Выбор метода для определения концентрации холестерина липопротеидов высокой плотности

М.Г. Творогова

Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва

В статье кратко описаны достоинства и недостатки многочисленных методов, используемых в практике для определения ХС ЛПВП. Рассмотрены основные группы новых прямых или гомогенных методов определения ХС ЛПВП. Отмечено, что несовпадение значений ХС ЛПВП, полученные разными методами, в основном обусловлено двумя причинами: способом выделения ЛПВП и особенностями строения и состава частиц ЛПВП пациента.

Многочисленные проспективные эпидемиологические исследования показали достоверную и независимую отрицательную взаимосвязь между уровнем холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) и частотой ишемической болезни сердца [10]. В этой связи при разработке программ по первичной и вторичной профилактике ИБС уделяется особое внимание уровню ХС ЛПВП пациента. В докладе Национальной образовательной программы по холестерину (США) уровень ХС ЛПВП < 40 мг/дл назван фактором риска ИБС, а уровень ХС ЛПВП ⩾ 60 мг/дл — отрицательным фактором риска [8]. В докладе Европейского общества по изучению атеросклероза концентрация ХС ЛПВП < 1,0 ммоль/л считается маркером увеличения риска ИБС [17]. Определение ХС ЛПВП, наряду с определением ХС и триглицеридов, рекомендовано проводить всему населению, начиная с 20-летних, по меньшей мере один раз в 5 лет.

Липопротеиды высокой плотности впервые идентифицированы как отдельный класс ЛП при аналитическом ультрацентрифугировании плазмы крови [9]. За последние десятилетия определен липидный и белковый состав ЛПВП, получено множество экспериментальных данных о возможных механизмах антиатерогенной роли ЛПВП. Эти сведения подробно рассмотрены нами ранее [3, 4].

В клинической биохимии уровень ЛПВП в плазме крови обычно оценивают по содержанию в них ХС. Для выделения ЛП можно использовать многочисленные методические подходы [2, 15]. Препаративное выделение при последовательном ультрацентрифугировании в солевых растворах различных плотностей, соответствующих границам гидратированной плотности выделяемых ЛП, позволяет изолировать ЛПВП и определить их состав. Длительность и трудоемкость ультрацентрифугирования привела к разработке методов, более доступных для лабораторной практики. Для выделения ЛПВП в клинических лабораториях были разработаны преципитационные методы, которые выполняются в несколько этапов. Первый — осаждение ЛП, содержащих апоВ, при использовании преципитирующих агентов, второй — центрифугирование для разделения осадка и надосадочной жидкости (супернатанта), третий — определение ХС в супернатанте — ХС ЛПВП.

Исследования доказали идентичность концентрации ХС во фракции ЛПВП, выделенной ультрацентрифугированием или преципитационными методами с использованием различных агентов (полиэтиленгликоль, декстран-сульфат, фосфовольфрамовая кислота и др.), за исключением смеси гепарин:хлористый марганец [7, 12]. Последний метод не позволял полностью преципитировать апоВ, особенно при высоком уровне триглицеридов в крови. Определение специфичности при преципитации ЛП, содержащих апо В, смесью фосфовольфрамовой кислоты и хлористого магния показало, что в супернатанте присутствуют 95% радиоактивно меченого апоА-I и практически отсутствует апоВ [5]. Тем не менее, этапы выделения ЛПВП методом преципитации (осаждение, центрифугирование) препятствуют полной автоматизации процесса и способствуют увеличению аналитической вариабельности.

В настоящее время разработаны «прямые» или гомогенные методы определения ХС ЛПВП. В ходе таких методов изоляция других классов ЛП не требует дополнительных операций, и концентрацию ХС ЛПВП можно определить напрямую в сыворот-

ке или плазме крови общеприятыми ферментативными методами с использованием холестеролэстеразы, холестеролоксидазы и хромогенов.

Можно выделить несколько групп методов «прямого» определения ХС ЛПВП, различающихся по способу изоляции ЛП, содержащих апоВ — липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикронов (ХМ).

1. При нейтральном pH в присутствии $MgCL_2$ сульфатированный альфа-циклодекстрин и декстран-сульфат образуют водорастворимые комплексы с ЛПНП, ЛПОНП и ХМ. Образованные комплексы не способны реагировать с ферментами, модифицированными полиэтиленгликолем (ПЭГ). Поскольку частицы ЛПВП не включены в названные комплексы, ХС ЛПВП взаимодействует с ферментами, соединенными с ПЭГ — холестеролоксидазой и холестеролэстеразой, — и системой хромогенов.

