

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ, МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК 577.15.08
©А.С.Иванов

ПРИНЦИПЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО АНАЛИЗА ЛИПИДОВ

А.С.Иванов.

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН
119121, Москва, Погодинская ул. 10;
факс: (095) 245-0857; эл.почта:ivanov@ibmh.msk.su

Обзор посвящен описанию основных принципов современных методов ферментативного анализа липидов. Многие из этих методов в настоящее время стандартизированы и используются в клинико-диагностических лабораториях. В обзоре рассматриваются различные варианты анализа холестерина, эфиров холестерина, триглицеридов, свободных жирных кислот, различных видов фосфолипидов и оксистериннов.

Ключевые слова: липиды, фосфолипиды, холестерин, эфиры холестерина, триглицериды, ферментативные методы анализа

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время большинство лабораторных методов анализа липидов в биологических жидкостях являются ферментативными. Эти современные биохимические методы, пришедшие на смену традиционным химическим, основаны на использовании ферментов, катализирующих высокоселективные реакции. История ферментативных методов анализа липидов началась с того момента как была выделена холестериноксидаза (ХСО) из *Nocardia sp.*, катализирующая окислительное превращение холестерина в D4-холестенон, и Flegg [1] и Richmond [2] впервые использовали ее для анализа холестерина в сыворотке крови. В настоящее время ХСО, а также глюкозооксидаза являются наиболее широко используемыми ферментами в клинической лабораторной практике. В качестве источников получения ХСО используются различные бактериальные продуценты [3].

Данный краткий обзор посвящен описанию основных принципов использования различных ферментов в современных лабораторных методах анализа липидов. Рассматриваются различные варианты анализа холестерина, эфиров холестерина, триглицеридов, свободных жирных кислот, различных видов фосфолипидов и оксистериннов.

1. Ферментативный анализ холестерина

Современные ферментативные методы анализа холестерина [4] значительно превосходят традиционные химические [5] по избирательности и скорости анализа, не требуют использования сильных кислот и летучих веществ.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЛИПИДОВ

В основе всех анализов лежит использование ХСО, катализирующей реакцию окисления холестерина с образованием Δ^4 -холестерона (рис. 1А):



Существующие методы анализа холестерина, основанные на данной реакции, могут быть разделены на три основных группы:

1) методы, основанные на измерении накопления продукта окисления холестерина (Δ^4 -холестерон) по увеличению поглощения света при 240 нм [6];

2) методы, основанные на амперометрическом измерении скорости поглощения кислорода [7];

3) методы, основанные на измерении накопления перекиси водорода, образующейся в ходе реакции.

Так как наиболее часто используются методы последней группы, рассмотрим их более подробно.

1.1. Измерение H_2O_2 с помощью сопряженной реакции Триндера.

Данная реакция была впервые предложена для ферментативного анализа глюкозы с участием глюкозооксидазы [8]. Она представляет собой реакцию перекиси водорода с фенолом и 4-аминоантипирином (рис. 1Б) при участии пероксидазы (ПО):



Образующийся в результате реакции окрашенный продукт (хинонимин) измеряется фотометрически при 500 нм.

Реакция Триндера часто используется в анализах холестерина [9]. Разработано много вариантов этой реакции с использованием в качестве хромогенов различных производных фенола, ароматических аминов и др. соединений [10 - 13]. Наиболее часто применяются производные гидроксibenзол-сульфоновой кислоты (рис. 1В), образующие хинонимины с большей величиной оптического поглощения в диапазоне от 400 до 550 нм.

1.2. Измерение H_2O_2 с помощью сопряженной реакции Хенсча [14].

В данной реакции перекись водорода окисляет метанол до формальдегида при участии фермента каталазы (К):



Формальдегид в свою очередь реагирует в присутствии ионов аммония с ацетилацетоном с образованием желтого продукта - лютидина:



Концентрация лютидина (3,5-диацетил-1,4-дигидролютидин), образующегося в стехиометрических количествах, измеряется фотометрически в видимой области спектра при 405 нм.

1.3. Измерение H_2O_2 с помощью сопряженной реакции с ионами йода.

В реакции, катализируемой молибдатом, перекись водорода взаимодействует с ионами йода с образованием в стехиометрических количествах свободного йода. Последний измеряется фотометрически по поглощению при 365 нм или 405 нм.

Существует также вариант потенциометрического измерения убыли анионов йода с помощью йод-селективного электрода [15].

1.4. Электрохимический анализ перекиси водорода.

Образующаяся в реакции (1) перекись водорода определяется различными электрохимическими методами. Существуют варианты анализа H_2O_2 с помощью полярографии на платиновом аноде [16] или с помощью H_2O_2 -сенсора на основе пероксидазы хрена [17].

1.5. Измерение H_2O_2 с помощью сопряженной реакции окисления NADH.

Перекись водорода, образовавшаяся при окислении холестерина в реакции (1), окисляет NADH при участии фермента NAD⁺-пероксидазы [18]. Спектрофотометрическое определение убыли NADH в этой сопряженной реакции обеспечивает прямое и абсолютное измерение холестерина.

2. Ферментативный анализ "общего" холестерина.

