

- al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell.* 2006; 11(6): 791—801.
14. Lurien-Martinez M.A., Palacios C., Vivar-Quintana A.M., Revilla I. Effect of the addition of calcium soap to ewes' diet on fatty acid composition of ewe milk and subcutaneous fat of suckling lambs reared on ewe milk. *Meat. Sci.* 2010; 84(4): 677—83.
 15. Limanovitz I., Davidson K., Davidson K., Eliakim A., Dolfin T., Bar-Yoseph F. et al. The effects of infant formula beta-palmitate structural position on bone speed of sound, anthropometrics and infantile colic: a double-blind, randomized control trial. *J. Pediatr. Gastroenterol.* 2011; 52: E215—6.
 16. Koo W.W., Hammami M., Margeson D.P., Nwaesei C., Montalto M.B., Lasekan J.B. Reduced bone mineralization in infants fed palm olein-containing formula: a randomized, double-blinded, prospective trial. *Pediatrics.* 2003; 111(5 Pt.1): 1017—23.
 17. Zhong X., Gao S., Wang J.J., Dong L., Huang J., Zhang L.L. et al. Effects of linseed oil and palm oil on growth performance, tibia fatty acid and biomarkers of bone metabolism in broilers. *Br. Poult. Sci.* 2014; 55(3): 335—42.
 18. Malakhov V.V. A new look at the origin of chordates. *Priroda.* 1982; (5): 485—99. (in Russian)
 19. Esteve E., Ricart W., Fernandez-Reel J.M. Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiota co-evolve with insulin resistance? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2011; 14(5): 483—90.
 20. Enot D.P., Niso-Santano M., Durand S., Chery A., Pietroccola F., Vaccelli E. et al. Metabolomic analyses reveal that anti-aging metabolites are depleted by palmitate but increased by oleate in vivo. *Cell Cycle.* 2015; 14(15): 2399—407.
 21. Moreira A.P., Teixeira F.S., do Peluzio G., de Alfenas C.G. Gut microbiota and the development of obesity la microbiota intestinal y el desarrollo de la obesidad. *Nutr. Hosp.* 2012; 27(5): 5887.
 22. Shen J., Obin M.S., Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 2013; 34(10): 39—58.
 23. Kadzharyan V.G., Solov'yuk A.O., Bidzilya P.P. The endogenous cannabinoid system: a role in the development of endocrine pathology. *Zaporozhskiy meditsinskiy zhurnal.* 2013; (2): 62—6. (in Russian)
 24. Smith P.F., Ashton J.C., Darlington C.L. The endocannabinoid system: A new player in the neurochemical control of vestibular function? *Audiol. Neurootol.* 2006; 11(4): 207—12.
 25. Robson P. Human studies of cannabinoids and medicinal cannabis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2005; 168: 719—56.
 26. Ponnampalam E.N., Lewandowski P., Nesaratnam K., Dunshea F.R., Gill H. Differential effects of natural palm oil, chemically- and enzymatically-modified palm oil on weight gain, blood lipid metabolites and fat deposition in a pediatric pig model. *Nutr. J.* 2011; 10: 53—9.
 27. Nagai T., Watanabe N., Yoshinaga K., Mizobe H., Kojima K., Kuroda I. et al. Abundances of Triacylglycerol Positional Isomers and Enantiomers Comprised of a Dipalmitoylglycerol Backbone and Short- or Medium-chain Fatty Acids in Bovine Milk Fat. *J. Oleo. Sci.* 2015; 64(9): 943—52.
 28. Loften J.R., Linn J.G., Drackley J.K., Jenkins T.C., Soderholm C.G., Kertz A.F. Invited review: palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 2014; 97(8): 4661—74.
 29. Segura J., Cambero M.I., Cámara L., Lorient C., Mateos G.G., López-Bote C.J. Effect of sex, dietary glycerol or dietary fat during late fattening, on fatty acid composition and positional distribution of fatty acids within the triglyceride in pigs. *Animal.* 2015; 9(11): 1904—11.
 30. Bar-Yoseph F., Lifshitz Y., Cohen T. Review of sn-2 palmitate oil implications for infant health. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2013; 89(4): 139—43.
 31. Krishnan S., Cooper J.A. Effect of dietary fatty acid composition on substrate utilization and body weight maintenance in humans. *Eur. J. Nutr.* 2014; 53(3): 691—710.
 32. Kien C.L., Matthews D.E., Poynter M.E., Bunn J.Y., Fukagawa N.K., Crain K.I. et al. Increased palmitate intake: higher acylcarnitine concentrations without impaired progression of β -oxidation. *J. Lipid Res.* 2015; 56(9): 1795—807.
 33. Schwingshacks L., Hoffmann G. Comparison of effects of long-term low-fat vs high-fat diets on blood lipid levels in overweight or obese patients: a systematic review and meta-analysis. *J. Acad. Nutr. Diet.* 2013; 113(12): 1640—61.

Received 02.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.1-07:616.153:577.112.856]-073:537.363

Уткина Е.А., Афанасьева О.И., Ежов М.В., Артемьева Н.В., Адамова И.Ю., Покровский С.Н.

