مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیست و دوم، شماره‌ی ۱، صفحه‌های ۲۹ ـ ۱۱ (فروردین ـ اردیبهشت ۱۳۹۹)

مقاله‌ی پژوهشی

روش‌های سنجش لیپوپروتئین با دانسیته بالا از روش‌های رسوبی تا رزونانس مغناطیس هسته

دکتر سمانه حسین‌زاده، دکتر صفورا پاکیزه‌کار، دکتر مهدی هدایتی

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران،
نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، دکتر مهدی هدایتی؛ e-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: نتایج تحقیقات گسترده، حاکی از شکل‌گیری فرضیه‌ای رایج در خصوص نقش محافظتی کلسترول لیپوپروتئین پرچگال (**HDL-C**) در برابر گرفتگی عروق می‌باشد. این تفکر به دلیل کاهش نرخ بیماری‌های قلبی عروقی و سایر بیماری‌های مربوط به گرفتگی عروق در غلظت بالای **HDL-C** است. مکانیسم‌های مختلفی از قبیل جریان معکوس کلسترول، کارکرد ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی، سبب شد که **HDL-C** به عنوان یکی از نشانگرهای پیش‌بینی احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی پیشنهاد گردد. در این راستا، آشنایی با روش‌های سنجش **HDL-C** و ارزیابی نقاط قوت و ضعف آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه، سعی بر آن شده است تا پس از ذکر خلاصه‌ای از ماهیت، کارکرد و عملکرد محافظتی **HDL-C** در برابر بیماری‌های قلبی عروقی، روش‌های مذکور را بر اساس ماهیت سنجش بررسی نموده و برخی از مولکول‌های مداخله‌کننده در نتیجه آزمایشات و برخی استراتژی‌های کاهنده تداخلات را ارائه نماید. در نهایت، آن گونه که به نظر می‌رسد، برخی معایب از قبیل هزینه بالا، جداسازی دستی، زمان‌بر بودن، امکان بر هم خوردن ساختار در روش‌های جداسازی بر مبنای خصوصیات فیزیکی و هم‌چنین نسل اول و دوم روش‌های شیمیایی، موجب برتری استفاده از روش‌های سنجش همگن شده است. از سوی دیگر، ارزیابی هدف‌مند **HDL-C** از جهت میزان عملکرد و انجام نقش‌های محافظتی، می‌تواند رویکرد نوینی در پیش‌بینی خطر احتمال وقوع بیماری‌های قلبی عروقی باشد. هر چند تمامی روش‌های ذکر شده نیازمند به پیشرفت و بهینه‌سازی بیشتری هستند.

واژگان کلیدی: کلسترول HDL، سنجش، بیماری‌های قلبی ـ عروقی

دریافت مقاله: ۹۹/۲/۱۶- دریافت اصلاحیه: ۹۹/۴/۱۴ ـ پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۱۳

مقدمه

در سال‌های اخیر، بیماری‌های غیرواگیردار و مزمن به عنوان عمده‌ترین عامل مرگ و میر جهانی تلقی می‌گردند. در کشورهای کم درآمد، بیماری‌های قلبی عروقی با فاکتورهای افزاینده خطر از قبیل شرایط مادر و جنین و اختلالات تغذیه‌ای، پس از بیماری‌های عفونی (مانند ایدز، توبرکلوزیس و مالاریا) در رتبه دوم عوامل کشنده قرار گرفته است. این امر سبب شده است تا امروزه بیماری‌های قلبی عروقی بزرگ‌ترین عامل مرگ و میر جهانی به شمار آمده و با توجه به تحقیقات صورت گرفته، روند فوق در آینده نیز حاکم خواهد بود.[۱] از دیدگاه اپیدمیولوژی، یکی از باورهای رایج، نسبت معکوس خطر بیماری‌های قلبی عروقی با میزان HDL-C[i] است. این تفکر به دلیل کاهش نرخ بیماری‌های قلبی عروقی و سایر بیماری‌های مربوط به گرفتگی عروق در غلظت بالای HDL-C است.[۲] کلسترول HDL-C موجود در جریان خون تنها در شرایط تعریف شده‌ای می‌تواند نقش محافظتی خود را ایفا نماید؛ به عنوان مثال، بیماران با HDL-C پایین معمولاً دارای تری‌گلیسرید بالا، ناشی از افزایش apoC-III[ii] بوده و هم‌چنین غلظت LDL[iii] آن‌ها نیز بالا است؛ و این نسبت موجب افزایش خطر بیماری‌های قلبی عروقی می‌گردد.[۳] از طرفی در بررسی نقش محافظتی HDL-C، تغییر ژنتیکی منجر به افزایش HDL-C، موجب کاهش خطر سکته قلبی نگردید.[۲] هم‌چنین مطالعات صورت گرفته به صورت کنترل شده و تصادفی بر روی مهارکننده‌های نیکوتینیک اسید و پروتئین انتقال‌دهنده کلسترول استر

i -High Density Lipoprotein

ii -Apolipoprotein C-III
iii -Low Density Lipoprotein

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

(CETP)[i] که در حالت عادی موجب افزایش HDL-C می‌گردد، پس از استفاده بیماران از داروهای حاوی استاتین‌ها، موجب کاهش حملات قلبی عروقی نگردیدند.[۴] از این روی می‌توان گفت که جنبه‌های متعددی از HDL-C از قبیل محتوای آپولیپوپروتئینی، میزان سایر پروتئین‌ها و لیپیدها، اندازه ذرات HDL-C و وضعیت اکسیداسیون تاثیر زیادی بر کارکرد ذرات HDL-C در انجام نقش محافظتی یا خطرزا بودن دارد.[۵] در این راستا، پرداختن به روش‌های سنجش میزان HDL-C، محتوای پروتئینی و لیپیدی آن و هم‌چنین عملکرد صحیح HDL-C می‌تواند در پیش‌بینی احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی ـ عروقی به صورت دقیق و علمی نقش کاربردی ایفا نماید. در این مطالعه، پس از نگاهی اجمالی به نقش‌های عملکردی و محافظتی HDL-C، عناصر تشکیل‌دهنده و فاکتورهای دخیل در سنتز آن، به بررسی روش‌های مربوط به سنجش HDL-C شامل روش‌های معمول سنجش بر پایه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، روش‌های سنجش عملکردی و سنجش بر پایه محتوای پروتئینی و لیپیدی پرداخته می‌شود. پس از آشنایی با روند پیشرفت روش‌ها و نیز ذکر مزایا و محدودیت‌های هر یک از آن‌ها، به برخی از شاخص‌های سنجش صحت و دقت روش‌ها پرداخته و در خاتمه با برخی از مداخله‌کننده‌ها که ممکن است در نتیجه آزمایش موجب ایجاد جواب‌های کاذب گردند آشنا شده و چگونگی کاهش تداخلات مربوطه به اختصار بیان خواهند شد.

عملکرد HDL-C:

ذرات HDL-C نقش‌های فیزیولوژیک و متابولیکی متعددی بر عهده دارند. به طور خلاصه اهم این نقش‌ها عبارتند از:

- انتقال معکوس کلسترول (RCT[ii])
- نقل و انتقال microRNA ها
- اثر ضد التهابی
- اثر ضدترومبوتیک
- مهار اکسیداسیون LDL
- محافظت از سلول‌های اندوتلیال و اثر بر گشادکنندگی عروق
- اثر محافظت‌کنندگی در برابر آسیب ناشی از ایسکمی ـ پرفشاری خون
- تنظیم متابولیسم گلوکز

۱- **انتقال معکوس کلسترول** (RCT) : کلسترول‌های آزاد در جریان خون استریفیه شده و پس از رسیدن به کبد، از طریق مولکول‌های واسطه مانند ABCAI[iii]، ABCGI و SR-B1[iv] به کبد انتقال یافته و پس از تبدیل به لیپیدهای خنثی و یا اسیدهای صفراوی، به همراه مدفوع و یا صفرا در فرآیند RCT دفع می‌گردند. این فرآیند می‌تواند توجیه‌کننده نقش ضد آرترواسکلروتیک HDL-C باشد.[۶]

۲- **نقل و انتقال** microRNA **ها**: نتایج تحقیقات پیشین حاکی از توانایی miRNA ها در تنظیم بیان ژن در فرآیندهای پاتولوژیکی و بیولوژیکی مهم در درون سلول است.[۷-۹] در این میان، پنج miRNA از قبیل miR-135a، miR-188، miR-877، miR-223 و miR-760 که توسط HDL-C منتقل می‌شوند در متابولیسم لیپیدها، هومئوستازی کلسترول، فشار خون و تصلب عروق نقش دارند. افزایش یا کاهش ذرات HDL-C می‌تواند در میزان جابجایی miRNA ها و به تبع آن در بروز بیماری‌های قلبی عروقی از جمله تصلب شرائین نقش داشته باشد.[۱۰]

۳- **اثر ضد التهابی**: علاوه بر نقش‌های ذکر شده، HDL-C از طریق پروتئین apoA-I[v] موجب بروز اثرات ضدالتهابی در سلول‌های اندوتلیال و ماکروفاژ می‌گردد.[۱۱]

۴- **اثر ضدترومبوتیک**: HDL-C این اثر را به چند طریق از جمله ممانعت از فعالیت پلاکت‌ها و ممانعت از فعال شدن فاکتورهای فعال‌سازی پلاکت‌ها و سیکلواکسیژناز A2 توسط افزایش جریان خون و هم‌چنین کاهش پروتئین APC و ترومبومدولین به جهت کاهش شکل‌گیری ترومبین در سلول‌های اندوتلیال و به تبع آن ممانعت از آپوپتوز آن‌ها به انجام می‌رساند.[۱۲]

۵- **مهار اکسیداسیون** LDL: HDL-C به کمک آنزیم‌های ضداکسیداسیونی خود از قبیل PON1[vi] و LCAT[vii]، از اکسیداسیون LDL جلوگیری نموده و بدین ترتیب نقش ضد التهابی و ضداکسیداسیونی خود را ایفا می‌نماید.

۶- **محافظت از سلول‌های اندوتلیال و اثر بر گشادکنندگی عروق**: HDL-C از طریق افزایش بیان نیتریک

i- Cholesterol Ester Transfer Protein
ii- Reverse Cholesterol Transport

iii- ATP binding cassette transporter proteins A1
iv -Scavenger Receptor Class B Type 1
v- Apolipoprotein A-I
vi- Paraoxonase-1
vii- Lecithin-Cholesterol Acyl Transferase

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOs[i]) توسط اتصال apoA-I به SR-B1 موجود در حفرات چربی سلول‌های اندوتلیال و هم‌چنین فعال کردن گیرنده S1P [ii] غشایی سلول‌های اندوتلیال، اثر محافظتی خود را به انجام می‌رساند.

۷- اثر محافظت‌کنندگی در برابر آسیب ناشی از ایسکمی ـ پرفشاری خون: این ویژگی HDL-C ناشی از ترکیب اسفنگولیپیدی موجود در ساختار آن به نام S1P است که موجب فعال شدن گیرنده لیزوفسفولیپید، تقویت تولید NO، مهار سلول‌های التهابی و آپوپتوز سلول های قلبی می‌گردد.

۸- تنظیم متابولیسم گلوکز: HDL-C در مکانیسم وابسته به انسولین، موجب افزایش کارکرد سلول‌های بتا و ترشح انسولین شده و سبب کاهش تجمع کلسترول به کمک ناقلین ABCA1 و ABCG1 می‌شود. اثر دیگر آن در مکانیسم غیروابسته به انسولین شامل فعال‌سازی پروتئین کیناز فعال‌کننده ۵' آدنوزین مونوفسفات (AMPK) در سلول‌های اندوتلیال، بافت چربی و عضله اسکلتی جهت تسریع در جذب گلوکز محیطی است.[۱۳]

عناصر تشکیل‌دهنده HDL-C:

مولکول HDL-C شامل ۵۰ درصد آپوپروتئین (اغلب AI، AII، CI، CII، CIII، E و J)، ۲۰ درصد کلسترول آزاد (FC)[iii] و کلسترول استریفیه شده (EC)[iv]، ۲۵ درصد فسفولیپیدها (PL[v]) و ۵ درصد تری‌گلیسرید می‌باشد.[۱۴]

فاکتورهای دخیل در ساخت HDL-C:

- ApoA-I
- ABCA1
- ABCG1
- LCAT
- SR-B1
- CETP

۱- ApoA-I: این پروتئین ۷۰ درصد از ساختار HDL-C را شامل شده و ناقل اصلی کلسترول از سلول‌ها است و از نظر ساختاری برای اتصال با تمایل بالا به لیپیدها تکامل یافته است. شکل مونومری apoA-I موجود در پلاسما که دارای مقدار اندکی لیپید می‌باشد، pre-β1 HDL-C نامیده می‌شود. تنها در حضور این مولکول، آنزیم ABCA1 ساختاری پایدار پیدا کرده و می‌تواند جریان کلسترول کبدی را به صورت موثر میانجی‌گری کند؛ به گونه‌ای که بیان بالای apoA-I موجب کاهش چشم‌گیر رسوبدهی لیپید در کبد و ممانعت از شکل گیری کبد چرب می‌گردد.[۱۵]

۲- ABCA1: اَبَرخانواده ABC دارای هفت زیرخانوده از ABCA-G است. نقش اصلی ABCA1، انتقال بین سلولی کلسترول آزاد و فسفولیپیدها به apoA-I اولیه و شکل گیری pre-β1 HDL-C است. این گیرنده در ذرات کوچک‌تر و متراکم‌تر از HDL-C کارایی بیشتری دارد.

