



УДК 577.352.27.088.3

© 1992 г. Н. Ю. Замеева, Н. В. Антонов, А. Ю. Мишарин

ОБМЕН ФОСФАТИДИЛХОЛИНА В МОДЕЛЬНЫХ
ЛИПОПРОТЕИНАХ. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОСФОЛИПИДНЫХ
МИЦЕЛЛ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА аПОЛВП-СЕФАРОЗЕ

Институт экспериментальной кардиологии КНЦ РАМН, Москва

Исследована кинетика обмена фосфатидилхолина (ФХ) между мицеллярными комплексами аПОЛВП/ФХ в растворе и теми же комплексами, иммобилизованными на сефарозе. Обмен фосфатидилхолина в буфере описывается кинетикой обратимой реакции первого порядка по концентрации фосфатидилхолина. Константы скоростей выхода фосфатидилхолина из аПОЛВП/ФХ-сефарозы (k_1) и из комплекса аПОЛВП/ФХ (k_2) составляют $(0.45 \pm 0.20) \cdot 10^{-3}$ и $(1.35 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹ соответственно. Зависимость значений k_1 от температуры в интервале 278–323 К линейна. Сывороточные белки плазмы ускоряют выход фосфатидилхолина из аПОЛВП/ФХ-сефарозы и являются дополнительным акцентором ФХ. Обсуждается возможность использования аПОЛВП/ФХ-сефарозы для направленного изменения фосфолипидного состава плазмы в эксперименте.

Метаболизм липопротеинов высокой плотности (ЛВП) в плазме крови и структурные изменения этих частиц, происходящие при взаимодействии с поверхностью клеток, неразрывно связаны с процессами обмена холестерина и фосфолипидов [1–4]. Исследования взаимодействия природных или модельных ЛВП с источниками фосфолипидов — липосомами или липопротеинами других классов — показали, что в зависимости от условий возможны процессы обмена фосфолипидов, как сопровождающиеся, так и не сопровождающиеся изменением стехиометрического состава мицеллы. Кинетика обмена достаточно сложна, особенно в присутствии поверхностно-активных соединений (некоторых белков плазмы или детергентов) [5–8].

Ранее [9] мы показали, что рекомбинация мицеллярных комплексов аполинопротеинов с фосфолипидами представляет собой кинетически сложный процесс, причем скорость его определяется скоростью обмена фосфолипидов между мицеллярными комплексами. В настоящей работе проводится изучение кинетики этого обмена. Ниже описан простой метод, основанный на распределении радиоактивно меченого фосфатидилхолина (ФХ*) между комплексами аПОЛВП/ФХ, находящимися в растворе, и теми же комплексами, иммобилизованными на сефарозной матрице (аПОЛВП/ФХ-сефароза). В работе также сделана попытка использовать обменные процессы для направленного изменения фосфолипидов в модельных ЛВП.

Мицеллярные комплексы аПОЛВП/ФХ и аПОЛВП/ФХ-сефароза получены как описано нами ранее [9–11]. ФХ* вводили в состав растворенного или иммобилизованного комплекса. Измерение общей или удельной радиоактивности ФХ* в двух фазах (растворе и геле) позволяет использовать уравнения формальной кинетики для описания обмена фосфоли-

Используемые сокращения: ЛВП — липопротеины высокой плотности; ФХ — фосфатидилхолин; ФХ* — [¹⁴C]фосфатидилхолин; ККМ — критическая концентрация мицеллообразования.