В биологических пробах, таких как плазма или сыворотка крови, холестерин присутствует в двух состояниях - в виде свободного холестерина и в виде эфиров (рис. 1Г). Как правило, в клинических лабораториях определяется суммарное содержание холестерина в пробе с помощью так называемого анализа "общего холестерина". Во всех вариантах ферментативного анализа общего холестерина первоначально эфиры холестерина гидролизуются с образованием свободного холестерина и свободных жирных кислот (СЖК). Гидролиз эфиров холестерина может быть как химическим, так и ферментативным с участием холестеринэстеразы (ХСЭ) [19]:



Образовавшийся холестерин анализируется вместе с имевшимся в пробе свободным холестерином методами, которые были описаны выше в разделе 1.

3. Ферментативный анализ эфиров холестерина.

Содержание эфиров холестерина определяется как разность результатов анализа одной и той же биологической пробы на общий и свободный холестерин с помощью описанных выше методов (разделы 1 и 2, соответственно).

4. Ферментативный анализ холестерина во фракциях липопротеинов плазмы крови.

Общий холестерин плазмы крови распределен между тремя классами липопротеинов: высокой плотности (ЛВП), низкой плотности (ЛНП) и очень низкой плотности (ЛОНП). Небольшое количество холестерина также содержится в двух минорных классах липопротеинов: промежуточной плотности (ЛПП) и типа (а) - Л(а). Так как анализ распределения холестерина между ЛВП и ЛНП имеет диагностическое значение, то для этого были разработаны соответствующие методы.

Анализ холестерина может проводиться в любых фракциях липопротеинов, полученных методами преципитации [20], ультрацентрифугирования [21] или электрофореза в агарозе [22]. Фракции липопротеинов при этом не нуждаются в дополнительной очистке или подготовке. На практике чаще всего используются методы химической или иммунохимической преципитации, позволяющие получать фракции ЛВП и ЛНП [23-28].

Довольно часто содержание общего холестерина в ЛНП не определяется, а рассчитывается [29] по эмпирической формуле:

$$\text{холестерин ЛНП} = \text{общий холестерин} - \text{холестерин ЛВП} - \text{ТГ}/5,$$

где ТГ - триглицериды плазмы крови, а все величины концентраций в единицах (мг/дл).

Поправка (ТГ/5) введена для учета холестерина ЛОНП, ЛПП и Л(а).

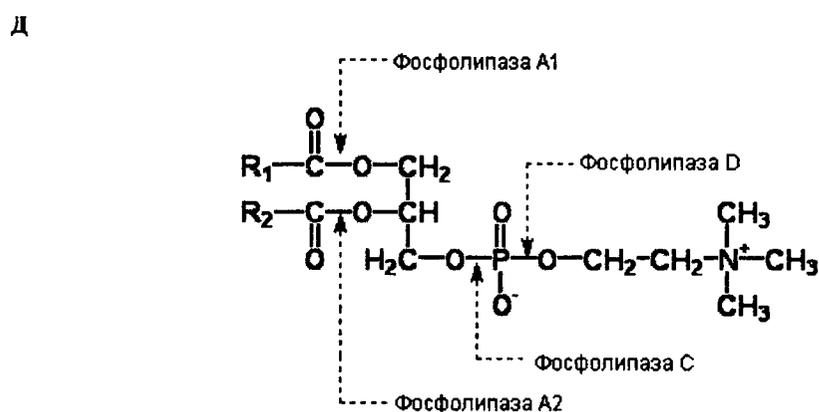
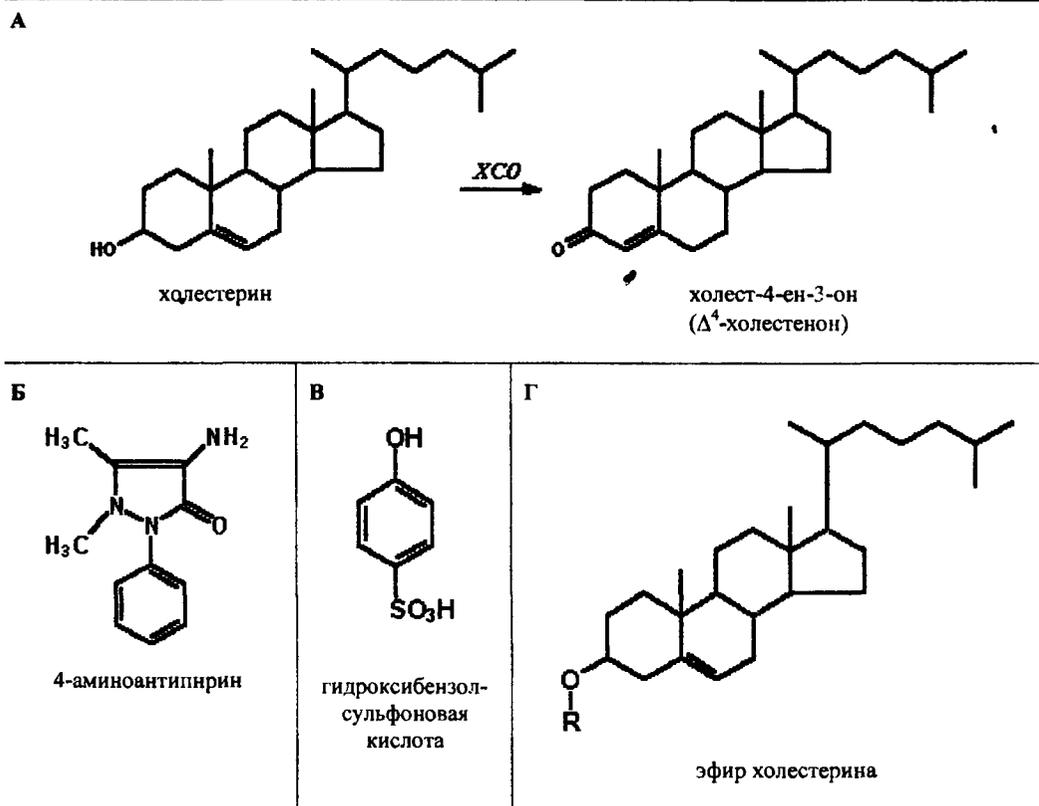
Существуют и более быстрые методы анализа холестерина липопротеинов без разделения плазмы крови на отдельные фракции. Они основаны на обработке цельной плазмы с помощью специфических антител или водорастворимых полимеров для блокирования доступа ферментов к холестерину ЛОНП и ЛНП [30-33]. Холестерин в образовавшихся комплексах становится недоступным для ферментов анализа общего холестерина (ХЭ и ХО). В результате анализируется только холестерин ЛВП.

