

Акустический метод определения апо А1 и апо В в сыворотке крови

В. А. Клемин, к.б.н., ген. директор¹

С. Н. Гурбатов, д.ф.-м.н., зав. кафедрой акустики радиофизического факультета²

А. В. Клемина, к.ф.-м.н., ст. преподаватель кафедры акустики радиофизического факультета²

И. Ю. Демин, к.ф.-м.н., доцент кафедры акустики радиофизического факультета²

О. В. Руденко, д.ф.-м.н., зав. кафедрой акустики физического факультета³

Т. Н. Горшкова, зав. лабораторией⁴

¹ООО «Фирма «БИОМ»», г. Нижний Новгород

²ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского», г. Нижний Новгород

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», г. Москва

⁴ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, г. Нижний Новгород

Acoustic method for determining apo A1 and apo B in serum

V. A. Klemín, S. N. Gurbatov, O. V. Rudenko, A. V. Klemína, I. Yu. Demin, T. N. Gorshkova

BIOM Co., Nizhni Novgorod; the Nizhni Novgorod State University n.a. N. I. Lobachevsky, Nizhni Novgorod; the Moscow State University n.a. M. V. Lomonosov, Moscow; the Volga District Medical Centre, Nizhni Novgorod; Russia

Резюме

В статье представлены результаты исследований аполипопротеина А1 (апо А1) и аполипопротеина В (апо В) сыворотки крови человека методом интерферометра постоянной длины. Акустический метод реализован на акустическом анализаторе «БИОМ». На основании проведенных исследований разработан безреагентный акустический метод определения апо А1 и апо В сыворотки крови. Проведены сопоставительные исследования определения апо А1 и апо В традиционным и акустическим методами на сыворотках 140 пациентов с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями. Коэффициент корреляции составил 91 %.

Ключевые слова: лабораторная диагностика без реагентов, акустический метод, акустический анализатор, апо А1 и апо В.

Summary

In the article the results of researches of apolipoprotein A1 and apolipoprotein B in serum blood of a man by method of interferometer of permanent length are presented. The acoustic method is realized on BIOM acoustic analyzer. On the basis of conducted researches the reagentless acoustic method of determination of apo A1 and apo B is developed in blood serum. Comparable researches of determination of apo A1 and apo B were conducted with traditional and acoustic methods on sera of 140 patients with different cardiac and vascular diseases. The coefficient of correlation was equal to 91 %.

Key words: laboratory diagnostics without reagents, acoustic method, acoustic analyzer, apo A1 and apo B.

Акустические исследования биологических жидкостей позволяют изучать тонкие структурные характеристики и гидратацию биологических макромолекул в растворе, их межмолекулярные взаимодействия и конформационные перестройки биополимеров [1]. На основе этой информации при использовании определенных модельных представлений возможно анализировать состав сложных биожидкостей, таких как сыворотка крови, желудочный сок, слюна и т. д. [2] Акустические исследования биожидкостей *in vitro* стали возможными с появлением прецизионного резонаторного метода измерения скорости и поглощения ультразвука в сверхмалых количествах жидкости (менее 0,1 мл) с разрешением по скорости порядка $10^{-4}\%$ и по поглощению порядка $10^{-2}\%$ [3].

На основе акустического резонаторного метода фирмой «БИОМ» разработан и производится прибор — анализатор акустический «АКБа-01 БИОМ», который после всесторонних клинических испытаний зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития России (регистрационное удостоверение на медицинское изделие № ФСР 2010/07996

от 22 июня 2010 года) и Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии России (сертификат об утверждении типа СИ RU.C.39.011 А № 23578). Прибор предназначен для определения общего белка и белковых фракций сыворотки крови (альбумин, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, γ -глобулины). Ставропольской государственной медицинской академией разработаны и утверждены методические указания по использованию анализатора акустического «АКБа-01 БИОМ» для определения без реагентов концентрации липидов в сыворотке крови и липопротеидов различной плотности у человека (холестерина общего, холестерина липопротеидов высокой плотности, холестерина липопротеидов низкой плотности и триглицеридов) [4].

В настоящее время более 120 приборов успешно используются в клинико-диагностических лабораториях ЛПУ в различных городах России. Безреагентные методы, реализованные на анализаторе акустическом «АКБа-01 БИОМ», дают значительный экономический эффект. Прибор надежен, прост в эксплуатации и техническом обслуживании, 90% комплектующих для изготовления прибора производятся в России.

Вопросы диагностики, профилактики и лечения болезненной системы кровообращения (БСК) — ведущей причины смертности во всех индустриально развитых странах — уже несколько десятилетий занимают как теоретическую медицину, так и врачей-практиков. Среди многих факторов риска развития БСК важнейшим является гиперлипидемия. Многочисленными исследованиями показано, что обязательным является определение, помимо холестерина общего, еще холестерина ЛПВП, холестерина ЛПНП и триглицеридов, а также аполипопротеина А1 (апо А1) и аполипопротеина В (апо В). Следует подчеркнуть, что определение апо А1 и апо В имеет большое значение для выявления факторов риска атеросклероза коронарных артерий в популяции, а отношение апо В / апо А1 превосходит прогностическое значение отдельных апо ЛП.

