

547.963:543.062

MOŽNOSTI A ÚSKALÍ KVANTIFIKACE APOLIPOPROTEINŮ A-I A B V KLINICKÉ PRAXI

Pplk. MUDr. Bohuslav CHOLUJ,¹ npor. MUDr. Tomáš VOTRUBA,²

MUDr. Jarmila KLEŠTINCOVÁ¹

¹Oddělení klinické biochemie Ústřední vojenské nemocnice, Praha

(náčelník: pplk. MUDr. Bohuslav Choluš)

²Oddělení klinické a experimentální imunologie Vojenského ústavu hygieny,
epidemiologie a mikrobiologie, Praha

(náčelník: plk. MUDr. Josef Vančouř, CSc.)

Apolipoproteiny A tvoří hlavní bílkovinnou složku plazmatických lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL), kterým se přisuzuje ochranný vliv na cévy, proti ateroskleróze. Apolipoprotein A-I je schopen zachycovat přebytečný cholesterol např. z pěnových buněk v aterosklerotickém ložisku a přenášet jej ve třídě HDL do jater. Vedle toho apolipoprotein A-I (Apo A-I) aktivuje enzym lecitin-cholesterol: acyltransferázu (LCAT), který je nezbytný pro esterifikaci plazmatického cholesterolu. V roce 1983 na klinice Mayo v USA (1) u nemocných s pozitivním koronarografickým nálezem našli Maciejko a spol. sníženou koncentraci Apo A-I v séru ($p < 0,001$). Plazmatická koncentrace HDL-cholesterolu byla ve významnosti až na druhém místě; přitom však je třeba brát v úvahu, že jeho pokles může snadno ovlivnit celá řada nespecifických faktorů, proti kterým je Apo A-I podstatně odolnější (léky, virový, akutní zátěž atd.).

Obě hlavní izoformy apolipoproteinu B (Apo B) — Apo B 48, tzv. střevní, a Apo B 100, tzv. jaterní — jsou obsaženy ve více lipoproteinových třídách v chylomikronech, v lipoproteinech o velmi nízké hustotě (VLDL), v lipoproteinech o nízké hustotě (LDL), ale i v Lp (a), které při zvýšené koncentraci mohou působit aterosogenně.

Je proto snahou klinických biochemiků určit s vysokou pravděpodobností riziko ohrože-

ní aterosklerotickým procesem, nebo určovat takové biochemické markery metabolismu lipidů a lipoproteinů, které již přítomné aterosklerotické ložisko odhalí (2). Smyslem tohoto sdělení je tedy podat stručný přehled možnosti stanovování hlavních (majoritních) apolipoproteinů A-I, A-II a B, vyčlenit metodiky vhodné i pro menší laboratoře a na druhé straně upozornit na metody, které je možno aplikovat i na složitější techniku, jako jsou např. automatické analyzátory na větších OKB.

Ze starších metodik, které se dnes objevují již jen ojediněle, které však měly základní význam pro vypracování dalších technik, je pro úplnost vhodné připomenout neimunologické metody ultracentrifugační flotace (3), ultracentrifugace v hustotním gradientu a selektivní precipitace různými činidly. Z hlediska stanovení apolipoproteinů se dnes částečně používají jen metody selektivní precipitace, které však v současné době prožívají určitou renesanci (4).

Převažujícími jsou dnes metodiky imunochemické, což logicky vyplývá z toho, že apolipoproteiny jsou bílkovinné povahy. Z metod, které se dnes široce využívají: jednoduchá radiální imunodifúze, elektroimunostanovení, imunonefelometrie, imunoturbidimetrie, enzymoimunostanovení a radioimunostanovení. Některé základní charakteristiky těchto metodik jsou uvedeny v tabulce 1.

Radiální jednoduchá imunodifúze (4) je svým provedením nejjednodušší. Je velmi vhodná i pro nejskromnější podmínky. Lze ji využít

* Z příspěvku na IX. celostátní konferenci s mezinárodní účastí „Klinická a biochemická genetika hyperlipoproteinémií“.

