

УДК 577.115.5

Липопротеидные патологии и количественные методы определения

*Халипина Д.В., студент
Россия, 105005, г. Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана,
кафедра «Биомедицинские Технические Системы»*

*Научный руководитель: Еришов Ю.А., д.т.н, профессор
Россия, 105005, г. Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана
bauman@bmstu.ru*

Липиды функционируют в организме в виде комплексов с белками. Количественное соотношение липида и белка определяет физические свойства комплекса и в первую очередь его растворимость. Биоконплексы, приближающиеся по растворимости к белкам, т.е. растворимые в воде и водных растворах солей, классифицируют как липопротеиды. Различают два основных вида липопротеидов: липопротеиды плазмы, к которым относятся комплексы, диспергированные в водной фазе крови и тканевых жидкостях, и липопротеиды клеточных структур, так называемые ламеллярные липопротеиды, составляющие структурную основу клеточных мембран. [5]

Макромолекулы липопротеидов содержат липиды и белки. Ядро такой молекулы состоит из неполяризованных липидов, окруженных своеобразной «мембраной» - оболочкой из монослоя фосфолипидов со вставками из свободного холестерина и белков. Липопротеиды различают по составу липидного ядра и соотношению протеидов и липидов оболочки. Они классифицируются по химической плотности и электрофоретической подвижности. В организме человека находятся пять основных видов липопротеидов (Таблицу 1).

Виды липопротеидов

Липидный состав	Липопротеины	Плотность, г/мл	Мол.м.	Диаметр, нм	Состав (% по массе)
1. <u>Липопротеиды</u> <u>очень</u> <u>низкой</u> <u>плотности</u> (ЛПОНП)					
ХС 10-15% ТГ 55% ФЛ 10-20%	А по В-100 А по Е А по С	0,95-1,006	(5-10)*10 ⁶	25-75	Белок: 10 Триацилглицерины: 55 Холестерин: 7 Эфиры холестерина: 10 Фосфолипиды: 18
2. <u>Липопротеиды</u> <u>низкой</u> <u>плотности</u> (ЛПНП)					
ХС 55% ТГ 15% ФЛ 20-25%	А по В-100 А по Е	1,006-1,063	(2,7-4,8)*10 ⁶	20-22,5	Белок: 21 Триацилглицерины: 11 Холестерин: 8 Эфиры холестерина: 37 Фосфолипиды: 22
3. <u>Липопротеиды</u> <u>высокой</u> <u>плотности</u> (ЛПВП)					
ХС 15-25% ТГ 5-10% ФЛ 20-30%	А по А А по А-1, меньше А по С и А по Е	1,063-1,21	(1,8-4,2)*10 ⁵	4-14	Белок: 50 Триацилглицерины: 3 Холестерин: 4 Эфиры холестерина: 16 Фосфолипиды: 27

Содержание липидов в плазме крови взрослых здоровых людей

Название липида	Содержание	
	г/л	ммоль/л
НЭЖК	0,08-0,2	0,28-0,71
ТГ	0,5-1,9	0,56-2,15
ФЛ (без сфингоемилинов)	1,1-2,75	1,41-3,62
Сфингоемилины	0,3-0,6	0,41-0,82
ХС общий	1,5-2,5	3,88-6,46

В образовании липопротеидных структур участвуют и силы ионного взаимодействия между заряженными группами липидов $[PO_4, NH_3, COO^-]$ и аминокислотных остатков полипептидных цепей (COO^-, NH_3^+) , например [1]:

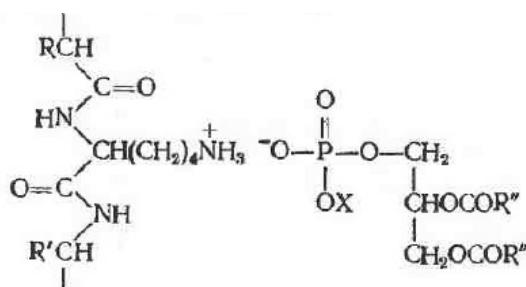
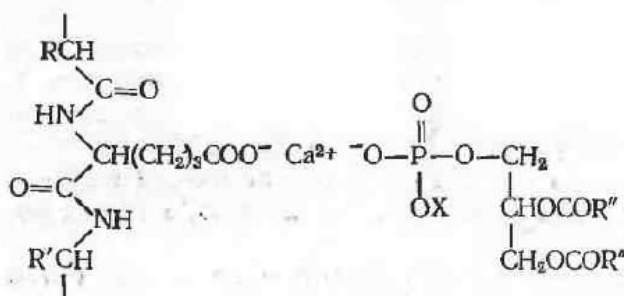


Рис. 1. Соединение пептидной цепи и фосфолипида

Бивалентные катионы, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} могут служить в качестве мостиковой связи между анионной группой липида и анионной группой белка:

Рис. 2. Соединение пептидной цепи и фосфолипида посредством катионов Ca^{2+} и Mg^{2+}

Хиломикроны – частицы, которые образуются в слизистой кишечника с пищевого жира и содержат преимущественно триглицериды. Они поступают в системный кровоток

через грудной лимфатический протоки метаболизируются ферментом, который локализуется на поверхности эндотелия сосудов – липопроотеидлипазой.

