



УДК 577.352.27.088.3

© 1992 г. И. В. Антонов, Н. Ю. Замсева,
Н. В. Медведева, А. Ю. Мишарин

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФОСФОЛИПИДНЫХ МИЦЕЛЛ НА МОДИФИЦИРОВАННОЙ апоЛВП-СЕФАРОЗЕ

Институт экспериментальной кардиологии КНЦ РАН, Москва

Разработан метод иммобилизации мицеллярных комплексов фосфатидилхолинов (ФХ) из яичного желтка и препарата Lipostabil с аполипопротеинами высокой плотности (апоЛВП) на модифицированной сефарозе с последующей обработкой диметилсуберимидатом для образования ковалентных межбелковых связей. После делипидирования и повторной инкубации иммобилизованного белка с фосфолипидами возможно образование мицелл на матрице. Показана возможность использования апоЛВП/ФХ-сефарозы для изменения липидного состава плазмы крови человека.

Аполипопротеины ЛВП образуют мицеллярные комплексы с фосфолипидами, состав и стабильность которых зависят от природы компонентов, их соотношения и способов комплексообразования. Стехиометрический состав комплексов аполипопротеина апоА1 с фосфатидилхолинами (природными и синтетическими), полученных методом холатного диализа, приведен в обзоре [1]. Наши предыдущие работы по исследованию взаимодействия апоА1 с ДМФХ [2–4] позволили охарактеризовать комплексы различной стехиометрии, а также показали возможность комплексообразования ДМФХ с ковалентно связанным димером апоА1 [2].

Цель данной работы — получение фосфолипидных мицелл, иммобилизованных на водонерастворимом носителе (модифицированной апоЛВП-сефарозе). В работе использованы фосфатидилхолин яичного желтка (ЯФХ) и полиненасыщенные фосфолипиды соевых бобов (так называемые эссенциальные фосфолипиды (ЭФХ) из препаратов Essentiale и Lipostabil), поскольку эти фосфолипиды совместимы с фосфолипидами человеческого организма [5]. Комплексы апоА1 и апоЛВП с ЯФХ, получаемые методом холатного диализа, детально исследованы [6–10], комплексы апоА1 с дилинолеилфосфатидилхолином и диарахидоноилфосфатидилхолином также известны [1, 11], однако условия их приготовления подробно не описаны.

Для получения апоЛВП-сефарозы использовалась стандартная процедура связывания белков с сефарозой, активированной бромцианом [12]. В процессе работы были проведены опыты по иммобилизации на активированной сефарозе природных ЛВП, суммарных белков апоЛВП, апоА1 и комплексов апоА1/ЯФХ и апоЛВП/ЯФХ. В опытах исследовалось количество белка, ковалентно связанное с 1 см³ сефарозы (апоЛВП/ЯФХ-сефароза-1), и количество ЯФХ, сорбированное 1 см³ сефарозы, после обработки бифункциональным реагентом диметилсубе-

Используемые сокращения: апоА1 — аполипопротеин А1; ЛВП — липопротеины высокой плотности; ФХ — фосфатидилхолин; ДМФХ — 1,2-димаристоил-*L*- α -фосфатидилхолин; ЯФХ — фосфатидилхолин яичного желтка; ЭФХ — «эссенциальный» фосфатидилхолин из бобов сои; ДМС — диметилсуберимидат.

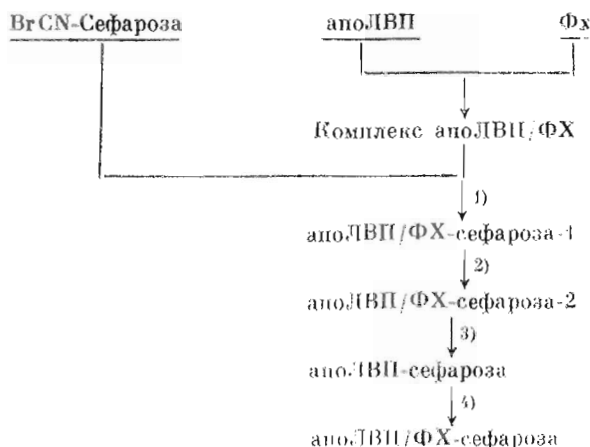


Схема получения и использования фосфолипидных мицелл, иммобилизованных на apo-LVPI-сефарозе. 1) Инкубация при pH 9,5 и 0–4° С. 2) обработка ДМС. 3) элюирование ФХ, 4) инкубация с мицеллярным раствором ФХ/детергент и последующий диализ.