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛП(А) НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДФРАКЦИЙ ЛИПОПРОТЕИНОВ МЕТОДОМ НАТИВНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, 121552, Москва, Российская Федерация

Количественный анализ подфракций липопротеинов (ЛП) приобретает все большее значение в диагностике и прогнозировании сердечно-сосудистых заболеваний. Известно, что присутствие высоких концентраций липопротеина (а) (Лп(а)) значимо искажает результаты биохимического анализа, в частности определение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Лп(а) — гетерогенная частица, и ее подвижность в системах, используемых для анализа подфракций ЛП, может иметь значительную вариабельность, что будет вносить погрешность в результаты. Сведения о взаимосвязи Лп(а) и подфракций ЛП, а также их дифференциации в различных системах определения липидного спектра весьма немногочисленны. Данное исследование представляется актуальным, поскольку анализирует вклад Лп(а) в результаты определения подфракций ЛП методом, имеющим диагностическое значение.

Цель работы — оценить возможный вклад Лп(а) в результаты количественного определения подфракций липопротеинов методом нативного электрофореза в полиакриламидном геле, используемого для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний.

Для определения концентрации Лп(а) в сыворотке крови пациентов использовали метод иммуноферментного анализа. Количественное определение содержания подфракций ЛП проводили с помощью системы Lipoprint (Quantimetrix, США).

Подфракции ЛП определяли в образцах сыворотки здорового донора и нормоллипидемических пациентов до и после удаления Лп(а) методом аффинной хроматографии in vitro. Оказалось, что при анализе подфракций ЛП в плазме здорового донора после удаления Лп(а) выявляется существенное уменьшение уровня липопротеинов промежуточной плотности (ЛПП). В образцах сыворотки пациентов с атеросклерозом, помимо удаления подфракций ЛПП, наблюдали снижение

Для корреспонденции: Уткина Елена Анатольевна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории проблем атеросклероза Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «РКНПК» Минздрава РФ, 121552, Москва, e-mail: utkelena@yandex.ru

уровня крупных подфракций ЛНП. Анализ образцов, полученных после процедур терапевтического Лп(а) афереза с использованием колонок «Лп(а) Липopak» (Россия), продемонстрировал, наряду с удалением Лп(а), снижение концентрации подфракции С липопротеинов промежуточной плотности (ЛПП-С) во всех образцах, что подтверждает полученные *in vitro* данные. У пациентов без поражения и с многососудистым поражением коронарного русла обнаружены также достоверные различия в концентрации ЛПП.

Полученные данные свидетельствуют о том, что высокий уровень Лп(а) может вносить существенные погрешности в результаты определения подфракций ЛП. Поэтому использование системы Lipoprint (Quantimetrix, США) не позволяет однозначно интерпретировать данные о вкладе подфракций липопротеинов в риск развития сердечно-сосудистых заболеваний у больных с патологическим липидным профилем и высокой концентрацией Лп(а).

Ключевые слова: Лп(а); подфракции липопротеинов; система Lipoprint.

Для цитирования: Уткина Е.А., Афанасьева О.И., Ежов М.В., Артемьева Н.В., Адамова И.Ю., Покровский С.Н. Влияние повышенной концентрации Лп(а) на определение подфракций липопротеинов методом нативного электрофореза. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(8): 461-466. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-461-466

Utkina E.A., Afanasieva O.I., Ejoy M.V., Artemieva N.V., Adamova I.Yu., Pokrovskii S.N.

THE EFFECT OF INCREASED CONCENTRATION OF LIPOPROTEIN (A) ON IDENTIFICATION OF SUB-FRACTION OF LIPOPROTEINS USING NATIVE ELECTROPHORESIS TECHNIQUE

The Russian cardiologic R&D production complex of Minzdraz of Russia, 121552 Moscow, Russia

The quantitative analysis of sub-fractions of lipoproteins acquires growing significance in diagnostic and prognosis of cardiovascular diseases. It is well known that presence of lipoprotein (a) in high concentrations significantly distorts results of biochemical analysis, in particular detection of level of cholesterol of low-density lipoproteins. The lipoprotein (a) is a heterogeneous particle and its mobility in the systems used for analysis of sub-fractions of lipoproteins can have significant variability that will bring inaccuracy into results. The data concerning relationship between lipoprotein (a) and sub-fractions of lipoproteins and also their differentiation in various systems of determination of lipid spectrum are quite numerous. The given study is considered as actual one because it analyses input of lipoprotein (a) into results of detection of sub-fractions using the technique with diagnostic significance.

The study was carried out for evaluating possible input of lipoprotein (a) into results of quantitative estimation of sub-fractions of lipoproteins by technique of native electrophoresis in polyacrylamide gel used for diagnostic of cardio-vascular diseases.

To detect concentration of lipoprotein (a) in blood serum the technique of enzyme-linked immunosorbent assay was applied. The qualitative valuation of content of sub-fractions of lipoproteins was implemented using system Lipoprint Quantimetrix (USA).

The sub-fractions of lipoproteins were detected in samples of serum of healthy donor and normolipidic patients before and after removal of lipoprotein (a) using technique of affine chromatography in vitro. It turned out that after removal of lipoprotein (a) analysis of sub-fractions of lipoproteins in plasma of healthy donor detects significant decreasing of level of lipoproteins of medium density. The samples of serum of patients with atherosclerosis besides removal of sub-fractions of lipoproteins of medium density, decreasing of level of large sub-fractions of low density lipoproteins was observed. The analysis of samples obtained after procedures of therapeutic lipoprotein (a) apheresis using columns "Lp (a) Lipopak" (Russia) demonstrated that along with removal of lipoprotein (a), decreasing of concentration of sub-fraction C lipoproteins of medium density in all samples that substantiates in vitro data. In patients without affection and with multi-vessel lesion of coronary bloodstream reliable differences in concentration of lipoproteins of medium density were established.

