

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© И.Л. ХАЙДУКОВА, В.Н. МАЛАХОВ, 1995
УДК 615.383.012.038

ПОЛУЧЕНИЕ КОНТРОЛЬНЫХ СЫВОРОТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПОПРОТЕИДОВ ОПРЕДЕЛЕННОГО КЛАССА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ, ОСАЖДЕННЫХ СУЛЬФАТИРОВАННЫМИ ПОЛИАНИОНАМИ

И.Л. ХАЙДУКОВА, В.Н. МАЛАХОВ

Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины Минздравмедпрома РФ,
Москва

Подобраны условия для выделения трех основных классов липопротеидов (ЛП) сыворотки крови человека — ЛП очень низкой плотности (ЛОНП), ЛП низкой плотности (ЛНП) и ЛП высокой плотности (ЛВП) путем их избирательного осаждения гепарином и сульфатом декстрана в присутствии ионов металла. На основе проведенных исследований предложен метод получения фракций сыворотки крови человека, обогащенных преимущественно одним классом ЛП. С использованием выделенных фракций приготовлены опытные серии сывороток с повышенным содержанием общего холестерина, холестерина ЛВП и триглицеридов. Показано, что приготовленные сыворотки могут быть использованы в качестве контрольных для оценки погрешностей, возникающих при анализе нативных проб.

Развитие медицинской биохимии в последние десятилетия привело к возрастанию роли лабораторных методов в научных исследованиях и клинической практике, что вызвало в свою очередь повышение требований к качеству проводимых измерений. Одним из наиболее важных аспектов в обеспечении точности получаемых результатов является осуществление регуляторного контроля качества выполняемых анализов, основанного на исследовании в каждой аналитической серии контрольных материалов, воспроизводящих свойства анализируемых проб, в том числе проб с повышенной ("патологической") концентрацией определяемых компонентов.

Получение контрольных сывороток с повышенным содержанием водорастворимых компонентов не вызывает проблем и достигается простым их добавлением к сыворотке донорской крови до требуемой концентрации. Особую задачу представляет приготовление контрольных сывороток с повышенной концентрацией нерастворимых в водных средах липидов, в том числе таких как общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеидов высокой плотности (ХСЛПВП) и триглицериды (ТГ), наиболее часто измеряемых в клинических лабораториях. Основной подход к приготовлению таких сывороток состоит в добавлении к донорской сыворотке либо выделенных липопротеидов (ЛП), в составе которых преобладает соответствующий липидный компонент [1,2], либо фракций сыворотки крови человека, обогащенных ЛП определенного класса [3, 7]. Известно, что ТГ сыворотки находятся преимущественно в составе ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), а также хиломикронов, которые отсутствуют в крови, взятой натощак, ОХС — в составе ЛП низкой плотности (ЛПНП) и высокой плотности (ЛПВП) [8].

В основе ряда методов получения фракций, обогащенных ЛП, лежит осаждение ЛП сульфатированными полианионами, такими как сульфат декстрана (СД) [5, 10] и гепарин [4]. При этом в предложенных до настоящего времени методах фракционирования ЛП сульфатированными полианионами не удается разделить ЛПОНП и ЛПНП, что не позволяет получать фракции, избирательно обогащенные ТГ или ОХС, пригодные для приготовления сывороток с повышенным содержанием преимущественно одного из этих компонентов.

Ранее нами были разработаны методы получения фракций сыворотки крови человека, избирательно обогащенных одним из классов ЛП, которые выделяются с использованием СД (мол. масса 500 кДа) в сочетании с ионами Mg^{2+} и Mn^{2+} [9] или сульфатом аммония (СА) [10].

В настоящей работе изучена возможность использования для получения таких фракций другого сульфатированного полианиона — гепарина, доступного и широко используемого для одновременного осаждения ЛПОНП и ЛПНП сыворотки (плазмы)

крови в целях количественного определения ХС ЛПВП [11].

Методика. В работе использовали слитые остатки сывороток крови доноров, полученные со станции переливания крови. Сыворотка хранилась в замороженном виде при -70°C не более 6 мес. Кроме того, использовали слитые остатки проб сывороток крови, поступавшие на анализ в лаборатории ГНИЦ профилактической медицины Минздравмедпрома РФ при обследовании населения Москвы. Такие сыворотки хранились в жидком виде при 4°C не более 4 суток.

Реактивы: судановый черный Б ("Serva", Германия), раствор гепарина 5000 ЕД/мл (35 мг/мл) ("Richter", Венгрия), ХС, триолеин, СД (мол. масса 500 кДа), агароза, акриламид, N,N-метилен-бисакриламид, фосфовольфрамовая кислота, перйодат Na (все фирмы "Sigma", США) $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ("Merk", Германия), калибровочная сыворотка с аттестованным содержанием билирубина ("Technicon", США, кат. ТОЗ-0977-60). Остальные реактивы отечественного производства марок х.ч. или о.с.ч.