Для определения содержания апо А1 и апо В в сыворотке крови применяют разные методические подходы. Разделение аполипопротеинов на основании их физико-химических свойств (электрофорез на разных поддерживающих средах, изоэлектрическое фокусирование) используют для качественного определения аполипопротеинов, а также (в сочетании со сканирующей денситометрией) для оценки соотношения аполипопротеинов. Методы применяют в научных исследованиях или используют как диагностические тесты в специализированных лабораториях, их применение в обычной лабораторной практике в настоящее время затруднительно.

Большая часть методов определения аполипопротеинов основана на принципах иммунохимического анализа: иммунотурбидиметрия и иммунонефелометрия, радиальная иммунодиффузия и иммуноэлектрофорез, иммуноферментный и радиоиммунный анализ. Для количественного иммунохимического определения необходимо иметь специфическую анти сыворотку и стандарт.

Используемые в настоящее время методы определения аполипопротеина А1 и аполипопротеина В в сыворотке крови обладают рядом существенных недостатков, общими из которых являются: длительное время проведения анализа; зависимость результатов от качества используемых реактивов; чувствительность существующих методов к температуре; мутность сыворотки, обусловленная высокой концентрацией липопротеидов, богатых триглицеридами.

Кроме того, каждый из известных способов предназначен для определения только одного из компонентов. Отсутствует единый универсальный метод одновременного определения аполипопротеина А1 и аполипопротеина В в сыворотке крови.

Целью данного исследования явилась разработка нового акустического безреагентного способа определения аполипопротеина А1 и аполипопротеина В в сыворотке крови с использованием анализатора акустического «АКБа-01 БИОМ», см. рис.

В приборе применяется метод интерферометра постоянной длины, основанный на использовании стоячих ультразвуковых волн в цилиндрическом резонаторе. Термостатирование акустических ячеек выполняет специализированный ультратермостат. Точность поддержания температуры в ячейках объемом 90 мкл составляет 0,002 °С.



Рисунок. Анализатор акустический «АКБа-01 БИОМ».

Точность измерения относительной скорости ультразвука в сыворотке крови на приборе «БИОМ» составляет величину порядка 2×10^{-6} . Это было определено с использованием растворов NaCl различной концентрации [4] и данных по скорости ультразвука в дистиллированной воде [5]. Для поглощения ультразвука была определена точность измерения порядка 10^{-2} с помощью сопоставления с литературными данными по растворам $MnSO_4$ [6].

Для определения аполипопротеина А1 и аполипопротеина В сыворотка крови помещается в акустические ячейки, в которых выполняется температурное (в диапазоне 25–40 °С) и частотное сканирование (в диапазоне 6–12 МГц) сыворотки в течение 45 с. Это позволяет определить скорость и поглощение ультразвука в сыворотке крови, их частотные и температурные зависимости на основании полученных данных определяют относительные изменения скоростей ультразвука в сыворотке крови при соответствующих температурах, и дополнительно определяют частотный коэффициент поглощения и температурный коэффициент скорости ультразвука в сыворотке крови, после чего определяют концентрацию апо А1 и апо В в г/л, решая систему уравнений, рассматривая в качестве неизвестных указанные компоненты сыворотки крови:

$$\begin{aligned} K1 \times (ано А1) + K2 \times (ано В) &= \Delta\varphi_1 \\ K3 \times (ано А1) + K4 \times (ано В) &= \Delta\xi_2 \end{aligned}$$

где $\Delta\varphi_1 = (\varphi_1 - \varphi_2)/\Delta t$, $\Delta\xi_2 = (\xi_1 - \xi_2)/\Delta f$, φ_1 — относительное изменение скорости ультразвука в сыворотке крови относительно дистиллированной воды, помещенных в акустическую ячейку № 1; φ_2 — относительное изменение скорости ультразвука в сыворотке крови относительно дистиллированной воды, помещенных в акустическую ячейку № 2; $\Delta t = t_1 - t_2$ — разность температур между акустическими ячейками № 2 и № 1, ξ_1 — разность коэффициентов поглощения ультразвука в сыворотке крови и дистиллированной воде в акустической ячейке № 1 при частоте f_1 , ξ_2 — разность коэффициентов поглощения ультразвука в сыворотке крови и дистиллированной воде в акустической ячейке № 2 при частоте f_2 , Δf — разность частот между акустической ячейкой № 2 и акустической ячейкой № 1, $K1$ — концентрационный коэффициент от-

носительной скорости ультразвука для аполипопротеина А1; К2 — концентрационный коэффициент относительной скорости ультразвука для аполипопротеина В; К3 — концентрационный коэффициент поглощения ультразвука для аполипопротеина А1; К4 — концентрационный коэффициент поглощения ультразвука для аполипопротеина В.