Липопроотеиды очень низкой плотности образуются в печени, содержат 10-15% от общего холестерина и обогащены триглицеридами. В метаболизме липопроотеидов очень низкой плотности также принимает участие липопроотеидлипаза. В результате липопроотеиды очень низкой плотности трансформируются в более мелкие частицы (ЛПНП), почти половина которых у здоровых людей выводится печенью, другие деградируют в липопроотеиды низкой плотности. Некоторые формы остаточных липопроотеидов очень низкой плотности являются атерогенными.

Липопроотеиды низкой плотности содержат 60-70% общего холестерина сыворотки крови. Они считаются основными переносчиками холестерина к периферическим тканям. В норме время полувыведения липопроотеидов низкой плотности составляет 2,5–3,5 дней, они удаляются из плазмы крови в основном благодаря специфическим рецепторам, размещенным на поверхности мембран многих типов клеток. Преимущественно клиренс липопроотеидов низкой плотности происходит в печени и лишь частично в периферических тканях.

***Аполипопротеин В (Apolipoprotein B, Apo B)** - основной структурный белок богатых триглицеридами атерогенных липопроотеинов низкой плотности (ЛПНП). Благодаря наличию этого белка ЛПНП реагируют со специфическими рецепторами эндотелиальных, гладкомышечных и др. клеток. **Apo B** – главный транспортер триглицеридов из кишечника в жировые клетки. По данным исследований, **аполипопротеин В** является лучшим маркёром, по сравнению с определением липопроотеинов низкой плотности при оценке риска атеросклероза коронарных сосудов.*

Липопроотеиды высокой плотности содержат 20-30% холестерина. Они являются самыми важными факторами обратного транспорта холестерина из тканей в печень, где происходит его катаболизм.

***Аполипопротеин А-1 (Apolipoprotein A-1, Apo A1)**- является основным белком липопроотеинов высокой плотности (ЛПВП). Он участвует в транспорте триглицеридов и холестерина, активирует липетин-холестерин-ацетилтрансферазу, способствуя обратному транспорту холестерина с периферии (в том числе из стенки сосудов) в печень. У пациентов с атеросклеротическими изменениями наблюдаются пониженные уровни **Apo A1**. Даже в случае, когда концентрация аполипопротеина В находится в пределах нормы, пониженные уровни **Apo A1** в крови считаются фактором риска*

*развития атеросклеротических процессов. Снижение уровня **Apo A1** в крови наблюдается также при дислипотеинемии, активной фазе цирроза печени, при лечении инсулином.*

Установлена связь между риском развития ишемической болезни сердца и снижением концентрации липопротеидов высокой плотности. Большинство исследователей связывает антиатерогенные свойства липопротеидов высокой плотности с их ролью в обратном транспорте холестерина, способностью извлекать холестерин из атеросклеротических бляшек. Возможно также, что ферменты, связанные с липопротеидами высокой плотности, противодействуют развитию биологических эффектов окисленных липопротеидов низкой плотности.

Роль в патологии

ЛПНП переносят в организме холестерин, и их повышенный уровень может вызывать жировые отложения в стенках сосудов (как правило, в артериях). Уровень холестерина ЛПНП коррелирует с высоким риском развития атеросклероза и таких его проявлений, как инфаркт миокарда, инсульт и окклюзия периферических артерий. По этой причине холестерин ЛПНП часто называют «плохим холестерином» в противоположность «хорошему холестерину» ЛПВП. Стоит отметить, что мелкие ЛПНП — более атерогенны, чем более крупные.

Наследственной формой заболевания с высоким уровнем ЛПНП является наследственная гиперхолестеринемия или гиперлипотеинемия II типа (различают типы IIa и IIb, классификация Фредриксона).

Повышенный уровень ЛПОНП связан с повышенным риском атеросклероза, а также связан с рядом других заболеваний.

В условиях патологии ЛПНП захватываются клетками в стенках сосудов с образованием атеросклеротических бляшек, которые сужают просвет сосудов и способствуют тромбообразованию. Повышенный уровень ЛПНП-холестерола (более 3,37 ммоль/л) рассматривается как фактор риска развития атеросклероза, а уровень > 4,14 ммоль/л можно расценивать как высокую степень риска развития атеросклероза и ишемической болезни сердца.