Концентрацию ОХС определяли методом Абея-Кендала в модификации Центра по контролю за заболеваемостью (CDC, США) [12], а также такими наиболее часто используемыми в клиничко-биохимической практике (рутинными) методами, как химический метод на автоанализаторе "Техникон АА-II" (экстракция ХС и его эфиров изопропанолом и образование окрашенного продукта в реакции с реактивом Либермана-Бурхарда) [13], прямой химический метод (непосредственное смешивание пробы с реактивом Либермана-Бурхарда) [14] и ферментативный метод с использованием набора реактивов "Monotest Cholesterol" ("Boehringer", Германия, каталог N 237574) [15]. Концентрацию ТГ также определяли наиболее часто используемыми методами — химическим методом (экстракция ТГ смесью изопропанол/гептан, гидролиз и последующая реакция с ацетил-ацетоновым реактивом) [16], а также ферментативным методом на автоанализаторе "Centrifichem" с использованием набора реактивов "Triglycerides GPO-PAP" ("Boehringer", Германия, каталог N 701 904) [17]. Осаждение ЛПОНП и ЛПНП при анализе ХС ЛПВП проводили гепарин-марганцевой [11] и магний-фосфовольфрамовой [18] смесями. Концентрацию фосфолипидов определяли колориметрическим методом с использованием набора реактивов "Test Combination Phosphorus" ("Boehringer", Германия, каталог N 124 974) [19], билирубина — методом Фог [20], белка — модифицированным методом Лоури [21]. Фотометрирование проводили с использованием спектрофотометра "Spectronic 2100" ("Bausch & Lomb", США). Содержание аполипопротеидов А1 и В определяли методом ракетного иммуноэлектрофореза [22] и иммунотурбидиметрии [23]. Анализ липопротеидного состава проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле со ступенчатым градиентом концентраций [24]. На гель наносили 50 мкл образца. Денситометрию гелей осуществляли с использованием лазерного денситометра "Ультраскан 2202" (LKB, Швеция). Осаждение ЛП СА проводили, как описано нами ранее в [10].

Получение фракции ЛПОНП

1.1. К 100 мл сыворотки крови при комнатной температуре добавляли 2 моль/л раствора MgCl_2 до концентрации 0,1 моль/л и 5 мл раствора гепарина (конечная концентрация 160 мг/дл). Через 30 мин инкубации при 0°C (ледяная баня) полученную суспензию центрифугировали 30 мин при 1500 g и 4°C , что приводило к формированию на поверхности раствора кремовидного слоя. Донную фракцию отделяли отсасыванием с использованием перистальтического насоса и сохраняли, а оставшийся "крем" растворяли в минимальном объеме 10% раствора NaCl (6-8 мл).

1.2. Для удаления избытка СД к полученному раствору добавляли 10% раствор BaCl_2 до конечной концентрации 1,5% и через 25 мин отделяли образовавшийся осадок центрифугированием (30 мин, 1500 g, 4°C). Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость (НЖ) диализовали в течение суток против 200-кратного объема 20 ммоль/л трис-соляно-кислого буфера pH 7,8 с 0,9% NaCl при 4°C с тремя сменами буфера.

Получение фракции ЛПНП

2. К донной фракции (п. 1.1) добавляли 1 моль/л раствора MnCl_2 до концентрации 0,06 моль/л. Через 30 мин инкубации при 0°C (ледяная баня) образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 1500 g и 4°C в течение 30 мин и растворяли в минимальном объеме 10% процентного раствора NaCl (6-8 мл). Полученный раствор обрабатывали, как это описано в п. 1.2.

Получение фракции ЛПВП

3.1. К НЖ, полученной на стадии 2, добавляли 11% раствор СД до концентрации

0,4%, смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре, образовавшийся остаток отделяли центрифугированием (30 мин, 1500 g, 4°C). Осадок растворяли в 10% растворе NaCl, содержащем 2% цитрат натрия.

3.2. Для удаления избытка ионов Mn^{2+} к полученному раствору добавляли 1 моль/л раствора NaOH до pH 8,0 и через 30 мин перемешивания на магнитной мешалке отделяли образовавшийся осадок центрифугированием (20 мин, 1500 g, 4°C). К НЖ для удаления избытка СД добавляли 10% раствор $BaCl_2$ (конечная концентрация 1,5%) и через 20 мин инкубации центрифугировали 20 мин при 1500 g и 4°C. Осадок отбрасывали, а НЖ подвергали дальнейшей обработке.

3.3. К НЖ при комнатной температуре добавляли СА до 20% насыщения и через 20 мин инкубации образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (20 мин, 1500 g, 4°C). Осадок отбрасывали, а к НЖ добавляли СА до 70% насыщения. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (30 мин, 1500 g, 4°C), растворяли в 0,9% растворе NaCl и диализовали, как описано в п. 1.2.