Существует также два варианта анализа холестерина ЛНП [34-36]:

1) Плазма последовательно обрабатывается двумя реагентами:

(1) раствором хлорида магния, сульфата циклодекстрина и сульфата декстрана, блокирующим при рН 7,0 доступ ферментов стандартного набора к холестерину ЛОНП и хиломикронам;

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЛИПИДОВ



Лецитин (фосфатидилхолин) и точки действия различных фосфолипаз.

Рисунок 1

- А. Реакция окисления холестерина, катализируемая холестериноксидазой (XCO). Б. Структура 4-аминоантипирина. В. Структура гидроксibenзолсульфоной кислоты. Г. Структура эфира холестерина (R - остаток жирной кислоты). Д. Точки действия различных фосфолипаз, показанные на примере фосфатидилхолина.

(2) раствором неионного детергента, селективно растворяющим холестерин ЛНП (но не ЛВП), что позволяет определять только холестерин ЛНП с помощью стандартного ферментативного набора.

2) Плазма также обрабатывается последовательно двумя реагентами:

(1) раствором полианиона и амфотерного детергента, который блокирует при

pH 6,8 доступ ферментов к холестерину ЛНП; общий холестерин других классов липопротеинов (хиломикроны, ЛОНП и ЛВП) подвергается действию ХСЭ, ХСО (реакции (5) и (1) соответственно), образовавшаяся перекись водорода разлагается с помощью каталазы как в реакции (3);

(2) раствором детергента, который позволяет растворить холестерин ЛНП и выполнить его анализ по стандартной схеме.

5. Ферментативный анализ холестерина в биологических тканях.

Существующие методы ферментативного анализа холестерина разработаны и стандартизированы для анализа жидких биологических образцов, таких как плазма и сыворотка крови, однако они могут быть адаптированы для анализа холестерина в других биологических образцах. Адаптация заключается в экстракции холестерина из образца [37], с последующим высушиванием и перерастворением в смешивающихся с водой растворителях (изопропанол [38], смесь изопропанола с диоксаном [39] и т.д.), далее образец диспергируется в водной среде с образованием липосом или мицелл. Высушенный экстракт может быть также перерастворен в растворе детергента (тритон X-100, тритон WR-1339 и др.).

6. Ферментативный анализ триглицеридов

Для анализа триглицеридов часто используется метод, разработанный Visolo и David [40]. В анализе используются следующие ферменты: липаза, α -химотрипсин, глицеринкиназа (ГК), пируваткиназа (ПК) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Первоначально триглицериды, имеющиеся в образце, гидролизуются с помощью бактериальной липазы (триацилглицеролацилгидролаза) до глицерина и свободных жирных кислот (СЖК). Для ускорения протекания данной реакции в реактив добавляется α -химотрипсин.



Освободившийся в результате реакции (6) глицерин затем фосфорилируется при участии АТФ и глицерокиназы (ГК) с образованием эквимольного количества АДФ



Образовавшийся АДФ реагирует с фосфоенолпируватом (ФЕП) при участии пируваткиназы (ПК) с образованием пирувата:



Далее при участии лактатдегидрогеназы (ЛДГ) пируват взаимодействует с NADH и превращается в лактат:



Уменьшение количества NADH, измеренное фотометрически по поглощению при 340 нм, пропорционально количеству глицерина, образовавшегося из триглицеридов и присутствовавшему в образце в небольшом количестве свободного глицерина.

В ряде других методов после реакции (7) используется реакция образовавшегося глицерофосфата с NAD⁺ при участии глицерофосфатдегидрогеназы (ГФД):



Образовавшийся NADH затем измеряется по нарастанию поглощения при 340 нм.

