БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 7 * № 9 * 1981

УДК 547.953.04:543.426

ИЗУЧЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ЛИПИД-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Маневич Е. М.

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

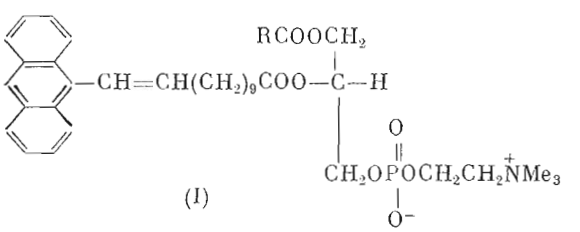
Герасимова Е. Н., Полесский В. А.

Всесоюзный кардиологический центр Академии медицинских наук СССР, Москва

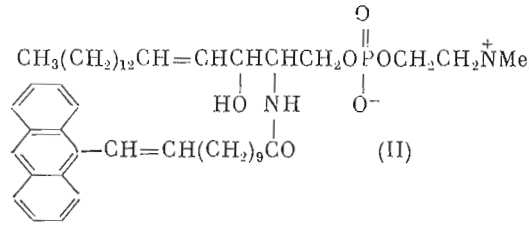
Проведено исследование молекулярной организации фосфолипидов в липопротеинах высокой плотности ($ЛВП_2$) плазмы человека с помощью липид-специфических зондов – флуоресцентных фосфатидилхолина и сфингомиелина,– которые по своим физико-химическим свойствам имитируют природные фосфолипиды и однозначно локализованы в полярной части липопротеиновой глобулы. Найдено, что фосфатидилхолин и сфингомиелин по-разному взаимодействуют с остатками триптофана аполипопротеинов и образуют раздельные пулы на поверхности липопротеина. Обнаружена корреляция параметров, характеризующих жидкость фосфолипидов и степень связывания сфингомиелина аполипопротеинами, с уровнем α-холестерина в крови.

Флуоресцентные методы неоднократно применялись при изучении липопротеинов высокой плотности (ЛВП), выделенных из плазмы крови [1–5]. Однако использовавшиеся до сих пор флуоресцентные зонды по своей природе резко отличались от компонентов липопротеиновых комплексов, нарушали их структуру и не локализовались однозначно в определенной области липопротеиновой глобулы, что затрудняло интерпретацию полученной информации.

Недавно нами был осуществлен синтез новых флуоресцентных зондов (I) и (II), представляющих собой модифицированные молекулы фосфатидилхолина и сфингомиелина [6, 7] – основных фосфолипидных компонентов липопротеинов. Было показано, что указанные зонды вносят лишь



(I)



(II)

незначительные возмущения в структуру фосфатидилхолиновых мембран и ориентированы в них подобно природным фосфолипидам, причем антрильная группа располагается в неполярной области бислоя [7].

В настоящей работе фосфатидилхолиновый (I) и сфингомиелиновый (II) зонды были использованы для изучения фракции 2 липопротеинов высокой плотности ($ЛВП_2$), выделенных из крови здоровых людей, различающихся по уровню α-холестерина, т. е. по содержанию холестерина в суммарных липопротеинах высокой плотности [8]. После введения в раствор $ЛВП_2$ флуоресцентных фосфолипидов (~1% суммы фосфолипидов $ЛВП_2$) информацию об их подвижности и локализации получали путем измерения поляризации флуоресценции зондов и переноса энергии от триптофановых остатков аполипопротеинов на антрильный флуорофор. Этим путем впервые удалось дифференцированно изучить поведение фосфатидилхолина и сфингомиелина в нативной липопротеиновой глобуле.