Получение фракции "делипидированная сыворотка" проводили, как описано в работе [9].

Приготовление сывороток с повышенным содержанием ОХС, ТГ и ХС ЛПВП

Порции одной и той же сыворотки крови, полученной объединением остатков сывороток крови доноров (исходная сыворотка), смешивали с отдельными фракциями, полученными разработанным методом, в соотношении 8:1. Приготовленные таким образом обогащенные сыворотки, а также порцию исходной сыворотки разливали по флаконам и хранили до использования в замороженном виде при -70°C.

Оценка пригодности приготовленных сывороток для использования в качестве контрольных

В приготовленных и исходной сыворотках определяли концентрацию ОХС, ТГ и ХС ЛПВП указанными выше методами. В каждой серии анализировали все исследуемые сыворотки, по 4 измерения для каждой сыворотки, проводя по 5 серий измерений всеми методами. Каждая серия включала также первичные стандарты и пробы ранее приготовленных контрольных сывороток, расставленные случайным образом.

Оценку пригодности приготовленных пулов для использования в качестве контрольных проводили, сопоставляя смещения результатов определения ОХС, ХС ЛПВП и ТГ в приготовленных сыворотках рутинными методами по отношению к таковым, полученным методом сравнения, со смещениями, полученными таким же образом для исходной сыворотки. При определении ОХС в качестве метода сравнения использовали метод Абея-Кендала [12], при определении ТГ — метод Готтфрида [16], при определении ХС ЛПВП — гепарин-марганцевый метод осаждения ЛПОНП и ЛПНП [11] с последующим определением ХС в надосадке методом Абея-Кендала.

Наряду с этим оценку аналитических свойств сывороток, обогащенных ЛПВП, проводили также сопоставлением смещений, полученных при разделении ЛП осаждающими смесями с намеренно измененными концентрациями осаждающих агентов, а именно: 1) уменьшенной вдвое концентрацией Мп в гепарин-марганцевом методе и 2) уменьшенной вдвое концентрацией фосфовольфрамовой кислоты в фосфовольфрамат-магниеом методе.

Результаты и обсуждение. Фракционирование сыворотки крови гепарином в сочетании с ионами Mg, Мп и СД

На рис. 1 представлена зависимость осаждаемой доли ОХС и ТГ исходной сыворотки от концентрации добавленного гепарина в присутствии 0,1 моль/л $MgCl_2$. Добавление гепарина вызывало образование суспензии, центрифугирование которой приводило к формированию на поверхности раствора кремовидного слоя. При добавлении 0,05 мл гепарина на 1 мл сыворотки (конечная концентрация гепарина 160 мг/дл) в состав кремовидного слоя переходило в среднем 46% ТГ и 13% ОХС исходной сыворотки, что соответствует доле этих липидов в составе ЛПОНП [25]. Дальнейшее увеличение концентрации добавленного гепарина практически не меняло эти величины.

Анализ липопротеидного состава кремовидного слоя (рис. 2, Б) показал, что в нем преобладают ЛПОНП, а также присутствует некоторое количество ЛПНП и ЛПВП, небольшие пики которых видны на денситограмме. Поскольку, по данным литературы, гепарин не образует нерастворимого комплекса с ЛПВП в сыворотке крови человека, а в случае ЛПНП для образования такого комплекса необходимо присутствие ионов Mn^{2+} , наличие на денситограмме этой фракции пиков ЛПНП и ЛПВП может быть объяснено

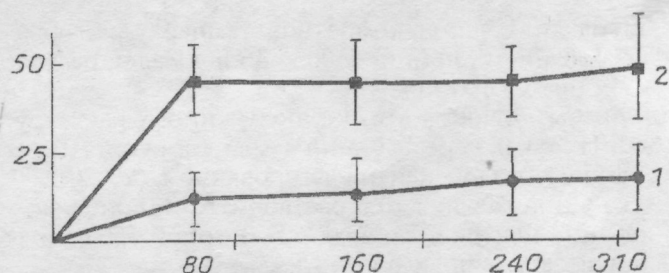


Рис. 1. Доли ОХС (1) и ТГ (2) исходной сыворотки, переходящие в состав поверхностного слоя при добавлении к сыворотке гепарина в присутствии 0,1 моль/л $MgCl_2$. Гепарин добавляли в виде раствора с концентрацией 35 мг/мл (5000 ЕД/мл). По оси абсцисс — концентрация гепарина в растворе (в мг/дл); по оси ординат — доля ОХС и ТГ (в %) от их содержания в исходной порции сыворотки и выделенных фракций.