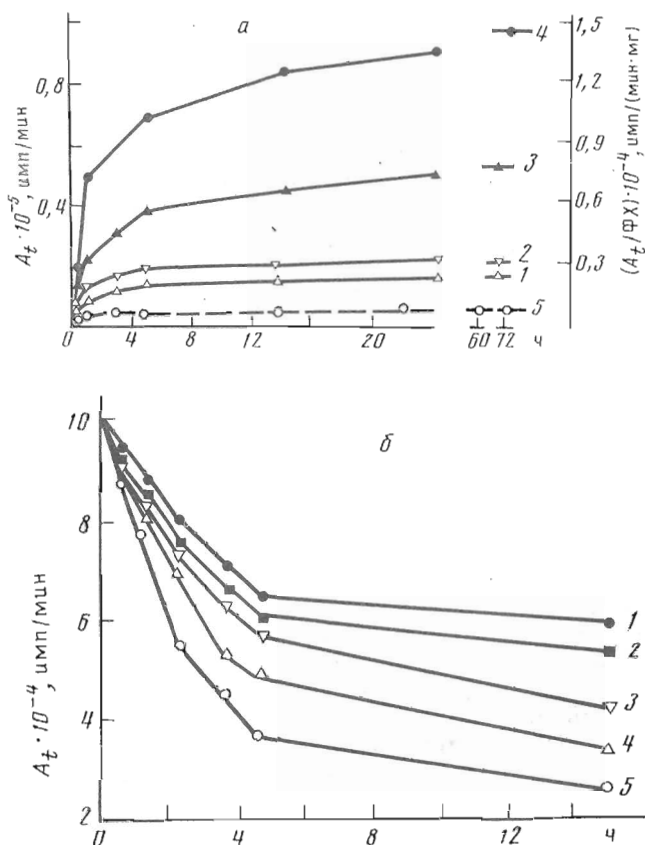


Рис. 1. Зависимость общего содержания ФХ* в растворе от времени инкубации. а — инкубация апоЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозы с комплексом апоЛВП/ФХ. Содержание ФХ (мг) в составе комплекса в инкубационной смеси: 1 — 0,64; 2 — 1,6; 3 — 6,4; 4 — 9,6; 5 — 0. б — инкубация апоЛВП/ФХ-сефарозы с комплексом апоЛВП/ФХ/ФХ* в отсутствие комплекса апоЛВП/ФХ (1); в присутствии комплекса апоЛВП/ФХ с содержанием ФХ 0,75 (2), 1,5 (3), 3,75 (4), 6,0 мг (5)

пидов в липидно-белковых мицеллах. На рис. 1а показано изменение содержания ФХ* в растворе при инкубации апоЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозы с комплексом апоЛВП/ФХ, на рис. 1б — изменение содержания ФХ* в растворе при инкубации комплекса апоЛВП/ФХ/ФХ* с апоЛВП/ФХ-сефарозой. Отношения апоЛВП : ФХ в растворенном и иммобилизованном комплексе были выбраны равными и составляли 1:1,6 (мг белка/мг ФХ). Инкубацию проводили при 20°С при начальных соотношениях ФХ раствора/ФХ геля, равных 5:1; 3,5:1; 0,9:1; 0,35:1.

Из рис. 1а и 1б видно, что кривые, выражающие распределение ФХ* между раствором и гелем, имеют насыщаемый характер. Определение концентрации фосфатидилхолина в растворе показало, что в условиях эксперимента количество фосфолипидов в растворе и геле оставалось неизменным. Удельная активность ФХ в растворе и геле выравнивалась через 60–72 ч. Следовательно, наблюдаемый переход ФХ* между двумя фазами можно представить как обратимый процесс.

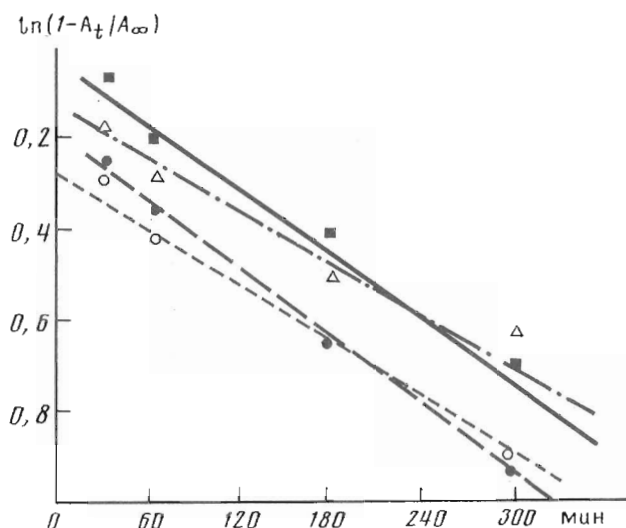


Рис. 2. Сумма констант $(k_1 + k_2)$ скоростей обмена ФХ^* между апоЛВП/ФХ-сефарозой и комплексом апоЛВП/ФХ в буфере. Значения A_t и A_∞ и обозначения кривых соответствуют рис. 1а

