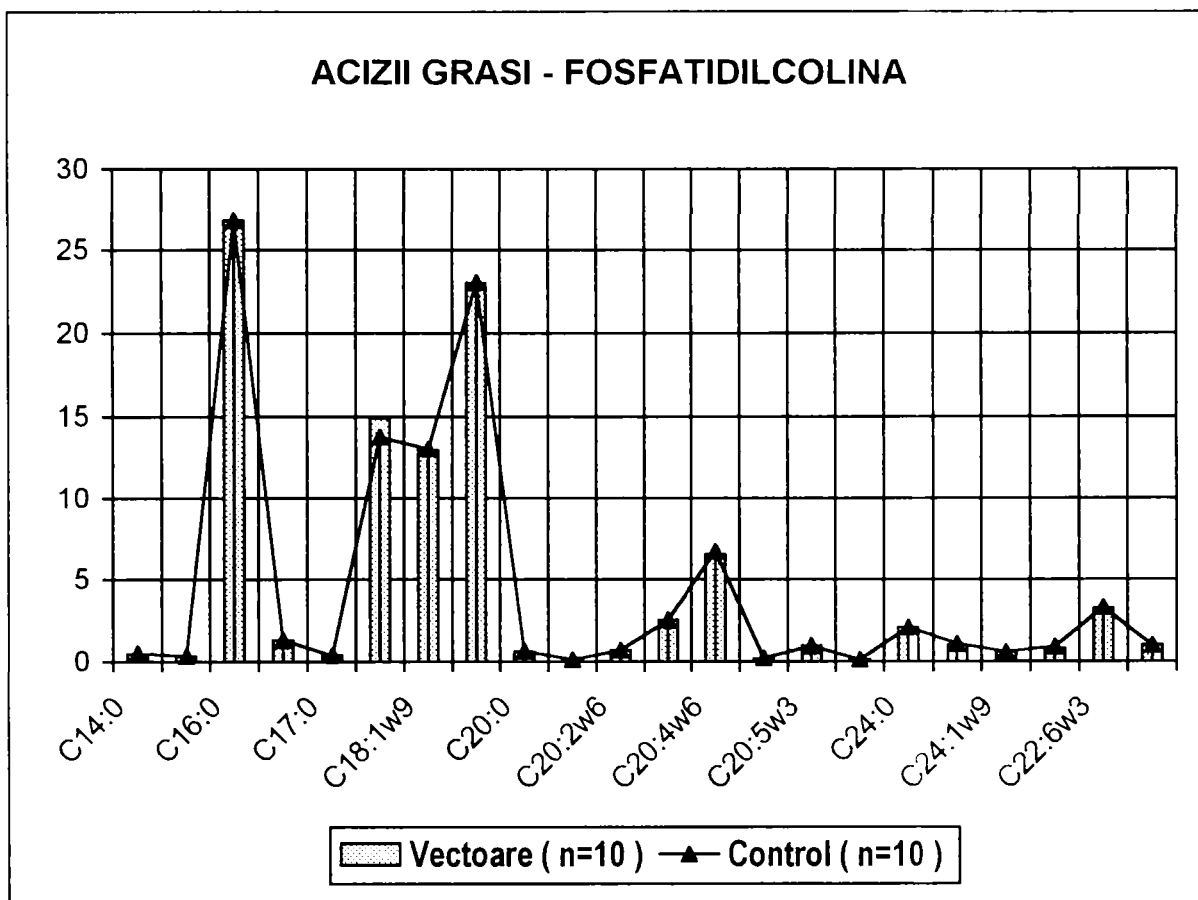


Fig. 5-43.

Acizii grași din fracția fosfatidilcolinică. Vectoare DMP-Duchenne și subiecți de control.

Diferențele statistice semnificative notate la dozarea acizilor grași fosfolipidici totali plasmatici, au motivat studiile ulterioare de compoziție ale fracțiilor individuale de fosfolipide plasmatic. Rezultatele medii obținute din analiza acizilor grași sunt reprezentate în graficele alăturate.

Tabel 5. 23.

Compoziția procentuală în acizi grași a lizo fosfatidilcolinei plasmatic.

Acizi Grași	DMPD (n=20)	Control (n=20)	Vectoare (n=10)	Control (n=10)	p
C14: 0	5.81 ± 1.52	4.41 ± 0.39	5.55 ± 1.21	5.48 ± 1.20	< 0.001
C15: 0	2.00 ± 0.44	1.85 ± 0.49	2.44 ± 0.55	2.40 ± 0.50	
C16: 0	28.00 ± 1.75	27.61 ± 2.41	26.85 ± 2.84	27.00 ± 2.75	
C16: 1w7	3.54 ± 0.87	5.10 ± 1.49	6.10 ± 1.44	6.00 ± 1.40	< 0.001
C18: 0	16.45 ± 1.32	22.84 ± 0.55	23.74 ± 4.05	23.66 ± 4.00	< 0.001
C18: 1w9	17.28 ± 4.35	17.20 ± 1.00	17.55 ± 4.01	16.98 ± 3.97	
C18: 2w6	6.45 ± 0.45	7.00 ± 0.78	6.55 ± 0.70	7.02 ± 0.68	
C20: 2w6	2.21 ± 0.55	1.45 ± 0.41	1.50 ± 0.36	1.50 ± 0.40	< 0.001
C20: 3w6	0.38 ± 0.08	0.40 ± 0.10	0.51 ± 0.10	0.49 ± 0.05	
C20: 4w6	0.55 ± 0.19	0.68 ± 0.44	0.60 ± 0.20	0.57 ± 0.20	
C22: 0	1.60 ± 0.20	1.50 ± 0.59	1.81 ± 0.20	1.75 ± 0.20	
C22: 6w3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

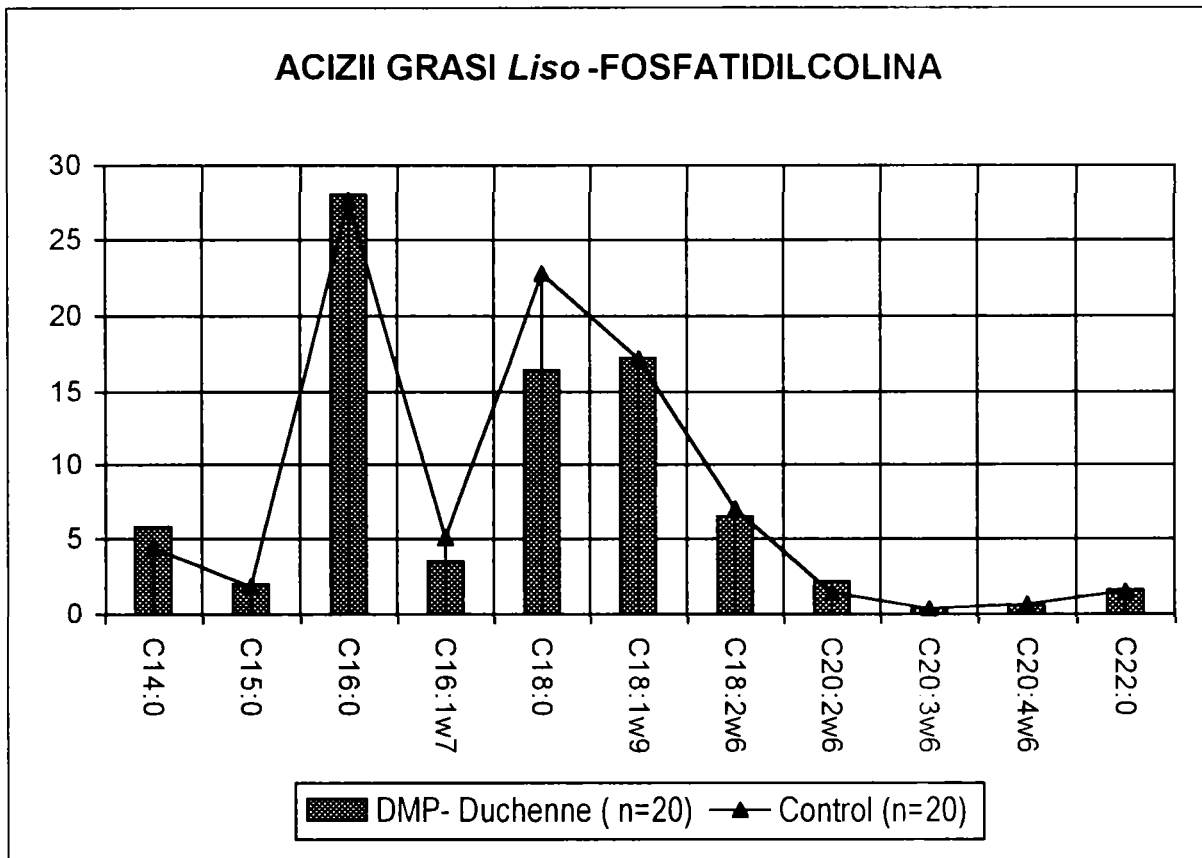


Fig. 5-44.
Separarea acizilor grași totali din fracția liso-fosfatidilcolină. Subiecți afectați de DMP-Duchenne și controlii.

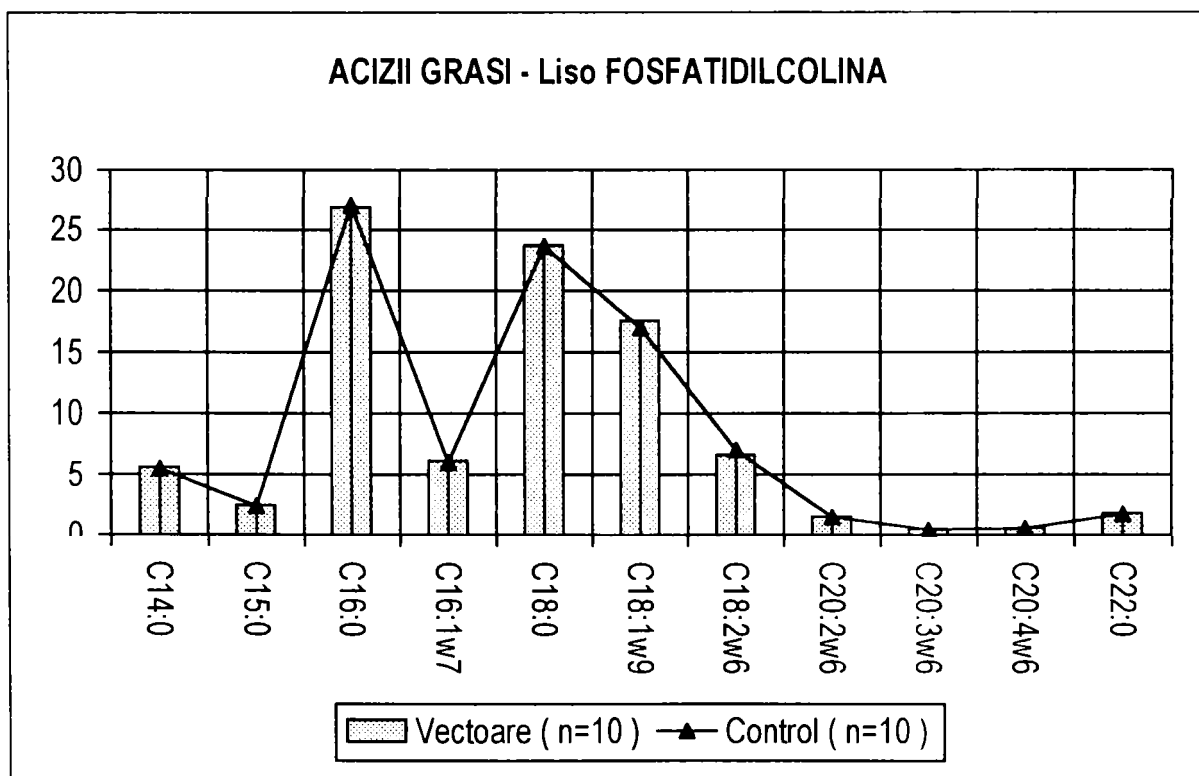


Fig. 5-45.
Separarea acizilor grași totali din fracția liso-fosfatidilcolină. Vettore de DMP-Duchenne și controlii.

Tabel 5.24.
Compoziția procentuală în acizi grași a sfingomielinei.

Acizi Grași	DMPD (n=20)	Control (n=20)	Vectoare (n=10)	Control (n=10)	p
C14:0	3.54 ± 0.44	3.33 ± 0.31	3.25 ± 0.33	3.25 ± 0.31	
C15:0	1.46 ± 0.30	1.10 ± 0.12	1.35 ± 0.15	1.34 ± 0.14	< 0.001
C16:0	24.54 ± 2.77	24.50 ± 0.61	25.00 ± 2.10	25.01 ± 2.10	
C16:1ω7	4.58 ± 1.00	3.61 ± 0.45	4.21 ± 0.51	4.20 ± 0.43	< 0.001
C18:0	15.54 ± 2.10	15.40 ± 1.97	15.44 ± 1.61	15.45 ± 1.60	
C18:1ω9	12.33 ± 2.39	12.34 ± 2.00	12.35 ± 1.54	12.38 ± 1.98	
C18:2ω6	2.64 ± 0.26	2.40 ± 0.24	2.58 ± 0.33	2.58 ± 0.34	
C20:2ω6	0.84 ± 0.15	0.84 ± 0.13	0.90 ± 0.15	0.91 ± 0.20	
C20:4ω6	3.14 ± 0.55	2.56 ± 0.53	3.00 ± 0.41	3.12 ± 0.35	
C22:0	7.59 ± 0.78	7.44 ± 0.73	7.69 ± 0.85	7.70 ± 0.74	
C24:0	5.12 ± 0.81	5.26 ± 0.56	5.08 ± 0.60	5.32 ± 0.50	
C24:1ω9	6.55 ± 2.03	6.77 ± 0.67	6.77 ± 0.89	6.89 ± 0.74	
C22:6ω3	0.54 ± 0.05	0.70 ± 0.10	0.53 ± 0.10	0.74 ± 0.20	< 0.001

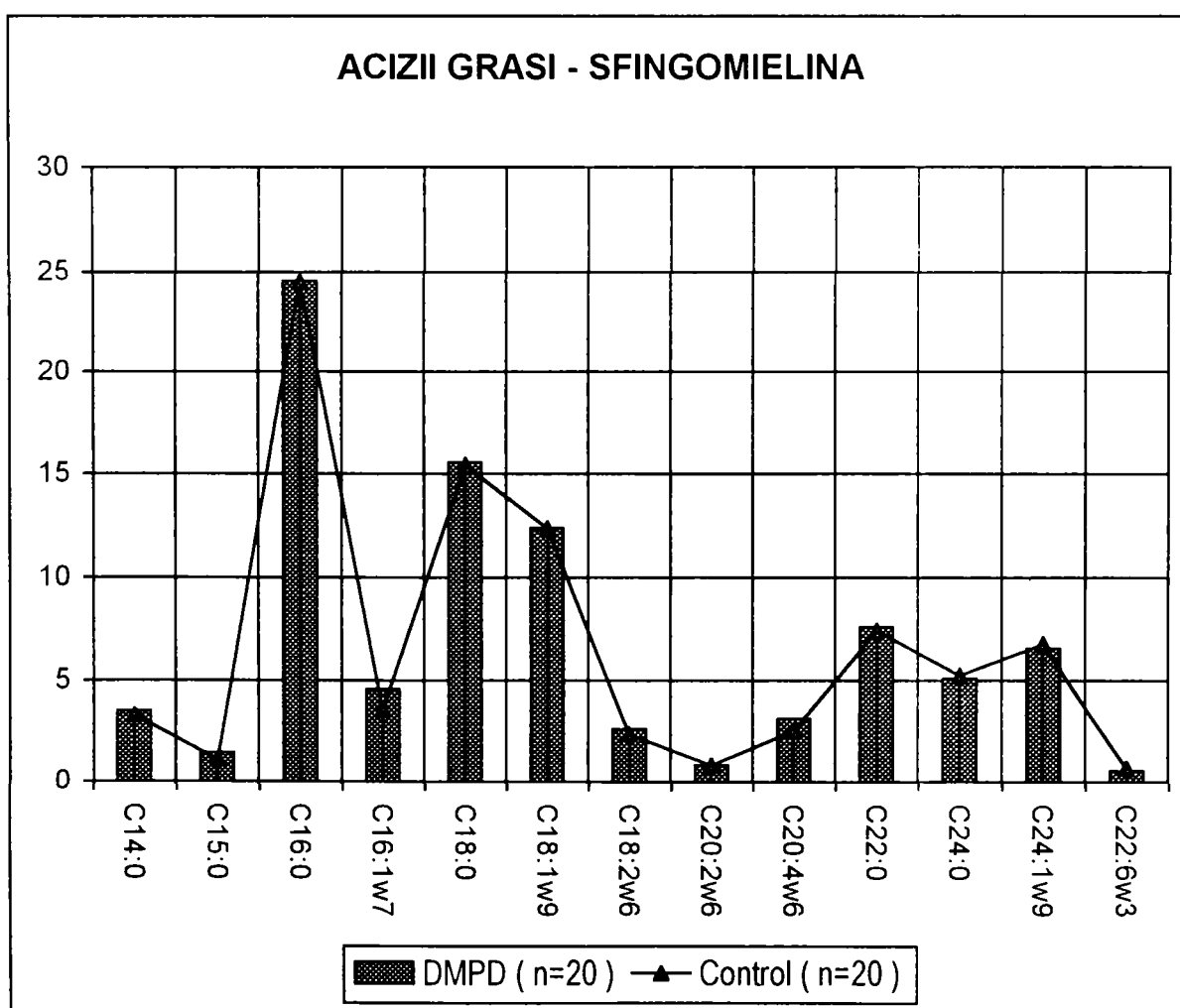


Fig. 5-46.
Separarea acizilor grași totali din fracția sfingomielin. DMP-Duchenne și controlii.

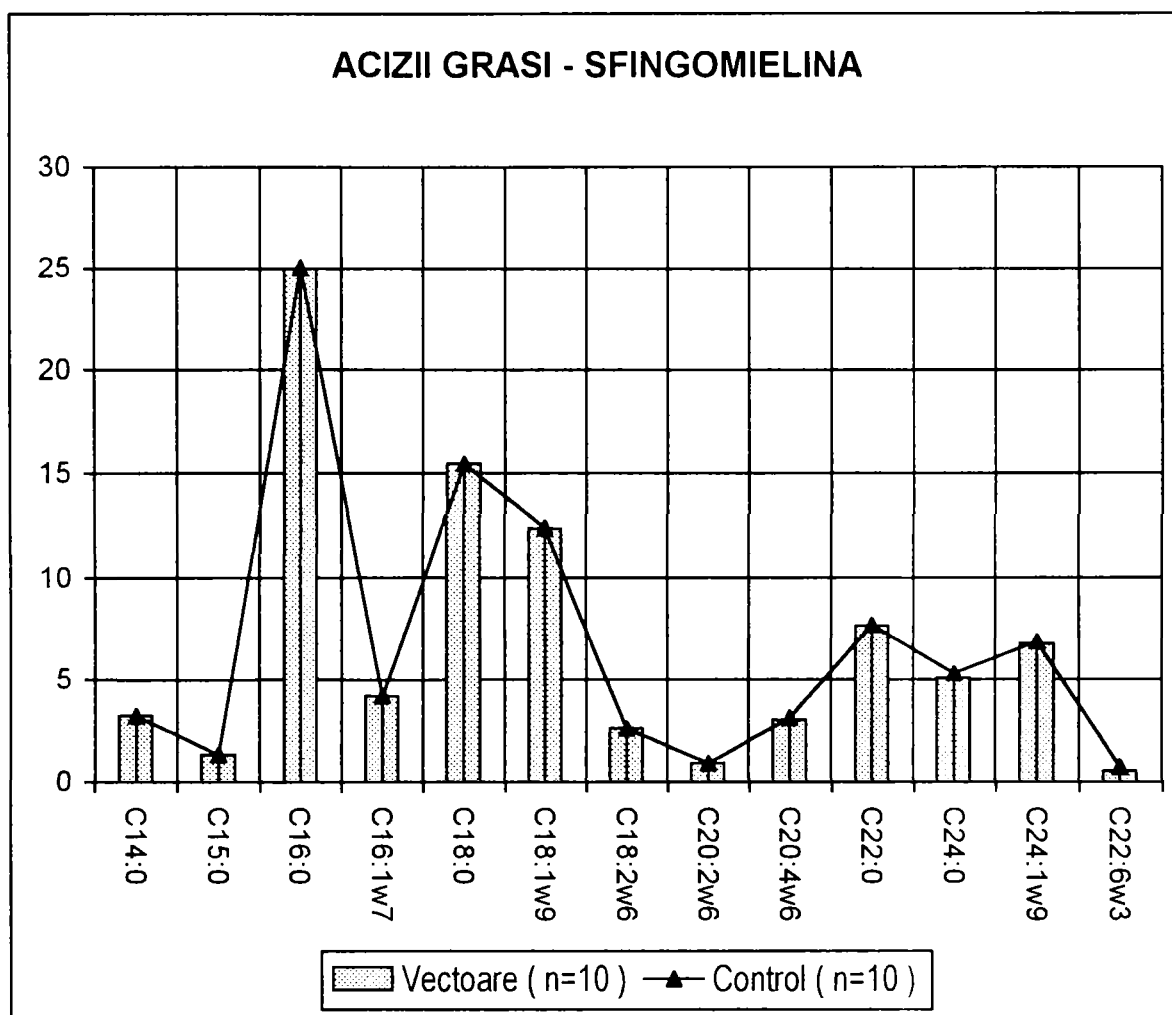


Fig. 5-47.
Separarea acizilor grași totali din fracția sfingomielin. Vectoare DMP-Duchenne și control.

Tabel 5.26.
Compoziția procentuală în acizi grași a fosfatidiletanolaminei

Acizi Grași	DMPD (n=20)	Control (n=20)	Vectoare (n=10)	Control (n=10)	p
C14:0	7.14 ± 1.60	5.12 ± 1.12	6.25 ± 2.10	5.20 ± 2.12	< 0.001
C15:0	1.72 ± 0.40	1.80 ± 0.32	1.55 ± 0.72	1.83 ± 0.22	
C16:0	24.87 ± 2.64	18.44 ± 3.00	19.25 ± 2.20	17.22 ± 2.62	< 0.001
C16:1w7	4.15 ± 0.78	4.44 ± 0.60	4.22 ± 0.44	4.52 ± 0.50	
C18:0	18.85 ± 3.10	26.01 ± 3.90	25.89 ± 3.00	26.80 ± 3.86	
C18:1w9	14.10 ± 3.21	15.70 ± 1.20	15.80 ± 1.63	15.78 ± 1.00	
C18:2w6	4.15 ± 3.45	7.92 ± 1.90	7.88 ± 0.90	8.10 ± 1.20	< 0.001
C20:4w6	2.74 ± 0.22	2.20 ± 0.12	2.60 ± 0.15	2.20 ± 0.40	
C22:0	2.49 ± 0.89	5.64 ± 0.65	3.45 ± 0.79	1.60 ± 0.70	< 0.001
C24:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
C24:1w9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
C22:6w3	1.29 ± 0.21	1.80 ± 0.11	1.45 ± 0.14	1.3 ± 0.45	< 0.001

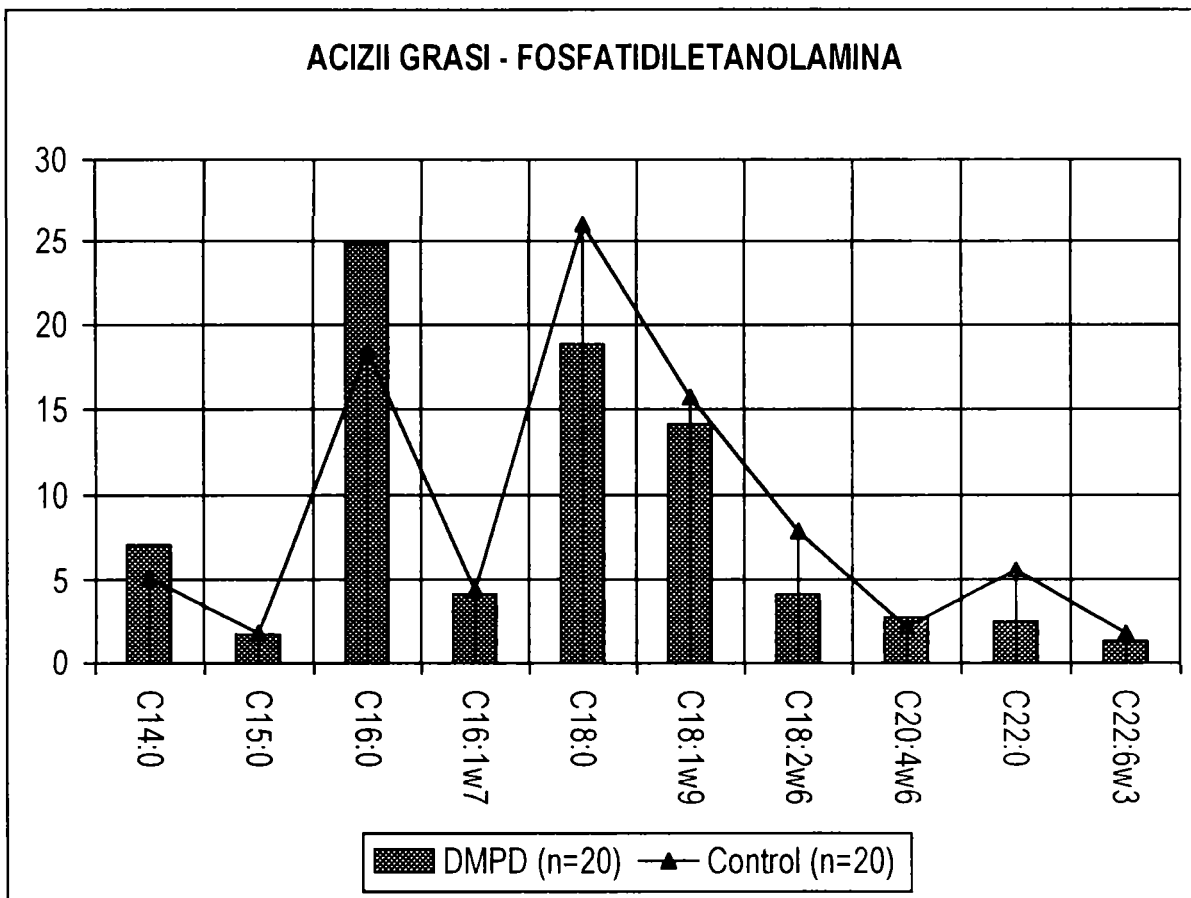


Fig. 5-48.

Separarea acizilor grași totali din fracția fosfatidiletanolamină. DMP-Duchenne și controlii.

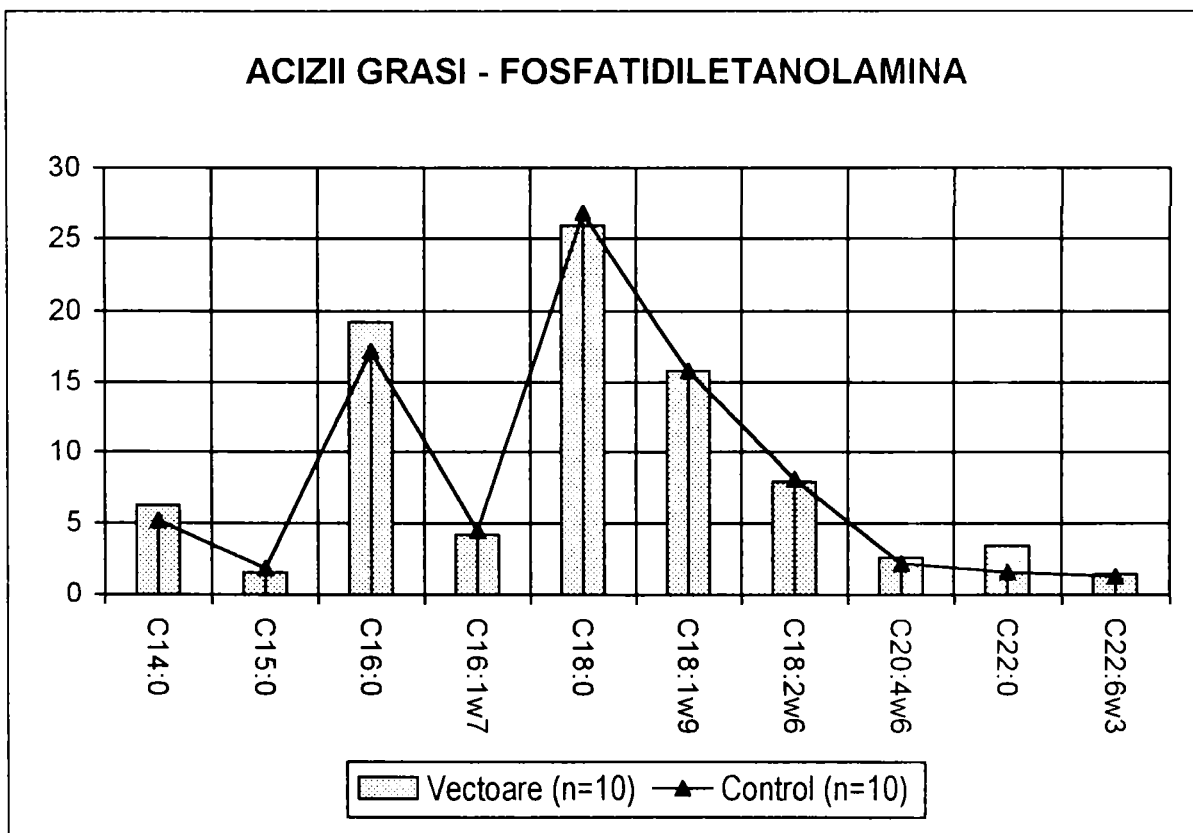


Fig. 5-49.

Separarea acizilor grași totali din fracția fosfatidietanolamină. Vectoare DMP-Duchenne și controlii.

Rezultatele prezentate în tabelele de mai sus sunt medii $\% \pm D.S.$ Rezultatele obținute pe probele de plasmă denotă o modificare a concentrațiilor diferitelor specii de acizi grași frecvente în lipidele plasmatiche.

O corelație plauzibilă va fi făcută la acizii grași membranari.

