

ارزیابی روش‌های سنجش کلسترول در لیپوپروتئین‌های با دانسیته بالا (HDL-C)

دکتر مهدی هدایتی، مریم‌السادات دانشپور

چکیده

با محرز شدن اهمیت لیپوپروتئین‌های با دانسیته بالا در بیماری‌های قلبی - عروقی، درخواست این آزمایش جزء لاینفک نسخه پزشکان در این نوع بررسی‌ها گردیده است. امروزه در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی از روش‌های ساده رسوبی قدیمی تا انواع سنجش‌های یکنواخت جدید برای این منظور استفاده می‌شود، اما واقعاً ویژگی، دقت، صحت و کارایی این روش‌ها تا چه میزان است و استاندارد نمودن و ارزیابی آنها چگونه میسر می‌شود؟ در این مقاله سعی شده است تا متدولوژی انواع روش‌های مهم اندازه‌گیری کلسترول در لیپوپروتئین‌های با دانسیته بالا اعم از اولتراسانتریفیوژ، الکتروفورز، روش‌های رسوبی و روش‌های سنجش یکنواخت بررسی شود و برتری روش‌های سنجش یکنواخت مورد بحث قرار گیرد. در نهایت، پیچیدگی، نیاز به مهارت بالای پرسنلی، زمان‌بر بودن و هزینه بالای روش‌های اولتراسانتریفیوژ، الکتروفورزهای کمی، طیف سنجی مغناطیسی هسته و انواع روش‌های کروماتوگرافی، سبب عدم مطلوبیت این روش‌ها برای آزمایشگاه‌های تشخیص طبی گردیده است. نیاز به مراحل نمونه‌برداری، رسوب‌دهی و جداسازی دستی، از دقت روش‌های غیر یکنواخت کاسته و باعث جایگزینی آنها با روش‌های دقیق‌تری مانند روش‌های سنجش یکنواخت شده است. البته برای رقابتی شدن قیمت روش‌های یکنواخت در مقایسه با روش‌های رسوبی غیر یکنواخت اندکی زمان لازم است.

واژگان کلیدی: ارزیابی، HDL-C، سنجش

دریافت مقاله: ۸۳/۸/۳۰ - دریافت اصلاحیه: ۸۴/۵/۲۳ - پذیرش مقاله: ۸۴/۵/۲۴

مقدمه

عروقی در بزرگسالان توصیه شده است.^۵
مطالعه قند و لیپید تهران نیز پایین بودن میزان HDL-C در جمعیت ایرانی مورد بررسی و در معرض خطر بیماری‌های قلبی - عروقی را نشان داد. از این رو بدیهی است انجام هر اقدامی در راستای تصحیح این اختلال نیازمند سنجش HDL-C است. همچنین تمامی مطالعات ژنتیکی نیز که در راستای بررسی علل پایین بودن HDL-C انجام می‌شوند، فارغ از این سنجش نیستند.^{۳،۴} سنجش HDL-C به سه نسل تقسیم‌بندی می‌شود. در نسل اول، مبنای این

بیماری‌های قلبی - عروقی هنوز بزرگترین علت مرگ و میر در جوامع بشری محسوب می‌شوند و رابطه معکوس HDL-C و خطر ابتلا به این بیماری‌ها در بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک مورد تأیید قرار گرفته است.^{۱-۶} یکی از راه‌های مشخص نمودن خطر ابتلا به CVD اندازه‌گیری میزان HDL-C است و این سنجش طبق راهنمای NCEP حتی به عنوان اولین مرحله غربالگری بیماری‌های قلبی -

اندازه‌گیری‌ها، رسوب دادن کلسترول غیر HDL و اندازه‌گیری کلسترول HDL در بخش محلول نمونه است. اغلب مرحله رسوب‌دهی به طور دستی و سنجش کلسترول در محلول فوقانی با انواع دستگاه‌های اتو آنالایزر انجام می‌شود.^۷ نسل جدید روش‌های سنجش یکنواخت، با جلوگیری از واکنش کلسترول غیر HDL، نیاز به مرحله رسوب‌دهی را مرتفع نموده است.^{۸،۹} نکته مهم در مورد سنجش ذراتی چون HDL، غیر یکنواخت بودن جمعیت ذرات مذکور است؛ یعنی جمعیت مشخصی از نظر شکل، اندازه و تراکم مطرح نیست بلکه محدوده مشخصی از پارامترهای مذکور وجود دارد.^{۱۰} مثلاً از لحاظ تراکم، تمامی ذرات لیپوپروتئینی با تراکم ۱/۰۶۳ تا ۱/۲۱ کیلوگرم در لیتر از نوع HDL در نظر گرفته می‌شوند؛ به طوری که حداقل چهارده زیر گروه برای HDL گزارش شده است.^{۱۱،۱۲} به هر حال در میان لیپوپروتئین‌ها، HDL بیشترین نسبت پروتئین به لیپید را داراست. آپوپروتئین‌های AI، AII بیشترین مقدار را در این نوع ذره تشکیل می‌دهند. البته آپوپروتئین‌هایی مانند AIV، CI، CII، CIII، D و E نیز به مقدار کمتر وجود دارند.^{۱۳} فقدان آپوپروتئین B مهمترین وجه تمایز و اساس تمامی روش‌های جداسازی و اندازه‌گیری HDL-C است. در بخش لیپیدی این لیپوپروتئین بیشترین میزان مربوط به فسفولیپیدها (بیش از ۵۰٪) و کمترین میزان مربوط به تری‌گلیسرید (کمتر از ۱۰٪) است. کلسترول آزاد این ذره کمتر از ۱۰٪ است در حالی که حدود ۳۰٪ کلسترول استریفیه نیز در آن حضور دارد. در تمامی روش‌های سنجش HDL-C با هیدرولیز، کلسترول آزاد و استریفیه توأم اندازه‌گیری می‌شوند و منظور از HDL-C، کل کلسترول موجود در HDL است.^{۱۴} نکته مهم دیگری که در اندازه‌گیری HDL وجود دارد، وابستگی میزان LDL-C بر اساس محاسبه فریدوالد است. یعنی هر نوع عدم صحت در سنجش HDL-C سبب خطا در محاسبه LDL-C و نهایتاً خطا در طبقه‌بندی اختلال لیپوپروتئین‌ها می‌گردد. از این رو، صحت اندازه‌گیری HDL-C از هر دو نظر اهمیت دارد.^{۱۵}