۳- ABCG1: این مولکول نیز از اَبَرخانواده ABC بوده اما برخلاف ABCA1، ABCG1 به تنهایی نمی‌تواند ناقل کلسترول آزاد به apoA-I باشد و به کمک گیرنده‌های حاوی فسفولیپید مانند HDL-C نیاز دارد. این مولکول در بافت‌های محیطی و سلول‌ها در ترکیب با ABCA1 می تواند انتقال معکوس کلسترول را بهبود بخشد. به صورت کلی، نقش این مولکول را می‌توان القای جریان کلسترول آزاد، ممانعت از تجمع لیپیدهای مضاعف در هپاتوسیت‌ها و ماکروفاژها، ممانعت از انتقال LDL آسیله شده به مونوسیت‌ها و تمایز مونوسیت‌ها به ماکروفاژها و اثر سینرژیک با HDL-C در ایجاد تاخیر در فرآیند آپوپتوز ماکروفاژ با واسطه LDL اکسیداتیو تعریف نمود.[۱۶]

٤- LCAT: این پروتئین، آنزیمی کلیدی در متابولیسم لیپوپروتئین‌ها بوده و به آسانی به HDL-C متصل شده و توسط apoA-I فعال می‌شود. LCAT دارای فعالیت آسیل ترانسفراز، فسفولیپاز A2، تنظیم گردش کلسترول و نگه‌داری هومئوستازی کلسترول است. این آنزیم معمولا در کبد سنتز شده و سپس وارد جریان خون می‌شود. عمده فعالیت این آنزیم بر دو بخش استوار است:

- استریفیکاسیون کلسترول که آن را به منبع اصلی کلسترول استر (CE[vi]) تبدیل می‌کند. این آنزیم، با فعالیت آسیل ترانسفرازی خود، HDL-C و لسیتین را به CE و لیزولسیتین تبدیل می کند.
- بالغ نمودن HDL-C ، تبدیل β HDL-C به فرم کروی α HDL-C.[۱۷]

۵- SR-B1 : تنظیم‌کننده نقل و انتقال کلسترول آزاد در درون سلول بر اساس گرادیان بوده و هم‌چنین در جذب انتخابی CE، فسفولیپیدها و TG[i] ها نقش دارد. به علاوه این مولکول واسطه‌ای در جذب انتخابی CE از ذرات HDL-C در

i- Endothelial Nitric Oxide synthase
ii- Sphingosine-1-phospate
iii Free Cholesterol
iv- Esterified Cholesterol
v- Phospholipids

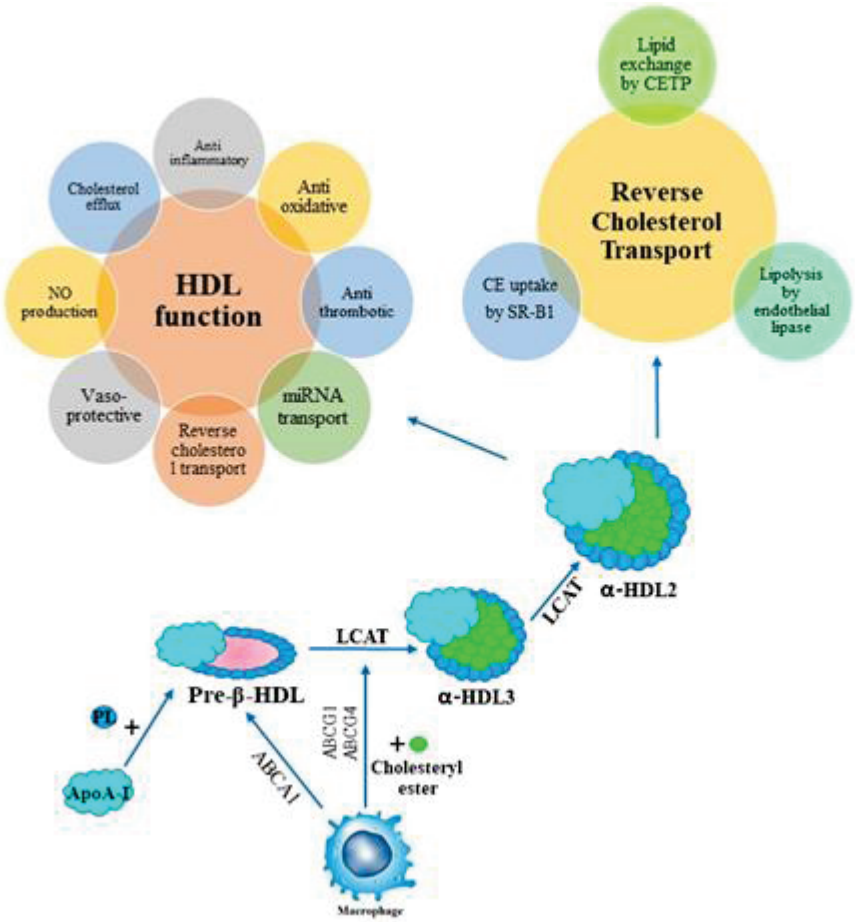
vi-Cholesterol Ester

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

هپاتوسیت‌ها و سلول‌های تولیدکننده استروئید بوده و نیز در جذب CE از LDL به سلول‌ها که بر روی متابولیست apo-B اثر می‌گذارد نقش میانجی را ایفا می‌نماید. بررسی ارتباط میان SR-B1، ABCA1 و ABCG1 در میانجی‌گری جریان کلسترول آزاد نشان داد که افزایش SR-B1 موجب کاهش جریان کلسترول آزاد از طریق دو میانجی دیگر می‌گردد ولی بر جریان فسفولیپید اثر معنی‌داری ندارد. این گیرنده در ذرات بزرگ‌تری از HDL-C کارایی بهتری دارد.[۱۸]

۶- CETP: عملکرد اصلی CETP، جایگزینی لیپیدهای خنثی موجود در HDL-C از قبیل CE با TG موجود در LDL و VLDL جهت شکل‌گیری HDL-C غنی از تری‌گلیسیرید می‌باشد. ذره HDL-C غنی از TG یک سوبسترای خنثی برای لیپاز کبدی بوده که موجب پاکسازی HDL-C از خون می‌گردد. به علاوه این مولکول موجب جداسازی apoA-I از HDL-C شده که در طی HDL-C موجود در جریان خون موثر است.[۱۹] بنابراین به نظر می‌رسد با استفاده از مهار درمانی CETP می‌توان سطح HDL-C پلاسمایی را افزایش و سطح LDL-C را کاهش داد. هر چند که تاثیر داروهای فوق بر پیامدهای بالینی هنوز در مطالعات فاز III در جریان بوده و ارتباط قطعی مبنی بر ارتباط میان افزایش CETP و خطر بیماری‌های قلبی عروقی ثابت نگردیده است.[۲۰]

خلاصه‌ای از متابولیسم و کاتابولیسم HDL-C وجریان انتقال معکوس کلسترول در شکل (۱) نشان داده شده است:



شکل ۱- متابولیسم HDL-C و انتقال معکوس کلسترول. در اولین مرحله از ساخت HDL-C، ApoA-I به همراه فسفولیپید اولین فرم از HDL-C به نام Pre-β-HDL-C را تشکیل می‌دهد که کلسترول استری شده را از سلول‌های محیطی مانند ماکروفاژها از طریق انتقال‌دهنده ABCA1 می‌پذیرد در فضای خون، ذرات HDL-C توسط LCAT بازسازی می‌شوند. بزرگ‌ترین ذرات که به عنوان α-HDL-C2 شناخته می‌شوند حاوی بیش از ۱۰۰ پروتئین در ترکیب‌ها و غلظت‌های مختلف هستند. در خاتمه، ذرات HDL-C توسط انواع مکانیسم‌های نشان داده شده، از جمله جذب مستقیم توسط SRB1، تبادل CE با TG از طریق CETP و لیپولیز شدن توسط لیپازها کاتابولیزه می‌شوند.

i- Triglyceride

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

استراتژی جستجو

مطالعات انجام گرفته در زمینه روش‌های سنجش HDL-C در پایگاه‌های اطلاعاتی اصلی شامل PubMed، Web of Science، Google Scholar، Scopus و ScienceDirect مورد جستجو قرار گرفتند. جستجو با استفاده از واژه‌های کلیدی Cholesterol, HDL، Risk Assessment، Cardiovascular Diseases، Coronary Artery Disease، Arteriosclerosis تا ژانویه ۲۰۲۰ انجام گرفت. فهرست منابع مقالات نیز برای یافتن مقالات مرتبط بیشتر مورد جستجو قرار گرفت.

معیار راهیابی و عدم راهیابی به مطالعه

مقالات اصیلی که تا ژانویه ۲۰۲۰ چاپ شده بودند و به بررسی روش‌های سنجش HDL-C پرداخته بودند، واجد شرایط ورود به این مطالعه شناخته شدند. گزارش‌های موردی، نامه به سر دبیر و نتایج کنفرانس‌ها از این مطالعه خارج شدند.

غربالگری مقالات و استخراج داده‌ها

به منظور سهولت در غربالگری مقالات یافت شده، نتایج جستجو به برنامه Endnote منتقل گردید. پس از حذف موارد تکراری، عنوان و چکیده هر مقاله مورد بررسی قرار گرفت و در صورت ارتباط چکیده با موضوع، متن کامل مقاله بررسی گردید. پس از آن، داده‌های مربوط به بررسی روش‌های سنجش HDL-C استخراج و دسته‌بندی گردید.

روش‌های سنجش HDL-C

۱) روش‌های سنجش HDL-C بر پایه خصوصیات فیزیکی

۱-۱) اولتراسانتریفیوژ

به کارگیری اولتراسانتریفیوژ براساس تکنیک جداسازی با استفاده از گرادیان چگالی شناور بیش از ۷۰ سال پیش برای تعیین خصوصیات لیپوپروتئین‌ها صورت گرفت. روش‌های مختلف اولتراسانتریفیوژ که منجر به شناسایی دو زیر گروه اصلی HDL-C به نام‌های HDL-C 2 به عنوان زیرگروه بزرگ‌تر و شناور (۱/۱۲۵ – ۱/۰۶۳ گرم بر میلی‌لیتر) و HDL-C 3 به عنوان زیر گروه کوچکتر و متراکم تر (۱/۲۱ – ۱/۱۲۵ گرم بر میلی‌لیتر) گردید را می‌توان به گروه‌های زیر طبقه‌بندی نمود:

- اولتراسانتریفیوژ آنالیزی شناور[i]: اساس این روش، آنالیز چند مرحله‌ای پلاسما بر اساس میزان افزایش چگالی هیدراته اولیه لیپوپروتئین ها از ۱/۰۰۶ به ۱/۰۶۳ گرم بر میلی‌لیتر به کمک نمک‌های طبیعی از قبیل کلرید سدیم، برومید پتاسیم و برومید سدیم می‌باشد. به کمک این روش، لیپوپروتئین‌ها به ۵ گروه اصلی HDL-C، LDL، IDL[ii]، VLDL[iii] و شیلومیکرون‌ها تقسیم می‌شوند.
- اولتراسانتریفیوژ متوالی، روش تعادلی ایزوپیکنیک[iv]: در این روش، از سطحی از گرادیان نمک‌های سدیم کلراید - پتاسیم بروماید با لایه‌بندی متوالی محلول‌های نمکی با چگالی متمایز در ۱۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شده و سرم یا پلاسما بر روی این سطح با نیروی چرخان سانتریفیوژ لایه‌بندی می‌گردند. به کمک این روش که یک اولتراسانتریفیوژ تک مرحله‌ای است، جداسازی HDL-C در حالت غیراکسید و غیر دناتوره تسهیل شده و از آلودگی آن با پروتئین‌های پلاسمای انتهای لوله و دانسیته بیشتر از ۱/۲۵ گرم بر میلی‌لیتر جلوگیری می‌کند.
- نیمرخ عمودی خودکار[v](VAP) : در این روش که از یک روتور عمودی استفاده می شود، برخلاف سایر روش‌های اولتراسانتریفیوژ، تمامی لیپوپروتئین‌های در کمتر از یک ساعت در ۶۵۰۰۰ دور در دقیقه[vi] جداسازی می‌شوند. از مزایای این روش، حساس بودن (نیاز به کمتر از ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم یا پلاسما)، اقتصادی بودن، در دسترس بودن و دقت بالای قابل قبول است و در جداسازی و اندازه‌گیری HDL-C 2 و HDL-C 3 نیز مورد تائید قرار گرفته است. از میان روش‌های مختلف اولتراسانتریفیوژ، روش VAP پس از روش‌های NMR[vii] و ND-PAGGE[viii] مورد استفاده قرار می‌گیرد.[۲۱]

