

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



**STUDIUM LIPOPROTEINŮ METODOU
SEC-LLSD**

Lipoprotein Study by the SEC-LLSD Method

Diplomová práce
studijního oboru Analytická chemie

Praha 2014

Bc. Simona Šinglárová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. 5. 2014

podpis

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala své školitelce RNDr. Evě Tvrzické, CSc. za odborné vedení, všestrannou pomoc, ochotu a cenné připomínky k mojí diplomové práci. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za odborné konzultace, mým přátelům a rodině za pomoc a trpělivost.

Abstrakt

Pro diagnostiku poruch lipidového metabolismu, které je třeba podrobně sledovat u řady společensky závažných onemocnění, se v posledních 10 letech ukazuje jako velmi přínosné stanovení velikosti částic jednotlivých lipoproteinových tříd, především lipoproteinu o nízké hustotě. Z několika známých metod jsme zvolili gelovou filtraci s detektorem rozptylu světla.

Lipoproteinové frakce byly separovány ultracentrifugací z plazmy čtyř dárců. Rutinně byly stanoveny biochemické parametry – celkový cholesterol, triacylglycerol a celková bílkovina – pro plazmu i pro jednotlivé frakce. Kolona plněná silikagelem BioBasic SEC 300x7,8 mm byla kalibrována proteiny thyroglobulinem, ovalbuminem a angiotenzinem II s UV detekcí (280 nm). Tyto proteiny nejsou vhodné (velikostí) pro kalibraci metody SEC-LLSD. Proto byly vyzkoušeny latexové kuličky různých modifikací a velikostí. Jediný záznam se podařilo získat od latexových kuliček barvených tmavě modře o velikosti 55 nm, ostatní zůstaly zadrženy v koloně. Lipoproteinové frakce VLDL a LDL byly zkoumány metodou SEC-LLSD při různém pH (7,3; 7,5; 7,7; 8,0) a iontové síle (0,1M fosfátový pufr, 0,1M fosfátový pufr a 0,9% NaCl, 0,05M fosfátový pufr a 0,9% NaCl). Optimální mobilní fáze je 0,1M fosfátový pufr a 0,9% NaCl. Dále byla provedena analýza spojených frakcí VLDL a LDL, která poskytla dva nedokonale rozdělené píky. Pro stanovení střední molekulové hmotnosti by rozdělení bylo vyhovující, pro sledování kvantitativních vztahů by bylo třeba dokonalejšího rozdělení – spojením více kolon v sérii, případně volbou jiné stacionární fáze.

Abstract

The disorders of the lipid metabolism have to be monitored for a number of socially significant diseases. For the diagnosis of these disorders, it turned out in the last 10 years as very beneficial to determine the particle size of the individual lipoprotein classes, in particular the low-density lipoprotein. Among several known methods, we have chosen gel filtration with the light scattering detector.

Lipoprotein fractions were separated by ultracentrifugation from the plasma of four donors. Three biochemical parameters – total cholesterol, triacylglycerol, and total protein – were routinely determined for plasma and for each fraction. The silica column BioBasic SEC 300x7,8 mm was calibrated by the proteins thyroglobulin, ovalbumin and angiotensin II with UV detection (280 nm). These proteins are not suitable (due to the size) for the calibration method SEC-LLSD. Therefore, latex beads of various modifications and sizes were tested. The only usable measurement was obtained for the deep-blue latex beads of the size 55 nm, the others remained retained in the column. The lipoprotein fractions of VLDL and LDL were examined by the SEC-LLSD method at different pH (7.3, 7.5, 7.7, 8.0) and ionic strength (0.1M phosphate buffer, 0.1M phosphate buffer and 0.9% NaCl, 0.05M phosphate buffer and 0.9% NaCl). The optimal mobile phase is the 0.1M phosphate buffer and 0.9% NaCl. Further, the mixture of the VLDL and LDL fractions was analyzed, which yielded two imperfectly divided peaks. To determine the average molar mass, this distribution would be acceptable. However, to analyze the quantitative relations more accurately, a more precise distribution would be needed. It could be achieved by combining multiple columns in a series or by selecting a different stationary phase.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část	11
2.1	Lipoproteiny.....	11
2.1.1	Charakteristika lipoproteinů	11
2.1.2	Dělení lipoproteinů	12
2.1.3	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL).....	12
2.1.4	Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL).....	13
2.1.5	Separace lipoproteinů	14
2.1.6	Detekce pro separaci lipoproteinů	18
2.2	Gelová permeační chromatografie.....	19
2.2.1	Princip separace gelovou permeační chromatografií.....	19
2.2.2	Náplně kolon.....	19
2.3	Detektor rozptylu světla.....	21
2.3.1	Metody absolutního měření	21
2.3.2	Historický vývoj detekce rozptylu světla.....	21
2.3.3	Parametry detektoru	22
3	Cíl práce.....	23
4	Experimentální část.....	24
4.1	Aparatura a reagensie	24
4.2	Příprava hustotních roztoků pro ultracentrifugaci	24
4.2.1	Hustotní roztok $\rho = 1,006$ g/ml.....	25
4.2.2	Hustotní roztok $\rho = 1,157$ g/ml.....	25
4.2.3	Hustotní roztok $\rho = 1,182$ g/ml.....	25
4.2.4	Hustotní roztok $\rho = 1,210$ g/ml.....	25
4.2.5	Pyknometrické měření hustoty roztoků	25
4.3	Fosfátový pufr.....	26

4.4	Fyziologický roztok	26
4.5	Příprava standardů	26
4.6	Příprava vzorků.....	26
5	Výsledky a diskuze	28
5.1	Ověření retenčních časů.....	28
5.2	Kalibrace pomocí latexových kuliček.....	31
5.3	Reprodukovatelnost retenčních časů VLDL a LDL	32
5.4	Analýzy lipoproteinových tříd VLDL a LDL.....	33
5.4.1	Chromatogramy VLDL a LDL vzorku A – vliv pH.....	34
5.4.2	Chromatogramy VLDL a LDL vzorku B – vliv pH.....	36
5.4.3	Chromatogramy VLDL a LDL vzorku C – vliv pH.....	38
5.4.4	Chromatogramy VLDL a LDL vzorku D – vliv pH.....	40
5.5	Analýza vzorku B při různém složení mobilní fáze	43
5.6	Společná analýza lipoproteinových frakcí VLDL a LDL.....	44
6	Závěr	46
7	Literatura.....	47

Seznam symbolů a zkratek

AK	aminokyseliny
CB	celková bílkovina
CL	chylomikrony
ER	endoplazmatické retikulum
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
CH	cholesterol
IDL	lipoproteiny o střední hustotě
LCAT	lecitin:cholesterol acyltransferáza
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LLSD	detektor rozptylu světla
LPL	lipoproteinová lipáza
MK	mastné kyseliny
NEMK	volné mastné kyseliny
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SEC	gelová permeační chromatografie
TAG	triacylglyceroly
TC	celkový cholesterol
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

1 Úvod

Metody pro studium lipidového metabolismu i pro diagnostiku jeho poruch zaznamenaly v posledních 50 letech značný rozvoj. Na počátku 70. let minulého století byla prakticky jediným diagnostickým parametrem koncentrace celkového cholesterolu. Vyšetření tzv. celkové lipemie spektrofotometricky, které spočívalo v měření intenzity produktu sulfofosfovanilinové reakce lipidů, bylo nespecifické a nemělo prakticky žádnou diagnostickou hodnotu.¹ Dnes pod pojmem celková lipémie rozumíme gravimetrické stanovení celkových lipidů v krevním séru; separovaný produkt může být výchozím materiálem pro detailnější chromatografické analýzy. V polovině 70. let tak vyvstala potřeba spolehlivějšího parametru pro diagnostiku metabolických poruch, postupně se rozšířilo stanovení triacylglycerolů. Jejich chemické stanovení bylo založeno na měření oxidačních produktů uvolněného glycerolu, ze vzorku však bylo třeba odstranit rušící fosfolipidy (především lecitin). Konečné řešení přinesly až enzymatické metody založené na selektivní hydrolýze triacylglycerolů specifickými enzymy. Asi v polovině 80. let minulého století bylo dostupné i stanovení fosfolipidů, založené na stanovení lipidního fosforu jako fosfomolybdenové modři. V současné době se již neprovádí.

Existence lipoproteinů je známa již od 60. let.² Jejich detailní analýza je nejvýznamnějším přínosem pro diagnostiku, ale přes všechny pokroky ještě konečného výsledku nebylo dosaženo. Prvním krokem v tomto směru bylo stanovení cholesterolu v lipoproteinu o vysoké hustotě (HDL-cholesterolu), k tomu přibylo stanovení charakteristické bílkoviny pro lipoprotein HDL – apolipoproteinu AI. Analýza vyžaduje specifickou precipitaci lipoproteinů o nízké a velmi nízké hustotě (LDL a VLDL). V 80. letech se k rutinním analýzám přidalo ještě stanovení cholesterolu v lipoproteinu LDL, jeho charakteristického apolipoproteinu B100, a rovněž elektroforetické stanovení celkového profilu lipoproteinů s detekcí bílkoviny.³ Lipoprotein LDL je znám

jako aterogenní částice, jeho zvýšená koncentrace je jedním z rizikových faktorů aterosklerózy a jejích komplikací. Proto se upřel zájem výzkumných pracovníků právě na studium tohoto lipoproteinu. V 90. letech se objevily studie popisující výskyt aterogenní frakce LDL s malými částicemi, nazvanými „malé denzní LDL“, které se ve větší míře objevují u osob s metabolickými poruchami.^{4,5,6} Začaly se hledat metodiky, které by velikost částic LDL i dalších lipoproteinů umožnily stanovit rutinně alespoň na specializovaných pracovištích. V první dekádě nového tisíciletí již byly publikovány studie diskutující vhodnost a objektivitu možných metod – nukleární magnetické rezonance, elektroforézy na gradientu polyakrylamidu, elektroforézy na sloupci polakrylamidu⁷ a gelové filtrace na kolonách plněných TSK gely a sefarózou.⁸ Pro kontrolu chromatografie, někdy i pro samotný výzkum, sloužila příprava jednotlivých lipoproteinů ultracentrifugací. Detekce byla i v této době realizována UV-VIS detektorem a byly sledovány bílkoviny, pomocí tzv. „post-column reaction“ cholesterol a triacylglyceroly, případně byla provedena chemická reakce ve sbíraných frakcích eluátu a chromatogram sestával z jednotlivých bodů.⁹ Detekce pouze některé ze složek lipoproteinů však zkresluje kvantitativní vztahy. K detekci velikosti lipoproteinové částice LDL byl v minulosti již použit detektor rozptylu světla, ve srovnání s gradientovou elektroforézou na polyakrylamidu. Princip detekce v tomto případě spočíval ve sledování Brownova pohybu a velikost částic byla určena za základě difúzního koeficientu. Využili faktu, že menší částice se pohybují rychleji.¹⁰

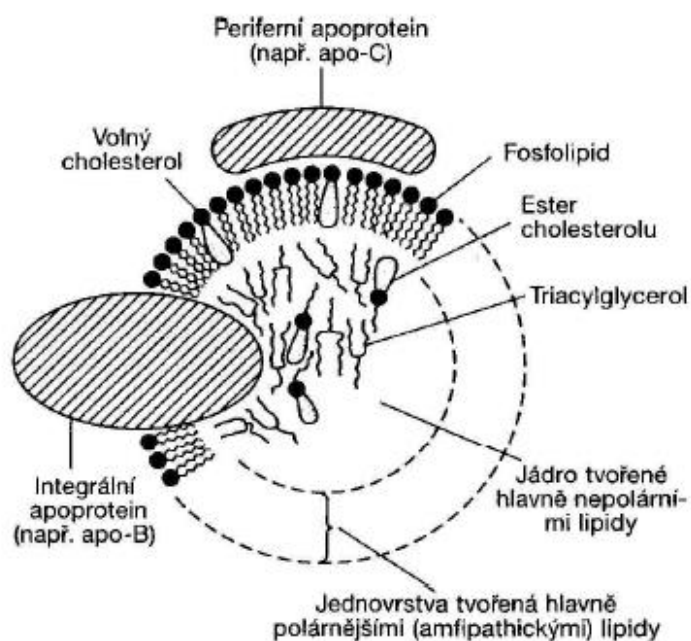
Všechny dosavadně používané metody jsou značně pracné a v současné době je nelze provádět rutinně. Spojení gelové filtrační chromatografie by mohlo nabídnout spolehlivou, jednoduchou a přesnou metodu měření velikosti lipoproteinových částic.