Традиционные методы определения холестерина липопротеидов низкой плотности

Определение уровня ХС ЛПНП требует особого внимания специалистов лабораторной диагностики в связи с решением экспертов Национальной образовательной программы по холестерину в США (National Cholesterol Education Program, NCEP) об

определение риска ИБС по уровню ХС ЛПНП, а не общего ХС сыворотки крови, опубликованном в 2001 году. В статье кратко описаны достоинства и недостатки многочисленных методов для определения ХС ЛПНП как традиционно используемых в лабораторной практике (метод Фридвальда, методы преципитации), так и новых, предлагаемые лабораториям в последнее десятилетие (прямые гомогенные методы).

В клинической биохимии уровень ЛПНП в плазме крови оценивают по содержанию в них ХС.

1. Референсный метод определения ХС ЛПНП является многостадийным: 1) ультрацентрифугирование в плотности 1,006 г/мл при 105 000g в течение 18 часов для удаления ЛП, богатых ТГ (ХМ и ЛПОНП); 2) выделение донной фракции (плотности 1,006 г/мл) и преципитация в ней ЛП, содержащих апо+В смесью гепаринMnCl₂ для выделения ЛПВП; 3) определение концентрации ХС в донной фракции и супернатантереференсным методом для определения общего ХС (модифицированный метод Абеля-Кендалла) 4) вычисление ХС ЛПНП как разности для значений ХС в донной фракции и ХС ЛПВП.

Препаративное выделение методом ультрацентрифугирования в солевом растворе определенной плотности позволяет изолировать ЛПНП и определить их состав.

Длительность и трудоемкость ультрацентрифугирования привела к разработке методов, более доступных для лабораторной практики. Самым распространенным способом определения ХС ЛПНП в клинических лабораториях является расчетный. В этом случае необходимо определить концентрацию ХС и ТГ в сыворотке крови и концентрацию ХС ЛПВП в супернатанте после преципитации ЛП, содержащих апо В (ЛПОНП и ЛПНП), и вычислить значение концентрации ХС ЛПНП по формуле Фридвальда:

$$\text{ХС ЛПНП (мг/дл)} = \text{общий ХС} - \text{ХС ЛПВП} - \text{ТГ}/5^*$$

$$\text{ХС ЛПНП (ммоль/л)} = \text{общий ХС} - \text{ХС ЛПВП} - \text{ТГ}/2,2^*$$

* – ХС ЛПОНП

В основе этой формулы лежат два допущения: 1) большая часть ТГ плазмы находится в ЛПОНП; 2) весовое отношение ТГ/ХС в ЛПОНП равно 5:1.

Формула Фридвальда позволяет получить значения ХС ЛПНП, сопоставимые с полученными референсным методом при ТГ < 2000 мг/л, при концентрации 2000–4000 мг/л доля правильных результатов снижается. Применение этой формулы при

концентрации ТГ > 4000 мг/л, наличии ХМ, III типе гиперлипопротеидемии (ГЛП) приводит к завышению содержания ХС ЛПОНП и занижению ХС ЛПНП и не позволяет получить сопоставимые результаты.

2. Методы преципитации были первой попыткой разработки прямых методов выделения ЛПНП, пригодных для использования в клинико+диагностической лаборатории.

Преципитационные методы выполняются в несколько этапов. Первый – осаждение ЛПНП после добавления преципитирующего агента (гепарин, поливинилсульфат, неспецифические амфипатические полимеры, декстрансульфат), второй – центрифугирование для разделения осадка и надосадочной жидкости (супернатанта), третий – определение концентрации ХС в супернатанте, четвертый – расчет ХС ЛПНП как разности общего ХС и ХС в супернатанте. Методы не имеют преимуществ перед расчетным: концентрация ТГ > 400 мг/дл, наличие ХМ или III типа ГЛП ограничивает их применение, в этих случаях имеет место копреципитация ЛПОНП и особенно их ремнантов.

3. Гомогенные методы определения ХС ЛПНП основаны на использовании различных детергентов и других химических соединений, способных специфично блокировать или солюбилизовать классы ЛП для выделения ЛПНП. ХС ЛПНП определяют ферментативным методом в той же кювете.

1)Метод солюбилизации. В присутствии $MgCl_2$ α -циклодекстрин блокирует ХС в составе ЛПОНП и ХМ. Полиоксиэтилен-полипропилен (РОЕ+РОР) блокирует ХС в составе ЛПВП. В реакцию с ферментами в присутствии хромогенов вступает только ХС ЛПНП; в результате образуется окрашенный продукт, оптическая плотность которого при 546 нм пропорциональна концентрации ХС ЛПНП в пробе.

2)Метод с применением сурфактантов. Детергент 1 солюбилизирует ЛП всех классов, кроме ЛПНП (ЛПВП, ЛПОНП, ХМ). Образованная при взаимодействии с ферментами перекись водорода разрушается пероксидазой, окрашивания нет. Детергент 2 освобождает ХС из частиц ЛПНП, после реакции с ферментами в присутствии хромогенов образуется окрашенный продукт, оптическая плотность которого при 546 нм пропорциональна концентрации ХС ЛПНП в пробе.