علی‌رغم وجود مشکلات روش اولتراسانتریفیوژ از قبیل زمانبربودن، احتمال تغییر لیپوپروتئین‌های ناپایدار براثر غلظت بالای نمک و قرارگرفتن در معرض نیروی سانتریفیوژ، تنوع در ساختار تجهیزات، حجم بالای نمونه مورد نیاز، عدم قابلیت تکرارپذیری و نیز عدم اطمینان به حصول نتیجه قطعی حتی توسط تکنسین‌های ماهر، احتمال آلودگی نمونه، هتروژن بودن نمونه و وجود لیپوپروتئین‌های دیگر، استفاده از آن را در آزمایشگاه‌های بالینی تقریباً

i- Flotational analytical ultracentrifugation

ii -Intermediate-Density Lipoprotein
iii- Very-Low-Density Lipoprotein
iv- Sequential ultracentrifugation: isopycnic equilibrium method
v -Vertical Auto Profile (VAP)
vi- Revolutions Per Minute
vii -Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy
viii- Non-Denaturing Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

غیرکاربردی ساخته است، اما هم‌چنان به عنوان یک روش مرجع و طلایی برای اندازه‌گیری کلسترول در تحقیقات علمی، روش مرجع مقایسه‌ای برای تائید سایر روش‌ها و هم‌چنین مطالعات اپدمیولوژیک به شمار می‌آید.[۲۲] بنابر پیشنهاد برنامه ملی آموزش کلسترول (NCEP[i]) مرکز پیشگیری و کنترل بیماری (CDC[ii])، اولتراسانتریفیوژ به عنوان دومین روش مرجع برای اندازه‌گیری HDL-C به شمار می‌آید.[۲۳]

۱-۲) الکتروفورز

تفاوت در ابعاد و بار لیپوپروتئین‌های مختلف، مبنای جداسازی آن‌ها در روش الکتروفورز با رنگ‌های چربی دوست می‌باشد. در این راستا، انواع متفاوتی از الکتروفورز را می‌توان جهت جداسازی HDL-C معرفی نمود:

- الکتروفورز ژل آگارز[iii]:

جداسازی HDL-C در این روش بر مبنای بار سطحی و شکل مولکول بوده و براین اساس دو زیرگروه از HDL-C به نام‌های ذرات مهاجر آلفا[iv] (شامل اکثریت HDL-C های در گردش) و ذرات مهاجر پیش بتا[v] - (HDL-C های نوساز و دارای مقدار ناچیزی لیپید) جداسازی و نام‌گذاری گردیدند.

- الکتروفورز یک بعدی[vi] (ND-PAGGE/GGE[vii]): اساس این روش که برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ توسط Nichols و همکاران مورد استفاده قرار گرفت، جداسازی زیرگروه‌های HDL-C بر مبنای اندازه ذرات بود. بر این اساس دو زیرگروه از HDL-C 2 به نام‌های HDL-C 2a (۹/۷ – ۸/۸ نانومتر) و HDL-C 2b (۱۲/۰ – ۹/۷ نانومتر) و سه زیر گروه از HDL-C 3 به نام‌های HDL-C 3a (۸/۸ – ۸/۲ نانومتر)، HDL-C 3b (۸/۲ – ۷/۸ نانومتر) و HDL-C 3c (۷/۸ – ۷/۲ نانومتر) کشف و نام‌گذاری گردید.[۲۴] این روش از سه دهه پیش به عنوان روشی استاندارد در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

- الکتروفورز یک بعدی به همراه ایمونوبلاتینگ:

با استفاده از این روش، دو زیرواحد preβ2 (۱۲/۳۷–۱۰/۲ نانومتر) و HDL-C 2b (۱۲/۹۷–۹/۸ نانومتر) به دلیل همپوشانی بالا، به عنوان زیرواحد HDL-C 2b+preβ2 نامگذاری گردیدند.[۲۵]

- الکتروفورز دو بعدی[viii]:

از تلفیق دو روش الکتروفورز ژل آگارز و GGE، و سپس روش لکه‌گذاری ایمنی Immunoblotting با استفاده از Anti-apoA-I روش الکتروفورز دو بعدی بدست آمده که اجزای HDL-C را بر اساس میزان ApoA-I (mg/dl) در دو مرحله: ابتدا بر اساس بار سطحی و سپس بر اساس ابعاد، تفکیک می‌نماید. اجزای تفکیک شده HDL-C که در این روش قابل تفکیک و بررسی هستند شامل Preβ-HDL-C (preβ1/preβ2)، α-HDL-C (α1/α2/α3/α4) و Preα-HDL-C (preα1/preα2/preα3) می‌باشند.[۲۶] زیرواحدهای جداسازی شده HDL-C در این روش بر اساس ابعاد نیز به شرح زیر طبقه‌بندی می‌گردند: زیرواحدهای بزرگ شامل α–1 و preα-1، زیرواحد متوسط شامل α–2 و preα-2، زیرواحد کوچک شامل α–3,4 و preα-3,4 و preβ-1,2

- **الکترواایمونو دیفیوژن**[ix]:

مبنای جداسازی اجزای HDL-C در این روش، محتوای پروتئینی آن‌ها بوده و میزان دو ذره حاوی apoA-I (LP A-I:A-II) یا بدون apo-A-II (Lp A-I) برروی ژل آگارز و با استفاده از منحنی کالیبراسیون قابل آنالیز می‌باشند.[۲۷]

- **الکتروفورز موئین**[x]:

این روش که در سال ۲۰۱۱ توسط Ruecha و همکاران معرفی گردید، جهت اندازه‌گیری سریع کلسترول با استفاده از الکتروفورز موئین حاوی میکروچیپ‌هایی بر پایه پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان است. اساس جداسازی در این روش تحرک الکتروشیمیایی است.[۲۳]

- **ایزوتاکوفورز (ITP) موئین**[xi]:

اساس این روش، جداسازی لیپوپروتئین‌ها بر پایه میزان تحرک الکتروفورزی آن‌ها در یک سیستم بافری تعیین شده است. در این سیستم، HDL-C بیشترین تحرک و پس از آن به ترتیب VLDL، IDL و LDL قرار دارند. HDL-C نیز در این روش به سه زیرواحد fHDL-C، iHDL-C و sHDL-C[xii] تقسیم‌بندی گردید. ایراد وارد شده بر این روش، عدم شناسایی زیرواحدهایی با تحرک الکتروفورزی نزدیک به هم است.

i- National Cholesterol Education Program
ii -Centers for Disease Control and prevention
iii- Agarose gel electrophoresis
iv -α - -migrating particles
v- Preβ-migration particles
vi -One dimensional gel electrophoresis
vii -Gradient Gel Electrophoresis
viii- 2D gel electrophoresis
ix- Electro immunodiffusion
x- Capillary electrophoresis
xi -Capillary isotachophoresis
xii -Fast-, Intermediate-, Slow-migrating HDL-C

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

- **ایزوتاکوفورز تحلیلی** در سال ۲۰۰۰ آلفرد بوتچر[i] و همکاران جهت برطرف نمودن معایب ITP از سه روش ITP، 2D-GGE و ایمونوبلات استفاده نمودند و موفق شدند دو زیر واحد از fHDL-C به نام های HDL-C 2a و HDL-C 2b را جداسازی نمایند. همچنین مشخص گردید که همپوشانی زیادی میان HDL-C 3 و fHDL-C وجود دارد.[۲۸] **FS-ITP** نسبت به روش **ITP** می‌تواند جداسازی زیرشاخه های لیپوپروتئین را با سرعت بیشتر و کمیت دقیق تر انجام دهد. داده‌های حاصل از **FS-ITP** را می‌توان برای تجزیه و تحلیل عملکردی آپولیپوپروتئین ها و ترکیبات لیپیدی زیرواحدهای **HDL** در پلاسمای انسانی مورد استفاده قرار داد.

۱-۳) کروماتوگرافی با کارایی بالا

اساس روش HPLC[ii]، جداسازی لیپوپروتئین‌ها توسط ستون‌های حاوی ژل های پلیمری است و از این طریق اجزای لیپیدی (اغلب کلسترول و تری‌گلیسیرید) از طریق آنزیمی جداسازی می‌شوند. آنالیز سریع و جداسازی تکرارپذیر لیپوپروتئین‌ها، موجب شده تا این روش به یکی از روش‌های موثق در تعیین میزان کلسترول موجود در محتوای لیپوپروتئینی تبدیل گردد. این روش هم‌چنین برای افراد مبتلا به هایپرلیپیدمیا نیز کاربردی بوده و صحت بیشتری را نسبت به UTC[iii] متوالی نشان داده است.[۲۱]

- کروماتوگرافی توسط فیلترکردن روی ستون ژل:

ستون‌های مورد استفاده در این روش را می‌توان با استفاده از مواد مختلفی از قبیل سیلیس، پلیمرهای مصنوعی و پلیمرهای طبیعی تهیه نمود. راندمان جداسازی بر اساس اندازه منافذ ستون مورد استفاده تعیین می‌شود. مولکول‌های کوچک‌تر از قطر منافذ به راحتی وارد منافذ شده و مولکول‌های بزرگتر بر همین اساس از آن‌ها جدا می‌شوند. از مزایای این روش می‌توان به تفکیک ترکیبات با حساسیت بالا بر اساس اندازه، شکل و وزن، حداقل دخالت در فرآیند فیلتراسیون، حفظ فعالیت بیولوژیکی ذرات و نیز محاسبه وزن مولکولی تقریبی ترکیب اشاره نمود. این روش به دلیل مزایای ذکر شده و هم‌چنین حفظ ساختمان مولکول‌ها و در دسترس بودن مواد تجاری مصرفی ستون مورد استقبال قرار گرفته است. هرچند که به صورت معمول، کار بردآن همراه با سایر روش‌های جداسازی بر اساس بار و pH تکمیل می‌گردد.[۲۹]

- کروماتوگرافی توسط ستون تبادلات یونی:

اساس این روش، جداسازی لیپوپروتئین‌ها بر پایه تبادلات یونی موجود در سطح ذره و هم‌چنین خصوصیات آبگریزی آن‌هاست. با استفاده از ستون تبادلات یونی، قطعات بزرگتر لیپوپروتئینی سریع‌تر از ستون شسته می‌شوند که به ترتیب عبارت اند از کیلومیکرون‌ها، VLDL، IDL، LDL و در آخر HDL-C. یکی از معایب این روش، احتمال آلودگی HDL-C با پروتئین‌های پلاسمایی خصوصاً آلبومین است.

- در سال ۲۰۱۱ Dong و همکاران روش جدیدی را برای جداسازی HDL-C و LDL با تلفیق دو روش HDL-C و اولتراسانتریفیوژ ارائه نمودند و آن، آنالیز میزان کلسترول جداسازی شده از روش اولتراسانتریفیوژ توسط HPLC بود. هر چند که این روش نیازمند حجم کمتری از نمونه در مقایسه با سایر روش‌های جداسازی است، اما به دلیل لزوم استفاده از اولتراسانتریفیوژ، همچنان به عنوان روش کاربردی در اندازه‌گیری‌های بالینی قابل استفاده نمی‌باشد.[۳۰]

۱-۴) اسپکتروفوتومتری رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR)

اساس این روش بر این پایه استوار است که هر ذره لیپوپروتئینی با توجه به اندازه خود دارای خصوصیات منحصر به فردی از سیگنال‌های NMR حاصل از گروه‌های متیل لیپیدی دارد. در نتیجه بر طبق سیگنال‌های NMR که از هسته‌های 1H، ۱۳C و ۳۲P حاصل می‌شود، سه زیرواحد HDL-C را می‌توان طبق ابعاد به نام‌های زیرواحد بزرگ (۸/۸-۱۳/۰ nm)، زیرواحد متوسط (۸/۸ – ۸/۲ نانومتر) و زیرواحد کوچک (۸/۲ –۷/۳ نانومتر) طبقه بندی نمود.[۳۱]

- Proton NMR[iv]: این روش در حالت عمومی جهت تعیین ساختار و میزان کمی ترکیبات شیمیایی نمونه با کمک رزنانس هسته هیدروژن استفاده می‌شود. حساسیت به اندازه، چگالی ماکرومولکول‌ها و تجمع فراذرات، از ویژگی‌های این روش می‌باشد.[۳۲]

i- Alfred Böttche
ii- High Performance Liquid Chromatography
iii- Ultracentrifuge
iv -Proton NMR measurement

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

- NMR[i] DOSY: در این روش، جداسازی زیرمجموعه‌های لیپوپروتئین‌ها بر اساس ضریب انتشار آن‌ها صورت می‌گیرد.[۳۳]

۱-۵) ELISA[ii]:

استفاده از این روش برای اندازه‌گیری preβ-1-HDL-C موجود در پلاسما برای بار اول توسط Miyazaki و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از آنتی‌بادی اولیه مونوکلونال اختصاصی preβ-1 معرفی گردید و بدین‌وسیله توانستند میزان زیرواحد ApoA-I را بسنجند. با در نظر گرفتن نسبت زیرواحدهای مونومر و دایمر ApoA-I، استفاده ازروش preβ-1-ELISA[iii] ممکن است تنها تعداد زیرواحدهای مونومریک و نه تمام زیرواحدهای preβ موجود در سرم را نشان دهد.[۳۴]

در جدول (۱)، روش‌های ذکر شده جهت سنجش HDL-C بر اساس خصوصیات فیزیکی به صورت خلاصه ذکر گردیده است.

