

# Wykorzystanie spektroskopii oscylacyjnej do klinicznych badań lipidów i lipoprotein krwi człowieka

## Streszczenie

Zespół metaboliczny to stan kliniczny, który charakteryzuje się jednoczesnym występowaniem otyłości brzusznej, podwyższonego ciśnienia tętniczego oraz zaburzonej gospodarki węglowodanowej i lipidowej, przejawiającej się podwyższonym stężeniem frakcji lipoprotein LDL (*low density lipoprotein*) i obniżonym HDL (*high density lipoprotein*). Czynniki te prowadzą do zmian miażdżycowych, grożących zawałem mięśnia sercowego lub udarem niedokrwiennym mózgu. Standardowa diagnostyka dyslipidemii obejmuje jedynie podstawowe oznaczenia: cholesterol frakcji LDL, HDL i całkowity oraz triglicerydy. Zgodnie z badaniami klinicznymi w przypadku typu dyslipidemii związanej z podwyższonym stężeniem triglicerydów, a cholesterolem często w normie, te parametry nie dają informacji o ilości i zmienionej strukturze lipoprotein. U niektórych pacjentów, pomimo wyników mieszczących się w normie, rozwijają się zmiany miażdżycowe zagrażające życiu. Badania wykazały, że odpowiedzialna za to jest obecność patologicznych podklas frakcji lipoprotein VLDL (*very low density lipoprotein*), LDL i HDL.

Lipoproteiny zbudowane są z triglicerydów (TG), cholesterolu, fosfolipidów i białek. Poszczególne frakcje różnią się od siebie nie tylko funkcją, rozmiarem cząstek i ich gęstością, ale także proporcjami wymienionych składników. Zaburzenia w ich składzie przyczyniają się do powstawania patologicznych podklas lipoprotein. Podwyższone stężenie kwasów tłuszczowych także sprzyja ich pojawianiu. Dlatego ważne jest określenie tzw. wolnych kwasów tłuszczowych związanych nie z lipoproteinami, ale z albuminą, która jest uniwersalnym transporterem cząsteczek o charakterze hydrofobowym.

Celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości zastosowania bardziej dostępnej spektroskopii oscylacyjnej, zwłaszcza spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni, ale również Ramana, do wykrywania patobiologii lipidów i lipoprotein surowicy krwi. Zadania te są istotne nie tylko punktu widzenia inżynierii biomedycznej, ale również potencjalnej aplikacji medyczno-diagnostycznej.

Aby zrealizować cel pracy, spektroskopię FTIR-ATR i Ramana wykorzystano do oznaczania zawartości TG przenoszonych przez frakcję VLDL (TG-VLDL) bezpośrednio w surowicy krwi, bez konieczności izolacji frakcji czasochłonną metodą ultrawirowania. W tym celu z próbek krwi od 31 pacjentek wyizolowano frakcję VLDL poprzez ultrawirowanie. W wyizolowanych próbkach frakcji oznaczono stężenie TG-VLDL standardową metodą kolorymetryczną. Zarejestrowano także widma FTIR-ATR i Ramana surowicy krwi, na ich podstawie stworzono odpowiednie modele kalibracyjne z wykorzystaniem chemometrycznej metody regresji PLS (ang. *partial least-squares*). Modele kalibracyjne zwalidowano potwierdzając zgodność metod spektroskopii oscylacyjnej z metodą referencyjną.

Zbadano także wpływ zawartości PL we frakcji VLDL na jej podatność na agregację. W wyizolowanych z surowicy 22 pacjentów metodą ultrawirowania próbkach frakcji VLDL oznaczono referencyjną metodą kolorymetryczną zawartość PL. Zawartość PL oznaczona także została przy użyciu spektroskopii FTIR-ATR. Agregację lipoprotein wywołano poprzez jej mechaniczne wytrząsanie, a postęp agregacji mierzono spektrofotometrycznie jako wzrost ekstynkcji przy długości fali 680 nm. Rejestrowano także widma FTIR-ATR próbek frakcji po agregacji. Wykazano, że większa zawartość PL sprzyja zwiększeniu podatności na agregację, w wyniku której obserwowane były także zmiany w strukturze drugorzędowej apolipoprotein - białek wchodzących w skład cząstek VLDL.