The received data testify that high level of lipoprotein (a) can contribute significant inaccuracies into results of detection of sub-fractions of lipoproteins. Therefore, application of system Lipoprint (Quantimetrix USA) provides no opportunity to unequivocally interpret data concerning input of sub-fractions of lipoproteins into risk of development of cardio-vascular diseases in patients with pathological lipid profile and higher concentration of lipoprotein (a).

Key words: lipoprotein (a); sub-fractions of lipoproteins; system Lipoprint.

For citation: Utkina E.A., Afanasieva O.I., Ejoy M.V., Artemieva N.V., Adamova I.Yu., Pokrovskii S.N. The effect of increased concentration of lipoprotein (a) on identification of sub-fraction of lipoproteins using native electrophoresis technique. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (8): 461-466 (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-461-466

For correspondence: Utkina E.A., candidate of chemical sciences, senior researcher of laboratory of problems of atherosclerosis of the Institute of experimental cardiology. e-mail: utkelena@yandex.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 02.03.2016
Accepted 15.03.2016

Признание того, что гетерогенность липопротеинов (ЛП) различных классов может повысить точность прогнозирования сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), привело к росту интереса к определению данных показателей у различных категорий пациентов [1, 2]. Существуют несколько методик определения подфракционного состава ЛП. Одна из систем, одобренная для клинической диагностики, — система Lipoprint (Quantimetrix, США), основанная на разделении различных подфракций ЛП методом вертикального электрофореза в нативных условиях в полиакриламидном геле (ПААГ) [3]. В настоящее время систему Lipoprint используют не только

для диагностики атеросклероза, но и для исследований в области выявления атерогенных подфракций ЛП и их значимости для прогноза ССЗ [2]. Результаты оценки корреляции подфракций ЛП с коронарным атеросклерозом у мужчин среднего возраста продемонстрировали, что концентрация липопротеинов промежуточной плотности подкласса С (ЛПП-С) достоверно выше у больных с атеросклерозом, чем у пациентов с чистыми коронарными артериями ($14,1 \pm 5,9$ мг/дл и $10,3 \pm 3,6$ мг/дл соответственно). По данным многофакторного анализа с поправкой на уровень липидов, уровень ЛПП-С также связан с наличием и тяжестью поражения коронарного русла

[4]. Мы предположили, что подобные результаты могут объясняться повышенной концентрацией липопротеина (а) (Лп(а)), который также является независимым фактором риска возникновения и развития поражений коронарного, каротидного и периферического атеросклероза, по данным коронароангиографии как у мужчин, так и у женщин [5, 6]. Частица Лп(а) представляет собой сложный надмолекулярный комплекс, в котором молекула апобелка (а) через ковалентную дисульфидную связь соединена с апобелком В-100 (апоВ-100), входящим в состав липопротеинов низкой плотности (ЛНП) [7]. При проведении биохимических анализов повышенная концентрация Лп(а) способна значимо искажать уровень холестерина ЛНП, определяемого как прямым, так и расчетным методами [8]. По имеющимся данным, из всех существующих методов оценки подфракционного состава липопротеинов только метод VAP (Vertical auto profile), основанный на ультрацентрифугировании в вертикальном роторе, способен вычлнить концентрацию Лп(а) из профиля других фракций и подфракций липопротеинов [9]. Увеличение интереса к роли различных подфракций липопротеинов в атерогенезе, чрезвычайная гетерогенность Лп(а) и неопределенность метаболизма данной частицы на фоне ее высокой атеротромбогенности определяет актуальность исследований вклада Лп(а) в измерение концентрации атерогенных ЛП. Цель нашей работы — оценить влияние высоких концентраций Лп(а) на результаты количественного определения подфракций липопротеинов с использованием системы Lipoprint.