В современных методах ферментативного анализа триглицеридов часто используется другой набор реакций, позволяющий производить фотометрические измерения в видимой области спектра [41]. В них триглицериды также

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЛИПИДОВ

гидролизуются с помощью липазы на глицерин и свободные жирные кислоты (реакция (6)), далее глицерин взаимодействует с NAD^+ при участии глицериндегидрогеназы (ГДГ):



Образующийся NADH реагирует с 2,5-дифенил-3/4,5-диметил-тиазолил-(2)/2Н-тетразолил бромидом (МТТ). Реакция катализируется ферментом диафоразой.



В результате последней реакции образуется окрашенное соединение - формазан, количество которого измеряется по поглощению при 550 нм.

Возможен другой вариант реакции (12), где NADH реагирует с индонитро-тетразолил фиолетовым (ИНТ) с образованием окрашенного продукта (ИНТ-формазан), который измеряется спектрофотометрически при 500 или 505 нм [42].

Другой метод анализа триглицеридов [43, 44] основан на использовании фермента $\text{L-}\alpha$ -глицерофосфатоксидазы. После ферментативного гидролиза триглицеридов (реакция (6)) и фосфорилирования глицерина (реакция (7)) глицерофосфат окисляется под действием α -глицерофосфатоксидазы (ГФО) с выделением перекиси водорода:



Далее перекись водорода анализируется с помощью модифицированной реакции Триндера (реакция (2)), где вместо фенола используется 2-окси-3,5-дихлорбензолсульфонат натрия. Измерения производятся при 545 нм.

В плазме или сыворотке крови может присутствовать некоторое количество свободного глицерина эндогенного и/или экзогенного происхождения. Данный глицерин может дать завышение результатов ферментативного анализа триглицеридов. В большинстве клинических лабораторий коррекция на свободный глицерин не проводится, так как завышение результата анализа, как правило, не превышает 9 мг/дл. В тех случаях, когда требуется более точный анализ, делается поправка на свободный глицерин пробы путем проведения параллельного анализа без липазы, т.е. без реакции (6). В автоматических биохимических анализаторах это может быть сделано довольно легко.

7. Ферментативный микроанализ холестерина и триглицеридов в капле цельной крови.

Описанные выше методы ферментативного анализа холестерина и триглицеридов были адаптированы для микроанализа в капле цельной крови. Данный подход имеет две особенности:

1) все химические и биохимические компоненты анализа находятся в сухом состоянии (метод так называемой сухой химии) на специальном носителе (пластиковая пластинка-полоска) и растворяются в момент анализа непосредственно исследуемой жидкостью [45], измерение производится с помощью специальных анализаторов сухой химии [46-50] (подобные анализаторы очень удобны для предварительного массового анализа (скрининга) населения [51]);

2) разделение капли крови на клетки и плазму происходит путем фильтрации через пористую пластинку непосредственно после нанесения капли крови на противоположную от компонентов сухой химии сторону (плазма проникает через поры пластинки и достигает зоны анализа).

Разрабатываются также неинструментальные варианты тестов [52], когда результат анализа на тест-полоске считывается визуально (по принципу термометра) по изменению окраски сопряженной системы индикаторов.

8. Ферментативный анализ лецитина (фосфатидилхолина).

В ранних методах [53] ферментативного анализа лецитина был использован фермент фосфолипаза D (Фл-D). Под действием этого фермента лецитин гидролизуется с образованием фосфатидной кислоты и холина (рис. 1Д):



Освободившийся холин осаждался в виде рейнеката. Красно-фиолетовый холинрейнекат растворялся в ацетоне и его концентрация измерялась колориметрически при 520 нм. Данный вариант анализа лецитина недостаточно селективен, так как в результате анализа могут давать вклад другие холин-содержащие фосфолипиды (лизолецитин и сфингомиелин).

В настоящее время в анализах лецитина используется другой фермент - фосфолипаза C (Фл-C). Данный фермент обычно выделяют из *B. cereus*. Другие холин-содержащие фосфолипиды (лизолецитин и сфингомиелин) данной фосфолипазой не гидролизуются. Лецитин (фосфатидилхолин) гидролизуется Фл-C на диацилглицерин и фосфохолин (рис. 1Д) [54-56].



Образовавшийся в результате реакции фосфохолин гидролизуется щелочной фосфатазой (ЩФ) на холин и неорганический фосфат (Р):



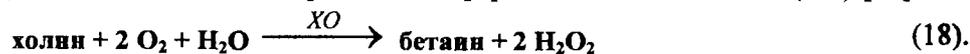
После этапа инактивации щелочной фосфатазы образовавшийся холин определяется одним из двух способов:

1) Фосфорилированием холина при помощи холинкиназы (ХК):



Далее АДР взаимодействует с фосфоенолпируватом при участии пируваткиназы (ПК) (реакция (8)), а образовавшийся пируват взаимодействует с NADH при участии лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (реакция (9)). Измерение производится по уменьшению поглощения NADH при 334, 340 или 365 нм.

2) Окислением холина при помощи фермента холиноксидазы (ХО) [57]:



Далее используется реакция Триндера (реакция (2)), катализируемая пероксидазой (ПО). Измерение производится по поглощению при 550 нм.