روش‌های اندازه‌گیری HDL-C

صرف‌نظر از نوع روش اندازه‌گیری، صحت سنجش از اهمیت خاصی برخوردار است. به طوری که در سنجش HDL-C خطای تام (total error= bias + 1.96 CV) باید

به‌گونه‌ای باشد که نتایج به‌دست آمده حتماً در محدوده ۱۳٪ مقدار واقعی قرار گیرد. یعنی خطای تام که مجموعه‌ای از عدم دقت (خطای اتفاقی) و عدم صحت (تورش یا خطای سیستمیک) سنجش است، در محدوده ۹۵٪ حد قابل قبول اندازه‌گیری باشد. به عبارتی در مورد دقت روش، CV، کمتر یا مساوی ۴٪ قابل قبول است. و تورش قابل قبول کمتر از ۵٪ مقدار واقعی است. $13\% = 5\% + (4\% \times 1/96)$

روش‌های اندازه‌گیری HDL-C بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی این ذرات بنا شده است. مثلاً تراکم این ذرات مبنای سنجش آنها با روش اولتراسانتریفیوژ است. اختلاف در بار الکتریکی یا اندازه آنها به ترتیب مبنای سنجش در روش‌های الکتروفورز و کروماتوگرافی قرار می‌گیرد. در انواع روش‌های رسوبی غیر یکنواخت بار مثبت آپوپروتئین B و واکنش آن با پلی‌آنیون‌ها و یون‌های دو ظرفیتی اساس جداسازی ذرات لیپوپروتئینی غیر HDL از HDL می‌باشند.^{۱۶-۱۹} در جدول ۱ چند حقیقت بالینی راجع به HDL-C آورده شده است.

جدول ۱- چند حقیقت بالینی درباره HDL-C

- با کاهش هر ۱۰ mg/dL HDL-C، خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی ۲ تا ۳٪ افزایش می‌یابد.^۲
- افراد دارای HDL-C بالاتر از ۶۰ mg/dL در برابر بیماری‌های قلبی - عروقی مقاوم محسوب می‌شوند.^۵
- پیشگویی بیماری‌های قلبی - عروقی بر اساس HDL-C مهم‌تر از پیشگویی بر اساس LDL-C است.
- افراد دارای HDL-C کمتر از ۳۵ mg/dL در گروه پر خطر بیماری‌های قلبی - عروقی به شمار می‌روند.
- طبق مطالعه فرامینگهام ۸٪ افزایش LDL-C خطر بیماری‌های قلبی - عروقی را ۲٪ افزایش می‌دهد، اما ۱٪ کاهش در HDL-C خطر این بیماری‌ها را ۳ تا ۴٪ افزایش می‌دهد.^۶

روش الکتروفورز

لیپوپروتئین‌ها مانند سایر ذرات باردار در میدان الکتریکی به سمت قطب مخالف حرکت می‌کنند و به راحتی طی یک مرحله از یکدیگر جدا می‌شوند، اما برای آشکار نمودن نوار مربوط به لیپیدها از رنگ‌آمیزی اختصاصی چربی‌ها (Red Sudan Black, oil O, Fat red 7B) استفاده می‌شود. البته این رنگ‌ها چربی‌ها را بدون در نظر گرفتن ترکیب لیپوپروتئینی آنها مشخص می‌کنند و ارتباطی با میزان کلسترول آنها ندارند، بنابراین برای بررسی‌های «کیفی»

کردن محلول نمکی KBr (یا NaBr) تراکم تا ۱/۰۶۳ بالا برده می‌شود و مجدداً در همان شرایط ۲۰ ساعت سانتریفیوژ می‌گردد. با افزودن KBr جامد و افزایش چگالی تا ۱/۲۱۰ HDL در قسمت ته ماندهٔ محیطی با چگالی ۱/۰۶۳ جدا می‌گردد. این روش گران قیمت، زمان‌بر و نیازمند تکنیک آزمایشگاهی مناسب است اما به هرحال ابزاری قدرتمند در تحقیقات و روشی مرجع به شمار می‌رود.^{۲۴-۲۶} لازم به ذکر است که از روش‌های کروماتوگرافی مانند HPLC و روش‌های طیف‌سنجی مانند NMR (رزونانس مغناطیس هسته) نیز برای جداسازی و اندازه‌گیری HDL استفاده شده است اما این روش‌ها بسیار وقت‌گیر، گران‌قیمت و پیچیده‌اند و صحت آنها نیز نیاز به بررسی بیشتری دارد و از این رو برای آزمایشگاه‌های تشخیص طبی توصیه نمی‌شوند.^{۲۷،۲۸}