Материал и методы. Сыворотку крови пациентов с пораженными атеросклерозом коронарными артериями, без атеросклероза, а также здорового донора получали из крови, которую забирали натощак в вакутейнеры для сыворотки Vacutest (Vacutest Kima, Италия). Аффинную хроматографию проводили на иммуносорбенте с иммобилизованными поликлональными антителами (ПкАТ) барана к Лп(а) человека, обладающими высокой специфичностью к Лп(а) и не связывающими другие компоненты плазмы крови человека [10]. Образцы до и после удаления Лп(а) в процессе процедуры Лп(а)-афереза собирали согласно описанному ранее методу, замораживали и хранили при -70°C [11]. Концентрацию Лп(а) в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа с использованием моноспецифических ПкАТ барана к Лп(а) человека [12]. Метод валидирован относительно коммерческих наборов Immunozyum Lp(a) (Progen Biotechnik GmbH, Германия) и TintElyze Lp(a) (Biorool AB, Швеция). В качестве референсного стандарта использовали контрольный препарат Лп(а) фирмы Technoclone (Австрия), одобренный Международной Федерацией клинической химии. Определение концентрации общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), ХС ЛВП в сыворотке крови осуществляли ферментативным колориметрическим методом с использованием наборов Bioson (Германия). Содержание ХС ЛНП рассчитывали по формуле Фридвальда: $\text{ХС ЛНП} = \text{ОХС} - \text{ХС ЛВП} - \text{ТГ}/5,5$ (мг/дл). ХС ЛНП, скорректированный по уровню ХС Лп(а) (ХС ЛНП_{корр.}), согласно формуле $\text{ХС ЛНП}_{\text{корр.}} = \text{ХС ЛНП} - \text{ХС Лп(а)}$, где $\text{ХС Лп(а)} = \text{Лп(а)} \cdot 0,33$ мг/дл [8]. Количественное содержание подфракций ЛП определяли с помощью системы Lipoprint (Quantimetrix, США), для чего предварительно окрашенные на липиды образцы плазмы или сыворотки разделяли при помощи нативного электрофореза в ПААГе в течение 1 ч при комнатной температуре и силе тока 3 мА на одну трубку. После электрофореза проводили денситометрическое сканирование геля при длине волны 610 нм и компьютерную обработку полученных денситограмм.

В результате определения получали количественную характеристику в тестируемых образцах подфракций ЛПП и ЛНП, а также фракций липопротеидов очень низкой (ЛОНП) и высокой плотности (ЛВП).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета MedCalc версия 5.00.020. Данные приводились как среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (SD). При сравнении количественных показателей двух групп использовали t -критерий Стьюдента.

Результаты. При проведении нативного электрофореза в агарозном и полиакриламидном геле Лп(а) демонстрирует пре- β электрофоретическую подвижность, подобную подвижности ЛОНП [13]. Чтобы оценить зону подвижности Лп(а) при разделении подфракций апоВ, содержащих ЛП, методом нативного электрофореза в ПААГе исследованы образцы сыворотки крови здорового донора и двух пациентов с подтвержденным атеросклерозом. Все три образца имели высокий уровень Лп(а) (табл. 1). При помощи хроматографии на иммуносорбенте с иммобилизованными поликлональными антителами к Лп(а) из плазмы была удалена большая часть Лп(а). Количественное определение липидов и Лп(а) в исследуемых образцах плазмы до и после хроматографии показало значимое изменение концентрации Лп(а) и незначительное изменение уровня других ЛП (см. табл. 1). Оценка уровня ОХС и ХС ЛНП, рассчитанного по формуле Фридвальда без учета и с учетом концентрации ХС, входящего в состав Лп(а), показала отсутствие сорбции собственно ЛНП. Из приведенных данных видно, что весь ХС, удаляемый на сорбенте с ПкАТ к Лп(а), можно отнести к ХС, входящему в состав Лп(а), поскольку ХС ЛНП_{корр.} практически не изменялся. Таким образом, были получены образцы плазмы, отличающиеся только концентрацией Лп(а). Эти же образцы, а также элюат с аффинной колонки проанализированы с использованием системы для количественного определения подфракций липопротеинов Lipoprint (рис. 1).

Анализ результатов показал, что наиболее значимым было снижение концентрации ХС ЛПП, что подтверждало присутствие Лп(а) в области подвижности ЛПП в условиях проведения нативного электрофореза, используемого в системе Lipoprint. При определении различных подфракций ЛПП было показано, что у данного донора зона миграции

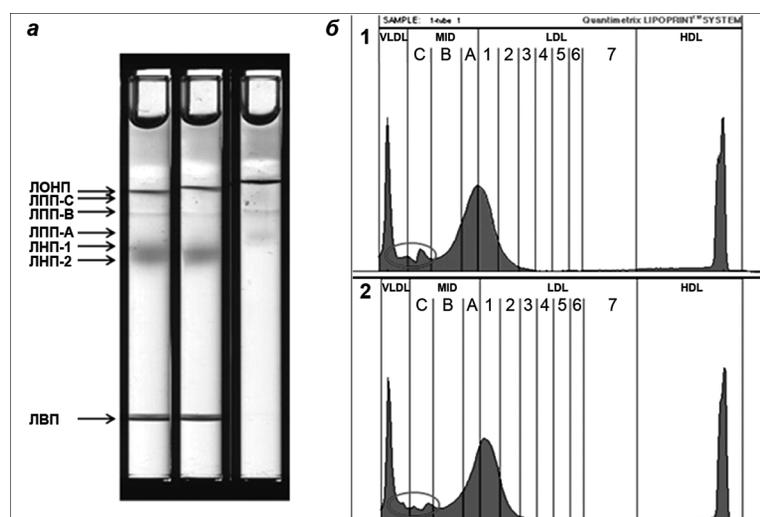


Рис. 1. Определение подфракций липопротеинов сыворотки крови здорового донора методом нативного электрофореза в ПААГе.

a — электрофореграммы образцов сывороток и элюатов с колонки; *б* — компьютерная обработка полученных результатов системой Lipoprint® (Quantimetrix). 1 — образец сыворотки до хроматографии; 2 — образец после хроматографии.