Аналитическая характеристика изученных нами препаратов $ЛВП_2$ представлена в табл. 1. Все образцы содержали 5—6 молекул фосфатидилхолина на каждую молекулу сфингомиелина и по 3—4 молекулы аполипопротеина А-I на каждую молекулу аполипопротеина А-II. Однако после введения флуоресцентных зондов (I) или (II) между отдельными образцами выявились существенные различия флуоресцентных характеристик. В случае $ЛВП_2$, выделенных из крови людей с низким содержанием α-холестерина (32—39 мг%), поляризация флуоресценции фосфатидилхолинового зонда (I) при 36,5° С была существенно выше, чем сфингомиелинового (II) (рис. 1). В образцах же $ЛВП_2$, выделенных из крови доноров с высоким содержанием α-холестерина (76—83 мг%), величины поляризации обоих зондов примерно одинаковы. Та же тенденция наблюдалась при измерении поляризации флуоресценции обоих зондов при 20° С (данные не приведены).

Различия в поляризации флуоресценции фосфолипидных зондов в $ЛВП_2$, полученных от доноров с различным уровнем α-холестерина, могут быть вызваны либо различием в подвижности самих зондов, либо неодинаковым размером липопротеиновых глобул, так как при достаточно

Таблица 1

Характеристика исследованных образцов липопротеинов высокой плотности (фракция $ЛВП_2$)

Номер образца	Число доноров	α-Холестерин сыворотки, мг%	Содержание белка, мг%	Содержание фосфолипидов, мг%	Соотношение фосфатидилхолин/сфингомиелин, моль/моль	Соотношение апоА-I/апоА-II, моль/моль
1	3	32	200	47	5,1	3,1
2	1	34	67	25	—	—
3	5	34	59	39	5,0	2,8
4	4	37	113	83	5,0	4,3
5	3	39	195	75	4,7	2,7
6	3	47	72	49	5,5	—
7	4	58	95	65	5,7	3,1
8	1	67	272	150	—	—
9	3	76	440	184	5,8	3,8
10	1	83	440	187	5,1	3,7

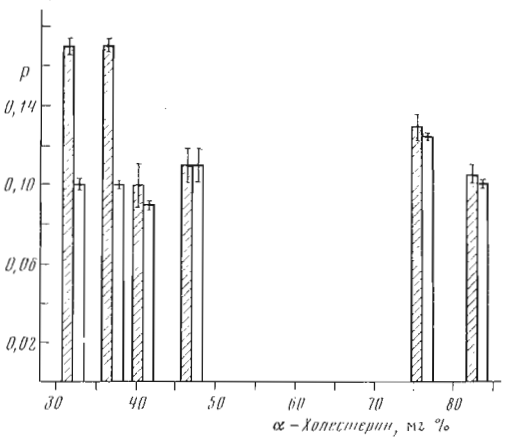


Рис. 1. Зависимость поляризации флуоресценции (P) включенных в $ЛВП_2$ флуоресцентных зондов – фосфатидилхолинового (I) (заштриховано) и сфингомиелинового (II) (не заштриховано) — от содержания в крови α-холестерина. Соотношение зонд/сумма фосфолипидов 1 : 100, время инкубации 24 ч, температура 36,5° С

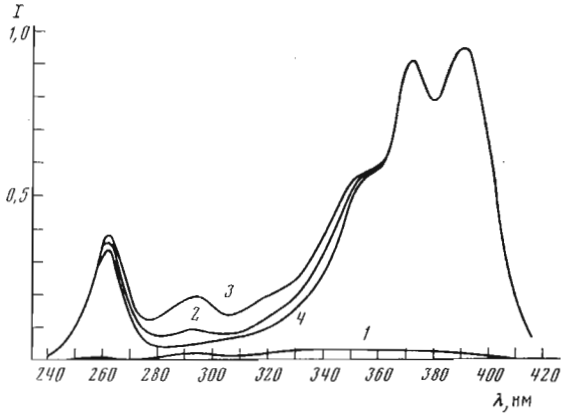


Рис. 2. Нормированные спектры возбуждения при 36,5° С и $\lambda_{фл}$ 430 нм: *1* – $ЛВП_2$ (образец № 7) без зонда; *2* – тот же образец $ЛВП_2$ с фосфатидилхолиновым зондом (I); *3* – тот же образец $ЛВП_2$ со сфингомиелиновым зондом (II); *4* – везикулы из яичного фосфатидилхолина (1 мг/мл) с фосфатидилхолиновым зондом (I), соотношение 100 : 1