5.5. DETERMINĂRI PE MEMBRANE ERITROCITARE

De mai bine de un secol, eritrocitele reprezintă un model de studiu, care a permis observarea pentru întâia oară a unor fenomene și structuri ce au depășit larg interesul direct în cunoașterea acestei celule specializate, considerate uneori, cu totul incorect, drept "un sac cu hemoglobină" sau o "celulă în agonie". Faptul că eritrocitul este o celulă specializată comparabilă din punct de vedere al complexității cu oricare altă celulă din organism este probat prin identificarea și izolarea la nivelul său a peste 140 enzime. Cunoașterea structurii moleculare și a funcțiilor eritrocitare permite, de aceea, unor procese care depășesc larg aria de interes aparent restrictiv prin destinul fiziologic al acestei celule. Afirmatia este probată de faptul că o serie de momente fundamentale din evoluția biologiei moleculare și a medicinei ultimelor decenii au ca punct de pornire hematia. Dintre acestea amintim doar două : cunoașterea structurii spațiale a hemoglobinei, care a modificat radical modul de înțelegere a organizării și funcției proteinelor, iar, în mod particular, pentru evoluția medicinei contemporane, conturarea conceptului de boală moleculară. Prin descrierea la nivel molecular a cauzelor siclemiei s-a demonstrat posibilitatea detectării cauzelor bolilor la nivelul cel mai subtil de organizare a materiei.

Eritrocitul s-a consacrat, de asemenea, ca modelul experimental cel mai utilizat în studiul biomembranelor. De aceea, membrana plasmatică a globulelor roșii umane este mai bine cunoscută decât oricare altă biomembrană a eucariotelor. Această preferință pentru cercetarea membranei eritrocitare se datorează unor rațiuni de ordin experimental :

1. Globulele roșii sunt disponibile în cantitate mare și relativ puțin contaminate de alte tipuri celulare,
2. La nivelul eritrocitului există doar membrană plasmatică și deci, nu se pune problema dificilă de separare a acesteia de membranele intracelulare.
3. Membranele hematiilor sau stroma acestora pot fi separate de singura proteină majoră nemembranară, hemoglobina, prin introducerea în soluție salină hipotonă și liză consecutivă
4. Se obțin astfel "fantomele" eritrocitare (ghosts), care permit manipulări diverse : când fantomele sunt deschise se pot experimenta substanțe cu interacțiuni moleculare la nivelul ambelor fețe, sau dimpotrivă, prin închiderea fantomelor se pot studia substanțe cu efect exclusiv la nivelul feței externe a membranei. În fantomele reînchise ("resigilate") se pot introduce soluții cu conținut adecvat de ioni și de ATP, membranele izolate de hemoglobină prezentând proprietăți de transport similare cu hematia normală. Din stroma eritrocitară se obțin vezicule cu păstrarea dispoziției normale a membranei, sau vezicule inversate, cu fața internă a membranei situată la exterior. Toate aceste posibilități, la care se adaugă rezistența în condiții controlate, in vitro, au transformat membrana eritrocitară într-un model de o extremă popularitate cu atât mai mult cu cât, ea se aseamănă cu celelalte tipuri de biomembrane, atât în planul organizării moleculare, cât și pe plan funcțional., (Rusu, 1988).

Paralizia periodică, mio-tonia, mioglobinuria recurentă, distrofiile musculare sunt expresii clinice diferite ale funcționării defectuoase a membranei musculare. Aceste afecțiuni

au manifestări clinice diferite, reflectând anormalitățile biochimice diferite, la nivelul membranei musculare.

Observația fundamentală care a marcat alterarea membranei musculare în distrofiile musculare progresive a fost activitatea anormală a enzimelor serice. În 1949, Sibley și Lehninger efectuând teste de diagnostic al cancerului evaluează activitatea aldolazei serice ca un posibil marker biochimic al acestei afecțiuni. Printre cei investigați s-au numărat și doi băieți afectați de distrofie musculară progresivă, iar activitatea aldolazei serice a prezentat valori crescute față de normal. Observația a rămas "latentă" până în 1953, când Schapira a demonstrat fără tăgadă că nivelul crescut al aldolazei serice, este un marker biochimic al distrofiei musculare progresive Duchenne. Ulterior, s-a dovedit că și alte enzime serice manifestă un titru ridicat, fosfocreatin kinaza fiind una dintre acestea, (Ebashi, 1959; Munsat, 1973).

Dacă aldolaza sau alte enzime sunt "pierdute" de țesutul muscular în cantități apreciabile a conduce la concluzia că metabolismul celular este compromis, apar primele simptome ale bolii.

Această posibilitate nu a fost acceptată decât parțial deoarece multe alte enzime ale metabolismului hidraților de carbon, proteinelor și lipidelor ajung în ser într-o manieră asemănătoare aldolazei și fosfocreatinkinazei.

Impactul funcțional al anormalităților enzimatică nu pare a fi major, modificarea enzimatică este legată desigur într-un alt mod de defectul genetic primar pentru este semnalat la fiecare băiat afectat de Distrofie Musculară Progresivă Duchenne (DMP-D).

Dacă un suspect de DMP-D prezintă un titru enzimatic seric normal, diagnosticul trebuie reconsiderat.

Magnitudinea creșterii activității enzimatică serice este extremă în cazul DMP-D. Anormalitatea este prezentă la naștere, (Beckmann, 1976, 1977, 1978; Garcia, 1979; Gardner-Medwin, 1978, 1979), cu toate acestea testele enzimatică pe sângele obținut prin puncție venoasă fetală nu este relevant pentru un diagnostic antenatal.

Unele studii au raportat o anormalitate activității fosfocreatinkinazei serice la vectoare DMP-D, concretizată printr-o creștere cu cel puțin 50%, (Nicholson, 1979).

Dacă va fi înțeleasă anormalitatea enzimatică serică, vom fi foarte aproape de defectul genetic primar, implicit acestor afecțiuni.

La acest moment există suficient suport experimental care să susțină originea musculară a enzimelor serice.

Întrebarea care se pune firesc este : Dacă se suspectează un defect genetic care afectează membrana musculară, de ce, nu se izolează și caracterizează compoziția și funcția enzimatică direct a acestor membrane?

Acest fapt este încă dificil de realizat din câteva cauze obiective:

1. Este încă dificil de separat sarcolema de proteinele contractile și alte membrane chiar în cazul mușchiului normal. Este aproape imposibil de identificat membranele contaminante, nu există o modalitate realistă de a afirma că preparatul obținut conține numai sarcolema. Nu este posibil să se separe membranele de suprafață de membranele sistemul T, de exemplu.
2. Cantitate de membrane sarcolemale este extrem de mică, la un gram de țesut muscular normal corespunde de regulă 150 micrograme proteine de membrană, ori un material obținut biotic de la un subiect afectat de DMP-D, rare ori depășește 1.5 – 2.0 grame.
3. Mușchiul unui pacient afectat de DMP-D, este infiltrat de grăsime și țesut conjunctiv. Membranele acestor țesuturi contaminante se vor regăsi în preparatele sarcolemale, alterând acuratețea investigațiilor. Nici unul dintre aceste motive nu poate fi exclus până la acest moment, prin tehnicile de preparare cunoscute.

Culturile celulare nu sunt încă un răspuns cert la cerințele investigatorilor, dar viitorul foarte apropiat pare să se arate promițător. Datorită acestor impedimente obiective, mulți investigatori și-au îndreptat atenția spre alte celule : celula roșie devine în acest fel atractivă, mai ales datorită accesibilității ei. Trecheri în revistă cuprinzătoare, ale datelor acumulate de-a lungul timpului au fost realizate de Radu (1977), Plishker (1980). Walton (1988), Rusu (1988), Gordon (1994) etc.

ATP-azele. Investigațiile activităților enzimatică și de transport ale ATP-azelor Na,K, au demonstrat rezultate relativ conflictuale. Brown (1967) inițiază studiile asupra ATP-azei ouabain-senzitive, raportând că ouabaina stimulează hidroliza ATP-ului din "fantomele" celulei roșii sanguine (RBC) preparate de la subiecți afectați de distrofie musculară progresivă Duchenne, distrofie miotonică și miotonie congenitală.

Acest proces de stimulare a fost detectat când incubarea s-a realizat în prezența unor concentrații scăzute de sodiu și potasiu. Când studiile au fost efectuate pe RBC obținute de la subiecți distrofici, la concentrații de sodiu și potasiu suficiente pentru activitate optimă a ATP-azei, ouabaina a reacționat într-un mod mai puțin așteptat teoretic: a inhibat atât hidroliza ATP-ului cât și transportul activ de sodiu și potasiu, (Klassen, 1969; Souweine 1978). Cu "fantome" preparat cu multă acuratețe însă, în condiții optime, nu au prezentat nici o alterare a ATP-azei, Na,K, .

Alte două rapoarte au confirmat constatările lui Brown (1967), sugerând că un factor plasmatic este responsabil pentru aceste efecte.

În 1976, Hull și Roses , raportau o alterare a stoechiometriei schimbului sodiu-potasiu în cazul distrofiei miotonice. Raportul normal a efluxului de sodiu la influxul de potasiu este 1.5 dar în cazul distrofiei miotonice acesta este redus la 1.00. O explicație a acestor date poate fi aceea că permeabilitatea pasivă a membranei la sodiu trebuie să fie redusă, deși constatările pe controli nu suportă această ipoteză. O altă explicație ceva mai plauzibilă este o diferență între volumul celular între RBC provenite de la subiecți afectați de distrofie miotonică și controli.

Protein Kinaza. Studieră fosforilării proteinelor au demonstrat o scădere în cazul distrofiei miotonice și o creștere în DMP-D, cu polipeptide specifice diferite. În DMP-D, cea mai semnificativă creștere ca rată și grad de fosforilare a fost dovedită la un polipeptide 220 000 dalton, cunoscută sub denumirea de spectrină. În distrofia miotonică, band 3, care constă din câteva polipeptide diferite, migrând în domeniul de 95 000 dalton, a fost cea mai puțin fosforilată. Pentru a demonstra diferența endogenă a activității protein kinazei, "fantomele" proaspăt preparate trebuiesc să fie libere de orice contaminare cu cation bivalenți. Activitatea enzimatică este crescută de presupus datorită unei permeabilități crescute pentru substrat. Aceste date demonstrând o alterare semnificativă a activității enzimatică nu au o explicație unitară, responsabilitatea fenomenului fiind fie enzimatică, a substratului sau a altor constituienți membranari.

Modificările morfologice. Câteva studii de microscopie electronică a RBC, au demonstrat anormalități de formă, la probele provenind de la distrofici, după fixarea preparatelor. Pe sângele proaspăt, nefixat nu au fost semnalate aceste modificări.

Cercetările efectuate asupra sângelui pacienților cu distrofie miotonică, distrofie musculară progresivă Duchenne și vectarilor au demonstrat un număr anormal de stomatocite. Apariția stomatocitelor este influențată de un număr mare de variabile, printre care mediul nutritiv, numărul de spălări, pH-ul și timpul de fixare. Desigur acești factori perturbatori pot fi eliminați când se lucrează probe paralele afectați – martor. Prepararea probelor prin crio-fractură elimină multe din artefactele de manipulare oferind rezultate certe, asupra morfologiei RBC. În aceste studii banda proteică de 95 000 dalton, apare ca fiind corelată atât cu transportul ionic cât și cu prezența particulelor intramembranare, (Gunn ,1976). În acest context este interesant de notat descreșterea densității particulelor intramembranare atât la fața

citoplasmatică cât și la fața celulară, în cazul DMP-D, (Schotland, 1980). Studiile biofizice, au demonstrat alterări majore ale permeabilității apei, fluidității, etc.

Teoretic, modificările activităților enzimatică, morfologia celulei, biofizica membranei și fenomenelor de transport ionic, întâlnite în cazul distrofiilor musculare pot fi explicate de un defect primar la nivelul metabolismului lipidic. Proporția relativă a diferitelor fosfolipide, lungimea catenei și gradul de saturare al diferiților acizi grași constituenți ai claselor lipidice, conținutul de sterol al membranei plasmatică își aduc o contribuție majoră la structura și funcționarea membranei.

Este cunoscut că multe enzime ale RBC sunt dependente sau influențate de lipidele membranare. ATP-aza Na,K, pare să necesite fosfatidilserină, (Roelofsen, 1973).

Alterările morfologice și a fenomenelor de transport în RBC sunt observate în afecțiuni în care există modificări certe de compoziție lipidică. Creșterea proporției de fosfoinozite sau diacilglicerol în membrană este asociată cu mărirea concentrației de calciu intracelular și modificări de formă ale RBC.

Membrană sintetică formată din colesterol oxidat și lizofosfoinozite formează un canal cationic univalent sensibil la calciu.

În final atât creșterea fluidității "fantomelor" RBC și miotonia poate fi indusă la animale sau chiar la om, de medicamente ce interferă metabolismul lipidic. Deoarece multe din aceste perturbări ale funcționalității membranei au fost semnalate în cazul distrofiei miotonice și distrofie musculare progresive Duchenne, este rezonabil de presupus că un defect fundamental în metabolismul lipidic este responsabil de unele anomalități asociate acestor afecțiuni.

Cantitativ fosfolipidele reprezintă cea mai importantă fracție din lipidele RBC. Fosfolipidele includ atât glicero- cât și sfingofosfolipidele. Glicerofosfolipidele au doi acizi grași esterificați în poziția 1 și 2 a moleculei glicerolice și un rest fosfat care esterifică poziția 3.

Distincția dintre diferitele subclase fosfolipidice este realizată de diferitele molecule polare esterificate la restul fosfat. Moleculele primare sunt colina (fosfatidilcolina), etanolamina (fosfatidiletanolamina), serina (fosfatidilserina) și inositolul (fosfatidilinozitolul).

Atunci când acidul gras din poziția 2 lipsește, prefixul liso descrie acest monoacil glicerofosfolipid. Singurul lisoglicerofosfolipid identificat în RBC este lisofosfatidilcolina (lisolecitina). Sfingomielinele sunt sfingofosfolipidul major din RBC. Un schelet glicerolic conține o catenă foarte lungă sfingozinică, iar un acid gras este atașat sfingozinei printr-o legătură amidică, fosfatidilcolina este esterificată la carbonul terminal datorită celor doi constituenți cu catenă hidrocarbonată foarte lungă și bazei colinice, sfingomielinele se aseamănă cu fosfatidilcolina. În 1973, Kunze, raporta o compoziție anormală a fosfolipidelor din membrana RBC la pacienți clasificați de el ca având distrofii musculare, observă inițial o creștere semnificativă a sfingomielinei și o diminuare semnificativă a unei fracții mixte compuse din fosfatidil-etanolamină și fosfatidilserină. O privire comparativă asupra compoziției fosfolipidelor din membrana RBC la pacienți afectați de Distrofie musculară progresivă Duchenne, dată de tabelul 5-27. Kalofoutis (1977), raporta o creștere semnificativă a fracției sfingomielinice.

Comparând rezultatele prezentate în tabelul 5-27, se observă o bună corelație între proporțiile medii. Discrepanța la valorile controlilor raportate de Kunze (1973) și Kalofoutis (1977), sugerează că fosfolipidele au fost alterate prin autooxidare. Broekhuysen (1974), remarcă faptul că oxidarea acizilor grași polinesaturați din fosfolipidele eritrocitare este asociată cu o pierdere semnificativă de fosfatidiletanolamină, fosfatidilcolină și fosfatidilserină.

Datorită unui grad înalt de saturare sfingomielinele nu pare afectată major de oxidare. Dacă nu sunt luate precauțiile necesare în vederea minimalizării autooxidării, sfingomielinele

devine fracția fosfolipidică majoritară iar proporția fosfatidiletanolaminei și fosfatidilserinei se reduce.

Compoziția în acizi grași a extractului lipidic total din RBC, este determinată evident de compoziția claselor lipidice .

Fiecare clasă lipidică este caracterizată de un profil al acizilor grași specifici. Fosfatidilcolina are majoritar acid palmitic (C16:0), și acid linoleic (C18:2 ω 6), fosfatidiletanolamina, acid oleic (C18:1 ω 9) și acid arachidonic (C20:4 ω 6), fosfatidilserina, acid stearic (C18:0) și acid arachidonic (C20:4 ω 6). Prin contrast glicerofosfolipidele au numai câțiva acizi grași cu mai mult de 20 de atomi de carbon, (de exemplu în sfingomielină mai mult de 50% din acizii grași au peste 20 atomi de carbon dintre care acidul lignoceric (C24:0) și nervonic (C24:1 ω 9) sunt majoritari. O prezentare în detaliu a rezultatelor obținute este redată în tabelele următoare. Rezultatele prezentate mai jos sunt obținute pe probe obținute de la DMP-Duchenne.

Tabel 5-27.

Compoziția fosfolipidelor membranare eritrocitare

	SF	LFC	FC	FE	FS	FI
Kunze (1973) (n = 38/14)	31.0 ^m		34.6 ^m	34.3 ^m		
	36.8 ^p		36.0 ^p	27.3 ^c		
Kalofoutis (1977) (n=20/11)	18.0 ^m	1.5 ^m	30.2 ^m	26.6 ^m	12.3 ^m	3.1 ^m
	19.4 ^p	2.3 ^p	20.1 ^p	25.2 ^c	11.7 ^p	3.6 ^p
McLaughlin (1979) (n= 9/8)	27.7 ^m		30.4 ^m	29.4 ^m	12.4 ^m	
	27.7 ^p		30.9 ^p	29.4 ^p	12.2 ^p	
Kobayashi (1978) (n=10/10)	25.5 ^m		28.0 ^m	31.5 ^m	15.1 ^m	
	26.1 ^p		28.8 ^p	30.0 ^p	15.5 ^p	
Koski (1978) (n= 4/5)	26.6 ^m	1.6 ^m	29.8 ^m	28.0 ^m	1.5 ^m	
	27.6 ^p	1.1 ^p	30.0 ^p	27.8 ^p	1.5 ^p	
Ionescu(1986) (n =20/20) (n=10/10)	26.9 ^m		30.3 ^m	29.2 ^m	12.28 ^m	
	27.5 ^p		30.6 ^p	29.3 ^p	12.20 ^p	
	25.7 ⁿ		29.01 ⁿ	30.15 ⁿ	14.60 ⁿ	
	25.8 ^v		29.02 ^v	30.10 ^v	14.60 ^v	
m –Martori (copii) ; p – Pacienți ; n – Normali –femei ; v – Vectoare DMP-D						
SF – Sfingomielină; LFC – Lisofosfatidilcolină; FC – Fosfatidilcolină; FS – Fosfatidilserină FI – Fosfatidilinozitol						

Tabel 5-28.

Compoziția în acizi grași din fosfatidiletanolamină și fosfatidilserină din membranele eritrocitare

Acid gras	Fosfatidiletanolamină		Fosfatidilserină		p
	DMP-D	Control	DMP-D	Control	
C14:0	0.55 ± 0.25	0.89 ± 0.12	1.60 ± 0.33	1.25 ± 0.17	< 0.001
C15:0	0.50 ± 0.18	0.42 ± 0.10	0.33 ± 0.05	0.4 ± 0.14	
C16:0	17.20 ± 1.95	18.33 ± 0.44	5.20 ± 1.00	6.78 ± 0.51	
C16:1ω7	2.55 ± 0.35	1.80 ± 0.44	2.55 ± 0.51	1.80 ± 0.32	< 0.001
C18:0	18.75 ± 1.33	18.00 ± 1.10	40.21 ± 2.44	38.89 ± 1.25	
C18:1ω9	18.70 ± 1.10	18.33 ± 0.30	8.78 ± 1.50	10.51 ± 0.25	
C18:2ω6	6.40 ± 0.75	6.25 ± 0.25	2.65 ± 1.20	2.00 ± 0.21	
C20:2ω9	0.40 ± 0.10	0.33 ± 0.10	0.50 ± 0.10	0.41 ± 0.10	
C20:3ω6	0.77 ± 0.11	0.76 ± 0.10	1.51 ± 0.45	3.10 ± 1.10	
C20:4ω6	17.52 ± 1.89	19.20 ± 0.66	20.44 ± 1.10	18.39 ± 1.00	< 0.001
C22:0	0.20 ± 0.10	0.20 ± 0.10	0.20 ± 0.10	0.30 ± 0.10	
C22:4ω6	5.10 ± 1.10	5.74 ± 0.61	3.44 ± 0.21	2.72 ± 0.22	< 0.001
C22:5ω3	2.33 ± 0.33	3.00 ± 0.20	2.20 ± 0.20	2.30 ± 0.30	< 0.001
C22:6ω3	2.45 ± 0.70	3.91 ± 0.39	4.99 ± 0.74	5.74 ± 0.65	< 0.001
Alți acizi	6.58	2.84	5.40	5.41	

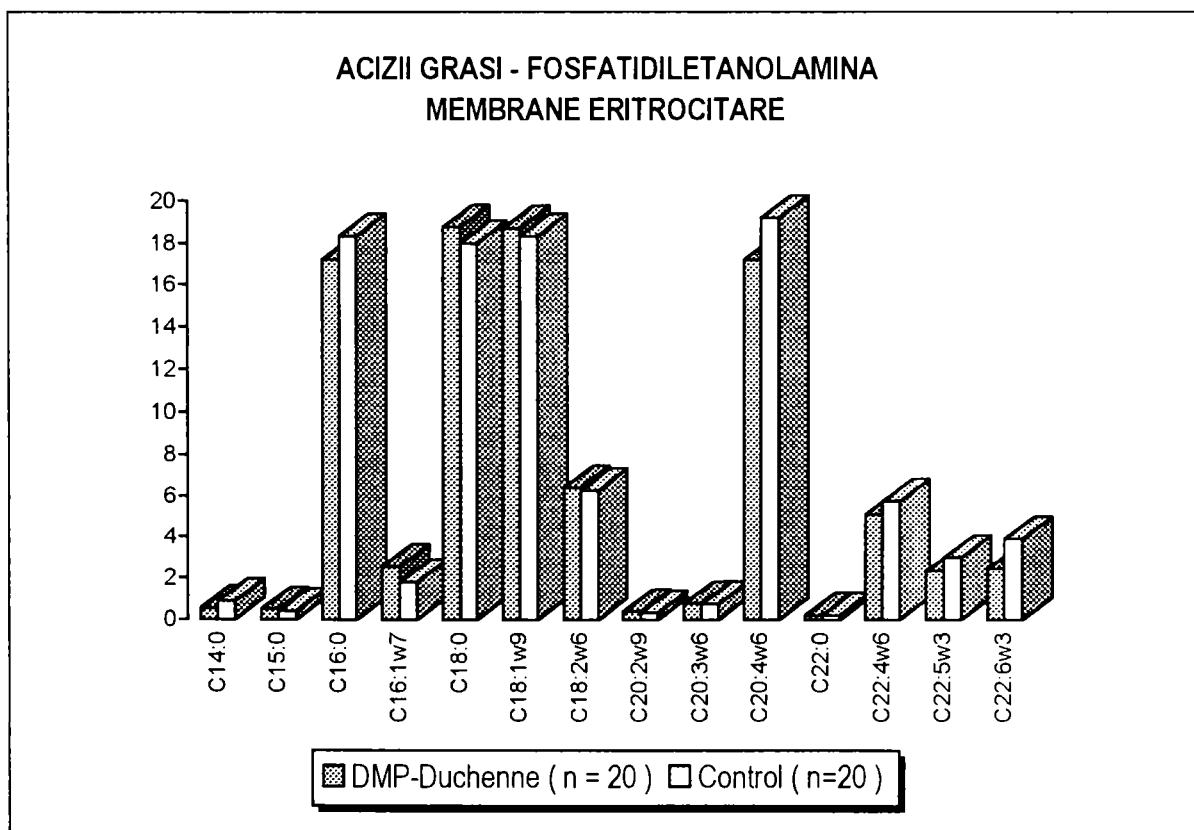


Fig.5-50.

Acizii grași din fracția fosfatidiletanolamină. Membrane eritrocitare la pacienți cu distrofie musculară progresivă Duchenne și controlii.

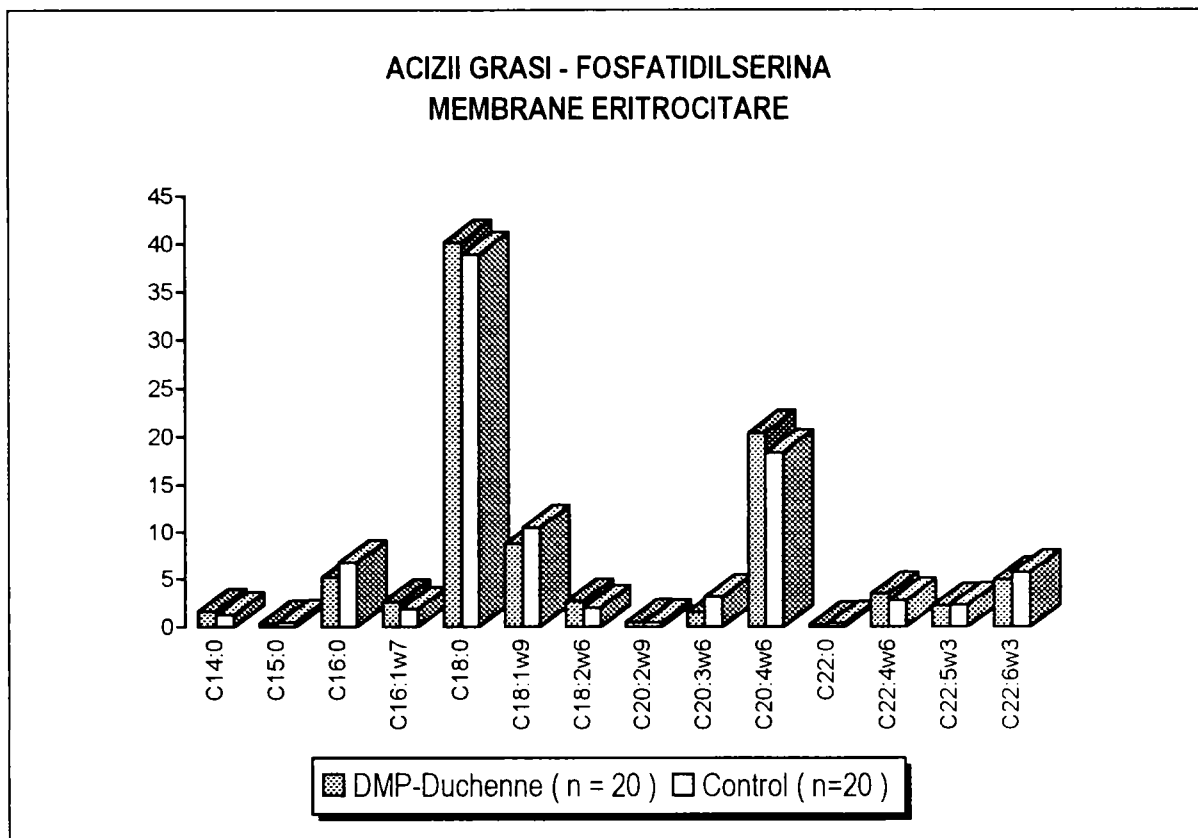


Fig.5-51.

Acizii grași din fracția fosfatidilserină. Membrane eritrocitare la pacienți cu distrofie musculară progresivă Duchenne și control.

Tabel 5-29.

Compoziția în acizi grași din fosfatidilcolină și sfingomielină din membranele eritrocitare

Acid gras	Fosfatidilcolină		Sfingomielină		p
	DMP-D	Control	DMP-D	Control	
C14:0	1.10 ± 0.2	1.20 ± 0.20	1.10 ± 0.2	1.20 ± 0.20	
C15:0	0.44 ± 0.10	1.10 ± 0.47	0.45 ± 0.20	0.45 ± 0.20	
C16:0	31.30 ± 0.52	32.54 ± 0.33	24.01 ± 2.00	26.00 ± 1.11	< 0.001
C16:1w7	1.91 ± 0.25	1.55 ± 0.30	1.40 ± 0.30	2.00 ± 0.35	< 0.001
C18:0	15.76 ± 0.85	14.51 ± 0.52	16.30 ± 2.45	11.44 ± 0.20	< 0.001
C18:1w9	18.95 ± 1.10	19.25 ± 1.00	7.33 ± 2.00	6.08 ± 1.20	
C18:2w6	19.20 ± 1.35	20.20 ± 0.75	2.20 ± 0.59	1.10 ± 0.12	< 0.001
C20:2w9	0.58 ± 0.30	0.25 ± 0.15	0.80 ± 0.15	0.15 ± 0.05	< 0.001
C20:3w6	1.22 ± 0.11	1.21 ± 0.20	Tr.	Tr.	
C20:4w6	4.70 ± 0.71	4.00 ± 0.20	2.50 ± 0.51	1.05 ± 0.2	< 0.001
C22:0	0.20 ± 0.10	0.20 ± 0.10	7.66 ± 0.66	8.44 ± 0.60	< 0.001
C22:4w6	0.35 ± 0.10	0.35 ± 0.10	Tr.	Tr.	
C24 : 0	Tr.	Tr.	10.49 ± 2.00	14.00 ± 1.40	< 0.001
C24 : 1w9	Tr.	Tr.	16.85 ± 2.10	19.55 ± 2.0	< 0.001
C22:6w3	0.55 ± 0.15	0.97 ± 0.21	1.10 ± 0.10	2.01 ± 0.20	< 0.001
Alți acizi	3.74	2.67	7.81	6.53	

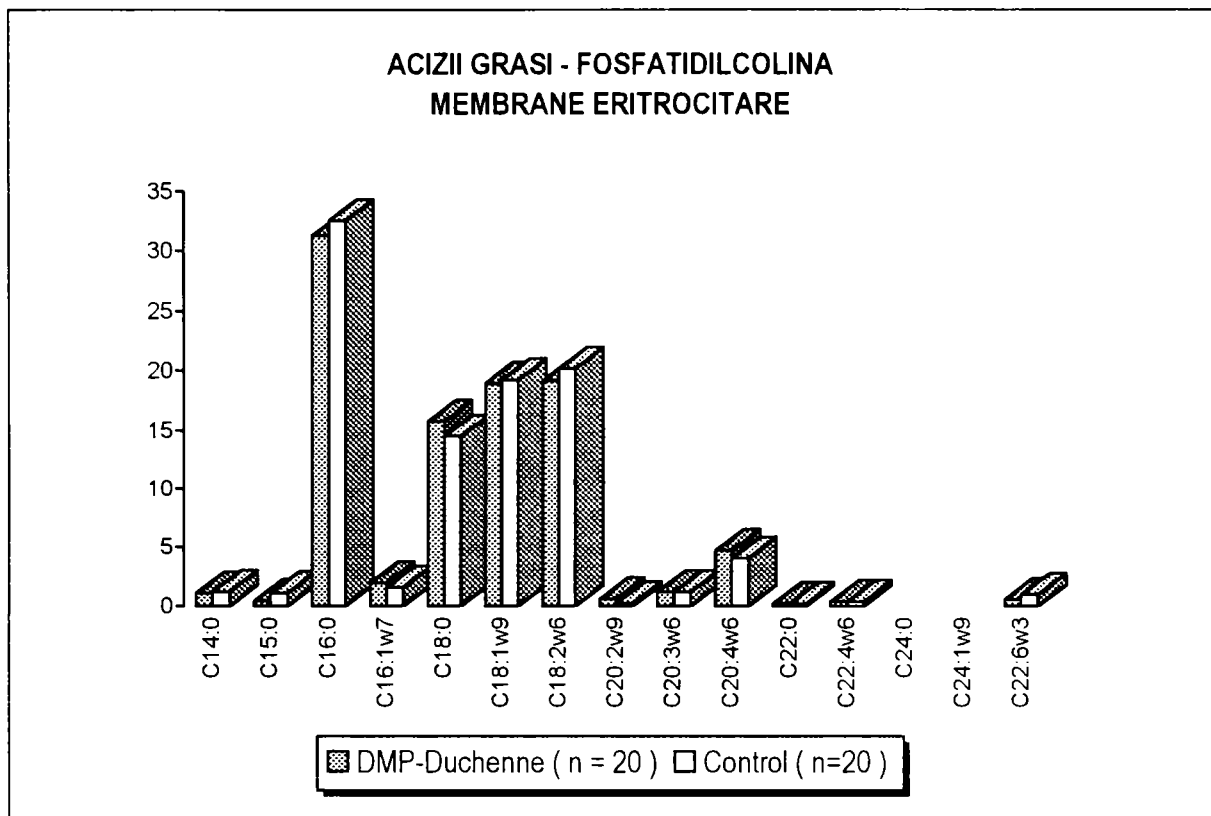


Fig.5-52.