جدول ۱- روش‌های سنجش بر اساس خصوصیات فیزیکی

اولتراسانتریفیوژ
• اولتراسانتریفیوژ آنالیزی شناور
• اولتراسانتریفیوژ متوالی، روش تعادلی ایزوپیکنیک
• اولتراسانتریفیوژ یک مرحله‌ای(VAP)
الکتروفورز
• الکتروفورز ژل آگارز
• الکتروفورز یک بعدی
• الکتروفورز یک بعدی به همراه ایمونوبلاتینگ
• الکتروفورز دو بعدی
• Electro immunodiffusion
• capillary electrophoresis
• Capillary Isotachophoresis
• Free-Solution ITP
کروماتوگرافی
• کروماتوگرافی توسط ستون ژل فیلتراسیون
• کروماتوگرافی توسط ستون تبادل یونی
• تلفیق دو روش HPLC و اولتراسانتریفیوژ
اسپکتروفوتومتری رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR)
• Proton NMR
• DOSY NMR
الایزا

جدول ۱) خلاصه‌ای از روش‌های سنجش HDL-C بر اساس خصوصیات فیزیکی؛ شامل اولتراسانتریفیوژ، الکتروفورز، کروماتوگرافی، اسپکتروفوتومتری رزونانس مغناطیس هسته‌ای و الایزا

i- Diffusion ordered NMR spectroscopy
ii -Enzyme-Linked Differential Antibody Immunosorbent Assay
iii -Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

۲) روش‌های سنجش HDL-C بر پایه خصوصیات شیمیایی

۲-۱) نسل اول: روش‌های شیمیایی

از پیشتازان روش‌های رسوبی برای جداسازی سریع لیپوپروتئین Burstein و همکاران‌ها بودند.[۳۵] اساس این روش، استفاده از پلی‌آنیون‌ها و در مواقعی در ترکیب با کاتیون‌ها جهت تجمیع انتخابی و حل نمودن لیپوپروتئین‌های سبک مانند HDL-C در محلول و رسوب لیپوپروتئین‌های نامحلول توسط سانتریفیوژ با سرعت پایین است. در خاتمه، محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ پس از جداسازی جهت ارزیابی میزان HDL-C مورد استفاده قرار می‌گیرد. یون‌های مختلفی در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرند:

- **Heparin-MnCL2:**

معروف‌ترین و پیشتازترین ترکیب در تحقیقات لیپوپروتئین‌ها است. مرکز بین‌المللی کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) از این روش در ترکیب با اولتراسانتریفیوژ به عنوان روش پیشنهادی سه مرحله‌ای استفاده می‌نماید. در روش پیشنهادی CDC، پس از جداسازی کیلومیکرون‌ها وVLDL توسط اولتراسانتریفیوژ، لیپوپروتئین‌های دارای Apo-B، توسط روش رسوبی Heparin-MnCl2 رسوب کرده و در مرحله سوم، محلول فوقانی حاوی HDL-C با سانتریفیوژ با دور پایین بهبود یافته وHDL-C موجود در آن اندازه‌گیری می‌شود.

- **Dextran Sulfate-Mg2+(DS):**

به دلیل محدودیت در تهیه هپارین تجاری و هم‌چنین تداخلات مشاهده شده از+Mn2 با روش‌های اولیه آنزیمی، ترکیب فوق به عنوان جایگزین برای استفاده رایج آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. این ترکیب به عنوان روش انتخابی انجمن شیمی بالینی آمریکا (AACC)[iv] معرفی و به رایج‌ترین شیوه رسوب‌گذاری برای HDL-C در آمریکا تبدیل گردید.[۲۲]

- **روش رسوبدهی یک مرحله‌ای:**

در این روش از سه معرف Heparin/ MnCL2/DS جهت رسوبدهی آپولیپوپروتئین‌های حاوی apo-B استفاده می‌شود. پس از اندازه‌گیری HDL-C توسط روش‌های سنجش همگن شده[v] و HDL-C 3 توسط رقیق‌سازی، میزان

iv -American Association for Clinical Chemistry
v- Homogeneous Assays

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

2 HDL-C از تفاوت میان دو اندازه محاسبه شده تعیین می‌شود.

- **روش رسوبدهی دو مرحله‌ای:**

این روش که با هدف جداسازی HDL-C مورد استفاده قرار می‌گیرد، از معرف‌های Heparin/ MnCl2 در مرحله اول و برای جداسازی HDL-C در محلول رویی و سپس از DS برای حل نمودن رسوب و اندازه‌گیری 3 HDL-C از طریق روش‌های سنجش همگن شده استفاده می‌شود. مبنای محاسبه 2 HDL-C در این روش همانند روش رسوبدهی تک مرحله‌ای می‌باشد.[۳۶]

- **روش PTA / Phosphotungstate-Mg2+[i]:**

استفاده از این ماده به دلیل ارزان بودن و هم‌چنین در دسترس بودن در ابتدا بسیار رایج بود اما محدودیت‌هایی چون ناپایداری آن در نگه‌داری بلندمدت منجر به استفاده از روش دکستران سولفات به عنوان روش جایگزین گردید.

- **روش Polyethylene glycol:**

این روش به همراه روش PTA بیشتر در اروپا مورد استفاده قرار می‌گرفت. از مهم‌ترین مشکلات روش‌های رسوبی نسل اول، تداخل ناشی از افزایش تری‌گلیسریدهاست که منجر به تجمع لیپوپروتئین‌های سبک‌تر، جلوگیری از رسوبدهی مواد نامحلول و تولید محلول فوقانی کدر می‌گردد که علاوه بر HDL-C دارای سایرلیپوپروتئین‌ها نیز هست.[۲۲]

۲-۲) نسل دوم: روش‌های اتوماتیک

روش‌های نسل دوم با هدف حذف مراحل سانتریفیوژ پدیدار گردیدند. اساس روش‌های نسل دوم، استفاده از ترکیب پلی‌آنیون‌ها و کاتیون‌های دوظرفیتی کپسوله شده با ذرات مغناطیسی، به منظور تسهیل در جداسازی لیپوپروتئین‌های غنی از Apo-B از قطعات HDL-C بود.[۳۷]

- **روش Magnetic-Dextran Sulfate-Mg2+ :**

این ترکیب معروف‌ترین و کاربردی‌ترین معرف رسوبی نسل دوم است. در این روش، کاربر به سادگی نمونه را به یک لوله پلاستیکی حاوی معرف مذکور اضافه نموده و در سانتریفیوژ قرار می‌دهد. در حین سانتریفیوژ، نمونه با معرف ترکیب شده و پس از رسوب نمودن ذرات نامحلول، محلول فوقانی در بخش مرکزی تجمع می‌یابد. در نهایت، لوله پلاستیکی جهت سنجش HDL-C موجود در محلول فوقانی مستقیماً در محل مخصوص نمونه آنالایزر شیمی قرار می‌گیرد.

۲-۳) نسل سوم: روش‌های سنجش همگن شده

منظور از واژه Homogeneous، استفاده از روش سنجش مستقیم و بدون نیاز به آماده‌سازی قبلی نمونه و جداسازی اولیه است. هم‌چنین در این روش مراحل پیپتاژ دستی، مخلوط و سانتریفیوژ کردن حذف شده است.

- **روش جداسازی IRC[ii]:**

این روش که توسط شرکت بین‌المللی معرف‌ها عرضه شد، شامل چهار معرف با چهار عملکرد متوالی است؛

۱) معرف PEG موجب تجمع لیپوپروتئین‌های حاوی apo-B از جمله CM، VLDL و LDL می‌شود

۲) معرف دوم لیپوپروتئین‌های دارای آنتی‌بادی بر علیه apo-B و apo-C را بلاک و از تجمع نمودن آن‌ها محافظت می‌کند

۳) شامل آنزیم‌های واکنش‌دهنده با کلسترول شامل کلسترول استراز، کلسترول اکسیداز و پراکسیداز، صرفاً با HDL-C های غیربلوکه شده واکنش می‌دهد

٤) معرف نهایی واکنش آنزیماتیک رنگی را متوقف نموده و ذرات تجمع شده در مخلوط واکنش را توسط نمک گوانیدین حل می‌نماید. در نهایت، HDL-C بر اساس میزان جذب آن در nm ٦٠٠-٧٠٠ ارزیابی می‌شود.[۲۲] چند سال بعد شرکت Kokusai (IRC سابق)، معرف جدیدی حاوی ماده‌ای به نام کالیکسارین را عرضه نمود که کمپلکس محلولی از ترکیب کالیکسارین-لیپوپروتئین‌های غیر HDL-C ایجاد می‌نمود.

- **روش جداسازی Serotec and UMA:**

این روش بر پایه استفاده از مهارکننده‌های کمپلکس فسفات بوده و کلسترول HDL-C در حضور یک دترژان و فسفات، تحت واکنش آنزیمی قرار می‌گیرد.[۳۸]

- **روش جداسازی PEG-Kyowa Medex:**

دو معرف در این روش عبارت است از:

۱) α-سیکلودکسترین سولفات به همراه Mg2+ که موجب مهار واکنش و نه رسوب دهی CM و VLDL شده که

i -Phosphotungstic Acid

ii -International Reagent Corporation

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

منجر به جداسازی آن‌ها بدون نیاز به معرف پاکسازی می‌شود

۲) افزایش خصوصیت تمایل آنزیم‌های کلسترول استراز و کلسترول اکسیداز به HDL-C توسط اتصال کووالانسی به مولکول‌های پلی‌اتیلن گلیکول PEG (۶۰۰۰ Da).[۳۹] نوع تجاری معرف اول، α-سیکلودکسترین سولفات به همراه دکستران سولفات، Mg2+ و دترجنت‌های تنظیم شده در pH=7 است که توسط شرکت Roche Diagnostics ارائه شده است.

- **روش جداسازی SPD-Daiichi[i]:**

اساس این روش، در مرحله اول، استفاده از ترکیبی از پلیمرهای مصنوعی و پلی‌آنیون‌ها جهت مهار کردن واکنش لیپوپروتئین‌های غیر HDL-C، و در مرحله دوم، استفاده از یک معرف و یک آنزیم جهت واکنش آنزیمی کلسترول HDL-C می‌باشد.[۴۰] اصلاحات زیادی بر روی ترکیبات فوق الذکر انجام گرفت تا در نهایت، ترکیب فاقد Mg2+ در سال ۲۰۰۰ در کنفرانس سالانه AACC[ii] توسط شرکت Daiichi Pure Chemicals ارائه گردید.

- **روش جداسازی AB-Wako:**

چهارمین روش هموژن، شامل مهارکننده‌های ایمنی، توسط شرکت صنعتی Wako Pure Chemicals معرفی گردید. دراین روش آنتی‌بادی بر علیه apo-B در معرف اول با لیپوپروتئین‌های حاوی apo-B از قبیل CM[iii]، VLDL و LDL وارد واکنش شده و با کمک آنزیم موجود در معرف دوم، فعالیت آن‌ها را مهار می‌کند و در نتیجه موجب بروز ویژگی واکنش HDL-C می‌گردد.[۴۱]

- **روش جداسازی CAT-Denka Seiken:**
- پنجمین روش که توسط شرکت Denka Seiken معرفی گردید، در مرحله اول حاوی معرف‌های انتخابی حاوی کلسترول استراز و اکسیداز برای تولید پراکسیداز از کلسترول موجود در لیپوپروتئین‌ها به جز HDL-C است که هیچ‌گونه رنگی در این مرحله ایجاد نمی‌کند. پراکسیدهای اولیه تولید شده از این واکنش توسط کاتالاز از بین می‌رود. در مرحله دوم، ابتدا از مهارکننده کاتالاز و سپس از سورفکتانت جهت آزاد نمودن HDL-C و تولید محصول رنگی با استفاده از پراکسیداز استفاده می‌نماید.[۴۲]

i -Synthetic Polymer/Detergent HDL-C
ii -American Association for Clinical Chemistry
iii- Chylomicron

جدول (۲) شامل خلاصه‌ای از روش‌های ذکر شده جهت سنجش HDL-C بر اساس خصوصیات شیمیایی می‌باشد.

