

26. Akmaev I.G., Aleksandrov A.S., Alchinova I.B., Bocharov E.V., Karganov M.Yu., Kryzhanovskiy G.N. et al. *Sanology [Sanologiya]*. Moscow: Nauka; 2014. (in Russian)
27. Titov V.N., Dugin S.F. Translocation syndrome, bacterial lipopolysaccharide, inflammation disorders of biological reactions and blood pressure (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; (4): 21—37. (in Russian)
28. Titov V.N. *Phylogenetic Theory of General Pathology. Pathogenesis of Metabolic Pandemics. Hypertension [Filogeneticheskaya teoriya obshchey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Arterial'naya gipertoniya]*. Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
29. Blázquez-Medela A.M., García-Sánchez O., Quirós Y., Blanco-Goza V., Prieto-García L., Sancho-Martínez S.M. et al. Increased Klk9 Urinary Excretion Is Associated to Hypertension-Induced Cardiovascular Damage and Renal Alterations. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(41): e1617.
30. Chu Y., Jiang H., Ju J., Li Y., Gong L., Wang X. et al. A metabolomic study using HPLC-TOF/MS coupled with ingenuity pathway analysis: Intervention effects of *Rhizoma Alismatis* on spontaneous hypertensive rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016; 117: 446—52.
31. Pleskova S.N., Krylov V.N., Deryugina A.V. Features Planar rafts and caveolae in cell physiology. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(6): 590—8. (in Russian)
32. Daneman R., Zhou L., Kebede A.A., Barres B.A. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010; 468(7323): 562—6.
33. Armulik A., Genové G., Mäe M., Nisancioglu M.H., Wallgard E., Niaudet C. et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010; 468(7323): 557—61.
34. Titov V.N., Krylin V.V. Stress, chaperone proteins, the biological function of a violation Endoecology and excretion of biological reactions, inflammation and blood pressure (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; (5): 20—36. (in Russian)
35. Mukhin N.A., Fomin V.V. Personalized medicine in clinical neurology. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2012; 84(6): 5—9. (in Russian)
36. Launay D., Humbert M., Hachula E. Pulmonary arterial hypertension and systemic sclerosis. *Presse Med.* 2006; 35(12 Pt 2): 1929—37.
37. Zhou C., Li G., Li Y., Gong L., Huang Y., Shi Z. et al. A high-throughput metabolomic approach to explore the regulatory effect of mangiferin on metabolic network disturbances of hyperlipidemia rats. *Mol. Biosyst.* 2015; 11(2): 418—33.
38. Dong H., Zhang A., Sun H., Wang H., Lu X., Wang M. et al. Ingenuity pathways analysis of urine metabolomics phenotypes toxicity of Chuanwu in Wistar rats by UPLC-Q-TOF-HDMS coupled with pattern recognition methods. *Mol. Biosyst.* 2012; 8(4): 1206—21.
39. Popper K.R. *Objective Knowledge. The Evolutionary Approach. [Ob'ektivnoe znanie. Evolyutsionnyy podkhod]*. Moscow: Editorial URSS; 2002. (in Russian)

Поступила 01.06.16

Принята к печати 15.06.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.387.014.8

Ариповский А.В.¹, Астахова Е.А.², Колесник П.О.³, Кулагина Т.Р.⁴, Шушман И.В.³, Титов В.Н.⁵

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФТОРОПЛАСТОВЫЙ ПОРИСТЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ КОНСЕРВАЦИИ И ПЕРЕСЫЛКИ ПРОБ ПЛАЗМЫ КРОВИ: ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА «СУХОЙ КАПЛИ» С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Госсанэпиднадзора РФ, г. Оболенск, Московская область;

²ВГОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург;

³Ужгородский национальный университет, г. Ужгород, Закарпатская область, Украина;

⁴ФГУН «Институт биофизики клетки» РАН, г. Пущино, Московская область;

⁵ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, 121552, Москва

Для консервирования и пересылки по почте проб биологических жидкостей (прежде всего плазмы крови) в аналитическую лабораторию предлагается существенно модифицировать известный метод «сухой капли» крови (DBS, dried blood spot method) за счет использования отечественного фторопластового фильтрующего материала типа МФФК-Г в качестве пористого носителя жидкой биологической пробы. Синтетический материал не содержит химически активных молекулярных фрагментов и обладает вчетверо большей влагоемкостью, чем фильтровальная и хроматографическая бумага. Так, фторопластовый пористый диск массой 15 мг пригоден для нанесения 70—100 мкл (вместо 15—20 мкл) жидкости. Предварительная пропитка такого диска раствором антиоксиданта — 0,5—0,9% 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола в хлороформе — позволяет сильно повысить устойчивость высших полиненасыщенных жирных кислот (ЖК) в нанесенной на диск сухой пробе плазмы или эритроцитарной массы. Время хранения готового диска с сухой пробой на воздухе при комнатной температуре в этом случае возрастает с 3—4 до 35—40 дней, время хранения в морозильной камере — от 50—60 дней до полугода и более. Хранение сухих образцов в герметичных флаконах или виалах, продутых техническим пропан-бутаном, также увеличивает время хранения образцов примерно на порядок. Метод позволяет количественно определять содержание индивидуальных ЖК во фракции этерифицированных и неэтерифицированных ЖК, а также общего и свободного холестерина в пробах биологических жидкостей.

Ключевые слова: жирные кислоты; газовая хроматография; метод сухой капли; атеросклероз; фторопластовая фильтровальная бумага; консервирование биологических жидких проб.

Для корреспонденции: Ариповский Александр Викторович, канд. хим. наук., вед. науч. сотр. ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Россанэпиднадзора РФ, 142279, e-mail: aripovskiy@rambler.ru

Для цитирования: А.В. Ариповский, Е.А. Астахова, П.О. Колесник, Т.П. Кулагина, И.В. Шушман, В.Н. Титов. Перспективный фторопластовый пористый носитель для консервирования и пересылки проб плазмы крови: применение «метода сухой капли» с целью определения индивидуальных жирных кислот. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(9): 526-536. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-526-536>

Aripovsky A.V.¹, Astakhova E.A.², Kolesnik P.O.³, Kulagina T.P.⁴, Shushman I.V.³, Titov V.N.⁵

THE PERSPECTIVE FLUOROPLASTIC POROUS CARRIER FOR CONSERVATION AND TRANSFER OF SAMPLES OF BLOOD PLASMA: APPLICATION OF "DRY DROP" TECHNIQUE WITH THE PURPOSE OF DETECTION OF INDIVIDUAL FATTY ACIDS

¹The state research center of applied microbiology and biotechnology of the Gossanepidnadzor of Russia, Obolensk, Russia

²The I.I. Mechnikov North-Western state medical university of Minzdrav of Russia, 191015 St. Petersburg, Russia

³The Uzhgorodskii national university, Uzhgorod, Russia

⁴The institute of biophysics of cell of the Russian academy of sciences, Puschino, Russia

⁵The Russian cardiologic R&D production complex of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia

It is proposed for preserving samples of biological fluids (blood plasma first of all) and mailing them to analytical laboratory to significantly modify a well-known technique of "dried blood spot" (DBS) at the expense of application of home-made fluoroplastic filtering material type MFFK-G as a porous carrier of fluid biological sample. The synthetic material contains no chemically active molecular fragments and it has four times greater water capacity than filter and chromatographic paper. Thus, fluoroplastic porous disc of mass of 15 mg is suitable to carrying of 70-100 mkl (instead of 15-20 mkl) of fluid. The preliminary impregnation of such a disc with solution of antioxidant - 0.5% - 0.9% 2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol in chloroform - permits to strongly increase stability of higher poly-saturated fatty acids in applied of dry plasma sample or erythrocytic mass on the disc. In that case, time of storage of ready-made disc with dry sample under room temperature increases up to 35-40 days and time of storage in freezer - from 50-60 days to half a year and longer. The storage of dry samples in airtight bottles of vials air-blown with technical propane-butane, also increases time of storage of samples approximately on a degree. This method permits to qualitatively determine content of individual fatty acids in the fraction of etherized and non-etherized fatty acids and also total and free cholesterol in samples of biological fluids.

