

# ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.115.083:577.125.5:543.94.056

## МОДИФИКАЦИЯ СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Н.В. Канская<sup>1</sup>, В.В. Иванов<sup>1</sup>, Е.А. Степовая<sup>1</sup>, И.А. Позднякова<sup>1</sup>, Н.А. Федорова<sup>2</sup><sup>1</sup>ГБОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет" Минздрава России, Томск<sup>2</sup>ФГБУ "НИИ кардиологии" СО РАМН, Томск

E-mail: ivanovv1953@gmail.com

## THE MODIFICATION OF LIPID ESTIMATION METHOD

N.V. Kanskaya<sup>1</sup>, V.V. Ivanov<sup>1</sup>, Ye.A. Stepovaya<sup>1</sup>, I.A. Pozdniakova<sup>1</sup>, N.A. Fedorova<sup>2</sup><sup>1</sup>Siberian State Medical University, Tomsk<sup>2</sup>Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Cardiology" of Siberian Branch under the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk

Впервые для повышения точности ферментативного определения триацилглицеридов в биологическом материале предварительное экстрагирование липидов проводилось с дополнительным добавлением к хлороформному экстракту 25 мкл 10%-го раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20 °С и частоте колебаний 120 в мин в течение 30 мин.

**Ключевые слова:** липиды, биологический материал, ферментативное определение триацилглицеридов, экстрагирование.

For the first time, to increase the accuracy of triacylglyceride enzymatic estimation in biological material, preliminary lipid extracting was conducted with complementary addition of 25 mL of 10% tesis solution to chloroform extract with simultaneous admixture blending in a shaker under 20 °C and oscillation frequency of 120 per 1 min during 30 min.

**Key words:** lipids, biological material, triacylglyceride enzymatic estimation, extracting.

### Введение

Модификация и повышение точности определения липидов в биологическом материале возможны путем предварительной экстракции и получения прозрачного раствора липидов для их последующей ферментативной оценки.

При выборе метода экстракции необходимо принимать во внимание ряд особенностей липидов. Липидами называют класс органических веществ, гетерогенных по химической структуре, но обладающих общим свойством – высокой растворимостью в неполярных растворителях, так как они имеют гидрофобный характер. Среди них различают нейтральные липиды (свободные жирные кислоты и их эфиры, моно-, ди- и триацилглицерины, стероиды, воски, углеводороды) и полярные липиды (глицерофосфолипиды, сфинго- и гликолипиды, цереброзиды). Поэтому при экстракции липидов принимают во внимание тот факт, что они способны не только к гидрофобным взаимодействиям, но и к образованию водородных, электростатических и ковалентных связей (сложноэфирных, амидных, гликозидных). Относительно влия-

ния на связи: неполярные растворители (хлороформ, бензол, диэтиловый эфир) разрушают комплексы, образованные гидрофобными взаимодействиями в жировой ткани, хиломикроны, комплексы альбумина с жирными кислотами; полярные растворители (этанол, метанол) разрушают водородные и электростатические связи. Полярные растворители применяют в смеси со слабополярными растворителями при экстракции липидов из плазматических мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикулума печени. Липиды, находящиеся в комплексах, образованных ковалентными связями, растворителями не экстрагируются. Их можно выделить только после гидролиза с использованием органического растворителя.

Наиболее распространенным методом экстракции липидов является метод Фолча [1], при котором применяют смесь хлороформ – метанол (2:1) из расчета 20 частей экстрагирующей смеси на одну часть ткани. Метод позволяет выделить 90–95% всех клеточных липидов. Смеси растворителей, содержащие спирт, также экстрагируют нелипидные вещества (сахара, аминокислоты, соли и т.д.). Для удаления нелипидных примесей экстракт

липидов промывают водой или слабыми солевыми растворами. Однако это приводит к частичной потере кислых липидов.