римидамом (ДМС), делипидирования, инкубации с мицеллярным раствором ЯФХ/дезоксихолата натрия, удаления дезоксихолата натрия и промывки сорбента (apo-LVPI/ЯФХ-сефароза-2). Воспроизводимые результаты были получены при иммобилизации комплексов apo-LVPI/ЯФХ (1 мг apo-LVPI/1,6 мг ЯФХ), полученных в присутствии этиленхлоргидрина [4, 13].

Комплекс apo-LVPI/ЯФХ инкубировали со свежеективированной сефарозой при pH 9,5 (6 ч, 0–4° С). Полученная apo-LVPI/ЯФХ-сефароза-1 содержала не менее 3,2 мг белка/см³. Для предотвращения диссоциации белка сорбент обрабатывали избытком ДМС в 0,05 М триэтанолмин-HCl-буфере, pH 9,7 [14]. После промывки содержание фосфолипидов в препарате apo-LVPI/ЯФХ-сефароза-2 составляло 1,6–2,2 мг/см³ сорбента, что было показано определением фосфолипидов [15] в экстракте, после обработки аликвоты сорбента смесью хлороформ – метанол (2:1, здесь и далее соотношения объемные).

Удаление фосфолипидов в условиях градиентного элюирования (см. «Экспериментальную часть») позволяло получить apo-LVPI-сефарозу, сохраняющую способность связывать фосфолипиды в мицеллярной форме. Инкубация с мицеллярными растворами ЯФХ – дезоксихолата натрия с последующим удалением детергента диализом при 4° С позволяла получить сорбент, содержащий до 7 мг ЯФХ на 1 см³ набухшей сефарозы (1,6 мг ЯФХ/мг иммобилизованного белка). Проведение операций при 20° С заметно снижало содержание ЯФХ. Это согласуется с известным фактом, что для фосфатидилхолинов образование стабильных комплексов с аполипопротеинами зависит от температуры [1].

Для иммобилизации ЭФХ на apo-LVPI-сефарозе предварительно было изучено образование комплексов ЭФХ/apo-LVPI при удалении дезоксихолата, содержащегося в препарате Lipostabil, с помощью сорбента Bio-Beads SM-2 [16].

Инкубация apo-LVPI с препаратом Lipostabil с последующим удалением детергента приводила к гетерогенной смеси продуктов, в составе которой методом неденатурирующего гель-электрофореза идентифицированы комплексы различного размера, а также делипидированный apoA1 (рис. 1а). Данные электронной микроскопии (не приведены) свидетельствуют о наличии крупных ламеллярных агрегатов, лишенных опреде-