На основе решения этой линейной системы уравнений, в которой в качестве неизвестных рассматриваются апо А1 и апо В, определяют концентрацию этих липидных компонентов сыворотки крови, а также их отношение, характеризующее степень риска сердечно-сосудистой патологии.

При определении аполипопротеина А1 и аполипопротеина В на аппарате «БИОМ» были выполнены проверки воспроизводимости (внутрисерийной и аналитической) и правильности (сравнением с контрольными сыворотками Serodos и Serodos plus, Human, Германия).

При проведении сравнительных исследований сыворотки крови для разных групп пациентов иммунотурбидиметрическим и акустическим методами установлена высокая степень корреляции, которая составила 0,91. Выполненные исследования позволили разработать новый акустический метод определения аполипопротеина А1 и аполипопротеина В в сыворотке крови человека. Метод не требует дорогостоящей аппаратуры и биохимических реактивов и в то же время имеет хорошие корреляционные соотношения с традиционными методами. Время выполнения акустического анализа аполипопротеина А1 и аполипопротеина В в сыворотке крови сокращено в 12 раз по сравнению с традиционным методом. Совершенствование

разработанной модели позволит уменьшить различие результатов двух методов и внедрить акустический метод определения аполипопротеина А1 и аполипопротеина В в широкую медицинскую практику.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-42-02586, а также при поддержке базовой части государственного задания по теме 2014/134, проект 1822.

Список литературы

1. Сарвазян А. П., Харакоз Д. П. Акустические исследования конформационных состояний белков в водных растворах. // В сб.: Молекулярная и клеточная биофизика. — М.: Наука. 1977. — С. 93.— 106.
2. Klemm V. A., Karev I. D., Sarvazyan A. P., Timokhina L. M., Ruchkin V. V., Mayorov E. A. Relation of acoustic characteristics of Human gastric juice to its composition for some stomach diseases. // *Studia biophysica.*— 1981. V. 84, № 2.— P. 139–144.
3. Гурбатов, С. Н., Клемина, А. В., Демин, И. Ю., Клемин, В. А. Акустический анализ состава сыворотки крови человека. // *Акустический журнал.*— 2009. Т. 55, № 4–5.— С. 496–505.
4. Методические указания по использованию акустического анализатора АКБа-01-«БИОМ» для определения без реагентов концентрации липидов и липопротеидов различной плотности у человека. Под редакцией проф. Ю. В. Первушина. — Ставрополь: СтГМА, 2006, с. 26, табл. 5.
5. Millero F. J., Vinokurova F., Fernandez M., Hershey P. J. PVT properties of concentrated electrolytes. 4. the speed of sound and molar compressibilities of NaCl, Na₂SO₄, MgCl₂, MgSO₄ solutions from 0 to 100 °C. // *J. Solution Chemistry.*— 1987. V. 16, № 4.— P. 269–284.
6. Del Grosso V. A., Mader C. W. Speed of sound in pure water. // *JASA.*— 1972. V. 52.— P. 1442–1446.
7. Стюэр Дж., Егер Э. Распространение ультразвуковых волн в растворах электролитов. // В кн. *Физическая акустика*, под. ред. Мазона. — М.: Наука. 1968. Т. 2.— С. 371–485.



БЕЗРЕАГЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АНАЛИЗАТОР АКУСТИЧЕСКИЙ АКБа-01-БИОМ



- акустический метод технологичен и прост (не требует для работы квалифицированного специалиста)

- не требуется реагентов и дорогих расходных материалов

- мультифункциональность анализатора; один анализатор заменяет несколько лабораторных приборов (СОЭ-метр, гемоглобинометр и устройство электрофореза белков), экономия средства на приобретение и обслуживание

- общий белок, белковые фракции (альбумин, α1, α2, β, γ-глобулины);
- липидный профиль (холестерин общий, холестерин ЛПНП, ЛПВП и ЛПОНП, коэффициент атерогенности);
- степень адаптации I-VI (группы риска онкопатологии внутренних органов);
- гемоглобин, гематокрит, количество эритроцитов и их основные индексы;
- СОЭ

- стоимость анализатора для определения общего белка и белковых фракций минимальна среди устройств электрофореза белков

- быстрое определение СОЭ
~ 3 мин анализ (~100 мкл крови)
- быстрое определение гемоглобина
~ 30 сек анализ (~100 мкл крови)
- липидный профиль: одновременное определение всех показателей за 1 мин
- белковые фракции ~ 3 мин анализ (не требуется денситометр, сканирование)

- ежегодный эффект экономии реагентов и расходных материалов составит:
• липидный профиль ~1 700 000 рублей в год
• белковые фракции ~700 000 рублей в год
• СОЭ и красная кровь ~300 000 рублей в год (при выполнении КДЛ ежедневно 20 анализов на биохимическом анализаторе, устройстве электрофореза)

- компактность и минимальное энергопотребление (~30 ВА) позволяет экономить средства и площадь

- производственная и сервисная база в России - залог недорогой, стабильной поддержки работы анализатора на весь срок эксплуатации

Фирма БИОМ
+7 831 434 50 80
info@bim.biz, www.biom.biz