جدول ۲- روش‌های سنجش بر اساس خصوصیات شیمیایی

نسل اول: روش‌های شیمیایی
- Heparin-MnCL2
- (DS)
- Dextran Sulfate-Mg2+
- روش رسوبدهی یک مرحله‌ای
- روش رسوبدهی دو مرحله‌ای
- Phosphotungstic acid/ Phosphotungstate-Mg2+ (PTA)
- Polyethylene glycol

نسل دوم: روش‌های اتوماتیک
- Magnetic-Dextran Sulfate-Mg2+

نسل سوم: روش‌های سنجش همگن شده
- روش جداسازی IRC
- روش جداسازی Serotec and UMA
- روش جداسازی PEG-Kyowa Medex
- روش جداسازی SPD-Daiichi
- روش جداسازی AB-Wako
- روش جداسازی CAT-Denka Seiken

جدول ۲) خلاصه‌ای از روش‌های سنجش HDL-C بر اساس خصوصیات شیمیایی؛ شامل نسل اول (روش‌های شیمیایی)، نسل دوم (روش‌های اتوماتیک) و نسل سوم (روش‌های سنجش همگن شده)

۳) روش‌های سنجش عملکردی و محافظتی HDL-C

۳-۱) سنجش لسیتین: کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT)

۱- سنجش جرمی (سنجش بیرونی): سنجش LCAT که به عنوان یک مرحله مهم در مسیر انتقال معکوس کلسترول به شمار می‌رود، نه تنها در تشخیص بیماران دارای نقص آنزیم اهمیت دارد، بلکه در ارزیابی خطر بیماری‌های قلبی عروقی و متابولیسم لیپوپروتئین‌ها نیز نقش دارد. در این نوع سنجش، پروتئین اصلی HDL-C یعنی apoA-I موجود در پلاسما به سوبسترای نشاندار شده متصل می‌شود و موجب تغییر فعالیت آنزیم LCAT می‌گردد. در این حالت چنانچه دو نمونه پلاسما در مقایسه با یکدیگر دارای میزان یکسانی از جرم LCAT بوده ولی دارای میزان متفاوتی از HDL-C باشند، میزان فعالیت LCAT متفاوت خواهد بود.[۴۳]

۲- سنجش براساس میزان استریفیکاسیون قطعات (سنجش درونی): از آنجا که LCAT میانجی استری شدن کلسترول و پایداری گرادیان کلسترول آزاد میان غشای پلاسمایی و ذرات HDL-C است، در این سنجش، میزان استری شدن کلسترول آزاد نشاندار شده و معادل با میزان

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

HDL-C، اندازه گیری می شود. میزان تغییرات در این سنجش براساس تخمین رادیواکتیویه کلسترول آزاد غیراستریفیه شده و کلسترول استریفیه شده در پلاسمای فاقد apo-B است.[۴۴]

۳-۲) سنجش جریان کلسترول[i]

انتقال معکوس کلسترول توسط حامل‌هایی همچون HDL-C یک مکانیسم محافظتی جهت ممانعت از تجمع کلسترول و انتقال کلسترول های اضافی به کبد می‌باشد. اولین مرحله در این فرآیند، برخورد سلول‌ها به قطعات لیپوپروتئینی بوده که موجب آزاد شدن کلسترول‌های اضافی از سلول‌ها می‌گردد. مبنای استفاده از سنجش جریان کلسترول، اندازه‌گیری جریان کلسترول از طریق میانجی‌ها به حامل هاست.[۴۵]

- **اندازه‌گیری HDL-C با جریان کلسترول:**

انتقال کلسترول‌های مازاد از سلول‌ها به حامل‌ها توسط میانجی‌هایی همچون ABCA1، ABCG1 و SR-B1 صورت می‌گیرد. در این میان، بررسی کارکرد ABCA1 به عنوان استاندارد طلایی برای اندازه‌گیری کلسترول منتشر شده پیشنهاد گردیده که apoA-I را به عنوان پذیرنده اولیه کلسترول درنظر می‌گیرد. در این روش، جریان کلسترول، به عنوان سنجش درصد کلسترول نشاندار شده سلولی (با [H]۳ یا [C]۱۴) است که در واحد زمان از سلول به حامل عرضه می‌گردد. یکی از معایب این روش، عدم توانایی اندازه‌گیری جریان فسفولیپید توسط ABCA1 و درنتیجه، عدم توانایی اندازه‌گیری شکل‌گیری HDL-C کبدی است که موجب کاهش توانایی در برقراری ارتباط بین بیماری‌های قلبی و میزان جریان کلسترول می‌گردد.[۴۵]

- **سنجش انتشار فلورسانس با استفاده از BODIPY-[ii] cholesterol:**

در این روش به منظور عدم استفاده از رادیوایزوتوپ‌ها، پروب BODIPY-cholesterol به عنوان جایگزین برای نشاندارکردن کلسترول بکار گرفته شد و نتیجه آن، آزاد شدن پروب مذکور از سلول‌ها از طریق مسیر ABCA1 بود. می‌توان گفت استفاده از این روش در مقایسه با استفاده از رادیوایوتوپ‌ها، از نقطه نظر سادگی بیشتر روش و غربالگری سریع، بهینه‌تر می‌باشد.[۴۶]

i- HDL-C cholesterol efflux assay
ii- Boron dipyrromethene difluoride cholesterol

۳-۳) سنجش کلسترول HDL-C غیر التهابی[iii]:

تاکنون بیش از بیست و چهار ذره HDL-C با رزیدوهای مختلف در ارتباط با پاسخ ایمنی کشف شده‌اند که دارای خصوصیات ضدالتهابی هستند. سنجش این خصوصیت HDL-C توسط تکنیک‌های مختلفی صورت می‌گیرد؛ به عنوان مثال:

۱- سنجش کموتاکسی مونوسیت: این سنجش توانایی HDL-C در ممانعت از اکسیداسیون LDL و بیان پروتئین MCP-I [iv] را در حضور و غیاب HDL-C به عنوان شاخص ضدالتهابی آن بررسی می‌نماید.[۴۷]

۲- اندازه‌گیری پاسخ سایتوکاینی در ماکروفاژهای فعال شده توسط LP.[۴۸]

۳- اندازه‌گیری میزان مهار INF-TypeI[v] تولید شده توسط ماکروفاژهای فعال شده بوسیله HDL-C.[۴۹]

۳-۴) سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی[vi] کلسترول HDL-C:

کلسترول HDL-C دارای آنزیم‌های متعددی بوده که از شکل‌گیری ذرات اکسید شده LDL ممانعت می‌کند. سنجش‌های متنوعی جهت اندازه‌گیری ظرفیت اکسیداسیون HDL-C طراحی گردیده‌اند؛[۵۰] به عنوان مثال:

۱- سنجش Cell free از اکسیداسیون HDL-C: این سنجش، تاثیر HDL-C در تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر حاصل از اکسیداسیون و تولید DCF [vii] فلورسانت را ارزیابی می‌کند.

۲- اندازه‌گیری فعالیت پارآکسوناز (PON-I[viii]): بیشتر سنجش‌های این شاخص براساس اندازه‌گیری شکل‌گیری پارانیتروفنول از پارآکسون یا فنیل استات به عنوان سوبستراست.

۳- اندازه‌گیری فعالیت میلوپراکسیداز (MPO[ix]): داده‌های اخیر نشان می‌دهد که محل فعال هر دو آنزیم PON-I و MPO در مکان مشترکی در HDL-C قرار گرفته که بر روی استرس اکسیداسیون و پراکسیداسیون لیپیددر طی واکنش التهابی اثر می‌گذارد.

iii- HDL-C anti-inflammatory assay
iv- Monocyte Chemoattractant Protein 1
v- Human type I interferons
vi- HDL-C antioxidant capacity assay
vii- Dichlorodihydrofluorescein
viii- Paraoxonase
ix -Myeloperoxidase

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

۳-۵) سنجش نیتریک اکساید اندوتلیال عروقی[i]: کلسترول HDL-C رابطه مستقیمی با افزایش بیان و پایداری نیتریک اکساید سنتاز و در نتیجه آن، افزایش تولید نیتریک اکساید در سلول‌های اندوتلیال عروقی دارد. این ویژگی HDL-C اساس اندازه‌گیری تولید نیتریک اکساید توسط فلورسانس بوده که با تعیین نسبت فسفوریلاسیون ser1177/thr495 انجام می‌شود.[۵۰]

۳-۶) سنجش غیررادیواکتیوی برای تبادل کلسترول به لیپیدهای ضعیف apoA-I[ii]: در این روش، از نظر کیفی میزان تبادل HDL-C-apoA-I میان لیپیدهای مرکب و لیپیدهای آزاد بررسی می‌شود.

۱- سنجش apoA-I فلورسانس شده[iii]:

apoA-I بیوتینه شده بر روی یک بیوسنسور (زیست حسگر) پوشیده شده با استرپتاویدین درگیر می‌شود. تغییرات طول موج رزونانس اندازه‌گیری شده متناسب است با میزان لیپید همراه با apoA-I[45].

۲- روش انتقال انرژی رزونانس فلورسانس با واسطه زمان (TR-FRET)[iv]:

نام دیگر این روش، سنجش غیرپیوسته بوده که از apoA-I نشاندار شده با N- ترمینال بیوتین متصل به استرپتاویدین استفاده می‌نماید. در این سنجش، در صورت عدم وجود apoA-I فلورسانس موجود در HDL-C، کاهش میزان TR-FRET به تناسب با افزایش لیپید به apoA-I مشاهده می‌شود.[۴۵]

۳- روزنانس مغناطیسی الکترون‌های نشاندار شده در حال گردش[v]:

در این سیستم رزیدوهای اختصاصی apoA-I با پروب‌های فلورسانس حساس به آبگریزی نشاندار شده و تغییرات محیطی اطراف apoA-I را در حین شکل‌گیری HDL-C مشخص می‌نماید.[۵۱]

۳-۷) سنجش ICAM/VCAM اندوتلیالی[vi]:

بیان مولکول‌های چسبنده درون سلولی (ICAMs[vii]) و مولکول چسبنده سلولی عروقی (VCAM-I[viii]) که در پاسخ به محرکات التهابی حاصل از NF-κB، سلول‌های اندوتلیال عروقی را شکل می‌دهند، می‌تواند توسط HDL-C تنظیم گردد. این قابلیت توسط ELISA یا الکتروفورز ژلی در نمونه پلاسما قابل اندازه‌گیری است.[۵۲]

در جدول (۳) خلاصه‌ای از روش‌های سنجش عملکردی و محافظتی HDL-C به صورت خلاصه ذکر گردیده است.

جدول ۳- روش‌های سنجش عملکردی و محافظتی HDL-C

سنجش لسیتین:کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT)
• سنجش جرمی (سنجش بیرونی)
• سنجش براساس میزان استریفیکاسیون قطعات (سنجش درونی)
سنجش جریان کلسترول
• اندازه‌گیری کلسترول منتشر شده
• سنجش انتشار فلورسانس با استفاده از BODIPY-cholesterol
سنجش کلسترول HDL-C غیر التهابی
• سنجش کموتاکسی مونوسیت
• اندازه‌گیری پاسخ سایتوکاینی در ماکروفاژهای فعال شده توسط LP
• اندازه‌گیری میزان مهار INF-TypeI تولید شده توسط ماکروفاژهای فعال شده HDL-C
سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کلسترول HDL
• سنجش Cell free از اکسیداسیون HDL-C
• اندازه‌گیری پاراکسوناز (PON-I)
• اندازه‌گیری فعالیت میلوپراکسیداز (MPO)
سنجش نیتریک اکساید اندوتلیال عروقی
سنجش غیررادیواکتیوی برای تبادل کلسترول به لیپیدهای ضعیف apoA-I
• سنجش apoA-I فلورسانس شده
• روش انتقال انرژی رزونانس فلورسانس با واسطه زمان (TR-FRET)
• روزنانس مغناطیسی الکترون‌های نشاندار شده درحال گردش
سنجش ICAM/VCAM اندوتلیالی

جدول ۳) خلاصه‌ای از روش‌های سنجش عملکردی و محافظتی HDL-C؛ شامل سنجش لسیتین:کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT)، سنجش جریان کلسترول، سنجش کلسترول HDL-C غیر التهابی، سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کلسترول HDL-C، سنجش نیتریک اکساید اندوتلیال عروقی، سنجش غیررادیواکتیوی برای تبادل کلسترول به لیپیدهای ضعیف apoA-I، سنجش ICAM/VCAM اندوتلیالی.