Tab. 1
Srovnání některých základních charakteristik imunochemických metodik

Metoda	Citlivost (mg/l)	Časové nároky	Přesnost (%)	Automatizovatelnost
Jednoduchá radiální imunodifúze	10	1–3 dny	10–50	NE
Elektroimunostanovení	1,0	6–36 h	10	NE
Imunonefelometrie	0,1–0,2	1 min–2 h	2–5	ANO
Imunoturbidimetrie	0,2–0,5	1–20 min	2–5	ANO
Enzymoimunostanovení	0,05–0,1	12 h–3 dny	5–10	ANO
Radioimunostanovení	0,01	3 h–5 dní	5–10	ANO

především pro stanovení apolipoproteinů v třídě HDL (především Apo A-I a Apo A-II), méně vhodná je pro stanovení apolipoproteinů ve třídě LDL a VLDL (Apo B). Nevýhodou je délka provedení vlastního stanovení, možné zkreslení výsledků v důsledku agregace bílkovin rozdílné velikosti lipoproteinových molekul, skutečnost, že se metoda nedá automatizovat.

Elektroimunostanovení (dle Laurella „raketková technika“) je velmi výhodná metoda (5). Je realizovatelná i ve skromných laboratorních podmínkách. Neuplatňuje se zde vliv agregace a rozdílná velikost molekul, dá se současně provádět stanovení Apo A-I i Apo B. Jistou nevýhodou jsou malé série stanovení, protože každou agarózovou vrstvu je nutno kalibrovat samostatně.

Metody využívající zákal tvořený komplexem antigen-protilátka v kapalném prostředí — imunonefelometrie a imunoturbidimetrie — se staly v posledních letech převažujícími metodami pro stanovení plazmatických apolipoproteinů (6, 7). Velikou předností těchto metodik je rychlost, automatizovatelnost a citlivost, čímž splňují základní požadavky na moderní kvantitativní technologii. V případě turbidimetrie se dají využívat dnes již dosti rozšířené automatické analyzátory. Podle našich zkušeností se komerční antiséra proti apolipoproteinům dají použít např. v systému analyzátorů Multistat III (kinetická turbidimetrie). Pro nefelometrii jsou používány přístroje dovozené výhradně z devizové oblasti (např. PDQ Hyland).

Pokud jde o užití enzymoimunostanovení (EIA) (8) a radioimunostanovení (RIA) (9) v podstatě není důvod pro zařazení těchto metodik se zesilovacím prvkem, protože v případě Apo A-I a Apo B jsou koncentrace řádu

g/l, resp. 0,1 g/l, což jsou hodnoty nevyžadující použití takto citlivých metod. Navíc RIA je přístrojově i režimově velmi náročná. V případě EIA se však dá předpokládat, že se v budoucnu přesto její používání rozšíří. Bude to dáno především tím, že EIA se dá plně automatizovat, je dosti rychlá a v zásadě nenáročná. U EIA se zatím užívá buď označení peroxidázou, nebo alkalickou fosfatázou s použitím sendvičové techniky. U RIA se používá především metoda dvojí protilátky, nebo kompetice antigenů.

V literatuře se dá najít řada prací, které srovnávají možnosti těchto technik navzájem. Výsledky se však od sebe dosti liší. Obecně se dá říci, že dobře srovnatelné jsou nefelometrie a turbidimetrie s elektroimunostanovením (10). Naopak poměrně málo koreluje RIA s jednoduchou radiální imunodifúzí (11).

Důležitou fází stanovení apolipoproteinů je také problém homogenizace různých lipoproteinových tříd při měření daného apolipoproteinu. Např. Apo B se nachází jak ve VLDL, tak v LDL. Obě tyto hustotní frakce se liší relativní molekulovou hmotností, velikostí atd. To znamená, že při stanovení protilátka přichází do styku se stejnými antigenními strukturami v různých prostorových možnostech. Aby tento rozdíl byl co možná nejmenší, provádí se homogenizace nebo delipidace vzorku. Nejstarším je delipidace vzorků organickými rozpouštědly nebo vysoce účinným chaotropním činidlem. Holmquist (12) prokázal, že většina organických rozpouštědel extrahuje jistá množství různých apolipoproteinů, a proto jsou pro tento účel nevhodná. Totéž platí pro použití chaotropních činidel. Mnohem vhodnější je užití slabších detergentů, které neruší imunochemickou reakci a jejichž účinek na vytváření homogenní populace antigenů je výrazný, např. Tween 20. Výborně se uplatnil především u nefelometrie a turbidimetrie. Oblíbené je použití také polychlórpolychlorovaným uhlovodíků, jejichž vliv na bílkoviny séra je minimální a s nimiž se dobře zachází (13). Dosud často používané a s dobrým výsledkem je srážení VLDL a LDL při stanovení Apo A-I pomocí kyseliny fosfowolframové v přítomnosti hořečnatých iontů.