Таблица 1

Динамика Лп(а), липидных показателей и подфракций липопротеинов в образцах сывороток здорового донора и пациентов с атеросклерозом после удаления Лп(а) методом аффинной хроматографии

Концентрация, мг/дл*	Донор			Пациент 1			Пациент 2		
	до	после	%	до	после	%	до	после	%
ОХС	208	177	14	146	108	28	112	85	24
ТГ	55	46	16	35	9	63	27	27	0
ХС ЛВП	88	85	4	46	39	17	46	39	15
ХС ЛНП	112	89	21	89	65	27	54	35	36
ХС ЛНП _{корр.}	81	81	0	58	58	0	31	31	0
ХС Лп(а)	31	7	75	34	3	90	24	3	86
Лп(а)	102	25		102	10		74	10	
ЛОНП	39	34	13	39	32	17	33	25	24
ЛПП-С	12	10	13	3	0	100	0	0	0
ЛПП-В	21	16	24	3	0	100	4	0	100
ЛПП-А	39	26	33	21	13	38	4	0	100
ЛПП (суммарно)	72	52	27	27	13	52	8	0	100
ЛНП-1	45	44	1	35	23	34	19	14	26
ЛНП-2	10	10	0	3	0	100	9	4	14
ЛНП (суммарно)	55	54	1	38	23	39	28	18	36

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — для пересчета единиц из мг/дл в ммоль/л нужно их разделить на коэффициент, равный 38,7 — для ХС, 88,5 — для ТГ.

Лп(а) соответствует подфракциям ЛПП-А и ЛПП-В (рис. 2, б). Мы не обнаружили достоверного изменения концентрации ЛНП 1 и 2 (мелкие плотные ЛНП (млЛНП) отсутствовали), а также ЛВП. При этом обращает на себя внимание практически полное исчезновение минорного пика, соответствующего области подвижности ЛОНП (см. рис. 1, б), что соответствовало незначительному изменению их концентрации (рис. 2, а).

Результаты аналогичных экспериментов, проведенных с использованием сывороток нормолипидемических пациентов, отличались от результатов, полученных с использованием сыворотки здорового донора. Мы обнаружили более низкие значения как в исходной концентрации ЛПП, так и в изменении подфракций ЛПП после удаления Лп(а). Анализ подфракций ЛНП продемонстрировал значительное снижение концентрации крупных подфракций ЛНП (см. табл. 1), что не наблюдалось у здорового донора. Как и у здорового донора, оценка ОХС и ХС ЛНП, рассчитанного по формуле Фридвальда, показала, что практически весь ХС, удаляемый на сорбенте с ПкАт к Лп(а), можно отнести к ХС, входящему в состав Лп(а), поскольку корригированный холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛНП_{корр.}) практически не изменялся. Таким образом, у больных с нарушением липидного обмена и/или пациентов, находящихся на гиполипидемической терапии, зона миграции Лп(а) при определении с помощью системы Lipoprint может быть

Таблица 2

Лп(а) и подфракции ЛП у пациентов без поражения и с многосудистым поражением коронарных артерий

Параметр	Многосудистое поражение коронарных артерий, n = 63		Непораженные коронарные артерии, n = 33	
	нормо-Лп(а)	гипер-Лп(а)	нормо-Лп(а)	гипер-Лп(а)
Число мужчин, %	33 (79%)	30 (87%)	25 (44%)	8 (38%)
Возраст, годы	62 ± 9	61 ± 10	56 ± 12	59 ± 8
Концентрация (мг/дл)				
ОХС	158 ± 36	169 ± 31	170 ± 46	208 ± 73
ТГ	142 ± 53	133 ± 62	115 ± 62	133 ± 71
ХС ЛНП	89 ± 31	100 ± 31	104 ± 27	127 ± 65
ХС ЛНП _{корр.}	104 ± 35	73 ± 35	96 ± 23	104 ± 64
ХС ЛВП	42 ± 8	42 ± 12	46 ± 12	50 ± 12
ХС Лп(а)	4,2 ± 2,3	22,2 ± 11,7	4,0 ± 1,3	21,8 ± 10,2
Лп(а)	12,7 ± 7,0*	67,3 ± 35,4	12,1 ± 6,8*	66,0 ± 30,9
ЛОНП	29,9 ± 8,5	30,8 ± 10,8	31,1 ± 11,7	37,9 ± 15,1
ЛПП-С	14,7 ± 5,7*	13,6 ± 5,7**	11,9 ± 6,9**	20,8 ± 8,8
ЛПП-В	14,3 ± 6,9	14,5 ± 9,8	13,4 ± 4,7	15,1 ± 5,9
ЛПП-А	13,9 ± 5,8	15,4 ± 6,9	17,3 ± 7,6	15,5 ± 9,3
ЛНП-1	24,6 ± 8,8	27,9 ± 9,6	32,8 ± 13,9	28,0 ± 19,1
ЛНП-2	12,5 ± 8,7	14,5 ± 8,4	12,2 ± 7,6	14,4 ± 11,9
ЛНП-3	2,3 ± 4,0	2,2 ± 2,8	1,5 ± 2,6	2,6 ± 3,1
ЛНП-4	0,9 ± 1,2	0,2 ± 0,6	0,2 ± 0,6	0,4 ± 0,7
ЛНП-5–7 [#]	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,04 ± 0,2	0,0 ± 0,0
ЛВП	39,9 ± 9,1*	42,9 ± 17,1	47,3 ± 14,7	56,5 ± 12,8

Примечание. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ относительно подгруппы 4. [#] — млЛНП 5–7 в исследуемых образцах отсутствовали.