Зависимость скоростей перехода ФХ^* в полулогарифмических координатах (рис. 2) линейна, что указывает на возможность описания обмена фосфатидилхолина в рамках обратимой реакции первого порядка [12]. Ввиду низкой ККМ фосфатидилхолина можно считать, что весь фосфатидилхолин входит в состав комплексов, и, согласно [13], концентрацию обменивающегося фосфатидилхолина можно выражать через удельную активность ФХ^* или отношение ФХ^* (имп/мин)/ФХ (ммоль или мг) в каждой из фаз.

Сумма констант скорости первого порядка $(k_1 + k_2)$ для выхода фосфатидилхолина из апоЛВП/ФХ-сефарозы и комплекса апоЛВП/ФХ определялась графически из рис. 2 или формулы

$$(k_1 + k_2)t = -\ln(1 - A_t/A_\infty). \quad (1)$$

При достижении равновесия распределения ФХ^* между фазами:

$$k_1 \frac{(A_0 - A_\infty)}{\text{ФХ}_c} = k_2 \frac{A_\infty}{\text{ФХ}_p}, \quad (2)$$

где A_0 — количество ФХ^* (имп/мин) в апоЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозе в момент времени $t=0$; A_t — количество ФХ^* (имп/мин), выпущенное в раствор за время t ; A_∞ — количество ФХ^* (имп/мин), выпущенное в раствор при достижении равновесного распределения ФХ между раствором и гелем; ФХ_c и ФХ_p — количества фосфатидилхолина (мг) в составе апоЛВП/ФХ-сефарозы и в растворе; k_1 — константа скорости первого порядка выхода фосфатидилхолина из апоЛВП/ФХ-сефарозы; k_2 — константа скорости первого порядка выхода фосфатидилхолина из комплекса апоЛВП/ФХ.

Рассчитанные значения составили для k_1 $(0,45 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$, для k_2 — $(1,35 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$.

Полученное значение k_2 близко к найденной в работе [14] константе скорости переноса ФХ из комплекса апоЛ1/ФХ к ФХ-везикулам. По-видимому, наблюдаемые различия в значениях k_1 и k_2 определяются эффектами иммобилизации, а также наличием межбелковых «сшивок», присут-

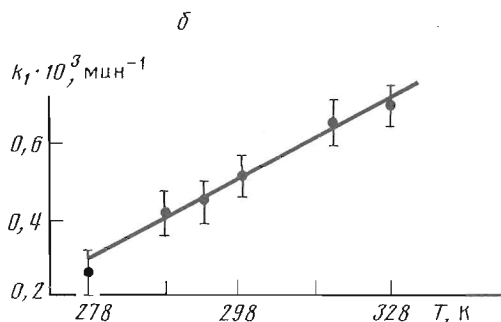
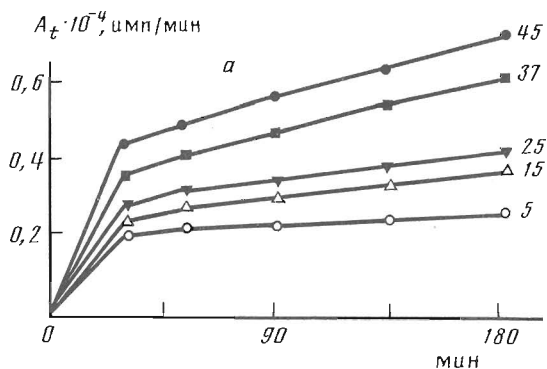


Рис. 3. Зависимость общего содержания ФХ^* (имп/мин) в растворе (а) и кажущихся значений k_1 (б) от температуры инкубации (на рис. а цифры справа — t , $^{\circ}\text{C}$) апоЛВП/ ФХ / ФХ^* -сефарозы с комплексом апоЛВП/ ФХ

ствующих в апоЛВП/ ФХ -сефарозе и влияющих на подвижность фосфатидилхолина [10] в составе таких мицеллярных комплексов.