2. Синтетические полимеры и полианионы адсорбируются на поверхность ЛПНП, ЛПОНП и ХМ и превращают эти ЛП в стабильные комплексы, недоступные для реакции. Далее детергент удаляет небольшое количество полимеров, обратимо связанных с ЛПВП, и ХС этого класса ЛП вступает в реакцию с ферментами и хромогенами, что позволяет определить концентрацию ХС только в ЛПВП.

3. Иммунопреципитация — антитела к апоВ человека реагируют со всеми классами ЛП, кроме ЛПВП — ЛПНП, ЛПОНП и ХМ. Образованные комплексы не вступают в ферментативные реакции определения ХС, и т.о. в результате названных реакций измеряют содержание ХС только во фракции ЛПВП.

4. На первой стадии холестеролэстераза и холестерооксидаза воздействует на ХС всех ЛП (ЛПНП, ЛПОНП и ХМ), кроме ЛПВП. H_20_2, образованная в результате окисления ХС, разрушается под действием каталазы. На второй стадии концентрацию ХС ЛПВП измеряют ферментативным методом с участием хромогенов.

Проведенные исследования показали, что все предложенные «прямые» методы определения ХС ЛПВП обладают высокой чувствительностью и специфичностью, линейностью в необходимых пределах, прекрасной воспроизводимостью [6, 11, 13]. Результаты определения незначительно подвержены влиянию повышенной концентрации гемоглобина, билирубина и триглицеридов. Однако при использовании ряда методов отмечают влияние на результаты диспротеинемий и парапротеинемий [13].

Согласно рекомендациям Национальной образовательной программы по холестерину, метод определения ХС ЛПВП должен удовлетворять определенным критериям правильности и воспроизводимости [16]. При значениях ХС ЛПВП $\geqslant$ 1,09 ммоль/л коэффициент вариации (КВан) между сериями (случайная ошибка) должен быть $\leqslant$ 4%; среднее отклонение от значений ХС ЛПВП, выполненных референсным методом (систематическая ошибка, Ос), не должно превышать 5%. Систематическая ошибка рассчитывается на основании уравнения линейной регрессии: ось X — данные, полученные референсным методом, ось Y — данные, полученные методом, которым обычно работает лаборатория. Общая ошибка (Ооб) при измерениях, рассчитываемая как сумма систематической и случайной ошибок, Ооб = 1,96х КВан + Ос, должна быть $\leqslant$ 13%.

Данные о величине общей ошибки при определении ХС ЛПВП прямыми и преципитационными методами неоднозначны [6,11,13]. Если по воспроизводимости определения практически все методы удовлетворяют заданным критериям, то при оценке правильности определения получены различные, в некоторых случаях противоположные данные. Таким образом, все методы определения ХС ЛПВП имеют свои недостатки. Референсные методы, включающие ультрацентрифугирование и определение ХС химическими методами, слишком трудоемки для рутинного использования. Преципитационные методы увеличивают вероятность случайных ошибок. Прямые методы в ряде случаев представляют данные, имеющие систематическую ошибку.

Значения ХС ЛПВП, полученные «прямыми» методами, достоверно и высокозначимо коррелируют со значениями ХС, определенными во фракции ЛПВП, выделенной ультрацентрифугированием или при использовании преципитации для удаления ЛП, содержащих апоВ. В то же время, в некоторых случаях несмотря на достоверную корреляцию, в уравнении регресии, описывающем связь значений, полученных разными методами, коэффициент наклона кривой достоверно отличается от единицы, а значение смещения достоверно отличается от нуля [13]. Это означает, что значения ХС ЛПВП, полученные разными методами, могут быть различными.

Одной из причин несовпадения значений может быть способ выделения ЛПВП. Например, хотя применение последовательного ультрацентрифугирования позволяет точно выделить частицы соответствующей плотности, деление ЛП по плотности иногда может не соответствовать белковому составу ЛП, разделению их на апоВ- и апоА-ЛП; ультрацентрифугирование вызывает денатурацию белков и потерю некоторых элементов ЛПВП [2, 14]. Более того, А.Н. Климов полагает, что выделенные классы ЛП «отражают не только то, что представляют собой ЛП плазмы, взятой для анализа, но и то, что произошло с ними при длительном многочасовом ультрацентрифугировании в концентрированном

солевом растворе при заданной величине плотности» [1].