Анализ специфичен на лецитин. Присутствие в образце других фосфолипидов (лизолецитин, сфингомиелин, глицеролфосфохолин, фосфатидилэтанолламин и др.) не влияет на результат. В настоящее время используются оба варианта анализа лецитина (с холиноксидазой и с холинкиназой). Предпочтение той или иной методике отдается в зависимости от характера образца. Так если в образце присутствует значительное количество детергента (например, тритон X-100), то желательно использовать анализ с холиноксидазой, так как холинкиназа малоустойчива к детергентам. Если же в образце присутствуют высокие концентрации билирубина, аскорбата и т. д., то предпочтение следует отдать анализу с холинкиназой, так как данные вещества влияют на систему определения H_2O_2 с помощью пероксидазы (реакция Триндера).

9. Ферментативный анализ сфингомиелина.

В данном анализе сфингомиелин гидролизуется ферментом сфингомиелиназой (СМ) на ацилсфингозин и фосфохолин [57, 58] (рис. 2):



Далее фосфохолин гидролизуется с помощью щелочной фосфатазы на холин

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЛИПИДОВ

и неорганический фосфат и т.д. как при анализе лецитина (реакции (16)-(18)). В данном случае также могут быть использованы оба пути определения холина - с использованием холинкиназы или холиноксидазы.

Данный вариант анализа может быть также использован для определения сфингомиелина во фракции ЛВП, полученной методами химической преципитации [59].

10. Ферментативный анализ лецитина и сфингомиелина.

Существует ферментативный тест на определение общего содержания лецитина и сфингомиелина в сыворотке крови человека [60]. Метод основан на совместном действии фосфолипазы С и сфингомиелиназы, гидролизующих соответственно только лецитин и сфингомиелин с образованием фосфохолина (рис. 1Д, рис. 2 и реакции (15) и (19)). Далее фосфохолин гидролизуется с помощью щелочной фосфатазы (реакция (16)) и холин анализируется с использованием холиноксидазы (реакции (18) и (2)).

Для конечной стадии анализа существует альтернативный вариант, основанный на определении неорганического фосфата в реакции с метаванадатом [61].

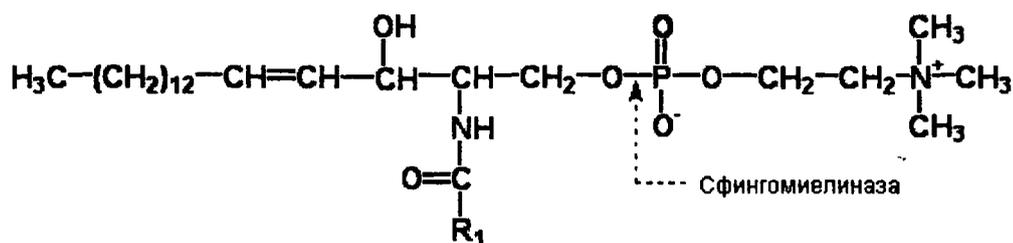
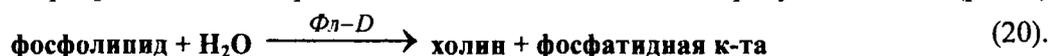


Рисунок 2.

Точка действия сфингомиелиназы.

11. Ферментативный анализ "общих фосфолипидов".

Данный метод позволяет анализировать общее количество холин-содержащих фосфолипидов в пробе [60, 62-65]. Так как холин-содержащие фосфолипиды (лецитин, лизолецитин и сфингомиелин) составляют до 97% всех фосфолипидов сыворотки крови человека, то этот метод назвали анализом "общих фосфолипидов". В данном методе холин-содержащие фосфолипиды гидролизуются с помощью фермента фосфолипазы D (Фл-D), выделенной из микроорганизмов, с образованием в качестве одного из продуктов холина (рис. 1):



Количество холина стехиометрично общему количеству холин-содержащих фосфолипидов. Далее холин анализируется с помощью холиноксидазы (реакции (18) и (2)).

Данный метод также успешно может быть использован для анализа холин-содержащих фосфолипидов во фракциях липопротеинов крови [66].

12. Ферментативный анализ лизолецитина

Лизолецитин (лизофосфатидилхолин) в присутствии лецитина может быть определен только по разности результатов анализов с использованием фосфолипазы D, фосфолипазы С и сфингомиелиназы [57] (реакции (15), (19) и (20)):

$$\text{лизолецитин} = \text{холин (Фл-D)} - \text{фосфохолин (Фл-С)} - \text{фосфохолин (СМ)}$$

13. Ферментативный анализ глицерофосфатидов

Был разработан простой метод определения глицерофосфатидов в сыворотке крови [67, 68]. В основе метода лежит гидролиз всех глицерофосфатидов (за исключением лизолецитина) с участием фосфолипазы С до диглицеридов и фосфохолина (рис. 1 и реакция (15)). Диглицериды определяются в ферментативном тесте на триглицериды (реакции (6)-(11)) путем выполнения двух анализов:

- 1) обычный ферментативный анализ триглицеридов в исходной сыворотке;
- 2) анализ триглицеридов в сыворотке после инкубации ее с фосфолипазой С.

Разность между двумя определениями дает концентрацию глицерофосфатидов.