Key words: *fatty acids; gas chromatography; dried blood spot technique; atherosclerosis; fluoroplastic filter paper; preservation of biological samples*

For citation: Aripovsky A.V., Astakhova E.A., Kolesnik P.O., Kulagina T.P., Shushman I.V., Titov V.N. The perspective fluoroplastic porous carrier for conservation and transfer of samples of blood plasma: application of "dry drop" technique with the purpose of detection of individual fatty acids. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (9): 526-536. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-526-536>

For correspondence: Aripovsky A.V., candidate of chemical sciences, leading researcher. e-mail: aripovsky@rambler.ru

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 01.03.2017
Accepted 15.03.2017

Более 100 лет назад сформулировано принципиальное положение о том, что атеросклероз является следствием нарушения неких фундаментальных процессов липидного обмена в организме человека или животного. Смысл понятия такого нарушения мог быть очевидным образом сведен к патологическому уменьшению или, наоборот, увеличению концентраций определенных биологически активных соединений из класса липидов: в качестве лабораторно-диагностических маркеров патогенеза поэтому представлялось естественным использование концентрационных параметров липидов, ответственных за патогенез атеросклероза. Практика, однако, показала, что конкретизировать химическую природу таких маркеров — и даже наиболее «информативный» в этом отношении подкласс липидов — совсем не просто!

Лабораторная диагностика стала в некотором смысле заложницей в ходе столкновения различных биохимических представлений и теорий атерогенеза. Но если концепции удавалось менять относительно быстро, легко и безболезненно, то приемы лабораторной диагностики в ходе эволюции постоянно демонстрировали (что естественно для медицинской практики) откровенный консерватизм и ригидность. Не пытаясь стимулировать дис-

куссию о сильных и слабых сторонах различных теорий этиологии и патогенеза атеросклероза, попробуем оценить, сколь адекватны существующим концепциям применяемые на практике методы клинической диагностики.

Варианты холестериновой теории гласят, что патология вызвана чрезмерным потреблением холестерина (ХС) с пищей или недостаточной скоростью его оттока из тканей. Поэтому в качестве диагностических маркеров используют концентрацию общего ХС в крови или концентрации ХС в составе липопротеинов низкой и высокой плотности, ЛПНП и ЛПВП, ответственных за эффективность переноса этого вещества из печени к клеткам (и обратно).

Более современные концепции связывают процесс развития этой патологии с иными факторами, перечисленными ниже.

1. Атеросклероз вызван избытком алиментарных насыщенных жирных кислот (ЖК) С8—С22, почерпнутых из мясной и жирной молочной пищи (или из гидрогенизированных масел) при недостатке полиненасыщенных ЖК С20—С22. Маркером служит отношение насыщенных и полиненасыщенных ЖК (НЖК и ПНЖК) в плазме крови.

2. Атеросклероз инициирован дефицитом ПНЖК ω³-серии на фоне преобладания ПНЖК ω⁶-серии в пи-

ще; следует определять долю ω^3 -ПНЖК в сумме всех ЖК образца или соотношение ПНЖК ω^6 - и ω^3 -серий.

3. Атеросклероз прямым или косвенным образом связан с соотношением основных подклассов липидов в плазме; поэтому следует определять суммарную абсолютную концентрацию неэтерифицированных кислот (НЭЖК), а также содержание конкретных НЖК, мононенасыщенных ЖК (МЖК) и ПНЖК в этой липидной фракции.

Даже если не касаться иных концепций атерогенеза (теория окислительного стресса предполагает контроль параметров перекисного окисления липидов, гормональные теории — определение уровня стероидов и стероидов в плазме крови, теории микроэлементозов — выявление биологически значимых уровней йода, фтора и т.д.), становится очевидным, что современное состояние лабораторной диагностики атерогенеза соответствует приблизительно второму десятилетию XX века, т. е. времени абсолютного доминирования холестериновой теории.

В 2016 г. опубликовано [1] наше представление о том, что активация атерогенеза произошла в тот момент, когда преимущественно травоядный в филогенезе *Homo sapiens* стал потреблять афизиологично много плотоядной, мясной пищи. Филогенетически поздние липопротеины очень низкой плотности травоядных, призванные переносить эндогенные (синтезированные в печени из глюкозы) олеиновые триглицериды (ТГ), не могут столь же физиологично переносить ТГ на основе экзогенной пальмитиновой кислоты — одного из основных жирнокислотных компонентов мясной и молочной пищи.

В рамках всех сколько-нибудь современных концепций атерогенеза наиболее информативными в качестве маркеров патологического процесса представляются уже не параметры холестеринového обмена (общий и свободный холестерин, ЛПНП и ЛПВП), а скорее параметры обмена жирнокислотного — как величины суммарного содержания ТГ или НЭЖК, так и концентрации химически индивидуальных ЖК различных структурных типов.

Весьма вероятно, что в дальнейшем окажутся диагностически востребованными результаты определения концентраций НЖК или МЖК, однако исследования последних десятилетий недвусмысленно свидетельствуют также о важнейшей роли отдельных ПНЖК в процессах возникновения и, наоборот, устранения множества патологических состояний человеческого организма [2—4]. Общеизвестна роль ПНЖК ω^3 - и ω^6 -серий в патогенезе и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний и неинфекционных болезней — аутоиммунного ревматоидного артрита, язвенного колита, болезни Крона и нейродегенеративного процесса при болезни Альцгеймера, деменции, депрессии и шизофрении.

Хорошо документированы возможности определения «жирнокислотного статуса» пациентов путем количественного выявления состава ЖК в одной из фракций крови. Подобные исследования выполняются, например, на основе вычисления: а) «омега-3-индекса» [5] — процентного содержания ω^3 -эйкозапентаеновой

и ω^3 -докозагексаеновой ПНЖК в сумме ЖК эритроцитарных мембран; б) отношения концентрации ω^6 -арахидоновой ПНЖК к сумме концентраций ω^3 — 20:5 и ω^3 — 22:6 ПНЖК в плазме крови [4, 6].

Этим методом с высокой степенью достоверности могут быть предсказаны риски сердечно-сосудистых заболеваний, острого коронарного синдрома и внезапной смерти, вероятность экламптических осложнений беременности [7], опасность суицидальных попыток, острых психозов и депрессий [8].

В то же время приходится констатировать, что современная медицинская диагностика, повсеместно оперируя маловыразительными параметрами общего липидного состава (концентрации общего ХС, ТГ, ЛПНП и ЛПВП), практически не использует данные о ЖК-составе тех или иных фракций крови. Такое положение представляется тем более удивительным, что в странах Европы и США уже организованы схемы пересылки биологических образцов (авиатранспортом, в глубоко замороженном состоянии) и их хроматографического экспресс-анализа с целью определения концентраций наиболее важных в диагностическом отношении ЖК.