2 Teoretická část

2.1 Lipoproteiny

2.1.1 Charakteristika lipoproteinů

Lipoproteiny jsou transportní forma plazmatických lipidů. Jejich tvar je většinou kulovitý. Triglyceridy a estery cholesterolu (hydrofobní lipidy) tvoří nepolární jádro a jejich transport je zajištěn asociací s polárnějšími lipidy, které jsou zde zastoupeny fosfolipidy a volným cholesterolem. Ty tvoří povrch lipoproteinu. Další složkou jsou specifické bílkoviny, nazývané apolipoproteiny či apoproteiny. Taktéž přispívají k hydrofilitě částice, transportu hydrofobních lipidů a dále zajišťují vazbu lipoproteinu na receptory buněčných membrán a enzymů či výměnu lipidů mezi lipoproteinovými třídami. Apolipoproteiny jsou na povrchu částice, zanořeny, a jejich hydrofilní část je orientována do vodného prostředí (viz Obr. 2.1).^{1,11-14}



Obr. 2.1: Schéma lipoproteinů¹⁵

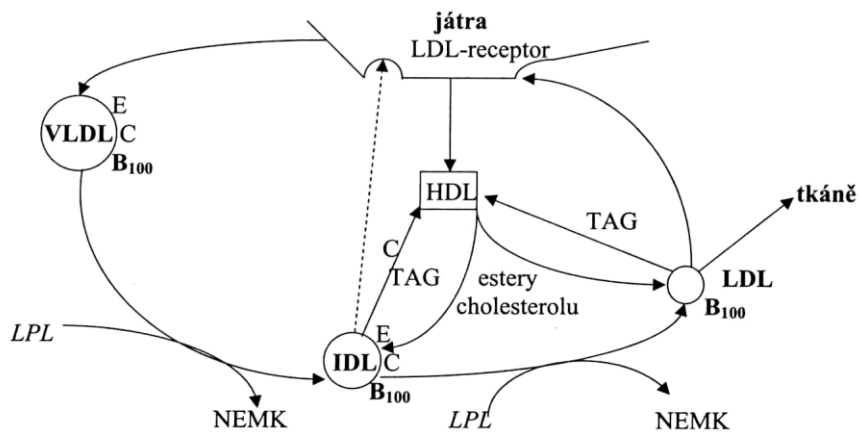
2.1.2 Dělení lipoproteinů

Každý lipoprotein je charakterizován svým chemickým složením a fyzikálními vlastnostmi. Chemické složení je dané poměrným zastoupením jednotlivých složek: fosfolipidů, cholesterolu a jeho esterů, triglyceridů a apolipoproteinů. Lipoproteinové frakce dělíme podle hustoty, flotační konstanty (Sf), elektroforetické pohyblivosti, chemického složení, zastoupení jednotlivých apolipoproteinů. Jednotlivé lipoproteinové třídy nesou z praktických důvodů názvy charakterizující částice na základě jejich hustoty:

- 1) CL – chylomicrons = chylomikrony (chylomikra)
- 2) VLDL – very low density lipoproteins = lipoproteiny o velmi nízké hustotě
- 3) LDL – low density lipoproteins = lipoproteiny o nízké hustotě
- 4) IDL – intermediate density lipoproteins = lipoproteiny o střední hustotě
- 5) HDL – high density lipoproteins = lipoproteiny o vysoké hustotě ^{1,11,15}

2.1.3 Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)

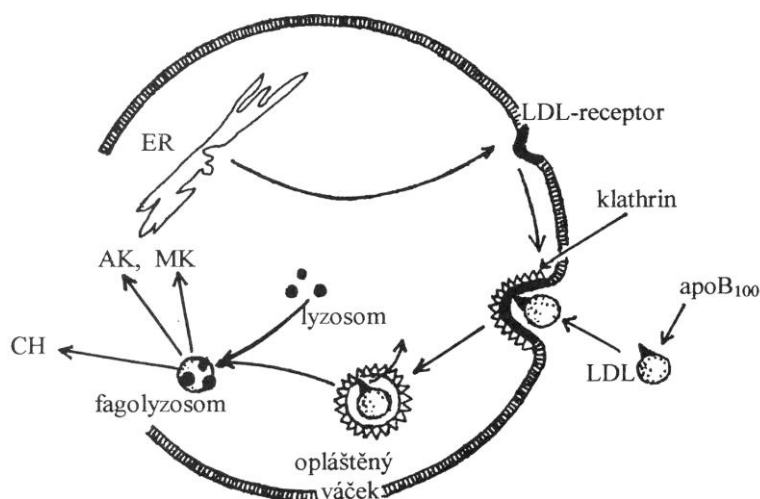
Plazmatické VLDL jsou syntetizovány v játrech parenchymovými buňkami. Tato třída lipoproteinů obsahuje v charakteristickém fosfolipidovém obalu zanořené apolipoproteiny typu Apo B-100, Apo E a všechny subtypy Apo C. Apolipoprotein B-100 je syntetizován na ribozomech endoplazmatického retikula, v hladkém endoplazmatickém retikulu je zabudován do lipoproteinu. Lipoproteiny se zabudovanou proteinovou složkou prochází Golgiho aparátem, kde jsou navázány sacharidové zbytky a jsou uvolněny z jaterní buňky splynutím sekreční vakuoly s buněčnou membránou do Disseova prostoru a následně do jaterních sinusoidů. Působením lipoproteinové lipázy (LPL) periferních tkání a za účasti lecitin:cholesterol acyltransferázy (LCAT) jsou VLDL metabolizovány přes meziprodukt (IDL) na LDL (viz Obr. 2.2). Velikost částic lipoproteinové třídy VLDL kolísá od 280 do 450 Å, střední molekulární hmotnost je $2,6 \cdot 10^7$ daltonů. ^{3,15,16}



Obr. 2.2: Přeměna VLDL na další lipoproteinové třídy.¹⁷ NEMK – volné mastné kyseliny, TAG – triacylglyceroly, C – apolipoprotein C, E – apolipoprotein E, B₁₀₀ – apolipoprotein B-100, LPL – lipoproteinová lipáza

2.1.4 Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)

Lipoproteiny LDL jsou produktem metabolismu VLDL. Vznikají přes meziprodukt, kdy je odštěpena část triacylglycerolů, proteinů a esterů cholesterolu. Jediným apolipoproteinem, který zůstává v částici během celého procesu, je Apo B-100. LDL jsou díky němu rozeznány specifickými receptory v buněčné membráně, dochází k pinocytóze a odbourání těchto lipoproteinů v buňce (viz Obr. 2.3). Takto se dostává cholesterol a další LDL složky (včetně vitaminů rozpustných v tucích) do cytoplazmy buněk různých tkání. Lipoproteiny o nízké hustotě jsou zastoupeny několika subfrakcemi, z medicínského hlediska jsou nejzajímavější malé denzní LDL. Obsahují méně cholesterolu než větší LDL částice, ale snáze podléhají modifikaci a díky menší velikosti snadněji pronikají do subendotelového prostoru a nejsou zachyceny LDL receptory. Ve srovnání s většími LDL mají tedy výraznější aterogenní vlastnosti. Velikost částic této lipoproteinové třídy je 120 až 200 Å, průměrná molekulární hmotnost je $2,3 \cdot 10^6$ daltonů. Složení v LDL částicích se u každého člověka liší. U lidí s normálními hodnotami lipidů se nachází přibližně stejné množství velkých a malých LDL.^{7,15,18,19}



Obr. 2.3: Navázání LDL na receptorech buňky, pinocytóza a odbourání; ER – endoplazmatické retikulum, MK – mastné kyseliny, AK – aminokyseliny, CH – cholesterol¹⁷

2.1.5 Separace lipoproteinů

Fyzikální a chemické vlastnosti umožňují dělení lipoproteinů různými separačními metodami, zejména elektroforetickými, ultracentrifugačními, precipitačními či chromatografickými. Pro detailní studium složení lipoproteinů lze vzájemně tyto metody kombinovat. Frakce lipoproteinů prakticky nikdy není homogenní. To je důsledek variability charakterizujících znaků. Čím je hustota lipoproteinové třídy větší, tím je homogennější populace lipoproteinů.¹

Základní parametry jsou přehledně uvedeny v Tab. 2.1.

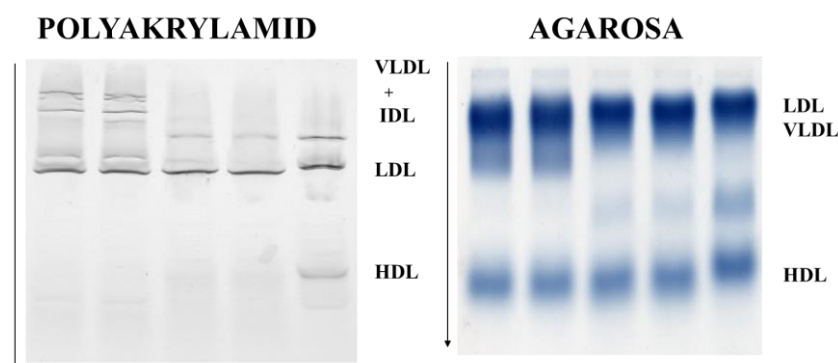
Tab. 2.1: Složení lipoproteinů v plazmě²⁰

Frakce	Zdroj	Průměr (nm)	Relativní hustota	Sf	Složení						
					Protein (%)	Celkový lipid (%)	Procenta celkového lipidů				
							TAG	Fosfolipid	Ester cholesterolu	Cholesterol (volný)	Volné mastné kyseliny
Chylomikrony	Střevo	90-1000	<0,95	>400	1-2	98-99	88	8	3	1	...
VLDL	Játra (střevo)	30-90	0,95-1,006	20-400	7-10	90-93	56	20	15	8	1
IDL	VLDL	25-30	1,006-1,019	12-20	11	89	29	26	34	9	1
LDL	VLDL	20-25	1,019-1,063	2-12	21	79	13	28	48	10	1
HDL ₂	Játra a střevo, VLDL, Chylomikrony	10-20	1,063-1,125		33	67	16	43	31	10	...
HDL ₃		7,5-10	1,125-1,210		57	43	13	46	29	6	6
Albumin-FFA	Tuková tkáň		>1,2810		99	1	0	0	0	0	100

FFA – volné mastné kyseliny, VHDL (lipoproteiny o velmi vysoké hustotě) je minoritní frakce, jejíž hustota je 1,21 – 1,25

Elektroforetické metody

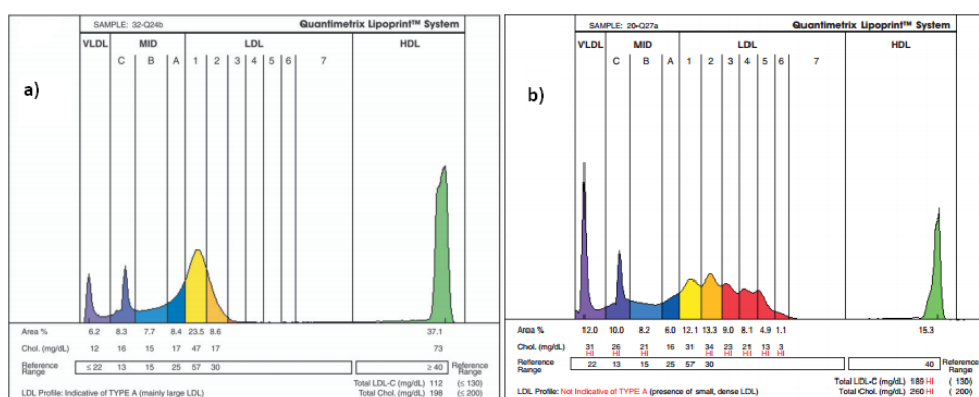
Povrchový elektrický náboj umožňuje separaci lipoproteinů elektroforetickými metodami. Je daný složením částice a určuje její elektroforetickou mobilitu. Nejčastěji používanou technikou je elektroforéza na agaróze, kterou lze dělit všechny lipoproteinové třídy. Je možné použít i jiné nosiče jako např. polyakrylamidový gel, acetát celulózy, papír. Mobilita lipoproteinových frakcí je rozdílná dle typu nosiče (viz Obr. 2.4).^{1,21}



Obr. 2.4: Srovnání elektroforézy lipoproteinových tříd na polyakrylamidovém gelu a agaróze²²

Po rozdělení jsou lipoproteiny fixovány a barveny barvivy specifickými buď pro lipid (Sudanová čerň) nebo pro bílkovinu (Coomassie Brilliant Blue); poté jsou usušeny a pomocí denzitometrie (metoda měření optické hustoty) se zjišťuje relativní zastoupení nebo obsah jednotlivých frakcí. Inovativní metodou elektroforézy na polyakrylamidovém gelu je tzv. Lipoprint (viz Obr. 2.5). Analyzuje lipoproteinové frakce a podskupiny ze séra i plazmy. Princip této metody je v měření cholesterolu v každé frakci, u lipoproteinů LDL rozlišuje až 7 podskupin. Podmínkou této separace je koncentrace celkového cholesterolu > 100 mg/dl.