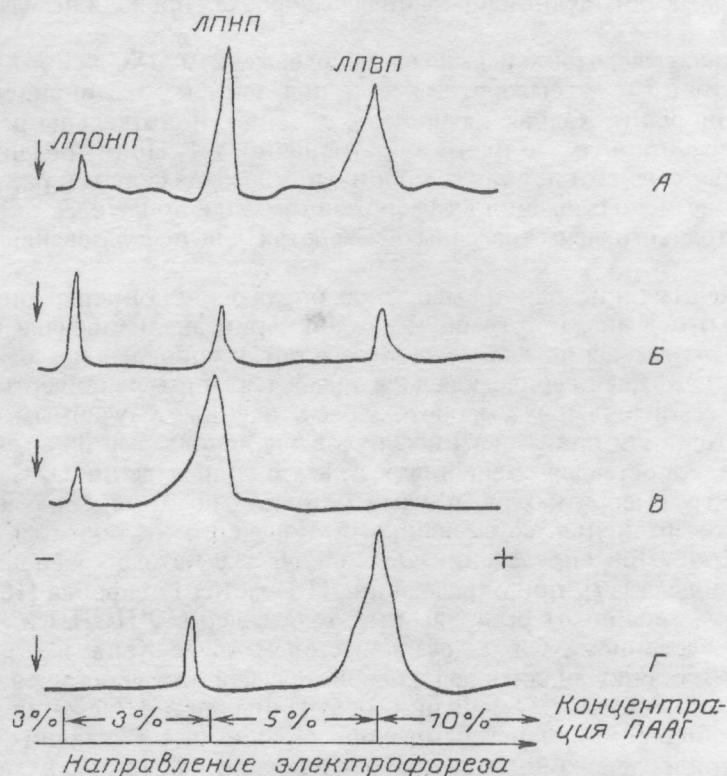


Рис. 2. Денситограмма гелей после электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) исходной сыворотки и выделенных фракций.

А — исходная сыворотка, Б — флотирующий кремовидный слой, В — фракция, полученная при добавлении к донной фракции $MnCl_2$ до концентрации 0,06 моль/г, Г — фракция, выделенная в присутствии 0,4 г/дл СД. Использовали 4-ступенчатый гель, на гель наносили 50 мкл образца, электрофорез проводили в трис-глициновом буфере pH 8,9. Стрелками отмечены стартовые зоны.

переносом некоторого объема донной фракции вместе с кремовидным слоем при его отделении. Сопоставление размеров пиков соответствующих классов ЛП на денситограмме выделенной фракции (см. рис. 2, Б) и исходной сыворотки (рис. 2, А) указывает, что фракция значительно обогащена ЛПОНП. Таким образом, фракция, получаемая на стадии 1 из кремовидного поверхностного слоя, содержит большую часть ЛПОНП исходной сыворотки, что дало основание условно назвать эту фракцию фракцией ЛПОНП.

На рис. 3 представлена зависимость между концентрацией $MnCl_2$, добавленного к донной фракции, и содержанием ОХС в НЖ, полученная при фракционировании одной из сывороток. Содержание ОХС в растворе уменьшалось с увеличением концентрации добавленного $MnCl_2$. При концентрации $MnCl_2$ свыше 0,05 моль/л содержание ОХС в НЖ менялось мало и соответствовало содержанию в сыворотке ХС ЛПВП, что указы-

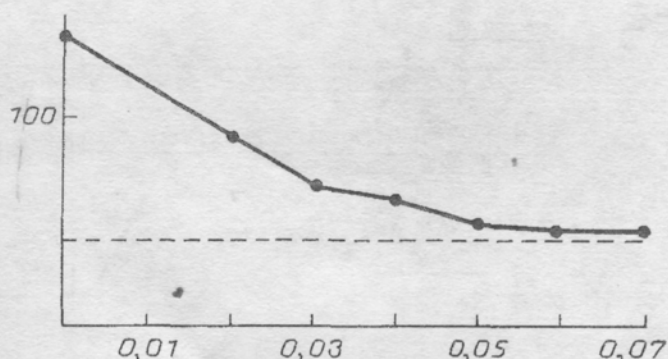


Рис. 3. Зависимость содержания ОХС в донной фракции от концентрации добавленного $MnCl_2$ в опыте по фракционированию одной из сывороток крови человека. По оси абсцисс — концентрация добавленного $MnCl_2$ (в моль/л); по оси ординат — концентрация ОХС (в мг/дл) в растворе после отделения образовавшегося осадка. Пунктирной линией отмечен уровень ХС ЛПВП во фракционируемой сыворотке.

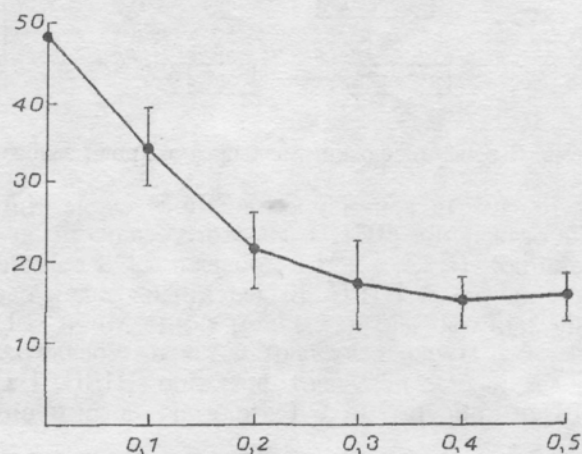


Рис. 4. Зависимость содержания ОХС в НЖ, полученной на стадии осаждения ЛПНП, от концентрации добавленного СД. По оси абсцисс — концентрация добавленного СД (в г/дл); по оси ординат — концентрация ОХС (в мг/дл) в растворе после отделения образовавшегося осадка.