При всей перспективности хроматографического исследования спектра ЖК пациентов следует учитывать и серьезные проблемы этого подхода. Стандартизированные определения ХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП, ТГ выполняются спектрофотометрически — с использованием сравнительно простых и неприхотливых специализированных приборов, не требующих (в отличие от гораздо более изощренного хроматографического анализа) очень чистых реактивов, сложной пробоподготовки и высокой квалификации лаборантов. И хотя стандартная аппаратура для капиллярной газовой хроматографии никак не может считаться дорогостоящей, ее эксплуатация все же предполагает специальную подготовку операторов, наличия линий очистки газов (гелия, водорода и воздуха), схемы предварительной химической дериватизации липидов биологического образца (перевода жирнокислотных остатков фосфолипидов, ТГ, эфиров ХС в летучие метиловые эфиры ЖК). Поэтому перспективы организации газохроматографических подразделений в клинических лабораториях лечебных учреждений по меньшей мере сомнительны.

В наших условиях значительно более разумной кажется возможность копирования зарубежного опыта, т. е. организация ряда аналитических центров, располагающих соответствующим оборудованием и специалистами нужной квалификации, и эффективной системы транспортировки анализируемых материалов. Подобный вариант оказывается привлекательным еще и потому, что может и не потребовать перевозки глубоко замороженных (в сосудах Дьюара с жидким азотом или сухим льдом) биологических образцов: определение ЖК в фракциях крови требует всего нескольких десятков микролитров исследуемой жидкости, а такие объемы уже можно консервировать и транспортировать «методом сухой капли крови» (DBS, dried blood spot method) [9].

В «каноническом» варианте этого метода каплю

крови (обычно около 10 мг) наносят на диск из фильтровальной или хроматографической бумаги приблизительно того же веса (иногда пропитанный антиоксидантом), сушат на воздухе 0,5—1 ч. После этого образец может в течение некоторого времени храниться и транспортироваться в герметичном сосуде без риска его микробиологической или окислительной деструкции.

Метод «сухой капли» [10—12] достаточно широко применяют биологи и медики как в условиях полевых эпидемиологических работ, так и в ходе лабораторных исследований тех или иных нарушений метаболизма липидов. При использовании этого метода были продемонстрированы: 1) идентичность жирнокислотного состава венозной и капиллярной крови (т. е. анализ такого рода не требует забора крови из вены); 2) возможность прямой переэтерификации липидов высушенной крови непосредственно на диске в ходе химической дериватизации образца — без предварительной экстракции липидов из биологической матрицы; 3) эффективность пропитки исходной хроматографической бумаги раствором антиоксиданта ВНТ (2,6-ди-*t*-бутил-4-гидрокситолуола) перед нанесением биологической жидкости: она позволяет подавить окислительную полимеризацию ПНЖК и уменьшить изменения состава жидкого образца в ходе его хранения.

В то же время в ходе знакомства с литературой по использованию метода DBS для исследования жирнокислотного и липидного состава крови возникает стойкое ощущение некоего его несовершенства и незавершенности: похоже, метод создавался биологами и медиками, а профессиональные химики в этом процессе участия не принимали. Действительно, за все время применения метода ни одним из авторов не были даже сформулированы следующие очевидные вопросы.

Влагоемкость целлюлозной бумаги всех типов велика и редко превышает 50% (т. е. для консервирования 1 мл водного раствора требуется использовать около 1 г бумаги); еще меньше влагоемкость пористого слоя силикагеля на пластинах для тонкослойной хроматографии, которые изредка также применяли в методе DBS. В этом состоит один из несомненных недостатков метода, сильно затрудняющий определение состава минорных липидных фракций (например, неэтерифицированных ЖК): слишком мала доза биологического образца, наносимого на диск разумной величины и массы. В то же время среди пористых химических полимеров встречаются материалы с существенно большей влагоемкостью, и их применение могло бы привести к осязаемому увеличению чувствительности хроматографических определений с использованием DBS-метода.

Целлюлоза вырабатывается из древесины, биологического материала, и потенциально может содержать микропримеси не экстрагируемых липидов. Этот факт не имеет ни малейшего значения при использовании метода для контроля микробиологических, токсических, лекарственных загрязнений биологической жидкости, однако оказывается в высшей

степени нежелательным при определении микроколичеств липидов, нанесенных на целлюлозу в составе исследуемого образца.

В ходе прямой (без предварительной экстракции липидов) химической дериватизации образца на диске следует иметь в виду, что целлюлозная основа диска отнюдь не является химически инертной: каждый моносахаридный фрагмент включает гликозидную связь и три свободных гидроксила, т. е. 4 активных группировки, способных участвовать в реакциях метилирования и переэтерификации (требующих [13] обработки исследуемого объекта весьма агрессивными реагентами в достаточно жестких условиях).

Действительно, гликозидные связи разрушаются при действии кислых метилирующих агентов, а гидроксильные группы целлюлозы могут конкурировать с гидроксильными группами метанола при переводе карбоновых кислот в их сложные эфиры. Необходимое условие количественной дериватизации химического вещества обычно формулируют [13] следующим образом: отношение мольных количеств дериватизирующего реактива и дериватируемого вещества (с учетом числа химически активных группировок в молекуле) не должно быть менее 100 — в этом случае обеспечивается достаточно высокий, превышающий 95% теоретического, выход летучего производного. Несложно подсчитать, что для метилирования липидов в сухом остатке 50 мкл жидкой плазмы крови (типичное содержание липидов — 3—4 г/л) понадобится всего 0,2—0,3 ммоль, т. е. десятки микролитров, дериватирующего реактива. Для метилирования того же остатка в присутствии 50 мг целлюлозной бумаги — уже порядка 100 ммоль, 5—10 мл реактива! Резко увеличенный расход реактивов, разбавление и загрязнение получаемого производного в данном случае обусловлены химическими особенностями материала матрицы: эти недостатки можно считать потенциально устранимыми при условии использования химически инертного пористого носителя пробы.

Пропитка целлюлозного пористого носителя гидрофобным антиоксидантом из истинного раствора в органическом растворителе приведет к кристаллизации антиоксиданта в виде дифференцированных крупных частиц на гидрофильной гидроксильной поверхности носителя. В то же время липиды в плазме крови (не говоря уже о клетках крови) находятся отнюдь не в виде истинного раствора, а в форме устойчивого коллоида, будучи включенными во внутренние полости ЛП. При последовательной пропитке пористого материала водонерастворимым антиоксидантом и плазмой крови частицы антиоксиданта и ЛП на высушенной поверхности окажутся пространственно разобщенными; эффективность антиоксидантного действия в этом случае становится проблематичной. Поэтому интерес вызывают гидрофобные пористые носители с частично гидрофилизованной (для эффективного смачивания водой) поверхностью: в таких объектах можно ожидать гораздо более равномерного распределения антиоксиданта и липида по поверхности твердого носителя.

Пористые синтетические материалы, не содержа-

щие химически активных группировок, используют в химической промышленности во всем мире для фильтрации агрессивных жидкостей, в том числе горячих растворов минеральных кислот и щелочей, окислителей и органических растворителей. Фильтрующие и мембранные материалы такого рода (различной химической природы — полиолефины, полиамиды, полисульфоны, фторопласты) в России выпускает, например, владимирский НТЦ «Владипор» (<http://www.vladipor.ru>); по понятным причинам наиболее перспективными кажутся фторопластовые фильтрующие материалы на основе сополимера тетрафторэтилена и винилидендифторида («полимер Ф42Л»), армированного полипропиленовыми или полиамидными нитями. Гидрофилизированные пористые мембраны этого типа (под маркой МФФК-Г), судя по данным производителя, хорошо смачиваются водными растворами, характеризуются необычно высокой влагоемкостью (до 85%) и химической устойчивостью в отношении кислот, щелочей, спиртов и углеводов — стандартных реагентов для перевода липидов биологических проб в метиловые эфиры ЖК.

