

УДК 616.152.

© Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО И СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВОВ ЛИПОПРОТЕИНОВ КРОВИ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ (СРАВНЕНИЕ С БИОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ).

²Ф.В. Тузиков, ¹Ю.И. Рагино, ²Н.А. Тузикова, ¹М.В. Иванова,
²Р.В. Галимов, ¹Ю.П. Никитин

¹Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения РАМН, 630003, Новосибирск, ул. Владимирский спуск - 2а;

²Институт молекулярной биологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии "Вектор", 630559, Кольцово, Новосибирская область

Разработан новый, высокоточный экспресс-метод количественной и качественной оценки фракционного и субфракционного составов липопротеинов (ЛП) крови с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния на дифрактометре фирмы "Siemens". Данный метод позволяет определять концентрации общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), ХС липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛВП), ХС липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛНП), фосфолипидов (ФЛ) и общих липидов сыворотки крови, а также концентрации каждой из 5 субфракций липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), липопротеинов промежуточной плотности (ЛПП), 3 субфракций ЛНП (большие легкие, средние и мелкие плотные частицы), 5 субфракций ЛВП и концентрации ХС, ТГ и ФЛ в каждой субфракции. Метод основан на разработанной единой модели строения ЛП всех фракций и субфракций в результате обобщения и анализа литературных данных о компонентном составе ЛП и их размерах. Результаты концентраций основных липидов сыворотки крови (ХС, ТГ, ХС-ЛВП), полученные при использовании этого метода, коррелируют с данными, полученными биохимическим ферментативным методом и методом "сухой химии". Новый метод характеризуется высокой воспроизводимостью и пригоден для крупномасштабных клинических исследований.

Ключевые слова: малоугловое рентгеновское рассеяние, фракции и субфракции липопротеинов, холестерин, триглицериды

ВВЕДЕНИЕ. Согласно данным экспериментальных и эпидемиологических исследований существует взаимосвязь между высоким уровнем холестерина (ХС) сыворотки крови, особенно ХС липопротеинов низкой плотности (ЛНП), низким уровнем ХС липопротеинов высокой плотности (ЛВП) и развитием атеросклероза [1, 2]. Кроме того, широко обсуждается, что повышенные уровни триглицеридов (ТГ) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП) являются факторами развития атеросклероза [3].

Однако вероятность развития атеросклероза и ИБС у людей со сходными концентрациями липидов и наличием других факторов риска может быть различной [4]. Некоторые из этих различий могут быть обусловлены гетерогенностью каждого из основных классов липопротеинов (ЛП), состоящих из отдельных субфракций, различных как по физико-химическим свойствам, так и по биологическим функциям [5, 6].

Проведены единичные исследования субфракционного состава основных ЛП крови [5, 6], выявлены связи повышенных концентраций мелких плотных ЛОНП, ЛНП и ЛВП с риском развития атеросклероза [7, 8]. В этом плане наиболее изучены субфракции ЛНП. Показано, что с увеличением плотности субфракций ЛНП увеличивается содержание в них свободного ХС и его эфиров. Мелкие плотные субфракции ЛНП слабо связываются с В/Е рецепторами *in vitro*, длительное время присутствуют в плазме *in vivo*, вызывают накопление ХС в культивируемых гладкомышечных клетках и демонстрируют низкую резистентность к окислению [9, 10]. Таким образом, мелкие плотные частицы ЛНП являются наиболее атерогенными.

В этих немногочисленных исследованиях субфракции основных ЛП крови были идентифицированы различными методами: ультрацентрифугированием в градиенте плотности [6], электрофорезом в градиентном геле [11], с помощью ядерно-магнитного резонанса [12] и т.д. Однако длительность по времени и трудоемкость этих методов ограничили их широкое использование в клинической практике.

Целью настоящего исследования было разработать принципиально новый метод оценки фракционного и субфракционного составов основных ЛП крови, отличающийся высокой точностью, экспрессностью и пригодный для крупномасштабных клинических исследований.

МЕТОДИКА Для исследования использовали малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР), биохимический ферментативный метод и метод "сухой химии". Кровь для анализа брали у 178 пациентов клиники НИИ терапии СО РАМН утром натощак из локтевой вены не ранее, чем через 12 часов после последнего приема пищи.