Acizii grași din fracția fosfatidilcolină. Membrane eritrocitare la pacienți cu distrofie musculară progresivă Duchenne și control.

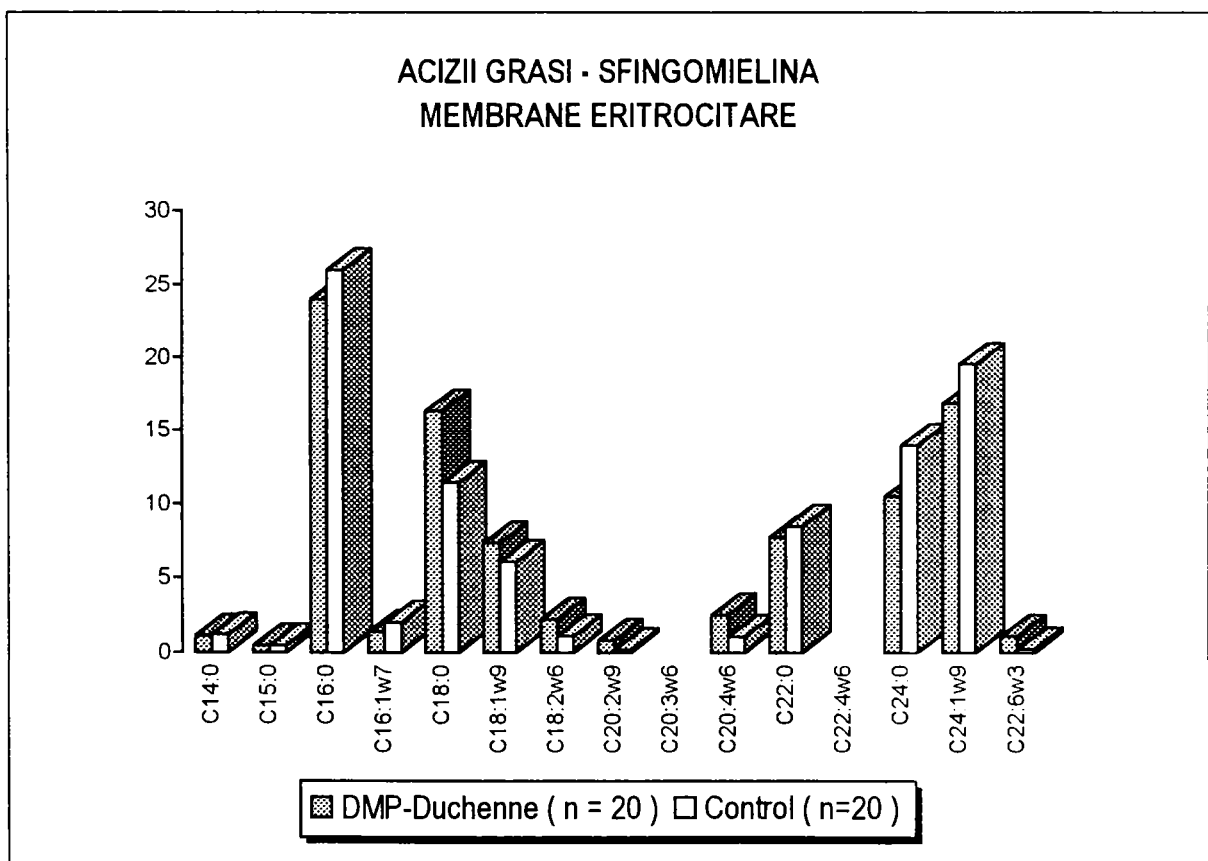


Fig.5-53.

Acizii grași din fracția sfingomielină. Membrane eritrocitare la pacienți cu distrofie musculară progresivă Duchenne și control.

Tabel 5-30.

Compoziția în acizi grași din Triacilgliceroli și Diacilgliceroli din membranele eritrocitare

Acid gras	Triacilgliceroli		Diacilgliceroli		p
	DMP-D	Control	DMP-D	Control	
C14:0	4.28 ± 1.00	3.81 ± 1.45	4.45 ± 2.0	5.32 ± 1.43	
C15:0	2.50 ± 0.20	1.78 ± 0.30	1.80 ± 0.34	3.45 ± 0.66	< 0.001
C16:0	20.05 ± 2.90	20.0 ± 1.60	15.80 ± 0.80	20.30 ± 2.74	< 0.001
C16:1ω7	8.21 ± 1.29	10.60 ± 2.29	4.00 ± 0.75	9.12 ± 2.70	< 0.001
C18:0	9.00 ± 1.10	9.50 ± 0.81	10.33 ± 0.90	9.23 ± 0.95	< 0.001
C18:1ω9	10.44 ± 0.72	12.71 ± 0.10	6.55 ± 1.45	10.25 ± 2.44	< 0.001
C18:2ω6	1.44 ± 0.21	1.72 ± 0.47	1.20 ± 0.20	1.0 ± 0.20	
C19:0	2.11 ± 1.33	1.20 ± 0.66	3.01 ± 1.20	3.67 ± 2.50	
C18:3ω6	2.19 ± 0.65	3.20 ± 1.51	2.84 ± 1.45	2.85 ± 1.44	
C20:2ω9	12.35 ± 2.55	8.81 ± 2.0	14.00 ± 2.00	9.90 ± 2.20	< 0.001
C20:3ω6	3.54 ± 1.45	5.54 ± 2.05	5.45 ± 1.78	3.60 ± 1.30	< 0.001
C22:0	10.12 ± 3.45	9.70 ± 1.44	13.90 ± 2.50	9.10 ± 1.20	< 0.001
Alți acizi	13.77	11.43	16.67	12.21	

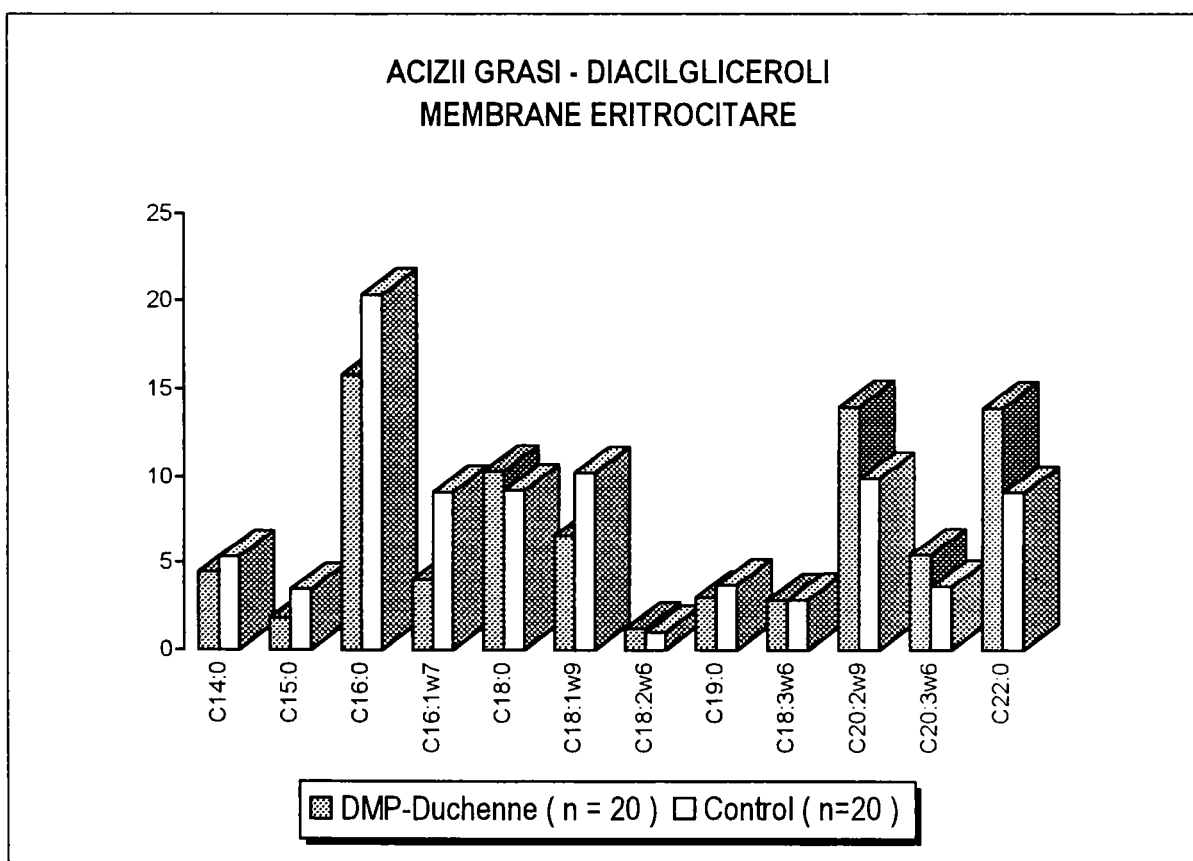


Fig.5-54.

Acizii grași din fracția diacilgliceroli. Membrane eritrocitare la pacienți cu distrofie musculară progresivă Duchenne și controlii.

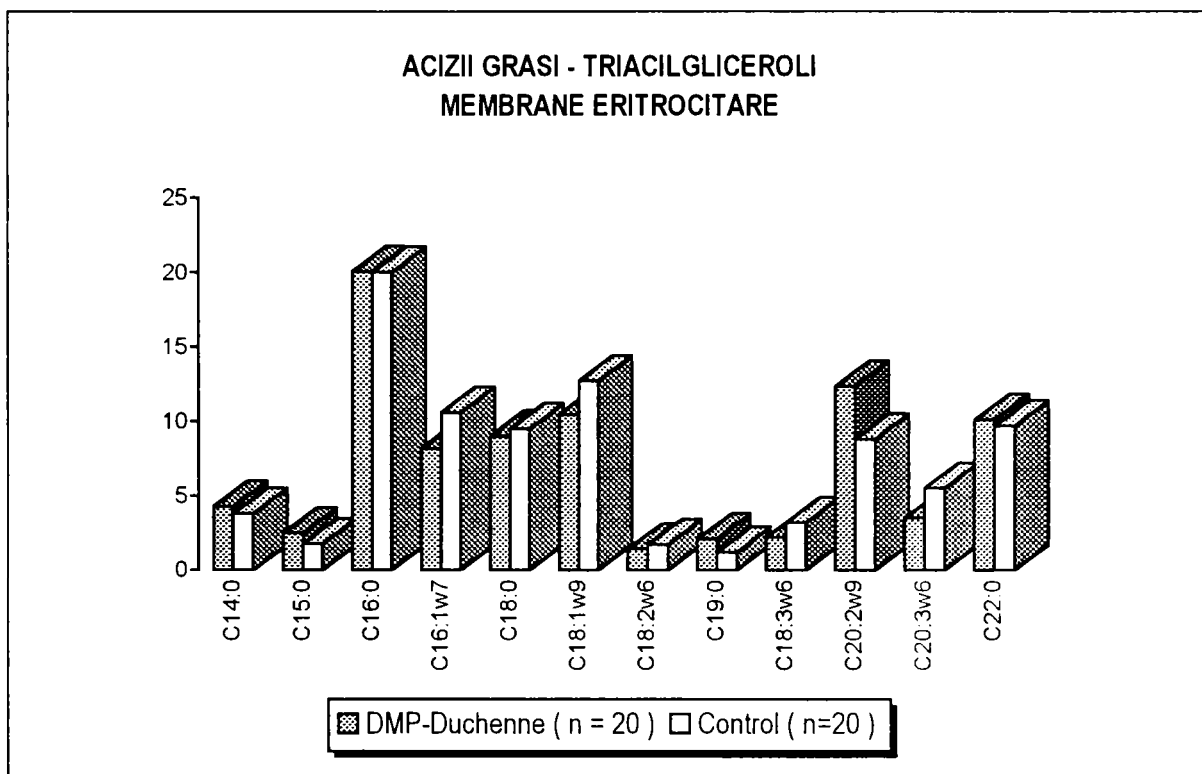


Fig.5-54.

Acizii grași din fracția triacilgliceroli. Membrane eritrocitare la pacienți cu distrofie musculară progresivă Duchenne și controlii.

Rezultatele prezentate fac parte dintr-un pachet de determinări structurate pe grupe de vârstă, grad de evoluție a bolii, etc.

Dificultatea interpretării stricte a acestor anomalii la momentul euristic actual este generată în primul rând de datele insuficiente asupra rolului și funcționabilității acizilor grași în agregatul membranar.

Cu toate acestea apare evidentă posibilitatea localizării primare sau secundare a defectului genetic responsabil de declanșarea distrofiei musculare progresive Duchenne la nivelul structurilor lipidice membranare. Modul cum aceste alterări contribuie la evoluția afecțiunii este încă obscur.

CONCLUZII

Sistematizarea și interpretarea rezultatelor obținute, reprezintă un domeniu extrem de dificil de abordat, în primul rând datorită numărului extrem de mic de publicații. Corelarea domeniului biochimic cu cel fiziologic și apoi cu cel clinic, este la acest moment euristic departe de a se fi realizat. Manifestarea biochimică și biomoleculară (de mare acuratețe și fapt esențial, manifestă cu mult anterior semnelor clinice) are de regulă surprinzător o pondere scăzută în decizia clinică și actul terapeutic (secundare, tardive, ulterioare).

Rezultatele experimentale obținute în studiul nostru permit concluziile:

1. Analiza datelor prezentate în referitoare la comportamentul enzimatic seric în cazul afecțiunilor de maladii neuro-musculare relevă:

1.1. **Aldolaza serică** - În studiul nostru am determinat aldolaza serică (1,6) la 576 de cazuri cu boli neuro-musculare, dintre care 80 cu distrofie musculară progresivă Duchenne. Paralel au fost incluse în studiu: 44 de cazuri distrofie musculară Becker-Kiener, 138 de cazuri distrofie musculară progresivă de centură, 85 de cazuri de distrofie musculară facio-scapulo umerală, 191 cazuri de maladie Charcot-Marie-Tooth, 22 de vectoare de distrofie musculară progresivă Duchenne, precum și 250 de martori, indemni de orice afecțiune neuro-musculară. Domeniul de definiție normal al Aldolazei a fost 0.5 - 3.1 mU/ml, cu o medie de 1.98 mU/ml. În cazul distrofiei musculare Duchenne, valoarea medie, semnificativ crescută s-a situat în jurul valorii de 7.90 mU/ml. Se pot face corelații între valorile aldolazei serice în distrofiile musculare progresive și diverși parametri, ca de exemplu, vârstă, sex, vechimea afecțiunii, forma clinică.

Corelația cu sexul. Se observă o creștere semnificativă a valorii aldolazei serice la pacienții de sex masculin față de bolnavii de sex feminin, ($p < 0.01$).

Corelația cu vechimea bolii. Se poate observa o creștere semnificativă a aldolazei serice la cazuri relativ recente (de debut) de distrofii musculare progresive (evoluție între 1-5 ani), ($p < 0.001$).

Corelația cu forma clinică. Creșterea maximă a aldolazei serice semnificativ statistic față de celelalte forme clinice se înregistrează în distrofia musculară progresivă Duchenne. Creșteri moderate sunt notate în distrofia musculară progresivă Becker-Kiener, forma centurilor și facio-scapulo-umerală. Maladia Charcot-Marie-Tooth, a prezentat numai rareori valori moderat crescute.

Creșterea aldolazei serice în distrofiile musculare progresive este interpretată ca expresie a unei alterări de permeabilitate a membranei musculare.

1.2. **Creatin-Fosfo Kinaza serică.** În cazul maladii Duchenne, activitatea creatin-fosfo-kinaza serice poate prezenta valori crescute de peste 50 de ori valoarea maximă normală. Creșteri moderate de activitate enzimatică sunt notate și în infarctul miocardic. Analiza statistică relevă aceleași corelații ca și în cazul aldolazei serice. Valorile medii prezentate în tabelele menționate sunt un suport experimental afirmațiilor noastre.

1.3. **Transaminazele oxalacetică și piruvică.** Transaminazele, TGO și TGP pot fi crescute în distrofiile musculare primitive. TGO este crescută și în cazul infarctului miocardic. Transaminazele se păstrează în limitele normale în cazul atrofiilor musculare neurogene. Interesant de remarcat comportamentul transaminazei oxalacetice; aceasta având o origine musculară și hepatică preponderentă, are tendința de a răspunde relativ prompt oricărei suferințe musculare sau hepatice. Creșterea activității TGO este urmată aproape imediat de o modificare homeostatică a TGP. Raportul de *Ritis*, TGO/TGP are normal o valoare cuprinsă între 1.33-1.80. Creșterea a transaminazei oxalacetice consecință a suferinței

musculare, este urmată de o creștere relativ lentă a TGP. După o perioadă de activitate enzimatică ridicată revenirea spre domeniul normal al TGO, lasă un TGP crescut un interval mai mare sau mai mic funcție de stadiul și evoluția bolii.

1.4. **Lactat dehidrogenaza** marchează variații asemănătoare creatin fosfo kinazei, dar cu specificitate difuză.

Există în aproape toate cazurile o corelație între forma clinică a distrofiei musculare progresive și variația activității enzimaticice.

La modul general, creșterile notabile ale creatin fosfo kinazei sunt marcate și specifice; aldolaza serică și transaminazele sunt moderat crescute, lactat dehidrogenaza și izoenzimele ei au o creștere pronunțată. Modificările enzimaticice serice sunt rezultatul evident al unor suferințe musculare :

1.5. Gradul de anormalitate enzimatică depinde de severitatea și întinderea proceselor distrofice. Distrofia musculară progresivă Duchenne, este maladia cea mai severă din acest grup, caracterizată se abateri majore de la domeniile de definiție normale în special în cazul creatin fosfo kinazei. În tipul facio-scapulo-umeral activitățile enzimelor serice sunt moderat crescute asemănător cu distrofia musculară de centură. Un grup aparte îl constituie distrofia musculară Becker-Kiener, cu un aspect enzimatic oarecum asemănător distrofiei Duchenne.

1.6. Emisia enzimelor în sânge se diminuează pe măsură ce țesutul muscular degenerază și este înlocuit cu țesut colagenic și adipos. Această influență a evoluției bolii este netă în cazul distrofiei Duchenne; am observat activități enzimaticice serice mult crescute în prima copilărie (la debut); activitățile se diminuează pe măsură ce afecțiunea progresează și au tendința de a se stabili la o valoare foarte ridicată (dar inferioară momentului inițial) care se menține până în stadiul terminal. Analiza enzimatică, pe un număr mare de cazuri, a evidențiat mai multe stadii de evoluție subclinice. Evoluția este analogă în distrofia Becker-Kiener și facio-scapulo-umerală. În cazul distrofiei musculare de centură evoluția este mult mai lentă și mai neregulată.

1.7. Mușchiul afectat eliberează permanent enzime în sânge, atâta timp cât el este activ. Valorile enzimaticice pot reflecta o perioadă de imobilizare (de exemplu la pat) prin diminuarea activităților serice. Variabilitatea activităților enzimaticice serice la pacientul tânăr are ca explicație importanța încă mare a masei musculare precum și capacitățile funcționale încă ridicate.

1.8. Toate modificările enzimaticice serice au la bază alterări morfo-funcționale și de compoziție ale membranelor musculare.

2. Rezultatele dozărilor colesterolului total, triacilglicerolilor, fosfolipidelor, lipoproteinelor, acidului uric, creatininei și bilirubinei totale.

2.1. În cazul afecțiilor de distrofie musculare progresive Duchenne, domeniul de variație al colesterolului seric este 2.46 - 6.43 mmol/l cu o medie de 4.13 ± 0.53 mmol/l; fosfolipidele serice variază în domeniul 1.92 - 3.94 mmol/l, cu o medie de 2.78 ± 0.23 , iar triacilglicerolii sunt plasați în intervalul 0.67 - 2.06 mmol/l cu o medie de 1.14 ± 0.21 . Raportul colesterol / fosfolipide este 1.49 ± 0.102 . Acidul uric este definit pe domeniul 154.7 - 515.57 μ mol/l, cu valoarea medie 283.32 ± 68.49 .

Analiza statistică a rezultatelor remarcă cantonarea rezultatelor medii în domenii de interferență ale patologicului cu normalul.

2.2. În cazul subiecților cu distrofie musculare progresive Becker-Kiener, domeniul de variație al colesterolului seric este 2.26 - 5.85 mmol/l cu o medie de 4.62 ± 0.62 mmol/l; fosfolipidele serice variază în domeniul 1.85 - 4.16 mmol/l, cu o medie de 2.97 ± 0.28 , iar triacilglicerolii sunt plasați în intervalul 0.31 - 1.53 mmol/l cu o medie de 0.98 ± 0.18 . Raportul colesterol / fosfolipide este 1.55 ± 0.17 .

Acidul uric este definit pe domeniul 146.87 – 332.37 $\mu\text{mol/l}$, cu valoarea medie 239.62 ± 19.55 .

2.3. Distrofia musculară progresivă forma centurilor, are domeniul de variație al colesterolului seric 2.90-5.15 mmol/l cu o medie de 4.10 ± 0.28 mmol/l; fosfolipidele serice variază în domeniul 1.72 - 3.61 mmol/l, cu o medie de 2.53 ± 0.14 , iar triacilglicerolii sunt plasați în intervalul 0.55 - 2.93 mmol/l cu o medie de 0.93 ± 0.19 . Raportul colesterol / fosfolipide este 1.62 ± 0.12 .

Acidul uric este definit pe domeniul 160.49 – 582.51 $\mu\text{mol/l}$, cu valoarea medie 347.38 ± 39.52 .

2.4. În cazul afecțiilor de distrofie musculară progresivă facio-scapulo-umerală, domeniul de variație al colesterolului seric este 2.90–9.27 mmol/l cu o medie de 4.69 ± 1.47 mmol/l; fosfolipidele serice variază în domeniul 1.79 - 5.08 mmol/l, cu o medie de 3.07 ± 0.81 , iar triacilglicerolii sunt plasați în intervalul 0.53–4.54 mmol/l cu o medie de 1.47 ± 0.97 . Raportul colesterol / fosfolipide este 1.56 ± 0.63 .

Acidul uric este definit pe domeniul 65.45 – 422.65 $\mu\text{mol/l}$, cu valoarea medie 309.13 ± 99.25 .

2.5. Afecțiunea Charcot-Marie-Tooth (neurogenă), are domeniul de variație al colesterolului seric 2.51 – 9.08 mmol/l cu o medie de 4.48 ± 0.97 mmol/l; fosfolipidele serice variază în domeniul 1.85 – 5.50 mmol/l, cu o medie de 3.08 ± 0.58 , iar triacilglicerolii sunt plasați în intervalul 0.22 – 6.54 mmol/l cu o medie de 1.13 ± 0.71 . Raportul colesterol / fosfolipide este 1.47 ± 0.29 .

Acidul uric este definit pe domeniul 143.99–580.52 $\mu\text{mol/l}$, cu valoarea medie 333.59 ± 47.07 .

3. Separarea și dozarea acizilor grași serici constituenți, a fost înregistrată pe un lot de 20 de pacienți clinic și anatomo-patologic confirmați ca suferind de distrofie musculară Duchenne, precum și 10 vechi sigure

4. Fiecare clasă lipidică este caracterizată de un profil al acizilor grași specifici.

4.1. Fosfatidilcolina are majoritar acid palmitic (C16:0), și acid linoleic (C18:2 ω 6), fosfatidiletanolamina, acid oleic (C18:1 ω 9) și acid arachidonic (C20:4 ω 6), fosfatidilserina, acid stearic (C18:0) și acid arachidonic (C20:4 ω 6). Prin contrast glicerofosfolipidele au numai câțiva acizi grași cu mai puțin de 20 de atomi de carbon, (de exemplu în sfingomielină mai puțin de 50% din acizii grași au peste 20 atomi de carbon dintre care acidul lignoceric (C24:0) și nervonic (C24:1 ω 9) sunt majoritari. O prezentare în detaliu a rezultatelor obținute este redată în tabelele de mai sus.

4.2. Teoretic, modificările activităților enzimice, morfologia celulei, biofizica membranei și fenomenelor de transport ionic, întâlnite în cazul distrofiilor musculare pot fi explicate de un defect primar la nivelul metabolismului lipidic.

4.3. Proporția relativă a diferitelor fosfolipide, lungimea catenei și gradul de saturare al diferiților acizi grași constituenți ai claselor lipidice, conținutul de sterol al membranei plasmatică își aduc o contribuție majoră la structura și funcționarea membranei.

4.4. Modificările de concentrație a acizilor grași semnalate răspund cel puțin la modul teoretic de alterările biofizice ale membranelor eritrocitare.

5. Anormalitățile statusului oxidativ semnalate, corelate cu alterările acizilor grași, deschid un domeniu generos de studiu asupra etiopatogenezei secundare distrofiilor musculare progresive.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. ABEYWARDENA M.Y.; HEAD R. J. - Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function., *Cardiovascular research*, 52; (3); p361-71, Dec 2001.
2. ABLORDEPPEY S.Y.; FAN P.; ABLORDEPPEY J.H.; MARDENBOROUGH L., - Systemic antifungal agents against AIDS-related opportunistic infections: current status and emerging drugs in development., *Current medicinal chemistry*, 6 (12) p1151-95, Dec 1999.
3. ABRAMSON D., BLECHER, M.,- Quantitative two-dimensional thin-layer chromatography of naturally occurring phospholipids, *J.Lipid Res.*, 5, p628, 1964.
4. ACKMAN R.G., HOOPER S.N., HOOPER D.L., - Linoleic Acid artefacts from the deodorization of oils, *J.Am. Oil Chem.Soc.* 51, p42-49, 1979.
5. ADKISSON H.D., RISENER F.S., ZARRINKAR P.P., WALLA M.D., CHRISTIE W.W., WUTHIER R.E., - Unique fatty acid composition of normal cartilage: Discovery of high n-9 eicosatrienoic acid and low levels of n-6 polyunsaturated fatty acids, *FASEB J.* 5, p344-353, 1994.
6. AGOSTONI C.,TROJAN S., BELLU R., RIVA E.,GIOVANNINI M. – Neurodevelopmental quotient of healthy term infants at 4 months and feeding practice: the role of long-chain polyunsaturated fatty acids., *Paediat. Res.*, 38, p262-266, 1995.
7. AGUILERA C.M.; RAMIREZ-TORTOSA M.C.; MESA M.D.; GIL A. - Protective effect of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the development of cardiovascular disease, *Nutricion hospitalaria* 16; (3); p78-91, 2001.
8. AHRENS E.H., BLANKENHORN D.H., TSALTAS T.T. – Effect on human serum lipids of substituting plant for animal fat in diet., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86, p872-8, 1954.
9. AHRENS E.H., INSULL W., HIRSCH J., - The effects on human serum lipids of dietary fat, highly unsaturated, but poor in essential fatty acids., *Lancet* 1, p115-119, 1959.
10. ALEXANDER L.R., JUSTICE JR.J.B., MADDEN J., - Fatty Acid composition of Human Erythrocyte Membranes by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J.Chromato.* 342, p1-12, 1985.
11. ALLEN B.R., - Fish oil in combination with other therapies in the treatment of psoriasis., In : Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E., Barlow S.M., (eds.), Health effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids in: Seafood's, *World Rev. Nutr. Diet*, 66, p436-445, 1991.
12. ALMÉ B., BREMMELGAARD A., SJÖVALL J., THOMASSEN P. - Analysis of metabolic profiles of bile acids in urine using a lipophilic anion exchanger and computerized gas-liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Lipid Research*. 18, p339-362, 1977.
13. AMENTA J.S., - A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography., *J.Lipid.Res.*5, p270, 1964.
14. AMORIM CRUZ JA; MOREIRAS O; BECKER W; VAN AMELSVOORT JM; VIDAL-JESSEL S; SALMINEN I; MOSCHANDREAS J; SIGFUSSON N; MARTINS I; CARBAJAL A; YTTERFORS A; POPPEL G. - Association between trans fatty acid intake and cardiovascular risk factors in Europe: the TRANSFAIR study. - van de Vijver LP; Kardinaal AF; Couet C; Aro A; Kafatos A; Steingrimsdottir L (eds); *European journal of clinical nutrition* 54 (2) p126-35, Feb 2000.
15. ANDERSON J L; HEAD S I; RAE C; MORLEY J W.- Brain function in Duchenne muscular dystrophy., *Brain; a journal of neurology* 125; (Pt 1); p4-13, Jan 2002 .
16. ANDERSON R.E. – Lipids of ocular tissues. IV. A comparison of the phospholipids from the retina of six mammalian species., *Exp.Exe Res.*, 10,p339-344,1970.
17. ANDERSON R.E., FELDMAN L.S., FELDMAN G.L.- Lipids of ocular tissues II. The phospholipids of mature bovine and rabbit whole retina. *Biochem. Biophys. Acta*, 202,

- p307, 1970.
18. ANDERSON R.E., MAUDE M.R., LEWIS R.A., NEWSOME, FISHMAN G.A., - Abnormal plasma levels of polyunsaturated fatty acid in autosomal dominant retinitis pigmentosa., *Exp.Eys Res.*44,p155-158, 1987.
 19. ANDERSON R.E., SPERLING L. – Lipids of ocular tissues VII. Positional distribution of the fatty acids and the phospholipids of bovine rod outer segments., *Arch. Biochem.Biophys.*,144, 673,1971.
 20. ANDO S., KON K., TANAKA Y., - High-Precision TLC-Densitometry of Membrane Lipids, in : *Membrane Fluidity; Biophysical Techniques and Cellular Regulation*, Ed. Morris Kates and Amis Kuksis, *The Humana Press* p.43, 1980.
 21. ANGERER P.; VON SCHACKY C - n-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. *Current opinion in lipidology* 11;(1); p57-63, Feb 2000.
 22. ANGERER P; VON SCHACKY C.,- n-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 3; (6); p439-45, Nov 2000.
 23. ARCHER S., GREEN D., CHAMBERLAIN M., DYER A.R., - Association of dietary fish and n-3 fatty acid intake with hemostatic factors in the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) Study., *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 18,7, p1119-1123, 1998.
 24. ARVIDSON G.A.E. - Fractionation of naturally occurring lecithins according to degree of unsaturation by thin layer chromatography, *J.Lipid Res.* 6,p574, 1965.
 25. ASCHERIO A., HENNEKENS C.H., BURNING J.E., MASTER C., STAMPFER M.J., WILLETT W.C., - Trans fatty acids intake and risk of myocardial infarction, *Circulation*, 89,p94-101, 1994.
 26. ASKANAS V. - New pathogenetic consideration in inclusion-body myositis: importance of cholesterol and related mecanisms, *The 6th Congress of Mediterranean Society of Myology*, p23-26 May, 2002.
 27. ATLAN H. – On a formal definition of organization, *J. theor. Biol.*,45, p295-304,1974.
 28. BABIN F., ABDERRAZIK M., FAVIER F., CRISTOL J.P., LEGER CL., PAPOZ L., DESCOMPS B.- Differences between polyunsaturated fatty acid status of non- institutionalised elderly women and younger controls: a bioconversion defect can be suspected., *European journal of clinical nutrition*, 53 (8) p591-6, Aug 1999.
 29. BĂCANU I., THOMAS ST.,T., BĂCANU S.AL., IONESCU I., SÂRZEA S.,-Oligoelements Modulators. *Terapeutica I*, 3,p39-43, 1994.
 30. BĂCANU I., THOMAS ST.,T., BĂCANU S.AL., IONESCU I., SÂRZEA S.,- Oligoelements Modulators – A New Therapeutical Class., *Terapeutica II*,1,p41-46, 1995.
 31. BĂCANU I., THOMAS ST.,T., BĂCANU S.AL., IONESCU I., SÂRZEA S.,- Oligoelements Modulators, *Xth National Congress of Pharmacy, Cluj-Napoca*, 22-24 sept. 1994.
 32. BALANCO F.J., LOTZ M., - IL-1 induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE₂, *Exp.Cell.Res.* 218,p319-325,1995.
 33. BALLANTYNE CM. - Reducing atherothrombotic events in high-risk patients:recent data on therapy with statins and fatty acids. *Current atherosclerosis reports* 1; (1); p6-8, Jul 1999.
 34. BANG H.O., DYERBERG J.,- Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic West-cost Eskimos, *Acta Med. Scand.* 192, p85-94, 1972.
 35. BANG H.O., DYERBERG J., HJORNE N. – The composition of food consumed by Greenland Eskimos, *Acta Med. Scand.* 200, p69-73, 1976.
 36. BANGHAM A.D.–Lipid bilayers and biomembranes. *Annu. Rev. Biochem*, 41, p753, 1972.
 37. BAO D.Q., MORI T.A., BURKE V., PUDDLEY I.B., - Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives., *Hypertension*, 32, 4, p710-717, 1998.