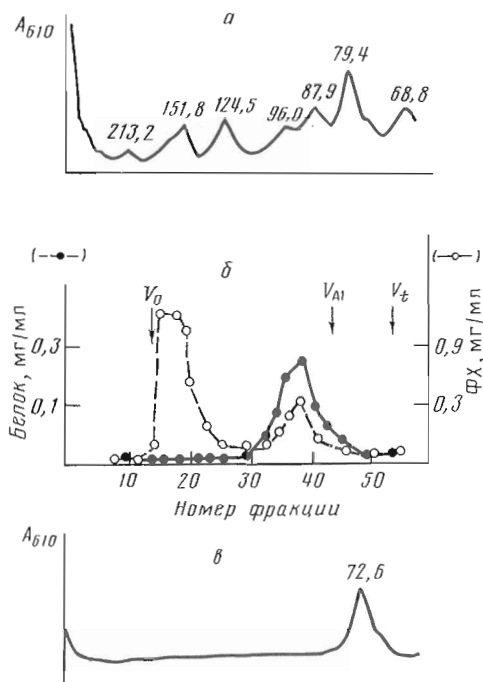


Рис. 1. Получение комплексов апоЛВП/ЭФХ с использованием препарата Lipostabil (см. «Экспер. часть»): а — электрофоретическая картина комплекса после удаления дезоксихолата, приведенные цифры соответствуют диаметру Стокса (λ) для плоского диска [17]; б — геле-хроматография комплекса после диализа: $\circ$ — электрофоретическая картина комплекса, выделенного геле-хроматографией (фракции 32–40)

ленной формы, а также присутствию дискообразных частиц, размеры которых в силу гетерогенности статистически достоверно не определялись. Гель-хроматография комплексов (рис. 1б), проводимая при -15°C , позволила выделить гомогенную, по данным неденатурирующего градиентного гель-электрофореза, фракцию частиц с соотношением ЭФХ/белок, равным 0,6 (мг/мг, рис. 1в). Попытки выделить комплекс при более высоких температурах хроматографии приводили к снижению его выхода и содержания ЭФХ во фракции комплекса.

Взаимодействие апоЛВП-сефарозы с препаратом Lipostabil при низких температурах в присутствии концентрированных растворов хлористого натрия и ступенчатого диализа (см. «Экспериментальная часть») дало апоЛВП/ЭФХ-сефарозу, содержащую 1,3 мг ЭФХ/мг иммобилизованного белка.

Последовательное проведение делипидирования апоЛВП/ФХ-сефарозы и насыщения апоЛВП-сефарозы фосфатидилхолином не изменяло максимальное связывание фосфатидилхолинов (три образца сорбента последовательно подвергали такой обработке 6 раз).

Специфическое связывание фосфатидилхолинов с апоЛВП-сефарозой с образованием белок-фосфолипидных мицелл продемонстрировано в простом эксперименте: апоЛВП/ФХ-сефароза (где ФХ — ЯФХ или ЭФХ в количестве 1,6 и 1,3 мг/мг иммобилизованного белка соответственно) и необработанная сефароза смешивались в соотношениях 5:0; 4:1; 3:2; 2:3; 1:4; 0:5, каждая смесь делипидировалась, а затем насыщалась соответственно ЯФХ или ЭФХ в дезоксихолате натрия. После удаления

Содержание липидов основных классов в образцах плазмы крови человека при взаимодействии с апоЛВП/ЯФХ-сефарозой *

Образец	Концентрация, мг/дл		
	холестерин	триглицериды	фосфолипиды
(I) а	200	221	213
	б	175	303
(II) а	242	217	445
	б	181	413
(III) а	181	194	344
	б	183	365
(IV) а	161	98	440
	б	80	435

* Стандартная ошибка в измерении концентрации холестерина и фосфолипидов ± 5 мг/дл, триглицеридов — ± 10 мг/дл. а — значения для образца исходной плазмы, б — для того же образца после инкубации с апоЛВП/ЯФХ-сефарозой.

детергента образцы делипидировались. Содержание фосфатидилхолина было пропорционально содержанию иммобилизованного белка, а не общему объему сефарозы (рис. 2).

Предварительные опыты показали, что 4-часовая инкубация полученных сорбентов с образцами плазмы крови человека заметно снижает общий холестерин плазмы и незначительно триглицериды (таблица и рис. 3). На рис. 3 приведена зависимость изменения концентрации липидов в образцах плазмы от времени инкубации. (О влиянии апоЛВП/ЯФХ-сефарозы на фосфолипидный состав плазмы и на процессы обмена фосфолипидов см. в следующем сообщении.)