Problémem je také stanovení rozmezí hodnot pro zdravou populaci. Literatura je v tomto ohledu velice nejednotná, publikované údaje se liší až téměř dvakrát. Proto pro zvolenou metodiku a standardní materiál je nutno vypracovat vlastní normy. Přesto v tabulce 2 uvádíme koncentrace apolipoproteinů A-I, A-II a B, které mohou být považovány za normální pro zdravou dospělou populaci.

Z některých problémů nastíněných v tomto článku je zřejmé, že stanovení apolipoproteinů je náročné, ale při splnění určitých základních předpokladů dostaneme výsledky, jejichž klinická aplikace je nejen moderní, ale i velice přínosná.

Tab. 2

Koncentrace majoritních apolipoproteinů pro zdravou dospělou populaci

Apolipoprotein	Střední hodnota rozmezí (g/l)	Směrodatná odchylka (g/l)
Apo A-I	1,65	0,17
Apo A-II	0,34	0,06
Apo B	0,9	0,2

Souhrn

V článku autoři stručně shrnují některé základní možnosti stanovení apolipoproteinů různými technikami. Zabývají se otázkou delipidace a homogenizace měřeného vzorku. Jsou uvedeny koncentrace Apo A-I, A-II a B pro zdravou dospělou populaci.

Literatura

- MACIEJKO, J. J. et al.: Apolipoprotein A-I as a marker of angiographically assessed coronary — artery disease. *N. Engl. J. Med.*, 309, 1983, s. 385—390.
- FRUCHART, J. Ch. et al.: Lipoproteins, apolipoproteins and coronary artery disease. *Ric. clin. Lab.*, 12, 1982, s. 101—106.
- HAVEL, R. H. - EDER, H. A. - BRAGDON, J. H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, 34, 1955, s. 1345—1353.
- MÜNSCHER, G. - METZMAN, E. - ZIEGENBEIN, W.: Standardization procedures of immunochemical apolipoprotein quantitation. *Ric. clin. Lab.*, 12, 1982, s. 143—154.
- REARDON, M. F. - POAPST, M. E. - UFFERMAN, K. D. - STEINER, G.: Improved method for quantitation of B apoprotein in plasma lipoproteins by electroimmunoassay. *Clin. Chem.*, 27, 1981, s. 892—895.
- ROSSENEU, M. et al.: Quantitative determination of human plasma apolipoprotein A-I by laser immunonephelometry. *Clin. Chem.*, 27, 1981, s. 856—859.
- LIPELL, K. - TYROLER, H. A. - GOTTO, A. et al.: Workshop on apolipoprotein quantification. *Arteriosclerosis*, 3, 1983, s. 452—464.
- KORITNIK, D. L. - RUDEL, L. L.: Measurement of apolipoprotein A-I concentration in nonhuman primates serum by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Lip. Res.*, 24, 1983, s. 1639—1645.
- CURRY, M. D. - GUSTAFSSON, A. - ALAUPOVIC, P. - McCONATHY, W. J.: Electroimmunoassay, radioimmunoassay and radial immunodiffusion assay evaluated for quantitation of human apolipoprotein B. *Clin. Chem.*, 24, 1978, s. 280—286.
- BALLANTYNE, F. C. et al.: Estimation of apolipoprotein B in man by immunonephelometry. *Clin. Chem.*, 24, 1978, s. 788—792.
- ALBUS, J. J. - CABANA, V. G. - HAZZARD, W. R.: Immunoassay of human plasma apolipoprotein B. *Metabolism*, 24, 1975, s. 1339—1351.
- HOLMQUIST, L. - CARLSON, K.: Selective extraction of human serum very low density apolipoproteins with organic solvents. *Biochim. biophys. Acta*, 493, 1977, s. 400—409.
- STEINBERG, K. K. - COOPER, G. R. - GRAISER, S. R. - ROSSENEU, M.: Some consideration of methodology and standardization of apolipoprotein A-I immunoassays. *Clin. Chem.*, 29, 1983, s. 415—425.
- KOHLMEIER, M.: Simple method for preparing and quantifying very-low-density lipoprotein. *Clin. Chem.*, 30, 1984, s. 295—297.

Klíčová slova: Stanovení koncentrace apolipoproteinů; Imunochemické metodiky; Normální hodnoty koncentrace apolipoproteinů.