Pohyblivost lipoproteinových frakcí je ovlivněna fyzikálními vlastnostmi nosiče, náboje lipoproteinů a také koncentrací nanášených vzorků. Elektroforetické metody je nezbytné provádět precizně, častým zdrojem chyb je také nestandardní kvalita nosičů.¹

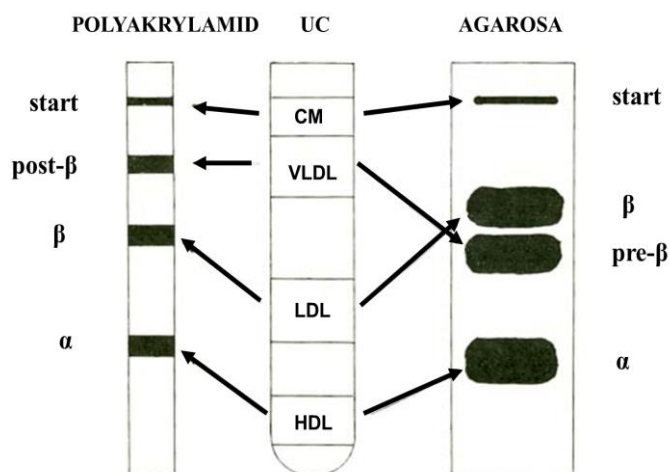


Obr. 2.5: Analýza lipoproteinových tříd krevního séra elektroforézou na polyakrylamidu: a) fyziologické rozložení, b) hyperlipoproteinemie²³

Ultracentrifugační metody

Poměr apolipoproteinů vůči lipidům určuje hustotu lipoproteinové částice, což je základní rys, který umožňuje separaci jednotlivých lipoproteinových tříd ultracentrifugací. Lipoproteiny v prostředí o různé hustotě sedimentují či flotují díky gravitačnímu poli ultracentrifugy. Postupnou změnou hustoty je možné

izolovat jednotlivé frakce, které mohou následně sloužit k detailnější analýze subfrakcí a jiným studiím. Mezi ultracentrifugačním a elektroforetickým chováním lipoproteinů existují vztahy podmíněné složením lipoproteinů a vlastnostmi nosiče (viz Obr. 2.6). Kompletní izolace lipoproteinových frakcí ultracentrifugační metodou trvá několik dní a je značně pracná.^{1,24,25}



Obr. 2.6: Srovnání elektroforetické mobility lipoproteinů na polyakrylamidovém gelu a agaróze s dělením ultracentrifugací²²

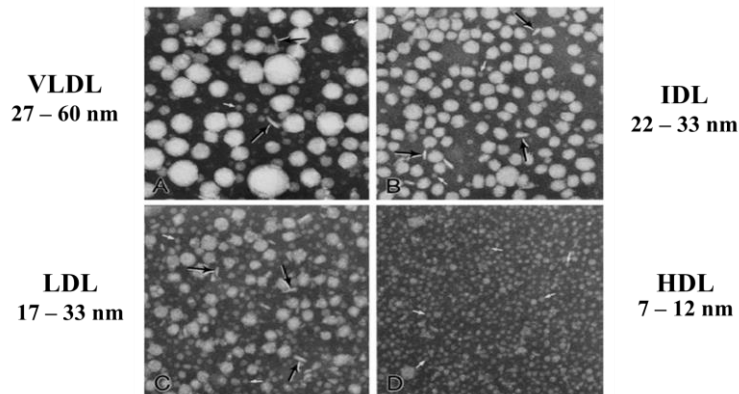
Precipitační metody

Princip těchto metod je založen na selektivním srážení lipoproteinů obsahujících Apo B-100 některými dvojmocnými ionty v přítomnosti sulfopolysacharidů. Lipoproteiny VLDL a LDL jsou vysráženy, HDL zůstávají v roztoku. Nedostatkem těchto metod je omezené použití v případě vysoké koncentrace triacylglycerolů, srážení VLDL nebývá kvantitativní. Ideální koncentrace triacylglycerolů je okolo 300 mg/dl. Precipitační metody jsou rychlé, jednoduché a bez nároků na instrumentální techniku. Je nutné dbát zvýšené opatrnosti na optimální podmínky precipitace (teplota, doba stání).¹

Chromatografické metody

Pro separaci lipoproteinů je možné využít gelovou permeační chromatografii (SEC) nebo afinitní chromatografii. U SEC se pro stanovení lipoproteinových frakcí využívají kolony plněné silikagelem, metakrylátovou pryskyřicí, sefarózou (agaróza). Separace probíhá za izokratických podmínek. U afinitní chromatografie se používá kolona plněná iontovýměnnou pryskyřicí (ligand diethylaminoethyl) a dělí lipoproteiny v opačném pořadí, než je běžné – HDL, LDL, VLDL. Druhou možností je stacionární fáze heparin-sefaróza.^{1,11}

Problémem, především u elektroforetických a chromatografických metod, je možnost kalibrace. Podobný tvar a definovanou velikost mají například latexové kuličky. Bohužel mají rozdílný povrchový náboj, tudíž jsou nevhodné pro elektroforézu a v chromatografických kolonách jsou ireverzibilně zadrženy. Jediným možným řešením je tedy sada lipoproteinových frakcí, u kterých je stanovena velikost částic pomocí elektronového mikroskopu (viz Obr. 2.7).



Obr. 2.7: Lipoproteinové třídy pod elektronovým mikroskopem²²

2.1.6 Detekce pro separaci lipoproteinů

Pro stanovení lipoproteinů se ve většině případů používá detektor UV-VIS, jehož odezva reflektuje bílkovinu, cholesterol či triacylglyceroly s využitím tzv. „post-column reaction“. Tento způsob detekce nedává objektivní informaci

o celkovém množství analyzované látky; např. lipoprotein VLDL poskytne velmi malou odezvu na bílkovinu i cholesterol, a vysokou odezvu na svou hlavní složku triacylglyceroly. S postupným zmenšováním částic lipoproteinů v řadě VLDL-LDL-HDL vzrůstá odezva na bílkovinu a cholesterol a pro triacylglyceroly klesá. Jedinou objektivní metodou pro detekci celkového množství je použití detektoru rozptylu světla, který detekuje množství hmoty procházející celou.

2.2 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační (filtrační) chromatografie je speciální druh kolonové kapalinové chromatografie. Tato metoda je vhodná například pro zakoncentrování vzorků, frakcionaci, či v našem případě pro stanovení molekulové hmotnosti.²⁶

2.2.1 Princip separace gelovou permeační chromatografií

Dělení není na principu ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází, ale stacionární fáze zde figuruje jako „molekulové síto“, tudíž separuje molekuly dle jejich velikosti. Chromatografická kolona je naplněna malými částicemi gelu, který obsahuje póry definovaných rozměrů. Prostor mezi částicemi gelu a póry je vyplněn roztokem mobilní fáze. K separaci dochází ve chvíli, kdy molekuly různých velikostí difundují do kapalně fáze přítomné v pórech gelu. Molekuly menší než póry gelu difundují a čím je průměr molekul menší, tím pronikají hlouběji, jsou déle retardovány a mají větší retenční čas. Velké molekuly, které mají průměr větší než póry gelu, nejsou zadrženy vůbec, jejich eluční čas je roven mrtvému objemu kolony.^{26,27}

2.2.2 Náplně kolon

Na počátku vývoje gelové filtrační chromatografie bylo konstrukčním materiálem sklo. Mezi výhody patří chemická i tepelná odolnost, inertnost, průhlednost umožňuje kontrolu plnění kolony a stav gelového lůžka v průběhu

používání. Nevýhodou jsou mechanické vlastnosti jako například malá odolnost vůči tlaku. Proto je v současné době nejpoužívanějším konstrukčním materiálem nerezová ocel, méně často titan či nikl.

Nejčastěji používané gely:

Dextranové gely

Dextran je produkt bakteriální přeměny sacharózy, zesíťovaný epichlorhydrinem v alkalickém prostředí. Dextranový gel se vyrábí z fragmentů dextranu. Komerční název je Sephadex.

Agarózové gely

Agaróza je polysacharid získávaný purifikací agaru z mořských řas. Při zpracování agaru se odstraní nabitě polysacharidy, zahřátý roztok elektroneutrální agarózy po ochlazení spontánně tvoří gel. Zesíťování agarózy se dosáhne reakcí s 2,3-dibrompropanolem v alkalickém prostředí. Velikost pórů určuje podíl agarózy. Komerční název Sepharosa, Bio-Gel A.

Polyakrylamidové gely

Připravují se kopolymerací akrylamidu (monomer) a N,N'-metylenbisakrylamidu (dimer). Výhodou tohoto gelu oproti výše zmíněným je odolnost proti mikrobiálnímu růstu. Komerční název je BioGel P.

Silikagel

Pórovitá forma oxidu křemičitého je nejrozšířenější polární sorbent. Lze jej připravit ve velmi čisté formě. Nejčastější velikost částic náplně je 3, 5 a 10 μm . Aktivními centry na povrchu silikagelu jsou hydroxylové resp. silanové skupiny (Si-OH). Povrch silikagelu je slabě kyselý, více zadržuje bazické látky než neutrální a kyselé a může způsobit jejich chvostování. Tomu lze zabránit přidávkem slabé organické báze do mobilní fáze. Kolony mají široké komerční využití.

Dále jsou známy i gely metakrylátové, polyvinylacetátové, polystyrénové a další.^{28,29,40}

2.3 Detektor rozptylu světla

2.3.1 Metody absolutního měření

Základní metody absolutního měření jsou založeny na základních fyzikálních charakteristikách a jejich vztahu k molární hmotnosti. Mezi nejpoužívanější patří membránová osmometrie, sedimentace, hmotnostní spektrometrie a rozptyl světla. Nevýhodou měření pomocí membránové osmometrie a sedimentace je časová náročnost a schopnost objemové charakterizace pouze na jedné úrovni, bez dalšího rozlišení částic vzorku. Metody pro separaci částic o různé velikosti se začaly používat až s rozvojem chromatografie HPLC a SEC. Detektor rozptylu světla využívá těchto separačních metod a jeho výhodou je, že není nutné jej kalibrovat při provádění experimentů.³⁰

2.3.2 Historický vývoj detekce rozptylu světla

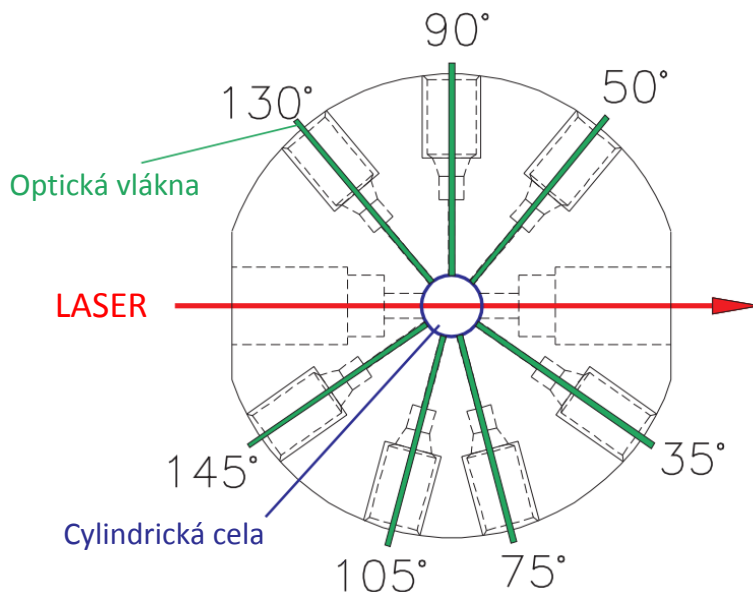
Základem detekce je rozptyl světla při jeho průchodu zkoumaným vzorkem. Tato měření byla v padesátých a šedesátých letech 20. století nejprve prováděna s jedním pohyblivým senzorem (Brice-Phoenix, Sofica), který na daných pozicích zachycoval množství dopadajícího světla. V sedmdesátých letech začal být tento senzor nahrazován několika statickými, umístěnými pod příslušnými úhly (Phillips). Ve stejné době se také začal používat laserový zdroj, který nahradil konvenční zdroj světla – rtuťovou výbojku. Laserový zdroj umožňuje vysílat velmi úzký paprsek, díky čemuž došlo k výraznému zvýšení přesnosti. Používá se v detektoru LALLS – Low Angle Laser Light Scattering (Kaye a spol.), který slouží k měření světla dopadajícího pod úhly menšími než 10° od vysílaného laserového paprsku. Začátkem devadesátých

let byl uveden na trh první laserový detektor s více statickými senzory MALLS – Multi Angle Laser Light Scattering.³¹

2.3.3 Parametry detektoru

V provedených experimentech se používá detektor rozptylu světla MALLS SECcurity SLD7000. Tento detektor měří absolutní molekulovou hmotnost, velikost a prostorovou konfiguraci molekul v roztoku. Pro určení absolutní molekulové hmotnosti je nutné určit závislost indexu lomu na koncentraci, dn/dc .