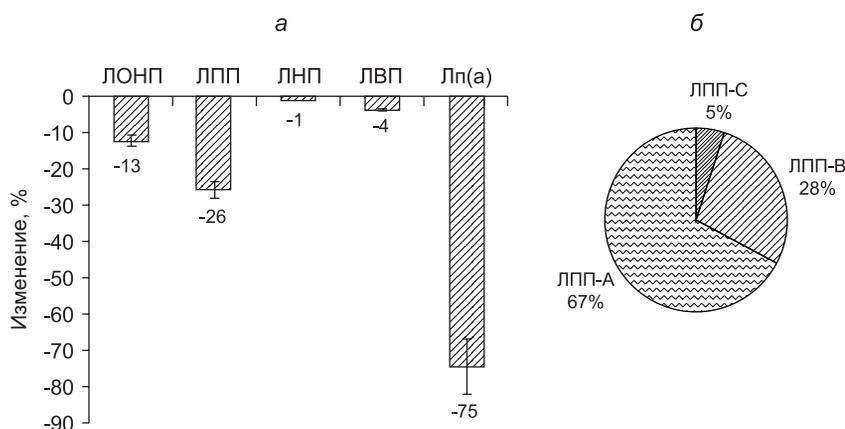


Рис. 2. Изменение различных фракций и подфракций липопротеинов до и после аффинной хроматографии плазмы крови здорового донора на сорбенте с иммобилизованными ПкАт к Лп(а), измеренных с использованием системы Lipoprint. а — динамика концентрации липопротеинов и Лп(а), данные представлены как среднее ± стандартное отклонение из двух независимых экспериментов; б — изменение в распределении подфракций ЛПП после удаления Лп(а).

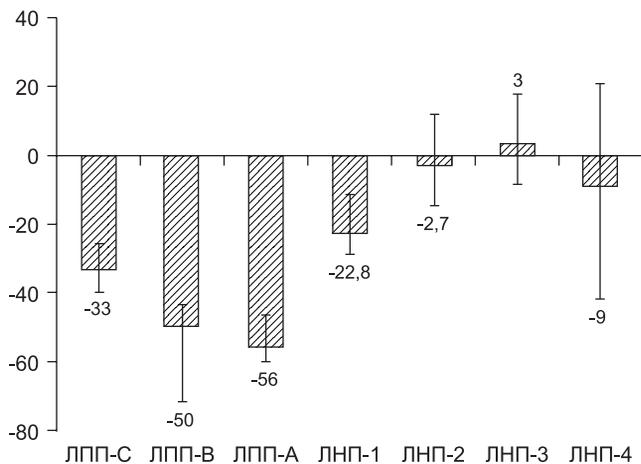


Рис.3. Изменение концентрации подфракций липопротеинов промежуточной и низкой плотностей у пациентов с хронической ИБС после удаления Лп(а) методом специфического Лп(а) афереза. Данные представлены как медиана и интерквартильный интервал.

сдвинута в область крупных подфракций ЛНП, обладающих большей подвижностью.

Процедуры терапевтического афереза с использованием колонок «Лп(а) Липоapak» (НПФ «Покард», Россия) также позволяют с высокой специфичностью удалять Лп(а) из плазмы крови пациента, не затрагивая другие липопротеины [10]. Анализ сывороток 9 больных хронической ишемической болезнью сердца (ИБС) с нормальным уровнем холестерина ЛНП при помощи системы LipoPrint до и после процедуры терапевтического Лп(а) афереза продемонстрировал достоверное снижение концентрации ЛПП наряду с ограниченным удалением подфракции ЛНП-1 (рис. 3). Уровень ХС ЛНПкорр., рассчитанного с учетом ХС-Лп(а), так же как и в опытах *in vitro*, достоверно не изменялся.

Для проверки результатов, полученных в опытах *in vitro* с использованием аффинной хроматографии, мы провели измерение подфракций ЛП и Лп(а) в сыворотке крови пациентов без поражения ($n = 33$) и с многососудистым поражением артерий коронарного бассейна ($n = 63$). Все больные принимали гиполипидемические лекарственные препараты (статины). В каждой группе были выделены две подгруппы — пациентов с нормальным и повышенным уровнем Лп(а) (табл. 2). Подгруппы соизмеримы по всем параметрам, за исключением достоверных различий в концентрации крупных подфракций ЛПП-С. При этом прямая связь между концентрацией Лп(а) и ЛПП-С ($r = 0,57, p = 0,0005$) присутствовала только в группе пациентов с непораженными коронарными артериями.

Отсутствие достоверных различий между подфракциями ЛП в подгруппах пациентов с нормальным и повышенным уровнем Лп(а) объясняется, на наш взгляд, широкой вариабельностью миграции Лп(а) при проведении нативного электрофореза в ПААГе, не позволяющей ввести какую-либо определенную поправку на концентрацию Лп(а) в системе LipoPrint.