Выход ФХ^* из апоЛВП/ ФХ / ФХ^* -сефарозы в раствор при различных температурах представлен на рис. 3а. Замечено, что инкубация при температуре выше 25°C приводит к увеличению концентрации фосфатидилхолина в растворе, что, очевидно, определяется диссоциацией иммобилизованных мицелл. Поскольку при малых временах инкубации и высокой концентрации ФХ в растворе скорость обратного процесса (сорбции ФХ^* апоЛВП/ ФХ -сефарозой) низка, кажущаяся скорость выхода ФХ^* в раствор (рис. 3а) и начальная скорость одностороннего выхода ФХ^* в раствор, равная $k_1 \cdot A_0 / \text{ФХ}_{\text{с.о.}}$, близки. Кажущиеся значения k_1 линейно зависели от температуры (рис. 3б).

Выход ФХ^* из апоЛВП/ ФХ / ФХ^* -сефарозы в раствор, содержащий компоненты плазмы, зависит от состава инкубационной смеси. Во-первых, апоЛВП/ ФХ -сефароза, будучи гидрофобным сорбентом, способна быстро связывать целые частицы липопротеинов, что должно приводить к резкому изменению концентрации ФХ как в растворе, так и в геле. Во-вторых, на скорость обмена ФХ должен влиять липопротеиновый состав плазмы, поскольку различие в структуре поверхностного слоя липопротеинов определяет значение k_2 . И наконец, присутствие в плазме белков, катализирующих обмен липидами между липопротеинами разных классов [5–8], также способно влиять на скорости обмена ФХ^* между мицеллярными комплексами в растворе и апоЛВП/ ФХ -сефарозой.

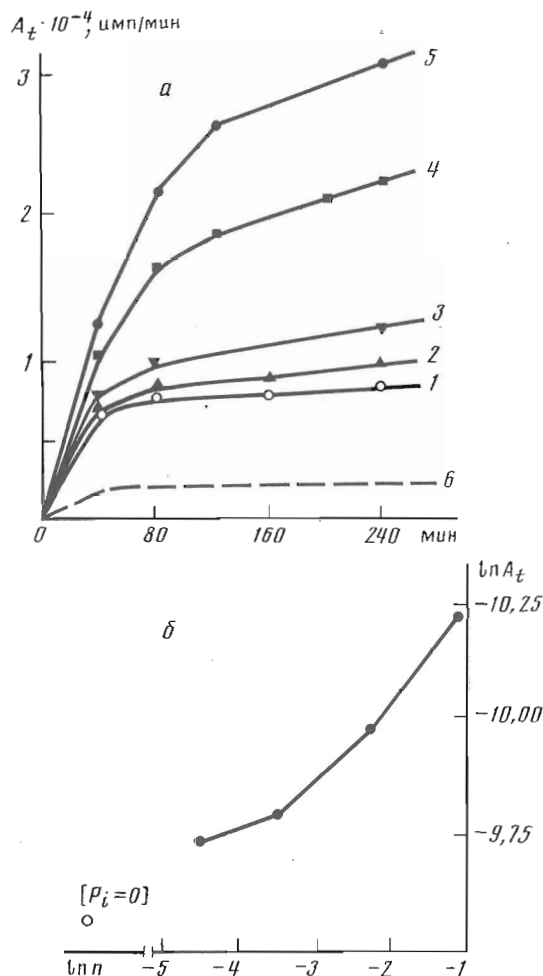


Рис. 4. Зависимость общего содержания FX^* (имп/мин) в растворе от времени инкубации апоЛВП/ FX/FX^* -сефарозы с комплексом апоЛВП/ FX при 37°C в присутствии белков сыворотки с концентрацией белка в растворе 4,1 (1), 0,6 (2), 1,8 (3), 6,0 (4), 18,0 (5), 0 (6) (а) и зависимость начальной скорости выхода FX^* от концентрации сывороточных белков в инкубационной смеси (б)

Влияние компонентов плазмы на скорость выхода FX^* из апоЛВП/ FX/FX^* -сефарозы исследовалось в двух экспериментах: в одном определяли накопление FX^* в растворе, содержащем комплекс апоЛВП/ FX и белки сыворотки в различных концентрациях (рис. 4а, б), в другом апоЛВП/ FX/FX^* -сефарозу инкубировали с целой плазмой, в которой параллельно определяли содержание FX и FX^* (рис. 5).