Так как липиды легко подвергаются окислению и гидролитической дегградации, чтобы затормозить эти процессы, экстракцию липидов проводят при комнатной температуре, применяя растворители, из которых предварительно удаляется кислород. Извлеченные липиды не упаривают досуха и не оставляют в упаренном виде на долгое время, а сразу растворяют. Экстракты липидов следует хранить в плотно закрытой посуде при  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже в присутствии инертных газов. Можно применять антиоксиданты, например, 2,6-ди-трет-бутил-крезол, который в концентрации 0,005% эффективно предотвращает окислительное расщепление ненасыщенных липидов.

Некоторые растворители содержат или накапливают при хранении вещества, разрушающие липиды. Так, при хранении диэтилового и петролейного эфира накапливаются перекиси, окисляющие двойные связи. При хранении хлороформа и дихлорметана образуется фосген, реагирующий с окси- и аминогруппами. Небольшие количества альдегидов, содержащихся в первичных спиртах, также реагируют с окси- и аминогруппами и активированными метиленовыми группировками.

Чтобы удалить примеси, растворители подвергают специальной обработке. Свежий хлороформ перегоняют и хранят в темной склянке с добавлением 1%-го метанола или этанола. Хлороформ после длительного хранения промывают водой, сушат над хлористым кальцием и перегоняют. Метанол и этанол (95 или 99%) перегоняют над гранулированной гидроокисью калия, хранят в темной склянке 1–2 мес.

Процедура экстракции липидов должна приводить к количественному извлечению клеточных липидов в неизменном виде. Липидный экстракт не должен быть загрязнен нелипидными веществами, такими как сахара и аминокислоты. Эффективность экстракции липидов в значительной степени зависит от химической природы липидных компонентов и от вида комплексов, которые образуют липиды в клетке с другими классами природных соединений. Известны три основных типа взаимодействия липидов с другими веществами:

- I тип – ван-дер-ваальсово взаимодействие между гидрофобными “нейтральными” или неполярными липидами, такими как эфиры стероидов, глицериды, углеводороды, каротиноиды, которые связываются относительно слабыми нековалентными связями, их углеводородные цепи образуют связи с другими липидами или с гидрофобными участками белков. Такое взаимодействие осуществляется, в частности, в жировой ткани, хиломикронах, комплексах альбумина с жирными кислотами, жировых образованиях микробных клеток и т.п.;
- II тип взаимодействия – образование водородных связей, электростатическое или гидрофобное взаимодействие, при котором полярные липиды (фосфатиды, гликолипиды, холестерин) образуют связи с белками, например, в плазматических мембранах, митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и липопротеинах сыворотки;

- III тип взаимодействия – образование комплексов, в которых жирные кислоты (нормальные или разветвленные) и оксикислоты связаны ковалентными связями (сложноэфирными, амидными или гликозидными) с полисахаридами, как это имеет место в липополисахаридах клеточных стенок бактерий.

Из комплексов, образованных в результате ван-дер-ваальсового гидрофобного взаимодействия, липиды можно экстрагировать относительно неполярными растворителями, такими как этиловый эфир, хлороформ или бензол. Липиды, связанные в мембранах, экстрагируются полярными растворителями, такими как этанол или метанол, разрушающими водородные связи и нарушающими электростатическое взаимодействие белков с липидами. Ковалентно связанные липиды не экстрагируются никакими растворителями: их можно выделить лишь путем расщепления комплекса с помощью кислотного или щелочного гидролиза.

При выборе метода экстракции необходимо принимать во внимание способность липидов к перекисному окислению по двойным связям. Поэтому обычно, чтобы предотвратить окисление двойных связей, непосредственно перед экстракцией растворители перегоняют и удаляют из них перекиси. Растворители, применяемые для извлечения высоконенасыщенных липидов, следует дезаэрировать, пропуская через них азот, и затем все операции проводить в атмосфере азота. Липидные экстракты не следует ни упаривать досуха, ни оставлять в упаренном виде на долгое время; извлеченные липиды надо как можно скорее растворять в подходящем растворителе (хлороформе). Температура, при которой проводится экстракция, должна быть не выше комнатной (или ниже, если это необходимо) для того, чтобы затормозить окисление и гидролитическое расщепление липидов. Старые способы экстракции кипящим растворителем в аппарате Сокслета должны быть исключены.