Základními komponentami detektoru jsou cylindrická cela, laserový zdroj, optická vlákna a CCD senzor. Laserový zdroj o výkonu 35 mW vysílá vertikálně polarizovaný světelný paprsek o vlnové délce 635 nm, který prochází mobilní fází se zkoumanými částicemi, čímž dochází k jeho rozptylu. Intenzita nese informaci o molární hmotnosti a úhel nese informaci o velikosti částice. Senzory jsou umístěny pod úhly 35°, 50°, 75°, 90°, 105°, 130°, 145° (viz Obr. 2.8). Cylindrická cela má objem 100 μl .^{32,33}



Obr. 2.8: Schematické znázornění detektoru³⁴

3 Cíl práce

Cílem práce bylo prostudovat chromatografické chování lipoproteinů LDL a VLDL metodou gelové permeační chromatografie s laserovým detektorem rozptylu světla. Bylo nezbytné se zabývat otázkou kalibrace, separovat lipoproteinové třídy metodou ultracentrifugace z plazmy a také se pokusit nalézt optimální složení mobilní fáze pro určení velikosti lipoproteinových částic.

4 Experimentální část

4.1 Aparatura a reagencie

Laboratorní úprava vody Direct Q 3 UV, Millipore, Praha, ČR

Multifunkční centrifuga Megafuge 16/16R, Thermo Scientific, USA

Ultracentrifuga Optima L-100 XP, Beckman Coulter s.r.o, SRN

Analytické váhy Sartorius Analytic AC 120 S, SRN

pH metr pH 6000, Thermo Scientific, USA

Autosampler Finnigan SpectraSYSTEM AS3000, Thermo Electron, USA

Gradientová pumpa Finnigan SpectraSYSTEM, Thermo Electron, USA

Detektor rozptylu světla SECcurity SLD7000, Brookhaven Instruments, USA

Detektor UV-VIS Accela, Thermo Scientific, USA

Kolona BioBasic SEC 300x7,8 mm s předkolonou 100x7,8 mm, Thermo Electron, USA

Thyroglobulin, ovalbumin, angiotensin II, Sigma-Aldrich, SRN

Latexové kuličky, Sigma-Aldrich, SRN

Chlorid sodný, Sigma-Aldrich, SRN

Bromid sodný, Sigma-Aldrich, SRN

Hydrogenfosforečnan draselný trihydrát, Sigma-Aldrich, SRN

Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich, SRN

Azid sodný, Sigma-Aldrich, SRN

Hydroxid sodný, Sigma-Aldrich, SRN

Dvojsodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Sigma-Aldrich, SRN

4.2 Příprava hustotních roztoků pro ultracentrifugaci

Odlišná specifická hustota lipoproteinů, daná jejich odlišným chemickým složením, umožňuje postupnou změnou hustoty prostředí izolovat jednotlivé lipoproteinové frakce.¹

Hustotu roztoků je třeba přeměřit pomocí pyknometru a případně upravit.

4.2.1 Hustotní roztok $\rho = 1,006 \text{ g/ml}$

NaCl23,2 g

Na₂EDTA..... 0,2 g

NaN₃..... 1,0 g

1M NaOH..... 2 ml

Doplnit destilovanou vodou na 2 l.

4.2.2 Hustotní roztok $\rho = 1,157 \text{ g/ml}$

NaBr 98,7 g

Doplnit hustotním roztokem o $\rho = 1,006 \text{ g/ml}$ na 500 ml.

4.2.3 Hustotní roztok $\rho = 1,182 \text{ g/ml}$

NaBr 118,3 g

Doplnit hustotním roztokem o $\rho = 1,006 \text{ g/ml}$ na 500 ml.

4.2.4 Hustotní roztok $\rho = 1,210 \text{ g/ml}$

NaBr 140,7 g

Doplnit hustotním roztokem o $\rho = 1,006 \text{ g/ml}$ na 500 ml.

4.2.5 Pyknometrické měření hustoty roztoků

1. Zvážit suchý pyknometr i se zátkou. Hmotnost zaznamenat jako m_1 .
2. Naplnit pyknometr destilovanou vodou. Uzavřít vtlačení kapilární zátky tak, aby po nasazení přebytečná voda byla vytlačena, čímž se zamezí výskytu vzduchových bublin. Pyknometr, mimo zátky, pečlivě osušit buničinou. Kapilární zátku pyknometru jemně přejet suchým prstem. Zvážit. Provést 3x, průměr zaznamenat jako m_2 .
3. Opakovat stejný postup plnění pyknometru s hustotním roztokem. Provést 3x, průměr zaznamenat jako m_3 .

Výpočet: $\rho = (m_3 - m_1) / (m_2 - m_1)$

Pokud výsledný roztok nemá požadovanou hustotu, je nezbytné jí upravit. Při vyšší hodnotě se přidá destilovaná voda, při nižší sodná sůl.

4.3 Fosfátový pufr

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 22,82 g

KH_2PO_4 13,61 g

Každou navážku doplnit destilovanou vodou na 1 l. Za stálého míchání titrovat první roztok druhým do dosažení požadovaného pH = 7,0.

4.4 Fyziologický roztok

NaCl 9,0 g

Doplnit destilovanou vodou na 1 l.

4.5 Příprava standardů

Thyroglobulin 10,0 mg

Ovalbumin 10,0 mg

Angiotensin II 10,0 mg

Každou navážku rozpustit v 1 ml fyziologického roztoku.

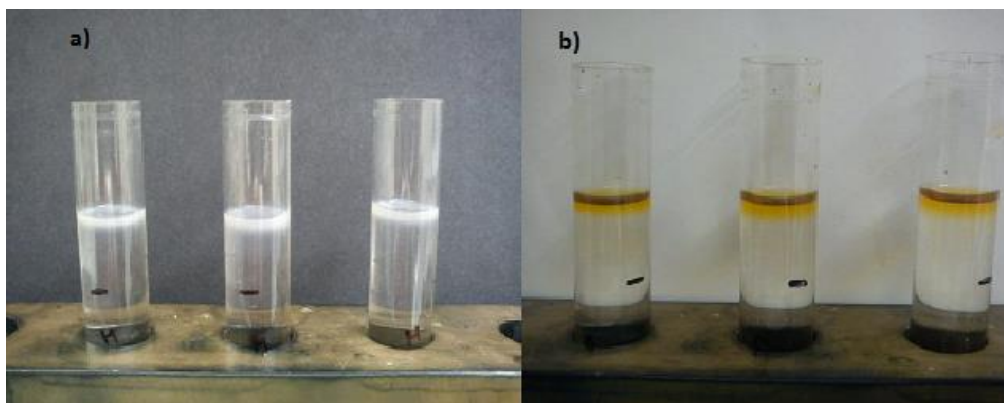
4.6 Příprava vzorků

Do zkumavek s K_3EDTA byly odebrány vzorky krve. Biologický materiál byl nejdříve stočen 15 minut při 1500 ot/min. Automatickou pipetou byl odebrán vrchní díl. Plazmu je třeba odebírat se zvýšenou opatrností, nad spodní částí s erytrocyty je velmi špatně viditelná vrstva leukocytů. Plazma je dále pipetována do ultracentrifugačních zkumavek společně s hustotními roztoky. Přidává se vždy ke 3 ml plazmy 1,5 ml hustotního roztoku. Hustotní roztok je vybrán na základě Tab. 2.2 podle požadované frakce.

Tab. 2.2: Přehled flotujících frakcí při dané hustotě hustotního roztoku

Materiál	Flotující frakce	Hustota roztoku ρ (g/ml)
Plasma	VLDL	1,006
Plazma	VLDL + IDL	1,045
Plazma bez VLDL	IDL + LDL	1,183
Plazma bez VLDL a IDL	LDL	1,153

Do ultracentrifugační zkumavky se pipetuje 3 ml plazmy a udělá se ryska v menisku. Přidá se hustotní roztok. Ultracentrifugace probíhá 20 hod při 36 tis. ot/min a 10 °C. Po stočení se odebere vrchní díl frakce VLDL či VLDL+IDL po vyznačenou rysku (viz Obr. 4.1). Přidá se opět 1,5 ml hustotního roztoku a pečlivě rozmíchá tyčinkou. Další frakce se točí při stejných podmínkách. Pokud by se odebralo více, než ukazuje ryska, je nezbytné nejdříve po značku přidat hustotní roztok $\rho = 1,006$ g/ml a pak až námi zvolený. Lipoproteiny v separovaných frakcích mají dvojnásobnou koncentraci ve srovnání s plazmou.



Obr. 4.1: Separované lipoproteinové frakce: a) VLDL, b) LDL

5 Výsledky a diskuze

Pro studium lipoproteinů jsme využili dvou detektorů zapojených v sérii. Detektor UV-VIS měřil při vlnové délce 200 nm, která je uváděná pro většinu lipidů, a dále při délce 280 nm charakteristické pro proteiny. Detektor LLSO poskytoval odezvu paprsku pod 7 úhly (35°, 50°, 75°, 90°, 135°, 150° a 175°).

5.1 Ověření retenčních časů

Před zahájením analýz lipoproteinů bylo nezbytné zkontrolovat funkčnost kolony. Přiložený chromatogram proteinových standardů od výrobce byl získán na koloně stejného typu, ale jiných parametrů (Tab. 5.1). Srovnání retenčních časů u obou kolon uvádí Tab. 5.2.

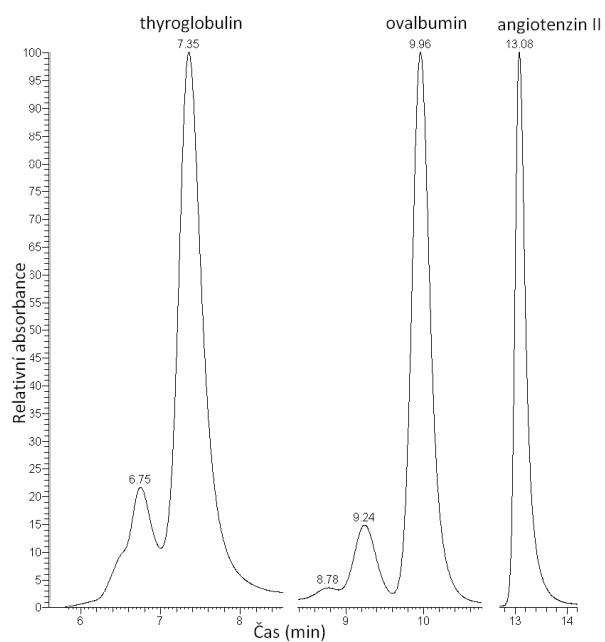
Tab. 5.1: Parametry kolon

Podmínky	Dodaná kolona	Vzorový chromatogram
BioBasic SEC 300, 5 μ m	300x7.8 mm	300x4.6 mm
Velikost pórů	300 Å	300 Å
Mobilní fáze	0,1M fosfátový pufr pH = 7,0	0,1M fosfátový pufr pH = 7,0
Průtok	1 ml/min	0,35 ml/min
Vlnová délka	280 nm	280 nm
Nástřik	20 μ l	20 μ l

Tab. 5.2: Retenční časy proteinových standardů

Standard \ rozměr kolony SEC	300x7,8 mm	300x4,6 mm
thyroglobulin	7,35 min	6,33 min
ovalbumin	9,96 min	8,62 min
angiotenzin II	13,08 min	11,13 min

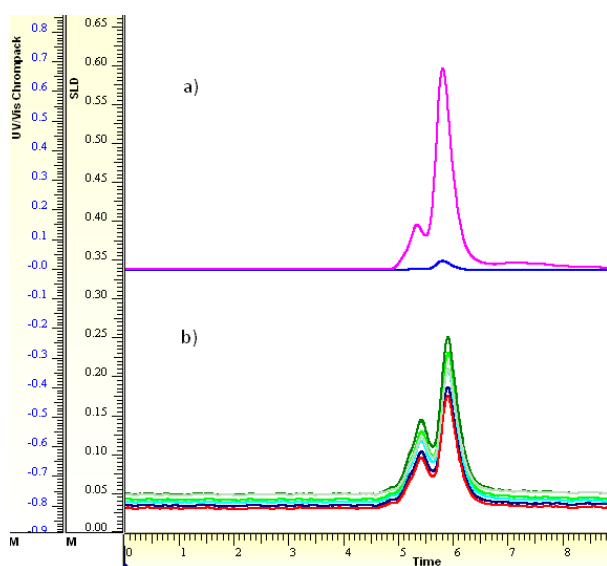
Jednotlivé chromatogramy s UV detekcí při vlnové délce 280 nm získané na koloně o rozměrech 300x7,8 mm jsou uvedeny na Obr. 5.1.



Obr. 5.1: Chromatogramy proteinových standardů

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,0, 1 ml/min

Analýza thyroglobulinu s detekcí LLSD a UV o vlnových délkách 200 nm a 280 nm na koloně SEC 300x7,8 mm je uvedena na Obr. 5.2.