Из рис. 4а видно, что белки сыворотки являются дополнительными акцепторами FX и увеличивают кажущуюся скорость выхода FX^* в раствор. Зависимость, представленная на рис. 4б, указывает, что концентрация сывороточных белков входит в кинетическое уравнение для скорости выхода FX^* из апоЛВП/ FX/FX^* -сефарозы. В самом деле, для скорости выхода FX^* , имеющей первый порядок по концентрации FX и n -й порядок по концентрации сывороточного белка, справедливо выражение [12]

$$\ln v_i = \ln k_{\text{эф}} + \ln [\text{FX}] + n \ln [P_i], \quad (3)$$

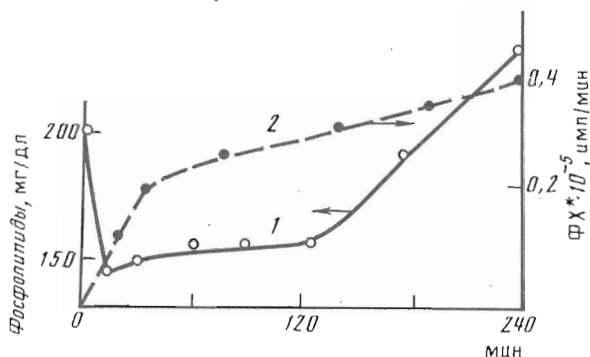


Рис. 5. Изменение концентрации ФХ (1) и ФХ* (2) в плазме при инкубации с апЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозой

где $k_{\text{эф}}$ — кажущееся значение k ; $[ФХ]$ и $[P]$ — концентрация фосфатидилхолина и белка; индекс i соответствует отношению содержания сывороточных белков в опыте по сравнению с содержанием их в целой плазме. Поскольку в опыте использовалась одна сыворотка с различным разведением, значения $[P]$ составляли $[0,01P]$, $[0,03P]$, $[0,1P]$ и $[0,3P]$. После элементарных преобразований из выражения (3) следует

$$\ln v_i = B + n \ln [i], \quad (4)$$

где B — постоянная, не зависящая от разведения сыворотки в данном опыте; i — отношение концентраций в опыте по сравнению с концентрацией белка в целой плазме.

Разумеется, система настолько сложна, что приведенные опыты лишь указывают на зависимость выхода фосфатидилхолина из иммобилизованных фосфолипидных мицелл от присутствия белков плазмы, но не дают возможности судить о механизмах этого процесса.

На рис. 5 показано изменение содержания фосфолипидов при инкубации апЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозы с образцом целой плазмы человека. Исходные количества ФХ в составе апЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозы и плазме брались одинаковыми. Из рис. 5 видно, что при инкубации происходит быстрое связывание ФХ плазмы с сефарозой, а затем — медленный процесс увеличения концентрации ФХ в среде, обусловленный обменом ФХ между фазой геля и раствором.

Представленные в данном сообщении кинетические данные могут быть положены в основу направленной коррекции липидного состава плазмы по принципу лигандообменной хроматографии. При помощи такого подхода возможно не только изменять концентрацию фосфолипидов в плазме, но и вводить в плазму ненасыщенные фосфолипиды, удалять липофильные токсические продукты, влиять на липопротеиновый спектр плазмы.

Экспериментальная часть

Получение ЛВП, апЛВП, комплексов апЛВП/ФХ проводили, как описано нами ранее [9–11]. Свежую плазму крови здоровых доноров получали с пункта переливания крови КНЦ. Липопротеиндефицитную сыворотку получали стандартным методом [15], после диализа против физиологического раствора концентрацию сывороточных белков доводили до 60 мг/мл физиологическим раствором. Концентрация фосфатидилхолина в полученной сыворотке не превышала 120 мкг/мл. Концентрацию белка определяли по методу [16], концентрацию фосфолипидов — по липидному

фосфору [17], радиоактивность измеряли на приборе фирмы Трасог в сцинтилляторе ЖС-8 (Союзреактив).