Другой фактор, который следует принимать во внимание, это ферментативная дегградация липидов во время экстракции. Так, например, содержащиеся спирт смеси растворителей вызывают дезактивацию большинства фосфатаз и липаз. Более стабильные ферменты разрушаются при 1–2-минутном контакте с кипящей водой или горячим спиртом.

Из вышесказанного следует, что спирт является необходимым компонентом всех смесей, употребляемых для экстракции липидов, так как он разрушает комплексы липидов с белками, растворяет липиды и дезактивирует ферменты, вызывающие расщепление липидов. Однако смесь растворителей, содержащих спирт, наряду с липидами экстрагирует содержащиеся в клетках нелипидные вещества, такие как сахара, аминокислоты, соли и т.д. Поэтому неочищенный липидный экстракт нужно обрабатывать так, чтобы удалить все водорастворимые примеси. Наиболее распространенной процедурой такого рода является промывка экстракта водой, приводящая в некоторых случаях к образованию очень стабильных эмульсий. Освобождают липиды от нелипидных примесей, пропуская неочищенные экстракты через колонки, заполненные целлюлозой или сефадексом, или проводя диализ через специальные мембраны.

В настоящее время перспективными являются методы исследования липидов с неионными детергентами Тритон-Х100 и тезитом для солюбилизации гидрофобных белков, липополисахаридов и других гидрофобных молекул. Наиболее часто используется Тритон-Х100. Его химическая формула  $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ , где  $n=10$ . Это полиоксиэтилен-октил-фениловый эфир или полиэтиленгликоль  $n(1,1,3,3$ тетраметил-бутил-фениловый эфир) с достаточно большой молекулярной массой. Однако в последнее время этот высокомолекулярный детергент часто заменяется на низкомолекулярный тезит с молекулярной формулой  $C_{30}H_{62}O_{10}$  и молекулярной массой 582,81 г/моль, что повышает эффективность экстракции при работе с биологическим материалом. Преимущества тезита позволяют широко использовать его не только в биохимии, но и в фармации, где он добавляется к лекарственным препаратам, а также в химической промышленности при изготовлении стирального порошка, моющих средств и т.д.

Использование различных детергентов в эксперименте при изучении ишемической болезни сердца и развитии липидемии рекомендовано Всероссийским научным обществом кардиологов, согласно положению рекомендаций Европейского общества по изучению атеросклероза [2].

Среди ранее известных способов определения липидов следует отметить метод экстракции с последующей тонкослойной хроматографией; метод с использованием для частичной делипидизации липопротеинов крови в низких концентрациях (0,1%) неионного детергента Тритона Х-100 [3–8], а также способ выделения липидов по методу Фолча.

Одним из наиболее часто применяемых и эффективных способов экстракции липидов является экстракция по Блайю и Дайэру – упрощенный вариант “классической” методики Фолча. При экстракции по этому методу используют однофазную систему растворителей хлороформ-метанол-вода, которая быстро и эффективно извлекает липиды. Экстракт разбавляют одним объемом воды и одним объемом хлороформа. В результате образуется двухфазная система, нижний слой которой состоит из хлороформа, а верхний – из смеси метанола и воды. Водорастворимые не липидные примеси переходят в воднометанольный слой, в то время как в хлороформном слое остаются липиды, практически свободные от загрязнений.

Дальнейшее исследование липидов проводится с помощью тонкослойной хроматографии и других химических методов. Существуют стандартные ферментативные методы исследования концентрации липидов в прозрачных средах. Для получения такой среды в хлороформ добавляют поверхностноактивные вещества, неполярные детергенты, такие как тезит.