В настоящем исследовании разработан высокоточный экспресс-метод количественной и качественной оценки фракционного и субфракционного составов основных ЛП крови с помощью МУРР на дифрактометре фирмы "Siemens", позволяющий определять концентрации общего ХС, ТГ, ХС липопротеинов высокой плотности (ЛВП), ХС липопротеинов низкой плотности (ЛНП), фосфолипидов (ФЛ) и общих липидов сыворотки крови, а также концентрации каждой из 6 субфракций липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), липопротеинов промежуточной плотности (ЛПП), 3 субфракций ЛНП (большие легкие, средние и мелкие плотные частицы), 5 субфракций ЛВП и концентрации ХС, ТГ и ФЛ в каждой субфракции ЛП.

Для получения растворов с заданной электронной плотностью растворителя использовали сухую сахарозу. Необходимую плотность растворителей обеспечивали с помощью расчетной формулы [13]:

$$m = V \cdot (r_1 - r_0) \cdot r_2 / (r_2 - r_1)$$

где V , r_1 - объем и требуемая конечная плотность исследуемого образца; r_0 - плотность сыворотки; m , r_2 - масса и плотность используемого контрастера (сахарозы). Плотность растворителей контролировали пикнометрически.

Измерения малоугловых рентгенограмм проводили на дифрактометре фирмы "Siemens" (Германия). Длина волны используемого излучения $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ($\text{CuK}\alpha$), температура образцов при измерении рентгенограмм 20°C . Малоугловые рентгенограммы измеряли в угловом

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО И СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВОВ ЛИПОПРОТЕИНОВ

диапазоне: $0,010 < h < 0,137 \text{ \AA}^{-1}$, где $h = 4\pi \cdot \sin(\theta/\lambda)$ (2θ - угол рассеяния). В рентгенограммы вносили поправки на фоновое рассеяние, поглощение, проводили сглаживание. Вычисление концентраций сферических частиц выполняли на компьютере типа Pentium-200MMX по алгоритмам, описанным в Приложении 1.

С целью сравнения, определение концентраций общего ХС, ХС-ЛВП и ТГ сыворотки крови проводили также энзиматическими методами с использованием стандартных реактивов Biosub CHOL, Biosub TG и ХС-ЛВП ("Herbos dijagnostika") на анализаторе "Корона" и методом "сухой химии" на анализаторе "CHOLESTECH" (США).

Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента для средних арифметических ($p < 0,05$) в программе "SPSS для Windows".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Одной из задач исследования было сравнить результаты измерений концентраций общего ХС, ТГ и ХС-ЛВП крови, полученных с помощью классического биохимического (энзиматического) метода и новым разработанным методом с применением МУРР. В таблице 1 представлены данные параллельных измерений концентраций общего ХС, ХС-ЛВП и ТГ крови двумя методами у 102 пациентов. Выявлена высокая положительная корреляция между измерениями общего ХС ($r = +0,91$, при $p < 0,001$) и ХС-ЛВП ($r = +0,82$, при $p < 0,001$). При сравнении данных параллельных измерений концентрации ТГ крови биохимическим методом и методом МУРР выявлена средняя положительная корреляция ($r = +0,68$, при $p < 0,001$). Разница значений концентраций общего ХС, ХС-ЛВП и ТГ крови, измеренных методом МУРР, составила -2%, 0% и 10,5% соответственно в сравнении с энзиматическим методом. Данные, представленные в таблице 2, показывают, что в 57% случаев отклонение результатов измерения общего ХС методом МУРР в сравнении с биохимическим методом $< 5\%$, а в 82% случаев - $< 10\%$. Для ХС-ЛВП эти показатели составляют 50% и 84% соответственно. В 50% случаев отклонение результатов измерения общих ТГ методом МУРР в сравнении с биохимическим методом $< 10\%$, а в 79% случаев - $< 20\%$. Итоговые данные двух параллельных измерений концентраций общего ХС, ТГ и ХС-ЛВП крови, полученные с помощью биохимического метода и разработанного метода с использованием МУРР, представлены на рисунке 1. Таким образом, результаты измерения концентраций основных липидов крови, полученные с использованием МУРР и классического биохимического метода характеризуются достаточно высокой положительной корреляцией.