روش‌های رسوب‌دهی شیمیایی سنجش HDL-C

معرف‌های نسل اول

استفاده از پلی‌آنیون‌ها یا ترکیب آنها با کاتیون‌های دو ظرفیتی از اولین و رایج‌ترین روش‌های رسوب‌دهی لیپوپروتئین‌های غیر HDL است. در این روش به کمک سانتریفیوژ ساده می‌توان رسوب را جدا و کلسترول را در محلول فوقانی اندازه‌گیری نمود. هپارین و کلرور منگنز قدیمی‌ترین پلی‌آنیون و کاتیون مورد استفاده‌اند.^{۲۹} عدم خلوص هپارین‌های تجارتي و تداخل منگنز در واکنش آنزیمی متعاقب سبب جایگزینی این ترکیبات با سولفات دکستران و منیزیم شد. هرچند کاربرد این دو ترکیب در آمریکا رایج است، در اروپا استفاده از فسفوتنگستات و پلی‌اتیلن‌گلیکول جهت رسوب‌دهی شیوع بیشتری دارد.^{۳۰،۳۱} محدودیت اصلی روش‌های رسوب‌دهی شیمیایی، تداخل میزان بالای تری‌گلیسرید است. در این وضعیت تشکیل تجمع‌های سبک لیپوپروتئینی سبب کدورت محلول فوقانی و اندازه‌گیری برخی ذرات غیر HDL و نهایتاً پاسخ‌های مثبت کاذب می‌شود. حد مشخصی برای تداخل تری‌گلیسرید در این روش‌ها تعیین نشده است، زیرا این تداخل به نوع و غلظت معرف‌های به کار رفته بستگی دارد.^{۳۲} رقیق‌سازی نمونه، فیلتر کردن یا سانتریفیوژ نمودن آنها به عنوان راهکار حذف این تداخل توصیه شده است.^{۳۳} دربارهٔ نمونه‌های پلاسمایی حاوی EDTA به دلیل شلات شدن کاتیون دو ظرفیتی توسط این ترکیب، نسبت به نمونه‌های سرمی غلظت بالاتری از کلرور منگنز نیاز است.^{۳۴} غلظت بالاتر این کاتیون

مناسب هستند. در ادامهٔ تلاش‌هایی که جهت کمی نمودن نتایج الکتروفورز صورت پذیرفته است، رسوب‌دهی نوارهای الکتروفورز به کمک ترکیبات شیمیایی مانند فسفو تنگستات و سپس استفاده از رنگ‌آمیزی آنزیمی و اختصاصی، روش الکتروفورز را به روشی «کمی» با کارایی بالا تبدیل نمود. در ابتدا با استفاده از آنزیم کلسترول استراز، کلسترول را از استرهای آن در نوارهای الکتروفورز آزاد و سپس به کمک آنزیم کلسترول اکسیداز و واکنش شیمیایی متعاقب، نوارها را به صورت کمی آشکار می‌کنند. البته آنزیم کلسترول دهیدروژناز بسیار اختصاصی‌تر عمل می‌نماید. پس از آشکارسازی نوارهای مذکور، نامگذاری آنها برحسب میزان حرکت در میدان الکتریکی انجام می‌شود و نوارها به ترتیب نوار آلفا (HDL) پیش بتا (VLDL) و بتا (LDL) نامیده می‌شوند. در نهایت الکتروفورز روشی کارآمد در جداسازی و آشکار نمودن انواع لیپوپروتئین‌ها به شمار می‌رود. مشاهدهٔ نتیجه الکتروفورز به صورت نوارهای رنگی با چشم غیر مسلح از مزایای این روش به شمار می‌رود اما الکتروفورز کمی با رنگ‌آمیزی آنزیمی برای آزمایشگاه‌های تشخیص طبی از نظر تکنیکی و اقتصادی میسر نیست و این روش بیشتر جنبهٔ کیفی و نیمه کمی دارد.^{۲۳-۲۵}

روش اولتراسانتریفیوژ

در اغلب مراکز پژوهشی که در زمینهٔ لیپیدها و ناهنجاری‌های لیپوپروتئینی تحقیق می‌کنند، از اولتراسانتریفیوژ برای جداسازی لیپوپروتئین‌ها استفاده گسترده‌ای می‌شود. پس از جداسازی لیپوپروتئین‌ها از محتوای کلسترول یا آپولیپوپروتئین آنها برای تعیین غلظت لیپوپروتئین مذکور استفاده می‌شود. البته آزمایشگاه‌های بالینی از نظر اقتصادی و تکنیکی قادر به انجام این کار نیستند و باید نمونه‌های خود را به مراکز تحقیقاتی ارجاع دهند. زمانی که کلسترول و تری‌گلیسرید هر دو بالاتر از ۳۰۰-۳۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر باشند یا تری‌گلیسرید بالاتر از ۴۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر باشد، اولتراسانتریفیوژ روشی مفیدی و استاندارد در تفکیک لیپوپروتئین‌ها به شمار می‌رود و در واقع بهترین روش جداسازی زیر گروه‌های HDL یعنی HDL2 و HDL3 اولتراسانتریفیوژ است. به منظور تفکیک لیپوپروتئین‌ها، حجم معینی از سرم یا پلاسما حدود ۱۶ ساعت در محیطی با چگالی ۱/۰۰۶ گرم در میلی‌لیتر و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌گردد. سپس با اضافه

دو ظرفیتی حتی تداخل تری گلیسرید را کاهش می دهد. پاسخ منفی کاذب در نتیجه جایگزینی دکستران ۵۰۰۰۰ دالتونی با دکستران ۵۰۰۰۰۰ دالتونی تصحیح می شود.^{۳۵} در مورد رسوب دهنده فسفوتنگستات با تغییر pH می توان کاتیون منگنز را از معرف ها حذف نمود. بیش از یک دهه آزمایشگاه های تشخیص طبی از این معرف های نسل اول برای اندازه گیری HDL-C استفاده نمودند. معمولاً روش جداسازی رسوب مذکور دستی و اندازه گیری HDL-C به صورت دستگاهی بود. در این نسل هر چند فسفوتنگستات ارزان تر و در دسترس بود، ناپایداری آن در درازمدت سبب جایگزینی آن با دکستران سولفات گردید.^{۳۶-۴۰}