Экспериментальная часть

Липопротеины высокой плотности (ЛВП) выделяли из плазмы здоровых доноров как описано ранее [18]. апоЛВП получали делипидированием ЛВП смесью хлороформ — метанол, 2:1 [2]. Содержание апоА1 составляло 85—90%, по данным электрофореза в додецилсульфате натрия [19], минорные компоненты — апоАII, сывороточный альбумин и апоЕ.

В работе использованы диметилсуберимидат, трис-HCl, куассия яркосиний G-250 (Sigma); сефароза CL-4B и набор стандартных белков (electrophoresis calibration kit) (Pharmacia); триэтаноламин (Koch-Light), сорбент Bio Beads SM-2 (Bio-Rad). ЯФХ (Merck) очищен хроматографией на силикагеле с использованием линейного градиента хлороформ — метанол (1:4—3:2). Препарат Lipostabil предоставлен фирмой Nattermann.

Концентрацию белка определяли по методу [20], концентрацию фосфолипидов — по липидному фосфору [15]. Неденатурирующий градиентный электрофорез проводили в пластинах с концентрацией полиакриламидного геля 4—30% по методу [17].

Комплексы апоЛВП с ЯФХ получали как описано ранее [4, 13] при 0—4° С.

Комплекс апоЛВП/ЯФХ. апоЛВП (30 мг) в 50 мл буфера (0,01 М трис-HCl, 0,05 М NaCl, pH 7,4) смешивали с одной ампулой (5 мл) препарата Lipostabil, содержащей 250 мг ЯФХ в растворе дезоксихолата натрия, смесь инкубировали 30 мин при 20° С, добавляли 3 мг Bio-Beads

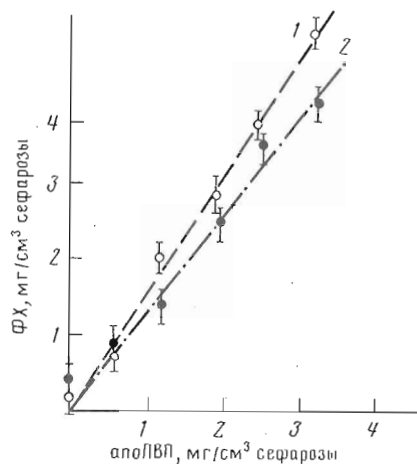


Рис. 2. Зависимость содержания фосфатидилхолинов в препаратах апоЛВП/ЯФХ-сефарозы (1) и апоЛВП/ЭФХ-сефарозы (2) от количества иммобилизованного апоЛВП на сефарозной матрице

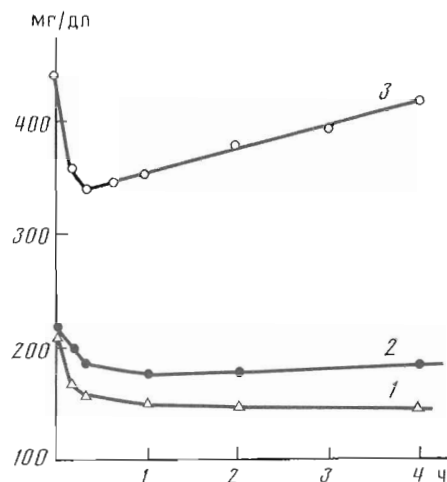


Рис. 3. Изменение содержания общего холестерина (1), триглицеридов (2) и фосфолипидов (3) в образце плазмы 2 при инкубации с апоЛВП/ЯФХ-сефарозой. Зависимости для образцов 1, 3 и 4 качественно совпадают с приведенными на рисунке

SM-2 (Bio-Rad), перемешивали на магнитной мешалке до полного удаления дезоксихолата. Полноту удаления последнего в модельном эксперименте контролировали по содержанию [^{14}C]дезоксихолата. Сорбент удаляли фильтрованием. Полученную смесь анализировали электрофорезом в градиентном геле ([17], рис. 1). Аликвоту (2 мл смеси) наносили на колонку (1,6×90 см) с сефарозой CL-4В, уравновешенной 5 М раствором NaCl. Хроматографию проводили в 5 М растворе NaCl при -15°C со скоростью 20 мл/ч, собирая фракции объемом 2 мл (рис. 1б). NaCl удаляли ступенчатым диализом (4×2 л) при постепенном повышении температуры (от -15 до 20°C), доводя концентрацию NaCl до 0,15 М. Фракции анализировали на содержание белка, липидного фосфора, а также характеризовали электрофоретически (рис. 1в).