Sprawdzono również jak zmienia się struktura drugorzędowa albuminy pod wpływem wiązania FA. Albumina, będąca uniwersalnym białkiem transportowym, posiada zdolność wiązania do 9 cząstek FA, w zależności od długości łańcucha alifatycznego. Zazwyczaj stosunek molowy FA do albuminy mieści się w zakresie od 0,2 do 2,0 mol/mol, jednak po posiłku, w wyniku wysiłku fizycznego lub w przebiegu niektórych chorób metabolicznych wskaźnik ten może być wyższy. Zbadano, jak zmienia się zawartość struktur  $\alpha$ -helikalnych albuminy przy rosnącym stosunku molowym FA względem albuminy w zakresie od 0 do 20 mol/mol. Wyniki skonfrontowano z danymi krystalograficznymi dostępnymi w *Protein Data Bank* (PDB), które zawierają jednak jedynie informację dla albuminy całkowicie wysyczonej FA. Nasze rezultaty wskazują na szybko rosnącą zawartość struktur  $\alpha$ -helikalnych albuminy wraz z zawartością FA rosnącą od 0 do 2 mol/mol i względną stabilność struktur do 9 mol/mol, co jest zgodne z symulacjami przeprowadzonymi na drodze dynamiki molekularnej. Wyniki wskazują na przydatność spektroskopii FTIR-ATR w badaniu ilości FA związanych z albuminą, co jednak powinno zostać potwierdzone dalszymi badaniami na surowicy krwi lub surowicy pozbawionej lipoprotein, będącej jednym z produktów ultrawirowania.

Spektroskopię FT-IR użyto też do zbadania zmian oksydacyjnych zachodzących w lipidach osocza w modelu zwierzęcym (owce rasy merynos polski). Zmiany oksydacyjne wywoływane były przez poddawanie zwierząt zabiegom hemodializy, prowadzącym do aktywacji układu odpornościowego i wydzielania przez neutrofile reaktywnych form tlenu w ramach niespecyficznego reakcji immunologicznej. Podczas trwania hemodializy pobierano próbki krwi i izolowano osocze. Metodą referencyjną mierzono zmianę zawartości metabolitów uszkodzonych oksydacyjnie lipidów w osoczu. Ponadto ekstrahowano z niego całkowitą frakcję lipidową, a następnie rejestrowano jej widma FTIR-ATR i oznaczano parametry związane z ich oksydacją. Badania wykazały zgodność między obiema metodami oraz przydatność spektroskopii FTIR do monitorowania uszkodzeń oksydacyjnych lipidów.

Podsumowując, przeprowadzone doświadczenia dowiodły użyteczności spektroskopii oscylacyjnej w badaniu lipidów i lipoprotein krwi. Może być ona z powodzeniem używana w badaniu stresu oksydacyjnego i peroksydacji lipidów osocza wywołanej hemodializą, oznaczaniu zawartości TG-VLDL bezpośrednio w surowicy krwi bez konieczności ultrawirowania, fosfolipidów we frakcji VLDL, badaniu zmian strukturalnych apolipoprotein i albuminy. Dowiedziono również, że zwiększona zawartość fosfolipidów zwiększa podatność lipoprotein VLDL na agregację.

Spektroskopia oscylacyjna jest powszechnie dostępna ze względu na relatywnie niski koszt aparatury. Nie wymaga również użycia drogich odczynników ani specjalnych warunków pomiaru, pozwalając na szybką rejestrację widm próbek o niewielkiej objętości. Zalety te czynią spektroskopię oscylacyjną, zwłaszcza FTIR-ATR, przyjazną dla aplikacji klinicznych.