معرف های نسل دوم

از آنجایی که مهمترین منبع خطا در روش های نسل اول، جداسازی دستی مرحله رسوب دهی بود، محققان سعی در حذف این مرحله نمودند. استفاده از دانه های دکستران سولفات حاوی آهن، جداسازی ذرات غیر HDL را به کمک آهن ربا میسر ساخت و سبب خودکار شدن مرحله جداسازی گردید. مرکز کنترل بیماری ها در آمریکا از تلفیق معرف های رسوب دهنده نسل اول (هپارین و منگنز) با اولتراسانتریفیوژ، در تهیه نمونه های کنترل صحت HDL-C استفاده می نماید. البته پس از مدتی برنامه آموزش ملی کلسترول (NCEP) نیز از روش توصیه شده توسط مرکز کنترل بیماری ها برای تهیه استاندارد صحت بهره گرفت. در روش مذکور به منظور حذف لیوپروتئین های غنی از تری گلیسرید (کیلو میکرون ها و VLDL) از اولتراسانتریفیوژ استفاده شده است. لذا روش استاندارد توصیه شده، استفاده از عوامل رسوب دهنده و سه مرحله اولتراسانتریفیوژ است. در اصل ابتدا کیلو میکرون ها و VLDL با کمک اولتراسانتریفیوژ حذف و سپس لیوپروتئین

حاوی آپو B (LDL) توسط هپارین و کلرور منگنز رسوب داده می شود و نهایتاً HDL-C در محلول فوقانی به روش آنزیمی مورد سنجش قرار می گیرد. البته نباید فراموش کرد که لیوپروتئین ها، گروه پیچیده و غیر یکنواختی از ذرات پراکنده اند که در برخی خواص با یکدیگر هم پوشانی دارند و از این رو روشی کاملاً استاندارد و مشخص برای سنجش آنها قابل تصور نیست و روش های مختلف جداسازی لیوپروتئین ها جمعیت متفاوت و غیر یکنواختی از این ذرات را به دست می دهد.^{۳۲-۳۵} مقایسه برخی مشخصات مربوط به روش های سنجش HDL-C در نسل اول و دوم در جدول ۲ ارائه شده است.

معرف های نسل سوم

سیستم یکنواخت یا هوموژنوس یکی از اصطلاحاتی است که اولین بار در سیستم های سنجش ایمنی (ایمونواسی ها) مانند رادیو ایمونواسی یا الیزا استفاده شد. در سنجش های ایمنی چنانچه نیاز به جداسازی ترکیب نشاندار از غیر نشاندار باشد، سیستم غیر یکنواخت یا هتروژنوس نامیده می شود ولی اگر به مرحله جداسازی مذکور نیازی نباشد، سیستم را یکنواخت یا هوموژنوس می خوانند. روش های اندازه گیری HDL-C در نسل های اول و دوم به دلیل نیاز به مرحله جداسازی پس از رسوب دهی، غیر یکنواخت محسوب می شوند، اما در نسل سوم این اندازه گیری نیازی به مرحله رسوب دهی و جداسازی نیست و از این رو روش یکنواخت خواهد بود. روش های نسل سوم سنجش HDL-C به دلیل اندازه گیری مستقیم و فارغ از رسوب دهی و جداسازی،

جدول ۲- مقایسه برخی مشخصات دو نسل اول و دوم

جداسازی	همبستگی با دکستران سولفات	همبستگی با فسفوتنگستات	تداخل با تری گلیسرید بالای ۱۰۰۰	تداخل با اسید چرب آزاد	تداخل با هموگلوبین
دستی	مبنای مقایسه	مبنای مقایسه	کم	ندارد	مبنای مقایسه
خودکار ^{۴۱،۴۲}	تورش منفی	تورش مثبت	زیاد	ندارد	مثبت کاذب

جدول ۴- مقایسه کارایی برخی عوامل رسوب‌دهنده

عامل رسوب دهنده یا ممانعت کننده	آنتی بادی ضد آپو B ^{۴۲}	پلیمر مصنوعی پلی اتیلن گلیکول ^{۵۱،۵۲}	پلیمر مصنوعی دکستران ^{۵۷-۶۰}
دقت بر اساس درصد ضریب تغییرات	۱/۸	۳/۱	۲/۱
حد تشخیص (mg/dL)	۱	۱	۰/۳ تا ۴
محدوده عملکرد خطی (mg/dL)	۱۸۰	۱۵۰	۲۰۰
همبستگی با استاندارد طلایی	بایاس مثبت تا ۲۲/۳٪	حداقل ۹۶٪ همبستگی دارد ^{۵۵،۵۶}	۸۵ تا ۹۶٪ همبستگی دارد
تداخل LDL (mg/dL)	تا ۶۰۰ ندارد	تا ۳۰۰ ندارد	تا ۷۰۰ ندارد
تداخل VLDL (mg/dL)	تا ۹۰۰ ندارد	تا ۱۰۰۰ ندارد	تا ۱۹۰۰ ندارد
تداخل هموگلوبین (g/L)	تا ۲ ندارد	تا ۱۰ ندارد ^{۵۳،۵۴}	تا ۰/۶ ندارد
تداخل بیلی‌روبین (mg/L)	تا ۵۰۰ ندارد	تا ۱۰۰ ندارد	تا ۳۰ ندارد
تداخل ویتامین C (mg/L)	تا ۵۰۰ ندارد	تا ۱۰۰ ندارد	تا ۵۰ ندارد