۴) روش‌های سنجش محتوای HDL-C:

۴-۱) آنالیز محتوای پروتئینی HDL-C: از آنجا که بیش از ۲۰۰ پروتئین و بالقوه در پروتئوم HDL-C شناسایی شده است و نقش عملکردی بسیاری از آن‌ها در فرآیندهای ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدگرفتگی عروق نشان داده شده است، پروتئوم HDL-C به عنوان یک شاخص زیستی جهت اختلال عملکرد HDL-C در CVD یا ACS[ix] در استرس اکسیداتیو پیشنهاد گردیده است.[۵۳]

۱- یکی از روش‌های بررسی، تفنگ پروتئومیک[x] بوده که ابتدا محتوای پروتئینی HDL-C توسط الکتروفورز جدا شده،

i- Vascular endothelial NOS assay
ii- Non-radioactive assays for cholesterol exchange onto lipid poor apo A-1
iii -Florescent apoAI assay
iv -Time-resolved fluorescence resonance energy transfer
v -Spin-label electron magnetic resonance
vi -Endothelial ICAM/VCAM assay
vii -Intercellular adhesion molecules
viii -Vascular cell adhesion molecule-1

ix-Acute Coronary Syndrome
x- Shotgun Proteomics

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

به پپتیدها تبدیل گردیده، توسط کروماتوگرافی مایع جداسازی گردیده و توسط جرم سنجی جرمی متوالی[i] (LC–MS/MS) اندازه‌گیری می‌شود. این روش بر اساس نوع تکنیک بکار رفته در آن، به دو تکنیک MALDI-TOF[ii] و SELDI-TOF[iii] تقسیم می‌شود.

۲- طیف سنجی جرمی یونیزان به کمک افشانه الکتریکی[iv](LC–ESI-MS/MS): این روش جهت بررسی پپتیدهای کوچک با طول ٦ تا ۲۰ آمینواسید در ابعاد نانو و پیکومول دارای حسیاسیت بالا می‌باشد.

۴-۲) آنالیز محتوای لیپیدی HDL-C:

۱- روش‌های مستقیم: این روش که در آن از تفنگ اسپکتروفوتومتری جرمی استفاده می‌شود، شامل LC–ESI-MS و ESI–MS/MS می‌باشد.

۲- روش‌های غیرمستقیم: این روش‌ها شامل روش‌های سه گانه اسپکتروفوومتری جرمی به نام‌های اسکن یونی پیش ساز (PIS[v])، neutral loss scan (NLS[vi]) و multi-reaction monitor (MRM[vii]) می‌باشد که آنالیزهای لیپیدی ساختارهای پیچیده بیولوژیکی را با توان بالاتری انجام می‌دهند.[۲۱]

جدول (٤) شامل خلاصه‌ای از روش‌های سنجش محتوای HDL-C شامل آنالیز محتوای پروتئینی و محتوای لیپیدی HDL-C می‌باشد.

جدول ۴- روش‌های سنجش محتوای HDL-C

آنالیز محتوای پروتئینی HDL-C
- تفنگ پروتئومیک(LC–MS/MS)
  - MALDI-TOF
  - SELDI-TOF
- طیف سنجی جرمی یونیزان به کمک افشانه الکتریکی (LC–ESI-MS/MS)

آنالیز محتوای لیپیدی HDL-C
- روش‌های مستقیم
  - LC–ESI-MS
  - ESI–MS/MS
- روش‌های غیرمستقیم
  - MRM/ NLS/PIN

جدول ٤) خلاصه‌ای از روش‌های سنجش محتوای HDL-C : شامل آنالیز محتوای پروتئینی و محتوای لیپیدی HDL-C

i -Tandem Mass Spectrophotometry
ii -Matrix-Assisted Laser Desorption - Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry
iii -Surface-enhanced laser desorption/ionization- Time of Flight Mass Spectrometry
iv -Electrospray Ionization
v -Precursor Ion Scan
vi -Neutral Loss Scan
vii -Multi-Reaction Monitor

بحث

در راستای نقش محافظتی HDL-C در ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، اهمیت تعیین دقیق میزان آن در پی بردن به احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و هم‌چنین میزان اهمیت آن در درمان موثر بالا بودن کلسترول خون، روش‌های متعددی در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

صحت اندازه‌گیری HDL-C نه تنها از نقطه نظرات ذکر شده بلکه به دلیل محاسبه LDL-C از طریق فرمول فریدوالد[viii] نیز اهمیت دارد LDL-C = Total cholesterol – (HDL-C+TG/5)[٥٤]. از این روی، عدم محاسبه صحیح میزان HDL-C موجب جواب کاذب به دلیل رابطه متقابل آن با LDL-C می‌گردد.

نکته قابل توجه دیگر در بررسی HDL-C، اطمینان ازصحت سنجش آن است. به گونه‌ای که میزان خطای تام (بایاس + ۱/۹٦ ضریب تغییر (CV[ix]) که شامل عدم دقت[x] (خطاهای تصادفی) و عدم صحت[xi] (خطاهای سیستماتیک یا همان بایاس) است، در هر اندازه‌گیری به ترتیب باید ≤٥٪ و ≤ ٤٪ و در مجموع ≤۱۳٪ از ارزش حقیقی آن باشد. لازم به ذکر است میزان دقت یک روش خاص بر اساس تکرار آنالیزهای آن سنجش ارزیابی می‌شود. در جدول (٥)، نمونه‌ای از مقایسه میان درصد میانگین دقت روش‌های رسوبی و روش‌های همگن SPD، PEG و AB نشان داده شده است.

جدول ۵- مقایسه درصد میانگین دقت روش‌های سنجش HDL-C

	Homogeneous method		
Precipitation pretreatment	SPD (Daiichi)	PEG (Kyowa Medex)	AB (Wako)
۳/٤	۲/۰٤	۱/۹	۱/٦

جدول ٥) مقایسه درصد میانگین دقت روش‌های رسوبی و روش‌های همگن SPD، PEG و AB

یکی دیگر از نکاتی که در سنجش HDL-C همواره باید در نظر گرفت، وجود سایر مولکول‌های مداخله‌کننده از جمله

viii -Friedewald
ix -Coefficient of Variation
x- Imprecision
xi- Bias

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

تری‌گلیسرید، هموگلوبین، بیلی‌روبین و لیپوپروتئین‌های LDL-C و VLDL-C است. در جدول ٦ میانگین میزان بدون مداخله مولکول‌های بالقوه مداخله‌گر در سنجش HDL-C نشان داده شده است.[۲۲]

علاوه بر موارد ذکر شده، عوامل دیگری مانند تغییرات بیولوژیکی، عوامل پیش از آنالیز و تفاوت‌های موجود میان روش‌های اندازه‌گیری نیز بر روی نتایج سنجش HDL-C تاثیرگذار هستند. جدول ۷ عوامل تاثیرگذار در تغییرات نتایج HDL-C و چگونگی به حداقل رساندن تداخلات مذکور را نشان می‌دهد.[۵۵]

جدول ۶- میزان مجاز مولکول‌های مداخله‌کننده جهت عدم اخلال در صحت روش سنجش

مولکول مداخله‌کننده	میزان تداخل
TGs	تا ≥mg/L ۹۰۰۰ ندارد
Hemoglobin	تا ≥g/L ۲ ندارد
Bilirubin	تا ≥mg/L ۱۰۰ ندارد
Lps	تا ≥mg/L ۳۰۰۰ ندارد

جدول ٦) حداکثر میزان ملکول‌های مداخله‌کننده از قبیل تری‌گلیسیریدها، هموگلوبین، بیلی‌روبین و لیپوپلی‌ساکاریدها که در غلظت ذکر شده در صحت روش سنجش HDL-C اخلال ایجاد نمی‌نمایند.

جدول ۷- عوامل تاثیرگذار در تغییرات نتایج HDL-C و چگونگی به حداقل رساندن تداخلات مذکور

نوع تداخل	چگونگی کاهش تداخلات
تغییرات بیولوژیکی	- گرفتن ۲ تا ۳ نمونه در فواصل یک هفته‌ای در طی دو ماه و میانگین گرفتن نتایج - جمع‌آوری اطلاعات از شرایط پزشکی و شیوه زندگی بیمار از قبیل فعالیت فیزیکی، رژیم غذایی، مصرف الکل، چاقی، بارداری، بیماری، مصرف دارو و... - ثبات وزن و رژیم غذایی به مدت حداقل دو هفته قبل از انجام تست - عدم فعالیت فیزیکی و تمرینات ورزشی سنگین قبل از انجام تست - عدم انجام تست به مدت ۸ تا ۱۲ هفته پس از انفارکتوس میوکارد حاد، ترومای حاد، جراحی، عفونت حاد یا التهاب و بارداری
عوامل قبل از آنالیز	- استاندارد بودن نمونه خون (رعایت ۱۲ ساعت ناشتایی، شیوه صحیح نشستن) -جداسازی سرم یا پلاسما از سلول‌ها در طی ۳ ساعت اولیه - تعیین تاثیر شرایط محیطی نمونه از قبیل استفاده از داروهای ضدانعقاد، شرایط نگهداری نمونه (نمونه می‌تواند در 4□C به مدت ۳ روز، در □C ۲۰- به مدت ۱ ماه و در کمتر از □C ۵۰- به مدت ۱ تا ۲ سال نگه‌داری شود)، فریز و دفریز کردن - جداسازی HDL-C طی ۱ تا ۲ روز پس از جمع‌آوری نمونه
تفاوت‌های مربوط به روش‌های سنجش	- مقایسه میان رفرنس CDC و DCM : هدف نهایی NCEP عبارت است از Bias≤٥٪ ، SD≤۱۷ mg/L ، CV≤٤٪، و خطای تام ≤۱۷٪ از ارزش واقعی - کنترل کیفیت معرف‌های اختصاصی، کارکرد دستگاه‌ها و کالیبراسیون
مداخله‌کننده ها	- تعیین تداخلات ناشی از TGs، پاراپروتئین‌های مونوکلونال، بیلی‌روبین، هموگلوبین -بررسی تائید استفاده از روش مذکور در نمونه‌های غیر طبیعی (دیابتی، دیس‌لیپیدمیا، بیماری‌های کبدی و کلیوی)

جدول ۷) عوامل تاثیرگذار در تغییرات نتایج HDL-C از قبیل تغییرات بیولوژیکی، عوامل قبل از آنالیز، تفاوت‌های مربوط به روش‌های سنجش و مداخله‌کننده‌ها و پیشنهاداتی جهت به حداقل رساندن تداخلات مذکور

از میان روش‌های ذکر شده، روش‌های اولیه که بر اساس رسوب دهی ذرات غیر HDL-C و اندازه‌گیری میزان HDL-C پس از سانتریفیوژ بود به دلیل معایب موجود توسط روش‌های نسل دوم و سپس توسط معرف‌های نسل

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

سوم جایگزین گردید. از ویژگی‌های برتر روش‌های نسل سوم می توان به قابلیت اتوماسیون، کاهش ضریب تغییرات، سرعت و ویژگی بالاتر و هزینه پرسنلی پایین‌تر اشاره نمود.[۵۶] علاوه بر موارد ذکر شده، در جدول (۸) خلاصه‌ای از روش‌های سنجش HDL-C، بر مبنای ساختار فیزیکی، ساختار شیمیایی، عملکرد و محتوای پروتئینی و لیپیدی، روش‌ها و شاخص‌های سنجش، و هم‌چنین مهم‌ترین فواید و محدودیت‌های هر یک از روش‌ها ذکر گردیده است.