14. Ферментативный анализ свободных жирных кислот

Shimizu et al. [69] разработали простой и быстрый метод ферментативного микроанализа свободных жирных кислот, основанный на использовании ферментов ацил-КоА-синтетазы (АКС), миокиназы (МК), пируваткиназы и лактатдегидрогеназы. Свободные жирные кислоты (RСООН) активируются первым ферментом в присутствии АТФ и коэнзима А (КоА) с образованием ацил-коэнзима А, АМР и неорганического фосфата:

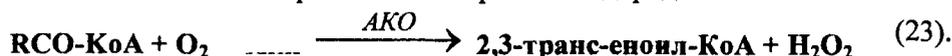


Образовавшийся в реакции АМР взаимодействует с АТФ при участии миокиназы с образованием АДФ:



Далее АДФ взаимодействует с фосфоенолпируватом при участии пируваткиназы (реакция (8)). Образовавшийся пируват реагирует с NADH при участии лактатдегидрогеназы (реакция (9)). Измерения производятся при 340 нм по уменьшению поглощения NADH.

Позднее был разработан ферментативный метод [70, 71] анализа свободных жирных кислот, основанный на использовании ферментов ацил-КоА-синтетазы (АКС) (реакция (21)) и ацил-КоА-оксидазы (АКО) выделенной из *Candida tropicalis* [72]. Ацил-КоА, образовавшийся в реакции (21), окисляется вторым ферментом до еноил-КоА с образованием перекиси водорода:



Далее перекись водорода анализируется с помощью модифицированной реакции Триндера (реакция (2)). Вместо фенола используется 2,4-дибромфенол. По сравнению с фенолом последний дает краситель с большей экстинкцией и позволяет повысить чувствительность анализа, что очень существенно в случае анализа свободных жирных кислот. Так как свободный непрореагировавший коэнзим А ингибирует пероксидазу, используемую в реакции Триндера, то после первой стадии анализа (реакция (21)) производится блокирование сульфгидрильных групп коэнзима А с помощью N-этилмалеимида.

Существует вариант анализа свободных жирных кислот с использованием ацил-КоА-синтетазы и ацил-КоА-оксидазы [73], в котором перекись водорода, образующаяся в реакции (23), определяется по изменению оптической плотности при 550 нм в присутствии каталазы и 4-амино-3-гидразино-5-меркапто-1, 2, 4-триазола. Данные ферментативные методы линейны в большом диапазоне концентраций и обладают широкой специфичностью по отношению к свободным жирным кислотам (от С12 до С18).

Был предложен метод анализа свободных жирных кислот [74], аналогичный вышеизложенным, в котором перекись водорода, получающаяся в реакции (23), определяется с помощью хромогенного реактива - эквимольной смеси Ti(IV) и 4-(2-пиридилазо)резорцина. Взаимодействие перекиси водорода с данным реактивом приводит к появлению окрашенного соединения, поглощающего при 508 нм. Предложенный метод позволяет определять свободные жирные кислоты с длиной углеводородной цепи от С6 до С18 независимо от степени их насыщенности. Диапазон измеряемых концентраций от 0,2 до 1,5 мМ. Метод не чувствителен к различным веществам, обычно присутствующим в сыворотке крови и искажающим результаты анализа, основанного на модификациях реакции Триндера.

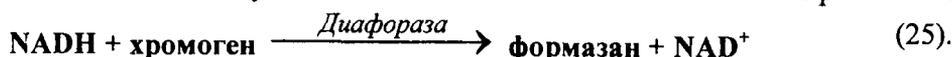
15. Ферментативный анализ оксистероидов

Разработаны методы [75-77], позволяющие проводить определение оксигалчных кислот и других оксистероидов в биологических жидкостях. Методы основаны на окислении оксистероидов (3 α , 7 α , 3 β , 17 β) с помощью соответствующих дегидрогеназ (ОСДГ) в присутствии NAD⁺ с образованием кетостероидов и NADH:

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЛИПИДОВ



Далее NADH в присутствии диафоразы и хромогена (хлорид 3-(*n*-йодфенил)-2-(*n*-нитрофенил)-5-фенил-2Н-тетразолий) дает окрашенный продукт - формазан. О количестве последнего судят по изменению оптической плотности при 500 нм:



Чувствительность анализа можно увеличить примерно на два порядка, если использовать кинетический метод [77] измерения, в основе которого кроме приведенных выше реакций лежит дополнительная сопряженная реакция восстановления NAD⁺ до NADH за счет окисления этанола до ацетальдегида в присутствии алкогольдегидрогеназы (АДГ):