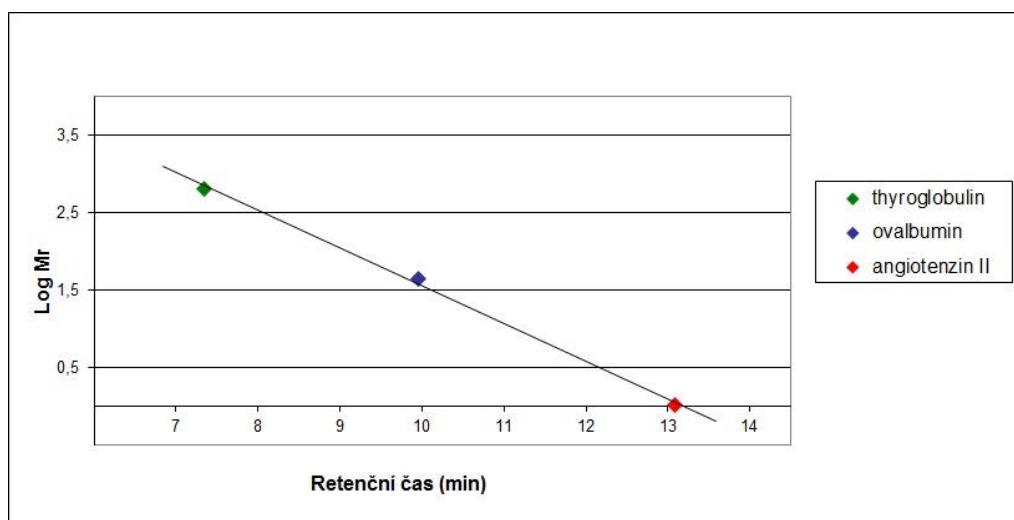
Obr. 5.2: Záznam chromatogramu thyroglobulinu s detekcí a) UV, b) LLSD

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,0, 1 ml/min

Získané analýzy prokázaly, že kolona poskytuje obdobné chromatogramy jako vzorový chromatogram od výrobce. Kalibrační závislost logaritmu molekulové hmotnosti na retenčním čase je uvedena v Tab. 5.3 a na Obr. 5.3.

Tab. 5.3: Deklarovaná molekulová hmotnost v závislosti na retenčním čase

Protein	Retenční čas (min)	Molekulová hmotnost (kDa)	log M_r
thyroglobulin	7,35	660,0	2,82
ovalbumin	9,96	45,0	1,65
angiotenzin II	13,08	1,045	0,02



Obr. 5.3: Kalibrační závislost molekulové hmotnosti (kDa) na retenčním čase

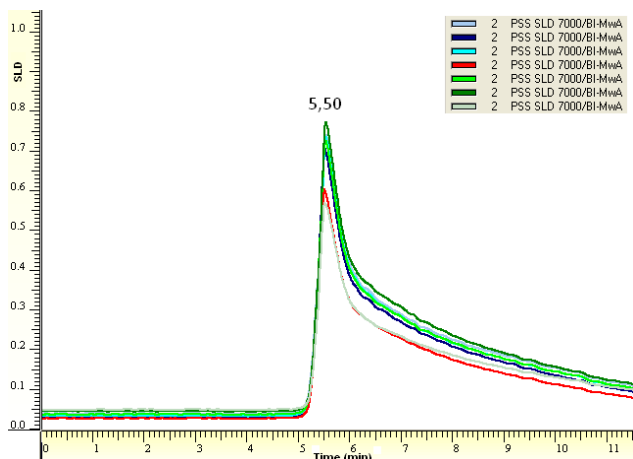
Naměřená závislost odpovídá údajům od výrobce. Použití této závislosti pro určení molekulových hmotností lipoproteinů je sporné, protože převážně leží mimo měřenou oblast. Navíc lipoproteiny nejsou homogenní makromolekuly, ale heterogenní částice s obsahem řady různých molekul. Optimální pro kalibraci by byly částice definovaného rozměru a kulovitého tvaru, jako mají lipoproteiny. Proto jsme vyzkoušeli vzorky latexových kuliček.

5.2 Kalibrace pomocí latexových kuliček

Pro experiment byla zvolena kalibrace pomocí latexových kuliček. K dispozici byly následující latexové kuličky od firmy Sigma o specifické velikosti:

- Latexové kuličky polystyrenové, velikost částic 0,1 μm
- Latexové kuličky obarvené tmavě modře (deep blue dyed), velikost částic 0,055 μm
- Latexové kuličky obarvené tmavě modře (deep blue dyed), velikost částic 0,24 μm
- Latexové kuličky polystyrenové modifikované sulfátem (sulfate-modified polystyrene), velikost částic 0,1 μm
- Latexové kuličky polystyrenové modifikované karboxylem, fluoreskující žluto-zeleně (carboxylate-modified polystyrene, fluorescent yellow-green), velikost částic 0,03 μm

Tato metoda kalibrace by byla použitelná, pokud by latexové kuličky o alespoň třech různých velikostech dávaly vhodnou odezvu. Ze všech testovaných vzorků jsme obdrželi odezvu pouze z kuliček obarvených modře o velikosti 0,055 μm , ostatní vzorky zůstaly zadržené v koloně. Záznam tohoto vzorku je uveden na Obr. 5.4.



Obr. 5.4: Chromatogram latexových kuliček deep blue o velikosti 0,055 μm
 Vzorek: latexové kuličky o velikosti 0,055 μm , naředěn 1:1, nástřik: 20 μl
 Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,5 a 0,9% NaCl, 1 ml/min

Vzorek latexových kuliček poskytl chvostující pík, který zřejmě v maximu odpovídá deklarované velikosti, ale pravděpodobně obsahuje ještě populaci dalších částic s postupně klesající velikostí. Bohužel nebylo v našich možnostech tuto hypotézu ověřit. Řešením by mohlo být proměření vzorku elektronovým mikroskopem, který v době měření nebyl dostupný.

5.3 Reprodukovatelnost retenčních časů VLDL a LDL

Pro test aparatury jsme provedli sérii měření obou lipoproteinových frakcí. Statistické zhodnocení retenčních časů (min) je uvedeno v Tab. 5.4. Měření bylo provedeno v mobilní fázi o pH 7,5. Výsledek považujeme za uspokojivý, je opět v souladu s údaji uváděnými výrobcem kolony.⁴¹

Tab. 5.4: Statistické zhodnocení reprodukovatelnosti retenčních časů

Měření / frakce	RRT ₁ (min)	RRT ₂ (min)	RRT ₃ (min)	RRT ₄ (min)	RRT ₅ (min)	Medián (min)	SD (min)	RSD (%)
VLDL	5,13	5,31	5,16	5,22	5,19	5,19	6,3.10⁻²	1,21
LDL	6,01	5,99	5,90	6,04	6,05	6,01	5,3.10⁻²	0,88

5.4 Analýzy lipoproteinových tříd VLDL a LDL

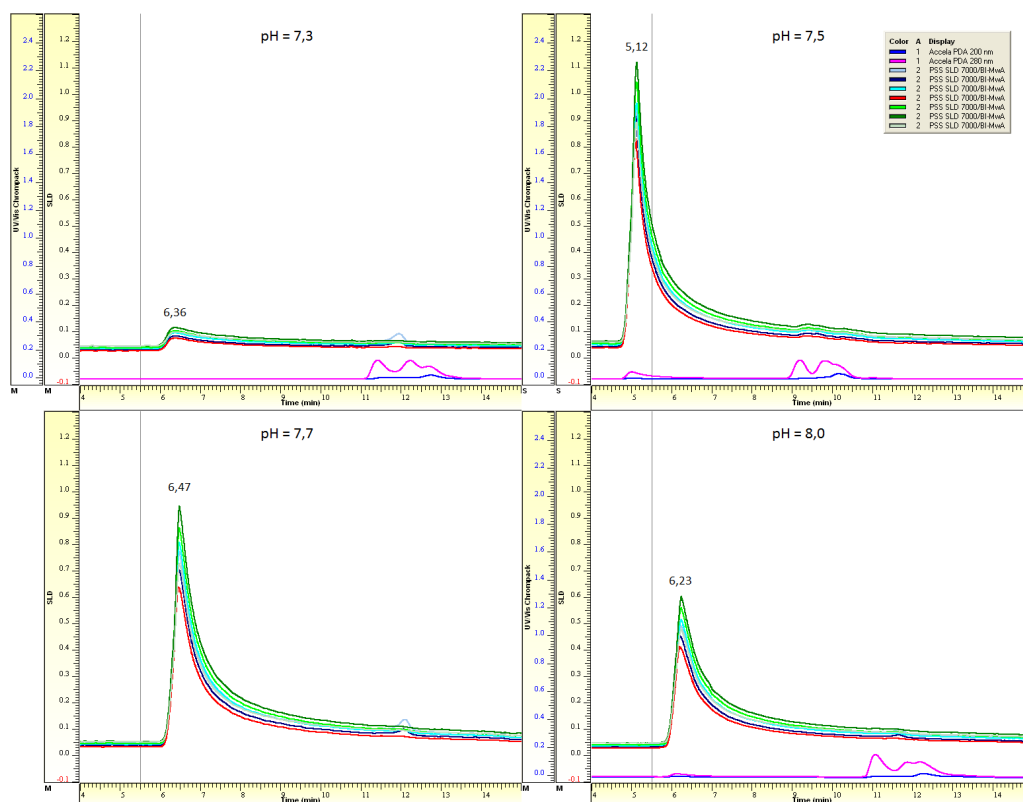
Pro optimalizaci metody bylo nezbytné proměřit různé podmínky pro analýzy VLDL a LDL a najít nejvhodnější. Přirozeným prostředím pro lipoproteiny v živém organismu je fyziologický roztok pufrovaný fosfátem. Využití tohoto roztoku pro chromatografické dělení lipoproteinových frakcí bylo popsáno řadou autorů.^{35,36}

Zkoumali jsme vliv pH a iontové síly na retenční čas, tvar píku a jeho velikost. Analyzovali jsme separované lipoproteiny LDL a VLDL 4 osob – dobrovolných dárců. V plazmě a jednotlivých frakcích byly změřeny koncentrace celkového cholesterolu (TC), triacylglycerolů (TAG) a celkové bílkoviny (CB) rutinními vyšetřovacími metodami. Vyšetření bylo provedeno v Centrálních laboratořích Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

5.4.1 Chromatogramy VLDL a LDL vzorku A – vliv pH

Vzorek A: muž, 55 let

Biochemické parametry v plazmě: TC 5,34 mmol/l, TAG 1,65 mmol/l, CB 70,5 g/l



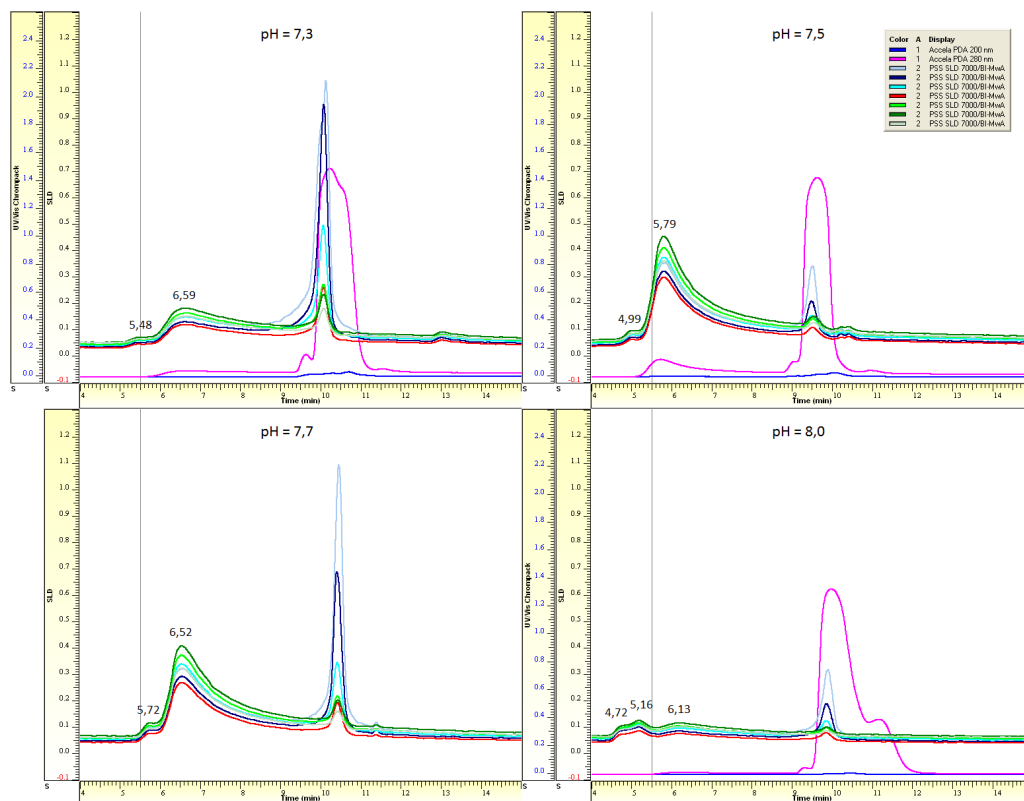
Obr. 5.5: Vliv pH na chromatogram VLDL vzorku A.