вало на осаждение большей части ЛПНП. Электрофоретический анализ состава липопротеидной фракции, выделенной при конечной концентрации $MnCl_2$ 0,06 моль/л, подтвердил содержание в ней большей части ЛПНП исходной сыворотки и некоторого количества ЛПОНП (рис. 2, В).

На рис. 4 представлена зависимость между концентрацией СД, добавленного к НЖ, полученной на предыдущем этапе (выделение ЛПНП), и содержанием ОХС в растворе после отделения образовавшегося осадка. Видно, что при концентрациях СД 0,3-0,5 г/дл происходит максимальное удаление ОХС из НЖ. Электрофоретический анализ липопротеидного состава полученного осадка (рис. 2, Д) показал, что преобладающими в осадке являются ЛПВП, что дало основание называть фракцию, полученную из этого осадка, фракцией ЛПВП.

Результаты проведенных исследований позволяют предложить схему выделения фракций сыворотки крови человека, содержащих преимущественно один класс ЛП. Согласно этой схеме, к сыворотке крови человека добавляется раствор гепарина до концентрации 160 мг/дл (0,05 мл раствора гепарина 5000 ЕД/мл на 1 мл сыворотки) и $MgCl_2$ до концентрации 0,1 моль/л, что приводит к выделению ЛПОНП в виде слоя на поверхности раствора. Из этого слоя после растворения в 10% растворе $NaCl$, удаления гепарина с помощью $BaCl_2$ и диализа получают фракцию ЛПОНП. Добавление к донной

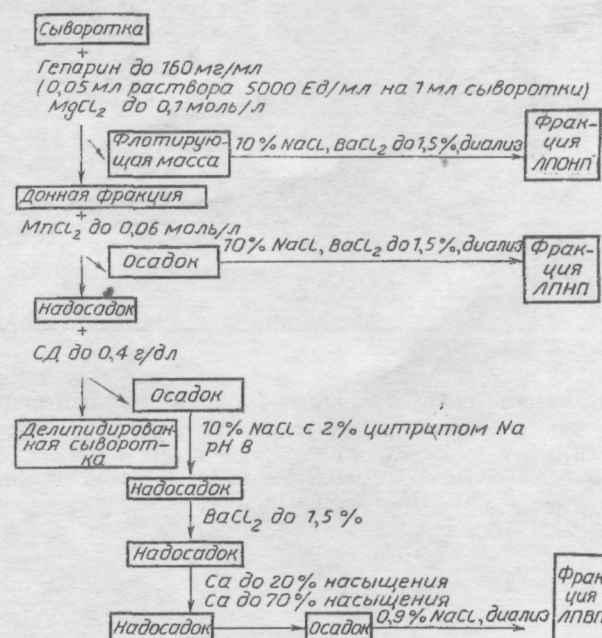


Схема. Выделение фракций сыворотки крови человека

фракции, оставшейся после отделения кремовидного слоя, $MnCl_2$ до концентрации 0,06 моль/л приводит к осаждению ЛПНП. Из этого осадка после удаления гепарина и диализа получают фракцию ЛПНП, а к НЖ добавляют СД до концентрации 0,4 г/дл и осаждают оставшиеся в растворе ЛПВП. Выделенный осадок растворяют в 10% растворе NaCl, содержащем цитрат Na и удаляют ионы Mn и СД. Для более полного отделения от полианиона ЛП переосаждают Са в интервале концентраций 20-70% насыщения [10] и после диализа получают фракцию ЛПВП. Из НЖ, оставшейся на этапе осаждения ЛПВП в присутствии СД, получают делипидированную сыворотку, как описано ранее [9].