معرف‌های مایع و آماده و نسخهٔ سوم حاوی معرف‌های آماده و غلظت پایین منیزیم (به منظور افزایش ویژگی و کاهش تداخل) است. برخی محققان روش‌هایی را که از آنتی‌بادی‌ها به جای پلیمرهای مصنوعی فوق استفاده می‌کنند، نسل چهارم روش‌های مستقیم سنجش HDL-C در نظر می‌گیرند.^{۴۸-۵۰}

بررسی کارایی روش‌های سنجش HDL-C در آزمایشگاه‌های بالینی

همان‌طور که اشاره شد، سه روش اصلی سنجش HDL-C استفاده از آنتی‌بادی ضد آپو پروتئین B، پلیمر مصنوعی پلی اتیلن گلیکول و نیز پلیمر مصنوعی دکستران است. مقایسه کارایی این روش‌ها در جدول ۴ آورده شده است. افزودن آنتی‌بادی ضد آپو B به روش ویژه‌ای مانع از شرکت ذرات حاوی این لیپوپروتئین در واکنش سنجش کلسترول می‌گردد و لذا به طور اختصاصی HDL-C سنجیده می‌شود.

گذشته از روش‌های یکنواخت جدول زیر، روش آنزیمی یکنواخت دیگری به نام روش کاتالاز اولین بار توسط یک کمپانی انگلیسی ابداع شد. در این روش ابتدا توسط مشتقات اختصاصی آنزیم‌های کلسترول استراز و اکسیداز، کلسترول ذرات غیر HDL آزاد و اکسید می‌گردد، سپس آنزیم کاتالاز محصول این واکنش را خنثی می‌کند و با افزودن معرف بعدی ضمن مهار نمودن کاتالاز، ذرات HDL

روش‌های مستقیم^۱ نیز خوانده می‌شوند.^{۴۶،۴۷} نسل سوم اندازه‌گیری، به دلیل یکنواخت بودن، به راحتی قابل اتوماسیون کامل است و به علاوه به دلیل حذف مراحل نمونه‌برداری دستی، مخلوط نمودن و سانتریفوژ، از دقت بالاتری برخوردار است. اولین گزارش نسل سوم سنجش HDL-C با کیت چهار محلوله، متعلق به یک کمپانی ژاپنی است. در کیت مذکور ابتدا لیپوپروتئین‌های حاوی آپو B توسط محلول پلی اتیلن گلیکول مجتمع گردیده، سپس به کمک آنتی‌بادی ضد آپو B، مانع شرکت این نوع ذرات در واکنش سنجش کلسترول می‌شوند. در مرحله بعد فقط HDL-C در واکنش سنجش کلسترول اندازه‌گیری می‌شود و در آخر محلول نهایی سبب توقف واکنش آنزیمی و شفاف شدن مجدد نمونه جهت خوانش جذب نوری در طول موج‌های ۶۰۰ و ۷۰۰ نانومتر می‌گردد. در روش‌های جدید استفاده از سیکلودکستران سولفات و منیزیم سبب ممانعت از واکنش کیلومیکرون‌ها و VLDL و عدم نیاز به محلول شفاف کننده می‌شود؛ در ضمن اتصال آنزیم‌های کلسترول استراز و اکسیداز باعث واکنش اختصاصی آنها با HDL-C می‌گردد. علاوه بر ترکیب مذکور، پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ دالتونی نیز برای این منظور ایده‌آل بود. کیت‌های هوموژنوس را به سه نسخه می‌توان تقسیم نمود. نسخه اول حاوی معرف‌های لیوفیلیزه و نیازمند آماده‌سازی، نسخه دوم حاوی

واکنش معمول سنجش کلاسترول را پشت سر خواهند گذاشت. درصد ضریب خطای دقت برون آزمونی این روش حدود ۲٪ و محدوده عملکرد خطی آن ۹ تا ۱۴۹ میلی‌گرم در دسی‌لیتر گزارش شده است. این روش از نظر صحت نیز همبستگی خوبی با روش استاندارد نشان داده است.

Catalase method = 1.09 Reference method - 49 mg/L (r=0.966)

اسید اسکوریک تا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، بیلی‌روبین تا ۲۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر، هموگلوبین تا ۵ گرم در لیتر و تری‌گلیسرید تا ۱۷۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر تداخلی در این روش ایجاد نمی‌کنند. استفاده از پلاسماهای حاوی هیپارین یا EDTA بلامانع است.^{۶۴-۶۸}

بحث

به دلیل نقش لیپوپروتئین‌ها در بیماری‌های قلبی - عروقی و مشخص شدن نقش لیپوپروتئین‌ها در این فرایند، سنجش HDL-C اهمیت روزافزونی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و بالینی پیدا کرده است.^{۶۵} در این میان طیف گسترده‌ای از روش‌های سنجش این ترکیب ابداع و مورد استفاده قرار گرفته است. کلاً این روش‌ها را به دو گروه اساسی تقسیم می‌کنند.

جدول ۳- کارایی روش‌های اصلی سنجش HDL-C

روش رسوبی یا غیر یکنواخت	روش مستقیم یا یکنواخت	
ندارد	دارد	قابلیت اتوماسیون
۲ تا ۶٪	۲ تا ۳٪	دقت، ضریب تغییرات
پایه قیاس	بالا تر	سرعت
پایه قیاس	بالا تر	هزینه خرید کیت
پایه قیاس	بالا تر	ویژگی
پایه قیاس	پایین تر	هزینه پرسنلی

در تمامی این روش‌ها دو مرحله وجود دارد، مرحله اول جداسازی ذرات حاوی آپولیپوپروتئین B و مرحله دوم سنجش دقیق و صحیح کلاسترول در ذرات HDL است. روش هیپارین منگنز به دلیل تداخل منگنز با معرف‌های آنزیمی سنجش کلاسترول (کلاسترول اکسیداز) کمی تورش مثبت دارد. روش پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG6000) هماهنگی

بسیار زیادی با روش تلفیقی اولتراسانتریفیوژ/هیپارین منگنز، و روش اولتراسانتریفیوژ گرادینانی دارد. در ضمن توان خوبی در رسوب‌دهی نمونه‌های لیپمیک داراست اما به دلیل کارایی بیشتر روش فسفوتنگستات، این روش نسبت به پلی‌اتیلن‌گلیکول عمومیت بیشتری یافته است.