Značka v čase 5,50 ukazuje retenční čas standardu velikosti částic 55 nm.

Biochemické parametry frakce: TC 0,46 mmol/l, TAG 1,26 mmol/l, CB 0,8 g/l,

nástřik: 20 μ l

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,3; 7,5; 7,7; 8,0; průtok 1 ml/min



Obr. 5.6: Vliv pH na chromatogram LDL vzorku A.

Značka v čase 5,50 ukazuje retenční čas standardu velikosti částic 55 nm.

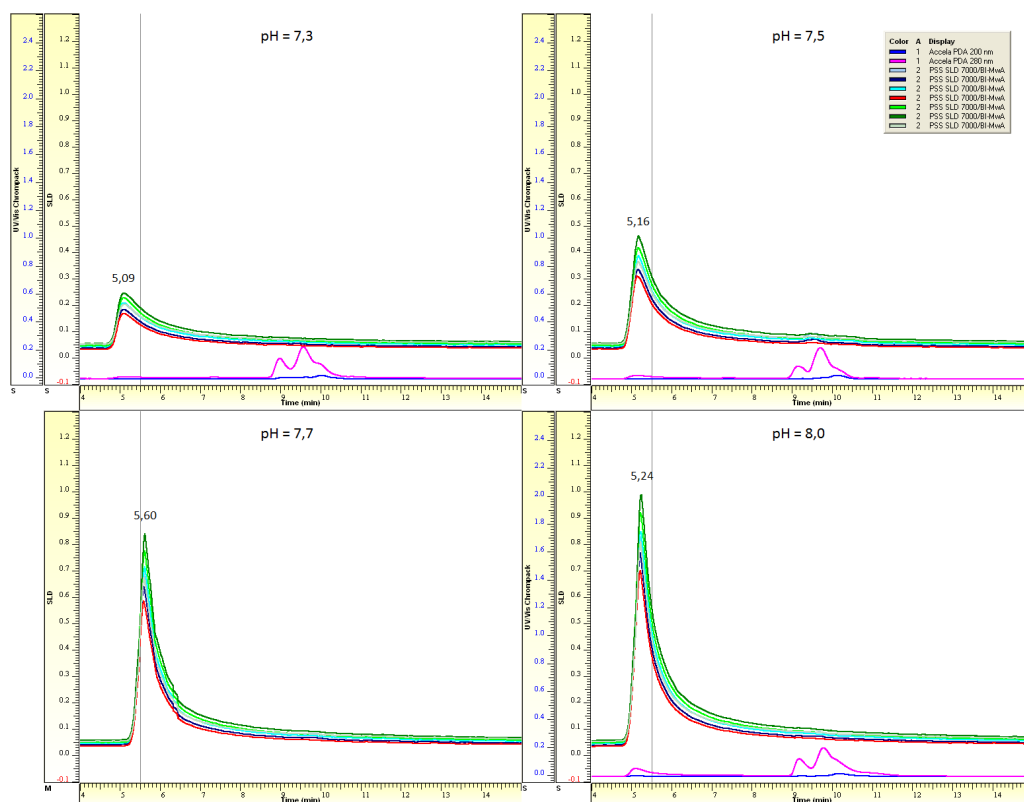
Biochemické parametry frakce: TC 2,54 mmol/l, TAG 0,23 mmol/l, CB 1,0 g/l, nástřik: 20 μ l

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,3; 7,5; 7,7; 8,0; průtok 1 ml/min

5.4.2 Chromatogramy VLDL a LDL vzorku B – vliv pH

Vzorek B: žena, 54 let

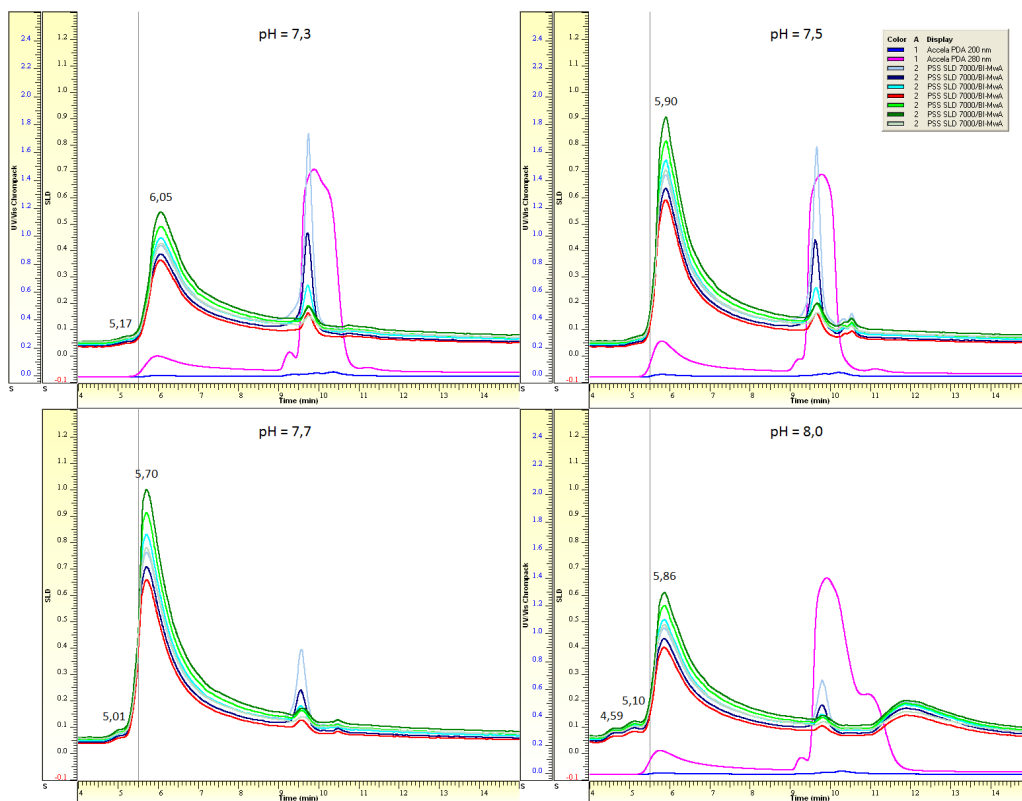
Biochemické parametry v plazmě: TC 5,55 mmol/l, TAG 1,20 mmol/l, CB 71,6 g/l



Obr. 5.7: Vliv pH na chromatogram VLDL vzorku B.

Značka v čase 5,50 ukazuje retenční čas standardu velikosti částic 55 nm.
Biochemické parametry frakce: TC 0,40 mmol/l, TAG 0,81 mmol/l, CB 1,0 g/l, nástřik 20 μ l

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,3; 7,5; 7,7; 8,0; průtok 1 ml/min



Obr. 5.8: Vliv pH na chromatogram LDL vzorku B.

Značka v čase 5,50 ukazuje retenční čas standardu velikosti částic 55 nm.
 Biochemické parametry frakce: TC 3,48 mmol/l, TAG 0,24 mmol/l, CB 1,6 g/l,
 nástřik 20 μ l

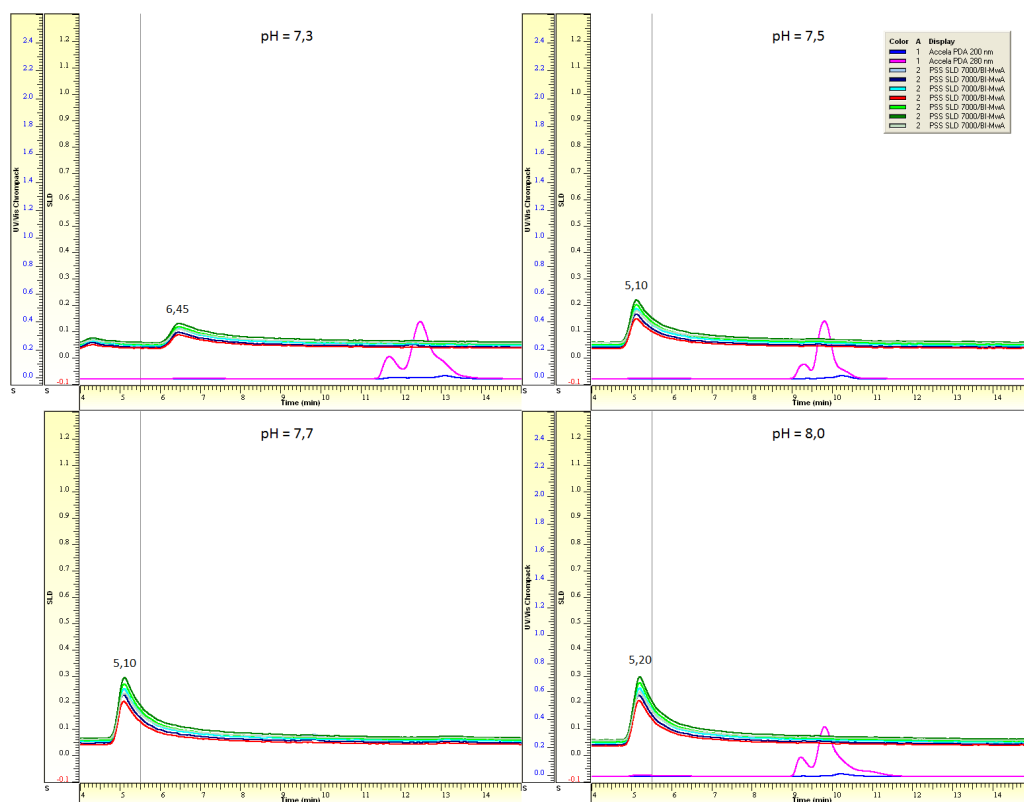
Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,3; 7,5; 7,7; 8,0; průtok 1 ml/min

5.4.3 Chromatogramy VLDL a LDL vzorku C – vliv pH

Vzorek C: žena, 25 let

Biochemické parametry v plazmě: TC 5,05 mmol/l, TAG 0,78 mmol/l,

CB 68,6 g/l



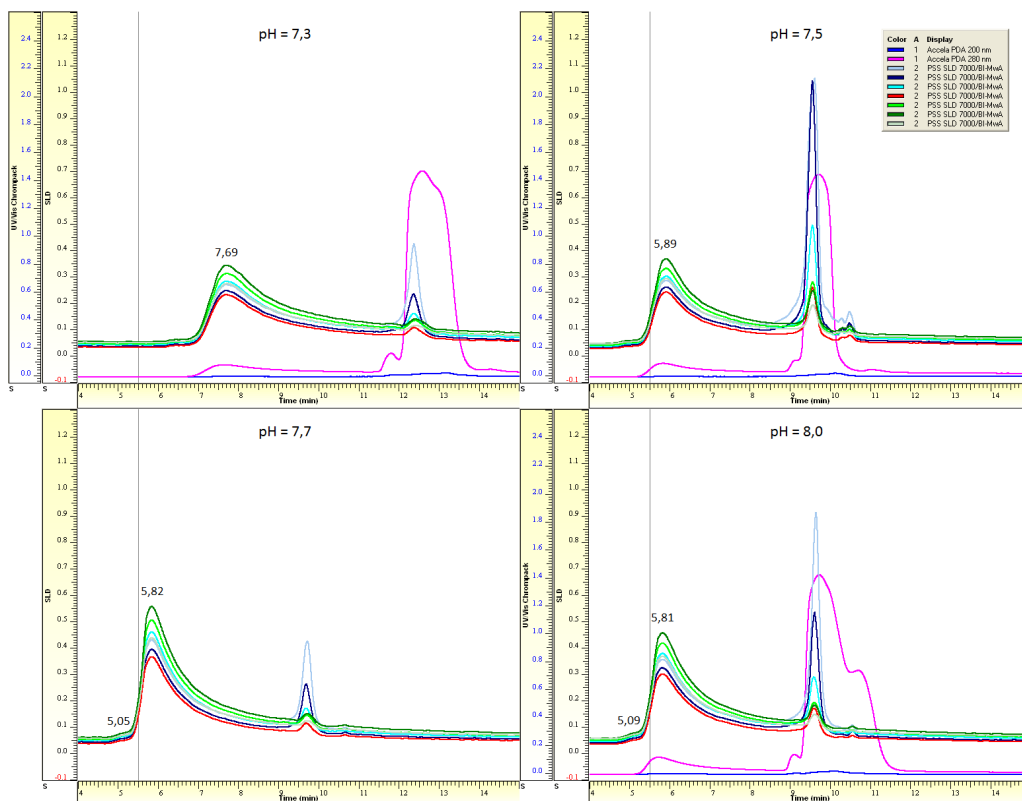
Obr. 5.9: Vliv pH na chromatogram VLDL vzorku C.

Značka v čase 5,50 ukazuje retenční čas standardu velikosti částic 55 nm.

