

Н. Л. АСЛАНЯН, В. М. ШУХЯН, М. А. КАЙФАДЖЯН, К. Л. АМБАРՇՄՅԱՆ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИИ (КЛАССОВ) ЛИПОПРОТЕИДОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Описывается метод разделения фракций липопротеидов электрофорезом в полиакриламидном геле. Разделение фракций альфа-, бета-, пребета-липопротеидов и хиломикронов основано на различной пористости геля-разделителя (мелкопористого) и геля-распределителя (крупнопористого), а также обусловлено величиной электрического заряда отдельных фракций. Окрашивание фракций липопротеидов осуществляется раствором судана черного Б в этиленгликоле, смешиваемым с сывороткой до начала электрофореза. Количественное определение фракций проводится денситометрированием. Результаты исследований показали, что у здоровых лиц выявляются фракции альфа- и бета-липопротеидов, а почти в половине случаев и пребета-липопротеидов. Количественное соотношение фракций определялось как процент от суммы экстинкций всех фракций.

Липопротеиды отличаются друг от друга по размерам молекул, плотности и содержанию компонентов: белков, триглицеридов, холестерина, фосфолипидов. Плотность липопротеидов уменьшается параллельно увеличению в них содержания липидов и увеличивается с нарастанием в них процента белка. Липопротеиды отличаются друг от друга также по величине электрического заряда [1, 3, 4].

Разделение липопротеидов на классы методом аналитического ультрацентрифугирования связано с применением дорогостоящей аппаратуры и в клинических исследованиях широко не применяется. В настоящее время большинство исследователей [6, 11, 13] используют метод электрофореза в полиакриламидном геле для изучения липопротеидов [2, 14]. Однако вопрос количественного определения фракций липопротеидов и применимости этого метода для широкого клинического внедрения остается пока не решенным.

В описанном нами методе применялась с некоторой модификацией рецептура, приведенная Найто и соавторами [12] для приготовления гелей. Электрофорез проводили в приборе для электрофореза в полиакриламидном геле, используя набор реактивов фирмы «Реанал» модель 69, Венгрия. Денситометрирование осуществляли денситометром БИАН-170, состоящим из денситометрической приставки (модель 781), измерителя БИАН-100 (модель 771) и кимографа БИАН-110 (модель 775).

РЕАКТИВЫ. Основные растворы хранят в холодильнике при 4°C и используют в течение трех месяцев за исключением персульфата аммония, раствор которого нуждается в обновлении каждые три недели.

Раствор I. Растворяют 36,6 г трис (2-амино-2-гидроксиметил)-1,3-пропандиол и 0,46 мл ТЭМЭД (N, N, N', N' -тетраметилэтилендиамин) в 48 мл 1 моль/л раствора соляной кислоты, доводят дистиллированной водой в 100-миллилитровой мерной колбе приблизительно до 98 мл. рН раствора должен равняться 8,9. При необходимости можно корригировать 1 моль/л раствором соляной кислоты, после чего объем раствора доводят до 100 мл дистиллированной водой.

Раствор II. Растворяют 5,98 г трис и 2,3 мл ТЭМЭД в 48 мл 1 моль/л раствора соляной кислоты, доводят дистиллированной водой в мерной колбе приблизительно до 98 мл. рН раствора должен равняться 6,6, в противном случае его следует поправить 1 моль/л раствором соляной кислоты, после чего объем раствора доводят до 100 мл дистиллированной водой.

Раствор III. Растворяют 9,6 г акриламида и 0,252 г N, N' -метилена-бис-акриламида в дистиллированной воде и объем раствора доводят до 100 мл в мерной колбе.

Раствор IV. Растворяют 10,0 г акриламида и 2,5 г N, N' -метилена-бис-акриламида в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 100 мл в мерной колбе.

Раствор V. Растворяют 4 мг рибофлавина в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 2000 мл в мерной колбе.

Раствор VI. Растворяют 4 мг рибофлавина в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 100 мл в мерной колбе [9].

Раствор VII. Растворяют 140 мг аммония надсернокислого (персульфата аммония $(NH_4)_2S_2O_8$) в дистиллированной воде и объем раствора доводят до 100 мл в мерной колбе.

Раствор VIII. Растворяют 10 мг судана черного Б в 10 мл этиленгликоля. Этот раствор готовят за две недели до его использования, фильтруют и хранят в темноте.

Раствор IX (основной буферный раствор). Растворяют 4,0 г трис и 19,2 г глицина в дистиллированной воде и объем раствора доводят до 1 л. рН раствора должен равняться 8,4.