38. BARANAY M., CHALOVICH J.M., GLONEK T.- Nuclear magnetic resonance studies of muscle, in: *Disorders of the motor unit (Schotland D.L., (ed.) Wiley Interscience, New York, p697, 1984.*
39. BARCELLI U.O., GLASS-GREENWALT P., POLLAK V.E.,- Enhancing effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on plasma fibrinolysis in normal subjects. *Thromb. Res.*, 39, p307-312, 1985.
40. BARON R., - Anatomy and ultrastructure of bone, In: Favus M.J.,(ed.) – *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. ed. 2, New York, Raven Press, p3-9, 1993.*
41. BARTLETT G.R., - Phosphorous assay in column chromatography, *J.Biol. Chem.* 234,p466, 1959.
42. BAYLINK D.J., FINKELMAN R.D., MOHAN S.,- Growth factors to stimulate bone formation., *J.Bone Miner.Res.*,8,pS565-S572, 1993.
43. BAZAN N.G., SCOTT B.L., REDDY T.S., PELISA M.Z. – Decreased content of docosahexaenoic and arachidonate in plasma phospholipids in Usher's Syndrome. *Biochem. Biophys Res Commun*, 141,p 600-604, 1986.
44. BEAUVAIS P. - Dystrophie musculaire de Duchenne. Epidemiologie, genetique, diagnostic., *La Revue du praticien (France) 51; (13); p1473-6, Sep 1, 2001.*
45. BECHOUA S; DUBOIS M; NEMOZ G; CHAPUY P; VERICEL E; LAGARDE M; PRIGENT AF. - Very low dietary intake of n-3 fatty acids affects the immune function of healthy elderly people., *Lipids*, 34 Suppl pS143, 1999.
46. BECKER P.E.–*Dystrophia musculorum progressiva, Stuttgart ,Ed. Thieme, p56-98, 1953.*
47. BECKMAN R., - Detection of preclinical Duchenne muscular dystrophy and its female carriers., *Isr. J. Med.Sci.* 13, p18-22, 1977.
48. BECKMAN R., SAUER M., KETELSEN U.P., SCHEUERBRANDT G., - Early diagnosis of Duchenne muscular dystrophy., *Lancet*, 2, p105, 1978.
49. BECKMAN R., SCHEUERBRANDT G., - Screening auf erhöhte CK-Aktivitäten zur Früherkennung der Duchenne Muskel-Dystrophie., *Kinderärztl.* 7, p1267-1272, 1976.
50. BELCH J.J; MUIR A. - n-6 and n-3 essential fatty acids in rheumatoid arthritis and other rheumatic conditions. *Proceedings of the Nutrition Society (ENGLAND) 57; (4); p563-9, Nov 1998.*
51. BELEZNAY Z., ZACHOWSKI A., DEVAUX P.F., NAVAZO M.P., OTT P.,- ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport. *Biochemistry.* 32(12):p3146-52, 1993.
52. BELEZNAY Z., ZACHOWSKI A., DEVAUX-P.F., OTT P., - Inhibition of aminophospho-lipid translocation in red cell vesicles. *Biochem-Soc-Trans.* 21(2):p76S, 1993.
53. BENGA G.,- *Biologia Moleculară a Membranelor cu Aplicații Medicale, ed. Dacia, Cluj-Napoca, p.22, 1979.*
54. BENGA G., POPESCU O., POP V.I., MURESAN A., BORZA V., HODARNAU A., BENGA I., IONESCU I., POPESCU M., SERBU A.M., - Studies of water permeability and proteins of erythrocyte membranes in patients with Duchenne muscular dystrophy, *Muscle & Nerve vol.12.No.4, p.294-301, April. 1989.*
55. BENGA GH. , TAGER J.M., - *Biomembranes. Basic and Medical Research, Springer-Verlag New York, 1988.*
56. BENGA GH., - *Structure and properties of cell membranes, vol. 1-3, CRC press, Boca Raton, 1985.*
57. BENGA GH., BAUM H., KUMMEROW F.A. – *Membrane Processes. Molecular Biology and Medical Applications, Springer- Verlag New York, 1984.*
58. BENGA GH., IONESCU M., POPESCU O., POP V.I., - Effect of chlorpromazine on proteins in human erythrocyte membranes as inferred by spin labeling and biochemical analyses,

- Mol.Pharmacol*, 2 , p771-778, 1983.
59. BENGA GH., MORARIU V. V., - Membrane defect affecting water permeability in human epilepsy, *Nature (London)*, 265, p636 – 638, 1977.
 60. BENGA GH., POP V. I., IONESCU M., HOLMES R. P., POPESCU O., - Irreversible inhibition of water diffusion through erythrocyte membranes by fluoresceinmercuric acetate, *Cell Biol. Int.Rep.* 6,p775-781, 1982.
 61. BENGA GH., POP V.I., IONESCU M., MIHELE V. , - Water exchange through erythrocyte membranes: nuclear magnetic resonance studies of the effects of inhibitors and chemical modification of human membranes. *J Membr. Biol.*76, p129-137, 1983.
 62. BENGA GH., POPESCU O., BORZA V., MURESAN A., BENGA I., MÖCSY I., BRAIN A., WRIGGLESWORTH J.M. - Water permeability of human erythrocytes: identification of membrane proteins involved in water transport, *Eur. J. Cell Biol*, 41, p252-262, 1986.
 63. BENGA GH., POPESCU O., POP V.I., MURESAN A., BORZA V., HODARNAU A., BENGA I., IONESCU I., POPESCU M., SERBU A.M., - Studies of water permeability and proteins of erythrocyte membranes in patients with Duchenne Muscular Dystrophy., *Muscle & Nerve* vol.12.No.4, p.294-301. April.1989.
 64. BENGA GH., POPESCU O., POP V.I., MURESAN A., HODARNAU A., BENGA I., HOLMES R.P., WRIGGLESWORTH J.M., BRAIN A., MÖCSY I., IONESCU I., SERBU A.M. - Membrane proteins involved in water permeability of human erythrocytes and pathological changes of this transport process, in: *Federation of European Biochemical Societies Advanced Course "Biomembranes and Diseases"* p.72, June 1986.
 65. BENITO P., NELSON G.J., KELLEY D.S., BARTOLINI G., SCHMIDT P.C., SIMON V. -The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids*, 36; (3); p229-36, Mar 2001.
 66. BERARDINELLI A., CONTI C., GRANOCCHIO E., ROSSI M., ROSSO E., LANZI G. - Neuropsychological and linguistic profile of children affected by Duchenne and Becker muscular dystrophies., *The 6th Congress of Mediterranean Society of Myology*, p23-26 May, 2002.
 67. BERDEAUX O., SEBEDIO J.L., CHARDIGNY J.M., BLOND J.P., MAIROT T.H., VATELE J.M., POUILLAIN D., NOEL J.P. – Effects of trans n-6 fatty acids on the fatty acid profile of tissues and liver microsomal desaturation in the rat. *Grasas Aceit.* 47, p86-99, 1996.
 68. BERGAMI R; MARANESI M; MARCHETTI M; SANGIORGI Z; TOLOMELLI B. - Influence of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma lipemic effect of vitamin B6 deficiency. *International journal for vitamin and nutrition research* 69 (5) p315-21, Sep 1999.
 69. BERGMAYER U. - *Methods Of Enzymatic Analysis*–Verlag Chemie Weinheim, Academic Press, Inc. New York and London, 2, p903, Ed. 1974.
 70. BERNARD C.– *Introducere în studiul medicinei experimentale*, Ed. Științifică, p45, 1958.
 71. BERNSOHN J., STEPHANIDES L.M., - Aetiology of multiple sclerosis. *Nature*, 215,p821,1967.
 72. BEYERS E.C., EMKEN E.A. - Metabolites of cis, trans, and trans, cis isomers of linolenic acid in mice and incorporation into tissue lipids. *Biochim. Biophys Acta*, 1082, p275-284, 1991.
 73. BIERI J.G., PRIVAL E.L. - Lipid composition of testes from various species, *Comp. Biochem.Physiol.*, 15,p275, 1967.
 74. BIERMAN E.L., GORDIS E., HAMLIN J.T. - Heterogenicity of fat particles in plasma during alimentary hyperlipemia. *Journ. Clin.Invest.*, 41, p2254, 1962.
 75. BILLMAN G.E., HALLAQ H., LEAF A., - Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by ω 3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, p4427-4430, 1994.
 76. BIRCH D.G., ANDERSON J.L., BIRCH E.E., - Early abnormalities of rod function in children with X-linked retinitis pigmentosa., *Clin.Vision Sci.*,8, p329-335, 1993.

77. BIRCH D.G., BIRCH E.E., HOFFMAN D.R., UAUY R.D., - Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development., *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.*33, p3242-3253, 1992.
78. BIRCH D.G., BIRCH E.E., HOFFMAN D.R., UAUY R.D., - Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33,p2365-2376, 1992.
79. BLAIR H.C., SCHLESINGER P.H., ROSS F.P., TEITELBAUM S.L., - Recent advances toward understanding osteoclast physiology.*Clin. Orthop.*,294,p7-22,1993.
80. BLAKE DJ; KROGER S. - The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?, *Trends in neurosciences* 23 (3) p92-9., Mar 2000.
81. BLANK M.L., PRIVETT O.S. – Studies on the metabolism of cis, trans, isomers of methyl linoleate and linolenat, *J. Lipid. Res*, 4, p470-476, 1963.
82. BLANKENHORN D.H., ROUSER G., WEIMER T.J., - A method for the estimation of blood glycerides employing florisil. *J.Lipid Res.* 2,p282, 1961.
83. BLOOR W.R.- A method for the determination of fat in small amounts of blood. *J.Biol. Chem.* 17, p377 ,1914
84. BLOOR W.R.- The determination of small amounts of lipid in blood plasma *J.Biol. Chem* 77, p53 , 1928.
85. BOATELLA J., RAFECAS M., CODONY R., GILBERT A., RIVERO M., TURMO R., INFANTE D., VALVERDE F.S. – Trans fatty acid content of human milk in Spain., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*16, p432-434, 1993.
86. BOGDANSKI K.,- Déduction du genre des couplages rétroactifs négatifs sur lequel repose l' homéostasie biotique d'un facteur dimensionnel élémentaire unique, *Cybernetica*, vol. 16,p99-112,1973.
87. BOGDANSKI K.,-The place of the living organisms in the size scale, *Bull.Acad.Polon.Sci, Cl. II*, vol.18, p187-192, 1970.
88. BONNA K.H., BJERVE K.S., STRAUME B., GRAM I.T., THELLE D., - Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension. A population-based intervention trial from the Tomaso Study, *N.Engl. J.Med*, 322, p795-801, 1990.
89. BÖRGSTRÖM B., - Investigation on lipid separation methods. Separation of phospholipids from neutral fat and fatty acids., *Acta physiol.scand.* 25,p111, 1952
90. BOURRE J.M, FRANCOIS M, YOUYOU A., DUMONT O., PICIOTTI M., PASCAL G., DURAND G. The effects of dietary α -linolenic Acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats, *J.Neurochem* 119, p1880-1892,1989.
91. BOURRE J.M., PASCAL G., DURAND G., MASSON M., DUMONT O., PICIOTTI M., - Alteration in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids., *J.Neurochem.*, 43, p342,1984.
92. BRADEN G.A., KNAPP H.P., FITZGERALD D.J., FITZGERALD G.A., - Dietary fish oil accelerates the response to coronary thrombolysis with tissue plasminogen activator. Evidence for a modest platelet inhibitory effect in vivo., *Circulation*, 82, p178-187,1990.
93. BRECKENRIDGE W.C., GOMBOS G., MORGAN I.G. - The lipid composition of adult rat brain synaptosomal membranes., *Biochem Biophys Acta* p266-695, 1972.
94. BRECKENRIDGE W.C., MORGAN I.G. ZANETTA J.P., VINCENDON G. - Adult rat brain synaptic vesicles II. Lipid composition, *Biochem Biophys Acta*, p320-681. 1973.
95. BROEKHUYSE R.M. – Long-term storage of erythrocytes for quantitative analyses of lipids. *Clin.Chim.Acta*,52, p53-58,1974.
96. BRONTE-STEWART B., ANTONIS A., EALES L., BROCK J.F., - Effects of feeding different fats on serum-cholesterol level, *Lancet*,1,p521-527, 1957.

97. BROUSSEAU ME; SCHAEFFER EJ. - Diet and coronary heart disease: clinical trials, *Current atherosclerosis reports* 2; (6); p487-93, Nov 2000.
98. BROWN A.J., ROBERTS D.C.K., - Fish and fish oil intake-effect on hematological variables related to cardiovascular disease. *Thromb. Res.* 64, 169-178, 1991.
99. BROWN AA; HU FB - Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease., *American journal of clinical nutrition* 73; (4); p673-86, Apr 2001.
100. BUCOLO, G., DAVID, H., - *Scand.J.Clin.Invest.*, 29, Suppl.126, Abst.3, p19, 1972.
101. BURR M.L., FEHILY A.M., GILBERT J.F. - Effect of changes in fat, fish and fibre intake on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART), *Lancet*, 2, 757-761., 1989.
102. BURSTEIN M., - Les lipoprotéines du plasma humain, *Bull.schweiz. Akad.med. Wiss*, 17, p 92, 1961.
103. Burstein M., Samaille J., - Sur le dosage immunologique des β - lipoprotéins, *Rev. franç. Étud. Clin. Biol.* 3, p780, 1958
104. BYSTED A; COLD S; HOLMER G. - An optimized method for fatty acid analysis, including quantification of trans fatty acids, in human adipose tissue by gas-liquid chromatography. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 59 (3) p205-14, May 1999.
105. CALDER PC., - Dietary fatty acids and the immune system. *Lipids* 34 Suppl pS137-40, 1999.
106. CANALIS E., - Regulation of bone remodeling, In: Favus M.J.,(ed) - *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. ed. 2, New York, Raven Press*, p33-37, 1993.
107. CARLSON S.E., CARVER J.D., HOUSE S.G. - High fat diets varying in ratios of polyunsaturated to saturated fatty acid and linolenic to linoleic acid: A comparison of rat neural and red cell membrane phospholipids. *J.Nutr.* 116, 718-726, 1986.
108. CARLSON, L.A., WADSTRÖM, L.B., - On the occurrence of tri-, di-, and monoglycerides in human serum. In: The blood lipids and the clearing-factor, *IIIrd Int. Conf. Biochem. Probl. Lipids*, p.123. 1956.
109. CARPENTIER Y - Atherosclerosis and micronutrients., *Revue medicale de Bruxelles* 21; (4); pA 363-6., Sep 2000.
110. CAVE W.T. JR. - ω 3 fatty acid diet effects on tumorigenesis in experimental animals. In : Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E., Barlow S.M., (eds.), Health effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids in seafood's, *World Rev. Nutr. Diet*, 66, p462-476, 1991.
111. CHALOVICH J.M., BURT T., DANON N.J., GLONEK T, BARANAY M.. - Phosphodiesterases in Muscular dystrophies. *Ann .NY Acad. Sci.* 317, p649, 1979.
112. CHAPMAN D., - *Biological membranes*, vol 2. Academic Press, p91-144, 1973.
113. Chardigny J.M., Blond J.P., Bretillon L., Mager E., Poullain D., Martine L., Vatale J.M., Noel J.P., Sebedio J.L., - Conversion of 18:3 delta-9 cis, 12 cis, 15-trans in rat liver microsomes, *Lipids* 32, p731-735, 1997.
114. CHARDIGNY J.M., BRON A., SEBEDIO J.L., JUANEDA P., GRANDGIRARD A., - Kinetics of incorporation of n-3 trans fatty acids in rat retina, *Nutr. Res.*, 14, p909-917, 1994.
115. CHARDIGNY J.M., SEBEDIO J.L., BERDEAUX O., - Trans polyunsaturated fatty acids : occurrence and nutritional implication. In Padley F.D. (ed). *Advances in applied Lipid Research. Jai Press Inc. London*, p1-33, 1996.
116. CHARDIGNY J.M., SEBEDIO J.L., GRANDGIRARD A., MARTINE L., BERDEAUX O., VATALE J.M., - Identification of novel trans isomers of 20:5n3 in liver lipids of rats fed heated oil., *Lipids*, 31, p165-168, 1996.
117. CHARDIGNY J.M., SEBEDIO J.L., JUANEDA P., VATALE J.M., GRANDGIRARD A., - Occurrence

- of n-3 trans polyunsaturated fatty acids in human platelets, *Nutr. Res.*, 13, p1105-1111, 1993.
118. CHARDIGNY J.M., WOLFF R.T., MAGER E., BAYARD C.C., SEBEDIO J.L., MARTINE L., RATNAYAKE W.M.N., - Fatty acid composition of French infant formulas with emphasis on the content and detailed profile of trans fatty acids., *J. Am. Oil Chem.Soc.* 73, p1595-1601, 1996.
119. CHARDIGNY J.M., WOLFF R.T., MAGER E., SEBEDIO J.L., MARTINE L., JUANEDA P., GRANDGIRARD A., - Trans mono- and polyunsaturated fatty acids in human milk., *Eur.J.Clin.Nutr.*49,p523-531,1995.
120. CHARNOCK J.S., DRYDEN W.F., MCMURCHIE E.J., ABEYWAREDNA M.Y., RUSSELL G.R., - Differences in fatty acid composition of atrial and ventricular phospholipids of rat heart following standard and lipid supplemented diets., *Comp. Biochem.Physiol.* 75B,p47,1983.
121. CHARNOCK J.S., - Omega-3 polyunsaturated fatty acids and ventricular fibrillation: the Possible involvement of eicosanoids. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 61 (4) p243-7, Oct 1999.
122. CHARNOCK J.S., - Antiarrhythmic effects of fish oil. In : Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E., Barlow S.M. (eds.) Health effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. *World Rev. Nutr. Diet*, 66, p278-291, 1991.
123. CHEN Z. Y., PELLETIER G., HOLLYWOOD R, RATNAYAKE W.M.N., - Trans fatty acid isomers in Canadian human milk, *Lipids*, 30,p15-21,1995.
124. CHO HP; NAKAMURA M; CLARKE SD., - Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *Journal of biological chemistry* 274 (52) p37335-9, Dec 24 1999.
125. CHRISTENSEN JH; CHRISTENSEN MS; DYERBERG J; SCHMIDT EB. - Heart rate variability and fatty acid content of blood cell membranes: a dose-response study with n-3 fatty acids., *American journal of clinical*, 70 (3), p331-7, Sep 1999.
126. CHRISTIE, W.W. – *Advances In Lipid Methodology*, The Oily Press, 1992
127. Cistola D.P., Small D.M., Hamilton J.A., - Carbon-13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. I. The filling of individual fatty acids binding sites., *J.Biol. Che.*, 262, p10971-10985, 1987.
128. CIUCANU I. – *Cromatografia De Gaze Cu Coloane Capilare – Ed. Academiei Române, Bucuresti,1990.*
129. CLANDININ MT; VAN AERDE JE; PARROTT A; FIELD CJ; EULER AR; LIEN E. - Assessment of feeding different amounts of arachidonic and docosahexaenoic acids in preterm infant formulas on the fatty acid content of lipoprotein lipids. *Acta paediatrica* 88 (8) p890-6, Aug 1999.
130. CLARKE S.D., ARMSTRONG M.K. – Suppression of rat liver fatty acid synthetase mRNA level by dietary fish oil, *FASEB J.*, 2, A852 (abstr.) 1988.
131. CLELAND LG; JAMES MJ, - Fish oil and rheumatoid arthritis: antiinflammatory and collateral health benefits. *Journal of rheumatology* 27; (10); p2305-7, Oct 2000.
132. CLOBIGER C.R. – Multilocus genetics of schizophrenia, *Curr. Opin Psychiat*, 10, p5-10, 1997.
133. CLUP B.R.,TITUS B.G., LANDS W.E.M.–Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid., *Prostaglandins Med.*, 3, p269-278, 1979.
134. CODREANU R. – Emil Racoviță în biologia generală, în *Emil Racoviță, Opere alese, Ed. Acad.R.S.R.*,p571-582, 1964.
135. COHEN H.J., MOLNAR G.E., TAFT L.T. – The genetic relationship of progressive muscular dystrophy (Duchenne type) and mental retardation. *Develop. Med. Child.Neurol.*, 10, p754-765, 1968.

136. COHN E. J., GURD F.R.N., SURGENOR D.M., BARNNES B.A., BROWN R. K., DEROUAUX G., GILLESPIE J.M., KAHNT F.W., LEVER W.F., LIU C.H., MITTELMAN D., MOUTON R.F., SCHMID K., UROMA E. - A system for separation of the components of human blood : Quantitative procedures for the separation of the protein component of human plasma. *J. Amer. Chem.Soc.* 72, 465, 1960.
137. COLLANDER R., BERLUND H. – *Acta Botanica Fennica*, 11, p1, 1933.
138. COLLEAU M., HERVE P., FELLMANN P. DEVAUX P.F., - Transmembrane diffusion of fluorescent phospholipids in human erythrocytes. *Chem-Phys-Lipids*. 57(1),p29-37, 1991.
139. COLOME C., ALONSO R., MATA P., BADIMON L. - Effects of dietary fatty acids and vitamin E levels in HL-60 cell proliferation. *European journal of clinical investigation* 29; (2); p129-38, Feb 1999.
140. CONNOR J., PAK C.H., ZWAAL R.F., SCHROIT A.J.- Bi-directional transbilayer movement of phospholipids analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J-Biol-Chem*. 267(27), p19412-7, 1992.
141. CONNOR W.E.,- Hypolipemic effects of dietary omega-3 fatty acids in normal and hyperlipidemic human : effectiveness and mechanisms. In: Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E. (eds). *Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods.*, Orlando, FL Academic Press, p173-210. 1986.
142. CONNOR W.E., LIN D.S., NEURINGER M.,- Is the docosahexaenoic (DHA, 22:6n-3) content of erythrocytes a marker for the DHA content of brain phospholipids?, *FABES J.*, 7,A152,1993.
143. CONNOR W.E., NEURINGER M., REISBICK S. – Essentiality of ω 3 Fatty Acids : Evidence from the primate model and implication for Human Nutrition, in Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martine R.E., Barlow S.M. (eds.) – *Health Effects of ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*, World Rev. Nutr. Diet. Basel, Karger, vol.66, p118-132, 1991.
144. CONVERSE C.A., HAMMER H.M., PACKARD C.J., SHEPHERD J., - Plasma abnormalities in retinitis pigmentosa and related conditions., *Trans. Ophthalmol.Soc.UK*,103, p508-512, 1983.
145. CORNWALL D.G., KRUGER F.A., - Molecular complexes in the isolation and characterization of plasma lipoproteins, *J.Lipid.Res.* 2, p110, 1944.
146. COSTE, J., PEYRAUD, J., COULLET, P. - Does complexity favor the existence of persistent ecosystems?, *J.Theor. Biol.*, 73, p359-362, 1978.
147. COTTON S., VOUDOURIS N.J., GREENWOOD K.M. - Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients., *Developmental medicine and child neurology* 43; (7); p497-501, Jul 2001.
148. CRAWFORD M.A. - Fatty acid ratios in free-living and domestic animals, *Lancet* , p1329-1333, 1968.
149. CRAWFORD M.A., HALL D., LAURANCE B.M., MUNHAMBO A., - Milk lipids and their variability., *Curr. Med. Res. Opinion*, 4, p33, 1976.
150. CULP B.R., TITUS B.G., LANDS W.E.M. – Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid., *Prostaglandins Med.*, 3, p269-278, 1985.
151. CURTIS C.L., HUGHES C.E., FLANNERY C.R., LITTLE C.B., HARWOOD J.L., CATERSON B. - n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *Journal of biological chemistry* 14, 275 (2) p721-4., 2000.
152. DAGUE P., - Les Niveaux mentaux dans le Myopathie., *Revue de Neuro-psychiatrie infantile*, 4-5, p299-345, 1970.
153. DANIELLI J.F. – The bilayer Hypothesis of Membrane Structure, in : *Cell Membranes Biochemistry, Cell Biology & Pathology* (Editor G. Weissmann, R. Claiborne), HP Publishing Co. Inc., Publishers, New York, p.3-12, 1975.