Получение апоЛВП/ЯФХ-сефарозы-1 и апоЛВП/ЯФХ-сефарозы-2. Сефарозу CL-4В (100 мл) активировали бромцианом по стандартной процедуре [12], к сорбенту добавляли приготовленный комплекс апоЛВП/ЯФХ (1000 мг апоЛВП) и перемешивали 6 ч при 4°C в буфере, содержащем 0,05 М раствор Na_2CO_3 (pH 9,5), контролируя содержание белка в супернатанте. Полученную апоЛВП/ЯФХ-сефарозу-1 промывали водой (5×200 мл), переводили в 0,1 М триэтаноламин-HCl-буфер, pH 9,7 [14], добавляли 1,5 г ДМС, перемешивали 4 ч. Сорбент отделяли фильтрованием и суспендировали в 2 М растворе NH_4OH , перемешивали 2 ч и переводили в требуемый буфер. Содержание ЯФХ в полученной апоЛВП/ЯФХ-сефарозе-2 составляло 1,6–2,2 мг на 1 см³ сорбента.

Получение апоЛВП-сефарозы и апоЛВП/ЯФХ-сефарозы. апоЛВП/ЯФХ-сефарозу-2 (30 см³), уравновешенную буфером (0,05 М трис-HCl, 0,15 М NaCl, pH 7,4), помещали в стеклянную колонку и для элюирования липидов промывали градиентом буфер/метанол (100 мл), линейным градиентом метанол/метанол-хлороформ, 1:1 (100 мл), контролируя содержание липидов в элюируемых фракциях, после чего делипидированный сорбент (апоЛВП-сефароза) переводили в буфер, промывая растворителем в обратном порядке.

Для получения апоЛВП/ЯФХ-сефарозы апоЛВП-сефарозу (30 см³) инкубировали 4 ч с мицеллярным раствором ЯФХ (750 мг) и дезоксихолата натрия (1500 мг) в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 8,3, при 4° С. Раствор декантировали, сорбент диализовали 48 ч при 4° С против буфера (3×2 л), затем сорбент промывали тем же буфером до отсутствия в элюате аниона дезоксихолата и отрицательного анализа на липидный фосфор.

Для получения апоЛВП/ЭФХ-сефарозы апоЛВП-сефарозу (30 см³) инкубировали 4 ч в 5 М NaCl с пятью ампулами препарата *Lipostabil* при -15° С, супернатант удаляли, сорбент последовательно диализовали 72 ч против 5 М раствора NaCl при -15° С, 2 М раствора NaCl при -5° С, затем против 0,15 М раствора NaCl при той же температуре.

Взаимодействие апоЛВП/ЯФХ-сефарозы с образцом плазмы. 2 см³ апоЛВП/ЯФХ-сефарозы (3,2 мг апоЛВП, 5,2 мг ЯФХ на 1 см³), уравновешенной физиологическим раствором, переносили в стерилизованную мерную пробирку, снабженную специальной пробкой с сифоном и вводом инертного газа. Током азота надосадочный раствор удаляли через сифон, затем, создавая разрежение, через сифон вводили свежую плазму до общего объема в пробирке 6 мл. Пробирку помещали в термостатируемую при 37° С ячейку инкубатора Еваро-Мих (Buchler). Пробы для анализа (200 мкл) отбирали в стерильных условиях через сифон. Аликвоты анализировали на содержание общего холестерина [21], фосфолипидов [15], триглицеридов [22]. Определяемые экспериментально значения концентраций холестерина, триглицеридов и фосфолипидов (мг/дл) умножали на коэффициент 1,33, соответствующий изменению концентраций в плазме, обусловленному добавлением сорбента.