В данной работе мы излагаем результаты использования фторопластового фильтрующего материала МФФК-Г в качестве носителя пробы биологической жидкости (БЖ) в методе «сухой капли» вместо традиционной фильтровальной или хроматографической бумаги. Продемонстрирована применимость данного материала для количественного определения индивидуальных компонентов обеих фракций ЖК образца (как общих, так и неэтерифицированных кислот), а также свободного ХС.

Материал и методы. В качестве носителя БЖ в методе «сухой капли» использовали материал фильтров МФФК-Г производства НПФ «Владипор» (<http://www.vladipor.ru/catalog/show/&cid=015&id=2>) и образцы фильтровальной бумаги «Ватман», «Фильтрак», «Чёрная лента» разных производителей. В ходе изготовления дисков и при химической дериватизации образцов применяли реагенты реактивной чистоты (производства «Мерк» и «Сигма-Олдрич») — гидроксид и метоксид натрия, метанол, хлороформ, 14% раствор трехфтористого бора в метаноле, бис-*N,O*-(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА), 2,6-ди-*t*-бутил-4-метилфенол (ВНТ), пиридин, трисмаргароилглицерин, стигмастерин. Растворители (хлороформ, *n*-гексан, толуол) перед употреблением подвергали перегонке с 20-сантиметровым дефлегматором. Создание инертных атмосфер в сосудах с образцами выполняли с использованием стандартной вакуумной линии (остаточное давление — 1,2 торр).

Хроматографические измерения проводили на аналитическом газовом хроматографе «Вариан 3900»; использовалась 15-метровая кварцевая капиллярная колонка «Супелковакс™ 10» (с внутренним диаметром 0,25 мм) и пламенно-ионизационный детектор. Применяли стандартную температурную программу: от 100°C (задержка 0,5 мин) до 245°C (задержка 10 мин) со скоростью 10°C/мин.

Приготовление носителей проб (пористых дисков). Для получения «круглых» дисков стопку фто-

ропластовой фильтровальной бумаги МФФК-Г про-резали хорошо отточенным пробочным сверлом с диаметром 16—18 мм; с тем же успехом бумагу можно разрезать на квадраты со стороной около 15 мм. Получаемые таким образом фрагменты полимерного фильтрующего материала площадью 2—2,5 см² (для простоты также именуемые далее дисками) характеризуется масса 12—16 мг; они пригодны для нанесения жидкой пробы объемом до 80—90 мкл. Приготовленные диски помещали в аппарат Сокслета и экстрагировали смесью хлороформа и метанола, 3:1, в течение 2 ч, после чего переносили их в сушильный шкаф, удаляя растворитель при 50—60°C.

Все операции с носителями после стадии экстракции выполняли с помощью пинцета, избегая прикасаться к дискам руками. Помещали стопку дисков на стеклофильтр воронки Шотта диаметром 2,5—4 см, смачивали материал избытком 0,1—1% раствора 2,6-ди-*t*-бутил-4-метилфенола в хлороформе, вакуумировали воронку и отжимали диски с помощью стеклянной пробки соответствующего размера. Сушили диски в вакууме до исчезновения запаха хлороформа, хранили в темном месте в герметично закупоренной посуде (возможно использовать «зип-лок»-пакеты).

Нанесение жидких биологических проб на носитель. Сухие диски равномерно располагали на тефлоновой пластинке или полосе тефлоновой пленки, предварительно промытой хлороформом. Использование для этой цели стеклянных, металлических или даже полиэтиленовых поверхностей крайне нежелательно из-за их сравнительно высокой адгезионной способности (в этих случаях высушенные диски могут с трудом отделяться от твердой поверхности и даже фрагментироваться).

Пробу консервируемой жидкости наносили в центр диска автоматической пипеткой: фторопластовый диск МФФК-Г указанных размеров и массы (около 15 мг) пригоден для нанесения 70–90 мкл жидкой пробы, на целлюлозный носитель той же массы можно нанести лишь 15—20 мкл жидкости. Диски сушили на воздухе при комнатной температуре в течение 1,5—2 ч; пробы на целлюлозном носителе полностью высыхают за 20—30 мин, на фторопластовой матрице за — 50—60 мин.

Хранение образцов в инертной атмосфере. Для консервирования дисков в инертной атмосфере их помещали в пенициллиновые флаконы, которые закупоривали стандартным способом; в качестве альтернативы могут быть использованы стеклянные виалы с винтовыми крышками и толстыми (не менее 2—3 мм) прокладками из вулканизированного каучука. В лабораторных условиях замену воздушной фазы во флаконе на пропан-бутановую газовую смесь выполняли с помощью обычной вакуумной линии, состоящей из форвакуумного насоса, трехходового крана и камеры со смесью газообразных углеводородов С3—С4 (из баллона или газовой зажигалки). Уплотняющую прокладку флакона или виалы перфорировали инъекционной иглой (с металлической муфтой внешним диаметром 5 мм или с пластмассовой муфтой, обрезанной до того же внешнего диаметра), после чего сосуд

через муфту иглы присоединяли к 3-ходовому крану с помощью вакуумного шланга с внутренним диаметром, равным 3 мм. Систему вакуумировали и заполняли инертным газом (переключением 3-ходового крана), затем иглу из прокладки извлекали.

Приготовление больших массивов сухих образцов в лабораторных условиях может быть выполнено с помощью стандартного вакуум-эксикатора: в каждый из сосудов вводили — сквозь прокладку — отдельную иглу, всю батарею флаконов помещали в эксикатор (его вакуумировали и заполняли инертной смесью газов описанным выше методом). После снятия крышки эксикатора иглы быстро извлекали.

Для продувки флаконов в полевых условиях может быть использован другой прием. Каучуковую крышку упоренного флакона (виала) с дисками можно проколоть двумя инъекционными иглами, после чего муфту одной из игл (доходящей почти до дна пузырька — в отличие от второй, заглубленной лишь на несколько миллиметров) соединить с соплом горелки стандартной одноразовой газовой зажигалки отрезком эластичной силиконовой трубки с внутренним диаметром 0,8—1,2 мм и толщиной стенки около 1 мм (например, www.coleparmer.com). Полностью заряженная газовая зажигалка легко обеспечивает поток газа, равный 50—100 мл/мин. Флакон с пробами продуть потоком инертного газа в течение 3—4 мин.

Химическая дериватизация сухих проб на дисках с целью определения жирнокислотного состава липидов. Использована модификация ранее описанного метода [10, 14, 15]. Диск с высушенной на нем пробой биологической жидкости пинцетом помещали в сосудик для работы под давлением (стеклянная пробирка или виала вместимостью 3—5 мл с завинчивающейся крышкой, снабженной самоуплотняющейся тефлоновой — на силиконовой основе — прокладкой), уплотняли стеклянной палочкой. В сосуд добавляли раствор внутреннего стандарта (30—50 мкг трисмаргароилглицерина в 30—50 мкл толуола с добавлением 100—150 мкг антиоксиданта ВНТ), 100 мкл толуола и 300 мкл 0,5 N раствора метоксида натрия в метаноле (может быть заменен таким же объемом 0,5 N метанольного раствора едкого натра) и нагревали в настольном термоблоке или сушильном шкафу в течение 20 мин при 70°C. Охлаждали, прибавляли 400 мкл 14% метанольного раствора трехфтористого бора и снова нагревали 20 мин при 70°C. Повторно охлаждали, прибавляли к смеси 800 мкл н-гексана и 800 мкл дистиллированной воды, встряхиванием экстрагировали метиловые эфиры в органическую фазу и добивались полного разделения водно-спиртовой и органической фаз кратковременным (1—2 мин) центрифугированием в низкооборотной центрифуге. Если полное разделение водно-органической эмульсии при этом не достигалось, к смеси прибавляли каплю 95% этилового спирта и повторяли центрифугирование. В углеводородной фазе хроматографически определяли содержание метиловых эфиров ЖК С14—С24.