В табл. 1 приведены средние величины концентраций ОХС, ТГ, фосфолипидов, апоА1 и апоВ и общего белка, а также величины соотношения ОХС/ТГ (в мг/мг) во фракциях, полученные из результатов 5 экспериментов по фракционированию разных сывороток крови человека по предложенной схеме (см. выше). Видно, что в сравнении с исходной сывороткой фракция ЛПОНП в наибольшей степени обогащена ТГ, а также фосфолипидами, фракция ЛПНП — ОХС, фосфолипидами и апоВ, фракция ЛПВП — ОХС, фосфолипидами и апоА1. Значительная вариация величин концентраций указанных компонентов во фракциях, полученных из разных исходных сывороток, вызвана, очевидно, различиями в белково-липидном составе последних. При этом соотношение ОХС/

Таблица 1
Белково-липидный состав фракций, полученных при фракционировании сыворотки крови человека гепарином в сочетании с Mg, Mn и СД

Фракция	ОХС, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ОХС/ТГ, мг/мг	Фосфолипиды, мг/дл	Общий белок, г/дл	апоА1, мг/дл	апоВ, мг/дл
Исходная сыворотка	5,33±0,27	1,36±0,52	1,64±0,10	205,0	8,0	146,0	106,0
ЛПОНП	13,60±5,55	10,10±2,69	0,57±0,05	441,0	3,2	22,0	83,0
ЛПНП	30,50±4,64	4,60±0,80	2,80±0,61	600,0	4,1	31,0	455,0
ЛПВП	17,40±2,38	2,38±0,53	3,10±0,24	646,0	5,1	530,0	40,0
Делипидированная сыворотка	0,25±0,09	0,10±0,04	—	31,0	6,3	—	—

Примечание. Приведены доверительные интервалы для полученных величин, рассчитанные по результатам 5 экспериментов по фракционированию различных пулированных сывороток крови человека; для удобства сравнения с данными литературы соотношение ОХС/ТГ выражено в мг/мг.

ТГ менялось мало и в целом соответствовало классу ЛП, одноименному с названием фракции [25]. Все фракции содержат, помимо липопротеидов, белки сыворотки крови, присутствие которых позволяет уменьшить понижение концентрации общего белка при смешивании таких фракций с сывороткой.

Наряду с фракциями ЛП продуктом такого способа фракционирования является фракция, практически лишенная липидов, но содержащая большую часть белка (75%) исходной сыворотки, — делипидированная сыворотка, которая может быть использована как разбавитель при получении сывороток крови человека с пониженным содержанием липидов, а также как источник для выделения нелипидных компонентов сыворотки крови человека.

Состав сывороток, приготовленных с использованием фракций, выделенных по предлагаемой схеме

Фракции, полученные предложенным способом, были использованы для избирательного повышения уровня ОХС, ТГ и ХС ЛПВП при приготовлении экспериментальных пулов сывороток (табл. 2). Как видно из этой таблицы, изменение уровня ОХС, ТГ, ХС ЛПВП и апобелков в приготовленных сыворотках соответствовало белково-липидному составу основного ЛП добавляемой фракции. В табл. 2 приведено также содержание билирубина и общего белка сыворотки — компонентов, существенное изменение концентраций которых может влиять на величину определяемой концентрации ОХС и ХС ЛПВП [25, 26]. Как видно, содержание общего белка и билирубина в приготовленных сыворотках сохраняется в пределах нормы, характерной для сыворотки крови человека.

Сравнение систематических погрешностей (смещений), получаемых при анализе ОХС, ТГ и ХС ЛПВП в приготовленных сыворотках, с таковыми, полученными при анализе исходной сыворотки

Как уже указывалось выше, для оценки пригодности использования приготовленных сывороток в качестве контрольных мы проводили сравнение смещений результатов определения ОХС, ТГ и ХС ЛПВП в приготовленных сыворотках рутинными методами относительно результатов, полученных методами сравнения, с аналогичными смещениями для исходной сыворотки (напомним, что исходная сыворотка была получена смешиванием остатков проб сывороток 5-7 доноров и обладала, таким образом, усредненным составом по отношению к составу индивидуальных сывороток). Величины таких смещений, рассчитанные по результатам проведенных измерений, приведены в табл. 3 и 4.

Смещения, полученные при анализе приготовленных и исходной сывороток, отлича-

Таблица 2
Состав обогащенных сывороток, полученных добавлением к исходной сыворотке выделенных фракций*

Сыворотка	ОХС, ммоль/л	ХС ЛПВП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	Общий белок, г/дл	Билирубин, мг/дл	apoA1, мг/дл	apoB, мг/дл
Исходная	5,4	1,3	1,1	7,3	0,61	146,0	106,0
Обогащенная: исходная + фракция ЛПНП	8,2	—	1,5	6,8	0,47	158,0	192,0
исходная + фракция ЛПОНП	6,0	—	1,7	6,5	0,51	118,7	120,5
исходная + фракция ЛПВП	6,4	2,3	1,2	8,5	0,37	221,0	95,0

* 8 объемов сыворотки и 1 объем фракции

Таблица 3
Смещения (в %) результатов определения ОХС и ТГ рутинными методами по отношению к результатам метода сравнения, выявленные при анализе приготокленных и исходной сывороток

Сывортка	ОХС				ТГ	
	концентрация, ммоль/л	смещение			концентрация ммоль/л	смещение (ферментативный метод)
		прямой метод	автоанализатор "Техникон АА-II"	ферментативный метод		
Исходная	5,35±0,23	6,2	-4,7	0,3	1,26	12,3
Исходная + фракция ЛПОНП	6,00±0,09	8,2	-1,2	4,5	1,66	5,8
Исходная + фракция ЛПНП	8,17±0,16	7,3	0,4	4,9	1,53	5,4