малом диаметре частиц их вращение вносит существенный вклад в деполяризацию флуоресценции. У нас не было сведений о размерах частиц $ЛВП_2$, выделенных из крови разных доноров, поэтому мы ограничились сравнением поляризации флуоресценции двух фосфолипидных зондов (фосфатидилхолинового и сфингомиелинового), введенных в один и тот же образец $ЛВП_2$. Мы определили, что в одинаковом липидном окружении (везикулы из яичного фосфатидилхолина) поляризация сфингомиелинового зонда несколько превышала поляризацию фосфатидилхолинового (при 36,5° С 0,04 и 0,03 соответственно). Низкие значения поляризации показывают, что в этих условиях флуорофоры зондов в везикулах имеют значительную свободу вращения. Возрастание поляризации флуоресценции при включении зондов в $ЛВП_2$ (рис. 1) свидетельствует о заторможенности вращения флуорофоров, что связано с взаимодействием

с белком. Поэтому различия в поляризации флуоресценции, наблюдаемые при включении фосфатидилхолинового и сфингомиелинового зондов в препараты $ЛВП_2$ от доноров с низким уровнем α-холестерина (32—37 мг%) (рис. 1), показывают, что в таких липопротеинах зонды (I) и (II) находятся в неодинаковом микроокружении. Учитывая, что использованные нами флуоресцентные зонды по полярности и заряду не отличаются от соответствующих природных фосфолипидов, можно сделать вывод, что в глобулах указанных липопротеинов фосфатидилхолин и сфингомиелин распределены неравномерно. Этот вывод не подтверждает мнение ряда исследователей, согласно которому фосфолипиды липопротеиновой глобулы распределены на ее поверхности неспецифическим образом [9, 10].

Согласно принятым в настоящее время моделям ЛВП, фосфолипиды расположены на поверхности глобулы в виде монослоя и находятся в контакте с холестерином и апопротеинами (см. обзор [11]). Мы предполагаем, что различия в значениях полимеризации флуоресценции фосфатидилхолинового и сфингомиелинового зондов определяются их различным взаимодействием с белками. Это предположение было подтверждено данными, полученными нами при изучении переноса энергии с остатков триптофана аполипопротеинов на антрильные зонды (I) и (II) при возбуждении триптофанилов. Перенос энергии происходит именно с триптофановых остатков белка потому, что вклад тирозиновых остатков в флуоресценцию белка $ЛВП_2$ составляет не более 5%. Это подтверждается вычитанием спектров флуоресценции белка, снятых при возбуждении 280 и 295 нм и нормированных по интенсивности флуоресценции при 370 нм. Кроме того, в спектрах возбуждения $ЛВП_2$ при $\lambda_{исп}$ как 330 нм, так и 370 нм обнаруживается только полоса при ~295 нм; та же полоса присутствует в спектрах возбуждения зондов (I) и (II), включенных в $ЛВП_2$ ($\lambda_{исп}$ 230 нм — см. рис. 2).

За меру переноса энергии $F_п$ принято отношение разности интенсивностей флуоресценции образца $ЛВП_2$ при 440 нм с зондом и без зонда к интенсивности максимума триптофановой флуоресценции при 330 нм без зонда (при 440 нм антрильные зонды имеют значительную флуоресценцию, тогда как собственная флуоресценция белка практически отсутствует):

$$F_п = \frac{I^{440} - I_0^{410}}{I^{330}} \cdot 100\%.$$

В качестве примера на рис. 3 показаны спектры флуоресценции одного из образцов $ЛВП_2$ без зонда и после введения зондов (I) и (II). Как видно из рис. 2 и 3, перенос энергии от триптофанов на фосфатидилхолиновый зонд (I) невелик, тогда как в случае сфингомиелинового зонда (II) он значителен. Аналогичные различия в поведении двух зондов наблюдались для всех изученных образцов $ЛВП_2$.