Дериватизация сухих проб при определении свободного ХС и индивидуальных кислот во фракции НЭЖК. Экстракцию проводили с использованием варианта

метода Фолча [16], дериватизацию — варианта метода Куксиса [17]. Диск с биологическим материалом (сухой остаток 50—100 мкл плазмы крови) помещали в сосуд для работы под давлением, куда добавляли раствор 5—10 мкг свободной маргариновой кислоты и 10—20 мкг стигмастерина (или ситостанола) в 50 мкл толуола, а также 2 мл смеси хлороформа с метанолом, 2: 1, содержащей 2 мг уксусной кислоты.

Нагревали раствор до 60°C, выдерживали в течение 5 мин, потом давали медленно охладиться (30 мин); далее экстракт промывали изотоническим раствором хлористого натрия (0,4 мл), пипеткой отбирали большую часть хлороформного экстракта в виал с герметично завинчивающейся крышкой. Упаривали раствор досуха в вакууме и силанизировали остаток действием смеси 20 мкл пиридина и 30 мкл БСТФА в течение 1 ч при 80°C. Определяли свободный холестерин и неэтерифицированные ЖК в виде триметилсилильных эфиров методом внутреннего стандарта (стандарты — маргариновая кислота для свободных ЖК, стигмастерин или холестеранол — для ХС) после хроматографирования на неполярной метилсиликоновой колонке с пламенно-ионизационным детектированием.

Результаты и обсуждение. Влагодность матрицы, объем жидкой пробы, чувствительность хроматографического определения. Результаты определения влагодности (отношения массы воды, впитанной носителем, к массе сырого образца) полимерного материала МФФК-Г вполне согласуются с данными производителя. При нанесении жидкой пробы на диск МФФК-Г, помещенный на не смачиваемую водой поверхность, массовая доля жидкой фазы в полученном образце достигала 84—85% (для материала, отжатого на фильтрующей пластине вакуумированной воронки Шотта, эта величина равна 76—77%). Та же величина для образцов целлюлозной фильтровальной бумаги разных производителей, как правило, составляла 50—55%, не превышая 60% (к этой величине близка влагодность пористого иммобилизованного слоя силикагеля на пластинах для тонкослойной хроматографии).

Таким образом, при пропитке целлюлозной и фторопластовой фильтрующей бумаги водными образцами приходится соблюдать следующие соотношения масс носителя и жидкой фазы: около 1:1 для целлюлозного материала и около 1:5 — для материала синтетического. Небольшой диск МФФК-Г массой 15—20 мг пригоден для нанесения 70—100 мкл крови, плазмы, культуральной среды или иного водного образца. При использовании дисков из целлюлозной бумаги наносимая на диск доза крови или плазмы, как правило, оказывается на порядок меньшей, не превышая 15—20 мкл: в ряде случаев столь малые объемы исследуемого материала ощутимо затрудняют определение минорных жирнокислотных компонентов пробы.

Взаимозаменяемость носителей для консервирования биологических жидкостей методом «сухой капли». Выполнено квалифицированное сравнение результатов хроматографического определения ЖК

Относительное уменьшение концентрации ПНЖК при хранении сухой плазмы крови на диске и усреднённые относительные погрешности определения индивидуальных ЖК

Время хранения сухого образца на диске, сут ¹	$[C_t - C_0]/C_0, \%$ ²					
	ЖК					СУММА С14—С24 ЖК
	$\omega^6-18:2$	$\omega^6-20:3$	$\omega^6-20:4$	$\omega^3-22:5$	$\omega^3-22:6$	
0	0	0	0	0	0	0
4	2,1	4	4,5	5	5,1	-1
10	6,5	7,3	7,7	7,4	8,9	-0,7
20	8,1	6,8	15	9,5	12	-1,4
30	7,6	8,0	18	12	11	2,3
40	7,7	8,8	20	16	14	3
100	12	10	32	28	36	3,6
$\Delta^{0,95}/C_0^{cp}$, погрешность определения ЖК ³	$4,2 \pm 0,7$	$5,0 \pm 1,7$	$4,5 \pm 1,4$	$9,6 \pm 2,2$	$6,8 \pm 1,3$	$4,2 \pm 1,0$

Примечание. ¹ — комнатная температура, антиоксидант отсутствует; ² — 6 независимых образцов (каждый — в 5 повторях); ³ $\Delta^{0,95}$ — полуширина доверительного интервала среднего C_0 для надёжности $p \geq 0,95$, отнесённая к величине C_0^{cp} (средние арифметические для 6 независимых образцов, каждый — в 5 повторях).

в одном и том же образце БЖ с использованием различных методов предварительного обезвоживания образца — непосредственной вакуумной сушкой капли жидкости в реакционном сосуде или высушиванием пористых материалов, импрегнированных жидким образцом (целлюлозная фильтровальная бумага, фторопластовая бумага, пластинки для ТСХ с

закрепленным слоем силикагеля). Сравнительное исследование не показывает каких-либо аналитически ощутимых различий: все перечисленные методы при прочих равных условиях приводят к метрологически идентичным результатам; результаты определения неэтерифицированных ЖК, общего и свободного холестерина плазмы с использованием фторопластового

Время гарантированной неизменности состава ЖК плазмы крови и эритроцитарной массы (ЭМ) при различных условиях хранения

Тип образца	Условия хранения	Допустимое время хранения, сут ¹
Камера кельвина, -70°C		
Плазма жидкая (замороженная)	На воздухе, без антиоксиданта ВНТ, доверху заполненные виалы или пробирки Эппендорфа	более 200
ЭМ замороженная	—"	более 200
Плазма высушенная, на диске ²	На воздухе, без ВНТ	более 200
ЭМ высушенная, на диске ²	—"	более 200
Морозильная камера, -18°C		
Плазма жидкая (замороженная)	На воздухе, без антиоксиданта ВНТ, доверху заполненные виалы	более 100
ЭМ замороженная	На воздухе, без ВНТ, доверху заполненные виалы	более 100
Плазма высушенная, на диске	На воздухе, без ВНТ	60
Плазма высушенная, на диске	На воздухе, с ВНТ ³	более 140
ЭМ высушенная, на диске	На воздухе, без ВНТ	50
ЭМ высушенная, на диске	На воздухе, с ВНТ	более 140
Комнатная температура (18—22°C)		
Плазма высушенная, на диске	На воздухе, без ВНТ	4
Плазма высушенная, на диске	На воздухе, с ВНТ	40
Плазма высушенная, на диске	Без ВНТ в смеси пропан-бутан (пенициллиновые флаконы)	35
Плазма высушенная, на диске	С ВНТ в смеси пропан-бутан (пенициллиновые флаконы)	более 140
Плазма высушенная, на диске	Без ВНТ, в запаянной ампуле (водород + катализатор Pt/C) ⁴	более 200
ЭМ высушенная, на диске	На воздухе, без ВНТ	менее 4
ЭМ высушенная, на диске	На воздухе, с ВНТ	30