154. DANIELLI J.F. – Experiment, Hypothesis, and Theory in the Development of Concepts of Cell Membrane Structure 1930 – 1970, in : *Membranes and Transport, vol. I* , (Editor A.N. Martonosi), *Penum Pub. Corpor.*, p. 3-14, 1982.
155. DAVID J.T., BRIDGES R.B., CONIGLIO J.G. - Changes in lipid composition of the maturing rat testis., *Biochem. J.* 98, p342, 1966.
156. DAVIS H.R., BRIDENSTINE R.T., VESSELINOVITCH D., WISSLER R.W. – Fish oil inhibits development of atherosclerosis in rhesus monkey., *Atherosclerosis*, 7, 441-449, 1987.
157. DE CATERINA R., LIAO J.K., LIBBY P., - Fatty acid modulation of endothelial activation. *American journal of clinical nutrition* 71 (1Suppl) p213S-23S., Jan 2000.
158. DE CATERINA R., MASSARO M.- Effects of diet and of dietary components on endothelial leukocyte adhesion molecules. *Current atherosclerosis reports* 1; (3); p188-95, Nov 1999.
159. DE DUVE C., - Exploring cells with a centrifuge., *Science*, 189, p186-194, 1975.
160. DE DUVE C., BAUDHUIN P., - Peroxisomes (microbodies and related particles), *Physiol. Rev.* 46, 323-357, 1966.
161. DE GOMEZ DUMMI.N.T., BRENNER R.P.,- Oxidative desaturation of alpha-linolenic, linoleic and stearic acids by humans liver microsomes., *Lipids*, 10, p315-317, 1975.
162. DE LALLA O.F., GOFMAN J.W., - Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. In: *Methods of biochemical analysis, Vol. 1*, p459. Ed. D. Glik, New York : Interscience Publishers 1954 .
163. DE PABLO M.A., ALVAREZ DE CIENFUEGOS G. - Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunology and cell biology* 78 (1) p31-9, Feb 2000.
164. DE ROOS N.M., BOTS M.L., KATAN M.B. - Replacement of dietary saturated fatty acids by trans fatty acids lowers serum HDL cholesterol and impairs endothelial function in healthy men and women., *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* ,21; (7); p1233-7, Jul 2001.
165. DEBER C.M., REYNOLDS S.J.- Central Nervous System Myelin: Structure, Function and Pathology. *Clin.Biochem.* 24 : p113-134, 1991.
166. DECATERINA R., GIANNESI D., MAZZONE A., - Vascular prostacyclin is increase in patients ingesting n-3 fatty acids prior to coronary artery surgery., *Circulation*, 82, p428-438, 1990.
167. DECSI T., MINDA H., BURUS I., SARKANY I., VOLKER V. - Fatty acid levels in plasma phospholipids in the cord blood of Austrian and Hungarian newborn infants., *Orvosi hetilap* 140 (16) p881-4, Apr 18 1999.
168. DEHMER G.J., POMPA J.J., VAN DEN BERG E.K., - Reduction in the rate of erly restenosis after coronary angioplasty by diet supplemented with n-3 fatty acids., *N.Engl.Med.* , 319, p733-740, 1988.
169. DEVAUX P.F., - Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry., *Annu-Rev-Biophys-Biomol-Struct.* 21: p417-39, 1992.
170. DEWEY M.M., BARR L. - Structure of Cellular Membranes - *W. Heinemann Medical Books Ltd., London*, p 1-31, 1970.
171. DI BIASE A., SALVATI S., - Exogenous lipids in myelination and myelination., *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih (TAIWAN)* Jan 13 (1) p19-29, 1997.
172. DIECKIN R.F., CAZABRESE G., MERRIN E.L., MEYERHOFF D.J., DILLON W.P., WEINER M.W., FEIN G.–³¹Phosphorus magnetic resonance spectroscopy of the frontal and parietal lobes in schizophrenia. *Biol. Psychiat.*, 36, 503-510, 1994.
173. DIECKIN R.F., CAZABRESE G., MERRIN E.L., MEYERHOFF D.J., DILLON W.P., WEINER M.W., FEIN G. – ³¹Phosphorus magnetic resonance spectroscopy of the frontal and parietal lobes in schizophrenia., *Biol.Psychiat*, 36, p503-510, 1994.
174. DOLE V., Meinertz H., - Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and

- tissues, *J.Biol.Chem.* 235, p2595- 2599, 1960.
175. DOLECEK T.A. – Epidemiological evidence of relationships between dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in multiple risk factor intervention trial., *Proc. Soc.Exp.Biol.Med.*200, p177-182, 1992.
176. DRATZ E.A., HOLTE L.L. – The molecular spring model for the function of docosahexaenoic acid (22:6 ω -3) in biological membranes, In : *Sinclair A., Gibson R., (eds.) Essential Fatty Acids and Eicosanoids, Champaign, American Oil Chemist's Society, p122-127, 1992.*
177. DROGE W., ECK H.P., GMUNDER H., MIHM S.- Requirement for prooxidant and antioxidant states in T cell mediated immune responses.– Relevance for the pathogenetic mechanisms AIDS?- *Klin-Wochenschr. Dec. 15; 69(21-23): p1118-22, 1991.*
178. DROGE W., ECK H.P., GMUNDER H., MIHM S.,- Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives. *Am. J.Med. Sept.30;91(3C):p140S-144S.,1991.*
179. DUBOWITZ V. – Mental retardation in Duchenne muscular dystrophy. In: *Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies., Edited by L.P.Rowland, Excerpta Medica, Amsterdam, p688-698, 1977.*
180. DUCHENNE A.G. B. – Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique, ou paralysie myo-sclerosique., *Arch. Gen. Med. (6th Ser) 11,p569, 1868.*
181. DULK FR. PH., In : *Archiv. Für die gesammte Naturlehre, 123, p213-238, Kastner, K.W.E. ed, 1832.*
182. DUNDER T., KUIKKA L., TURPINEN J., RASANEN L., UHARI M.-Diet. serum fatty acids, and atopic diseases in childhood. *Allergy 56; (5); p425-8, May 2001.*
183. DUPONT J., WHITE P.J., FELDMAN E. B.,- Saturated and hydrogenated fats in food in relation to health., *J.Am.Coll.Nutr., 10, p577-592, 1991.*
184. DURIEZ P., FRUCHART J.C. - Recent developments in the treatment of hypertriglyceridemia., *Current atherosclerosis reports 1; (1); p31-7, 1999.*
185. DUTTON H.J. – Hydrogenation of fats and its significance. – in : *Emken E.A., Dutton H.J. (eds). Geometrical and Positional Fatty Acids Isomers, AOCS, Champaign, p1-16, 1979.*
186. DYERBERG J., BANG H.O., - Haemostatic function and platelet poly unsaturated fatty acids in Eskimos, *Lancet,2, p433-435, 1979.*
187. DYERBERG J., BANG H.O., AAGAARD O. - Alpha-linolenic acid and eicosa-pentaenoic acid, *Lancet, 1, p199, 1980.*
188. DYERBERG J., BANG H.O., HJORNE N. – Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos, *Am. J. Clin. Nutr. 28, p958-966, 1972.*
189. DYERBERG J., BANG H.O., STOFFERSON E., - Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?,*Lancet, 2, p117-119, 1978.*
190. EATON B.S., EATON S.B.III, SINCLAIR A.J., CORDAIN L., MANN N.J. – Dietary Intake of Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids during The Paleolithic in– *World Review of Nutrition and Dietetics, Simopoulos A.P. (ed) vol. 83 - The Return of ω 3 Fatty Acids into the Food Supply, p12- 23, Karger, Basel, New York, 1998.*
191. EATON S.B., KONNER M. – Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *N.Engl. J. med. 312, p283-289, 1985.*
192. EATON S.B., KONNER M., SHOSTAK M., - Stone agers in the fast lane : Chronic degenerative diseases in evolutionary perspective, *Am. J. Med.. 84, p739-749, 1988 .*
193. EBASHI S., TOYOKURA Y., MOMOI H., SUGITA H., - High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy patients, *J.Biochem (Tokyo), 46, p103-104, 1959.*
194. ECK H.P., DRINGS P., DROGE W.,- Plasma levels,lymphocyte reactivity and death in

- patients with bronchial carcinoma. *J.Cancer.Res.Clin.Oncol.* 1989.
195. EDDY D.E., HARTMAN D., - Free radical theory of aging : Effect of age, sex and dietary precursors on rat brain docosahexaenoic acid., *J.Am Geriatr.Soc.*, 25, p220, 1977.
196. EGELAND GM; MEYER HE; SELMER R; TVERDAL A; VOLLSET SE. - Cod liver oil consumption, smoking, and coronary heart disease mortality:three counties, Norway. *Intemational journal of circumpolar health*, 60;(2);p143-9, Apr 2001.
197. EGGSTEIN, M.,- *Klin.Worchenschr.* 44, 267, 1966.
198. EGGSTEIN, M., KUHLMANN E., - Triglicerides and Glycerol.Determination after Alkaline Hydrolysis, in: *Methods of Enzymatic Analysis*, edited Bergmeyer U., Verlag Chemie, Academic Press, Inc. p.1825. 4th ed. 1971
199. EIK-NES K. B., HORNING E.C. - Gas Phase Chromatography Of Steroids - *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*, 1968.
200. ELBERS P. F. - *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 2, p443, 1964
201. EMERSON A.E.,-Dynamic homeostasis; a unifying principle in organic, social and ethical evolution. *Scientific Monthly*, vol.78,2, p67-85,1954.
202. EMERY A.E.H., SKINNER R., HOLLOWAY S., - A study of possible heterogeneity in Duchenne muscular dystrophy., *Clinical Genetics*, 15, p444-449.1979.
203. EMKEN E.A., ADOLF R.O., RAKOFF H., ROHWEDDER W.K., - Metabolism of deuterium-labeled linolenic, linoleic,oleic, stearic and palmitic acid in human subjects. In : *Baillie T.A., Jones J.R. (eds.) - Synthesis and applications of isotopically labeled compounds*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, p713-716, 1989.
204. ENDRES S., GHORBANI R., KELLEY V.F.,GEORGILIS K., LONNEMANN G., VAN DER MEER J.W., CANNON J.G., ROGERS T.S., KLEMPNER M.S., WEBER P.C., - The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells., *N.Engl. J.Med.*320, p265-271, 1989.
205. ENGELMANN B., SCHONTHIER U.M., RICHTER W.O., DUHM J., - Changes of membrane phospholipid composition of human erythrocytes in hyper-lipidemias. II. Increase in distinct molecular species of phosphatidy-lethanolamine and phosphatidylcholine containing arachidonic acid., *Biochim.biophys. Acta.*, 1165(1), p38-54, 1992.
206. ERITSLAND J.,- Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. *American journal of clinical nutrition* 71 (1Suppl) p197S-201S., Jan 2000.
207. FAGGIOTTO A., - Cellular dynamics in atherosclerosis., In: *Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E., (eds.) Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods*,Orlando, FL: Academic Press, p87-110,1986.
208. FALES, H.M., LUUKKAINEN T., - o-Methyloximes as carbonyl derivatives in gas chromatography, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Anal. Chem.*37, p955, 1965.
209. FELDMAN E.B.,- Abnormalities of circulating lipids. An appraisal of current methods of study, *Amer.J.Cardiol.* 13, p632, 1964.
210. FERNANDES G., VENKATRAMAN J.T., - Modulation of breast cancer growth in nude mice by ω 3 lipids., In : *Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E., Barlow S.M., (eds.), Health effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods*, World Rev. Nutr. Diet, 66, p488-503,1991.
211. FERNANDES G; TROYER DA; JOLLY CA. - The effects of dietary lipids on gene expression and apoptosis., *Proceedings of the Nutrition Society* 57; (4); p543-50, Nov 1998.
212. FISCHER S., WEBER P.C., - Prostaglandin I₃ is formed in vivo in man after dietary eicosapentaenoic acid, *Nature*, 307, p165-168, 1984.
213. FISHER M., LEVINE P.H., WEINER B.H., JOHNSON M.H., DOYLE E.M., ELLIS P.A., HOOGASIAN J. - Dietary n-3 fatty acids supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte enriched preparation of leukocytes, *Am. J. Clin.*

- Nutr.*, 51, p804-808, 1990.
214. FISKE, C.H., SUBBAROW Y., - The colorimetric determination of phosphorus, *J.Biol. Chem.* 66, p375, 1925.
215. FLIESLER S.J., ANDERSON R.E. – Chemistry and metabolism of lipids in vertebrate retina., *Prog.Lipid Res.*, 22,p79-131, 1983.
216. FOLCH J. - Brain cephalin, a mixture of phosphatides, separation from it phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, and a fraction containing inositol phosphatide., *J. Biol. Chem.*, 146, p35, 1942.
217. Folch, J., Ascoli I., Lees, M., Meath, J. A., Lebaron, F.N., - Preparation of lipide extracts from brain tissues. *J.biol.Chem.* 191, p833, 1951.
218. FORREST G.L., FUTTERMAN S., - Age-related changes in te retinal capillaries and fatty acid composition of retinal tissue of normal and essential fatty acid-deficient rats., *Invest. Ophthalmol.* 11, p760, 1972.
219. FOULON T., RICHARD M.J., PAYEN N., BOURRAIN J.L., BEANI J.C., LAPORTE F., HADJIAN A. - Effects of fish oil fatty acids on plasma lipids and lipoproteins and oxidant - antioxidant imbalance in healthy subjects. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 59 (4) p239-48, Jul 1999.
220. FOX P.L., DICORLETO P.E., - Fish oils inhibit endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein, *Science*, 241, p453-456, 1988.
221. FRANZOSI M.G., BRUNETTI M., MARCHIOLI R., MARFISI R.M., TOGNONI G., VALAGUSSA F.- Cost-effectiveness analysis of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) after myocardial infarction: results from Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto (GISSI)-Prevenzione Trial., *PharmacoEconomics* 19; (4); p411-20, 2001.
222. FRASER D.A., THOEN J., RUSTAN A.C., FORRE O., KJELDSSEN-KRAGH J., - Changes in plasma free fatty acid concentrations in rheumatoid arthritis patients during fasting and their effects upon T-lymphocyte proliferation. *Rheumatology* 38 (10) p948-52, Oct 1999.
223. FREEDMAN S.D., SHEA J.C., BLANCO P.G., ALVAREZ J.G. - Fatty acids in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine* 6; (6); p530-2, Nov 2000.
224. FREEMAN, C.P., WEST D., - Complet separation of lipid classes on single thin-layer plate. *J. Lipid Res.* 7, p324, 1966.
225. FRICKE H. – A mathematical treatment of electric conductivity and capacity of disperse systems. II.The capacity of suspension of conducting spheroids surrounded by a nonconducting membrane for a current of low frequency. *Phys. Rev.* 26, p678, 1925.
226. FROSCH, B., - Die quantitative Bestimmung der konjugierten Gallensäure der Serums nach dünnenschicht-chromatographischer Trennung. *Arzneimittel-Forsch.* 15, p178, 1965.
227. FROSCH, B., WAGENER, H., HENNING, E., - Zur quantitativen Bestimmung der mit Glycin oder Taurin konjugierten Chenodesoxycholsäure., *Mikrochim.Acta* 5, p620, 1964.
228. FURMAN, R.H., HOWARD R.P., LAKSHMI K., NORCIA L.N., - The serum lipids and lipoproteins in normal and hyperlipidemic subject as determined by preparative ultracentrifugation. *Amer.J.Clin.Nutr.* 9, p73, 1964.
229. GALLI C., MASCONI C., MEDINI L., COLLI S., TREMOLI E., - N-6 and N-3 fatty acids in plasma and platelet lipids, and generation of inositol phosphates by stimulated platelets after dietary manipulation in rabbit, in: Galli C., Simopoulos A.P., (eds.) *Dietary ω 3 and ω 6 fatty acids : biological effects and nutritional essentiality*, New York, Plenum Press, p213-218, 1989.
230. GALLI C., SIMOPOULOS A.P. (eds.), - *Dietary ω 3 and ω 6 Fatty Acids: Biological Effects and Nutritional Essentiality*, New York, Plenum Press, 1989.
231. GALLI C., TRZECIAK H.I., PAOLETTI R., - Effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of brain ethanolamine phosphoglyceride: reciprocal replacement of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids., *Biochem. Biophys. Acta*, 248, p449, 1971.

232. GALLI C., VISIOLI F.- n-3 fatty acids and antioxidants in coronary heart disease. *Italian heart journal 1 Suppl 3; pS20-1, Sep 2000.*
233. GALLI C., WHITE H.B. JR., PAOLETTI R., - Brain lipid modifications induced by essential fatty acid deficiency in growing male and female rats., *J. Neurochem 10, p523, 1970.*
234. GALLI G., SIMOPOULOS A.P., TREMOLI E., (eds.) – Effects of Fatty Acids and Lipids : *Biological Aspects in Health and Diseases, World Rev. Nutr.Diet., Basel, Karger, p76-90, 1994.*
235. GÄNSHIRT, H., KOSS, F.W., MORIANZ, K., - Untersuchung zur quantitativen Auswertung der Dünnschichtchromatographie. *Arzneimittel-Forsch. 10, p943, 1960.*
236. GÂRBAN Z. – Biochimie. *Tratat comprehensiv. Ed.2, Ed. Didactică și Pedagogică R.A., București, 1999.*
237. Gârban, Z. – *Tratat elementar de Biochimie, Ed. Mirton, Timisoara. 1996*
238. GARCIA W., - Elevated creatine phosphokinase levels associated with large muscle mass., *JAMA 228, p1395-1396, 1974.*
239. GARDNER-MEDWIN D., – Controversies about Duchenne muscular dystrophy. Neonatal screening. *Dev.Med.Child Neurol., 21, p390-393, 1979.*
240. GARDNER-MEDWIN D., BUNDERY S., GREEN S., - Early diagnosis of duchenne muscular dystrophy., *Lancet, 1, p1102, 1978.*
241. GARROD A., - *Lancet (Cronien Lectures), 2, 1, 73, 142, p214, 1908.*
242. GATTAZ W.F., SCHMITT A., MARAS A. – Increased platelet phospholipase A2 in schizophrenia. *Schizophr. Res. 16, 1-6, 1995.*
243. GATTAZ W.F., SCHMITT A., MARAS A. – Increased platelet phospholipase A2 in schizophrenia., *Schizophr. Res., 16, p1-6, 1995.*
244. GELDWERTH D., KUYPERS F.A., BUTIKOFER P., ALLARY M., LUBIN B.H., DEVAUX P.F. – Transbilayer mobility and distribution of red cell phospholipids during storage. *J.Clin.Invest. 92(1): p308-14, 1993.*
245. GERSTL B., TAVASTSTJERNA M.G., HAYMAN R.B., ENG L.F. SMITH J.K. – Alterations in myelin fatty acids and plasmalogens in multiple sclerosis., *Ann NY Acad. Sci., 122, p405, 1965.*
246. GERSTL B., TAVASTSTJERNA M.G., HAYMAN R.B., ENG L.F., SMITH J.K. – Alterations in myelin fatty acids and plasmalogens in multiple sclerosis., *Ann. NY Acad. Sci. 64, p489, 1965.*
247. GEUSENS P., WOUTERS C., NIJS J., JIANG Y., DEQUEKER J., - Long-term effect of omega-3 fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum. 37, p824-829, 1994.*
248. GIANOTTI L., BRAGA M., FORTIS C., SOLDINI L., VIGNALI A., COLOMBO S., RADAELLI G., DI CARLO V. - A prospective, randomized clinical trial on perioperative feeding with an arginine, omega-3 fatty acid, and RNA- enriched enteral diet: effect on host response and nutritional status. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition 23 (6) p314-20, Nov-Dec 1999.*
249. GIBSON N.J., BROWN M.F.,- Membrane lipid influences on the energetics of metarhodopsin I and metarhodopsin II, conformational states of rhodopsin probed by flash photolysis., *Photochem. Photobiol., 54, p985-992, 1991.*
250. GICHKA S.G., BRIUZGINA T.S., REVA S.N. - A comparison of the changes in the fatty acid composition of different biological specimens in myocardial infarct., *Likars'ka sprava (2) p39-42, Mar 1999.*
251. GJONE E., BERRY J.F., TURNER D.A. - The isolation and identification of lysolecithin from lipid extracts of human serum, *J.Lipid Res.1, p66, 1959/60.*
252. GLAUBER H., WALLANCE P., GRIVER K., BRECHTEL G., - Adverse metabolic effect of ω 3 fatty acids in non-insulin-dependent diabetes mellitus., *Ann.Intem.Med., 108, p663-668,*

- 1988.
253. GLEN A.I.M., GLEN E.M.T., HORROBIN D., VADDADI K.S. SPELLMAN M., MORSE-FISHER N., ELLIS K., SKINNER F.S.- A red cell membrane abnormality in a subgroup of schizophrenic patients: evidence for two diseases. *Schizophr. Res.* 12, 53-61, 1994.
254. GLICK, D., FELL, B. F., SJØLIN K., - Spectrophotometric determination of nanogram amounts of total cholesterol in microgram quantities of tissue or microliter volumes of serum. *Analyt. Chem.* 36, p1119, 1964.
255. GOLDSTEIN J.L., - Genetics and cardiovascular disease. In : *Braunwald E., - Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine., Vol.2. 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, p1606-1640, 1984.*
256. GONG J., ROSNER R., REES D.G., BERSON E.L., WEIGEL-DIFRANCO C.A., SCHAEFER E.J., - Plasma docosahexaenoic acid levels in various genetic forms of retinitis pigmentosa., *Invest.Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33, p2596-2602, 1992.
257. GOODNIGHT S.H. JR., - The antithrombotic effects of fish oil, in : *Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E. (eds.) Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods, Orlando, Fl, Academic Press, p135-149, 1986.*
258. GORDELADZE J.O., RESELAND J.E., DREVON C.A. - Pharmacological interference with transcriptional control of osteoblasts: a possible role for leptin and fatty acids in maintaining bone strength and body lean mass. *Current pharmaceutical design* 7; (4); p275-90, Mar 2001.
259. GORDON N., - Muscle and Brain Disease: An up date., *Child. Care Health Dev.*, 20(4), p279-287, 1994.
260. GOUNI-BERTHOLD I., BERTHOLD H.K., SEUL C., KO Y., VETTER H., SACHINIDIS A. - Effects of authentic and VLDL hydrolysis-derived fatty acids on vascular smooth muscle cell growth. *British journal of pharmacology* 132; (8); p1725-34, Apr 2001.
261. GRANDGIRARD A., CHARDIGNY J.M., BOURRE J.M, JULLIARD F., HOMAYOUN P., DUMONT O., PICIOTTI M., SEBEDIO J.L., - Incorporation of trans long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in rat brain structures and retina, *Lipids* 29, p251-258, 1994.
262. GRANDGIRARD A., JULLIARD F., - Influence de divers parameters sur la degradation d'huiles vegetales au cours du chauffage : nature de l'huile, temperature et duree du chauffage., *Rev. Fr. Corps Gras.*, 34, p213-219, 1987.
263. GRANDGIRARD A., PICONNEAUX A., SEBEDIO J.L., O'KEEFE S.F., SEMON E., LEQUERE J.L., - Occurrence of geometrical isomers of Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in liver lipids of rats heated linseed oil. *Lipids*, 24, p799-804, 1989.
264. GRÄSBECK, R., - Reference value philosophy., *Bull. Mol. Biol. Med.* 8, p1-11, 1983.
265. GRÄSBECK, R., SARIS, N.E., - *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 26, Suppl. 110, p62, 1969.
266. GREEN D. E., PERDUE J. F. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55, p1295, 1966.
267. GREGOIRE, P.E., - *Biochimie Pathologique, Presses Académiques Européennes. Bruxelles*, p 459 – 460, 1997.
268. GRIMSGAARD S., BONAA K.H., JACOBSEN B.K., BJERVE K.S., - Plasma saturated and linoleic fatty acids are independently associated with blood pressure. *Hypertension* 34 (3) p478-83, Sep 1999.
269. GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELLA SOPRAWIVENZA NELL'INFARTO MIOCARDICO - Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. . *Lancet* 354 (9177) p447-55, Aug 7 1999.
270. GUDBJARNASON S., BENEDIKTSÐOTTIR V.E., SKÜLADÓTTIR G.,- Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Coronary Heart Disease. In: *Somogyi J.C., Müller H.R. (eds.), Nutritional Impact of Food Processing, Bibl.Nutr.Dieta, Basel, Karger, 43, p1-12, 1989.*

271. GUDBJARNASON S., DOELL B., OSKARSDOTTIR G. - Docosahexaenoic acid in cardiac metabolism and function., *Acta Biol. Med. Germ.* 37, p777, 1978.
272. GUIDOTTI G. – *Physiology of membranes Disorders*, (ed. T.E. Andreolli, J.F. Hoffman, D.D. Fanestil, S.G.Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, p.45-55, 1986.
273. GUNN R.B., KIRK R.G. – Anion transport and membrane morphology, *J.Membr.Biol.* 27,265-282. 1976.
274. HAHN P.F.-, *Science* 98, p19, 1943.
275. HAINES A.P., SANDERS T.A.B., IMESON J.D. – Effects of a Fish oil supplement on platelet function, hemostatic variables and albuminuria in insulin-dependent diabetics., *Thromb.Res.*, 43,p643-655,1986
276. HAJRA A.K., BISHOP J.E., - Glycerolipid biosynthesis in proxisomes via the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway, *Ann.NY. Acad.Sci.*,386, p170-182, 1982.
277. HAMILTON L., GREINER R., SALEM N., KIM H.Y. - n-3 fatty acid deficiency decreases phosphatidylserine accumulation selectively in neuronal tissues. *Lipids* 35; (8); p863-9, Aug 2000.
278. HAMILTON, J.G., COMAI, K.,- *J. Lipid Res.* 25, p1142-1148, 1984.
279. HAMMAZAKI T., NAKAZWA R., TATENO S., - Effects of fish oil rich in eicosapentaenoic acid on serum lipid in hyperlipemic hemodialysis patients., *Kidney. Int.* 26, p81-84, 1984.
280. HANKENSON K.D., WATKINS B.A., SCHOENLEIN I.A., ALLEN K.G., TUREK J.J. - Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 223 (1) p88-95, Jan 2000.
281. HARBIGE L.S. - Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 57; (4); p555-62, Nov 1998.
282. HARRIS W.S. – Fish oil and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans : critical review. *J.Lipid Res*, 30, p785-807, 1989.
283. HARRIS W.S., CONNOR W.E., INKELES S.B., ILLINWORTH D.R., - Omega-3 fatty acids prevent carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism*, 33,p303-3039, 1984.
284. HARRIS W.S., ISLEY W.L. - Clinical trial evidence for the cardioprotective effects of omega-3 fatty acids. *Current atherosclerosis reports* 3; (2); p174-9, Mar 2001.
285. HARRISON R., LUNT G.L., - *Biological Membranes*, Ed. a 2-a, Blackie, Glasgow and London, p. 1-15, 1980.
286. HASLER C.M., KUNDRAT S., WOOL D.- Functional foods and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports* 2; (6); p467-75, Nov 2000.
287. HAVEL, R.J.- Atherosclerosis, 11, p. 3, 1970, citat de Manta, I., Benga, G., Cucuianu M., Hodâmău, A., *Metode Biochimice în Laboratorul Clinic*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, p. 203,1976.
288. HECKERS, H., MELCHER, F.W., SCHLOEDER, U., - SP 2340 in the glass capillary chromatography of fatty methyl esters, *J.Chroamato.* 136, p311-317,1977.
289. HEISKELL C. L., FISK R. T., FLORSHEIM W.H., YACHI A., GOODMAN J.R., CARPENTER C. M., - A simple method for quantitation of serum beta-lipoproteins by means of immunocrit. *Amer.J.Clin.Path.* 35, p22, 1961
290. HELGE J.W., WU B.J., WILLER M., DAUGAARD J.R., STORLIEN L.H., KIENS B.- Training affects muscle phospholipid fatty acid composition in humans. *Journal of applied physiology* 90; (2); p670-7, Feb 2001.
291. HERMAN R.,- *Annalen der Physik und Chemie*, 98, p161-192, 1831.
292. HINTON V.J., DE VIVO D.C., NEREO N.E, GOLDSTEIN E., STERN Y., - Selective deficits in verbal working memory associated with a known genetic etiology: the neuropsychological profile of duchenne muscular dystrophy., *Journal of the International*

- Neuropsychological Society*, 7; (1); p45-54., Jan 2001.
293. HIRAI A., HAMAZAKI T., TERANO R., - Eicosapentaenoic acid and platelet function in Japanese., *Lancet*, 2, p1132-1133, 1980.
294. HIRSCH T., KEMPE G. - Consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in former East and West Germany and changes in East Germany after the reunification. *Respiratory medicine*, 93 (3) p213-6, Mar 1999.
295. HIRSCH, J., AHRENS, E.H.- The separation of complex lipide mixtures by use of silicic acid chromatography, *J.biol. Chem.* 233, p311, 1958.
296. HIRSCH, J.- Practice chromatography : An automatically monitored, liquid-gel system for the separation of nonpolar lipid, *J.LipidRes.* 4, p1, 1963.
297. HODSON A., PLEASURE D., - Erythrocyte cation-activated adenosine triphosphates in Duchenne muscular dystrophy, *J.Neurol.Sci.* 32, p361-369, 1977.
298. HOFFMAN D.R., BIRCH D.G., - Docosahexaenoic acid in red blood cells of patients with X-linked retinitis pigmentosa., *Invest.Ophthalmol.Vis. Sci.* 36, p1009-1018, 1995.
299. HOJO N., FUKUSHIMA T., ISOBE A., GAO T., - Effect of serum fatty acid composition on coronary atherosclerosis in Japan, *Inter.J.Cardiol.*, 66, 1, p31-38, 1998.
300. HOLMAN R.T., BIBUS D.M., JEFFERY G.H., SMETHURST P., CROFTS J.W., - Abnormal plasma lipids of patients with retinitis pigmentosa., *Lipids*, 29, p61-65, 1994.
301. HOLMAN R.T., JOHANSON S.B., HATCH T.F. - A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities, *Am. J.Clin. Nutr.*, 37, p617, 1982.
302. HOLUB B.J., KUKSIS A. - Resolution of intact phosphatidylinositols by argentation thin layer chromatography., *J.Lipid Res.*, 12, p510, 1971.
303. HOOROKS L.A., VAN ROLLINS M., YATES A.J. - Lipid changes in the aging brain, in : *The molecular Basis of Neuropathology*, Thompson R.H.S., Davison A.N., eds., Edward Arnold Ltd., London, p.601, 1981.
304. HOPKINS J.C., BIA B.L., CRILLEY J.G., BOEHM E.A., SANG A.E., TINSLEY J.M., KING L.M., RADDA G.K., DAVIES K.E., CLARKE K. - Muscular dystrophy: from gene to patient. *Magma* 11; (1-2); p7-9., Nov 2000.
305. HORNING, E.C., HORNING, M.G., IKEKAWA, N., CHAMBAZ, E.M., JAAKONMAKI, P.I., BROOKS, C.J.W.- Studies of analytical separations of human steroids and steroid glucuronides *J.Gas chromatog.* 5, p283, 1967.
306. HORNSTEIN, I., ALFORD, J.A., ELLIOT, L.E., CROWE, P.F., - Determination of free fatty acids in fat, *Analyt.Chem.* 32, p540, 1960.
307. HORNSTRA G., CHRIST HAZELHOF E., HADDEMAN E., - Fish oil feeding lowers thromboxane and prostacyclin production by rat platelets and aorta and does not result in the formation of PGI₃, *Prostaglandins*, 21, p727-738, 1981.
308. HOSTMARK A., BJERKEDAL T., KIERULF P., FLATEN H., ULSHAGEN K. - Fish oil and plasma fibrinogen., *Br. Med. J.*, 297, p180-181, 1988.
309. HSU H.C., LEE Y.T., CHEN M.F. - Effect of n-3 fatty acids on the composition and binding properties of lipoproteins in hypertriglyceridemic patients. *American journal of clinical nutrition* 71 (1) p28-35, Jan 2000.
310. HU F.B., MANSON J.E., WILLETT W.C. - Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review., *Journal of the American College of Nutrition* 20; (1); p5-19, 2001.
311. HUDSON C.J., KENNEDY J.L., GOTOWIEC A., LIN A., KING N., GOJTAN N., GOJTAN K., MACCIARDI F., SKORECKI K., MELTZER L.H.Y., WARSH J.J., HORROBIN D.F. - Generic variant near cytosolic phospholipase A2 associated with schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 21, 111-116, 1996.
312. HUDSON C.J., KENNEDY J.L., GOTOWIEC A., LIN A., KING N., GOJTAN N., GOJTAN K., MACCIARDI F., SKORECKI K., MELTZER L.H.Y., WARSH J.J., HORROBIN D.F. - Genetic variant