Таблица 4

Смещения (в %) результатов определения ХС ЛПВП рутинными методами по отношению к результатам метода сравнения, выявленные при анализе приготокленных и исходной сывороток

Сыворотка	Гепарин-марганцевый метод			Фосфовольфрамат-магнийевый метод осаждения			
	прямой метод	автоанализатор "Техникон АА-II"	ферментативный метод	Абеля, Кендала	прямой метод	автоанализатор "Техникон АА-II"	ферментативный метод
Исходная	16,5	-3,9	1,3	-4,2	6,8	-13,9	-3,3
Исходная + фракция ЛПВП	11,7	-6,4	-3,4	-1,0	8,1	-12,6	-4,4

Таблица 5

Смещение (в %) результатов определения ХС ЛПВП при обработке сыворотки крови человека гепарин-марганцевыми и фосфовольфрамат-магнийевыми методами с измененными соотношениями осаждающих агентов

Сыворотка	Величина ХС ЛПВП, определенная методом сравнения, мг/дл	Смещения	
		гепарин-марганцевый метод	фосфовольфрамат-магнийевый метод
Нативная			
1	51,70	36	174
2	46,70	94	202
3	43,60	386	502
Исходная	50,79	67	212
Исходная+ЛПВП	89,10	80	131

ются по абсолютной величине, однако при статистическом анализе эти отличия оказались недостоверными. Коэффициент корреляции смещений результатов определения ОХС и ТГ в случае приготовленных сывороток с аналогичными смещениями для исходной сыворотки (см. табл. 3) составил 0,945 и 0,974, а при определении ХС ЛПВП — 0,955 (см. табл. 4). Полученные результаты позволяют утверждать, что контрольные сыворотки, приготовленные рассматриваемыми способами, позволяют выявлять смещения, характерные для исходной (неизменной) сыворотки.

При оценке свойств приготовленной сыворотки с повышенным содержанием ЛПВП, помимо рутинных методов, были использованы методы с намеренно измененным соотношением осаждающих агентов, что позволяло получить выраженные смещения и выявить возможные изменения в поведении ЛП на стадии их разделения при анализе ХС ЛПВП.

В табл. 5 представлены полученные для таких методов смещения, выявленные при анализе ХС ЛПВП в исходной, приготовленной обогащенной, а также (для сравнения) в трех нативных пулированных сыворотках. Как видно, изменение концентраций осаждающих агентов приводит к различной, но везде высокой величине положительного смещения как для нативных и исходной сывороток, так и для сыворотки, обогащенной добавлением фракции ЛПВП. Таким образом, сыворотка с повышенным уровнем ХС ЛПВП, приготовленная добавлением фракции ЛПВП, демонстрирует смещения, возникающие при изменении концентраций осаждающих агентов, сходные с таковыми, полученными для исходной и других нативных сывороток.

Отметим в заключение, что комплексообразующая способность гепарина широко используется при разделении ЛП в методах анализа ХС ЛПВП, а также при получении фракций ЛП для приготовления сывороток с повышенным содержанием липидов [4, 11]. Однако как в том, так и в другом случае при добавлении гепарина происходит одновременное осаждение ЛПОНП и ЛПНП. В отличие от этого в настоящей работе предлагается метод выделения фракций, отдельно обогащенных одним из классов указанных ЛП (ЛПОНП и ЛПНП) и получаемых наряду с фракцией ЛПВП. Поскольку гепарин не осаждает ЛПВП из сыворотки крови человека [23], выделение этих ЛП проводится осаждением СД с последующим переосаждением СА в условиях, описанных нами ранее в работе [10]. Получаемые фракции содержат до 85% ОХС и до 95% ТГ исходной сыворотки и предназначены для использования в качестве добавок к сыворотке крови человека для повышения в ней уровня ОХС, ХС ЛПВП и ТГ. Важной особен-

ностью предлагаемого метода является возможность одновременной обработки больших объемов исходной сыворотки и получение концентрированных растворов ЛП в количествах, достаточных для приготовления больших объемов сывороток, селективно обогащенных одним из классов ЛП.

Раздельное выделение ЛПОНП и ЛПНП позволяет готовить сыворотки, избирательно обогащенные ТГ или ОХС (см. табл. 2). Оценка пригодности таких сывороток к использованию в качестве контрольных, проведенная методом сопоставления смещений результатов определения ОХС и ТГ в приготовленных сыворотках с аналогичными смещениями в исходной пулированной сыворотке, показала, что приготовленные сыворотки могут быть использованы в качестве контрольных для оценки с их помощью реальных погрешностей, возникающих при анализе нативных проб.