Таблица 1. Сравнительные данные параллельных измерений концентраций общего ХС, ЛВП-ХС и ТГ сыворотки крови (мг/дл) двумя методами (энзиматическим - биохимическим и методом МУРР) у 102 пациентов

Статистические показатели	Биохимический метод			Метод МУРР		
	ХС	ЛВП-ХС	ТГ	ХС	ЛВП-ХС	ТГ
М	243,0	60,3	146,0	238,1	60,5	161,4
m	26,1	5,9	34,4	25,8	6,3	32,6
σ	35,5	8,5	49,0	34,5	8,2	42,9
Разница в %				-2	0	10,5
r				+0,91	+0,82	+0,68

Примечание: Здесь и в табл. 3 - r - коэффициент корреляции между значениями, полученными двумя разными методами

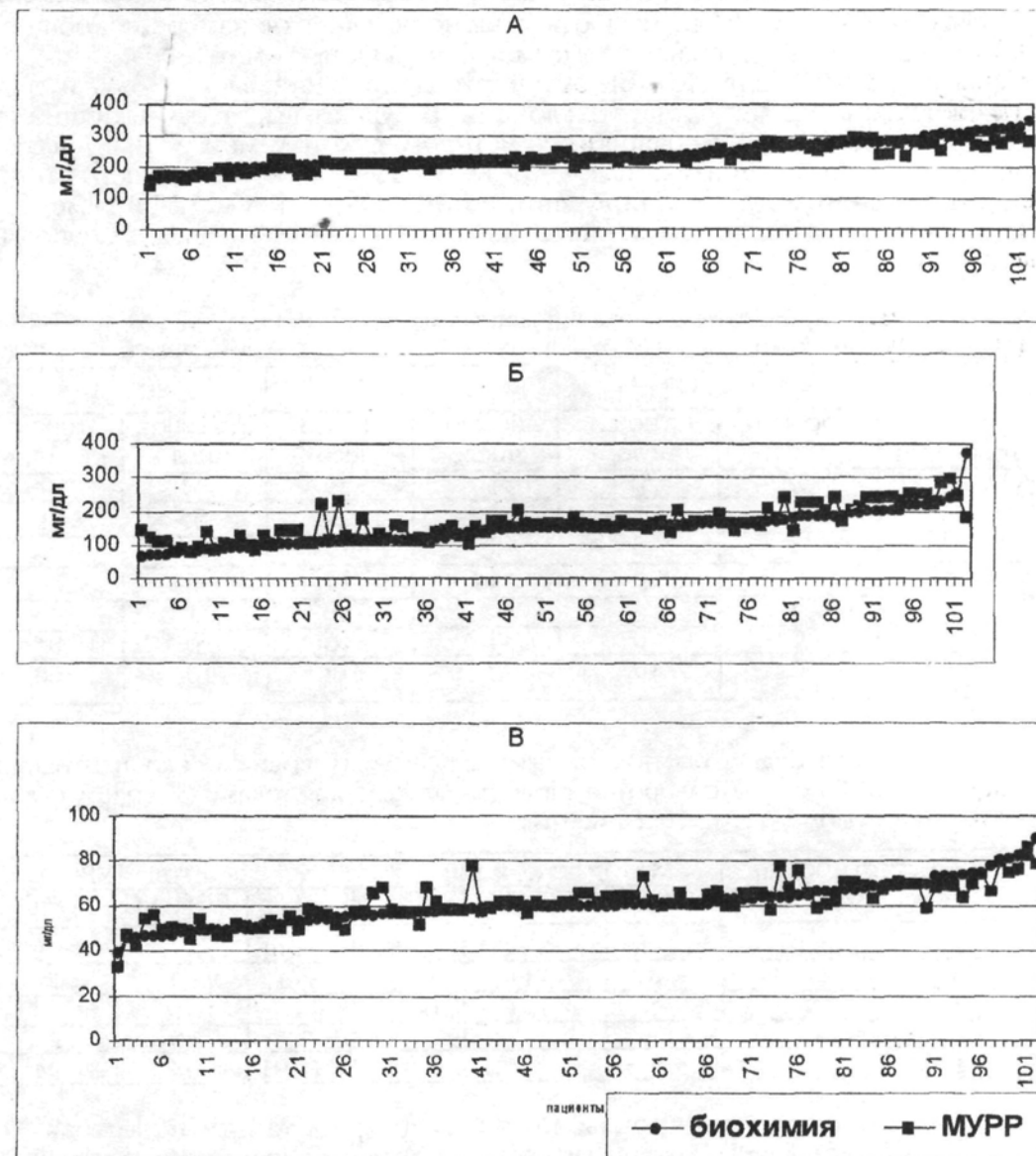


Рисунок 1.

Сравнительные данные параллельных измерений концентраций общего ХС (А), ТГ (Б) и ХС-ЛВП (В) крови, полученные двумя методами - энзиматическим (биохимическим) и методом МУРР.