- near cytosolic phospholipase A2 associated with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 21, p111-116, 1996.
313. HUGHES B.P., - Lipid changes in muscle disorders and their relation to maturation, in : *Basic Research in Myology*, ed. Kakulas B.A., American Elsevier Company, Inc. New York, p.155, vol.1., 1973.
314. HUGHES B.P.,- Lipid changes in Duchenne Muscular Dystrophy., *J.Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 35, p658, 1972.
315. HUGHES D.A. - In vitro and in vivo effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on human monocyte function. *Proceedings of the Nutrition Society* 57; (4): p521-5, Nov 1998.
316. HUGHES D.A., PINDER A.C., - n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes., *American journal of clinical nutrition* 71 (1Suppl) p357S-60S., Jan 2000.
317. Hull K.L., Roses A.D. - Stoichiometry of sodium and potassium transport in erythrocytes from patients with myotonic muscular dystrophy. *J.Physiol. (Lond)*, 254, p169-181, 1976.
318. IKAWA, S., AKIMORI H., -Analysis of serum bile acids by gas chromatography-mass spectrometry, *Hitachi Scientific Instrument News*, 22, p7-10, 1979
319. IKAWA, S., YAMAMOTO, Y., TAKITA, M., OGURA, M., KISHIMOTO, Y.. - Isolation of bile acids from biological fluids using Amberlite XAD-2, *Yonago Acta Medica* 21, p76-82, 1977.
320. INFANTE J.P. – Defective Synthesis of Polyunsaturated Phosphatidylcholine as the primary lesion in Duchenne and Murine *dy* muscular Dystrophies, *Medical Hypotheses*, 19, p113-116, 1986.
321. INFANTE J.P.– Biosynthesis of acyl-specific glycerophospholipids in mammalian tissues: postulation of new pathways, *FEBS Lett.* 170,p1, 1984.
322. IONESCU I.- Human Myotonic Dystrophy. Analysis of Muscular Lipids.*The Second International Symposium on Muscle Contraction Mechanism and Muscle Energetics, Bucuresti, Aug.1988.*
323. IONESCU I.- Human Myotonic Dystrophy. Analysis of Muscular Lipids.*The Second International Symposium on Muscle Contraction Mechanism and Muscle Energetics, Bucuresti, Aug.1988.*
324. IONESCU I., BENGĂ G., SERBU A.M. - Investigații Biochimice și Biofizice pe Membrana Eritocitară în Distrofii Musculare Progresive, *Primul Simpozion Național de Patologie Eredo-Degenerativă Neuro-Musculară, Vâlcele, oct.1985.*
325. IONESCU I., GĂRBAN Z., SĂRZEA S., BOERIU F.,- Wilson's Disease. Biochemical Considerations, *3rd International Symposium on Metal elements in Environment, Medicine and biology, Timișoara, 1998. In press.*
326. IONESCU I., MOȘOIU L.- Biochemical and Electromicroscopically Investigations of Myotonic Muscle, *J. of Neurol.Sciences*, 98, p425, 1990.
327. Ionescu I., Moșoiu L., - Heredopathia Atactica Polyneuritiformis (HAP); Refsum's Disease. A Familial Case Report, *3rd Simposium on Clinical Research, "Inborn Errors of Metabolism : Clinical and Biochemical Views", Graz, Austria, May 1990.*
328. IONESCU I., POPESCU, SERBU A.M - Acizi Grași și Lipide Serice în Patologia Neuro-Musculară, *Primul Simpozion Național de Patologie Eredo-Degenerativă Neuro-Musculară, Vâlcele, oct.1985.*
329. IONESCU I., POPESCU, SERBU A.M. - Îmbunătățirea și Modernizarea Diagnosticului unor Boli Genetice. *Primul Simpozion Național de Patologie Eredo-Degenerativă Neuro-Musculară, Vâlcele, oct.1985.*
330. IONESCU I., SĂRZEA S., BOERIU F. - Plasma concentrations of acid-soluble thiol (-SH), and uric acid in Multiple Sclerosis and Myasthenia Gravis., *4th International Symposium on Metal elements in Environment, Medicine and Biology, Timișoara, 6-8, nov. 2000.*

- Timișoara, 6-8, nov. 2000.
331. IONESCU I., SÂRZEA S., SÂRBU A., - *R O D I L E M I D*[®] A general presentation of a new medicine, Ed. Terapeutică, București, 1995.
 332. IONESCU I., SERBU A.M. - Studii Biochimice ale Membranelor Eritrocitare la Pacienți cu Distrofie Musculară Progresivă Duchenne. Investigații Lipidice. *Bull.Soc.Nat.Biol.Cell.* 9, June, p124, 1986.
 333. IRITANI N., NARITA R. - Changes of arachidonic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid classes in liver, brain, placenta and blood., *Int. J. Biochem.* 13, p21, 1984.
 334. ITAYA K., UR M., - Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids, *J.Lipid Res.*, 6, p16, 1965.
 335. JAY V., VAJSAR J. - The dystrophy of Duchenne., *Lancet* 357; (9255); p550-2., Feb 17 2001.
 336. JENDRASSIK L. - Das Le Chateliersche Prinzip und die Gesetze der Störung dynamischer Gleichgewichte, *Akad.kiadó, Budapesta*, 1965.
 337. JENSEN T., STENDER S., GOLDSTEIN K., HOLMER G., DECKERT T., - Partial normalization by dietary cod-liver oil of increased microvascular albumin leakage in patients with insulin-dependent diabetes and albuminuria, *N.Engl. J.Med.*321, p1572-1577, 1989.
 338. JOHANSEN O., BREKKE M., SELJEFLØT I., ABDELNOOR M., ARNESEN H. - N-3 fatty acids do not prevent restenosis after coronary angioplasty: results from the CART study. Coronary Angioplasty Restenosis Trial. *Journal of the American College of Cardiology* 33; (6); p1619-26, May 1999.
 339. JUDD J.T., CLEVIDENCE B.A., MUESING R.A., WITTERS J., SUNKIN M.E., PODCZASY J.J. - Dietary trans fatty acids. Effect on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women. *Am.J.Clin.Nutr.*, 59, p861-868, 1994.
 340. JUMP D.B., CLARKE S.D. - Regulation of gene expression by dietary fat. *Annual review of nutrition*, 19 p63-90, 2001.
 341. KALOFOUTIS A., JULLIEN G., SPANOS V., - Erythrocyte phospholipids in Duchenne muscular dystrophy. *Clin.Chim.Acta*,74, p85-87, 1977.
 342. KALUNZNY, M.A., et al.,- *J.Lipids.Res.* 25, p135-140, 1985.
 343. KAMINSKAS A., ZIEDEN B., ELVING B., KRISTENSON M., ABARAVICIUS A., BERGDAHL B., OLSSON A.G., KUCINSKIENE Z.- Adipose tissue fatty acids in men from two populations with different cardiovascular risk: the LiVicia study. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 59 (3) p227-32, May 1999.
 344. KANG J.X., LEAF A. - Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes., *Proc. Natl. Acad.Sci.USA*, 91, p9886-9890, 1994.
 345. KANG J.X., LEAF A. - Protective effect of all-trans-retinoic acid against cardiac arrhythmias indicated by isoproterenol, lysophosphatidyl choline or ischemia and reperfusion., *J.Cardiovasc. Pharmacol*, 26, p943-948, 1995.
 346. KANG J.X., LEAF A., - Prevention and termination of arrhythmias induced by lysophosphatidyl choline and acylcarnitine in neonatal rat cardiac myocytes by free ω 3 polyunsaturated fatty acids., *Eur.J.Pharmacol.* 297, p97-106, 1996.
 347. KARLAGNIS, G., PAUMGARTNER, G., - Analysis of bile acids in serum and bile by capillary gas-liquid chromatography, *Journal of Lipid Research*, 19, p771-771, 1978.
 348. KARMALI R.A.,- Dietary ω 3 and ω 6 fatty acids in cancer., In : Galli C., Simopoulos A.P. (eds). *Dietary ω 3 and ω 6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality*, New York, Plenum Press, p351-359, 1989.
 349. KATAN M.B., MENSINK R.P., - Isomeric fatty acids and serum lipoproteins, *Nutr. Rev.* 50, 4(Pt 2), p46-48, 1992.
 350. KELLEY D.S., RUDOLPH I.L. - Effect of individual fatty acids of omega-6 and omega-3 type

- on human immune status and role of eicosanoids. *Nutrition* 16 (2) p143-5, Feb 2000.
351. KELLEY V.E., FERRETTI A., IZUI S., STROM T.B., - A fish diet rich in eicosapenta-enoic acid reduces cyclooxygenase metabolites, and suppresses lupus in MRL-1pr mice., *J.Immunol*, 134, p1914-1919, 1985.
352. KEYS A. – Coronary heart disease in seven countries, *Circulation*, 41, (suppl.), p1-211, 1970.
353. KEYS A., ANDERSON J.T., GRANDE F. – “Essential” fatty acids, degree of unsaturation and effect of corn (maize) oil on the serum Cholesterol level in man. *Lancet*, 1, p66-68, 1955.
354. KEYS A., ANDERSON J.T.,GRANDE F.,- Serum cholesterol response to dietary fat, *Lancet*, 1, 78(letter), 1954.
355. KHUN E., - *Symposium Wilhelm Erb, Heidelberg Ed.* 1965.
356. KINSCHERF R., FISCHBACH T., MIHM S., ROTH S., HOHENHAUS-SIEVERT E., WEISS C., EDLER L., BARTSCH P., DROGE W. - Effect of glutathion depletion and oral N-acetyl-cysteine treatment on CD4+ and CD8+ cells. *FABES-J.* Apr 1;8(6) p448-51, 1994.
357. KISHIMOTO Y., RADIN N.S., TOURTELLOTTE W.W., PARKER J.A., ITABASHI H.H. - Gangliosides and glycerophospholipids in multiple sclerosis white matter., *Arch. Neurol*, 16,p44, 1967.
358. KLASSEN G.A., BLOSTEIN R.- Adenosine triphosphatase and myopathy, *Science* 163, p492-493, 1969.
359. KLEIN D.C., RAISZ L.G. - Prostaglandins : stimulation of bone resorption in tissue culture., *Endocrinology*, 86, p1436-1440, 1970.
360. KLENK E., KAHLKE W. - Uber das Vorkommen der 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansaure (phytansaure) in den Cholesterinestern und anderen Lipoidfraktionen der organe bei einem Krankheitsfall unbekannter Genese (Verdacht auf Heredopathia Atactica Polyneuritiformis Refsum-syndrome), *Hoppe-Seyler Zeits Physiol Chem.*, 333, p133-139, 1963.
361. KNAPP D. R. - *Handbook Of Analytical Derivatization Reactions*, John Willy & Sons, New York, NY, 1979.
362. KNAPP H.R., FITZGERALD G.A. - The antihypertensive effects of fish oil.A controlled study of polyunsaturated fatty acids and supplements in essential hipertension., *N.Engl. J.Med*, 320, p1037-1043, 1989.
363. KNAPP H.R., REILLY I.A.G., ALESSANDRINI P., FITZGERALD G.A. – In vivo indexes of platelet and vascular function during fish-oil administration in patients with atherosclerosis., *N.Engl.J.Med.*, 314, p937-942, 1986.
364. KOBAYASHI T., MAWATERI S., KUROIWA Y. – Lipids and proteins of erythrocyte membrane in Duchenne muscular dystrophy., *Clin.Chim.Acta*.85, p259-266, 1978.
365. KOIKE T., ISHIDA G., TANIGUCHI M., HIGAKI K., AYAKI Y., SAITO M., SAKAKIHARA Y., IWAMORI M., OHNO K. - Decreased membrane fluidity and unsaturated fatty acids in Niemann-Pick disease type C fibroblasts., *Biochimica et biophysica Acta* 1406; (3); p327-35, Apr 28 1998.
366. KOLETZKO B., MOROTZEK M., EUG B., BRENNER H.J.– Fatty acid composition of mature human milk in Germany., *Am. J. Clin. Nutr.* 47, p954-959, 1988.
367. KORN E. D. – Structure and function of plasma membrane, *J.Gen.Physiol.* 52, p257s, 1968.
368. KOSKI C.L., JUNGAWALA F.B. KOLODNY E.H. – Normality of erythrocyte phospho-lipids in Duchenne muscular dystrophy., *Clin.Chim.Acta*,85, p295-298, 1978.
369. KOSS, F.W., MAYER, D., HAINDL, H. - Bile Acids in Methods Of Enzymatic Analysis, *Bergmeyer, U – Verlag Chemie Weinheim, Academic Press, Inc. New York and London, Ed.* p1886, 1974.

370. KOSTNER G.M., HERRMANN W. - Influence of ω 3 PUFA on plasma Lp(a) concentration., In: *International symposium on multiple risk factors in cardiovascular disease.*, Houston, Giovanni Lorenzini Medical Foundation, 56 (abstr.), 1990.
371. KOVALEVA E.S., ORLOV O.N., TSUTSULKOVSKAIA M.I.A., VLADIMOROVA T.V., BELIAEV B.S.- Lipid peroxidation processes in patients with schizophrenia. *Zh. Neuropatol. Psikiatr.*, 89, 108-110, 1989.
372. KOVALEVA E.S., ORLOV O.N., TSUTSULKOVSKAIA M.I.A., VLADIMOROVA T.V., BELIAEV B.S.- Lipid peroxidation processes in patients with schizophrenia. *Zh. Neuropatolo.Psikiatr.* 89, p108-110, 1989.
373. KRELL, K., HASHIM, K., - Measurement of serum triglycerides by thin-layer chromatography and infrared spectrophotometry. *J. Lipid. Res.* 4. p407, 1963.
374. KREMER J.M., JUBIZ W., MICHALEK A. - Fish oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis., *Ann. Inern Med.*, 106, p497-503, 1987.
375. KREMER J.M., LAWRENCE D.A., JUBIZ W. - Different doses of fish-oil fatty acids ingestion in active rheumatoid arthritis., in: Galli C., Simopoulos A.P.,(eds.) *Dietary ω 3 and ω 6, biological effects and nutritional essentiality*, New York, Plenum Press, p343-350, 1989.
376. KREMER JM.,- n-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *American journal of clinical nutrition* 71 (1Suppl) p349S-51S., Jan 2000.
377. KRIS-ETHERTON PM.- AHA science advisory: monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Journal of nutrition*, 129,(12),p2280-4, Dec.1999.
378. KULAKOVA SN., GAPPAROVA KM., POGOZHEVA AV., LEVACHEV MM. - Evaluation of the effects of fish and vegetable omega-3 PUFA complex on the erythrocyte fatty acid composition in patients with ischemic heart disease and impaired glucose tolerance., *Voprosy pitaniia* 68 (5-6) p26-9, 1999.
379. KUMAR, A., CHRISTIAN, G.D., - *Clin.Chim Acta.* 74, p101, 1977.
380. KUNKEL L.M. AND 76 CO-AUTHORS . - Analysis of delation of DNA from patients with Becker and Duchenne muscular Dystrophy., *Nature, London*, 322, p73-77,1986.
381. KUNZE D., OLTHOFF D. - Der lipidgehalt mensschlicher skelettmuskulatur bei primaren und sekundaren myopathien., *Clin.Chim.Acta*, 4, p333, 1973.
382. KUNZE D., REICHMANN G., EGGER E, LEUSCHANER G., ECKHARDT H. - Erythrozy-tenlipide bei progressiver muskeldystrophia, *Clin.Chim.Acta* 43, p333-341, 1973.
383. KUYPERS F.A., LUBIN B.H., YEE M., AGRE P., DEVAUX P.F., GELDWERTH D. - The distribution of erythrocyte phospholipids in hereditary spherocytosis demonstrates a minimal role for erythrocyte spectrin on phospholipid diffusion and asymmetry. *Blood.* 1993 Feb 15; 81(4): p1051-7, 1993.
384. LAGARDE M., DELTON-VANDENBROUCKE I., VERICEL E., JANUEL C., CARRERAS M., LECOMTE M. - Dual regulation of glutathione peroxidase by docosahexaenoic acid in endothelial cells depending on concentration and vascular bed origin. *Free radical biology & medicine* 30; (8); p895-904, Apr 15 2001.
385. LAMELOISE N., MUZZIN P., PRENTKI M., ASSIMACOPOULOS-JEANNET F. - Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? *Diabetes*, 50; (4); p803-9, Apr 2001.
386. LANDOUZY L., DÉJERINE J. - De la myopathie atrophique progressive (myopathie sans neuropathie, débutant d'ordinaire dans l'enfance, par la face)., *Rev.Méd.*, 5,p8-253, 1885.
387. LANDS W.E., LIBELT B., MORRIS A., KRAMER N.C., PREWITT T.E., BOWEN P., SCHMEISSER D., DAVIDSON M.N., BURNS J.H.- Maintenance of Lower proportion of (n-6) eicosanoid precursor in phospholipids of human plasma in response to added dietary (n-3) fatty acids. *Biochem. Biophys. Acta* 1180, p147-162, 1992.
388. LANDYMORE R.W., MACAULY M., SHERIDAN B., CAMERON C.- Comparison of cod-liver oil

- and aspirin-dipyridamole for the prevention of intimal hyperplasia in autologous vein grafts., *Ann Thorac. Surg.*, 41, p54-57, 1986.
389. LANZMANN-PETITHORY D. - Alpha-linolenic acid and cardiovascular diseases. *Journal of nutrition, health & aging* 5; (3); p179-83, 2001.
390. Larque E; Zamora S; Gil A. - Dietary trans fatty acids in early life: a review. *Early human development* 65 Suppl; pS31-41, Nov 2001.
391. LAZAROW P.B., DE DUVE C. - A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clorofibrate, hipolipidemic drug., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, p2043-2046, 1976.
392. LAZAROW P.B., FUJIKI Y.- Biogenesis of peroxisomes, *Ann.Rev.Cell.Biol.*,1, p489-530, 1985.
393. LEAF A. - Diet and sudden cardiac death. *Journal of nutrition, health & aging* 5; (3); p173-8, 2001.
394. LEAF A., KANG J.X., XIAO Y.F., BILLMAN G.E. - Dietary n-3 fatty acids in the prevention of cardiac arrhythmias., *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*,1 (2) p225-8, Mar 1998.
395. LEAF A., KANG J.X., XIAO Y.F., BILLMAN G.E. - n-3 fatty acids in the prevention of cardiac arrhythmias. *Lipids*, 34 Suppl pS187-9, 1999.
396. LEAF A., KANG J.X., XIAO Y.F., BILLMAN G.E., VOSKUYL R.A. - The antiarrhythmic and anticonvulsant effects of dietary N-3 fatty acids. *Journal of membrane biology* 172 (1) p1-11, Nov 1 1999.
397. LEAF A., KANG, J.X. - ω 3 FattyAcids and Cardiovascular Diseases in: *Simopoulos A.P. (ed.)-The Return of ω 3 fatty Acids into the Food Supply. I. Land-based Animal food Products and Their Health Effects. World Rev. Nutr. Diet., Basel, Karger, 88, p24-37,1998.*
398. LEE T.H., HOOVER R.I., WILLIAMS J.D., SPERLING R.I., RAVALESE J. III, SPUR B.W., ROBINSON D.R., COREY E.J., LEWIS R.A., AUSTEN K.F. - Effects of dietary enrichment with eicosapentenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function., *N.Engl. J.Med.*, 312, p1217-1224, 1985.
399. LEES R.S., HATCH F.T. - Sharper separation of lipoprotein species by paper electrophoresis in albumin - containing buffer. *Journ. Lab.Clin.Med.*, 41, p2254, 1963.
400. LEHAR H.A., HUBER C., FINCK B., NOITE D., BEISIEGEL U., KOHLSCHUTTER A., MESSNER X. - Dietary fish oil reduces leukocyte/endothelial interaction following systemic administration of oxidatively modified low density lipoprotein. *Circulation*, 84, p1725-1732, 1991.
401. LENG G.C., TAYLOR GS., LEE AJ., FOWKES F.G., HORROBIN D. - Essential fatty acids and cardiovascular disease: the Edinburgh Artery Study.,*Vascular medicine* 4 (4) p219-26, 1999.
402. LEUVEN J.A., DE PAGTER H.A., DERSJANT ROORDA M.A., HELMERHORST F.A., ROELOFSEN J. - Effect of two monophasic oral contraceptives containing gestodene or desogestrel on serum lipoprotein lipid levels.*Int-J-Fertil.*34 Suppl: p55-60, 1989.
403. LEVIN R.J.- *The Living Barrier*, W. Heinemann Medical Books Ltd., London, p.1-21, 1969.
404. LEVINE P.H., FISHER M., SCHNEIDER P.B., WHITTEN R.H., WEINER B.H. - Dieary supplementation of ω 3 fatty acids prolongs platelet survival in hyperlipemic patients with atherosclerosis., *Arch.Int.Med.* 149, p1113-1116,1989.
405. LEWIS R.A., LEE T.H., AUSTEN K.F.- Effects of omega-3 fatty acids on the generation of products of the 5-lipoxygenase pathway., In : *Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E., (eds.), Health effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods, Orlando, FL, Academic Press, p227-238,1986.*

406. LICHTENSTEIN A.H., AUSMAN L.M., CARRACSO W., JENNER J.L., ORDOVAS J.M., SCHAEFER E.J. - Hydrogenation impairs the hypolipidemic effect of corn oil in humans. Hydrogenation, trans fatty acids and plasma lipids. *Arterio-sclerosis Thrombosis*, 13, p154-161, 1993.
407. LINDBERG, O., ERNSTER, L.- Determination of organic phosphorus compounds by phosphate analyses. In : *Methods of biochemical analysis*. Ed. D.Glick, New York : Interscience Publishers, vol.3,p.1 1955.
408. LITIN L., SACKS F. - Trans-fatty - acid content of common foods., *N. Engl. J. Med.*, 329, p1969-1970, 1993.
409. LORENZ R., SPENGLER U., FISCHER S., DUHM J., WEBER P.C. - Platelet function, thromboxane formation and blood pressure control during supplementation of the Western diet with cod liver oil. *Circulation*, 67, p504-511, 1983.
410. LOVEJOY J.C. - Dietary fatty acids and insulin resistance. *Current athero-sclerosis reports*, 1; (3); p215-20, Nov 1999.
411. LUCAS A., MORELY R., COLE T.J., LISTER G., LEESON-PAYNE C. - Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet*. 339, p261-264, 1992.
412. Lucy J. A. - *J. Theor. Biol.*, 7, 360, 1964.
413. MACALA L.J., YU R.K., ANDO S.- Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry, *J.Lipid Res.* 24,p1243-1250, 1983.
414. MAHADEVAN S., DILLARD C.J., TAPPEL A.L. - A modified Colorimetric Micro Method for long-chain fatty Acids and Its Application for Assay of lipolytic Enzymes, *Analyt. Biochem.*, 37, p387-396, 1969.
415. MAI-J; SORENSEN-PS; HANSEN J.C. - High dose antioxidant supplementation to MS patients. Effects on glutathione peroxidase, clinical safety, and absorption of selenium, *Biol-Trace-Elem-Res. Feb*; 24(2): p109-17 , 1990.
416. MAKINO I., SHINOZAKI K., NAKAGAWA S., MASHIMO, K. - Measurement of sulfated and non-sulfated bile acids in human serum and urine. *Journal of lipid Research* 15, p132-138, 1974.
417. MALIS C., LEAF A., VARADARAJAN G.S. NEWELL J.B., WEBER P.C., FORCE T., BONVENTRE J.V.- Effects of dietary fish oil on vascular contractility in pre-anoxic and postanoxic aortic rings. *Circulation*, 84, p1393-1401, 1991.
418. MALMROS H., WIGAND G. - *Report of Minnesota Arteriosclerosis Symposium. Minn. Med.* 38,p864, 1957.
419. MANERI L.R., LOW P.S. - Fatty acid composition of lipids which copurify with band 3. *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 159(3), p1012-9, 1989.
420. MARCHIOLI R., VALAGUSSA F. - The results of the GISSI-Prevenzione trial in the general framework of secondary prevention., *European heart journal*.21; (12); p949-52., Jun 2000.
421. MARCKMANN P., GRONBAEK M. - Fish consumption and coronary heart disease mortality. A systematic review of prospective cohort studies., *European journal of clinical nutrition*, 53 (8) p585-90, Aug 1999.
422. MARINETTI G.V., LOVE R. - The separation of ionic forms of phosphatidylserine by column chromatography., *Biochem.Biophys. Acta*, 30, p41, 1958.
423. MARINEZ M.- Polyunsaturated fatty acid changes suggesting a new enzymatic defect in Zellweger syndrome, *Lipids*, 24, p261-265, 1989.
424. MARINEZ M.- Severe deficiency of docosahexaenoic acid in peroxisomal disorders: A defect of D4 desaturation?, *Neurology*,40,p1292-1298, 1990.
425. MARINEZ M., - Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney, and retina of patients with peroxisomal disorders., *Brain Res.* 583, p171-182, 1992.
426. MATTHAN N.R., JONES P.J. - Differential effects of individual trans fatty acid isomers on

- lipoprotein assembly and metabolism. *Nutrition reviews* 57 (9 Pt 1) p282-4, Sep 1999.
427. MATTSON P.H., HOLLENBACH E.J., KLIGMAN A.M. – Effect of Hydrogenated fat on the plasma cholesterol levels and triglycerides levels of man., *Am.J.Clin. Nutr.* 28, p726-731, 1975.
428. MAYER M - Essential fatty acids and related molecular and cellular mechanisms in multiple sclerosis: new looks at old concepts. *Folia biologica* 45 (4) p133-41., 1999.
429. MAYOL V; DURAN MJ; GERBI A; DIGNAT-GEORGE F; LEVY S; SAMPOL J; MAIXENT JM. - Cholesterol and omega-3 fatty acids inhibit Na, K-ATPase activity in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 142; (2); p327-33, Feb 1999.
430. MAZIER MJ; JONES P.J., - Dietary fat saturation, but not the feeding state, modulates rates of cholesterol esterification in normolipidemic men. *Metabolism: clinical and experimental* 48 (10), p1210-5, Oct 1999.
431. MAZLIAK P. – *Les Membranes Protoplasmiques*, Ed. Doin, Paris. 1971.
432. MCALPINE D., LUMSDEN C.E., ACHESON E.D., - *Multiple Sclerosis, Williams and Wikins Ed.*, Baltimore, 1963.
433. MCCREADIE R.G. – The Nithsdale Schizophrenia Surveys. 16. Breastfeeding and schizophrenia: preliminary results and hypotheses., *Br.J.Psychiat*, p334-337, 1997.
434. MCLACHLAN T., MCCOLL A.J., COLLINS M.F., CONVERSE C.A., PACKARD C.J., SHEPHERD J.- A longitudinal study of plasma ω -3 fatty acid levels in a family with X-linked retinitis pigmentosa. *Biochem.Soc.Trans*, 18, p905-906, 1990.
435. MCLAUGHLIN J., ENGEL W.K. – Lipid composition of erythrocytes. Findings in Duchenne's muscular dystrophy and myotonic atrophy. *Arch. neurol.* 36, p351-354, 1979.
436. MCLENNAN P.L. - Relative effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on cardiac arrhythmias in rats. *Am.J. clin. Nutr.* 57, p207-212. 1993.
437. MCLENNAN P.L., ABEYWARDENA M.Y., CHARNOCK J.S. - The influence of age and dietary fat in an animal model of sudden cardiac death., *Aust.NZ.J.Med.* 19,p1-5,1989.
438. MCLENNAN P.L., ABEYWARDENA M.Y., CHARNOCK J.S.– Influence of dietary lipids on arrhythmias and infarction after coronary artery ligation in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 63, p1411-1417, 1985.
439. MCLENNAN P.L., BRIDLE T.M., ABEYWARDENA M.Y., CHARNOCK J.S – Dietary lipid modulation of ventricular fibrillation threshold in the marmoset monkey. *Am.Heart J.* 123, p1555-1561, 1992.
440. McMILLAN D.E.–Antihypertensive effects of fish oil., *N.Engl.J.Med*, 321, p1610 (letter), 1989.
441. MEGRAW, R.E., DUNN, D.E., BIGGS, H.G. - *Clin.Chem.* 25,p273, 1979.
442. MEISTER A. - Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol-Ther.* 51(2): p155-94) 1991.
443. MENKES J.H., ALTER M., STEIGLEDER G.K., WEAKLEY D.R., SUNG J.H. - A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration., *Pediatrics*, 29,p764, 1962.
444. MENSINK R.P, STOLWIJK A.M., KATAN M.B., - Effect of monounsaturated diet vs. a polyunsaturated fatty acid-enriched diet on blood pressure in normo-tensive women and men. *Eur.J.Clin.Invest.* 20(4),p463-469, 1990.
445. MENSINK R.P., KATAN M.B. - Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials., *Arterioscler-Thromb.* 12 (8), p911-919, 1992.
446. MENSINK R.P., KATAN M.B. – Effects of trans fatty acids on high-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects, *N.Engl. J. Med.*, 323, p439 - 445, 1990.
447. MENSINK R.P., ZOCK P.L., KATAN M.B., HORNSTRA G. – Effect of dietary cis and trans acids on serum lipoprotein [a] levels in humans, *J.Lip. Res.* 33(10), p1493-1501, 1992.

448. MEST H.J., BEITZ J., HEINROTH I., BLOCK H.U., FORSTER W. - The influence of linseed oil diet on fatty acid pattern in phospholipids and thromboxane formation in platelets and man. *Klin Wochenschr.* 61, p187, 1983.
449. MEYDANI M. - Omega-3 fatty acids alter soluble markers of endothelial function in coronary heart disease patients. *Nutrition reviews* 58;(2 Pt1); p56-9, Feb 2000.
450. MICHAELS, G. - A method for the determination of plasma glycerides and free fatty acids, *Metabolism* 11, p833, 1962.
451. MIDDELKOOP E., COPPENS A., LLANILLO M., VAN DER HOEK E.E., SLOTBOOM A.J., LUBIN B.H., OP DEN KAMP J.A., VAN DEENEN L.L., ROELOFSEN B. - Aminophospho-lipid translocase in the plasma membrane of Friend erythroleukemic cells can induce an asymmetric topology for phosphatidylserine but not for Phosphatidylethanolamine. *Biochim-Biophys-Acta.* 978(2): p241-8, 1989.
452. MILJANICH G.P., SKALAR L.A., WHITE D.L., DRATZ E.A. - Disaturated and dipoly-unsaturated phospholipids in the bovine retinal rod outer segment disk membrane. *Biochim. Biophys.Acta,* 552,p294, 1979.
453. MILNER M.R., GALLINO R.A., LEFFINGWELL A., PICHARD A.D., ROSENBERG J., LINDSAY J. - High dose omega-3 fatty acid supplementation reduces clinical restenosis after coronary angioplasty, *Circulation.*78(suppl.2), p634 (abstr.),1988.
454. MOHRHAUER H., HOLMAN R.T. - Alterations of fatty acid composition of brain lipids by varying levels of dietary essential fatty acids., *J.Neurochem.*17, p347-355, 1963.
455. MOIZARD M.P., TOUTAIN A., FOURNIER D., BERRET F., RAYNAUD M., BILLARD C., ANDRES C., MORAIN C.- Severe cognitive impairment in DMD:obvious clinical indication for Dp71 Isoform point mutation screening., *European journal of human genetics* 8; (7); p552-6, Jul 2000.
456. MONACO A.P., NEVE R.L., COLLETTI-FEENER C., BERTELSON C.J., KURNIT D.M., KUNKEL L.M.- Isolation of candidate cDNAs for portion of Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature, London,* 323, p646-650, 1986.
457. MOOR H. - *Z.zellforsch.*, 62, 546, 1964.
458. MOOR H., MÜHLEHALER K., Waidner H., FREY-WYSSLING H.- *J.Biophys. Biochem. Cytol.* 10,p1, 1971.
459. MORI T.A., BAO D.Q., BURKE V., PUDDEY I.B., WATTS G.F., BEILIN L.J. - Dietary fish as a major component of a weight - loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. *American journal of clinical nutrition* 70 (5) p817-25, Nov 1999.
460. MORRIS L.J. - Fractionation of cholesterol esters by thin layer chromatography. *J.Lipid Res,* 4, p357, 1963.
461. MORRISON, W.R., SMITH, L.M. - Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol, *J. Lipid Res.* 5, p600-608, 1964.
462. MOSER A.B., JONES D.S., RAYMOND G.V., MOSER H.W. - Plasma and red blood cell fatty acids in peroxisomal disorders., *Neurochemical Research,*24,2, p187-197,1999.
463. MOTRENSEN J.Z., SCHMIDT E.B., NIELSEN A.H., DYERBERG J. - The effect of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on hemostasis, blood lipids and blood pressure. *Thromb Haemost,* 50, p543-546, 1983.
464. MOURAD, N., ZAGER, R., NEVEAU, P.,- *Clin. Chem.*19, p116, 1973.
465. MULLER H.W., PURON A.D., SMITH J.B., WYKLE R.L. - 1-o-Alkyl-linked phospho-glycerides of human platelets: distribution of arachidonate and other acyl phosphoglycerides in the ether-linked and diacyl species. *Lipids,*18, 814,1980.
466. MUNDY G.R. - Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling., *J.Bone Miner.Res.*, 8, pS505-S510, 1993.