Каждый образец плазмы исследовали в трех независимых опытах, каждое определение концентрации липидов проводили при анализе трех алиquot.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jonas A. // J. Lipid Res. 1986. V. 27. № 7. P. 689-698.
- Мишарин А. Ю., Медведева Н. В., Бушмакина Н. Г., Антонов И. В., Бушueva Т. Л. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1551-1556.
- Мишарин А. Ю., Замаева Н. Ю., Антонов И. В., Бушмакина Н. Г., Медведева Н. В., Морозкин А. Д. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 6. С. 773-780.
- Мишарин А. Ю., Замаева Н. Ю., Медведева Н. В., Бушueva Т. Л. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 1. С. 53-59.
- Blaton V., Soelewey F., Vandamme P., Declerck B., Peeters H. // Artery. 1976. V. 2. № 4. P. 309-325.
- Atkinson D., Smith H. M., Dickson J., Austin J. P. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 64. № 2. P. 541-547.
- Matz C. E., Jonas A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 8. P. 4535-4540.
- Pownall H. J., Van Winkle W. B., Pao Q., Rhode M., Gotto A. M. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 713. № 3. P. 494-503.
- Nichols A. V., Gong E. L., Blanche P. J., Forte T. M. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 750. № 2. P. 353-364.
- Jonas A., Sweeney S. A., Herbert P. N. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 10. P. 6369-6375.
- Koizumi J., Kano M., Okabayashi K., Jadhav A., Thompson G. R. // J. Lipid Res. 1988. V. 29. № 11. P. 1405-1414.
- Porath J., Azen R., Ernback S. // Nature. 1967. V. 215. № 5127. P. 1491-1492.
- Antonov I. V., Medvedeva N. V., Misharin A. Yu., Morozkin A. D., Runge E. K. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 835. № 1. P. 50-57.
- Swaney J. B., O'Brien K. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 19. P. 7069-7077.
- Vaskovsky V. E., Kostetsky E. V., Vasendin I. M. // J. Chromatogr. 1975. V. 114. № 2. P. 129-141.
- Bonomo E. A., Swaney J. B. // J. Lipid Res. 1988. V. 29. № 3. P. 380-384.
- Blanche P. J., Gong E. L., Forte T. M., Nichols A. V. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 665. № 3. P. 408-419.

18. *Lindgren F. T.* // *Preparative Ultracentrifugation Laboratory Procedures and Suggestion for Lipoprotein Analysis*/Ed. Perkin E. C. Amer. Oil Chemists Soc., 1975. P. 204-224.
19. *Laemmli U. K.* // *Nature*. 1970. V. 222. № 5194. P. 680.
20. *Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Folbert N. E.* // *Analyt. Biochem.* 1978. V. 87. № 1. P. 206-209.
21. *Abell L. L., Brodie B. B., Kendall F. E.* // *J. Biol. Chem.* 1952. V. 195. № 2. P. 356-366.
22. *Bucolo G., David H.* // *Clin. Chem.* 1973. V. 19. № 3. P. 476-482.

Поступила в редакцию
18.III.1992

I. V. ANTONOV, N. Yu. ZAMAEVA, N. V. MEDVEDEVA, A. Yu. MISHARIN
IMMOBILIZATION OF PHOSPHOLIPID MICELLES ON THE MODIFIED
apoHDL-SEPHAROSE

*Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center, Russian Academy of
Medical Sciences, Moscow*

There was developed a procedure for immobilization of phosphatidyl cholines (Egg yolk phosphatidyl choline and polyunsaturated soya beans phosphatidyl choline) on the modified apoHDL-Sepharose. The formation of phospholipid micelles was proved by linear dependence of the content of the sorbed phosphatidyl choline versus, the content of apoHDL bound to Sepharose. Incubation of apoHDL/PC-Sepharose with human plasma was shown to change the plasma lipid composition. The apoHDL/PC-Sepharose might be used for correction of the plasma lipid composition on vitro experiments.