Скорость этой сопряженной ферментативной реакции в определенных пределах пропорциональна концентрации NADH, полученного в реакции (24).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Flegg H.M. (1973) Ann. Clin. Biochem., **10**, 79-84.
- 2 Richmond W. (1973) Clinical Chemistry, **19**, 1350-1356.
- 3 MacLachlana J., Wotherspoons A.T., Ansella R.O., Brooks C.J. (2000) J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., **72**, 169-195.
- 4 Richmond W. (1992) Ann. Clin. Biochem., **29**, 577-597.
- 5 Zak B. (1980) Lipids, **15**, 698-704.
- 6 Flegg H.M. (1973) Ann. Clin. Biochem., **10**, 79-84.
- 7 Kumar A., Christian G.D. (1977) Clin. Chim. Acta, **74**, 101-108.
- 8 Trinder P. (1969) Ann. Clin. Biochem., **6**, 24-27.
- 9 Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S., Richmond W., Fu P.C. (1974) Clin. Chem., **20**, 470-475.
- 10 Shephard M.D., Whiting M.J. (1990) Clin. Chem., **36**, 325-329.
- 11 Fossati P., Prencipe L. (1978) Quad. Sclavo Diagn., **14**, 164-177.
- 12 Majkic-Singh N., Karakasevic B., Spasic S., Stojanov M., Berkes I. (1980) Clin. Chim. Acta, **106**, 195-201.
- 13 Reljic R., Ries M., Anic N., Ries B. (1992) Clin. Chem., **38**, 522-525.
- 14 Roschlau P., Bernt E., Gruber W. (1974) J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **12**, 403-407.
- 15 Брајулеску Г., Кошофреу В. (1980) В кн. "Применение ион-селективных мембранных электродов в органическом анализе" М., "Мир", с.172-178.
- 16 Clark L.C. Jr., Duggan C.A., Grooms T.A., Hart L.M., Moore M.E. (1981) Clin. Chem., **27**, 1978-1982.
- 17 Iwai Hiroyuki, Akihama Sumiyuki (1986) Chem. and Pharm. Bull., **34**, 3471-3474.
- 18 Avigad G, Robertson B. (1981) Clin. Chem., **27**, 2035-2037.
- 19 Deacon A.C., Dawson P.J.G. (1979) Clin. Chem., **25**, 976-984.
- 20 Averna M.R., Cascio G., Rini G.B., Notarbartolo A., Marino G., Labisi M. (1983) Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **59**, 525-528.
- 21 Manzato E., Tempesta D., Baggio G., Fellin R., Crepaldi G. (1983) Clin. Chim. Acta, **130**, 383-389.
- 22 Bartholome M., Wieland H., Seidel D. (1980) Clin. Chim. Acta, **104**, 101-105.
- 23 Assmann G., Schriewer H., Schmitz G., Hagele E.O. (1983) Clin. Chem., **29**, 2026-2030.
- 24 Burstein M., Scholnick H.R., Morfix R. (1970) J. Lipid Res., **11**, 583-595.
- 25 Pisani T., Gebiski C.P., Leary E.T., Warnick G.R., Ollington J.F. (1995) Arch. Pathol. Lab. Med., **119**, 1127-1135.

- 26 Cohn J.S., McNamara J.R., Schaefer E.J. (1988) Clin. Chem., **34**, 2456-2459.
- 27 Yu H.H., Ginsburg G.S., Harris N., Rifai N. (1997) Am. J. Cardiol., **80**, 1295-1299.
- 28 Maitra A., Hirany S.V., Jialal I. (1997) Clin. Chem., **43**, 1040-1047.
- 29 NIH Publication (1995) September, No. 95-3044.
- 30 Sachiko Izawa (1997) J. Med. and Pharm. Sci., **37**, 1385-1388.
- 31 Nauck M., Marz W., Jarausch J., Cobbaert C., Sagers A., Bernard D., Delanghe J., Honauer G., Lehmann P., Oestrich E., von Eckardstein A., Walch S., Wieland H., Assmann G. (1997) Clin. Chem., **43**, 1622-1629.
- 32 Sugiuchi H., Uji Y., Okabe H., Irie T., Uekama K., Kayahara N., Miyauchi K. (1995) Clin. Chem., **41**, 717-723.
- 33 Matsuzaki Y., Kawaguchi E., Norita Y. (1996) J. Anal. Bio. Sc., **19**, 419-427.
- 34 Benlian P., Cansier C., Hennache G., Khallouf O., Bayer P., Duron F., Carrat F., Couderc R., Chazouilleres O., Bardet J., Bouchard P., Poupon R., Masliah J., Bereziat G. (2000) Clin. Chem., **46**, 493-505.
- 35 Rifai N., Iannotti E., DeAngelis K., Law T. (1998) Clin. Chem., **44**, 1242-1250.
- 36 Nauck M., Graziani M.S., Bruton D., Cobbaert C., Cole T.G., Lefevre F., Riesen W., Bachorik P.S., Rifai N. (2000) Clin. Chem., **46**, 506-514.
- 37 Кеумс М. (1975) Техника липидологии, М., "Мир".
- 38 Wang W, Gustafson A. (1993) Acta Chem. Scand., **47**, 846-848.
- 39 Cho B.H. (1983) Clin. Chem., **29**, 166-168.
- 40 Bucolo G., David H. (1973) Clin.Chem., **19**, 476-482.
- 41 Boehringer Mannheim GmbH. Instruction Sheets for manual assays. Edition 1983. W.-Germany.
- 42 TECO DIAGNOSTICS, Triglyceride-Int Reagent Set, 1995 (<http://www.tecodiag.com/html/pi/chemistry/triint.pdf>).
- 43 Buongiorno A.M., Macchia T. (1982) G. Ital. Chim. Clin., **7**, 307-313.
- 44 Me Gowan M.N., Artiss J.D., Strandbergh D.R., Zak B. (1983) Clin. Chem., **29**, 538-542.
- 45 Dappen G.M., Cumbo P.E., Goodhue C.T., Lynn S.Y., Morganson C.C., Nellis B.F., Sablauskas D.M., Schaeffer J.R., Schubert R.M., Snoke R.E., Underwood G.M., Warburton C.D., Wu T.W. (1982) Clin. Chem., **28**, 1159-1162.
- 46 Sanguini L.C., Ceriotti F., Franzini C., Grossi L., Bonini P.A. (1988) Ann. Biol. Clin. (Paris), **46**, 319-321.
- 47 Warnick G.R. (1989) Clin. Lab. Med., **9**, 73-88.
- 48 Statland B.E. (1990) Clin. Ther., **12**, 281-286.
- 49 Broughton P.M., Bullock D.G., Cramb R. (1990) Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., **198**, 43-48.
- 50 Keller H. (1987) Med. Prog. Technol., **13**, 5-19.
- 51 Sedor F.A., Holleman C.M., Heyden S., Schneider K.A. (1988) Clin. Chem., **34**, 2542-2545.
- 52 Allen M.P., DeLizza A., Ramel U., Jeong H., Singh P. (1990) Clin. Chem., **36**, 1591-1597.
- 53 Асатиани В.С. (1969) Ферментные методы анализа. Москва, "Наука", с. 391-393.
- 54 Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica. (1983) Booklet: Enzymatic Phospholipid Analysis., W.-Germany.
- 55 Schriewer H., Jabs H.U., Gunnewing V., Assmann G. (1983) J. Clin. Chem. and Clin. Biochem., **21**, 145-150.
- 56 Blaton V., De Buyzere M., Spincemaille J., Declercq B. (1983) Clin. Chem., **29**, 806-809.
- 57 Le Henaff Y., Guiard M., Jezequel M., Pays M. (1982) Ann. Biol. Clin., **40**, 585-590.
- 58 McGowan M.W., Artiss J.D., Zak B. (1983) Clin. Chem. Clin. **29**, 1513-1517.
- 59 Schriewer H., Jabs H.U., Assmann G. (1982) J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **20**, 305-312.
- 60 Takayama M., Itoh S., Nagasaki T., Tanimizu I. (1977) Clin. Chin. Acta, **79**, 93-98.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЛИПИДОВ

- 61 *Blaton V., De Buyzere M., Spincemaille J., Declercq B.* (1983) *Clin. Chem.*, **29**, 806-809.
- 62 *Okabe H., Kita M., Uji Y., Noma A.* (1981) *Clin. Biochem.*, **19**, 788-789.
- 63 *Goudard M., Aubry C., Piccardi G.* (1982) *Med. Lab.*, **35**, 21-24.
- 64 *Roschlau P., Bernt E., Gruber W.* (1974) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **12**, 403-407.
- 65 *Postiglione L., Oriente P., Cimmino F., Nastasi L., Spano A., Di Fraia G.* (1982) *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **58**, 605-611.
- 66 *McGowan M.W., Artiss J.D., Zak B.* (1982) *J Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **20**, 807-812.
- 67 *Postiglione L., Oriente P., Nastasi L., Cimmino F., Di Fraia G., Spano A.* (1982) *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **58**, 612-617.
- 68 *Kornmuller K.J.* (1981) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **19**, 7-11.
- 69 *Shimizu S., Inoae K., Tani Y., Yamada H.* (1979) *Anal. Biochem.*, **98**, 341-345.
- 70 *Okabe H., Uji Y., Nagashima K., Noma A.* (1980) *Clin. Chem.*, **26**, 1540-1543.
- 71 *Mizuno K., Toyosato M., Yabumoto S., Tanimizu I., Hirakawa H.* (1980) *Anal. Biochem.*, **108**, 6-10.
- 72 *Shimiua S., Yasui K., Tani Y., Yamada H.* (1979) *Biochem. Biophys. Res. Common.*, **91**, 108-113.
- 73 *Hosaka K., Kikuchi T., Mitsuhide N., Kawaguchi A.* (1981) *J. Biochem.*, **89**, 1799-1803.
- 74 *Matsubara C., Nishikawa Y., Yoshida Y., Takamura K.* (1983) *Anal. Biochem.*, **130**, 128-133.
- 75 *Yamaguchi Y., Seki T.* (1982) *Anal. Lett.*, **B15**, 537-542.
- 76 *Komiyama Y., Adachi T., Ito Y., Hirano K., Sugiura M., Sawaki S.* (1982) *Chem. and Farm. Bull.*, **30**, 3796-3799.
- 77 *Bovara R., Carrea G., Cremonesi P., Mazzola A.* (1982) *Fresenius' Z. anal. Chem.*, **312**, 185.

Поступила 10.12.02

PRINCIPLES OF ENZYMATIC ANALYSIS OF LIPIDS

A.S.Ivanov

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS
Pogodinskaya str. 10, Moscow, 119121, Russia
e.mail: ivanov@ibmh.msk.su; fax: (095) 245-0857.

The review described principles of modern methods of enzymatic analysis of lipids. Many of these methods of determination of cholesterol, cholesterol ethers, triglycerides, free fatty acids, various types of phospholipids and oxisterols may be employed or are employed in clinical diagnostic laboratories.

Key words: lipids, phospholipids, cholesterol, cholesterol esters, tryglicerides, enzymatic methods.