467. MUNSAT T.L., BALOH R., PEARSON C.M., FOWLER W. JR. - Serum enzyme alteration in neuromuscular disorders., *JAMA* 226, p1536-1543, 1973.
468. MUTANEN M., KLEEMOLA P., VALSTA L.M., MENSINK R.P., RASANEN L. - Lack of effect on blood pressure by polyunsaturated and monounsaturated fat diets., *Eur. J. Clin. Nutr.* 46 (1), p1-6, 1992.
469. NAGAKAWA Y., ORIMO H., HARASAWA M., MORITA I., YASHIRO K., MUROTA S. - Effect of EPA on platelet aggregation and composition of fatty acids in man., *Atherosclerosis*, 47, p71-75, 1983.
470. NAITO, H.K., DAVID, J.A. - Laboratory Considerations : Determination of Cholesterol, Triglyceride, Phospholipid and Other Lipids in Blood and Tissues in *Lipid Research Methodology*, Alan R. Liss, Inc. p. 1-76, 1984.
471. NASTEL P., NOAKES M., BELLING B., MC ARTHUR R., CLIFTON P., JANUS E. - Plasma lipoprotein and Lp(a) changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. *J.Lipid Res.*, 33, p1029-1036, 1992.
472. NEEDELEMAN P., RAZ A., MINKES M.S., FERRENDELI J.A., SPRECHER H. - Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique Biological properties., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, p944-948, 1979.
473. NEILL A.R., MASTERS C.J. - Metabolism of fatty acids by ovine-spermatozoa., *J. Reprod. Fert.* 34, p279, 1973.
474. NELSON A.M., - Diet therapy in coronary disease. Effect on mortality of high-protein, high-seafood, fat-controlled diet. *Geriatrics*, 12, p103-116, 1972.
475. NESTEL P. - Effects of fish oils and fish on cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports* 3; (1); p68-73, Jan 2001.
476. NESTEL P.J. - Fish oil attenuates the cholesterol-induced rise in lipoprotein cholesterol., *Am. J. Clin.Nutr.*, 43, p752-757, 1986.
477. NESTEL P.J., CONNOR W.E., REARDON M.R., CONNOR S., WONG S., BOSTON R. - Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J. Clin. Invest*, p72-89, 74, 1984.
478. NESTEL P.J. - Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. *American journal of clinical nutrition* 71 (1Suppl) p228S-31S., Jan 2000.
479. NEURINGER M., CONNOR W., LIN D., BARSTED L., LUCK S. - Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal ω 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, p4021-4025, 1986.
480. NICHOLSON G.A., GARDNER-MEDWIN D., PENNINGTON R.J.T., WALTON J.N., - Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy: assessment of effect of age on detection rate with serum creatine kinase activity., *Lancet* 1, p692-694, 1979.
481. NICOLOSI R.J., - Experimental mechanism: formation of atheroma in *Kris- Etherton P.M. (ed). Trans Fatty Acids and Coronary Heart Disease Risk*, *Am J. Clin. Nutr.* 62 (suppl): p655S-708S, 1995.
482. NIELSON N.C., FLEISCHER S., MCCONNELL D.G. - Lipid composition of bovine retinal outer segment fragments. *Biochim. Biophys. Acta*, 211, p10, 1970.
483. NIERBOJ-DOBOSZ I., FIDZIANSKA A., HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I. - Oxidative damage to muscle proteins in dystrophinopathies., *The 6th Congress of Mediterranean Society of Myology*, 23-26 May, 2002.
484. NILSEN D.W., ALBREKTSSEN G., LANDMARK K., MOEN S., AARSLAND T., WOIE L. - Effects of a high-dose concentrate of n-3 fatty acids or corn oil introduced early after an acute myocardial infarction on serum triacylglycerol and HDL cholesterol. *American journal of clinical nutrition* 74;(1); p50-6, Jul 2001.
485. NOAKES M., CLIFTON P.M. - Changes in plasma lipids and other cardiovascular risk factors during 3 energy-restricted diets differing in total fat and fatty acid composition.

- American journal of clinical nutrition, 71 (3) p706-12, Mar 2000.
486. NOVAK, M.- Colorimetric ultramicromethod for the determination of free fatty acids. *J.Lipid Res.* 6,p431, 1965
487. NOVGORODTSEVA T.P., ENDAKOVA E.A., IVANOVA E.M., KOZYCHEVA E.V.- Possibility of correction of erythrocyte fatty acid composition in men with anamnesis of hereditary ischemic heart disease., *Voprosy pitaniia* 68 (5-6) p30-4., 1999.
488. NUSSBAUM J.L., NESKOVIC N., MANDEL P. - The fatty acid composition of phospholipids and glycolipids in Jimpy mouse brain. *J.Neurochem.* 18, p1529, 1971.
489. O'BRIEN J.S., SAMPSON E.L. - Fatty acids and aldehyde composition of the major brain lipids in normal gray matter, white matter and myelin., *J.Lipide Res.*, 6, p545-515, 1965.
490. O'BRIEN J.S., SAMPSON E.L. - Kinky hair disease II. Biochemical studies., *J.Neuropath. Exp. Neurol.*, 25, p523,1966.
491. O'KEEFE S.F., GASKINS-WRIGHT S., WILEY V., CHEN-CHEN I. - Level of trans geometrical isomers of essential fatty acids in some unhydrogenated U.S. vegetable oils., *J. Food Lipids*, 1, p165-176,1994.
492. O'KEEFE S.F., WILEY V., GASKINS-WRIGHT S., - Geometrical isomers of essential fatty acids in liquid infant formulas., *Food.Res.Inst.* 27, p7-13, 1994.
493. OKEN R.J.- Obsessive-compulsive disorder: a neuronal membrane phospho-lipid hypothesis and concomitant therapeutic strategy., *Medical hypotheses*, 56; (4); p413-5, Apr 2001.
494. ONUMA Y., MASUZAWA Y., ISHIMA Y., WAKU K. - Selective incorporation of docosahexaenoic acid in rat brain.,*Biochem.Biophys. Acta*, 793, p80,1984.
495. Op den Kamp J.A., Roelofsen B. -Transbilayer mobility of Phosphatidyl -choline in the red blood cell. *Methods-Enzymol.* 173;p 223-31, 1989.
496. OSMUNDSEN H; CLOUET P.- Metabolic effects of omega-3 fatty acids. *BioFactors* 13; (1-4); p5-8, 2000.
497. OVERTON E. – Ueber die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tiergelle. *Vjschr. Naturforsch. Ges. Zurich* 40, p159, 1895.
498. PACE-ASCIAC C.R. - One-step rapid extractive methylation of plasma nonesterified fatty acids for gas chromatographic analysis, *J. Lipid Res.* 30, p451-454, 1989.
499. PAGANELLI F., MAIXENT J.M., DURAN M.J., PARHIZGAR R., PIERONI G., SENNOUNE S. - Altered erythrocyte n-3 fatty acids in Mediterranean patients with coronary artery disease., *International journal of cardiology* 78; (1); p27-32, 2001.
500. PALADE G. E. – Funcțiile multiple ale endoteliului vascular, workshop: "Evenimentele celulare și moleculare în ateroscleroză", București , 13-16 mai,1985.
501. PALADE G. E. – The fine structure of Blood capillaries, *J.Appl.Physiol.*, 24, p1424-1435, 1953.
502. PALADE G. E.- Intracellular Aspects of process of protein synthesis, *Science*,189, p347-358,1975.
503. PANTIN C.F.A.–Homeostasis and the environment, *Symp. Soc. exper. Biol.*, vol.18, p1-6,1964.
504. PAOLETTI R., GALLI C., - Effects of essential fatty acid deficiency on the central nervous system in the growing rat, in :*Lipids, Malnutrition and Developing Brain*, Elsevier, Amsterdam, p.121, 1972.
505. PARKS J.S., BULLOCK H. – Effect of fish oil versus lard diets on the chemical and physical properties of low density lipoproteins of nonhuman primates., *J. Lipid.Res.*, 28, p173-182, 1987.
506. PARKS J.S., BULLOCK H., RUDEL L.L. – The reactivity of plasma phospholipids with LCAT is decreased in fish oil-fed monkey., *J.Biol. Chem.*, 264, p2545-2551, 1989.
507. PARKS J.S., MARTINE J.A., SONBERT B.L.- Alteration of high density lipoprotein

- subfraction of non-human primates fed fish oil diets., *Arteriosclerosis*, 7, p71-79, 1987.
508. PARTINGTON, J.R., - *A History of Chemistry*, vol.3, p. 223. Ed. MacMillan, London, 1962.
509. PEARCE, P.H., JOHANSEN R.D., WY SOCK S.J., KAKULAS B.A., - Muscle Lipids in Duchenne Muscular Dystrophy, *Ajebak* 59 (Pt.1), p77-90, 1981.
510. PEATNIȚCHI I., - *Dialectica vitalității organismelor*, Ed. Acad. R.S.România, 1969.
511. PEET M, TELANG S.D., VANKAR G.K., SHAH S., SELVAM K., ZHANG Z.J., RAMCHAND C.N. – Plasma TBARS levels in unmedicated chronic schizophrenic patients. *Presented at the International Congress on Schizophrenia Research, Colorado Springs, april, 1997.*
512. PEET M., LAUGHARNE J., RANGARAJAN N., HORROBIN D., REYNOLDS G. – Depleted red cell membrane essential fatty acids in drug-treated schizophrenic patients. *J. Psychiat. Res.* 29, 227-232, 1995.
513. PEET M., LAUGHARNE J., RANGARAJAN N., HORROBIN D., REYNOLDS G., - Depleted red cell membrane essential acids in drug-treated schizophrenic patients, *J.Psychiat.Res.*, 29, p227-232, 1995.
514. PEET M., TELANG S.D., VANKAR G.K., SHAH S., SELVAM K., ZHANG Z.J., RAMCHAND C.N. – Plasma TBARS level in unmedicated chronic schizophrenic patients. *Presented at the International Congress on Schizophrenia Research, Colorado Spring, April, 1997.*
515. PEGORIER JP. - Regulation of gene expression by fatty acids. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 1 (4) p329-34, Jul 1998.
516. PERETZ A.M., NEVE J.D., FAMMAEY J.P.- Selenium in rheumatic diseases, *Semin.Arthritis Rheum.*,20, p305-316, 1991.
517. PEREYARA-KÄFER J., POCH G.F., TAMAROFF L., - Contribución casuística a la genetica de los distrofias musculares, *Rev.neurol. B.Aires*, 15, p161, 1957.
518. PESCE A. J., KAPLAN L. A., MOSBY C.V. CO, - *Methods In Clinical Chemistry*, St.Louis, MO, 1987.
519. PESCE, M.A., BODOURIAN, S.H., - *Clin.Chem.* 22, p2042, 1977.
520. PETTEGREW J.W., KESHAVEN M.S., PANCHALINGHAM K., STRYCHOR M.P.H., KAPLAN D.B., TRETTE M.G., ALLEN M. – Alterations in brain high-energy phosphate and membrane phospholipid metabolism in first episode drug-naïve schizophrenics., *Arch.Gen. Psychiat.*, 48, 563-568, 1991.
521. PETTEGREW J.W., KESHAVEN M.S., PANCHALINGHAM K., STRYCHOR M.P.H., KAPLAN D.B., TRETTE M.G., ALLEN M. - Alterations in brain high-energy phosphate and membrane phospholipid metabolism in first episode drug-naïve schizophrenics., *Arch.Gen.Psychiat*, 48, p563-568, 1991.
522. PEZOLD F.A., - *Lipide und Lipoproteide im Blutplasma* . Berlin – Göttingen-Heidelberg : Springer, p210-325, 1961
523. PHILIPS M., SABAS M., GREENBERG J. – Increased pentane and carbon disulphide in the breath of patients with schizophrenia. *J. Cli. Pathol.* 46, 861-864, 1993.
524. PHILIPS M., SABAS M., GREENBERG J. –Increased pentane and carbon disulfide in breath of patients with schizophrenia. *J. Clin.Pathol*,46,p861-864, 1993.
525. PHILIPSON B.E., ROTHOCK D.W., CONNOR W.E., HARRIS W.S., ILLINGWORTH D.R. - Reduction of plasma lipids, Lipoproteins, and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia, *N.Engl. J. Med.* 312, p1210-1216, 1985.
526. PHILLIPS G.B., - The isolation and quantitation of the principle phospholipid components of human serum using chromatography on silicic acid, *Biochem. Biophys. Acta (Amst.)*, 29, p594, 1958.
527. PIRICH C., GASZO A., GRANEGGER S., SINZINGER H. - Effects of fish oil supplementation on platelet survival and ex vivo platelet function in hypercholesterolemic patients. *Thrombosis research* 96 (3) p219-27, Nov 1, 1999.
528. PLISHKER G. A., APPEL S.H. –Red blood cell alteration in muscular Dystrophy: The role of

- Lipids, *Muscle & Nerve*, 3, p70-81, 1980.
529. POMPEIA C., LOPES L.R., MIYASAKA C.K., PROCOPIO J., SANNOMIYA P., CURI R. -Effect of fatty acids on leukocyte function. *Brazilian journal of medical and biological research*, 33; (11); p1255-68, Nov 2000.
530. POP I.V.– *Genetica și Eredopatologia Orto-facială.*, Ed. Risoprint. Cluj-Napoca, 1998.
531. POP I.V.,PORUTIU D., BENGHA GH. - Dozarea fosforului din fosfolipidele separate prin cromatografie in strat subtire pe Silcagel, *St.Cerc.biochim.* 22,1, p55-58,1970.
532. POP M., SĂHLEANU V. - Entropia și unele aspecte ale saltului calitativ în biologie, *Rev. de filozofie*, 12, p185-194,1965.
533. POP V.I., COPREAN D. – *Genetica umană. Bazele mendeliene și moleculare ale eredității, vol.I.*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2002.
534. POPESCU M., - *Atlas de patologie eredo-degenerativă neuro-musculară*, Ed.Medicală, București, 1989.
535. POULOS A., BOGLMAYR J.K., WHITE I.G. - Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull., *Biochim. Biophys. Acta*, 306, p192,1973.
536. POULOS A., DARIN-BENNETT A., WHITE J.G., - The phospholipid bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa., *Comp. Biochem.Physiol.* 46B, 541-549, 1975.
537. PREOTEASA E.A., BERCEANU S., IONESCU I., IONESCU-TIRGOVIȘTE C., GRECU V.V., ET AL. – Complex biophysical and biochemical alteration in several cases of chronic diseases, *Progrese în biofizică și fiziologia moleculară a celulei*, București, 8-14 octombrie 1989.
538. PREOTEASA E.A., GEORGESCU R., IONESCU I., IONESCU-TIRGOVIȘTE C., GRECU V.V., - Electron spin resonance (ESR) and Gas Chromatography (GC) study of Erythrocyte membrane changes in Diabetes, *Al 20-Congres Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice*, București, p166, 1990.
539. PREOTEASA E.A., IONESCU I. - Fatty-acid Peroxidation in Relation to Trace Elements in Serum of Patients with Homozygous Sickle-Cell Anemia and β -Thalassemia: A Gas-Chromatographic Study, *Nutrition*, 11, 5, p546-550, 1995.
540. PREOTEASA E.A., IONESCU-TIRGOVIȘTE C., IONESCU I.,GEORGESCU R., GRECU V.V., Changes of Erythrocyte fluidity and Fatty acids in diabets studied by EPR and GC.- *15th International Diabetes Federation Congress, Kobe, Japan, 6-11 nov.1994.*
541. PRICKETT J.D., ROBINSON D.R., STEINBERG A.D. - Effects of dietary enrichment with eicosapentaenoic acid upon autoimmune nephritis in female NZBxNZW/F1 mice., *Arthritis Rheum.* 26, p133-139,1983.
542. PRIVETT O.S., STEARNS E.M., NICKELL E.C., - Metabolism of the geometric isomers of linolenic acid in the rat., *J.Nutr.* 92, p303-310, 1967.
543. PULLARKAT R.K., PATEL V.K., BROCKERHOFF H. - Leukocyte docosahexenoic acid in juvenil form of ceroid-lipofuscinosis., *Neuropediatric*,9, p127, 1978.
544. RACLOT T., OUDART H. -Selectivity of fatty acids on lipid metabolism and gene expression. *Proceedings of the Nutrition Society (ENGLAND)* 58 (3) p633-46, Aug 1999.
545. RADACK K., DECK C., HUSTER G., - Dietary supplementation with low dose fish oils lowers fibrinogen evels, a randomized, double-blind controlled study.. *Ann Intern Med.*, 111, p757-758, 1989.
546. RADU H. - *Patologia Unității Motorii*, Ed.Medicală, București, 1978.
547. RADU H. – Un secol de patologie musculară, *Neurol.Psihiat. Neurochir.* XIV (3), p279-284, 1969.
548. RAISZ L.G., - Bone cell Biology: New approaches and unanswered questions., *J.bone Miner.Res.*, 8, pS457-S465,1993.
549. RAMIREZ M., GALLARDO EM., SOUTO AS., WEISSHEIMER C., GIL A. - Plasma fatty-acid composition and antioxidant capacity in low birth-weight infants fed formula enriched

- with n-6 and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids from purified phospholipids. *Clinical nutrition* 20; (1); p69-76, Feb 2001.
550. RANDRUP A. - A specific and reasonably accurate method for routine determination of plasma triglyceride. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 12,p1, 1960.
551. RATHAKRISHNAN C., TIKU K., RAGHAVAN A., TIKU M.L. – Release of oxygen radicals by articular chondrocytes: a study of lumino-dependent chemi-luminescence and hydrogen peroxide secretion, *J.Bone Miner.Res.*,7, p1139 - 1148, 1992.
552. RATNAYAKE W.M.N., CHARDIGNY J.M., WOLFF R.T., MAGER E., BAYARD C.C., SEBEDIO J.L., MARTINE L., - Essential fatty acids and their trans geometrical isomer in powdered and liquid infant formula sold in Canada. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 25, p96-116, 1997.
553. RATNAYAKE W.M.N., HOLLYWOOD R, O'GRADY E., - Fatty acids in Canadian margarines. *Can. Inst. Sci. Technol. J.*, 24, p81-86, 1991.
554. RATNAYAKE W.M.N., CHEN Z.Y., PELLETIER G., WEBER D., - Occurrence of 5c,8c, 11c,15t eicosantetraenoic acid and other unusual polyunsaturated fatty acids in rats fed partially hydrogenated canola oil. *Lipids*, 29, p707-714, 1994.
555. REFSUM S. - Heredoataxia Hemeralopica Polyneuritifformis—et tidligere ikke beskrevet familiaert syndrom. *Nordisk Medicin* 28,p2682-2685,1945.
556. REFSUM S. - Heredopathia Atactica Polyneuritifformis: A familial syndrome not hitherto described. A contribution to the clinical study of the hereditary disorders of the nervous system. *Acta Psychiatr.Scand. suppl.38*, 1946.
557. RHODIN J.- Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximale convoluted tubule cells of the mouse kidney, PhD thesis. *Aktiegolaget Godvil, Stockholm*, 76, 1954.
558. RIETZ, E.B., GUIBAULT, G.G.- *Clin. Chem.*, 23,p286, 1977.
559. ROBERTS R.G. - Dystrophins and dystrobrevins. *Genome biology* 2; (4); pREVIEWS3006, 2001.
560. ROBERTS T.L., WOOD D.A., RIEMERSMA R.A., GALLAGHER P. J., LAMPE F.C., - Trans isomers of linolenic acid and sudden cardiac death. Proceeding in : *Fatty acids and lipids from cell biology to human disease. Basel, Karger, World Rev. Nutr. Diete*, p75, 1994.
561. ROBERTSON J. D. – *Arch. Intern. Med.* 129,202,1972.
562. ROBINSON D.R., KREMER J.M., - Summary of Panel G.; rheumatoid arthritis and inflammatory mediators. In: *Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E., Barlow S.M., (eds.), Health effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods, World Rev. Nutr. Diet*, 66, p44-47, 1991.
563. ROBINSON D.S.- The clearing factor lipase and its action in the transport of fatty acids between the blood and the tissues. *Adv. In Lipid Res. Ed. By Paoletti R., Kritchevsky D.*, 1, p133, 1963
564. ROCHE H.M., GIBNEY M.J. - Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism. *American journal of clinical nutrition* 71 (1Suppl) p232S-7S. Jan 2000.
565. ROCHE HM.- Unsaturated fatty acids. *Proceedings of the Nutrition Society* 58 (2) p397-401, May 1999.
566. ROCHE HM; GIBNEY MJ. - Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and triacylglycerol metabolism in the postprandial state. *Lipids*, 34 Suppl pS259-65, 1999.
567. ROELOFSEN B., KUYPERS F.A., OP DEN KAMP J.A., VAN DEENEN L.L.- Influence of phosphatidylcholine molecular species composition on stability of the erythrocyte membrane. *Biochem-Soc-Trans.* 17(2): p284-6, 1989.
568. ROELOFSEN B., VAN DEENEN L.L.M, - Lipid requirement of membrane-bound ATPase. Studies on human erythrocyte gots, *Eur. J.Biochem.*40.p245-257,1975.

569. RÖSCHLAU P., BERNT E, GRUBER W. - Cholesterol and Esterified Cholesterol in *Bergmeyer Hans Ulrich- Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, Inc., vol.4, p1980, 1974.*
570. ROSE D.P., CONNOLLY J-M. - Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & therapeutics* 83 (3) p217-44, Sep 1999.
571. ROSS R. -Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interaction with blood components. *Atherosclerosis*, 1, p293-311. 1981.
572. ROSSE R. – The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *N.Engl.J.Med*, 314, p488-500,1986.
573. ROUSER G., KRITCHEVSKY G., YAMAMOTO - Column chromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids, in : *Lipid Chromatographic Analysis, Marinetti G.V. (ed.), vol.1,p99., Marcel Dekker, New York, 1967.*
574. RUCKER R., TINKER D.,- The role of nutrition in gene expression : a fertile field for the application of molecular biology . *J.Nutr.* 116, p177-189, 1986.
575. RUDERMAN N.B., HAUDENSCHILD C., - Diabetes as an atherogenic factor. *Metabolism*, 26, p372-412, 1984.
576. RUITENBEEK, W.,- The Fatty acid composition of various lipid fractions isolated from erythrocytes and blood plasma of patients with Duchenne and congenital Myotonic Muscular Dystrophy. *Clinica Chimica Acta*, 89, p99 - 110,1978.
577. RUSU V., BARAN T., BRĂNIȘTEANU D.D. – *Biomembrane și Patologie, Ed. Medicală, București, p12-25, 1988.*
578. SĂHLEANU V. – *Cybernétique et physiologie théorique, 4^e Congr. Internat. Cybernétique, Namur, p457-465, 1967.*
579. SĂHLEANU V. - La triade méthodologique: substance, énergie, information - comme fondement de la physiologie théoretique. *Helgoländer wiss. Meeresunters.*, 14,p32-35,1966.
580. SĂHLEANU V. – *Știința și filozofia informației, Ed. Politică, București, 1972.*
581. SAITO M., TANAKA Y., ANDO S, - Thin-Layer Chromatography-Densitometry of Minor Acidic Phospholipids: application to Lipids from Erythrocytes. *Liver, and Kidney, Anal.Biochem*, 132, p376-383, 1983.
582. SALEM N. JR., ABOOD L.G., HOSS W. - Separation of brain phosphatidylserine according to degree of unsaturation of thin layer chromatography, *Anal. Biochem*, 76, 407, 1976.
583. SALEM N. JR., SERPENTION P., PUSKIN J.S., ABOOD L.G., - Preparation and spectroscopic characterization of molecular species of brain phosphatidylserines, *Chem.Phys.Lipids*. 27,p289, 1980.
584. SALEM N. JR., SIMOPOULOS A.P., GALLI G., LAGARDE M., KNAPP H., (eds.) – *Proc 2nd Congr. ISSFAL on Fatty Acids and Lipids from Cell Biology to Human Disease., Lipids*, 31(suppl), p1-326, 1996.
585. SAMBAIAH K., LOKESH B.R. - Nutritional properties of trans fatty acids. *Indian journal of biochemistry & biophysics* 36 (4) p211-20, Aug 1999.
586. SAMPSON D., HENSLEY, W.J., - A Rapid Gas Chromatographic Method for the Quantitation of underivatized individual free Fatty Acids in Plasma, *Clin.Chim.Acta*,61,1-8,1975.
587. SAMPSON M.J., DAVIES I.R., BROWN J.C., MORGAN V., RICHARDSON T., JAMES A.J., SAMPSON A.P., HUGHES D.A.- n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation, monocyte adhesion molecule expression and pro-inflammatory mediators in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine* ,18; (1); p51-8, Jan 2001.
588. SANCHEZ-MUNIZ F.J., BASTIDA S., VIEJO J.M., TERPSTRA A.H. - Small supplements of N-3 fatty acids change serum low density lipoprotein composition by decreasing phospholipid and apolipoprotein B concentrations in young adult women. *European journal of*

- nutrition*, 38; (1); p20-7, Feb 1999.
589. SANDERBERG G.H., SJÖVALL J., SJÖVALL K., TURNER D.A. - Measurement of human serum bile acids by gas-liquid chromatography. *J.Lipid Res.* 6, p317, 1965.
590. SANDERS T.A.B., HOCHLAND M.C. - A comparison of the influence on plasma lipids and platelet function of supplements of ω 3 and ω 6 polyunsaturated fatty acids. *Br. J. Nutr.* 50, p521-529, 1983.
591. SANDERS T.A.B., MISTRY M., NAISMITH D.J. - The influence of a maternal diet rich in linolenic acid on brain and retinal docosahexaenoic acid in the rat. *Br. J. Nutr.* 51, p57, 1984.
592. SANDERS T.A.B., NAISMITH D.J. - A comparison of the influence of breast feeding and bottle-feeding on the fatty acid composition of the erythrocytes., *Br. J. Nutr.* 41, p619, 1979.
593. SANDERS T.A.B., SULLIVAN D.R., REEVE J., THOMSON G.R. - Triglyceride lowering effect of marine polyunsaturates in patients with hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis*, 5, p459-465, 1985.
594. SANDERS T.A.B., YOUNGER K.M. - The effect of dietary supplement of ω -3 polyunsaturated fatty acids on the fatty acid composition of platelets and plasma choline phosphoglycerides. *Br. J. Nutr.* 45, p613, 1981.
595. SANDERS T.A. - Essential fatty acid requirements of vegetarians in pregnancy, lactation, and infancy. *American journal of clinical nutrition*, 70 (3Suppl) p555S-559S, Sep 1999.
596. SARDA, S., DESNUELLE, - *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 513, 1958.
597. SARMA A.V., POWELL G.L., LABERGE M. - Phospholipid composition of articular cartilage boundary lubricant. *Journal of orthopaedic research*, 19; (4); p671-6, Jul 2001.
598. SASO L., VALENTINI G., CASINI M.L., MATTEI E., BRAGHIROLI L., MAZZANTI G., PANZIRONI C., GRIPPA E., SILVESTRINI B. - Inhibition of protein denaturation by fatty acids, bile salts and other natural substances: a new hypothesis for the mechanism of action of fish oil in rheumatic diseases. *Japanese journal of pharmacology* 79; (1): p89-99, Jan 1999.
599. SATO A., OSAKABE T., IKEMOTO A., WATANABE S., KOBAYASHI T., OKUYAMA H. - Long-term n-3 fatty acid deficiency induces no substantial change in the rate of protein synthesis in rat brain and liver. *Biological & pharmaceutical bulletin* 22 (8) p775-9, Aug 1999.
600. SAYNOR R., VEREL D., GILLOTT T. - The long term effect of dietary supplementation with fish lipid concentrate on serum lipids, bleeding time, platelets and angina. *Atherosclerosis*, 178, p215-260, 1988.
601. SCAPIRA F., DREYFUS J.C., SCHAPIRA F. - L'élévation du taux de l'aldolase sérique: test biochimique de myopathies. *Sem. Hop. Paris*, 29, p1917-1921, 1953.
602. SCHARSCHMIDT L.A., GIBBONS N.B., MCGARRY L. - Effects of dietary fish oil on renal insufficiency in rats with subtotal nephrectomy. *Kidney Int.*, 32, p700-709, 1987.
603. SCHECTMAN G., KAUL S., KISSEBATH A.M. - Effect of fish oil concentrate of lipoprotein composition in NIDDM. *Diabetes*, 37, p1567-1573, 1988.
604. SCHLIERF, G., WOOD, P. - Quantitative determination of plasma free fatty acids and triglycerides by thin-layer chromatography. *J.Lipid.Res.*, 6, p317, 1965.
605. SCHMALHAUSEN I.I. - Integrita biologiceskih sistem i ih samoregulația, *Biull. mosk. Obšč. ispít. prirodí.*, Biol. 66, p104-134, 1961.
606. SCHMIDT E.B., DYERBERG J. - n-3 fatty acids and coronary heart disease--the urgent need of clinical trials., *Lipids*, 34 Suppl pS303-5, 1999.
607. SCHMIDT E.B., KLAUSEN I.C., KRISTENSEN S.D., LERVANG H.H., FAERGEMAN O., DYERBERG J. - Effect of ω 3 fatty acids on lipoprotein (a)., In: *Simpopoulos A.P. Kifer R.R., Martin R.E., Barlow S.M., (eds.) Health effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. World Rev. Nutr. Diet*, 66, p529(abstr.), 1991.
608. SCHMIDT F. H., STORK H., VON DAHL K. - LIPASE in : *Methods of Enzymatic Analysis*,