В табл. 2 показана зависимость переноса энергии от содержания α-холестерина в плазме крови. Хотя полученные данные не позволяют точно определить расстояние между антрильным флуорофором и остатком триптофана, они однозначно свидетельствуют, что в среднем это расстояние для сфингомиелинового зонда меньше, чем для фосфатидилхолинового. При этом следует учесть, что, хотя концентрация введенных зондов была одинаковой, отношение концентраций фосфатидилхолина и сфингомиелина в $ЛВП_2$ равно примерно 5 : 1. Поэтому удельная концентрация фосфатидилхолинового зонда составляла ~1,2% общего содержания фосфатидилхолина, а сфингомиелинового — примерно 6% содержания сфингомиелина. Однако эти различия в удельной концентрации каждого из зондов могли отразиться на переносе энергии только при неравномерном распределении фосфатидилхолина и сфингомиелина на поверхности липопротеиновой глобулы, т. е. в случае их хотя бы частичной сегрегации.

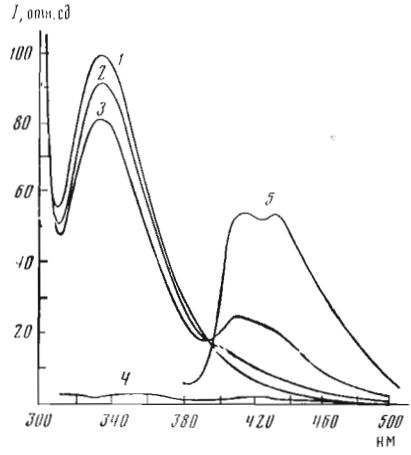


Рис. 3. Спектры испускания при 36,5° С и $\lambda_{возб}$ 295 нм: *1* – $ЛВП_2$ (образец № 7) без зонда; *2* – тот же образец $ЛВП_2$ с фосфатидилхолиновым зондом (I); *3* – тот же образец $ЛВП_2$ со сфингомиелиновым зондом (II); *4* – везикулы из яичного фосфатидилхолина (1 мг/мл) с фосфатидилхолиновым зондом (I), соотношение 100 : 1; *5* – то же, но при $\lambda_{возб}$ 370 нм

Наши опыты показали, что перенос энергии на сфингомиелиновый зонд (II) возрастает при увеличении времени инкубации (табл. 2) (для лучшего выявления временной зависимости инкубировали при 4° С, измерения же флуоресценции проводили при 36,5° С, чтобы исключить возможность разделения липидных фаз при пониженной температуре). Этот результат можно истолковать следующим образом. На поверхности липопротеиновой глобулы должны существовать два медленно обменивающихся пула фосфолипидов, различающихся по степени связывания с аполипопротеинами. При инкубации с липопротеинами фосфолипидный зонд вначале включается в пул слабо связанных фосфолипидов и затем постепенно переходит в аннулярный пул, находящийся в непосредственном контакте с белком.

Из двух основных аполипопротеинов $ЛВП_2$ (аполипопротеины A-I и A-II) триптофановые остатки содержит только аполипопротеин A-I. Хотя перенос энергии от триптофановых остатков других (минорных) аполипопротеинов исключить полностью нельзя, вклад такого переноса, несомненно, мал из-за незначительного содержания этих аполипопротеинов в $ЛВП_2$. Этот вывод подтверждается измерениями, проведенными на образце $ЛВП_2$ с повышенным содержанием аполипопротеинов С. В этом случае величина переноса энергии на сфингомиелиновый зонд оказалась несколько ниже, чем у образцов с обычным (низким) содержанием аполипопротеинов С (оба образца были получены от доноров с близким содержанием α-холе-

Таблица 2

Зависимость переноса энергии флуоресценции триптофана на сфингомиелиновый зонд (II) от содержания в крови α-холестерина

Температура инкубации 4° С, измерений – 36,5° С; номера образцов те же, что и в табл. 1

Номер образца	α-Холестерин сыворотки, мг%	$F_П$ (%) при времени инкубации	
		2 ч	24 ч
2	34	5,3	9,9
3	34	4,6	–
4	37	–	11
6	47	2,9	–
7	58	2,7	–
8	67	1,6	–
9	76	–	7,7

стерина; данные не приведены). Очевидно, в наблюдаемом переносе энергии на сфингомиелиновый зонд участвует только аполипопротеин A-I.