Методы получения апоЛВП-сефарозы и условия иммобилизации ФХ в мицеллярной форме на этом сорбенте представлены в предыдущем сообщении [11]. Комплексы апоЛВП/ФХ/ФХ* и апоЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозы получали аналогично, с добавлением дипальмитоилфосфатидил- ^{14}C холина фирмы Amersham (59 мкКи/моль).

Для измерения скорости выхода ФХ* из апоЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозы $0,25 \text{ см}^3$ апоЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозы (содержащей 4,1 мг апоЛВП, 7,0 мг ФХ и $8,7 \cdot 10^5$ имп/мин ФХ* на 1 см^3 сорбента) смешивали с рассчитанным количеством раствора комплекса апоЛВП/ФХ (4,0 мг апоЛВП, 6,4 мг ФХ в 1 мл апоЛВП) в трис-НСI-буфере, pH 7,4, содержащем $0,15 \text{ M NaCl}$, доводили объем буфером до 2,5 мл и инкубировали при перемешивании, отбирая по 50 мкл супернатанта через 0,5, 1, 3, 5, 14, 22, 60 и 72 ч для измерения радиоактивности.

Количество ФХ*, вышедшего в раствор за время t , рассчитывали по формуле

$$A_t = a_n \cdot V/v_n + \sum_{n=1} a_n$$

где A_t — активность ФХ*, вышедшая в раствор за время t ; a_n — радиоактивность аликвоты (имп/мин), V — объем инкубационной смеси после отбора $n-1$ -й аликвоты; v_n — объем аликвоты; $\sum_{n=1} a_n$ — суммарная радио-

активность всех отобранных ранее аликвот. Удельную активность ФХ*, вышедшего в раствор за время t , измеряли, проводя независимое определение липидного фосфора в 100-мкл аликвоте. Каждый эксперимент проводили в трех независимых повторях.

Для определения скоростей сорбции апоЛВП/ФХ-сефарозой ФХ* из комплекса апоЛВП/ФХ/ФХ* к $0,25 \text{ см}^3$ апоЛВП/ФХ-сефарозы (3,8 мг апоЛВП, 6,2 мг ФХ на 1 мл сорбента) добавляли $0,25 \text{ мл}$ комплекса апоЛВП/ФХ/ФХ* (1 мг апоЛВП, 1,6 мг ФХ, $3,91 \cdot 10^5$ имп/мин в 1 мл), рассчитанное количество комплекса апоЛВП/ФХ (1,9 мг апоЛВП; 3,0 мг ФХ в 1 мл), доведенное буфером до 2 мл, и инкубировали при перемешивании как указано выше.

Для графического определения констант k_1 и k_2 (рис. 2) использовали данные, рассчитанные из экспериментов, приведенных на рис. 1а, б.

Для определения зависимости выхода ФХ* от температуры $0,2 \text{ см}^3$ апоЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозы (3,0 мг апоЛВП; 5,0 мг ФХ; $1,66 \cdot 10^5$ имп/мин в 1 см^3) инкубировали 3 ч с 1 мл комплекса апоЛВП/ФХ (0,5 мг ФХ/мл) при 5, 10, 15, 20, 25, 37 и 45°C , измеряя скорость выхода ФХ в раствор как показано выше.

При определении температурной зависимости кажущихся значений k , из экспериментальных данных (рис. 4а) строили зависимость $\ln(A_0/\text{ФХ}_{c,0} - A_t/\text{ФХ}_{c,t})$ * от времени для каждой температуры и, после линеаризации по методу наименьших квадратов, кажущиеся значения k , вычисляли графически.

Для определения влияния сывороточных белков на обмен фосфолипидами между апоЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозой и комплексом апоЛВП/ФХ $0,3 \text{ см}^3$ апоЛВП/ФХ/ФХ*-сефарозы (3,7 мг апоЛВП; 6 мг ФХ; $4,0 \cdot 10^5$ имп/мин) инкубировали с 1,7 мл комплекса апоЛВП/ФХ (4,1 мг апоЛВП; 6,2 мг ФХ в 1 мл) при 37°C в буфере, содержащем свежевыделенную делипидированную плазму, разведенную физиологическим раствором. Со-

* $\text{ФХ}_{c,0}$ и $\text{ФХ}_{c,t}$ — количество ФХ в составе апоЛВП/ФХ-сефарозы в начальный момент времени и в момент времени t .