Другой задачей исследования было сравнить результаты измерений концентраций общего ХС, ТГ и ХС-ЛВП крови, полученные с помощью метода "сухой химии" и методом МУРР. В таблице 3 представлены данные параллельных измерений концентраций общего ХС, ХС-ЛВП и ТГ крови двумя методами у 70 пациентов. Выявлена высокая положительная корреляция между измерениями концентраций общего ХС ($r=+0,91$, при $p<0,001$), ХС-ЛВП ($r=+0,79$, при $p<0,001$) и ТГ крови ($r=+0,94$, при $p<0,001$). Разница значений концентраций общего ХС, ХС-ЛВП и ТГ крови, измеренных методом МУРР, составила -2,5%, 2% и 8,1% соответственно в сравнении с методом "сухой химии". Данные, представленные в таблице 4,

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО И СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВОВ ЛИПОПРОТЕИНОВ

показывают, что в 74% случаев отклонение результатов измерения общего ХС методом МУРР в сравнении с методом "сухой химии" < 5%, а в 92% случаев - < 10%. Для ХС-ЛВП эти показатели составляют - 39% и 63% соответственно. В 48% случаев отклонение результатов измерения общих ТГ крови методом МУРР в сравнении с методом "сухой химии" < 10%, а в 85% случаев - < 20%. Таким образом, результаты измерения концентраций основных липидов крови, полученные с использованием МУРР и метода "сухой химии" также характеризуются высокой положительной корреляцией.

Таблица 2. Проценты отклонения данных измерений общего ХС, ТГ и ХС-ЛВП крови, полученных методом МУРР от данных биохимического энзиматического метода.

Процент отклонения	Общий ХС		Общие ТГ		ХС-ЛВП	
	Абсолют. Число	Относит. число, %	Абсолют. число	Относит. число, %	Абсолют. число	Относит. число, %
0-5%	58	57	30	29	51	50
5-10%	26	25	22	21	35	34
10-15%	8	8	15	15	6	6
15-20%	6	6	14	14	9	9
20-25%	4	4	5	5	1	1
>25%	0	0	16	16	0	0
Всего	102	100	102	100	102	100

Таблица 3. Сравнительные данные параллельных измерений концентраций общего ХС, ЛВП-ХС и ТГ сыворотки крови (мг/дл) двумя методами (методом "сухой химии" и методом МУРР) у 70 пациентов.

Статистические показатели	Метод "сухой химии"			Метод МУРР		
	ХС	ЛВП-ХС	ТГ	ХС	ЛВП-ХС	ТГ
М	254,3	53,4	162,7	248,1	54,5	177,1
М	24,4	11,0	50,3	25,1	11,7	53,7
σ	31,4	14,6	66,7	30,9	16,0	66,0
Разница в %				-2,5	2,0	8,1
r				+0,91	+0,79	+0,94

Для оценки воспроизводимости разработанного метода с использованием МУРР было проведено слепое исследование концентраций общего ХС, ТГ и ХС-ЛВП крови у 6 пациентов (сыворотку крови забирали в 2 пробирки). Выявлена высокая положительная корреляция между парными значениями общего ХС и ТГ крови ($r=+0,96$ и $+0,98$ при $p<0,0001$ соответственно). Средняя положительная корреляция показана между парными значениями ХС-ЛВП крови ($r=+0,58$ при $p<0,0001$). Средние проценты отклонений значений общего ХС, ХС-ЛВП и ТГ составили соответственно 4%, 12% и 6%. Таким образом, новый метод характеризуется высокой воспроизводимостью.

Новый метод позволяет также оценивать наиболее информативные липидные показатели - концентрации основных фракций и субфракций ЛП крови, а также содержание в них ХС, ТГ, ФЛ и величину отношения ХС/ТГ. В таблице 5 представлены результаты измерений концентраций ХС, ТГ, общих липидов и величины отношения ХС/ТГ в 5 субфракциях ЛОНП, ЛПП, 3 субфракциях ЛНП (большие легкие, средние и мелкие плотные частицы ЛНП) и 5 субфракциях ЛВП у одного пациента с уровнем ХС крови - 212,3 мг/дл, ТГ - 165,5 мг/дл и ХС-ЛВП - 60,8 мг/дл. Результаты измерения

показывают, что концентрации ХС и общих липидов возрастают от ЛОНП-1 к ЛНП-3 (т.е. с уменьшением размера частиц и с увеличением их плотности). С уменьшением размера и с увеличением плотности отдельно частиц ЛОНП и ЛНП в них также возрастает уровень ТГ. Отношение ХС/ТГ возрастает постепенно от ЛОНП-1 к ЛНП-3 и постепенно уменьшается от ЛВП-1 к ЛВП-5. Приведенные результаты измерения не противоречат данным мировой литературы. Графическое изображение данных измерения основных липидов в субфракциях ЛП представлено на рисунке 2.