Все вышесказанное свидетельствует о значимости использования тезита при липидной экстракции для разработки высокоточных и чувствительных методов количественной оценки липидов разных тканей. Кроме того, популярность способа количественной оценки липидов тканей в хлороформных экстрактах с добавлением детергента обусловлена простотой осуществления и доста-

точной адекватностью получаемых результатов [9].

Целью предлагаемого исследования является повышение эффективности и точности определения липидов путем получения прозрачного раствора липидов в результате использования малых концентраций детергента тезита.

Указанная цель достигается дополнительным добавлением к хлороформному экстракту липидов 25 мкл 10%-го раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20 °С и частоте колебаний 120 в мин в течение 30 мин и получением прозрачного раствора липидов для ферментативного определения триглицеридов.

Режим обработки пробы тезитом подбирался на основе экспериментальных исследований эмпирическим путем. Для этого использовали различные разведения тезита, различную температуру и различную экспозицию в минуту. При использовании различных концентраций раствора тезита малые концентрации (а именно 1%) не позволяли получить абсолютно прозрачный раствор, а высокие концентрации (а именно 20%) не позволяли выполнить дальнейшее ферментативное исследование триацилглицеридов печени крыс.

## Материал и методы

Эксперименты проводили на 20 крысах-самцах массой  $200 \pm 20$  г, которые содержались в виварии на естественном световом режиме, свободном доступе к воде и пище, на стандартном рационе.

Метод основан на предварительной экстракции липидов из печени крыс хлороформ-метаноловой смесью по методу Фолча и последующем определении триацилглицеридов ферментативным путем.

Способ-прототип осуществлялся следующим образом: к 6 г печени крысы добавляют 3 мл воды и измельчают в гомогенизаторе Поттера–Эльвехейма (Potter–Elvehjem). Гомогенизат центрифугируют, супернатант декантируют и остаток реэстрагируют 38 мл смеси: хлороформ – метанол – вода (1:2:0,9 по объему) в гомогенизаторе в течение 2 мин. Ткань отделяют центрифугированием. Объединенный супернатант разбавляют 20 мл хлороформа и 20 мл воды. Воднометанольную и хлороформную фазу разделяют центрифугированием. Нижний хлороформный слой концентрируют на роторном испарителе при 35 °С. Для удаления воды добавляют бензол и упаривают его в вакууме. К упаренному остатку липидов добавляют 10 мл хлороформа с 25 мкл 20%-го раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера ПЭ-6300М при 20 °С и частоте колебания платформы 120 в мин в течение 30 мин с последующим определением триацилглицеридов ферментативным методом набором “триглицерол-ново” (жидкая форма) кат№В8322 фирмы “Вектор” БЭСТ (Новосибирск) при длине волны 500 нм спектрофотометрически при 25 °С. Опытная и калибровочная пробы составляют 10 мкг. Концентрацию триацилглицеридов рассчитывают по формуле  $C = E/E_k \times 2,29$ , где 2,29 – концентрация триглицеридов в калибраторе, ммоль/л, делают перерасчет на 1,00 г сырого веса печени.

Исследования триацилглицеридов по общепринятому и предлагаемому способу проводились по 20 раз.

Результаты исследования обработаны статистически с использованием пакета программ StatSoft STATISTICA 6.0 с определением среднеарифметического (M) и его ошибки (m).

## Результаты и обсуждение

При проведении исследований по общепринятому способу уровень триацилглицеридов составил  $5,8 \pm 0,6$  мг на 1,0 г массы печени крыс, а при исследовании по предлагаемому способу уровень триацилглицеридов составил  $8,4 \pm 0,7$  мг/1,0 г массы печени, что соответствует значениям нормы по данным литературы и современным результатам [9].