Другой причиной несовпадения уровня ХС ЛПВП, определенных разными методами, могут быть особенности строения и состава ЛПВП у отдельных пациентов. Изменения состава ЛПВП отмечены при болезнях печени, алкоголизме, некоторых наследственных болезнях [2]. Хотя известно, что при электрофорезе ЛПВП обладают альфа-подвижностью, значительная подфракция апоА-I обнаружена в частицах с пре-бета подвижностью [14]. Установлено, что последовательное ультрацентрифугирование не позволяет выделить пре-бета ЛПВП. Эта подфракция, отличающаяся по структуре и свойствам от альфа-ЛПВП, может составлять до 10 и более процентов всей фракции ЛПВП. При ряде распространенных заболеваний, в том числе диабете, ИБС, гипертонической болезни, соотношение основных подфракций ЛПВП — ЛПВП2 и ЛПВП3 — отличается от такового у здоровых лиц [2,14].

Таким образом, сопоставимость средних значений ХС ЛПВП, полученные разными методами, подтвержденная высокозначимой достоверной корреляционной зависимостью, совершенно не означает, что у каждого пациента разными методами будут получены идентичные значения ХС ЛПВП. Можно полагать, что описанное несовпадение значений в основном обусловлено двумя причинами: способом выделения ЛПВП и особенностями строения и состава частиц ЛПВП пациента. В этой связи при выборе метода для определения ХС ЛПВП, руководствуясь задачами исследования, следует учесть все достоинства и недостатки предлагаемых методов и 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.

Литература

1. А.Н. Климов. Липопротеиды плазмы крови: некоторые нерешенные и дискуссионные вопросы.// Тезисы докладов YI симпозиума по биохимии липидов.– С-Пб.– 1994. С.3-11.
2. Климов А., Никульчева Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения.– С-Пб: «Питер», 1999.– 512 с.
3. Творогова М.Г. Обратный транспорт холестерина.// Кардиология. -2001.– N2.– С.66-72.
4. Творогова М.Г. Лабораторная диагностика нарушений липидного обмена.//Лабораторная медицина.– 2001.– N 4.– С.67-74.
5. Assman G., Schriewer H., Schopohl B. et al. Investigation of the specificity of the HDL-cholesterol test. // Lipoproteins and coronary heart disease. Ed. Greten H., Lang P., Schettler G.– Gerhard Witzstrock Publishing House. – 1980.– N.Y.– Baden-Baden– Cologne.
6. Cobbart C., Mulder P., Baadenhuijensen H. et al.// Survey of total error of precipitation and homogenous HDL-cholesterol methods and simultaneous evaluation of lyophilized saccharose-containing candidate reference materials for HDL-cholesterol.
7. Demacker P., Hessels M., Toenhake H. et al. Precipitation methods for high-density lipoprotein cholesterol measurement compared, and final evaluation under routine operating conditions of a method with a low-to-reagent ratio.// Clin. Chem.– 1997.– V.43.– P.663-668.
8. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholestrol in adults/ Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholestrol in adults (Adult Treatment Panel III) // JAMA. 2001.– V.285. P.2486-97.
9. Gofman J., Lindgren F., Elliot H. et al. The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis// Science.– 1950.– v.111.– p. 166-177.
10. Illingworth D., Durrington P. Dyslipidemia and atherosclerosis: how much more evidence do we need? Curr. Opin. Lipidol.– 1999.– V.10.– P.383-386.
11. De Keijzer M., Elbers H., Baadenhuijsen H. et al. Evaluation of five different high-density lipoprotein cholesterol assays: the most precise are not the most accurate.//Ann. Clin. Biochem. -1999.– V/ 36.– P. 168-175.
12. Kostner G., Avogaro P., Bittolo Bon G. et al. Determination of high density lipoproteins: screening methods compared // Clin. Chem.– 1979.– V.25.– P.939-942.
13. Nauck M., Graziani M., Jarausch J. et al. A new liquid homogenous assay for HDL-cholesterol determination evaluated in seven laboratories in Europe and the United States.// Clin.Chem.Lab.Med.– 1999.– V. 37.– P.1067-1076.
14. Tall A., Breslow J. Plasma high density lipoproteins and atherogenesis.// Atherosclerosis and coronary artery disease. -Ed. by Fuster V., Ross R., Topol E.-1996.– Lippincott-Raven Press Publishers.– Philadelphia. P.105-127.
15. Warnick G., Nauck M., Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogenous assays.//Clin.Chem.– 2001.– v.47.– P.1579-1596.
16. Warnick G., Wood P. For the National Cholesterol Education Program Working Groop on Lipoprotein Measurement. National Cholesterol Education Program Recomendations for Measurement of high density lipoprotein cholesterol: executive summary. //Clin. Chem.– 1995.– V. 41.– P. 1427-1433.
17. Wood D., De Backer G., Faergeman O. et al. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Second Joint Task Force of European and other societies on coronary prevention // Eur. Heart J.– 1998.– V.19.– P.1434-1503.