خلاصه‌ای از مقایسه دو روش رسوبی و یکنواخت در جدول ۳ آورده شده است.

روش‌های یکنواخت ویژگی قابل قبولی دارند و اثر تداخلی بسیاری از ترکیبات داخلی مانند تری‌گلیسرید، بیلی‌روبین، هموگلوبین و اسکوریک اسید را به حداقل رسانده‌اند. در این روش‌ها به طور متوسط تداخل تری‌گلیسرید عموماً تا ۹۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر از بین رفته است و حتی در برخی از این روش‌ها تا ۱۷۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر نیز تداخلی مشاهده نشده است. هموگلوبین تا ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر عاری از تداخل در نظر گرفته می‌شود و روش‌های یکنواخت فاقد تداخل هموگلوبین تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر نیز گزارش شده‌اند. البته در تمام روش‌های موجود، تری‌گلیسرید بالاتر از ۲۰۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر تداخل دارد. به هر حال روش‌های یکنواخت علاوه بر سرعت بالاتر و دقت بیشتر و کاهش هزینه‌های پرسنلی از پارامترهای متدولوژیک مناسب‌تری نیز برخوردارند و در کشوری مانند آمریکا به سرعت جایگزین روش‌های غیر یکنواخت شده‌اند. طبق گزارش انجمن پاتولوژیست‌های آمریکا در سال ۱۹۹۷ تعداد ۵۵۰ آزمایشگاه در سطح آمریکا به جای روش‌های غیر یکنواخت از روش‌های یکنواخت استفاده کردند و این رقم در سال بعد به ۸۵۳ آزمایشگاه رسید و آمار سال ۲۰۰۰ حاکی از استفاده ۲۵۷۸ آزمایشگاه از این روش‌ها بوده است. در جدول ۵ خلاصه‌ای از روش‌های سنجش HDL-C مورد استفاده در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و بالینی ارائه شده است. تاکنون روش‌های رسوبی، روش غالب در آزمایشگاه‌های بالینی کشورمان بوده است و دلیل عمده، قیمت پایین‌تر کیت‌های روش‌های رسوبی نسبت به روش‌های مستقیم است اما در نهایت چنانچه هزینه خرید کیت‌های مربوط به روش‌های هوموژنوس یا یکنواخت تا حدودی کاهش یابد، جایگزین بسیار مناسبی برای روش‌های رسوبی غیریکنواخت در کشورمان خواهد بود.

جدول ۵- مقایسهٔ اجمالی روش‌های سنجش HDL-C

آزمایشگاه‌های بالینی		آزمایشگاه‌های تحقیقاتی
روش‌های یکنواخت یا مستقیم	روش‌های غیر یکنواخت یا رسوبی	اولتراسانتیفریوژها کروماتوگرافی‌ها رزونانس مغناطیسی هسته الکتروفورزهای کمی
هزینهٔ پایین	هزینهٔ بسیار پایین	هزینهٔ بالای خرید دستگاه‌ها و مواد مصرفی
سرعت پاسخ‌دهی بسیار بالا	سرعت پاسخ‌دهی بالا	قیمت بالا
اجرا توسط پرسنل رایج	اجرا توسط پرسنل رایج	زمان‌بر بودن روش
عدم نیاز به تخصص بالا	عدم نیاز به تخصص بالا	پیچیدگی
صحت قابل قبول	صحت قابل قبول	نیاز به نیروی انسانی متخصص
دقت بسیار بالا	دقت بالا	دقت و صحت بسیار بالا

References

- Badimon JJ, Fuster V, Badimon L. Role of high density lipoproteins in the regression of atherosclerosis. *Circulation* 1992 Dec;86(6 Suppl):III86-94.
- Skinner ER. High-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 241-7.
- Daneshpour MS, Hedayati M, Azari F, Ghasemi F, Azizi F. Association between the cholesteryl ester transfer protein_TaqI polymorphism and low HDL-C concentration in Tehran population. *Iranian Journal of Endocrinology & Metabolism*, Vol. 5, Supplement, 355-61. (Winter 2004).
- Daneshpour MS, Hedayati M, Azari F, Ghasemi F, Azizi F. Association of B2 allele frequency in CETP gene with low level of HDL-C in Tehran. *Journal of Iran University of Medical Science*. Vol11, No.43, 757-63(2005).
- Expert Panel. Summary of second report of the NCEP expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA* 1993; 269:3015-23.
- Wilson PWF. High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990; 66: 7A-10A.
- Reed RG. In Search of the Ideal Measure of High-Density Lipoprotein. *Clin Chem* 1997;43: 1809-10.
- Nauck M, Marz W, Haas B, Wieland H. Homogeneous assay for direct determination of high-density lipoprotein cholesterol evaluated. *Clin Chem* 1996; 42: 424-9.
- Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. *Clin Chem* 1995; 41: 717-23.
- Havel RJ, Kane JP. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. Scriver CR Beaudet AL Sly WS Valle D Eds. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases* 1995 NewYork: McGraw Hill. P.1841-50.
- Li Z, McNamara JR, Ordovas JM, Schaefer EJ. Analysis of high-density lipoproteins by a modified gradient gel electrophoresis method. *J Lipid Res* 1994; 35: 1698-711.
- Delalla OF, Elliot HA, Gofman JW. Ultracentrifugal studies of high-density serum lipoproteins in clinically healthy adults. *Am J Physiol* 1954; 179: 333-7.
- Fuchart JC, Bard JM. Lipoprotein particle measurement: an alternative approach to classification of lipid disorders. *Curr Opin Lipidol* 1991; 2: 362-6.
- Gibson JC, Rubinstein A, Brown WB. Precipitation of apo E-containing lipoproteins by precipitation reagents for apolipoprotein B. *Clin Chem* 1984; 30: 1784-88.
- Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
- Warnick GR, Wood PD. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. *The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement*. *Clin Chem* 1995; 41: 1427-33.
- National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. Recommendations on lipoprotein measurement. NIH publication 95-3044 1995 NIH Bethesda, MD.
- Miller WG. Matrix effects in the measurement and standardization of lipids and lipoproteins. Rifai N Warnick GR Dominiczak MH eds. *Handbook of lipoprotein testing* 2000: Washington: AACC Press. P.695-716.
- Myers GL, Cooper GR, Henderson LO, Hassemer DJ, Kimberly MM. Standardization of lipid and lipoprotein measurement. Rifai N Warnick GR Dominiczak MH