держание сывороточных белков в исходной плазме составляло 60 мг/мл, в опытах -- 0,6; 1,8; 6,0 и 18 мг/мл. Инкубацию проводили 4 ч, рассчитывая скорость выхода ФХ в раствор как показано выше.

Взаимодействие апоЛВП/ФХ/ФХ⁺-сепарозы с плазмой здорового донора проводилось в трех независимых экспериментах при 37°С в течение 4 ч. Условия проведения эксперимента описаны ранее в работе [11]. Использовалась апоЛВП/ФХ/ФХ⁺-сепароза, содержащая 3,2 мг апоЛВП, 5,2 мг ФХ, $1,66 \cdot 10^3$ ипм/мин на 1 см³ сорбента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eisenberg S. // J. Lipid Res. 1984. V. 25. № 10. P. 1017-1058.
2. Phillips M. C., Johnson W. J., Rothblat G. H. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 906. № 2. P. 223-276.
3. Roseman M. A., Thompson T. F. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 3. P. 438-444.
4. Massey J. B., Hickson D., She H. S., Sparrow J. T., Vio P. D., Gotto A. M., Pownall H. J. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 794. № 2. P. 274-280.
5. Zorich N. L., Kezdy K. E., Jonas A. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 919. № 2. P. 181-189.
6. Tall A. R. // J. Lipid Res. 1986. V. 27. № 4. P. 364-367.
7. Damen J., Dijkstra J., Regts J., Scherphof G. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 620. № 1. P. 90-99.
8. Tall A. R., Krumholz S., Olivecrona T., Deckelbaum B. J. // J. Lipid Res. 1985. V. 26. № 7. P. 842-851.
9. Мисарин А. Ю., Замалева Н. Ю., Медведова Н. В., Бушуева Т. Т. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. № 1. С. 53-59.
10. Мисарин А. Ю., Замалева Н. Ю., Антонов И. В., Бушмакина Н. Р., Медведова Н. В., Морозкин А. Д. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 6. С. 773-780.
11. Антонов И. В., Замалева Н. Ю., Медведова Н. В., Мисарин А. Ю. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. № 9. С. 1214-1220.
12. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. М.: Высш. шк., 1974.
13. McLean R., Phillips M. C. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 12. P. 2964-2969.
14. Jonas A., Kezdy K. E., Williams M. I., Rye K.-A. // J. Lipid Res. 1988. V. 29. № 10. P. 1349-1357.
15. Lindgren F. T., Jensen L. C., Hatch F. T. // Blood Lipids and Lipoproteins/Ed. Nelson G. V. J. N. Y.: Wiley, 1972. P. 181-274.
16. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Folbert N. E. // Analyt. Biochem. 1978. V. 87. № 1. P. 206-209.
17. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. V., Vasendin I. M. // J. Chromatogr. 1975. V. 114. № 1. P. 129-141.

Поступила в редакцию
18.11.1992

N. Yu. ZAMAEVA, I. V. ANTONOV, A. Yu. MISHARIN

PHOSPHATIDYL CHOLINE EXCHANGE IN MODEL LIPOPROTEINS. APPLICATION OF PHOSPHOLIPIDS MICELLES IMMOBILIZED ON apoHDL-SEPHAROSE

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

A phosphatidyl choline (PC) exchange between apoHDL/PC micellar complexes in solution and the same complexes immobilized on Sepharose was studied. The PC exchange in buffer was represented in terms of pseudo first order reversible process. The first order constants for the unidirectional efflux of PC from apoHDL/PC-Sepharose (k_1) and for the unidirectional influx of PC from apoHDL/PC complexes (k_2) were equal to $(0,45 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ and $(1,35 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, respectively. The k_1 values showed the Arrhenius dependence on the temperature within range 278-323 K. Plasma serum proteins facilitated the PC efflux from apoHDL/PC-Sepharose being additional acceptors of PC. These data allow use of apoHDL/PC-Sepharose for correcting lipid plasma composition in vitro.