Таблица 4. Проценты отклонения данных измерений общего ХС, ТГ и ХС-ЛВП крови, полученных методом МУРР и методом "сухой химии".

Процент отклонения	Общий ХС		Общие ТГ		ХС-ЛВП	
	Абсолют. число	Относит. число, %	Абсолют. число	Относит. число, %	Абсолют. число	Относит. число, %
0-5%	52	74	13	19	27	39
5-10%	12	18	20	29	17	24
10-15%	3	4	16	23	7	10
15-20%	1	1,5	10	14	9	13
20-25%	2	2,5	6	9	2	3
>25%	0	0	5	6	8	11
Всего	70	100	70	100	70	100

Таблица 5. Концентрации липидов в субфракциях липопротеинов крови одного пациента, определенные методом МУРР (мг/дл)

Липопротеины	ХС	ТГ	Общие липиды	ХС/ТГ
ЛОНП-1	0,28	2,61	3,39	0,11
ЛОНП-2	1,15	6,57	9,57	0,17
ЛОНП-3	2,96	10,34	17,77	0,29
ЛОНП-4	4,19	10,84	21,11	0,39
ЛОНП-5	6,17	11,45	26,22	0,54
ЛПП	10,64	11,87	36,59	0,9
ЛНП-1	10,59	6,54	30,59	1,62
ЛНП-2	26,99	9,16	69,76	2,95
ЛНП-3	52,95	13,81	134,0	3,83
ЛВП-1	4,15	1,31	12,86	3,17
ЛВП-2	29,78	10,85	106,4	2,74
ЛВП-3	17,31	7,21	70,27	2,4
ЛВП-4	0,85	0,41	3,98	2,1
ЛВП-5	1,82	1,12	10,57	1,62

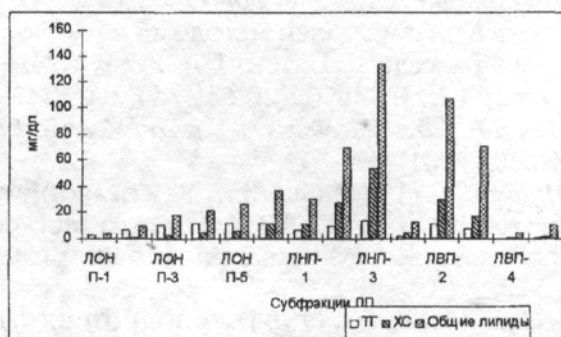


Рисунок 2.

Распределение концентраций ХС, ТГ и общих липидов (по оси ординат) по отдельным субфракциям ЛП крови одного пациента. Данные метода МУРР.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО И СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВОВ ЛИПОПРОТЕИНОВ

Разработанный новый метод имеет ряд преимуществ перед существующими методами оценки субфракционного состава липопротеинов крови. Он отличается экспрессностью (20 мин на 1 анализ), простотой реализации, использованием всего одного реактива (вещества-контрастера типа сахарозы), высокой точностью и разрешающей способностью; для анализа требуется 50 мкл сыворотки крови.