Обсуждение. Электрофоретическая подвижность каждого белка, а тем более такого надмолекулярного комплекса, как Лп(а), зависит одновременно от целого ряда факторов, таких как суммарный заряд, молекулярная масса, конфигурация и жесткость упаковки полипептидной цепи белка. Вклад каждого из этих факторов очень трудно определить, и он может существенно меняться в зависимости от условий проведения электрофореза. Показано, что при проведении нативного

электрофореза в геле агарозы препарат Лп(а) демонстрирует пре- β электрофоретическую подвижность, незначительно меньшую, чем подвижность ЛОНП, тогда как в нативном электрофорезе в ПААГе с использованием системы LipoPrint его подвижность была большей, чем ЛОНП, за счет меньшего размера пор геля. Высокая гетерогенность Лп(а) по молекулярной массе апобелка (а) вносит дополнительный вклад в полиморфизм частицы в целом. Поэтому можно предположить, что распределение Лп(а) по подвижности имеет значительную индивидуальную вариабельность, обусловленную широкой гетерогенностью как белковой, так и липидной частей надмолекулярного комплекса. Обнаруженное в нашей работе совпадение зоны миграции Лп(а) в системе LipoPrint с областью миграции ЛПП находит подтверждение в недавно опубликованном исследовании S. Oravec и соавт., которые показали, что в группе пациентов с концентрацией Лп(а) выше 80 мг/дл были достоверно повышены концентрации подфракций ЛПП-А и ЛПП-В и незначительно — концентрация ЛПП-С — относительно больных с уровнем Лп(а) менее 30 мг/дл [14]. При анализе подфракций ЛП в подгруппах с различным уровнем Лп(а), проведенном в нашей работе, более высокий уровень ЛПП-С в подгруппе пациентов без коронарного атеросклероза и с уровнем Лп(а) выше 30 мг/дл позволяет предположить, что подвижность Лп(а) у здоровых доноров и пациентов без атеросклероза может значимо отличаться от таковой у больных атеросклерозом. При этом различия во фракционном составе ЛПП, по-видимому, могут быть связаны с наличием атеросклеротических поражений вне зависимости от концентрации Лп(а) [4]. Выявленное присутствие Лп(а) во фракции ЛОНП может быть обусловлено как непосредственным наличием Лп(а) во фракции обогащенных триглицеридом частиц, так и соответствующей подвижностью самой частицы Лп(а). Таким образом, было показано, что при измерении подфракций ЛП с использованием системы LipoPrint повышенная концентрация Лп(а) может вносить погрешность в результаты определения ЛПП, а также, возможно, в результаты определения подфракций крупных ЛНП, не затрагивая подфракцию мЛНП. Дальнейшее исследование выявленной взаимосвязи концентрации Лп(а) с подфракциями ЛПП-С представляет большой интерес как возможное звено малоизученного метаболизма Лп(а).

Заключение. Методом сопоставительного анализа образцов сыворотки, из которой практически полностью была удалена фракция Лп(а), было продемонстрировано, что при количественном определении подфракций ЛП в системе LipoPrint Лп(а) может мигрировать в широком диапазоне соответствующей подвижности ЛПП и (у некоторых пациентов) в области крупных частиц ЛНП. Минорное количество Лп(а) может также присутствовать во фракции ЛОНП. Таким образом, при интерпретации данных о вкладе подфракций липопротеинов в риск развития ССЗ необходимо учитывать, что у пациентов с патологическим липидным профилем и высокой концентрацией Лп(а) в системе LipoPrint могут регистрироваться артефактно завышенные значения подфракций ЛПП, аналогично тому, как это происходит с показателем ХС ЛНП, и/или искажения в измерениях крупных подфракций ЛНП.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3, 7—11, 13—14 см. REFERENCES)

2. Озерова И.Н., Метельская В.А., Перова Н.В., Гаврилова Н.Е., Чернушевич О.И. Связь субфракционного спектра липопротеинов низких плотностей с уровнем триглицеридов в крови при разной степени стенозов коронарных артерий. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2014; (2): 33—7.
4. Уткина Е.А., Афанасьева О.И., Ежов М.В., Артемьева Н.В., Мат-