Рабочие растворы. Перед опытом готовят следующие растворы. А. Гель-разделитель (сеперейшэн)—36,0 г/л. Для его приготовления смешивают одну часть основного раствора I, три части раствора III и четыре части раствора VII. Б. Гель-распределитель (спейсэр)—25 г/л. Для его приготовления смешивают одну часть раствора II, две части раствора IV, пять частей раствора V. В. Гель-образец (сэмпл)—32,8 г/л. Для его приготовления смешивают одну часть раствора II, две части раствора IV, 0,7 частей раствора VI и 2,4 части рабочего раствора судана черного Б. Рабочий раствор судана черного Б готовят путем смешивания 2,5 частей основного раствора судана (раствор VIII) и 7,5 частей этиленгликоля. Г. Рабочий раствор буфера. Для его приготовления основной раствор (раствор IX) разбавляют в 10 раз.

Ход определения. В каждую стеклянную трубочку вносят по 2,0 мл гель-разделителя и настилают по 0,2 мл дистиллированной воды, после чего оставляют при комнатной температуре в естественном

освещении для полимеризации. Обычно полная полимеризация происходит в течение 15 мин. После полимеризации удаляют слой воды и добавляют по 0,2 мл гель-распределителя и наслаивают по 0,2 мл дистиллированной воды. При комнатном освещении естественным светом полимеризация длится около 20—25 мин. После полимеризации гель-распределителя удаляют слой воды и добавляют по 0,3 мл гель-образца, для приготовления которого смешивают (для каждой пары параллельных трубочек) в пробирке 0,1 мл основного раствора II, 0,2 мл раствора IV, 0,07 мл раствора VI, 0,18 мл этиленгликоля, 0,06 мл рабочего раствора судана черного Б и 0,2 мл исследуемой сыворотки. После внесения гель-образца доливают рабочий раствор буфера до верхнего конца трубочки.

Преципитация краски в гель-образце указывает на нечистоту стеклянных трубочек и загрязнение раствора краски. В таких случаях гель-образец должен быть приготовлен заново. После полимеризации гель-образца, которая осуществляется лампой дневного света ЛД-20 с мощностью в 20 ватт в течение 60 мин, трубочки помещают в электрофоретическую камеру, закрепляют и в верхнюю и нижнюю камеры наливают по 1 л рабочего буферного раствора. Электрофорез проводят силой тока в 4 ма на каждую трубочку в течение 30—40 мин и с последующим увеличением силы тока до 8 ма на каждую трубочку в течение 30—40 мин. В качестве источника питания нами использован блок питания (выпрямитель стабилизированного напряжения) от аппарата ЭФА-1 (производство завода физических приборов г. Фрунзе), который обеспечивает регулирование выходного напряжения от 100 до 900 вольт с наибольшим током 50 ма.

При вышеописанных условиях электрофореза пробег фракции альфа-липопротеидов соответствует расстоянию 3,5—5 см, считая от верхней границы гель-образца (сэмпл). Окраска фракции при использовании приведенной нами рецептуры стабильна в течение 3—5 часов.

Извлечение из трубочки окрашенного геля производят следующим образом. С помощью наполненного дистиллированной водой 10-миллилитрового шприца с длинной иглой под давлением струи воды постепенно отделяют от стенок трубочки вначале гель-образец, затем гель-распределитель. При этом гель легко удаляется из трубки целиком и без повреждения, благодаря образовавшемуся между поверхностями геля и стенкой трубочки водяному слою. Сразу же после извлечения геля из трубочки проводят денситометрирование. Необходимо отметить, что каретка денситометра БИАН-170 не предусмотрена для работы с гелем. Поэтому при денситометрировании необходимо прижимать гель пластинками к каретке. Учитывая указанное обстоятельство, нами было изменено устройство каретки с приспособлением ее для денситометрирования гелей без вынимания их из стеклянных трубок. В настоящее время нами применяется именно этот способ денситометрирования гелей как наиболее удобный и точный, так как повышается воспроизводимость метода, предотвращается искажение гелей, создается возможность повторного денситометрирования.

Описанным методом нами обнаружены четыре фракции липопротеидов: альфа-, пребета-, бета-липопротеиды и хиломикроны. У здоровых лиц обнаружены в основном альфа- и бета-липопротеиды, а нередко и пребета-липопротеиды (рис. 1, 2). У обследованных нами больных также были обнаружены указанные три фракции, выявляемые у здоровых лиц, но их количественное соотношение было изменено. Хиломикроны были обнаружены в основном при взятии крови после приема пищи и редко у больных с инфарктом миокарда.