- eds. Handbook of lipoprotein testing 2000: AACC Press Washington.717-48
20. Neubeck W, Wieland H, Habenicht A, Müller P, Baggio G, Seidel D. Improved assessment of plasma lipoprotein patterns. III. Direct measurement of lipoproteins after gel-electrophoresis. *Clin Chem* 1977; 23: 1296-300.
 21. Conlon D, Blankstein L, Pasakarins P, Steinberg C, D'Amelio J. Quantitative determination of high-density lipoprotein cholesterol by agarose gel electrophoresis. *Clin Chem* 1979; 25: 1965-9.
 22. Nauck M, Winkler K, März W, Wieland H. Quantitative determination of high-, low-, and very-low-density lipoproteins and lipoprotein (a) by agarose gel electrophoresis and enzymatic cholesterol staining. *Clin Chem* 1995; 41: 1761-7.
 23. Contois JH, Gillmor RG, Moore RE, Contois LR, Macer JL, Wu AH. Quantitative determination of cholesterol in lipoprotein fractions by electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1999; 282: 1-14.
 24. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-53.
 25. Delalla OF, Elliott HA, Gofman JW. Ultracentrifugal studies of high density serum lipoproteins in clinically healthy adults. *Am J Physiol* 1954; 179: 333-7.
 26. Fuchart JC, Bard JM. Lipoprotein particle measurement: an alternative approach to classification of lipid disorders. *Curr Opin Lipidol* 1991; 2: 362-6.
 27. Usui S, Nakamura M, Jitsukata K, Nara M, Hosaki S, Okazaki M. Assessment of between-instrument variations in a HPLC method for serum lipoproteins and its traceability to reference methods for total cholesterol and HDL-cholesterol. *Clin Chem* 2000; 46: 63-72.
 28. Otvos JD. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH eds. Handbook of lipoprotein testing 2000. AACC Press Washington: 609-23.
 29. Fredrickson DS, Levy RI, Lindgren FT. A comparison of heritable abnormal lipoprotein patterns as defined by two different techniques. *J Clin Invest* 1969; 47:2446-57.
 30. Mayfield C, Warnick GR, Albers JJ. Evaluation of commercial heparin preparations for use in the heparin-Mn²⁺ method for measuring HDL-cholesterol in high-density lipoprotein. *Clin Chem* 1979; 25:1309-13.
 31. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28: 1379-88.
 32. Briggs CJ, Anderson D, Johnson P, Deegan T. Evaluation of the polyethylene glycol precipitation method for the estimation of high-density lipoprotein cholesterol. *Ann Clin Biochem* 1981; 18: 177-81.
 33. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982;28:1379-88.
 34. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res* 1970; 11: 583-95.
 35. Burstein M, Scholnick HR. Lipoprotein-polyanion-metal interactions. *Adv Lipid Res* 1973; 11: 67-108.
 36. Warnick GR, Albers JJ. A comprehensive evaluation of the heparin-manganese precipitation procedure for estimating high density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* 1978; 19: 65-76.
 37. Finley PR, Schiffman RB, Williams RJ, Lichti DA. Cholesterol in high-density lipoprotein: use of Mg²⁺/dextran sulfate in its enzymic measurement. *Clin Chem* 1978; 24: 931-3.
 38. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 1977; 23: 882-4.
 39. Warnick GR, Nguyen T, Albers AA. Comparison of improved precipitation methods for quantification of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1985; 31: 217-22.
 40. Kimberly MM, Leary ET, Cole TG, Waymack PP. Selection, validation, standardization, and performance of a designated comparison method for HDL-cholesterol for use in the cholesterol reference method laboratory network. *Clin Chem* 1999; 45: 1803-12.
 41. Harris N, Galpichian V, Rifai N. Three routine methods for measuring high-density lipoprotein cholesterol compared with the Reference Method. *Clin Chem* 1996; 42: 738-43.
 42. Nauck M, Marz W, Wieland H. New immunoseparation-based homogeneous assay for HDL-cholesterol compared with three homogeneous and two heterogeneous methods for HDL-cholesterol. *Clin Chem* 1998; 44: 1443-51.
 43. Harris N, Galpichian V, Thomas J, Iannotti E, Law T, Rifai N. Three generations of high-density lipoprotein cholesterol assays compared with ultracentrifugation/dextran sulfate-Mg²⁺ method. *Clin Chem* 1997; 43: 816-23.
 44. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline. NCCLS document EP9-A 1995 NCCLS Wayne, PA.
 45. Myers GL, Kimberly MM, Waymack PP, Smith SJ, Cooper GR, Sampson EJ. A reference method laboratory network for cholesterol: a model for standardization and improvement of clinical laboratory measurements. *Clin Chem* 2000; 46: 1762-72.
 46. Kakuyama T, Kimura S, Hasiyuchi Y. Fully automated determination of HDL-cholesterol from human serum with Hitachi 911. *Clin Chem* 1994; 40:A1104.
 47. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem* 1995; 41: 717-23.
 48. Hoang MP, Hirany SV, Parupia J, Devaraj S, Jialal I. Comparison of 2 homogeneous high-density lipoprotein cholesterol assays. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 1005-9.
 49. Lin MJ, Hoke C, Ettinger B. Evaluation of homogeneous high-density lipoprotein cholesterol assay on a BM/Hitachi 747-200 analyzer. *Clin Chem* 1998; 44: 1050-2.
 50. Arranz-Pena ML, Tasende-Mata J, Martin-Gil FJ. Comparison of two homogeneous assays with a precipitation method and an ultracentrifugation method for the measurement of HDL-cholesterol. *Clin Chem* 1998; 44: 2499-505.
 51. Okamoto Y, Tanaka S, Nakano H. Direct measurement of HDL cholesterol preferable to precipitation method. *Clin Chem* 1995; 41: 1784.