3)Метод с применением защитного реагента. Амфотерный сурфактант (защитный реагент) селективно защищает ЛПНП от действия ферментов. ХС остальных классов ЛП

(ЛПВП, ЛПОНП, ХМ) при взаимодействии с ферментами образуют перекись водорода, которая разрушается под действием каталазы. Неионный сурфактант освобождает ЛПНП от защиты, ХС ЛПНП вступает в реакцию с ферментами в присутствии хромогенов с образованием окрашенного продукта.

4)Каталазный метод. В присутствии смеси неионных сурфактантов ХС всех классов ЛП, кроме ЛПНП (ЛПВП, ЛПОНП, ХМ), вступает в реакцию с ферментами, образованная перекись водорода удаляется при действии каталазы. После 5 мин. инкубации действие каталазы блокируется добавлением азида Na, и в присутствии Тритона X-100 ХС ЛПНП вступает в реакцию с ферментами в присутствии хромогенов с образованием окрашенного продукта.

5)Метод с использованием каликсарена. Детергент 1 (каликсарен) образует с ЛПНП растворимый комплекс. Все ЛП кроме ЛПНП (ЛПВП, ЛПОНП, ХМ) вступают в реакцию с ферментами и гидразином с образованием холестерон-гидразона. Детергент 2 (деоксихолат) разрушает комплекс ЛПНП - детергент 1 и ХС ЛПНП вступает в реакцию с ферментами в присутствии β -НАД с образованием β -НАДН, концентрация которого измеряется спектрометрически.

Проведенные исследования показали, что все предложенные «гомогенные» методы определения ХС ЛПНП обладают высокой чувствительностью и специфичностью, линейностью в необходимых пределах, прекрасной воспроизводимостью. Результаты определения незначительно подвержены влиянию повышенной концентрации гемоглобина, билирубина и триглицеридов. Однако при использовании ряда методов отмечают влияние на результаты диспротеинемий и парапротеинемий.

Согласно рекомендациям Национальной образовательной программы по холестерину, метод определения ХС ЛПНП должен удовлетворять определенным критериям правильности и воспроизводимости. Коэффициент вариации ($KB_{ан}$) между сериями (случайная ошибка) должен быть $\leq 4\%$; среднее отклонение от значений ХС ЛПНП, выполненных референсным методом (систематическая ошибка, O_c), не должно превышать 4% . Общая ошибка ($O_{об}$) при измерениях, рассчитываемая как сумма систематической и случайной ошибок, $O_{об} = 1,96 \cdot KB_{ан} + O_c$, должна быть $< 12\%$.

Преимуществами гомогенных методов являются полная автоматизация исследования, позволяющая достичь необходимого уровня воспроизводимости при определении ХС ЛПНП. Однако данные, полученные гомогенными методами, не всегда удовлетворяют критериям правильности вследствие систематической ошибки –

завышения или занижения концентрации ХС ЛПНП в сравнении со значениями, полученными референсным методом. Тем не менее, благодаря низким значениям КВ, эти методы удовлетворяют критериям NCEP для определения ХС ЛПНП – суммарная ошибка измерений не превышает 12%.

Таким образом, для определения ХС ЛПНП в клинико+диагностических лабораториях используется множество методов, основанных на разных принципах. В этой связи особое значение при определении ХС ЛПНП приобретает качество калибровочных материалов. В зависимости от метода, при определении ХС ЛПНП используют калибровочный материал для определения ХС или ХС ЛПНП.

Калибровочный материал для определения ХС может быть представлен водным раствором ХС или водным раствором ХС с добавлением матрицы (белка), калибровочной сывороткой. Предпочтительным является использование калибровочного материала, значения которого определены референсным методом и обеспечена прослеживаемость до аттестованного (сертифицированного) первичного стандартного образца (референсного материала).

Концентрация первичного референсного материала определяется дефинитным методом (изотопное разведение, газовая хроматография/масс+спектрометрия), концентрация вторичных референсных материалов, используемых для калибровки ферментативных методов – референсным методом (модифицированный метод Абеля-Кендалла). Метод включает экстракцию липидов неполярным растворителем, химический гидролиз эфиров ХС (омыление) спиртовым раствором КОН, развитие окрашивания после добавления реактива Либермана-Бурхарда (уксусный ангидрид-уксусная кислота-серная кислота).

Референсный метод относится к химическим непрямым (экстракционным) методам определения ХС и является трехстадийным.

Как и при определении ХС, при определении ХС ЛПНП предпочтительным является использование калибровочного материала, значения которого определены референсным методом и обеспечена прослеживаемость до аттестованного (сертифицированного) первичного стандартного образца.