- Bergmeyer, U – Verlag Chemie Weinheim, Academic Press, Inc. New York and London, p.815 – 823, Ed. 1974.
609. SCHMIDT F.H., STORK, H. - Boehringer Mannheim GmbH, DP DOS 2 000 127, 1970.
610. SCHOENHEIMER R. SPERRY W.M. - A micromethod for the determination of free and combined cholesterol. *J.Biol.Chem.* 106,p745, 1934.
611. SCHRADER W., BÖHLE E., BIEGLER R., MEDER V., TEICHE R. - Gaschromato-graphische Untersuchungen der Serumfettsäuren des Menschen. III. Mitt. Die Fettsäuren der Cholesterinester, Phospholipide und Triglyceride, sowie die unveresterten Fettsäuren bei Gesunden und Arteriosklerose-erkrankten. *Klin. Wschr.* 38, p739, 1960.
612. SCHRADER W., BÖHLE E., BIEGLER R., MEDER V., TEICHE R. - Gaschromato-graphische Untersuchungen der Serumfettsäuren des Menschen. I. Mitt. Über die Fettsäurezusammensetzung des Serumfettes beim Gesunden, Arteriosklerotiker und Diabetiker. *Klin. Wschr.* 38, p126, 1960.
613. SCHRAM A.W., TAGER J.M. - Functions and biogenesis of peroxisomes in relation to genetic diseases in man. *FEBS Advanced Course "Biomembranes and Diseases", Cluj-Napoca, 21, June 16-28, 1986.*
614. SCHRÖDINGER E. - What is life ? (*The physical aspect of the living cell*) & *Mind and matter, Cambridge Univ.Press, 1969.*
615. SCHWICHTENHOVEL C., DEUTICKE B., HAEST C.W. - Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane. *Biochim-Biophys-Acta.* 1111(1): p35-44, 1992.
616. SCOTLAND D.L., BONILLA E., WAKAYAMA Y. - Application of the freeze fracture technique to the study of human neuro-muscular disease. *Muscle & Nerve* 3, p21-27, 1980.
617. SCOTT T.W., VOGLMAYR J.K., SETCHELL B.P. - Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochem J.*, 102, p456-460, 1967.
618. SEARCY R.L., KOROTZER J.L., BERGQUIST L. M. - Micro measurement of serum total lipids. *Clin.Chim.Acta* 8,p376, 1963.
619. SEBEDIO J.L., BRETILLON L., CHARDIGNY J.M., BEAUFRERE B., VERDIER E., ZWOBODA F., WESTER J., MENSINK R.P., AMSTRONG R.A., RIEMERSMA R.A. - Dietary trans α - linolenic acid, serum lipids, and platelet aggregation in healthy European men. *Prost Leuk. Essential Fatty Acids*, 57, p213, 1997.
620. SEBEDIO J.L., GRANDGIRARD A., SEPTIER C.H., PREVOST J. - Etat d' alteration de quelques huiles de friture prelevees en restauration. *Rev. Fr. Corps Gras*, 34, p15-18, 1987.
621. SEBEDIO J.L., GRANDGIRARD A., PREVOST J. - Linoleic Acid isomers in heat treated sunflowers oils. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 65, p362-366, 1988.
622. SEED M., HOPPICHLER F., REAVELEY D. - Relation of serum lipoprotein (a) concentration and apolipoprotein (a) phenotype to coronary heart disease in patient with familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.*, 322, p1494-1499, 1990.
623. SELLMAYER A., THEISEN K., WEBER P.C. - Omega-3 fatty acids after myocardial infarct: decreasing mortality by anti arrhythmia effects, *Deutsche medizinische Wochenschrift* 15 125; (50); p1542-6. Dec, 2000.
624. SEPPANEN-LAAKSO T., LAAKSO I., VANHANEN H., KIVIRANTA K., LEHTIMAKI T., HILTUNEN R. - Major human plasma lipid classes determined by quantitative high-performance liquid chromatography, their variation and associations with phospholipid fatty acids. *Journal of chromatography* 754;(2); p437-45, Apr 25 2001.
625. SERRATRICE G. - Dysferlinopathy - from theory to clinical practice. *The 6th Congress of Mediterranean Society of Myology, 23-26 May, 2002.*
626. SHIMOKAWA H., VANHOUTE P.M. - Dietary omega-3 fatty acids and endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 256, p968-H973,

- 1989.
627. SIBLEY J.A., LENINGER A.L. – Aldolase in the serum and tissues of tumor-blaring animals. *J.Natl.Cancer Inst.* 9, p303-309, 1949.
628. SIGUEL E.N., LERMAN P.H. - Trans Fatty acid pattern in patients with angiographically documented coronary heart disease. *Am.J.Cardiol.* 71, p916-929, 1993.
629. SIMOPOULOS A.P. - Dietary risk factors for hypertension. *Compr. Ther.* 18, p26–30, 1992.
630. SIMOPOULOS A.P. - Essential fatty acids in health and chronic disease. *American journal of clinical nutrition*, 70 (3 Suppl) p560S-569S, Sep 1999.
631. SIMOPOULOS A.P. – Nutrition policies for the prevention of atherosclerosis in industrialized societies., In: *Moyal M.F., (ed.) Diet and life style. new technology, Paris : John Libbery Eurotext, p373-380, 1988.*
632. SIMOPOULOS A.P. – Omega-3 fatty acids health and disease and in growth and development. *Am.J.Clin.Nutr.* 54, p438-463, 1991.
633. SIMOPOULOS A.P. – *The Return Of ω 3 Fatty Acids Into The Food Supply*, Karger, 1998.
634. SIMOPOULOS A.P., - Executive summary, In : *Galli C., Simopoulos A.P. (eds.), Dietary ω 3 and ω 6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality*, New York, plenum Press., p391-402, 1989.
635. SIMOPOULOS A.P., -Trans fatty acids : In *Spiller G.A.(ed): Handbook of Lipids in Human Nutrition*, Basa Raton, CRC Press, 1995.
636. SIMOPOULOS A.P., KIFER R.E., MARTIN R.R.(eds.), - Health Effects of Poly-unsaturated Fatty Acids in Seafoods, *Proceeding from the Conference. June 1985, Orlando. Academic press, 1986.*
637. SIMOPOULOS A.P., KIFER R.E., MARTIN R.R., BARLOW S.M. (eds.) – Health Effects of ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods, *World Rev. Nutr.Diet. Basel, Karger, 66, 1991.*
638. SIMOPOULOS A.P., SALEM N. JR. - Egg yolk as a source of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant feeding. *Am.J.Clin.Nutr.*55, p411-414, 1992.
639. SIMOPOULOS AP. - Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 60(5-6) p421-9., May-Jun 1999.
640. SINCLAIR A. – Was the hunter-gather diet prothrombotic? – in : *Sinclair A., Gibson R. (eds.)- Essential fatty Acids and Eicosanoids. Champaign, American Oil Chemistrs Society, p318-324, 1992.*
641. SINCLAIR A.J. - Fatty acid composition of liver lipids during development of rat. *Lipids*, 9, p809, 1975.
642. SINCLAIR A.J., CRAWFORD.T.- The effect of a low fat maremal diet on neonatal rats. *Br.J.Nutr.* 29, p127, 1973.
643. SINCLAIR A.J., MANN N.J. - Short-term diets rich in arachidonic acid influence plasma phospholipid polyunsaturated fatty acid levels and prostacyclin and thromboxane production in humans. *J.Nutr.*, 126(suppl), p1110-114, 1996.
644. SINCLAIRE H. – Deficiency of essential fatty acids and atherosclerosis, *Lancet*, 1, p381-383, 1956.
645. SINGER P., JAEGER W., WITRH M. - Lipid and blood pressure-lowering effect of mackerel diet in man. *Atherosclerosis*, 42, p357-373,1983.
646. SINGER S. J., NICOLSON G. L. – *Science*, 175, p720, 1972.
647. SISCOVICK D.S., RAGHUNATHAN T., KING I., WEINMANN S., BOVBJERG V.E., KUSHI L., COBB L.A., COPASS M.K., PSATY B.M., LEMAITRE R., RETZLAFF B., KNOPP R.H. - Dietary intake of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *American journal of clinical nutrition* 71 (1Suppl) p208S-12S, Jan 2000.
648. SJÖVALL, J.- On the separation of bile acids by partition chromatography. Bile acids and steroids 4. *Acta physiol.scand.* 29, p232, 1953.
649. SJÖVALL, J., -The determination of bile acids in bile and duodenal contents by

- quantitative paper chromatography. *Clin Chim. Acta* 4, p652, 1959.
650. SKÚLADÓTTIR G.V., GUDMUNDSDÓTTIR E., ÓLAFSDÓTTIR E., GUDMUNDSSON T.V., HARDARSON T., KRISTINSSON Á., ÁSVALDSDÓTTIR H., SNORRASON S.P., GUDBJARNASON S.- Influence of dietary cod liver oil fatty acid composition of plasma lipids in human male subjects after myocardial infarction. *J.Intern.Med.*, 228, p563-568, 1990.
651. SLACK J.D., PINKERTON C.A., VAN TESSEL J. - Can oral fish oil supplement mini-mize restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty?, *J.Am.Coll. Cardiol.* 9 (suppl), 64a (abstr.), 1987.
652. SLATER S.J., HO C., TADDEO F.J., KELLY M.B., STUBBS C.D. - Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order, Effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation and ethanol. *Biochemistry*, 32, p3714-3721, 1993.
653. SOLONI, F.G., - *Clin.Chem.* 17,p529, 1971.
654. SOUWEINE G., BERNARD J.C., LASNE Y., LACANT J.-The sodium pump of erythrocyts from patients with Duchenne muscular dystrophy, effect of ouabain on the active sodium flux and on (Na⁺, K⁺) ATPase., *J.Neurol*, 217, p287-294, 1978.
655. SPECTOR A.A. - Essentiality of fatty acids. *Lipids*, 34 Suppl pS1-3, 1999.
656. SPECTOR A.A., WILLARD D.E., KADUCE T.L., WIDSTROM R.L. - Role of peroxisomal oxidation in the conversion of arachidonic acid to eicosatrienoic acid in human skin fibroblasts. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids.* 60 (5-6) p377-82, May-Jun 1999.
657. SPECTOR A.A., YOREK M.A.- Membrane lipid composition and cellular function. *J.Lipid.Res.* 26, p1015-1035, 1985.
658. SPERLING R.I.- The effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on neutrophils. *Proceedings of the Nutrition Society (ENGLAND)* 57;(4);p543-50, Nov 1998.
659. SPERLING R.I., ROBIN J.L., KYLANDER K.A., LEE T.H., LEWIS R.A., AUSTEN K.F. – The effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on the generation of platelet-activating factor-acether by human monocytes. *J.Immunol.*, 139, p4186-4191, 1987.
660. SPERRY W.M.- Lipide Analyses, vol.2, p.83. In: *Methods of biochemical analysis.* Ed. : D. Glick, New York : Interscience Publishers 1955
661. SPERRY W.M., WEBB M. - A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J.Biol.Chem.* 187, p97, 1950
662. SPRECHER H. - Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids and its regulation. In: *Polyunsaturated Fatty Acids, Kunan W.H., Holman R.T., eds., American Oil Chemical Society, Champagne, p.1, 1977.*
663. SPRECHER H. - Biosynthetic pathways of polyunsaturated fatty acids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 83,p35, 1977.
664. SPRECHER H. - The total synthesis and metabolism of 7,10,13,16 - docosa tetraenoate in brain. *Biochem Biophys Acta*, 144, p296, 1967.
665. SPRECHER H., CHEN Q., YIN F.Q. -Regulation of the biosynthesis of 22:5n-6 and 22:6n-3: a complex intracellular process. *Lipids*, 34 Suppl pS153-6, 1999.
666. STACEY N.H., CRAIG-G.K.- Role of thiols in human peripheral blood natural killer and killer lymphocyte activitie. *Experientia.*Feb15; 45(2), p180-1, 1989.
667. STATLAND B.E. - The rationale for using decision levels in clinical chemistry. *Bull. Mol. Biol. Med.* 8, p171-184, 1983.
668. STEINBERG D., PARTHASARATHY S., CAREW T.E., KHOO J.C., WITZTUM J.L., - Beyond cholesterol : modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N.Engl.J.Med.*, 320, p915-924, 1989.
669. STENDER S., DYERBERG J. - The importance of trans-fatty acids for health. *Update 2001, Ugeskrift for laeger* 163; (17); p2349 - 53, Apr 23, 2001.

670. STENDER S., DYERBERG J., HOLMER G., OVESEN L., SANDSTRÖM B. - *A report from the Danish Nutrition Council, Clinical Science*, 88, p375-392, 1995.
671. STIEFEL P., RUIZ-GUTIERREZ V., GAJON E., ACOSTA D., GARCIA-DONAS M.A., MADRAZO J., VILLAR J., CARNEADO J. - Sodium transport kinetics, cell membrane lipid composition, neural conduction and metabolic control in type 1 diabetic patients. Changes after a low-dose n-3 fatty acid dietary intervention. *Annals of nutrition & metabolism*, 43 (2) p113-20, 1999.
672. STINSHOFF K., WEISSHAAR D., STAEHLER F., HESSE, D., GRUBER W., STEIER E. - *Clin.Chem.* 23, p1029, 1977.
673. STOKKE O., ELDJARN L. - Biochemical and dietary aspects of Refsum's disease. In: Dyck E., (ed) *Peripheral neuropathy, Philadelphia, W.b.sunders*, p872-881, 1975.
674. STONE N.J. - The Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio (GISSI)-Prevenzione Trial on fish oil and vitamin E supplementation in myocardial infarction survivors. *Current cardiology* 2; (5); p445-51., reports Sep 2000.
675. STONE W.L., FARNSWORTH C.C., DRATZ E.A. - A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog retinal rod outer segments. *Exptl. Eye Res.* 28, 387, 1979.
676. STRUGREN B., SĂHLEANU V. - Unele implicații metodologice ale noțiunii de nivel de organizare și de sistem, în biologie, în: *Dialectica metodelor în cercetarea științifică, vol.1, p385-390, Ed. Științifică, București, 1966.*
677. STUBBS C.D., SMITH A.D. - the modification of mammalian membrane poly-unsaturated fatty acid composition in relation fluidity and function., *Biochim. Biophys. Acta*, 779, p89-137, 1984.
678. SUN G.Y., SUN A.Y. - Synaptosomal plasma membranes: acyl group composition of phosphoglycerides and (Na⁺ + K⁺)-ATP-ase activity during fatty acid deficiency. *J.Neurochem*, 22, p15, 1974.
679. SVENNERHOLM L., HAGBERG B., HALTIA M., SOURANDER P., VANIER M.T. - Poly-unsaturated fatty acid lipodosis II. Lipid biochemical studies. *Acta Paediatr. Scand.* 64, p489, 1975.
680. SYBURRA C., PASSI S. - Oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Ukr Biokhim Zh*, 71 (3) p112-5, May-Jun 1999.
681. TANAKA K., TAKESHITA K., TAKITA M. - Abnormalities of bile acids in serum and bile from patients with Myotonic Muscular Dystrophy, *Clinical. Science*, 62, p627-642, 1982.
682. TANFOLD C. - *The Hydrophobic Effect, New York. Ed. Wiley*, p34 1973.
683. TERANO T., HIRAI A., HAMAZAKI T., KOBAYASHI S., FUJITA T., TAMURA Y., KUMAGAI A. - Effect of oral administration of highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects, *Atherosclerosis*, 46, p321-331, 1983.
684. THIERY J., SEIDEL D. - Fish oil feeding results in an enhancement of cholesterol induced atherosclerosis in rabbit. *Atherosclerosis*, 63, p53-56, 1987.
685. THOMAS L.H., - Mortality from atherosclerotic disease and consumption of hydrogenated oils and fats. *Br.J.Prev.Soc.Med.*, 29, p82-90, 1975.
686. THOMAS L.H., WINTER J.A., SCOTT R.G. - Concentration of 18:1 and 16:1 trans unsaturated fatty acids in the adipose body tissue of descendants dying of ischemic heart disease compared with controls : analysis by gas liquid chromatography, *J. Epidemiol. Community Health*, 37, p16-21, 1976.
687. TINDER P. - *Ann. Clin. Biochem* 6, p24, 1969.
688. TINOCO J. - Dietary requirements and functions of alpha - Linolenic acid in animals. *Prog. Lipid Res.*, 21, p1, 1982.
689. TINOCO J., BABCOCK R., HINCENBERGS I., MEDWADOWSKI B., MILJANICH P. - Linolenic acid deficiency : changes in fatty acid patterns in female and male rats raised on linolenic

- acid-deficient diet for two generations. *Lipids*, 13, p6, 1978.
690. TINOCO J., ENDEMANN G., HINCEBERG I., MEDWADOWSKI B., MILJANICH P., WILLIAMS M.A. - Effects of linolenic acid deficiency on the fatty acid patterns in plasma and liver cholesterol esters, triglycerides and phospholipids in female rats. *J.nutr.*, 110, p149, 1980.
691. TINOCO J., MILJANICH P., MEDWADOWSKI B. - Depletion of docosahexaenoic acid in retinal lipids of rats fed a linolenic acid-deficient, linolenic- containing diet. *Biochem Biophys Acta*, 486, p575, 1977.
692. TITOV V.N. - Fatty acid transport in the blood by lipoproteins as macromolecules: facts and a hypothesis. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* 30 (3) p23-37, Jul-Sep 1999.
693. TITOV V.N.- Atherosclerosis as a problem of general biology: cell adaptation to deficiency of essential fatty acids, *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* (10); p53-7, 1999.
694. TOPALOGLU H. - New forms of Muscular Dytrophy with brain involvement. A personal experience. *The 6th Congress of Mediterranean Society of Myology*, 23-26 May, 2002.
695. TORNÝ I., SARKOZI A., IONESCU I. - Rata Mutatională în Distrofia Musculară Progresivă Duchenne. *Primul Simpozion Național de Patologie Eredo-Degenerativă Neuro-Musculară, Vâlcele*, oct.1985.
696. TOUCHSTONE J. C., DOBBINS M.F., - *Practice Of Thin Layer Chromatography* John Willy & Sons, New York, NY, p23-89, 1983.
697. TRACY RP. - Diet and hemostatic factors., *Current atherosclerosis reports* 1; (3); p243-8, Nov 1999.
698. TREEN M., HOFFMAN D.R., JAMESON D.M., THOMAS V.L., UAUY R.D., - Effect od docosahexaenoic acid on fluidity and function intact cultured Y-79 retinoblastoma cells. *Arch.Biochem Biophys.*, 294, p564-570,1992.
699. TURPEINEN A.M., MUTANEN M. - Similar effects of diets high in oleic or linoleic acids on coagulation and fibrinolytic factors in healthy humans. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*, 9 (2) p65-72, Apr 1999.
700. Uauy R.D., Birch D.G., Birch E.E., Tyson J.E., Hoffman D.R.- Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very-low birth weight neonates. *Pediatr. Res.*, 28, p485-492, 1990.
701. USCHERSOHN H. - Intégration et niveau d'organisation de la matière vivante, *Abstracts Reg. Congr. IUPS, Braşov*, p544, 1970.
702. VALENZUELA A., MORGADO N. - Trans fatty acid isomers in human health and in the food industry. *Biological research* 32; (4); p273-87, 1999.
703. VAN HANDEL E., ZILVERSMIT D.B. - *J.Lab.Clin.Med.* 50, p152,1957.
704. VANZETTI G.- Méthodes photométriques de dosage du cholestérol dans le sérum. *Clin. Chim. Acta* 10, p389, 1964.
705. VASILESCU V., MĂRGINEANU D.G. - *Introducere în neurobiofizică*, Ed. Stiințifică și enciclopedică, Bucureşti, p50-85, 1979.
706. VERDINO B., BLANK M.L., PRIVETT O.S., LUNDBERG W.O.- Metabolism of 4,7,10, 13,16-docosapentaenoic acid in the essential fatty acid-deficient rat. *J. Nutr.* 83, p234,1964.
707. VERHOVEN B. SCHLEGEL R.A., WILLIAMSON P., - Rapid loss and restoration of lipid asymmetry by different pathways in resealed erythrocyte ghosts. *Biochim.Biophys.Acta.* 1104(1), p15-23, 1992.
708. VOGEL W.C, DOIZAKI W. M., ZIEVE L.- Rapid thin-layer chromatographic separation of phospholipids and neutral lipids of serum. *J.Lipid.Res*,3, p138, 1962.
709. VON SCHACKY C. - n-3 fatty acids and the prevention of coronary athero-sclerosis. *American journal of clinical nutrition* 71 (1Suppl) p224S-7S, Jan 2000.
710. VON SCHACKY C., FISCHER S., WEBER P.C. - Long term effect of dietary marine ω 3 fatty

- acids upon plasma and cellular lipids, platelet function and eicosanoid formation in human. *J.Clin. Invest.*,76, p126-132, 1985.
711. VOSS A., REINHART M., SANKARAPPA S., SPRECHER H. - The metabolism of 7,10,13,16,19 - docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of 4 - desaturase. *J.Biol.Chem.*266, p19995-20000, 1991.
712. WADDINGTON E., SIENUARINE K., PUDDEY I., CROFT K. - Identification and quantitation of unique fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque using high-performance liquid chromatography. *Analytical bio-chemistry* , 292; (2); p234-44, May 15 2001.
713. WAGNER H., LANG D. U. FROSCHE W., - Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über die Phosphatides des Blutserums Gesunder und Arteriosklerosekranker. *Z. ges. Exp. Med.* 138. p425, 1964.
714. WAHLQUIST M.L., LO C.S., MYERS K.A., - Fish intake and arterial wall characteristic in healthy people and diabetic patients, *Lancet*,2, p944-946, 1989.
715. WALKER B.L. - Recovery of rat tissue lipids from essential fatty acid deficiency: plasma, erythrocytes and liver. *J. Nutr.* 92.p23,1967.
716. WALTON J. - *Disorders of Voluntary Muscle*, Churchill Livingstone, London Vth ed.1988.
717. WALTON J.N. - *Disorder of Voluntary Muscle*, Cahrchill Livingstone, London, 3rd ed.1974.
718. WANDERS R.J.A., VAN ROERMUND C.W.T., SCHUTGENS R.B.H., BARTH P.G., HEYMANS H.S.A., VAN DEN BOSCH H., TAGER J.M. - The Inborn Errors of Peroxisomal β - Oxidation : *A Review*, *J.Inher.Metab.Dis.* 13, p4-36,1990.
719. WATKINS B.A. - Regulatory Effects of Polyunsaturates on Bone Modeling and Cartilage Function, In : *Simopoulos A.P. (ed.) - The Return of ω 3 fatty Acids into the Food Supply. I. Land-based Animal food Products and Their Health Effects. World Rev. Nutr. Diet., Basel, Karger, 88, p38-51,1998.*
720. WATKINS B.A., LI Y., LIPPMAN H.E., SEIFERT M.F. - Omega-3 polyunsaturated fatty acids and skeletal health. *Exp Biol Med (Maywood)* 226; (6); p485-97, Jun 2001.
721. WEBER P.C. - Are we what eat? Fatty acids nutrition and in cell membranes : cell functions and disorders induced by dietary conditions. *Svanoybukt. Norway, Svanoy Foundation, (Report no.4)*, 1989.
722. WEICKLER, H. - Adsorptionschromatographische Untersuchung von Serum-lipiden auf Kieselgelplatten, *Klin.Wschr.* 37, p763, 1959.
723. WEINBERGER D.R. -From neuropathology to neurodevelopment, *Lancet*, 346, p552-556,1995.
724. WESTBERG G., TARKOWSKI A., SVALANDER C. - Effect of eicosapentaenoic acid rich menhaden oil and MaxEPA on autoimmune disease of Mrl/1 mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol*, 88, p454-461, 1989.
725. WHEELER T.G., BENOLKEN R.M., ANDERSON R.E. - Visual membrane. Specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination. *Science*, 188, p1312-1314, 1975.
726. WIEDMANN T.S., PATES R.D., BEACH J.M., SALMON A., BROWN M.F. - Lipid-protein interactions mediate photochemical function of rhodopsin. *Biochemistry*, 27, p6469-6474,1988.
727. WIKLUND O., ANGELINI B., OLOFSSON S.O. - Apolipoprotein (a) and ischemic heart disease in familial hypercholesterolemia. *Lancet*,335,p1360-1363, 1990.
728. WILLETT W.C., STAMPFER M.J., MANSON J.E. - Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart diseases among women. *Lancet*, 341, p581-585. 1993.
729. WILLIAMS C.M., MAUNDER K. - Effect of dietary fatty acid composition on inositol, choline- and ethanolamine-phospholipids of mammary tissue and erythrocytes in the rat. *Br-J-Nutr.*68(1): p183-93, 1992.

730. WILLIAMS R.R., HUNT S.C., HASSTEDT S.J.- Hypertension: genetics and nutrition. In : *Simopoulos A.P., Childs B., (eds.) Genetic variation and nutrition, World Rev.Nutr.Diet., 63, p116-130, 1990.*
731. WITTENBERGER C. – *Eseuri de Biologie teoretică, Ed. Științifică și Enciclopedică, București, p80-95, 1981.*
732. WITTENBERGER C. - Homeostazia și evoluția ei în lumea animală. *Studii, cercet. biol. 18, p532-530, 1966.*
733. WITTSTOCK C. - in : *Annalen der Physik und Chemie, Poggeendorff J.C., ed, 100, p509-533, 1832.*
734. WOLF R.L., SEBEDIO J.L., - Geometrical isomers of linolenic acid in low-calorie spreads marketed in France. *J.Am.Oil Chem. Soc., 68, p719-725, 1991.*
735. WOLFF R.L. – Further studies on artificial geometrical isomers of α -linolenic acid in edible linolenic acid containing oils. *J.Am. Oil Chem.Soc, 70, p219-224, 1993.*
736. WOLFF R.L. – Occurrence of artificial trans polyunsaturated fatty acids in refined walnut oil. *Sci.Aliment. 13, p155-163, 1993.*
737. WOLFF R.L., COMBE N.A., ENTRESSANGLES B., SEBEDIO J.L., GRANDGIRARD A. – Preferential incorporation of dietary elaidic acid, cis-9, cis-12, trans-15 18:3 acid into rat cardiolipins. *Biochim.Biophys Acta, 1168, p285-291, 1993.*
738. WOLFRUM C., BORRMANN C.M., BORCHERS T., SPENER F. - Fatty acids and hypo-lipidemic drugs regulate peroxisome proliferator- activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98; (5); p2323-8, Feb 27, 2001.*
739. WOOD R., KUBENA K., O'BRIEN B., TSENG S., MARTIN G. - Effect of butter, mono- and polyunsaturated fatty acid-enriched butter, trans fatty acid margarine and zero trans fatty acid margarine on serum lipids and lipoproteins in healthy men. *J. Lipid Res., 34, p1-11, 1993.*
740. WORNE H.E., SMITH L.W.- Effects of certain pure long chain polyunsaturated fatty acids esters on the blood lipids in man. *Am.J.Med. Sci. 237, p710-721, 1959.*
741. WROGEMANN K., PENA S.D. – Mitochondrial calcium overload : A General mechanism for cell-necrosis in muscle disease, *Lancet 1, p672, 1976.*
742. WU D., MEYDANI S.N. - n-3 polyunsaturated fatty acids and immune function. *Proceedings of the Nutrition Society 57; (4); p503-9, Nov 1998.*
743. XU H., WATKINS B.A., SEIFERT M.F. - Vitamine E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage morphometry, *Calcif.Tissue Int., 57, p293-300, 1995.*
744. YABUCHI H., O'BRIEN J.S. - Positional distribution of fatty acids in glycerophospholipides of bovine gray matter. *J.Lipid Res., 9, p65, 1968.*
745. YAMADA T., STRONG J.P., ISHII T., UENO T., KOYAMA M., WAGAYAMA H., SHIMIZU A., SAKAI T., MALCOM G.T., GUZMAN M.A. - Atherosclerosis and omega-3 fatty acids in the populations of a fishing village and a farming village in Japan. *Atherosclerosis 153; (2); p469-81, Dec 2000.*
746. YAMAMOTO S. - Essential unsaturated fatty acids, *Nippon rinsho 57 (10) p2242-6, Oct 1999.*
747. YAQOUB P. - Lipids and the immune response. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 1 (2) p153-61, Mar 1998.*
748. YAQOUB P., PALA H.S., CORTINA-BORJA M., NEWSHOLME E.A., CALDER P.C. - Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *European journal of clinical investigation 30 (3) p260-74, Mar 2000.*
749. YU T.C., SINNHUBER R.O., - Effect of dietary linolenic acid and docosa-hexaenoic acid on

- growth and fatty acid composition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids*, 7, p450, 1972.
750. ZABELINSKII S.A., CHEBOTAREVA M.A., KOSTKIN V.B., KRIVCHENKO A.I. - Phospho-lipids and their fatty acids in mitochondria, synaptosomes and myelin from the liver and brain of trout and rat: a new view on the role of fatty acids in membranes. *Comparative biochemistry and physiology* 124 (2) p187-93. Oct 1999.
751. ZAK B., DICKENMAN R.C., WHITE E.G., BURNETT H., CHERNEY P.J. - Rapid estimation of free and total cholesterol. *Amer.J.Clin.Path.* 24, 1307, 1954.
752. ZHU B.Q., SMITH D.L., SIEVERS R.E., ISENBERG W.M., PARMELY W.W. - Inhibition of atherosclerosis by fish oil in cholesterol-fed rabbits. *J.Am. Coll.Cardiol.* 12,p1073-1078, 1988.
753. ZIBOH V.A. - ω 3 polyunsaturated fatty acid of fish oil and the management of skin inflammatory and scaly disorders., In : *Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E., Barlow S.M., (eds.), Health effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods, World Rev. Nutr. Diet, 66, p425-435, 1991.*
754. ZILVA J.F. PANNALL P.R., MAYENE P.D., - *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment, Year Book Medical publishers, Inc.Chicago, IL, 1988.*
755. ZLATKIS A., ZAK B., BOYLE A.J. - A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J.Lab.Clin. Med.* 41,p486, 1953.
756. ZOCK P., KATAN M.B.- Hydrogenation alternatives : Effects of trans fatty acids and stearic acid versus linolenic acid on serum lipids and lipoproteins in humans. *J.Lip.Res.* 33, p399-410, 1992.
757. ZÖLLNER, N., EBERHAGEN, - *Untersuchung und Bestimmung der Lipide im Blut, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1965.*
758. ZÖLLNER, N., KIRSCH, K. - Über die quantitative Bestimmung von Lipiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipiden (allen bekannten Plasmalipiden) gemeinsamen Sulfophosphovanilin Reaktion. *Z. ges. Exp. Med.* 135, p545, 1962.
759. ZUCKER M.L. BILYEU D., HELMKAMP G.M., HARRIS W.S., DUJOVNE C.A. - Effects of dietary fish oil on platelet function and plasma lipids in hyper-lipoproteinemic and normal subjects. *Atherosclerosis*, 73, p13-22, 1988.