Biochemické parametry frakce: TC 0,19 mmol/l, TAG 0,46 mmol/l, CB 0,9 g/l,

nástřik: 20 μ l

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,3; 7,5; 7,7; 8,0; průtok 1 ml/min



Obr. 5.10: Vliv pH na chromatogram LDL vzorku C.

Značka v čase 5,50 ukazuje retenční čas standardu velikosti částic 55 nm.

Biochemické parametry frakce: TC 2,74 mmol/l, TAG 0,17 mmol/l, CB 1,1 g/l,

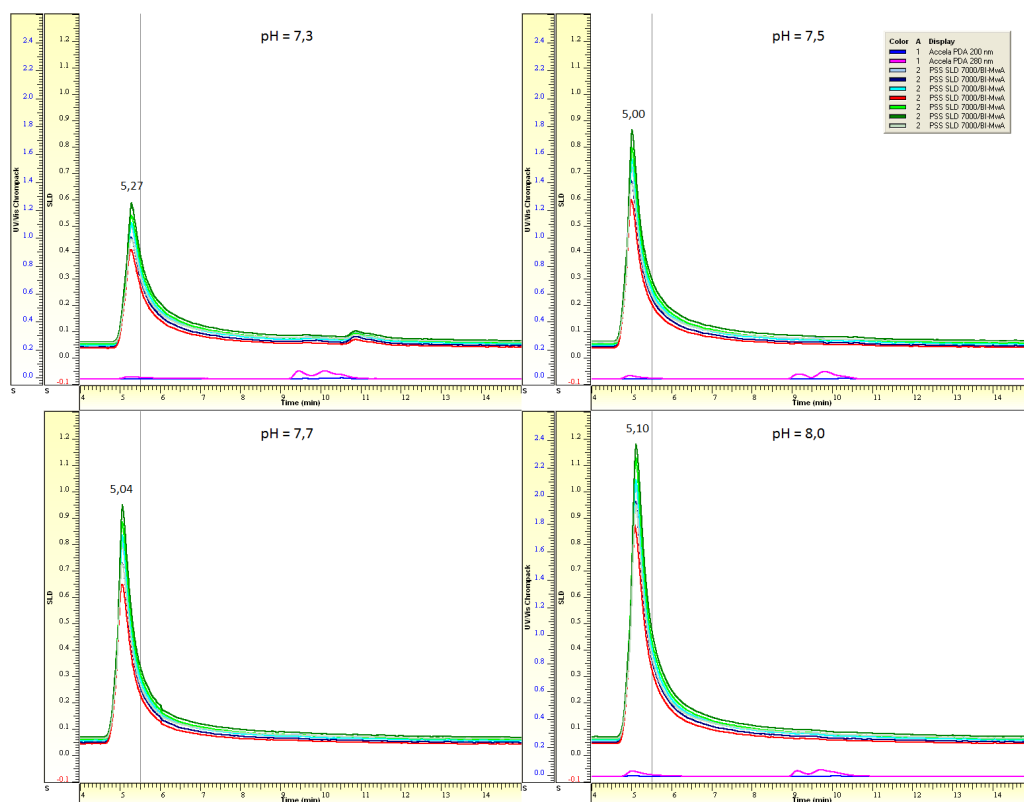
nástřik: 20 μ l

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,3; 7,5; 7,7; 8,0; průtok 1 ml/min

5.4.4 Chromatogramy VLDL a LDL vzorku D – vliv pH

Vzorek D: žena, 69 let

Biochemické parametry v plazmě: TC 5,97 mmol/l, TAG 2,15 mmol/l, CB 76,7 g/l

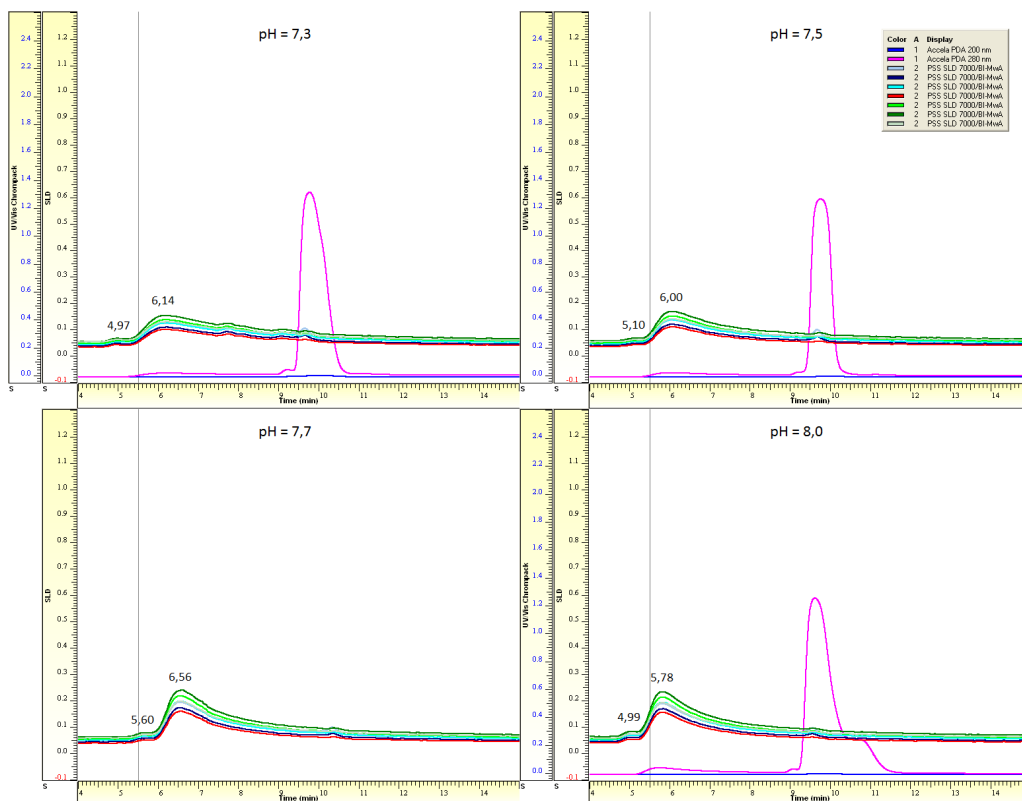


Obr. 5.11: Vliv pH na chromatogram VLDL vzorku D.

Značka v čase 5,50 ukazuje retenční čas standardu velikosti částic 55 nm.

Biochemické parametry frakce: TC 0,45 mmol/l, TAG 1,45 mmol/l, CB 0,7 g/l, nástřik: 20 μ l

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,3; 7,5; 7,7; 8,0; průtok 1 ml/min



Obr. 5.12: Vliv pH na chromatogram LDL vzorku D.

Značka v čase 5,50 ukazuje retenční čas standardu velikosti částic 55 nm.

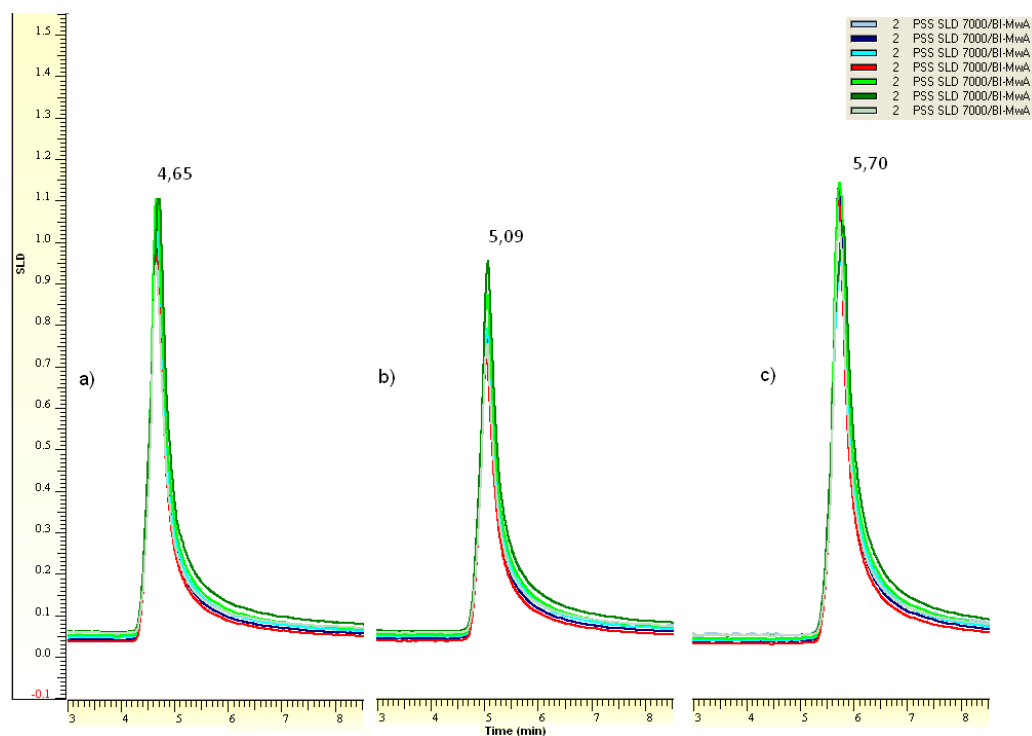
Biochemické parametry frakce: TC 3,72 mmol/l, TAG 0,46 mmol/l, CB 1,3 g/l, nástřik: 20 μ l

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,3; 7,5; 7,7; 8,0; průtok 1 ml/min

Chování lipoproteinů bylo sledováno při hodnotách pH mobilní fáze 7,3, 7,5, 7,7 a 8,0 (viz Obr. 5.5–5.12). Z uvedených chromatogramů je zřejmé, že pH ovlivňuje jak retenční čas píku, tak i velikost odezvy. Posun retenčního času k vyšším hodnotám odpovídá zmenšení velikosti částice. Je možné, že obal lipoproteinu, který obsahuje cholinovou hlavu fosfolipidu, volný cholesterol a bílkovinné složky (apolipoproteiny), reaguje na změnu acidity změnou konformace jednotlivých složek. Je známo, že na lipoproteiny jsou vázány lipolytické enzymy (převážně pankreatická lipáza), jejíž pH optimum je 9; dlouhodobým skladováním vzorků došlo k prakticky úplnému rozštěpení. V rámci analýzy tento trend není patrný, ale při pH 8 je na záznamech vidět další pík při 280 nm, který odpovídá nízkomolekulárním složkám. Tento efekt je mnohem výraznější u LDL než u VLDL. Pro další studium jsme zvolili hodnotu pH mobilní fáze 7,5.

Dále je možné, že změnou pH dochází k určité modifikaci stacionární fáze – silikagel je znám svou citlivostí vůči alkalickému prostředí.⁴⁰

5.5 Analýza vzorku B při různém složení mobilní fáze



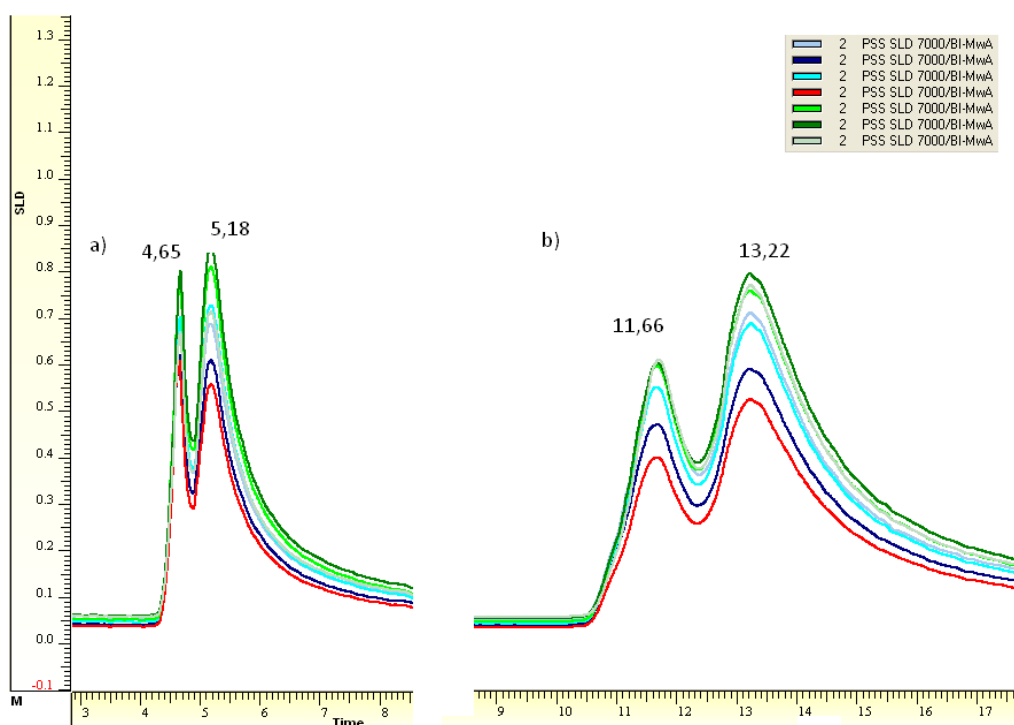
Obr. 5.13: Vliv iontové síly na chromatogram VLDL vzorku B

- a) 0,1M fosfátový pufr s 0,9% NaCl, pH 7,5
- b) 0,1M fosfátový pufr bez NaCl, pH 7,5
- c) 0,05M fosfátový pufr s 0,9 % NaCl, pH 7,5

Přidání NaCl do mobilní fáze v koncentraci odpovídající fyziologickému roztoku snížilo retenční čas, což odpovídá zvětšení částice; snížení koncentrace fosfátu za přítomnosti NaCl retenční čas zvýšilo a částice za těchto podmínek má menší rozměr, viz Obr. 5.13. Pro další studie proto navrhuje složení mobilní fáze chromatogramu a), které se nejvíc blíží fyziologickým podmínkám. Zvyšování koncentrace NaCl by ovlivnilo konformaci proteinů na povrchu lipoproteinu a pravděpodobně změnilo velikost částice. Cílem je určení velikosti za fyziologických podmínek. Asymetrie píku může být důsledkem přítomnosti širší populace velikosti částic a pravděpodobně tvoří obalovou křivku.