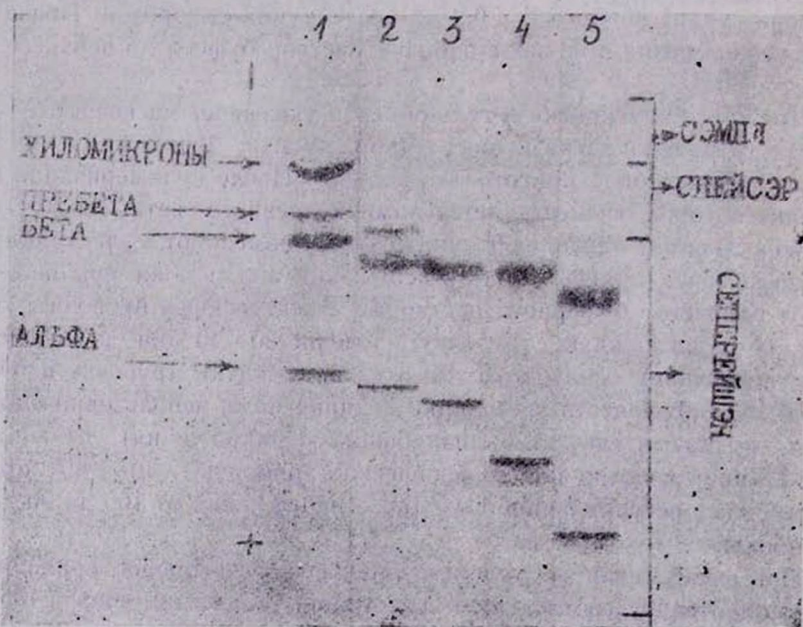


Рис. 1. Фракции липопротеидов, полученные методом электрофореза в полиакриламидном геле. 1—сыворотка больного с инфарктом миокарда. Выявляются хиломикроны и повышенное содержание бета- и пребета-липопротеидов. Ниже фракции альфа-липопротеидов и между фракциями альфа- и бета-липопротеидов дополнительные полосы желтовато-коричневатого оттенка. 2—сыворотка больного с атеросклеротическим кардиосклерозом. 3, 4, 5—сыворотки здоровых лиц. Фиксация пребета-липопротеидов в незначительном количестве лишь в случае 4 и 5.

Необходимо отметить, что на 0,3—0,8 мм ниже фракции альфа-липопротеидов в сторону анода часто выявляется полоса слабого желтовато-коричневатого оттенка шириной в 1 мм, которая отличается от фракции липопротеидов, окрашиваемых в ярко-синий цвет. При денситометрировании фильтром № 2 она часто не улавливается, а в противном случае не учитывается. Согласно литературным данным [12], указанная полоса представляет собой окрашенный рибофлавином комплекс альбуминов со свободными жирными кислотами. Кроме того, иногда между фракциями альфа- и бета-липопротеидов выявляется еще одна полоса, ранее не описанная в литературе, шириной в 1 мм и такого же

вых лиц, однако они указывают, что соотношение альфа- к бета-липопротеидам равняется $0,60 \pm 0,07$ при разделении их методом аналитического ультрацентрифугирования, $0,56 \pm 0,03$ —методом электрофореза в полиакриламидном геле, $0,47 \pm 0,06$ —методом электрофореза на бумаге.

Таким образом, полученные данные методом электрофореза в полиакриламидном геле у здоровых лиц совпадают с результатами Наито и соавт.

Согласно данным некоторых авторов [8], методом электрофореза на бумаге у здоровых лиц не выявляется фракция пребета-липопротеидов даже при добавлении альбумина в буферный раствор. При электрофорезе же на агаре бета- и пребета-липопротеиды четко разделяются. Другими авторами [10, 15] при электрофорезе на бумаге были обнаружены три фракции липопротеидов: альфа-, бета-липопротеиды и третья фракция, которая образует полосу от места нанесения сыворотки до бета-липопротеидов.

Согласно данным Вурман и соавт. [16], нормальные величины фракций липопротеидов при электрофорезе на бумаге следующие: альфа-липопротеиды—13,3—29,3%, бета-липопротеиды—34,6—50,3%, липидный остаток (в основном липопротеиды очень низкой плотности и хиломикроны)—29,0—46,8%.

Генри [7] указывает, что при электрофорезе на бумаге получают следующие фракции: липальбумин, альфа-1, альфа-2, бета-, гамма-липопротеиды. По его данным, у тридцати здоровых лиц (12 женщин и 18 мужчин) были обнаружены в основном: липальбумин (альфа-липопротеиды)—12—30% и бета-липопротеиды—36—53%.

Таким образом, мнения разных авторов о разделении липопротеидов на фракции методом электрофореза на бумаге расходятся. Мы считаем, что метод электрофореза на бумаге не удовлетворяет современным требованиям фракционирования липопротеидов, ибо этим методом не всегда удается разделить липопротеиды на основные фракции, полученные путем ультрацентрифугирования. Этим требованиям удовлетворяет метод электрофореза в полиакриламидном геле.