Примечание. ¹ — время хранения образца до достижения условия $[C_0 - C_t]/C_0 = \Delta^{0,95}/C_0^{cp}$. Здесь $[C_0 - C_t]/C_0$ — относительное уменьшение концентрации наиболее чувствительной к окислению ЖК (С20:4 или С22:6), $\Delta^{0,95}/C_0^{cp}$ — относительная погрешность определения концентрации этой ЖК, т. е. полуширина доверительного интервала среднего C_0 для надёжности $p \geq 0,95$, отнесённая к величине C_0^{cp} (среднее для 6 независимых образцов), см. табл. 1. ² — диск из фторопластовой бумаги МФФК-Г массой 12—16 мг, 60 мкл БЖ, высушено на воздухе в течение 2 ч. Диски упакованы в полиэтиленовые зип-лок-пакеты, проницаемые для кислорода. ³ — диск предварительно пропитан 0,80% раствором ВНТ в хлороформе (что соответствует нагрузке около 600 мкг антиоксиданта на диск). ⁴ — остаточное количество газообразного кислорода удалялось за счет связывания водородом в присутствии платинированного угля (10% Pt, 5 мг).

пористого материала также метрологически неотличимы от полученных на классическом целлюлозном носителе.

Одновременно экспериментальная проверка показала, что среди исследованных образцов фильтровальной бумаги самых разных производителей (импортные сорта фильтровальной бумаги «Ватман», «Ферак», отечественные фильтрующие материалы «Черная лента», «Белая лента») приблизительно в 15% случаев встречаются объекты с достаточно высоким — до 0,0005% — содержанием липидов, не экстрагируемых в аппарате Сокслета (в состав таких липидов обычно входят только тривиальные кислоты C16:0, C18:0, C18:1). Данный уровень «фоновых» липидов уже нельзя считать пренебрежительно малым; появление подобных отклонений непредсказуемо, и его вероятность, как показывает опыт, мало зависит от марки исследуемого материала.

Хранение сухих образцов на фторопластовых дисках. Термин «консервирование» обычно подразумевает совокупность мер по обеспечению неизменности химического и биохимического состава образца с целью его длительного хранения и транспортировки. Эффективное консервирование должно устранить возможность микробиологической или ферментативной деградации материала (что в обсуждаемом случае достигается обезвоживанием образца) и предотвратить разрушение его лабильных компонентов агрессивными газами атмосферы (кислород, озон, сероводород и т. п.).

Известно, что стабилизации жирнокислотного состава биологических образцов можно достигнуть, эффективно подавляя радикальное окисление и окислительную полимеризацию полиненасыщенных ЖК — результат их взаимодействия с газообразным кислородом, катализируемого ионами металлов переменной валентности. В недавнем обзоре [12] приведена обширная и добросовестная компиляция результатов экспериментальных работ по стабилизации жирнокислотного состава липидов разнообразными методами, среди которых фигурируют хранение образцов при пониженных температурах, введение в образцы жирорастворимых антиоксидантов и комплексонов (описаны даже попытки радикального решения проблемы за счет хранения образцов в запаянных полипропиленовых пакетах или пробирках, продутых чистым азотом).

В то же время результаты работ, касающихся стабильности липидов при различных условиях их консервации, можно назвать чрезвычайно разрозненными и противоречивыми (например, [12, 18—21]), скорее напоминающими чисто качественное описание. Аналитики в практической работе, как правило, руководствуются более строгими критериями, тем более что исследования до сих пор касались преимущественно устойчивости замороженных (а не высушенных) жидких образцов. Потому казалось интересным практическое выяснение вопроса, какие значения температур и концентраций антиоксиданта обеспечивают неизменность жирнокислотного состава жидкой (точнее, замороженной) плазмы и эритроцитарной

массы в ходе 10, 30, 100 дней хранения и как обеспечить неизменность состава тех же образцов при использовании метода «сухой капли» на целлюлозной и фторопластовой бумаге.

В первую очередь следовало бы более корректно определить само понятие «неизменность жирнокислотного состава образца». Многие авторы (например, [19]), констатируя 5—9% уменьшение абсолютной концентрации какой-либо из ПНЖК образца в ходе его хранения, игнорируют тот факт, что определение минорных термолабильных компонентов биологической пробы никогда не бывает абсолютно точным: погрешность выявления ЖК (в зависимости от объема материала, методик дериватизации и хроматографирования) обычно составляет 4—10 отн. %, т. е. регистрируемые изменения могут объясняться обычной погрешностью определения.

В качестве «критерия неизменности состава ЖК биологического образца» при хранении мы предлагаем следующую формулировку. Содержание конкретной ЖК можно считать неизменным к моменту времени t , если экспериментально определяемая величина ее относительной убыли $[C_0 - C_t]/C_0$ (где C_0 и C_t — абсолютные концентрации данной ЖК в начале эксперимента и в момент t соответственно) не превышает погрешности определения концентрации этой кислоты используемым методом. Погрешность определения считается равной половине доверительного интервала среднего значения определяемой величины (при 95% надежности), отнесенной к абсолютной величине среднего значения. $[C_0 - C_t]/C_0 \Delta^{0,95}/C_0^{cp}$

В табл. 1 приведены данные о погрешностях определения конкретных ЖК с использованием метода, описанного в экспериментальной части, и о динамике изменения состава плазмы человеческой крови в ходе хранения (DBS-метод на фторопластовой бумаге МФФК-Г в отсутствие антиоксиданта).

В табл. 2 приведены результаты использования данного критерия для оценки сохранности ПНЖК в жидких (замороженных) и сухих образцах плазмы и эритроцитарной массы при разных условиях хранения.

Наиболее надежным методом хранения жидких и сухих образцов любой природы следует признать замораживание в морозильной камере кельвинатора: признаков деградации ПНЖК после длительного хранения при -70°C наблюдать не удается даже в отсутствие стабилизирующих добавок антиоксиданта ВНТ.

Чрезвычайно интересным и важным в практическом отношении представлялся вопрос о возможности более или менее длительного хранения дисков с сухими образцами плазмы и эритроцитарной массы при комнатной температуре: решение такой задачи резко упростило бы проведение полевых работ и пересылку образцов.

Экспериментальная проверка показывает, что состав ЖК сухой плазмы или эритроцитарной массы можно считать неизменным после 30—40 дней хранения на воздухе при $18\text{—}22^\circ\text{C}$ при условии предварительной пропитки дисков 0,8% раствором

антиоксиданта ВНТ в органическом растворителе: это относится ко всем дискам, как целлюлозным, так и фторопластовым (в отсутствие антиоксиданта ПНЖК плазмы крови и эритроцитарной массы подвергаются глубокому окислению уже в течение нескольких дней). Таким образом, появляется техническая возможность пересылки образцов БЖ с целью их последующего жирнокислотного анализа в обычных почтовых письмах или бандеролях.