جدول ۸- مقایسه‌ای اجمالی میان روش‌های سنجش HDL-C

مبنای سنجش	روش‌های سنجش	شاخص سنجش	فواید	محدودیت‌ها
ساختار فیزیکی	• اولتراسانتریفیوژ		فواید عمومی روش‌های اولتراسانتریفیوژ: شناخته شده به عنوان روش طلایی استاندارد در جداسازی لیپوپروتئین‌ها و زیرمجموعه‌های HDL-C	محدودیت‌های عمومی روش های اولتراسانتریفیوژ: از بین رفتن پروتئین‌های مرتبط با لیپوپروتئین‌ها به دلیل نیروی بالای میدان، احتمال تغییر پروتئین‌های سطحی HDL-C براثر غلظت بالای نمک و تغییرات جزئی ساختار ذرات HDL-C، کاهش میزان apoA-I از HDL-C نسبت به سایر روش‌های رسوبدهی، نیاز به استفاده از تجهیزات مختلف، نیاز به اپراتورهای ماهر جهت فرآیند جداسازی، عدم امکان تکرارپذیری
	○ اولتراسانتریفیوژ آنالیزی شناور	چگالی	فواید عمومی روش‌های اولتراسانتریفیوژ	محدودیت‌های عمومی روش‌های اولتراسانتریفیوژ
	○ روش تعادلی ایزوپیکنیک	چگالی	فواید عمومی روش‌های اولتراسانتریفیوژ، تسهیل در جداسازی HDL-C در حالت غیراکسید و دناتوره نشده، عدم امکان آلودگی با پروتئین‌های پلاسمای بزرگتر از ۱/۲۵ گرم بر میلی‌لیتر	محدودیت‌های عمومی روش‌های اولتراسانتریفیوژ، حجم بالای نمونه مورد نیاز، احتمال نتیجه مثبت کاذب در افزایش میزان apoA-IV
	○ اولتراسانتریفیوژ VAP	چگالی	فواید عمومی روش‌های اولتراسانتریفیوژ، سرعت، قابلیت استفاده برای تمامی نمونه‌های پلاسما، دقت بالا، نیاز به حجم کم نمونه، صرفه اقتصادی	محدودیت‌های عمومی روش‌های اولتراسانتریفیوژ، عدم توانایی جداسازی برخی از زیرمجموعه‌های تکی از HDL-C
	• الکتروفورز			
	○ ژل آگارز	بار سطحی و شکل مولکول	عدم نیاز به حجم بالای نمونه، امکان انجام تست در آزمایشگاه‌های روتین و غیرتخصصی	ارائه اطلاعات نیمه کمی درباره LDL و VLDL
	○ یک بعدی	اندازه	حساسیت بالا جهت جداسازی کمی زیرمجموعه‌های HDL-C بر اساس اندازه	عدم توانایی جداسازی جمعیت preβ-2 ، نیاز به آزمایشگاه تخصصی، ارائه اطلاعات اندک از زیرکلاس های HDL-C جهت پیش‌بینی CVD، عدم وجود یا دسترسی به ۴-۳٪ الی ۳۰٪ از ژل‌های پیش ساخته در بازار
	○ یک بعدی همراه با ایمونوبلاتینگ	اندازه	تعیین دقیق تر زیرواحدهای HDL-C، حساسیت و اختصاصیت بالا	هزینه بالا، امکان جواب مثبت و منفی کاذب، نیاز به نیروی آزمایشگاهی ماهر
	○ دو بعدی	بار سطحی و جرم	صحت تشخیص ناهنجاری‌های متابولیسم HDL-C، ارائه اطلاعات درخصوص CVD، استانداردسازی شده، قابلیت تکرارپذیری	وجود پروتوکل‌های متنوع، نیاز به آزمایشگاه تخصصی، ارائه اطلاعات اندک درباره زیرکلاس‌های HDL-C مانند apoA-IV
	○ Electro Immune Diffusion (EID)	محتوای پروتئینی	سرعت و دقت بالا، قابلیت تکرارپذیری، نیاز به میزان اندک نمونه	هزینه بالا، نیاز به آزمایشگاه تخصصی
	○ Capillary Isotachophoresis	الکتروفورز برپایه بار	جداسازی سریع، اتوماسیون آسان، نظارت تک سویه	هزینه بالا، محدودیت در تجزیه و تحلیل نتایج
	○ Capillary electrophoresis	خصوصیات الکتروشیمیایی	سهولت انجام، هزینه پایین، عدم نیاز به مشتق سازی، نیاز به حجم اندک نمونه در غلظت‌های کم و بدون استخراج پیچیده	محدودیت استفاده برای مطالعه لیپیدها نسبت به سایر مولکول‌های زیستی بدن به دلیل عدم حلالیت آن‌ها در الکترولیت های آبی، عدم شناسایی زیرواحدهایی با حرکات الکتروفورزی نزدیک به هم
	○ Free-Solution ITP	میزان تحرک الکتروفورزی	استفاده هم‌زمان از سه روش ایمونوبلاتینگ، الکتروفورز دو بعدی و ITP، توانایی اتوماسیون و پردازش داده‌ها به صورت مستقیم و برخط	عدم توانایی در شناسایی مولکول‌ها بر اساس اختلاف بار و اندازه، عدم شناسایی زیرواحدهایی با حرکات الکتروفورزی نزدیک به هم
	• کروماتوگرافی			
	○ ستون ژلی فیلترکننده	اندازه ذره HDL-C	سرعت، صحت و تکرارپذیری در جداسازی بدون تاثیر بر ترکیب لیپوپروتئین	نیاز بیشتر به وجود آزمایشگاه تخصصی و بالینی، احتمال آلودگی قطعات HDL-C با آلبومین

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

	○ ستون تبادلات یونی	تمایلات یونی	سرعت، صحت و تکرارپذیری در جداسازی بدون تاثیر بر ترکیب لیپوپروتئین	احتمال آلودگی قطعات HDL-C با آلبومین
	○ تلفیق اولتراسانتریفیوژ/ HPLC	ابعاد و تمایلات یونی	حجم کمتر نمونه مورد نیاز، سرعت، صحت و تکرارپذیری در جداسازی بدون تاثیر بر ترکیب لیپوپروتئین	احتمال آلودگی قطعات HDL-C با آلبومین، نیاز به وجود آزمایشگاه تخصصی و بالینی، عدم امکان تکرار پذیری
	• NMR	سیگنال NMR از HDL-C خالص	عدم نیاز به آماده سازی نمونه، مناسب برای حجم بالای نمونه، بهره‌وری کمی HDL-C و LPs	عدم ارائه اطلاعات در خصوص ترکیب شیمیایی HDL-C، عدم صحت یکسان در اندازه‌گیری تمامی کلاس‌های لیپوپروتئینی، عدم اطمینان از حذف preβ-I، محدودیت در ارائه شواهد لازم جهت پیش بینی CVD بر پایه HDL-C
	• ELISA	ApoA-I	عدم وجود واکنش متقاطع و مداخله‌کننده‌ها، حساسیت بالا با کمترین غلظت پروتئین	امکان عدم ارائه نتایج در رابطه با زیرواحدهای دایمر preβ-I
ساختار شیمیایی	• نسل اول: روش‌های شیمیایی		فواید عمومی روش‌های نسل اول: قابلیت تکرارپذیری، صرفه اقتصادی، در دسترس بودن مواد اولیه، صرفه‌جویی در زمان	محدودیت‌های عمومی روش‌های نسل اول: رسوبدهی ناقص apo-E، امکان ایجاد اختلال در نتیجه آزمایش به دلیل کدورت مایع ناشی از شرایط بالینی از قبیل هایپرتریگلیسمی و التهاب، تاثیر بالای شرایط آزمایشگاهی از قبیل قدرت یونی، pH و دما بر روی نتایج اندازه‌گیری
	○ Heparin/MnCL2	Apo-B	فواید عمومی روش‌های نسل اول	محدودیت‌های عمومی روش‌های نسل اول، مخلوط شدن ذرات پروتئینی و apo-E در محلول رویی حاوی HDL-C، وجود محدودیت در تهیه هپارین تجاری، امکان مداخله Mn2+ با روش‌های اولیه آنزیمی
	○ Dextran sulfate- Mg2+	Apo-B	فواید عمومی روش‌های نسل اول	محدودیت‌های عمومی روش‌های نسل اول، مخلوط شدن ذرات پروتئینی و apo-E در محلول رویی حاوی HDL-C
	○ Phosphotungstic acid/ Phosphotungstate-Mg2+	Apo-B	فواید عمومی روش‌های نسل اول	محدودیت‌های عمومی روش‌های نسل اول، ناپایداری و عدم امکان نگه‌داری طولانی مدت
	○ Polyethylene glycol	Apo-B	فواید عمومی روش‌های نسل اول، عدم تغییر محتوای کلسترولی HDL-C، عدم تداخل رسوبات، دقت بالا در جداسازی کلاس های Lp	محدودیت‌های عمومی روش‌های نسل اول، رسوبدهی و حذف LDL و VLDL از نمونه سرم در غلظت های بالای PEG
	○ روش رسوبدهی یک مرحله‌ای	Apo-B	فواید عمومی روش‌های نسل اول، سهولت انجام توسط پرسنل غیرحرفه‌ای	محدودیت‌های عمومی روش های نسل اول، مخلوط شدن ذرات پروتئینی و apo-E در محلول رویی حاوی HDL-C
	○ روش رسوبدهی دومرحله‌ای	Apo-B	فواید عمومی روش‌های نسل اول	محدودیت‌های عمومی روش های نسل اول، مخلوط شدن ذرات پروتئینی و apo-E در محلول رویی حاوی HDL-C
	• نسل دوم: روش‌های اتوماتیک			
	○ Magnetic-Dextran Sulfate- Mg2+	Apo-B	سرعت بالا و سهولت بیشتر در جداسازی نسبت به روش‌های نسل اول، انجام خودکار، عدم تداخل با اسیدهای چرب آزاد	امکان تداخل با هموگلوبین، امکان تداخل با تری‌گلیسیرید در غلظت‌های بالا
	• نسل سوم: روش‌های سنجش همگن شده		فواید عمومی روش‌های نسل سوم: جداسازی Lps به غیر از HDL-C، بدون نیاز به معرف پاکسازی، کاملا اتوماتیک، عدم نیاز به آماده‌سازی قبلی نمونه و جداسازی اولیه، حذف مراحل پیپتاژ دستی و سانتریفیوژ، کاهش هزینه‌های پرسنلی و معرف‌ها، اتوماتیک بودن، نیاز به حجم کمتری از نمونه، کنترل دقیق دما، کاهش زمان	
	○ IRC	بلوکه کردن apo-B و apo-C در Lps به جز HDL-C	فواید عمومی روش‌های نسل سوم	محدودیت استفاده برای اغلب آنالیزورها به دلیل استفاده از چهار معرف، ترجیح به استفاده از روش در آزمایشگاه‌های بالینی پیشرفته
	○ Serotec and UMA	استفاده از مهارکننده های کمپلکس فسفات	فواید عمومی روش‌های نسل سوم	
	○ PEG-Kyowa Medex	بلوکه کردن Lps به جز HDL-C و شناسایی HDL-C به کمک معرف دارای Mg^{2+}	فواید عمومی روش‌های نسل سوم، استفاده Da PEG6000 به منظور بهینه سازی ویژگی جداسازی نسبت به روش‌های قبلی از نظر جداسازی بر اساس اندازه و بار در غلظت بسیار کم، افزایش تمایل CE و CO به HDL-C، کاملا اتوماتیک	

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

	○ SPD-Daiichi	استفاده از پلیمرهای سنتتیک و پلی‌آنیون‌ها جهت بلوکه کردن Lps به جز HDL-C و شناسایی HDL-C به کمک معرف فاقد Mg^{2+}	فواید عمومی روش‌های نسل سوم، افزایش ویژگی و کاهش تداخلات احتمالی نسبت به روش‌های قبلی	
	○ AB-Wako	بلوکه کردن apo-B در Lps به جز HDL-C	فواید عمومی روش‌های نسل سوم	نیاز به بازسازی و بهبود معرف‌های آنزیمی
	○ CAT-Denka Seiken	ایجاد رنگ از پراکسیداز HDL-C	فواید عمومی روش‌های نسل سوم	
عملکرد	• سنجش عمکردی			
	○ سنجش لسیتین:کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT)	نرخ استریفیکاسیون قطعات	سرعت بالا، هزینه کمتر و قابلیت تکرارپذیری	نیازمند به استانداردسازی و مطالعات بیشتر در ارتباط با پیش‌بینی CAD از طریق سنجش مذکور، احتمال عدم اندازه‌گیری استریفیکاسیون اولیه و عدم امکان اندازه‌گیری برگشت کلسترول
	○ سنجش جریان کلسترول	ظرفیت جابجایی کلسترول از پلاسما/سرم	دارای استاندارد طلایی، ارتباط معکوس با CAD و تصلب شرائن	محدود بودن به قطعات کوچک ازجریان معکوس کلسترول در ماکروفاژها، عدم امکان استانداردسازی و نسبت سازی معکوس در ارتباط با CAD، نتایج محدود غیرقابل ارزیابی از ترکیبات نهایی مسیر معکوس کلسترول
	○ سنجش کلسترول HDL غیر التهابی	آنالیز HDL-C از دید قدرت مهارکنندگی کموتاکسی LDL	امکان بررسی عملکرد ضدالتهابی HDL-C	عدم امکان تکرارپذیری، ارائه اطلاعات اندک
	○ سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی	ارزیابی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی HDL-C	امکان بررسی عملکرد آنتی‌اکسیدانی HDL-C	عدم استانداردسازی، محدودیت در تایید صحت فرضیات
	○ سنجش نیتریک اکساید اندوتلیال عروقی	نیتریک اکساید	ارزیابی ظرفیت محافظتی HDL-C از خصوصیات اندوتلیالی	عدم انجام تست به صورت روتین
	○ سنجش غیررادیواکتیوی برای تبادل کلسترول به لیپیدهای ضعیف apoA-I	بررسی کیفی تبادل HDL-C -apoA-I میان لیپیدهای مرکب و لیپیدهای آزاد	ارزیابی کیفی تبادلات apo-AI	عدم انجام تست به صورت روتین
	○ سنجش ICAM/VCAM اندوتلیالی	ICAMs/VCAM -1	ارزیابی ظرفیت محافظتی HDL-C از خصوصیات اندوتلیالی	عدم انجام تست به صورت روتین
محتوای پروتئینی و لیپیدی	• آنالیز محتوای پروتئینی			
	○ تفنگ پروتئومیک	محتوای پروتئینی	حساسیت کمتر نسبت به روش طیف سنجی جرمی یونیزان	طبیعت نیمه کمی بودن تست از نظر وابستگی به نتایج طیف سنجی جرمی و ماهیت ماده اولیه (سرم، پلاسما یا عصاره بیولوژیکی)
	○ طیف سنجی جرمی یونیزان به کمک افشانه الکتریکی	محتوای پروتئینی	دارای حساسیت بالا برای پپتید های کوچک به طول ٦ تا ۲۰ آمینواسید و مقیاس‌های نانو و پیکومول، سرعت بالای تبخیر و افزایش زمان اندازه‌گیری	نیاز به استانداردسازی و کنترل خارجی
	• آنالیز محتوای لیپیدی			
	○ روش‌های مستقیم	محتوای لیپیدی	دربرگرفتن طیف وسیعی از نمونه‌های چربی، آنالیز غیرهدفمند، سهولت ساخت نمونه	وضوح بالقوه پایین، محدودیت در روش‌های موجود
	○ روش‌های غیر مستقیم	محتوای لیپیدی	صحت بالای اندازه‌گیری، سرعت بالای آنالیز (تشخیص ۳۱۲ مولکول چربی در مدت ۲۰ دقیقه)، حسیاسیت بالا، استحکام ابزاری	نیاز به پیشرفت بیشتر جهت شناسایی بیش از ۲۰۰ نوع مولکول چربی شناخته شده، محدودیت در روش‌های موجود

جدول ۸) خلاصه‌ای از روش‌های سنجش HDL-c. بر مبنای ساختار فیزیکی، ساختار شیمیایی، عملکرد و محتوای پروتئینی و لیپیدی (ستون اول از راست)، روش‌ها و شاخص‌های سنجش (ستون دوم و سوم از راست)، و همچنین مهم‌ترین فواید و محدودیت‌های هر یک از روش‌ها (ستون اول و دوم از چپ).