Нами были обследованы также больные с гипертонической болезнью, ишемической болезнью сердца и ревматическими пороками сердца. У больных ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью обнаружены значительные отклонения количественного и качественного состава фракций липопротеидов, которые в основном проявляются увеличением фракций бета- и пребета-липопротеидов, иногда появлением редко встречающихся фракций между пребета- и бета-липопротеидами. Нами отмечено у одного больного с инфарктом миокарда и у больного с хронической коронарной недостаточностью отсутствие фракции альфа-липопротеидов. Такое явление описано Фредриксоном и соавт. [4] как наследственная патология, однако у обследуемого нами больного при повторном исследовании после лечения было обнаружено некоторое количество альфа-липопротеидов.

Таким образом, разделение фракций липопротеинов методом электрофореза в полиакриламидном геле является ценным и доступным способом изучения патологии липопротеинов, и его можно рекомендовать для широкого клинического применения.

Лаборатория клинической биохимии Института кардиологии им. Л. А. Оганесяна, МЗ Арм. ССР

Поступила 8/V 1975 г.

Ե. Լ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Վ. Մ. ՇՈՒԽՅԱՆ, Մ. Ա. ԿԱՅԱԶՅԱՆ, Կ. Լ. ՀԱՄԲԱՐՁՈՒՄՅԱՆ

ԼԻՊՈՊՐՈՏԵԻՆՆԵՐԻ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ԲԱԺԱՆՈՒՄԸ ՊՈԼԻԱԿՐԻԼԱՄԻԴԱՅԻՆ ԴՈՆԴՈՂՈՒՄ ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶԻ ՄԻՋՈՑՈՎ

Ա. մ. փ. n. փ. n. փ.

Հեղինակները նկարագրել են իրենց կողմից կիրառվող լիպոպրոտեինների ֆրակցիաների պոլիակրիլամիդային դոնդողում էլեկտրաֆորեզի միջոցով բաժանման մեթոդը: Ալբա-, բետա-, գլոբուլին-լիպոպրոտեինային ֆրակցիաների և խիլոմիկրոնների բաժանումը հիմնված է բաժանիչ-դոնդողի և բաշխիչ-դոնդողի ծակոտկենության տարբերության վրա, ինչպես նաև պայմանավորված է առանձին ֆրակցիաների էլեկտրական լիցքի մեծությամբ:

Հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ առողջ մարդկանց մոտ հալոնաբերվում են ալբա- և բետա-լիպոպրոտեինային ֆրակցիաներ, իսկ դեպքերի կեսի մոտ նաև գլոբուլին-լիպոպրոտեինային ֆրակցիա:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Beaumont J. L., Carlson L. A., Cooper G. R., Felfear Z., Fredrickson D. *Strasser T. Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1970, 43, 891.
2. Davis B. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, 121, 404.
3. Ditschuneit H. *Wiss. Veröff. Dtsch. Ges. Ernähr.*, 1973, 23, 31.
4. Fredrickson D. S., Levy R. J., Lees R. *S. New Engl. J. Med.*, 1967, 276, 94.
5. Fredrickson D. S., Levy R. I., Lees R. *S. New Engl. J. Med.*, 1967, 276, 148.
6. Frings C. S., Foster L. B., Cohen P. *S. Clin. Chem.*, 1971, 17, 111.
7. Henry R. J. *Clinical Chemistry. Principles and technics*. Hoeber Medical Division, Harper Row, 1964.
8. Irwin W. C., Campbell D. J. In: *Standard Methods of Clinical Chemistry*. Ed. G. R. Cooper, 1972, 7, 111.
9. Masket B. H., Levy R. I., Fredrickson D. J. *Labor. Clin. Med.*, 1973, 81, 794.
10. Miller A. L. In: *Chromatographic and Electrophoretic techniques*. Ed. Smith I. William Heinemann Medical Books Ltd. London, 1960, 18.
11. Moran R. F., Castelli W. P., Moran M. V. *Clin. Chem.*, 1972, 18, 217.
12. Naito H. K., Wada M., Ehrhart L. A., Lewis L. A. *Clin. Chem.*, 1973, 19, 228.
13. Narayan K. A., Narayan S., Kummerow F. A. *Nature*, 1965, 205, 246.
14. Ornstein L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, 121, 321.
15. Smith J., Thomas M. J. In: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*. Ed. I. Smith, William Heinemann Medical Books Ltd. London, 1960, 9.
16. Wuhrmann F., Markl H., Wunderly Ch. W. *Zschr. Inn. Med.*, 1958, 39, 173.