Очень перспективной (и до сих пор не исследованной сколько-нибудь профессионально) можно считать возможность длительного хранения биологических проб в анаэробных условиях. Литературные указания на низкую эффективность данного метода [21] едва ли можно считать убедительными, поскольку в качестве тары авторы использовали тонкостенные пластиковые пакеты и пробирки: полимерные пленки за редчайшими исключениями легко проницаемы для кислорода, азота и других постоянных газов [22]. Представлялась интересной попытка исключения или сильного замедления диффузии газов сквозь упаковочный материал. Это могло быть достигнуто, например, запаиванием образца в стеклянной ампуле с инертным газом; альтернативный вариант — помещение образца в узкогорлый стеклянный сосуд (виала, пенициллиновый пузырек), герметически укупоренный (с использованием достаточно толстой — не менее 2—3 мм — каучуковой прокладки) и продутый инертным газом. Склонность неполярных газов к диффузии сквозь каучук уменьшается при его вулканизации и резко падает с увеличением эффективного поперечного сечения молекул газа [22]. Можно было полагать, что фреон или даже обычная пропан-бутановая смесь в данном случае окажутся предпочтительнее, чем традиционно используемые для этой цели азот, аргон или углекислота (действительно, количественные измерения подтвердили это предположение). Кроме того, смесь сжиженных углеводородов С₃—С₄, в отличие от инертных газов в стандартных баллонах, несложно было бы использовать для создания инертных газовых сред и в полевых условиях.

В атмосфере электролитического водорода, свободного от О₂, ампулированный образец высушенной на диске плазмы крови действительно не демонстрировал признаков деградации и после весьма длительного хранения (см. табл. 2). В то же время любой из описанных методов продувки пенициллиновых пузырьков технической пропан-бутановой смесью резко увеличивал срок безопасного хранения образца в пузырьке, а комбинация двух различных приемов (т. е. предварительная пропитка диска антиоксидантом и последующее хранение диска в сосудике с газообразным углеводородом) позволила, по-видимому, приблизиться к параметрам стабильности, достигнутым для упомянутого ампулированного образца.

Описанный в экспериментальной части метод консервирования проб в пузырьках, заполненных газообразной смесью пропана с бутаном, не требует лабораторного оборудования и легко может быть использован в отсутствие электроэнергии и в усло-

виях эпидемиологических работ. Даже стандартный пенициллиновый флакон вместимостью около 10 мл пригоден для консервирования 20—30 сухих проб; заполнение нескольких десятков пузырьков данной газовой смесью в лабораторных условиях оказывается простой рутинной процедурой, которая может быть выполнена в течение нескольких минут.

Наиболее сложной задачей неожиданно оказалось поддержание стабильности состава замороженных образцов в ходе их хранения в морозильной камере при –18°C. Воспроизводимость результатов в этом случае чрезвычайно часто оказывалась совершенно неудовлетворительной. Квалифицированное исследование данного вопроса привело к нетривиальному выводу: сохранность ПНЖК в замороженных образцах БЖ сильнейшим образом зависела не только от герметичности сосуда, но и от соотношения объемов жидкой (замороженной) и воздушной фаз в пузырьке: низкая (10—15%) степень заполнения сосуда замороженной БЖ — причина сравнительно быстрой (30—60 дней) деградации биологического образца. Одновременно замораживание жидкостей в пенициллиновых пузырьках или узкогорлых виалах различной вместимости, заполненных «до сужения горлышка» (на 95%) и плотно укупоренных с использованием прокладок большой толщины (≥2 мм), позволяет многократно увеличить срок безопасного хранения образцов даже без использования добавок антиоксиданта.

В остальном же результаты экспериментов по длительному хранению фракций крови в условиях морозильной камеры были близкими к описанным [20, 21]. Действительно, введение небольших концентраций антиоксиданта позволяло надолго устранить окисление ПНЖК в плазме (см. табл. 2) при –18°C. Применение морозильной камеры можно рекомендовать как метод 3—4-месячного хранения высушенных на дисках фракций крови при условии введения в каждый образец антиоксиданта ВНТ в количестве 100—250% суммарного содержания липидов в этом образце: для метода «сухой капли» это отвечает предварительной пропитке диска 0,3—0,8% раствором ВНТ в спирте или хлороформе. Замороженные жидкие образцы при соблюдении указанного условия о полном заполнении сосудов оказываются заметно менее чувствительными к окислительной деградации, по сравнению с сухими образцами на дисках.

Практическое использование этих результатов, видимо, позволит устранить основные препятствия к широкому использованию хроматографического определения как общих, так и неэтерифицированных ЖК (а также свободного холестерина) в практике клинической диагностики.

Если некая лаборатория (опытное производство) будет производить и рассылать достаточное количество дисков из фторопластовой фильтрующей бумаги, несложно отработать систему почтовой пересылки (в обычных бумажных конвертах) приготовленных и высушенных образцов — с нанесенными на диски пробами плазмы, крови, эритроцитарной

массы и других БЖ — в аналитические лаборатории: ведь устойчивость ПНЖК в сухих пробах теперь не вступает в противоречие с типичным для России временем доставки почтовых отправок (10—15 дней).

Время диктует новые идеи и предлагает новые методы диагностики. Может быть, и в самом деле пора объединить идеи и усилия для разработки методов профилактики и ранней диагностики метаболических пандемий — атеросклероза и атероматоза, метаболической артериальной гипертензии, метаболического синдрома, ожирения, неалкогольной жировой дистрофии печени, синдрома инсулинорезистентности и эндогенной гиперурикемии?

Выводы

1. Использование отечественной фторопластовой бумаги типа МФФК-Г (фильтрующий материал для химически агрессивных жидкостей) в качестве носителя проб высушенных биологических жидкостей в методе «сухой капли» оказывается в высшей степени перспективным (в сравнении с применением традиционной целлюлозной бумаги), сильно облегчая хроматографическое определение индивидуальных общих и неэтерифицированных ЖК, общего и свободного холестерина.

2. Очевидные преимущества полимерного пористого материала такого типа — резко повышенная влагоемкость (позволяющая вчетверо увеличить объем наносимой пробы), полное отсутствие примесных липидов и химически активных функциональных групп, способных к взаимодействию с дериватирующими реактивами в процессе перевода липидов в метиловые эфиры жирных кислот.

3. Высшие ПНЖК биологических жидкостей в методе «сухой капли» на фторопластовой бумаге, импрегнированной антиоксидантом, не подвергаются аналитически фиксируемому окислительному изменению на протяжении 35—40 дней (комнатная температура, на воздухе).

4. Представляется вполне реальным не только приготовление достаточно стабильных проб (как в лабораторных, так и в полевых условиях), но и пересылка подобных проб в обычных почтовых письмах для последующего определения индивидуальных ЖК в аналитических лабораториях.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—5; 7—13; 15—21 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н., Эмануэль В.Л. Патогенез атеросклероза активирован, когда филогенетически травоядные животные начинают в избытке поедать мясную (плотоядную) пищу. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(9): 553.
6. Титов В.Н., Ариповский А.В., Каба С.И., Колесник П.О., Веждед М.И., Ширяева Ю.К. Индивидуальные жирные кислоты в плазме крови, эритроцитах и липопротеинах. Сравнение результатов больных ишемической болезнью сердца и добровольцев. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 7: 3—8.
14. Ариповский А.В., Колесник О.П., Веждед М.И., Титов В.Н.

Метод подготовки проб для хроматографического определения жирных кислот без предварительной экстракции липидов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 1: 3—6.

22. Рейтлингер С.А. *Проницаемость полимерных материалов*. М.: «Химия»; 1974.