Сыворотка, обогащенная фракцией ЛПВП, выделенной согласно разработанной схеме, ведет себя аналогично нативным пробам как в обычных, так и в измененных условиях анализа, которые могут иметь место на практике при ошибках в приготовлении осаждающих смесей. Такая сыворотка может быть использована для контроля качества определения ХС ЛПВП.

Таким образом, в результате проведенных исследований предложен способ выделения фракций сыворотки крови человека, обогащенных преимущественно одним из классов ЛП, использование которых позволяет получать контрольные сыворотки с повышенным содержанием ОХС, ТГ и ХС ЛПВП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Demacker P.N.M., Hijmans A.G., Sommeren-Zondag D.F. // Clin. Chem. — 1982. — Vol. 28, N 1. — P. 155-157.
2. Tetrault G.A., Miller W.G., Chinchilli V.M. et al. // Ibid. — 1990. — Vol. 36, N 1. — P. 145-149.
3. Kuchmak M., Hazlehurst J.S., Olansky A.S., Taylor L. // Clin. Chim. Acta. — 1984. — Vol. 144, N 2. — P. 237-243.
4. Pinto J.P. Pat. 3.993.585. USA 1976.
5. Proksch G.J., Bonderman D.P. Pat. 3.955.925. USA 1976.
6. Proksch G.J., Bonderman D.P. Pat. 4.045.176. USA 1977.
7. Proksch G.J., Bonderman D.P. // Clin. Chem. — 1979. — Vol. 28. — P. 1377-1380.
8. Дислипопропротеидемия и ишемическая болезнь сердца / Под ред. Е.И.Чазова, А.Н.Климова. — М., 1980.
9. Хайдукова И.Л., Шахов Ю.А., Чернышева Н.П., Малахов В.Н. // Вопр. мед. химии. — 1989. т. 35 — N 2. — С. 134-139.
10. Хайдукова И.Л., Шахов Ю.А., Еремеева М.Е., Малахов В.Н. // Там же. т. 35 — N 5. — С. 133-138.
11. Warnick G.R., Albers J.J. // J. Lipid Res. — 1978. — Vol. 19. — P. 65-76.
12. Abell J.J., Levy B.B., Brodie B.B., Kendall F.E. // J. biol. Chem. — 1952. — Vol. 195. — P. 357-366.
13. Block W.D., Jawett K.J., Levine J.B. // Automation in Analytical Chemistry. — New York, 1965. — P. 345.
14. Ilka S. // Z. ges. inn. Med. — 1962. — Bd 17, N 2. — S. 83.
15. Siedel J., Hagele E., Ziegenhorn J., Wahlefeld A.W. // Ibid. — 1983. — Vol. 29. — P. 1075-1080.
16. Gottfried S.P., Rosenberg B. // Clin. Chem. — 1973. — Vol. 19. — P. 1077-1078.
17. Bucolo G., David H. // Clin. Chem. — 1973. — Vol. 19. — P. 476-482.
18. Хайдукова И.Л., Дворкин В.И., Малахов В.Н. // Лаб. дело. — 1986. — N 11. — С. 687-689.
19. Zilversmit D.B. et al. // J. Lab. clin. Med. — 1950. — Vol. 35. — P. 155.
20. Fog J. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1958. — Vol. 10. — P. 241-245.
21. Hartree E.F. // Analyt. Biochem. — 1972. — Vol. 48. — P. 422-427.
22. Щербакowa И.А., Перова Н.В., Метельская В.А., Чернышева Н.П. // Вопр. мед. химии. т. 30 — 1984. — N 6. — С. 82-88.
23. Henry R.J. Clinical Chemistry Principles and Technics. — New York, 1964. — P. 843-864.
24. Мазрачева Е.Я. // Вопр. мед. химии. — 1973. — N 6. — С. 652-655.
25. Burstein M., Legmann P. // Monographs on Atherosclerosis / Eds. T.B.Clarkson, D.Kritchevsky, O.J.Pollak. — New York, 1982. — Vol. 11. — P. 1-130.
26. Rifai N., King M.E. // Ibid. — 1986. — Vol. 32, N 6. — P. 957-961.

USE OF SERUM FRACTION SEDIMENTED WITH SULFATATED POLYANIONS FOR PREPARATION OF HUMAN CONTROL SERUM ENRICHED WITH CERTAIN CLASS OF LIPOPROTEINS

I.L.KHAIDUKOVA, V.N.MALAKHOVA

Three main classes of human serum lipoproteins (LP), very low density lipoproteins (VLDLP), low density lipoproteins (LDLP), and high density lipoproteins (HDLP) were selectively sedimented by heparin and dextran sulfate in the presence of metal ions. These data were used for the development of a method for preparation of fractions of human serum enriched with certain class of LP. Using isolated fractions serums with increased content of total cholesterol, cholesterol of HDLP and triglycerides were prepared. These fractions may be used as control samples for evaluation of corresponding parameters in native samples.