Мы полагаем, что исследование субфракционного состава ЛП сыворотки крови с помощью нового метода имеет важное значение для понимания патогенетических механизмов развития атеросклероза и предшествующих ему дислипидотемий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson KM, Castelli WP, Levy D.* (1987) *J. Am. Med. Assoc.* 257, 2176-2180.
2. *Климов АН, Никульчева НГ.* (1995) Липиды, липопротеины и атеросклероз. Санкт-Петербург, Питер Пресс, 185-226.
3. *Havel RJ.* (1990) *Circulation.*, 82, 694-696.
4. *Freedman D.S., Croft J., Anderson AJ. et al.* (1994) *Epidemiology*, 5, 80-87.
5. *Chapman MJ, Laplaud P.M., Luc G. et al.* (1988) *J. Lipid Res.*, 29, 442-458.
6. *Otvos JD., Jeyarajah EJ., Bennett D.W.* (1996) *J. Clinical ligand assay*, 19, 184-189.
7. *Campos H., Blijlevens E., McNamara JR. et al.* (1992) *Arterioscler Thromb.*, 12, 1410-1419.
8. *Krauss RM.* (1991) *Curr. Opin. Lipidol.*, 2, 248-252.
9. *Austin MA, Breslow JL, Hermekers C.H. et al.* (1988) *JAMA*, 260, 1917-1921.
10. *Никитин Ю.П., Душкин М.И., Рагино Ю.И.* (1998) *Кардиология*, 10, 48-52.
11. *Williams P.T., Krauss RM., Vranizun KM. et al.* (1992) *Arterioscler. Thromb.*, 12, 332-340.
12. *Otvos JD., Jeyarajah EJ., Bennett D.W., Krauss RM.* (1992) *Clin. Chem.*, 38, 1632-1638.
13. *Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Панин Л.Е., Никитин Ю.П.* (1998) *Биол. мемб.*, 4, 420-432.
14. *Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Панин Л.Е., Никитин Ю.П.* (1998) *Вестник РАМН*, №3, 42-47.
15. *Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Анисимова Т.И., Галимов Р.В.* Способ анализа липопротеинов в плазме или сыворотке крови методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Патент РФ №2115121. МКИ G01N 33/49. Приоритет от 03.04.97г. Оpubл. 10.07.97г. Бюл. №19.
16. *Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Мистюрин Ю.Н.* Способ анализа липопротеинов в плазме крови методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Патент РФ №2099693. МКИ G01N 33/53. Приоритет от 22.12.93г. Оpubл. 20.12.97г. Бюл. №35.
17. *Tardieu A., Mateu L., Sardet C., Weiss B., Luzzati V., Aggerbeck L., Scarni A.M.* (1976) *J. Mol. Biol.*, 101, 129-153.
18. *Laggner P., Muller KW.* (1978) *Quarterly Rev. of Biophys.*, 11, 371-425.
19. *Mills G.L., Lane PA., Weech P.K.* (1984) *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. A guidebook to lipoprotein technique.* Elsevier, 14, 512.
20. *Климов АН, Никульчева НГ.* (1984) Липопротеиды, дислипидотемии и атеросклероз. Л: Медицина. С. 1-168.
21. *Gotto AM., Pownall HJ., Havel RJ.* (1986) *Methods in Enzymology*, 128, 3-122.

22. *Bellamy M.F., Nealis A.S., Aitken J.W., Bruckdorfer K.R., Perkins S.J.* (1989) Eur. J. Biochem., 183, 321-329.
23. *Shen B., Scanni A.M., Kezdy F.J.* (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 837-841.
24. *Гилл Ф., Мюррей У., Райм М.* (1985) Практическая оптимизация. М.: Мир;
25. *Свергун Д.И., Фейгин Л.А.* (1986) Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука.

Поступила 27.03.00.

DETERMINATION OF FRACTIONAL AND SUBFRACTIONAL COMPOSITIONS OF BLOOD LIPOPROTEINS BY SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING METHOD. THE COMPARISON WITH THE BIOCHEMICAL METHOD.

***F.V. Tuzikov², YU.I. Ragino¹, N.A. Tuzikova², M.V. Ivanova¹,
R.V. Galimov², YU.P. Nikitin¹***

1 - Institute of Internal Medicine SB RAMS, Novosibirsk;

2 - Institute of Molecular biology RSC of virusology and biotechnology "Vektor",
Koltovo, Novosibirsk region

Highly accurate and fast method for determination of quantitative and qualitative compositions of serum lipoprotein (LP) fractions and subfractions, using small-angle X-ray scattering on the "Siemens" diffractometer, has been developed. The method allows to determine the concentrations of serum cholesterol (CH), triglycerides (TG), high-density lipoprotein (HDL)-CH, low-density lipoprotein (LDL)-CH, phospholipides (FL) and total lipids. It allows to determine the levels of CH, TG, FL in LP subfractions and concentrations of 5 very-low-density lipoprotein, intermedius-density lipoprotein, 3 LDL (large, intermedius and small dense particles) and 5 HDL subfractions. The method is based on the elaborated united model of all LP fractions and subfractions as a result of generalization and analysis of literature data about LP composition and size. New method was proved to be highly reproductive. Strong positive correlation exists between serum levels of CH, TG, HDL-CH determined by enzymatic biochemical and our methods. The method is simple to perform and of high diagnostic value, and can, therefore, be applied to clinical purposes.