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

References

1. Fuster V KB. Promoting Cardiovascular health in the developing world 2010: 1-463. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45688/.
2. Haase CL, Tybjærg-Hansen A, Ali Qayyum A, Schou J, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: A mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. J Clin Endocrinol Metab 2012; 97: E248-56.
3. Jrøgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjræg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. N Engl J Med 2014; 371: 32-41.
4. Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, et al. Niacin in Patients with Low HDL Cholesterol Levels Receiving Intensive Statin Therapy. N Engl J Med 2011; 365: 2255-67.
5. Daneshpour MS, Fam B, Mansournia MA, Hedayati M, Halalkhor S, Mesbah Namin AR, et al. Association of the APOAI-CIII-AIV gene cluster polymorphisms with the level of lipids in Tehranian Population. Iranian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2012; 13: 504-13.
6. Rosenson RS, Brewer HB, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. Circulation 2012; 125: 1905-19.
7. Hossainzadeh S, Ranji N, Naderi Sohi A, Najafi F. Silibinin encapsulation in polymersome: A promising anticancer nanoparticle for inducing apoptosis and decreasing the expression level of miR-125b/miR-182 in human breast cancer cells. J Cell Physiol 2019; 234: 22285-98.
8. Pakizehkar S, Ranji N, Sohi AN, Sadeghizadeh M. Polymersome-assisted delivery of curcumin: A suitable approach to decrease cancer stemness markers and regulate miRNAs expression in HT29 colorectal cancer cells. Polym Adv Technol 2019: pat.4759.
9. Pakizehkar S, Ranji N, Naderi Sohi A, Sadeghizadeh M. Curcumin loaded PEG 400 -OA nanoparticles: A suitable system to increase apoptosis, decrease migration, and deregulate miR-125b/miR182 in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Polym Adv Technol March 2020.
10. Novák J, Bienertová-Vašků J, Kára T, Novák M. MicroRNAs involved in the lipid metabolism and their possible implications for atherosclerosis development and treatment. Mediators Inflamm 2014; 2014.
11. Barter PJ, Puranik R, Rye K. New Insights Into the Role of HDL as an Anti-inflammatory Agent in the Prevention of Cardiovascular Disease. Current Cardiology Reports 2007; 9: 493-8.
12. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. Circ Res 2006; 98: 1352-64.
13. Bardagjy AS, Steinberg FM. Relationship Between HDL Functional Characteristics and Cardiovascular Health and Potential Impact of Dietary Patterns: A Narrative Review. Nutrients 2019; 11: 1231.
14. Chapman MJ. Are the effects of statins on HDL-cholesterol clinically relevant? European Heart Journal Supplements 2004; Pages C58–C63.
15. Bandarian F, Hedayati M, Daneshpour MS, Naseri M, Azizi F. Genetic polymorphisms in the APOA1 gene and their relationship with serum HDL cholesterol levels. Lipids 2013; 48: 1207-16.
16. Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, et al. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 534-40.
17. Naseri M, Hedayati M, Daneshpour MS, Bandarian F, Azizi F. Identification of genetic variants of lecithin cholesterol acyltransferase in individuals with high HDL-C levels. Mol Med Rep 2014; 10: 496-502.
18. Faam B, Daneshpour MS, Hedayati M, et al. The age effect on the association between the scavenger receptor class B type I (SR-BI) polymorphism and HDL-C level: Tehran Lipid and Glucose Study. Endocr Res 2014; 39: 91-3.
19. Catte A, Patterson JC, Bashtovyy D, Jones MK, Gu F, Li L, et al. Structure of spheroidal HDL particles reve aled by combined atomistic and coarse-grained simu lations. Biophys J 2008; 94: 2306-19.
20. Holmes MV, Smith GD. Dyslipidaemia: Revealing the effect of CETP inhibition in cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol 2017; 14: 635-6.
21. Hafiane A, Genest J. High density lipoproteins: Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. BBA Clin 2015; 3: 175-88.
22. Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: From ultracentrifugation to homogeneous assays. Clin Chem 2001; 47: 1579-96.
23. Ahmadraji T, Killard AJ. The evolution of selective analyses of HDL and LDL cholesterol in clinical and point of care testing. Anal Methods 2013; 5: 3612-25.
24. Nichols A V., Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Methods Enzymol 1986; 128: 417-31.
25. Tian L, Long S, Li C, Liu Y, Chen Y, Zeng Z, et al. High-density lipoprotein subclass and particle size in coronary heart disease patients with or without diabetes. Lipids Health Dis 2012; 11: 54.
26. Atmeh RF. Isolation and identification of HDL particles of low molecular weight. J Lipid Res 1990; 31: 1771-80.
27. Franceschini G, Calabresi L, Colombo C, Favari E, Bernini F, Sirtori CR. Effects of fenofibrate and simvastatin on HDL-related biomarkers in low-HDL patients. Atherosclerosis 2007; 195: 385-91.
28. Böttcher A, Schlosser J, Kronenberg F, Dieplinger H, Knipping G, Lackner K, et al. Preparative free-solution isotachophoresis for separation of human plasma lipoproteins: Apolipoprotein and lipid composition of HDL subfractions. J Lipid Res 2000; 41: 905-15.
29. Hussain CM, Keçili R. Separation techniques for environmental analysis. In: Modern Environmental Analysis Techniques for Pollutants. Elsevier; 2020: 163-98.
30. Dong J, Guo H, Yang R, Li H, Wang S, Zhang J, et al. Serum LDL- and HDL-cholesterol determined by ultracentrifugation and HPLC. J Lipid Res 2011; 52: 383-8.
31. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. In: Clinical Chemistry 1992; 38: 1632-8.
32. Aru V, Lam C, Khakimov B, Khakimov B, Hoefsloot H, Zwanenburg G, et al. Quantification of lipoprotein profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. TrAC - Trends Anal Chem 2017; 94: 210-9.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

33. Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, et al. Liposcale: A novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy. J Lipid Res 2015; 56: 737-46.
34. Niisuke K, Horvath KV. Asztalos BF. Where next with HDL assays? Curr Opin Lipidol 2018; 29: 293-8.
35. 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.
36. Tsutomu Hirano1, Kyoko Nohtomi, Shinji Koba, Ayako Muroi and YI. A simple and precise method for measuring HDL-cholesterol subfractions by a single precipitation followed by homogenous HDL-cholesterol assay. J Lipid Res 2008; 49: 1130-6.
37. Harris N, Galpchian V, Rifai N. Three routine methods for measuring high-density lipoprotein cholesterol compared with the reference method. Clin Chem 1996; 42: 738-43.
38. M. A. Kramer. Focus on Cholesterol Research. Nova Biomedical. Available from: URL: http://www.novapublishers.org/catalog/product_info.php?products_id=3932. Accessed February 3, 2020.
39. 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.
40. Harris N, Galpchian 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.
41. De Keijzer MH, Elbers D, Baadenhuijsen H, Demacker PNM. Evaluation of five different high-density lipoprotein cholesterol assays: The most precise are not the most accurate. Ann Clin Biochem 1999; 36: 168-75.
42. Izawa S, Okada M, Matsui H, Horita Y. A new direct method for measuring HDL-cholesterol which does not produce any biased values. January 1997.
43. Barish GD, Tangirala RK. Measurement of Lecithin–Cholesterol Acyltransferase Activity with the Use of a Peptide-Proteoliposome Substrate. Methods Mol Biol 2013; 1027: 327-42.
44. Frohlich J, Dobiášová M. Fractional Esterification Rate of Cholesterol and Ratio of Triglycerides to HDL-Cholesterol Are Powerful Predictors of Positive Findings on Coronary Angiography. Clin Chem 2003; 49: 1873-80.
45. Rothblat GH, De La Llera-Moya M, Favari E, Yancey PG, Kellner-Weibel G. Cellular cholesterol flux studies: Methodological considerations. Atherosclerosis 2002; 163: 1-8.
46. Sankaranarayanan S, Kellner-Weibel G, De La Llera-Moya M, et al. A sensitive assay for ABCA1-mediated cholesterol efflux using BODIPY-cholesterol. J Lipid Res 2011; 52: 2332-40.
47. Huanga CX, Zhanga YL, Wanga JF, Jiangb JU and Bao JL. MCP-1 Impacts Reverse Cholesterol Transport by Repressing ABCA1, ABCG1 and SR-BI through PI3K/Akt Post-Translational Regulation in HepG2 Cells; 2013; 54: 1231-40.
48. van der Vorst EPC, Theodorou K, Wu Y, Hoeksema M, Goossens P, Bursill CA, et al. High-Density Lipoproteins Exert Pro-inflammatory Effects on Macrophages via Passive Cholesterol Depletion and PKC-NF-κB/STAT1-IRF1 Signaling. Cell Metab 2017; 25: 197-207.
49. Suzuki M, Pritchard DK, Becker L, Hoofnagle AN, Tanimura N, Bammler TK, et al. High-density lipoprotein suppresses the type i interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. Circulation 2010; 122: 1919-27.
50. Riwanto M, Landmesser U. Thematic review series: High density lipoprotein structure, function, and metabo lism: High density lipoproteins and endothelial func tions: Mechanistic insights and alterations in cardiov ascular disease. J Lipid Res 2013; 54: 3227-43.
51. Omura R, Nagao K, Kobayashi N, Ueda K, Saito H. Direct detection of ABCA1-dependent HDL formation based on lipidation-induced hydrophobicity change in apoA-I. J Lipid Res 2014; 55: 2423-31.
52. Calabresi L, Gomaraschi M, Villa B, Omoboni L, Dmitrieff C, Franceschini G. Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 656-61.
53. Alwaili K, Bailey D, Awan Z, et al. The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids 2012; 1821: 405-15.
54. William T. Friedewald, Robert I. Levy and DSF. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterolin Plasma, Without Useof the Prepa rative Ultracentrifug. Clin Chem 1972; 18: 499-502.
55. Langlois MR, Blaton VH. Historical milestones in measurement of HDL-cholesterol: Impact on clinical and laboratory practice. Clin Chim Acta 2006; 369: 168-78.
56. Hedayati M, Daneshpour M. Evaluation of HDL-C determination methods. Serv Endocr Metab Res Cent 2005; 7: 365-73.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]

Original Article

High-Density Lipoprotein Measurement Methods: From Precipitation to Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Hosseinzadeh S, Pakizehkar S, Hedayati M

Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran

e-mail:hedayati@endocrine.ac.ir

Received: 05/05/2020, **Accepted:** 03/08/2020

Abstract

Introduction: Extensive research suggests a common hypothesis regarding the protective role of total high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) against cardiovascular disease (CVD). This hypothesis indicates an inverse relationship between CVD and high HDL-C levels. Various mechanisms, such as reverse cholesterol transport, besides anti-inflammatory and antioxidant functions, indicate HDL-C as one of the potential predictors of CVD risk. Therefore, it is important to be familiar with different methods of HDL-C measurement and to evaluate their advantages and disadvantages. In this study, after reviewing the nature, function, and protective role of HDL-C against CVD, the HDL-C measurement methods were evaluated. Also, some interfering molecules due to interventions and some strategies to reduce interference were discussed. It seems that the increased use of homogenous measurement methods is related to some disadvantages, such as high cost, manual separation, time-consuming design, and structure manipulation, in first- and second-generation chemical methods, as well as methods based on physical properties. On the other hand, targeted assessment of HDL-C function and protective role can be a novel approach to predict the risk of CVD. However, all of these methods require further improvement and optimization.

Keywords: Cholesterol, HDL, Risk Assessment, Cardiovascular Disease, Coronary Artery Disease, Arteriosclerosis

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.2.9]