REFERENCES

1. Titov V.N., Emanuel V.L. The pathogenesis of atherosclerosis is activated when phylogenetical herbivores start to eat meat in excess (carnivorous) food. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(9): 553. (in Russian)
2. Galli C., Calder P.C. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann. Nutr. Metab.* 2009; 55: 123—39.
3. Simopoulos A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 70: 560—9.
4. Masood A., Stark K.D., Salem N. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *J. Lipid Res.* 2005; 46: 2299—305.
5. Harris W.S., von Schacky C. The omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease. *Preventive Medicine*. 2004; 39: 212—20.
6. Titov V.N., Aripovskiy A.V., Kaba S.I., Kolesnik P.O., Vezhdel M.I., Shiryayeva J.K. Individual fatty acids in plasma, erythrocytes and lipoproteins. Comparison of the results of coronary heart disease patients and volunteers. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 7: 3—8. (in Russian)
7. Lorentzen B., Drevon C.A., Endersen M.J., Henriksen T. Fatty acid pattern of esterified and free fatty acids in sera of women with normal and pre-eclamptic pregnancy. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.* 1995; 102(7): 530—7.
8. Colin A., Reggers J., Castronovo V., Ansseau M. Lipids, depression and suicide (review). *Encephale*. 2003; 29(1): 49—58.
9. Lehmann S., Delaby C., Vialaret J., Ducos J., Hirtz C. Current and future use of «dried blood spot» analysis in clinical chemistry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(10): 1897—1909.
10. Bailey-Hall E., Nelson E.B., Ryan A.S. Validation of rapid measure of blood PUFA levels in humans. *Lipids*. 2008; 43(2): 181—6.
11. Crowe F.L., Skeaff C.M., Green T.J., Gray A.P. Serum fatty acids as biomarkers of fat intake predicts serum cholesterol concentrations in population-based survey of New Zealand adolescents and adults. *Amer. J. Clin. Nutr.* 2006; 83(4): 887—9.
12. Metherel A.H., Stark K.D. A stability of blood fatty acids during storage and potential mechanisms of degradation: a review. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2016; 104: 33—43.
13. Knapp D.R. *Handbook of analytical derivatization reactions*. «A Wiley-Interscience publication»; 1979.
14. Aripovskiy A.V., Kolesnik O.P., Vezhdel M.I., Titov V.N. Method of preparing samples for the chromatographic determination of the fatty acids without preliminary extraction of lipids. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 1: 3—6. (in Russian)
15. Marangoni F., Colombo C., Galli C. A method for the direct evaluation of the fatty acid status in a drop of blood from a fingertip of humans: applicability to nutritional and epidemiological studies. *Anal. Biochem.* 2004; 326(2): 267—72.
16. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497—509.
17. Kuksis A., Myher J.J., Marai L., Geher K. Estimation of plasma free fatty acids as the trimethylsilyl (TMS) esters. *Anal. Biochem.* 1976; 70(2): 302—12.
18. Min Y., Ghebremeskel K., Geppert J., Khalil F. Effect of storage temperature and length on fatty acid composition of fingertip blood collected on filter paper. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2011; 84(1-2): 13—8.
19. Bell J.G., Mackinlay E.E., Dick J.R., Younger I., Lands B. Using a fingertip whole blood sample for rapid fatty acid measurement: method validation and correction with erythrocyte polar

- lipid composition in UK subjects. *Brit. J. Nutr.* 2011; 106(9): 1408—15.
20. Otto S.J., van Drongelen M.M., van Houwelingen A.C., Hornstra G. Effect of storage of venous and capillary blood samples — the influence of deferoxamine and butylated hydroxytoluene on the fatty acid alterations in red-blood-cell phospholipids. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1997; 35: 907—13.
21. Metherel A.H., Hogg R.C., Buzikievich L.M., Stark K.D., Buty-
lated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dry blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. *Lipids Health Dis.*, 12: 22. Published on-line, 2013, Feb 20, doi: 10.1186/1476-511X-12-22.
22. Reytlinger S.A. *The permeability of the polymeric materials. [Pronizae-most' polimernykh materialov]*. Moscow: Khimiya; 1974. (in Russian)

Поступила 01.03.17

Принята к печати 15.03.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.61-006.04-078.33:578.2.08

Герштейн Е.С.¹, Колпаков А.В.¹, Бежанова С.Д.¹, Морозов А.А.², Алфёров А.А.¹, Огнерубов Н.А.³, Казанцева И.А.², Кушлинский Н.Е.¹

ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И ЕГО РЕЦЕПТОРЫ 1-ГО И 2-ГО ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ: КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия

²ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, Москва, Россия

³Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, 392000, Тамбов, Россия

Успехи в лечении рака почки связаны с использованием антиангиогенных препаратов, поэтому изучение и поиск новых молекулярных маркеров, характеризующих его ангиогенную активность, не теряет актуальности. Цель настоящего исследования — сравнительная оценка содержания VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови практически здоровых людей, больных раком и доброкачественными опухолями почки, анализ их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими особенностями новообразований. Обследованы 94 больных раком и 10 больных доброкачественными опухолями почки. В контрольную группу вошли 80 человек. Концентрацию исследуемых белков определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Quantikine® (R&D Systems, США). Содержание VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови больных раком почки было достоверно выше, чем в группе контроля. Уровень VEGF также был повышен у больных доброкачественными опухолями. При пороговом уровне VEGF, равном 365 пг/мл, диагностическая чувствительность выявления первичного рака почки составила 67%, специфичность — 70%. Со стадией заболевания и индексами T и N положительно коррелировал только уровень VEGFR1. Взаимосвязь уровня маркеров с гистологическим строением и степенью дифференцировки рака почки не установлена. Таким образом, VEGF и его рецепторы имеют ограниченное диагностическое значение при раке почки, но могут быть использованы для мониторинга и прогноза эффективности антиангиогенной терапии.

Ключевые слова: рак почки; VEGF; VEGFR1; VEGFR2; сыворотка крови; диагностические характеристики.

Для цитирования: Герштейн Е.С., Колпаков А.В., Бежанова С.Д., Морозов А.А., Алфёров А.А.¹, Огнерубов Н.А., Казанцева И.А., Кушлинский Н.Е. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы 1-го и 2-го типа в сыворотке крови больных раком почки: клинико-морфологические корреляции. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(9): 536-541. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-536-541>

Gershtein E.S.¹, Kolpakov A.V.¹, Bezhanova S.D.¹, Morozov A.A.², Alferov A.A.¹, Ognerubov N.A.³, Kazantseva I.A.², Kushlinskiy N.E.¹

THE GROWTH FACTOR OF ENDOTHELIUM OF VESSELS AND ITS RECEPTORS TYPE I AND II IN BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER: CLINICAL MORPHOLOGICAL CORRELATIONS

¹The N.N. Blokhin Russian oncological center of Minzdrav of Russia, 115478 Moscow, Russia

²The M.F. Vladimirkii Moscow oblast research clinical institute, 129110 Moscow, Russia

³The G.R. Derjavina Tambovskii state university, 392000 Tambov, Russia

The progress in treatment of kidney cancer is related to application of anti-angiogenic medications. Therefore, investigation and searching for new molecular markers characterizing its angiogenic activity is actual still. The purpose of study is to compare VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 in blood serum of healthy people, patients with cancer and benign tumors of kidney and to analyze their relationship with main clinical morphological characteristics of neoplasms. The study sampling consisted of 94 patients with cancer and 10 patients with benign tumors of kidney. The control group included 80 individuals. The concentration of analyzed proteins was determined using QuantikineT (R&D Systems, USA), a reagents' kit for direct immune enzyme analysis. The content of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 in blood serum of patients with cancer of kidney was reliably higher than in control group. The level of VEGF also was increased in patients with benign tumors. Under threshold level of VEGF of 365 pg/ml the diagnostic sensitivity of detection of primary cancer of kidney amounted to 67% and specificity - 70%. The stage of disease and T and N