Key words: small-angle X-ray scattering, lipoproteins composition, fractions and subfractions, cholesterol, triglycerides

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Известно, что ЛП представляют собой компактные сферические образования с гидрофильной оболочкой из апопротеинов, фосфолипидов (ФЛ), свободного ХС и гидрофобным ядром из ТГ и эфиров холестерина (ЭХС) [2, 17-23]. Показано, что гидрофильная оболочка у всех классов ЛП имеет близкую к постоянной толщину 20 : 22 Å [17-18]. В работе [23] была сделана попытка предложить обобщенную модель строения человеческих ЛП на основании данных об их компонентном составе, т.е. долях ТГ, ФЛ, ХС и апопротеинов, приходящихся на ЛП каждого класса от липопротеинов очень высокой плотности (ЛОВП) до хиломикронов (ХМ) их связи с размерами ЛП. Однако с 1977 года многократно увеличилось число работ с уточненными данными о компонентном составе ЛП отдельных классов, подклассов и их размерах. Анализ накопившихся к настоящему времени литературных данных о весовых долях ТГ, ФЛ, ЭХС, ХС и апопротеинов в ЛОВП, ЛВП₃, ЛВП₂, ЛНП, липопротеинах промежуточной плотности (ЛПП), ЛОНП, ХМ и их размерах [2, 17-23] позволил нам развить общую математическую модель строения ЛП всех классов и подклассов, пригодную для использования в разрабатываемой нами новой методике.

Сущность этой модели следующая. Поскольку плотности (*) вещественных компонентов ЛП существенно отличаются, то для связи компонентного состава с размером и структурой этих частиц удобнее использовать не весовые (массовые), а их объемные доли (D):

$$D_i = D_{i0} / A, A = \sum D_{i0} / (100 \cdot \rho_i),$$

где $\sum D_i = \sum D_{i0} = 100\%$, $i = 1, \dots, 5$; D_{i0} , D_i - весовая и объемная доли i -й компоненты (в %) ЛП соответственно; ρ_i - плотности компонент: 0,922 (ТГ), 0,95 (ЭХС); 1,04 (ХС); 1,01 (ФЛ); 1,27 г/см³ (белок - (БК)).

Можно показать что если R - внешний радиус частиц ЛП; t_0 - толщина гидрофильной оболочки ЛП, состоящий из БК, ФЛ и ХС, а r - радиус гидрофобного ядра ЛП из ТГ и ЭХС, то

$$R = t_0 \cdot 100 / (100 - (D_{ТГ} + D_{ЭХС}))^{1/3}$$

Анализ зависимостей $D_i(R)$, полученных из литературных данных [2, 17-23] о компонентном составе субфракций ЛП, показал, что определенные сочетания объемных долей хорошо описываются рядом простых эмпирических зависимостей регрессионного вида. Используя процедуры оптимизации [24] для системы уравнений регрессии, были получены уравнения с оптимальными значениями коэффициентов:

$$\begin{aligned} D_{БК+ФЛ}(x) &= 285,186 - 53,134 \cdot x; \quad D_{БК}(x) = 218,636 - 43,778 \cdot x; \\ D_{ХС+ЭХС}(x) &= -174,181 + 49,031 \cdot x, \quad \text{где } x = \ln(R), \quad x = 3,6 + x_0; \quad (1) \\ \ln(D_{БК+ФЛ}(x)) &= 7,628 - 0,8548 \cdot x; \quad \ln(D_{БК}(x)) = 9,0 - 1,3444 \cdot x; \\ \ln(D_{БК+ФЛ}(x)) &= 10,6 - 1,4349 \cdot x, \quad \text{где } x = x_0 + 6,8. \end{aligned}$$

Таким образом, общее строение частиц ЛП можно описать шестью двухпараметрическими уравнениями с граничной точкой ($x_0 = 4,6254$) по R , соответствующей 102 Å ($\exp(x_0)$), и постоянной по толщине гидрофильной оболочкой, близкой к 21 Å. Численные значения объемных долей каждого из компонентов ЛП можно получить из (1) в виде дополнительных уравнений:

$$\begin{aligned} D_{ТГ}(R) &= 100 - D_{БК+ФЛ}(R) - D_{ХС+ЭХС}(R); \\ D_{ЭХС}(R) &= 100 \cdot (R - t_0)^3 / R^3 - D_{ТГ}(R); \\ D_{ХС}(R) &= D_{ХС+ЭХС}(R) - D_{ЭХС}(R); \\ D_{ФЛ}(R) &= D_{БК+ФЛ}(R) - D_{БК}(R), \end{aligned}$$

где $R = \exp(x)$ и значения $D_{БК+ФЛ}(x)$, $D_{БК}(x)$ и $D_{ХС+ЭХС}(x)$ при $x \geq x_0$ также предварительно экспонируются.