6) Колориметрические (фотометрические) методы. В основе этих методов лежит измерение при помощи визуального или фотоэлектрического колориметра окрашенного продукта, образующегося при взаимодействии субстрата или продукта действия фермента со специфическими реактивами, которые обычно добавляются в фиксированную опытную

пробу, взятую после остановки ферментативной реакции. Эти методы весьма разнообразны. Разработаны количественные методы, основанные на биуретовой реакции, при которой состав белка, очевидно не должен сказываться на результатах определения, т.к. эта реакция на пептидные связи, а не на боковые группы в белке. Метод Горнелла и соавторов, основанный на измерении полосы поглощения в области 550-650 нм, используется для определения значительных количеств (1-10 мг) белка в пробе. Предлагаются биуретовые микрометоды, основанные на поглощении ультрафиолетовых лучей медно-белковыми комплексами: они позволяют определять 0.1 - 2.0 мг белка в пробе. Число небелковых веществ, которые могут влиять на определения с помощью биуретовой реакции, невелико, но следует вносить поправки на те вещества, которые присутствуют в высоких концентрациях (соли аммония, сахара). Наиболее ценными являются те фотометрические методы, которые позволяют следить во времени за ходом ферментативной реакции без ее прекращения по изменению окраски хромогенного субстрата или добавленного индикатора. Метод Фолина и Чиокальто, предложенный для определения количества белка, основан на хромогенной природе некоторых боковых групп аминокислот, а также на присутствии в белках пептидных связей. Этот метод обладает высокой чувствительностью (на пробу достаточно 0.01 - 0.1 мг белка), но многие небелковые вещества мешают определению.

Современная лабораторная диагностика предлагает широкий спектр методов и методических приемов для определения ХС ЛПНП, различающихся не только по аналитическим свойствам, но также по трудоемкости и стоимости.

В этой связи при выборе метода для определения ХС ЛПНП, руководствуясь задачами исследования, следует учесть все достоинства и недостатки предлагаемых методов. Главное, не забывать одно из основных правил лабораторной диагностики нарушений липидного обмена: выполнение анализов всех пациентов, включенных в программу, должно быть проведено одним методическим приемом.

Таблица 3

Физические и химические свойства липопротеидов плазмы крови человека

Название	Плотность, г/см ³	S _t	Состав, % сухой массы				
			белки	фосфо- липиды	холес- терин	эфиры холестерина	тригли- цериды
ЛВП	1,063-1,21	-	45-55	30	3	15	5-8
ЛНП	1,006-1,06	0-20	20-25	22	8	35	10
ЛОНП	0,93-1,006	20-400	2-13	10-25	3-8	6-16	50-80
Хиломикроны	0,950	400х10 ⁵	0,5-2,5	3-15	1-5	1-7	79-85

Что означают результаты анализов?

Референсные значения: 0 - 3,3 ммоль/л.

Понятие «норма» не вполне применимо по отношению к уровню ХС ЛПНП. У разных людей, в жизни которых присутствует разное количество факторов риска, нормальный уровень ХС ЛПНП будет свой. Исследование на ХС ЛПНП используется для определения риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, однако, чтобы точно определить его для какого-либо человека, необходимо учесть все факторы.

Повышение уровня ХС ЛПНП может быть результатом наследственной предрасположенности (семейной гиперхолестеролемии) или избыточного приема с пищей животных жиров. У большинства людей с повышенным холестерином в той или иной мере задействованы оба фактора.

Уровень ХС ЛПНП можно оценить следующим образом:

- меньше 2,6 ммоль/л – оптимальный,
- 2,6-3,3 ммоль/л – близок к оптимальному,
- 3,4-4,1 ммоль/л – погранично высокий,
- 4,1-4,9 ммоль/л – высокий,
- выше 4,9 ммоль/л – очень высокий.

Возможные причины повышения уровня ХС ЛПНП:

- холестаза – застой желчи, который может быть вызван заболеванием печени (гепатитом, циррозом) или камнями в желчном пузыре,
- хроническое воспаление почек, приводящее к нефротическому синдрому,
- хроническая почечная недостаточность,
- снижение функции щитовидной железы (гипотиреоз),
- плохо вылеченный сахарный диабет,

- алкоголизм,
- ожирение,
- рак простаты или поджелудочной железы.

Пониженный уровень ХС ЛПНП не используется в диагностике из-за низкой специфичности. Тем не менее его причинами могут быть:

- наследственная гипохолестеремия,
- тяжелое заболевание печени,
- онкологические заболевания костного мозга,
- повышение функции щитовидной железы (гипертиреоз),
- воспалительные заболевания суставов,
- В₁₂- или фолиевоедефицитная анемия,
- распространенные ожоги,
- острые заболевания, острые инфекции,
- хроническая обструктивная болезнь легких.