52. Okazaki M, Sasamoto K, Muramatsu T, Hosaki S. Evaluation of precipitation and direct methods for HDL-cholesterol assay by HPLC. *Clin Chem* 1997; 43: 1885-90.
53. Cobbaert C, Zwang L, Ceriotti F, Modenese A, Cremer P, Herrmann W, et al. Reference standardization and triglyceride interference of a new homogeneous HDL-cholesterol assay compared with a former chemical precipitation assay. *Clin Chem* 1998; 44: 779-89.
54. Rifai N, Cole TG, Iannotti E, Law T, Macke M, Miller R, et al. Assessment of interlaboratory performance in external proficiency testing programs with a direct HDL-cholesterol assay. *Clin Chem* 1998; 44: 1452-8.
55. Lackner KJ, Schmitz G. beta-VLDL of patients with type III hyperlipoproteinemia interferes with homogeneous determination of HDL-cholesterol based on polyethylene glycol-modified enzymes. *Clin Chem* 1998; 44: 2546-8.
56. Escola-Gil JC, Jorba O, Julve-Gil J, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J, Blanco-Vaca F. Pitfalls of direct HDL-cholesterol measurements in mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Clin Chem* 1999; 45: 1567-9.
57. Simo JM, Castellano I, Ferre N, Joven J, Camps J. Evaluation of a homogeneous assay for high-density lipoprotein cholesterol: limitations in patients with cardiovascular, renal, and hepatic disorders. *Clin Chem* 1998; 44: 1233-41.
58. Kondo A, Muranaka Y, Ohta I, Kanno T. Dynamic reaction in a homogeneous HDL-cholesterol assay visualized by electron microscopy. *Clin Chem* 1999; 45: 1974-80.
59. Beheshti I, Wessels LM, Eckfeldt JH. EDTA-plasma vs serum differences in cholesterol, high-density-lipoprotein cholesterol, and triglyceride as measured by several methods. *Clin Chem* 1994; 40: 2088-92.
60. Bairaktari E, Elisaf M, Katsaraki A, Tsimihodimos V, Tselepis AD, Siamopoulos KC, et al. Homogeneous HDL-cholesterol assay versus ultracentrifugation/dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation and dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation in healthy population and in hemodialysis patients. *Clin Biochem* 1999; 32: 339-46.
61. Gomez F, Camps J, Simo JM, Ferre N, Joven J. Agreement study of methods based on the elimination principle for the measurement of LDL- and HDL-cholesterol compared with ultracentrifugation in patients with liver cirrhosis. *Clin Chem* 2000; 46: 1188-91.
62. Takashi K, Fumihiko M, Yoshiaki N. Evaluation of reactivity using homogeneous assays for serum HDL-cholesterol in various clinical subjects. *Jpn J Med Pharm Sci* 2000; 43:1149-54.
63. Izawa S, Okada M, Matsui H, Horita Y. A new direct method for measuring HDL-cholesterol which does not produce any biased values. *J Med Pharm Sci* 1997; 37:1385-8.
64. Lawlor J, Pelczar D, Sane R, Siek G. Performance characteristics of the RDI homogeneous HDL cholesterol assay. *Clin Chem* 1998; 44:A79.
65. Daneshpour MS, Hedayati M, Azizi F. Association of the TaqI and -629C>A polymorphisms in CETP gene with low level of HDL-C in Tehran. *Pajouhesh Quarterly Research journal*.(In Press) 2005.

Review Article**Evaluation of HDL-C determination methods**

Hedayati M, Daneshpour MS.

Endocrine Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

Abstract:

Following confirmation of the role of HDL-C role in cardiovascular disease, its measurement has become a fixed requirement by physicians. Today serum HDL-C is measured using different methods from simple outdated precipitation methods to the latest of homogenous assays used for HDL-C determination. However, the precision, accuracy and performance, standardization, and evaluation for those methods are controversial. This paper briefly discusses the methodology of various HDL-C determination methods e.g ultra centrifugation, electrophoresis, precipitation and homogenous assays, and advantages of homogenous methods. Human expertise, time consuming and high cost instrumentation of ultra centrifugation, quantitative electrophoresis, nuclear magnetic resonance and chromatographic methods are key factors that make the methods undesirable for clinical laboratories. Precipitation and manual separation steps of non homogenous HDL-C determination methods, reduces their precision, and causes them to be replaced by more precise methods such as homogenous assays; however more time is needed for their costs to be more competitive.

Key words: Evaluation, HDL-C, Determination.