Итак, при применении общепринятого способа был получен недостаточно точный результат, что связано с низкой прозрачностью исследуемого раствора, а наиболее эффективным и точным был предлагаемый способ. При этом предлагаемый способ прост в исполнении и интерпретации полученных результатов.

## Литература

- Северин С.Е., Соловьева Т.А. Практикум по биохимии. – М.: МГУ, 1989. – 509 с.
- Творогова М.Г. Липиды и липопротеины. Лабораторная диагностика нарушений липидтранспортной системы // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 10. – С. 21–32.
- Пат. 2413952 Российская Федерация, МПК G01N. Способ определения фракций модифицированных липопротеинов крови / Канская Н.В., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Позднякова И.А., Спирина Л.В.; заявители и патентообладатели Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию” (RU), Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН (RU), Областное государственное учреждение здравоохранения “Томский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями” (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Томский политехнический университет (RU). – № 2009103374 ; заявл.02.02.2009 ; опубл. 10.03.2011, Бюл. № 7. – 7 с.
- Пат. 2428698 Российская Федерация, МПК G01N. Способ определения фракций модифицированных липопротеинов крови [Текст] / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Позднякова И.А., Гузеева Т.И., Степовая Е.А. ; заявители и патентообладатели Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Национальный исследовательский Томский политехнический университет” (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию” (RU), Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН (RU), Областное государственное учреждение здравоохранения “Томский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и ин-

фекционными заболеваниями” (RU). – № 2010124210 ; заявл. 11.06.2010 ; опубл. 10.09.2011, Бюл. № 27. – 8 с.

- Пат. 2439575 Российская Федерация, МПК G01N. Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Позднякова И.А., Гузеева Т.И., Степовая Е.А. ; заявители и патентообладатели Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Национальный исследовательский Томский политехнический университет” (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию” (RU), Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН (RU), Областное государственное учреждение здравоохранения “Томский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями” (RU). – № 2010124101 ; заявл. 11.06.2010 ; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 6 с.
- Пат. 2439580 Российская Федерация, МПК G01N. Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Позднякова И.А., Гузеева Т.И., Понгольская Л.В. ; заявители и патентообладатели Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Национальный исследовательский Томский политехнический университет” (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию” (RU), Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН (RU), Областное государственное учреждение здравоохранения “Томский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями” (RU). – № 2010124072 ; заявл. 11.06.2010 ; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 5 с.
- Пат. 2439581 Российская Федерация, МПК G01N. Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Позднякова И.А., Гузеева Т.И., Бойков А.Н. ; заявители и патентообладатели Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Национальный исследовательский Томский политехнический университет” (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию” (RU), Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН (RU), Областное государственное учреждение здравоохранения “Томский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями” (RU). – № 2010124114 ; заявл. 11.06.2010 ; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 8 с.
- Пат. 2439582 Российская Федерация, МПК G01N. Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Позднякова И.А., Гузеева Т.И., Бойков А.Н. ; заявители и патентообладатели Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Национальный исследовательский Томский политехнический университет” (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию” (RU),

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН (RU), Областное государственное учреждение здравоохранения "Томский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями" (RU). – № 2010124116: заявл. 11.06.2010; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 9 с.

9. Левицкий А.П., Гоженко А.И., Левченко Е.М. Влияние квертулина на содержание липидов в печени и в сыворотке крови крыс с эндотоксемией // Актуальные проблемы трансплантационной медицины. – 2013. – № 1(31). – С. 139–143.

*Поступила 03.03.2014*

### Сведения об авторах

**Канская Наталья Викторовна**, докт. мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

**Иванов Владимир Владимирович**, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: ivanovvv1953@gmail.com

**Степовая Елена Алексеевна**, докт. мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

**Позднякова Ирина Анатольевна**, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

**Федорова Нина Александровна**, канд. мед. наук, заведующая отделением атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца ФГБУ "НИИ кардиологии" СО РАМН.

Адрес: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а.