- чин Ю.Г., Байда С.М. и др. Связь различных подфракций липопротеидов с коронарным атеросклерозом у мужчин среднего возраста, получавших терапию статинами. *Кардиологический вестник*. 2014; IX(1): 68—76.
- Ежов М.В., Афанасьева О.И., Беневоленская Г.Ф., Савченко А.П., Балахонова Т.В., Лякишев А.А. и др. Связь липопротеида(а) и фенотипа апобелка (а) с атеросклерозом у мужчин с ишемической болезнью сердца. *Терапевтический архив*. 2000; (1): 28—32.
 - Афанасьева О.И., Ежов М.В., Сафарова М.С., Афанасьева М.И., Адамова И.Ю., Покровский С.Н. Полиморфизм липопротеида(а) как фактор риска коронарного и каротидного атеросклероза и их осложнений у женщин. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2010; 9(6): 10—6.
 - Афанасьева О.И., Адамова И.Ю., Беневоленская Г.Ф., Покровский С.Н. Иммуноферментный метод определения липопротеида(а). *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1995; 120(10): 398—401.
 - Ezhov M.V., Afanas'eva O.I., Benevolenskaya G.F., Savchenko A.P., Balakhonova T.V., Lyakishev A.A. et al. Association of lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) phenotypes with coronary and carotid atherosclerosis in CHD men. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2000; (1): 28—32. (in Russian)
 - Afanas'eva O.I., Ezhov M.V., Safarova M.S., Afanas'eva M.I., Adamova I.Yu., Pokrovskiy S.N. Lipoprotein (a) polymorphism as a risk factor of coronary and carotid atherosclerosis and its complications in women. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2010; 9(6): 10—6. (in Russian)
 - Dube J.B., Boffa M.B., Hegele R.A., Koschinsky M.L. Lipoprotein(a): more interesting than ever after 50 years. *Curr. Opin. Lipidol.* 2012; 23: 133—40.
 - Dahlen G.H. Incidence of Lp(a) among populations. In: Scanu A.M., ed. *Lipoprotein(a)*. New York: Academic Press; 1990: 11.
 - Kulkarni K.R. Cholesterol profile measurement by vertical auto profile method. *Clin. Lab. Med.* 2006; 26(4): 787—802.
 - Pokrovskiy S.N., Adamova I.Yu., Afanasieva O.I., Benevolenskaya G.F. Immunosorbent for selective removal of lipoprotein (a) from human plasma: In vitro study. *Artif. Organs*. 1991; 15(2): 136—46.
 - Safarova M.S., Ezhov M.V., Afanasieva O.I., Matchin Y.G., Atanesyan R.V., Adamova I.Yu. et al. Effect of specific lipoprotein(a) apheresis on coronary atherosclerosis regression assessed by quantitative coronary angiography. *Atheroscler. Suppl.* 2013; 14(1): 93—9.
 - Afanas'eva O.I., Adamova I.Yu., Benevolenskaya G.F., Pokrovskiy S.N. Immunoassay method for determination of lipoprotein (a). *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1995; 120(10): 398—401. (in Russian)
 - Chellan B., Appukuttan P.S., Jayakumari N. Electroelution of lipoprotein(a) [Lp(a)] from native polyacrylamide gels: a new, simple method to purify Lp(a). *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2006; 68(1): 43—53.
 - Oravec S., Dostal E., Gruber K. Lipoprotein Lp(a) in lipoprotein spectrum indentified by Lipoprint LDL system. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2013; 34(4): 309—13.

Поступила 02.03.16

REFERENCES

- Hirayama S., Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta*. 2012; 414: 215—24.
- Ozerova I.N., Metel'skaya V.A., Perova N.V., Gavrilova N.E., Chernushevich O.I. Relationship of low densities lipoprotein subfractions with triglycerides level in patients with different grade of coronary arteries stenosis. *Ateroskleroz i dislipidemii*. 2014; (2): 33—7. (in Russian)
- Hoefner D.M., Hodel S.D., O'Brien J.F., Branum E.L., Sun D., Meissner I. et al. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin. Chem.* 2001; 47(2): 266—74.
- Utkina E.A., Afanas'eva O.I., Ezhov M.V., Artem'eva N.V., Matchin Yu.G., Bayda S.M. et al. Association between different lipoprotein subfractions and coronary atherosclerosis in middle-aged men on statin therapy. *Kardilogicheskiy vestnik*. 2014; IX(1): 68—76. (in Russian)

Received 02.03.16

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.831-006-06:616.8]-07:616.153.96-078.33

Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Кушлинский Н.Е.

ГЛИОФИБРИЛЛЯРНЫЙ КИСЛЫЙ ПРОТЕИН В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И НЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НЕОПУХОЛЕВОЙ ЭТИОЛОГИИ

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, 115478, Москва; Московский государственный медико-стоматологический институт им. А.И. Евдокимова, 127473, Москва, Российская Федерация

Введение. Глиофибриллярный кислый протеин (GFAP) считается биомаркером астроглиальной патологии при неврологических заболеваниях. GFAP представляет собой интрацитоплазматический филаментозный белок, специфичный для клеточного скелета зрелых астроцитов, который играет важную роль в их дифференцировке. По данным литературы, наиболее высокие сывороточные концентрации GFAP выявлены при нейролениции, гнойном менингите, фебрильной шизофрении, энцефалитах, болезни Альцгеймера, рассеянном склерозе, инсультах, открытой черепно-мозговой травме и других критических состояниях, связанных с нарушением гематоэнцефалического барьера. В последние годы появились публикации, посвященные исследованию GFAP в крови пациентов с первичными и метастатическими опухолями головного мозга.

Цель исследования — сравнительный анализ уровней GFAP в сыворотке крови больных первичными и метастатическими опухолями головного мозга, а также пациентов с неврологическими заболеваниями неопухолевого этиологии и практически здоровых людей.

Материал и методы. Были исследованы уровни GFAP в сыворотке крови нейроонкологических больных ($n = 175$), а также пациентов с патологией головного мозга неопухолевого этиологии — нейродегенеративными и цереброваскулярными заболеваниями ($n = 38$). Контрольная группа состояла из 52 практически здоровых людей, в целом не отличавшихся по полу и возрасту от исследуемых групп больных. Концентрацию GFAP определяли в сыворотке крови иммуноферментным анализом в плащечном формате на основе высокоспецифичных моноклональных антител к соответствующему белку с использованием реактивов фирмы BioVendor.

Для корреспонденции: Любимова Нина Васильевна, д-р биол. наук, проф. лаб. клинической биохимии «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», 115478, Москва, e-mail: biochimia@yandex.ru