Традиционные методы определения содержания липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови

Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) и низкой плотности (ЛПНП) в противоположность липопротеинам высокой плотности (ЛПВП) образуют нерастворимые комплексы с гепарином в присутствии ионов марганца. В надосадочной жидкости, оставшейся после осаждения ЛПНП и ЛПОНП, остается α -холестерин или ЛПВП. Нормальное содержание ХС ЛПВП в сыворотке крови составляет 0,9—1,9 ммоль/л.

Рекомендуются следующие показатели оценки вероятности развития атеросклероза [6]:

Показатели оценки вероятности развития атеросклероза

Показатель	Вероятность атеросклероза		
	Высокая	Умеренная	Малая
Общий холестерин, ммоль/л	Больше 6,2	5,68-6,2	Меньше 5,68
Холестерин в ЛПВП, ммоль/л:			
мужчины	Больше 1,0	1,0-1,3	Меньше 1,3
женщины	Больше 1,5	1,3-1,55	Меньше 1,55
Триглицериды, ммоль/л	Больше 2,16	1,6-2,15	Меньше 1,6
Коэффициент атерогенности	Больше 4	3-4	Меньше 3
X _{сoб} -альфа-ХС/альфа-ХС			
Тип дислипотеинемии	1а, 2в, 3, 4	5 тип, дислипотеинемия	1 тип, гипер-альфа-дислипотеинемия

Принцип метода: Хиломикроны, ЛПОНП (липопротеины очень низкой плотности) и ЛПНП (липопротеины низкой плотности) осаждаются добавлением фосфорно-вольфрамовой кислоты и хлорида магния. После центрифугирования супернатант содержит ЛПВП (липопротеины высокой плотности) — фракцию, содержание холестерина в которой определяется ферментативно.

Полученные значения достоверны, если:

- 1) в пробе нет хиломикронов;
- 2) концентрация триацилглицеридов не превышает 400 мг/100 мл;
- 3) в пробах не обнаруживается следов III типа дислипотеинемии.

При измерении на Нг 546 нм происходит завышение количества ЛПВП холестерина спектром поглощения гемоглобина, которое можно игнорировать при значениях до 200 мг Нб/100 мл.

Полученный при центрифугировании супернатант должен быть прозрачен. Если проба содержит большое количество триглицеридов (более 1000 мг/100 мл), осаждение липопротеинов может быть неполным (мутный супернатант) или часть осадка может плавать на поверхности. В этих случаях развести образец 1 : 1 0,9%-ным раствором NaCl и повторить осаждение.

Клинико-диагностическое значение ХС-ЛПВП

Эпидемиологические исследования показали обратную зависимость между уровнями ХС-ЛПВП и распространенностью ИБС. Определение ХС-ЛПВП способствует выявлению риска развития ИБС. Повышению уровня ХС-ЛПВП способствуют такие

заболевания, как первичный билиарный цирроз, хронический гепатит, алкоголизм, прочие хронические интоксикации.

Новые методы диагностики:

1. Метабомика

Метабомика — это «систематическое изучение уникальных химических „отпечатков пальцев“ специфичных для процессов, протекающих в живых клетках» — конкретнее, изучение их низкомолекулярных метаболических профилей [2]. Метаболом представляет собой совокупность всех метаболитов, являющихся конечным продуктом обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме. В то время как данные об экспрессии мРНК генов и данные протеомного анализа не раскрывают полностью всего того, что может происходить в клетке, метаболические профили могут дать мгновенный снимок физиологических процессов в клетке. Метабомика, ограниченная исследованием только липидов, называется липидомикой и может использоваться для идентификации и выяснения механизмов, лежащих в основе заболеваний, основанных на липидах.

Для определения липопротеидов, берется биопроба плазмы крови и по масс-спектрометрическому методу происходит количественный и качественный анализ. Результаты этих и подобных исследований показали, что основным преимуществом прямой масс-спектрометрии является высокая воспроизводимость результатов, которая позволяет эффективно проводить последующую кластеризацию метаболитных фингерпринтов образцов.

При механической обработке для мягкого растирания ткани ее предварительно измельчают ножницами, затем гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (гомогенизатор Поттера–Эльвегейма).

В результате получают препарат со смесью метаболитов, содержащихся в исходном образце. Аликвоты полученного препарата используют для качественного и количественного анализа с целью определения метаболического профиля исследуемого органа. При этом идентифицируются различные метаболиты и определяются их количества. Проводится анализ полученных данных и ставится диагноз [2].

Современные методы качественного и количественного анализа: ГХ-МС, ЖХ-МС/МС, СЕ-МС, FT-МС спектроскопия, ЯМР - спектроскопия и др.

2. Хроматография

Хроматография открыта и предложена как метод разделения и анализа смесей русским ученым Михаилом Семеновичем Цветом в 1903 г.