5.6 Společná analýza lipoproteinových frakcí VLDL a LDL

Dalším krokem byl pokus o analýzu spojených frakcí LDL a VLDL (viz Obr. 5.14), což by umožnilo stanovit průměrnou velikost částic obou lipoproteinových tříd na základě jedné ultracentrifugační separace. Zde jsme sledovali především vliv průtoku, jelikož nejvhodnější prostředí již bylo vybráno při analýzách samostatných frakcí.



Obr. 5.14: Analýza spojených frakcí VLDL a LDL vzorku B

Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH = 7,5 s 0,9% NaCl, 1 ml/min (a) a 0,5 ml/min (b)

Analýzou spojených frakcí jsme dostali dva nedokonale rozdělené píky, u kterých by bylo možné určit střední velikost částic. Protože latexové standardy neposkytly až na jednu výjimku odezvy, nemohli jsme určit kalibrační závislost molekulové hmotnosti na retenčním čase. Vzorky VLDL ve srovnání

s latexovým standardem o velikosti 55 nm vykazovaly větší velikost částic, vzorky LDL menší velikost. Konkrétní číselné hodnoty nebylo možné zjistit. Spolehlivou kalibraci kolony lze provést pomocí separovaných lipoproteinů, jejichž velikost byla určena elektronovým mikroskopem. Tato technika bohužel nebyla v době vypracování studie k dispozici.

Dělení všech lipoproteinových tříd včetně HDL sledovali Carroll a Rudel³⁸ na kolonách TSK SW 3000, TSK SW 4000 (silikagel) a TSK PW 5000 (metakrylát). Kolony měly rozměr 600x7,5 mm a byly zapojeny v sérii v různých kombinacích. Nejlepšího rozdělení lipoproteinů LDL a VLDL bylo dosaženo spojením všech tří kolon, což představuje celkovou délku 1800 mm, tedy šestkrát větší než naše kolona. Lze předpokládat, že spojením alespoň 2 kolon bychom rovněž dosáhli lepšího rozdělení. Ze srovnání analýz je zřejmé, že kolona BioBasic SEC 300 má lepší separační vlastnosti. Autoři poukázali také na nižší stabilitu i životnost kolon plněných silikagelem ve srovnání s kolonou plněnou metakrylátem.

Další autoři³⁵ rozdělili lipoproteiny izolované ultracentrifugací na koloně 300x10 mm plněné sefarózou. Velikost LDL stanovili pomocí 2 kalibrátorů LDL o známé velikosti. Referenční metodou byla elektroforéza na gradientu polyakrylamidu.

V novější studii sledovali Nanjee et al.³⁹ chemické složení lipoproteinových tříd separovaných rovněž na sefaróze. Záznam chromatogramu byl sestaven z jednotlivých eluovaných frakcí, ve kterých byly analyzovány jednotlivé lipidy. Frakce lipoproteinů byly dokumentovány elektronovým mikroskopem, změřené velikosti částic však nesloužily ke kalibraci kolony.

6 Závěr

Cílem práce bylo optimalizovat metodu SEC-LLSD, tedy najít vhodné podmínky pro analýzu lipoproteinových frakcí VLDL a LDL. Z výsledků lze určit optimální mobilní fázi o složení 0,1M fosfátový pufr a 0,9% NaCl, pH 7,5 a průtoku 1 ml/min. Eluční křivky chvostují, což může být způsobeno jednak nehomogenitou lipoproteinových frakcí, jednak faktem, že kolona plněná silikagelem je citlivá na $\text{pH} > 7$, a možná i mírně bazickým charakterem lipoproteinů.

Dalším pokusem byla společná analýza lipoproteinových tříd VLDL a LDL. Dokonale oddělit obě frakce se nezdařilo, zlepšení by se dalo docílit spojením dvou nebo více kolon v sérii. V kolonách pro řešení této problematiky je velmi malý výběr. V budoucnu by bylo vhodné zkusit separaci na koloně plněné sefarózou.

Neúspěšné analýzy latexových kuliček vypovídají o nevhodnosti daného materiálu ke kalibraci. Nejspíš byly trvale zadrženy ve stacionární fázi. Bohužel se tímto přišlo o nejsnazší a nejekonomičtější možnost kalibrace. Nejspolehlivější, i když ekonomicky náročnější, je kalibrace samotnými lipoproteiny předem změřenými elektronovým mikroskopem, což by mohlo být předmětem další práce.

7 Literatura

- [1] J. Skořepa a spolupracovníci: Lipidy a riziko koronární aterosklerózy, Praha, Univerzita Karlova, 1980
- [2] Alaupovic P.: Recent advances in metabolism of plasma lipoproteins, *Prog. Biochem Pharmacol*, 4, 91-109, 1968
- [3] Novák F.: Úvod do klinické biochemie, Karolinum, Praha 2002
- [4] Ambrosch A., Müller R., Freytag C., Borgmann S., Kraus J., Dierkes J., Neumann K. H., König W.: Small-sized low-density lipoproteins of subclass B from patients with end-stage renal disease effectively augment tumor necrosis factor- α -induced adhesive properties in human endothelial cells, *American Journal of Kidney Diseases*, 39, 972–984, 2002
- [5] Mykkanen L., Kuusisto J., Haffner S. M., Pyörälä K., Laakso M.: Hyperinsulinemia Predicts Multiple Atherogenic Changes in Lipoproteins in Elderly Subjects, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 14, 518-526, 1994
- [6] Kamigaki A. S., Siscovick D. S., Schwartz S. M., Psaty B. M., Edwards K. L., Raghunathan T. E., Austin M. A.: Low Density Lipoprotein Particle Size and Risk of Early-Onset Myocardial Infarction in Women, *Am. J. Epidemiol.*, 153(10):939-45, 2001
- [7] Stein E. A.: Are Measurements of LDL Particles Ready for Prime Time?, *Clinical Chemistry*, 52, 1643-1644, 2006
- [8] S. Usui, Y. Hara, S. Hosaki, M. Okazaki: A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC, *Journal Lipid Research*, 43, 805–814, 2002
- [9] Maki K. C., Davidson M. H., Cyrowski M. S. et al.: Low-density lipoprotein subclass distribution pattern and adiposity-associated dyslipidemia in postmenopausal women, *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 23-30, 2000
- [10] O'Neil D., Harrip P., Dragicevic G., Rae D., Best J.D.: A comparison of LDL size determination using gradient gel electrophoresis and light-scattering methods, *Journal of Lipid research*, 39, 2086-2090, 1998
- [11] Tvrzická E.: Chromatografické metody v analýze lipidů, *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek, VŠCHT, Praha 2006* 95–105
- [12] Swinkels D. W., Hak-Lemmers H. L., Demacker P. N.: Single spin density gradient ultracentrifugation method for the detection and isolation of light and heavy low density lipoprotein subfractions, *J. Lipid. Res.* 28, 1233–1239, 1987
- [13] Kraus R. M., Blanche P. J.: Detection and quantification of LDL subfractions, *Curr. Opin. Lipidol*, 3, 377–383, 1992

- [14] Nichols A. V., Kraus R. M., Musliner T. A.: Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis, *Methods Enzymol.* 128, 417–431, 1986
- [15] Jitka Horáková: Kreditní kurz Lipidy. CEVA [online] 28. červen 2012 , poslední aktualizace 28. červen 2012 [cit. 10. 5. 2014]. Dostupný z: <http://www.ceva-edu.cz/mod/data/view.php?d=13&rid=163>. ISSN 1803-8999
- [16] Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: Harperova biochemie, Nakladatelství H+H, Jinočany 2002
- [17] Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.: Metabolické osudy lipidů a cholesterolu v těle, *Biochemie pro studující medicíny, I. Díl*, Praha: Karolinum, 193–205, 2004
- [18] Wikiskripta – Ateroskleróza, [cit. 10. 5. 2014], dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Ateroskleróza>
- [19] Rizzo M., Berneis K.: Low – density lipoprotein size and cardiovascular risk assesment. *Q. J. Med.*, 99, 1–14, 2006
- [20] Pultarová K.: Refraktometrická studie lipoproteinů o nízké hustotě (LDL), Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2012
- [21] Fredrickson D. S., Levy R. I., Lees R. S.: Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanism and disorders. *N. Engl. J Med.*, 145, 34, 1967
- [22] Tvrzická E.: Analýsa lipidů a lipoproteinů, Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 2006
- [23] Lipoprint – A Breakthrough In Cholesterol Management, Quantimetrix Corporation, 2008. [cit. 16.5.2014], dostupné z: <http://alphascience.de/downloads/information-zu-lipoprint-e.pdf>
- [24] Beaumont J. L., Carlson L. A., Cooper G. R., Fejfar Z., Fredrickson D. S., Strasser T.: Classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Bull. WHO*, 43, 891, 1970
- [25] Warnick G. R., Cheung M. C., Albers J. J.: Comparison of current methods for high-density lipoprotein cholesterol quantitation, *Clin.Chem.*, 25, 596, 1979
- [26] Churáček J. a kolektiv. Analytická separace látek. Praha: SNTL – Nakladatelství echnické literatury, 1990, s. 276–277. ISBN 80-03-00569-8
- [27] Mori S., Barth H. G.: Size Exclusion Chromatography, Springer, 1999
- [28] Berek D., Kubín M., Marcinka K., Dressler M.: Gélová chromatografie, Bratislava, VEDA, 1983, s. 91.
- [29] Chromatografické metody, Kapalinová chromatografie, PPT dokument, 2012, [cit. 16.5.2014], dostupné z: <http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/bam/07.ppt>
- [30] Absolute Technique, Wyatt Technology Europe, [cit. 9.5.2014], dostupné z: <http://www.wyatt.eu/index.php?id=absolute-technique>

- [31] Wikipedia – Multiangle Light Scattering, [cit. 9.5.2014], dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Multiangle_light_scattering>
- [32] PSS Polymer Standards Service, [cit. 9.5.2014], dostupné z: <<http://www.pss-polymer.com/products/lc-instruments-and-detectors/gpcsec-detectors/#c296>>
- [33] Static Light Scattering, Wyatt Technology Europe, [cit. 9.5.2014], dostupné z: <http://www.wyatt.eu/index.php?id=static_light_scattering>
- [34] Kilz P., Hans-Ulrich Ehmcke H. U.: SEC Analysis of Polymers with Light Scattering Detection, G.I.T. Laboratory Journal, 2004
- [35] Scheffer P. G., Akker S. J. I., Heine R. J., Teerlink T.: Measurement of low density lipoprotein particle size by high performance gel filtration chromatography, 43:10 1904–1912, 1997
- [36] Westerlund J., Yao Z.: Elution of lipoprotein fractions containing apolipoproteins E and A-I in size exclusion on Superose 6 columns is sensitive to mobile phase pH and ionic strength, J Chromatogr A., 718, 59–66, 1995
- [37] Nordestgaard B.G., Zilvetsmi D. B.: Large lipoproteins are excluded from the arterial wall in diabetic cholesterol-fed rabbits, Journal of Lipid research, 29, 1491-500, 1988
- [38] R. M. Carroll, L. L. Rudel: Lipoprotein separation and low density lipoprotein molecular weight determination using high performance gel-filtration chromatography, Journal Lipid Research, 24, 200-207, 1983
- [39] Nanjee M.N., Doran, J. E., Lerch P. G., Miller N. E.: Acute Effects of Intravenous Infusion of ApoA1/Phosphatidylcholine Discs on Plasma Lipoproteins in Humans, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 19, 979–989, 1999
- [40] Adsorbenty a chemicky vázané fáze, [cit. 10.5.2014], dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html>
- [41] BioBasic™ HPLC Columns Technical Guide, [cit. 10.5.2014], dostupné z: <http://www.leacsa.com/informacion/Bio%20basic%20catalog.pdf>