В работах [13-16] нами была описана методика определения

фракционного состава ЛП на основе метода МУРР в прямой шкале размеров (R) и концентраций суммарных липидов во фракциях ЛП. Теперь, имея математическую модель общего строения частиц ЛП от ЛОВП до ХМ включительно, можно развить эту методику до определения всех основных липидов во фракциях и субфракциях ЛП и даже белковый компонент. Ранее для моделирования рентгенограмм МУРР нами использовались однородные по плотности сферические частицы как модели липидных ядер ЛП. Однако известно, что более точной моделью частиц ЛП является двухступенчатая по электронной плотности сферическая частица, в которой центральное ядро будет определяться средней плотностью (ρ_1) компонентов ТГ и ЭХС:

$$\rho_1 = c_1 \cdot \rho_{ТГ} + c_2 \cdot \rho_{ЭХС},$$

$$\text{где } c_1 = D_{ТГ}(R)/A_1; c_2 = D_{ЭХС}(R)/A_1; A_1 = D_{ТГ}(R) + D_{ЭХС}(R),$$

а оболочка толщиной t_0 будет иметь среднюю плотность компонентов ХС, ФЛ, БК [17, 18]. Для определения фракционного состава ЛП по данным МУРР используется введение в анализируемые образцы плазм и сывороток рентгеноконтрастного вещества [13-16] для создания в образцах плотности 1,27 г/см³. Тогда рассеяния от свободных белков плазмы крови можно не учитывать, а средняя плотность (ρ_2) гидрофильных оболочек ЛП будет:

$$\rho_2 = c_3 \cdot \rho_{ХС} + c_4 \cdot \rho_{ФЛ} + c_5 \cdot \rho_{БК}, \text{ где}$$

$$c_3 = D_{ХС}(R)/A_2; A_2 = D_{ХС}(R) + D_{ФЛ}(R) + D_{БК}(R);$$

$$c_4 = D_{ФЛ}(R)/A_2; c_5 = D_{БК}(R)/A_2.$$

Очевидно, что радиус липидного ядра (r) ЛП можно определить как: $r = R - t_0$. Если ρ_1, ρ_2 - средние электронные плотности липидного ядра и гидрофильной оболочки ЛП соответственно, а $\rho_0 = 1,27$ г/см³ (плотность растворителя - буфера), то интенсивность МУРР ($I(h)$) от сферической частицы с двумя уровнями плотности (в трехфазной системе) будет определяться из выражения [25]:

$$I(h) = [(r_2 - \rho_0) \cdot V_2 j(hR) + (\rho_1 - \rho_2) \cdot V_1 j(hr)]^2,$$

где $h = 4 \cdot \pi \cdot \sin(\Theta)/\lambda$, 2Θ - угол рассеяния; V_1, V_2 - объемы, а $j(hr), j(hR)$ - амплитуды рентгеновского рассеяния от однородных сфер с радиусами r и R соответственно [25].

Развитая в данной работе методология была использована для определения фракционного, субфракционного и липидного состава ЛП в образцах сывороток крови людей. Границы интервалов фракций и субфракций ЛП по шкале R использовали как в работах [6, 12]: ЛВП₁ (38 ± 1,0 А); ЛВП₂ (40 ± 1,0 А); ЛВП₃ (43 ± 1,5 А); ЛВП₄ (47 ± 3,0 А); ЛВП₅ (55 ± 7,5 А); ЛНП₁ (95 ± 3,5 А); ЛНП₂ (102 ± 3,5 А); ЛНП₃ (110 ± 3,5 А); ЛНП₄ (125 ± 10 А); ЛОНП₁ (145 ± 10 А); ЛОНП₂ (165 ± 10 А); ЛОНП₃ (190 ± 15 А); ЛОНП₄ (250 ± 50 А); ЛОНП₅ (350 ± 50 А). При сравнении результатов анализов, получаемых методом МУРР, значения концентраций ЭХС пересчитывали в концентрации ХС в соответствии с их молекулярными массами (650 и 387).