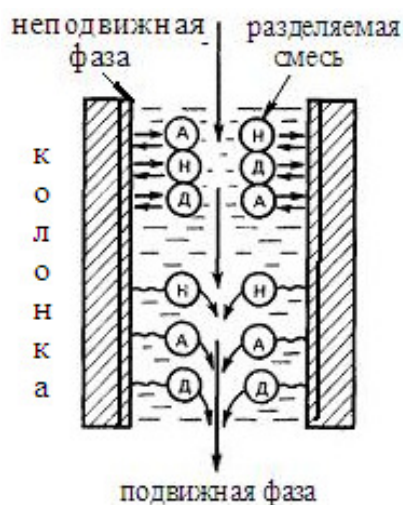


Рис. 3. Принцип разделения в хроматографической колонке

Хроматография – аналитический метод, сочетающий в себе и разделение, и количественное определение веществ, входящих в состав многокомпонентных проб.

В основе разных методов хроматографии лежат адсорбционные процессы различной природы. Хроматография один из немногих методов, сочетающий в себе и разделение, и количественное определение веществ, входящих в состав многокомпонентных проб.

Главным элементом для этих методов анализа являются хроматографические колонки. Хроматографические колонки — трубки, стенки которых покрыты веществом неподвижной фазы [2].

В ходе анализа по трубке движется подвижная фаза (газ или жидкость) с исследуемой смесью.

В результате непрерывно повторяющихся процессов сорбции и десорбции веществ на стенке трубки происходит разделение компонентов исследуемой смеси.

Обязательным условием для проведения хроматографии является наличие двух фаз: неподвижной (стационарной) и подвижной. В результате того, что различные вещества (А, Д, Н) перемещаются вдоль неподвижной фазы с разной скоростью, происходит их разделение.

Различная скорость перемещения отдельных компонентов смеси вдоль неподвижной фазы связана со сложным характером взаимодействия в системе «вещество — подвижная фаза — неподвижная фаза». По механизму взаимодействия различают адсорбционную, распределительную, ионообменную, хемосорбционную и молекулярно-ситовую хроматографию.

Таблица 5

Содержание липидов и липопротеидов у больных атеросклерозом

	<i>ХС</i>	<i>ТГ</i>	<i>ХС- ЛПВП, ммоль/л</i>	<i>ХС- ЛПНЛ</i>	<i>ХС- ЛПОНП</i>	<i>КА</i>
<i>Содержание липопротеидов в крови здоровых людей</i>	<i>3,88±0,12</i>	<i>1,12±0,06</i>	<i>1,11±0,07</i>	<i>2,3±0,12</i>	<i>0,52±0,03</i>	<i>3,1±0,3</i>
<i>Содержание липопротеидов в крови больных людей</i>	<i>4,63±0,14</i>	<i>1,58±0,13</i>	<i>0,99±0,06</i>	<i>2,96±0,16</i>	<i>0,72±0,06</i>	<i>4,0±0,3</i>

Пример использования метода

Наиболее применимым для анализа плазмы крови является метод адсорбционной ионной хроматографии [3].

Анализ смеси различных типов липопротеидов в плазме крови в лабораторной практике часто начинают с разделения этой смеси на компоненты на хроматографической колонке, представляющей собой длинную трубку, заполненную гранулами ионообменной смолы, выполняющей роль сорбента липопротеидов. Ионообменные смолы в зависимости от связанных с ними ионных групп подразделяются на катионообменные – те, что имеют связанные анионы. Например, остатки сульфоновой кислоты (см. рис. 4) – и анионообменные – со связанными катионами (например, ионы Na^+).

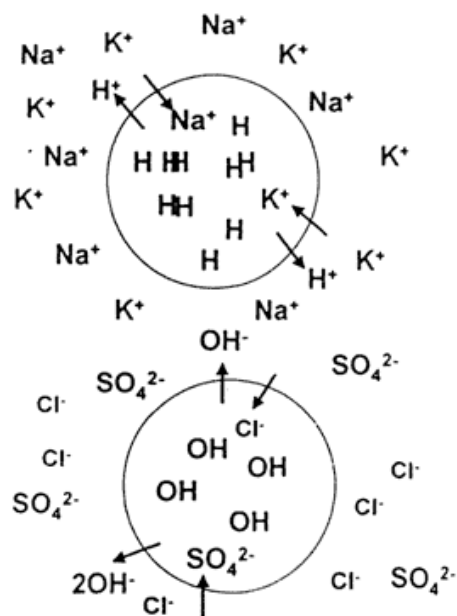


Рис. 4. Схема обмена ионами на смолах

При проведении анализа небольшое количество смеси вносят в верхнюю часть колонки. Затем через колонку пропускают буферный раствор (для катионообменных смол буфер кислый с pH около 3). Липопротеиды проходят через колонку с разными скоростями, поскольку их движение тормозят два фактора: электростатическое притяжение между отрицательно заряженными остатками сульфоновой кислоты и положительно заряженными функциональными группами липопротеидов и гидрофобное взаимодействие между плотностью липопротеидов и сильно гидрофобным составом смолы. В результате различные липопротеиды вымываются из колонки и детектируются на анализаторе (как правило, спектрофотометрически) в различные моменты времени. Результатом анализа является хроматограмма (см. рис. 5).

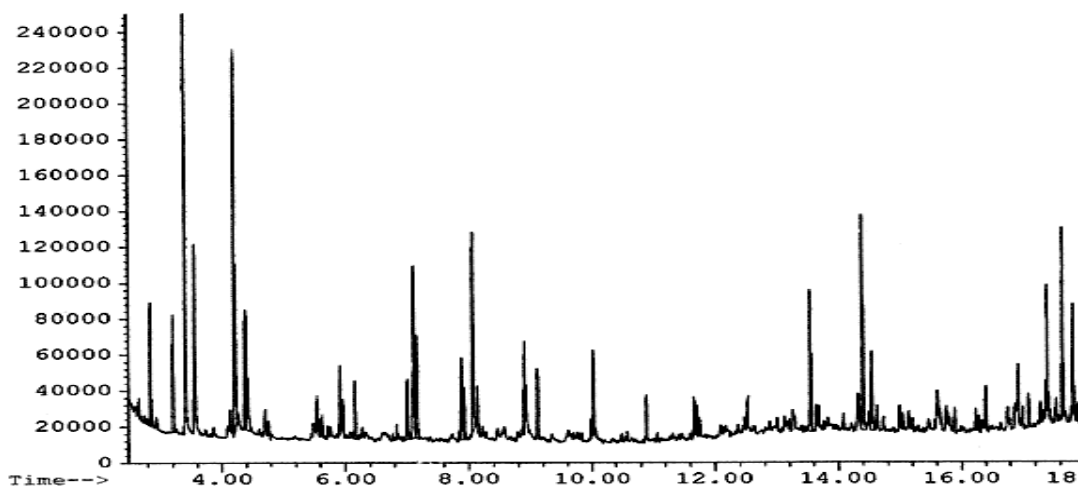


Рис. 5. Образец хроматограммы

4. Масс-спектрометрия

Различные масс-спектрометры (см. рис. 6) представляют собой приборы для разделения ионизированных молекул или атомов по их массам путем воздействия магнитных и электрических полей на пучки ионов, летящих в вакууме [2].



Рис. 6. Блок-схема масс-спектрометра: 1 — система подготовки и введения исследуемого образца (в частности, хроматограф); 2 — ионный источник (ионизационная камера масс-спектрометра); 3 — масс-анализатор; 4 — приемник ионов; 5 — система обработки данных; 6 — компьютер; 7 — масс-спектр; 8 — откачные устройства

Масс-спектрометр содержит: (1) блок подготовки исследуемого образца; (2) ионный источник, где вещества образца частично ионизуются и происходит формирование ионного пучка; (3) масс-анализатор, в котором происходит разделение ионов по массам; (4) приёмник ионов, где ионный ток преобразуется в электрический сигнал; (5) система обработки данных; (6) устройство регистрации сигнала (компьютер); (7) монитор.

В масс-спектрометр сначала происходит ионизация молекул с образованием газообразных ионов, затем идет разделение ионов, регистрация их масс и относительных количеств. Исследуемый образец переводится в газообразное состояние до или в процессе ионизации.

Каждый положительный или отрицательный ион характеризуется отношением его массы к заряду (m/z). В соответствии с этим отношением происходит разделение различных ионов.

Для разделения ионов по отношению массы к заряду используют анализаторы. Например, наиболее часто применяемыми являются магнитные, электростатические и квадрупольные анализаторы. Тип используемого анализатора в значительной степени определяет одну из важнейших характеристик масс-спектрометров – разрешающую способность, определяющую точность, с которой может быть установлена масса иона. Любой из описанных методов может применяться для определения уровня липопротеидов в крови и оказать значительную роль в профилактике различных патологий.

Список литературы

1. Ленинджер А.В. Основы биохимии. М.: Издательство Мир, 1985. 1055 с.
2. Ершов Ю.А. Основы молекулярной диагностики. М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2014.
3. Ершов Ю.А. Общая биохимия. М.: Высшая школа, 2002. 560 с.
4. Строев Е.А. Биологическая химия. М.: Высшая школа, 1986. 348 с.
5. Преображенский М.А. Химия биологически активных соединений: углеводов, липидов, липопротеидов. М.: Высшая школа, 2001. 125 с.
6. Климов Н.А., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 1999. 235 с.