Ранее с помощью спектроскопии ^{13}C-ЯМР было показано, что этот аполипопротеин отличается более сильным сродством к фосфатидилхолину, чем к сфингомиелину [12]. Поэтому факт значительного переноса энергии на сфингомиелиновый зонд и незначительного на фосфатидилхолиновый указывает на сегрегацию аннулярных пулов сфингомиелина и фосфатидилхолина, взаимодействующих с аполипопротеином A-I, т. е. на то, что разные участки пептидной цепи этого аполипопротеина обладают неодинаковым сродством к сфингомиелину и фосфатидилхолину.

Аминокислотная последовательность аполипопротеина A-I, состоящего из 243—245 аминокислотных остатков, до сих пор точно не определена [13—15]. Согласно последним данным [15], молекула аполипопротеина содержит четыре триптофановых остатка в положениях 8, 50, 72 и 108; из них два последних находятся в α-спиральном участке молекулы [9], который, как предполагают, погружен в фосфолипидный монослой липопротеина и находится в липидном окружении [11]. Последнее согласуется с положением максимума триптофановой флуоресценции, 330 нм, для исследованных нами образцов ЛВП$_2$, что соответствует неполярному окружению флуорофора [16]. Таким образом, наиболее вероятным участком полипептидной цепи аполипопротеина A-I, ассоциирующимся со сфингомиелином, является сегмент, включающий в себя 72—108 аминокислотных остатков.

Как известно, снижение уровня α-холестерина рассматривается как потенциальный фактор развития атеросклероза и ишемической болезни сердца (см., например, [17]), а повышение этого уровня, наоборот, снижает такую возможность. Интересно, что для образцов, полученных от разных групп доноров, значения $F_п$ сфингомиелинового зонда падают с возрастанием уровня α-холестерина (рис. 1). Вместе с тем прослеживается тенденция к возрастанию величины $F_п$ с увеличением относительного содержания сфингомиелина в ЛВП$_2$ (см. табл. 1 и 2), несмотря на то что удельная концентрация зонда при этом падает. Таким образом, создается впечатление, что сродство аполипопротеинов ЛВП$_2$ к сфингомиелину меняется вместе с уровнем α-холестерина.

В заключение следует обсудить итоги настоящей работы в связи с современными представлениями о структуре ЛВП. Как известно, эти представления остаются отчасти противоречивыми (см. обзор [11]). Так, данные, полученные с помощью ^{31}P- и ^{13}C-ЯМР при изучении рекомбинантов аполипопротеинов ЛВП с фосфолипидами, были интерпретированы как доказывающие отсутствие связи полярных головок фосфолипидов с аполипопротеинами [12, 18, 19]. Для таких рекомбинантов Штоффель и сотр. [12] наблюдали увеличение времен релаксации только для С-атомов ацильных цепей, но не полярных головок фосфолипидов. С другой стороны, Хаузер [20] на основании изучения химических сдвигов отдельных протонов фосфатидилхолина в ЛВП$_3$ из плазмы свиньи заключил, что только глицерофосфохолиновая головка и первые две метиленовые группы ацильных цепей взаимодействуют с аполипопротеинами. Воэн и сотр. [21], включая в рекомбинанты аполипопротеинов A-I и A-II с димиристоилфосфатидилхолином спин-меченные фосфатидилхолиновые зонды, несущие нитроксильную метку в различных положениях жирнокислотной цепи, нашли, что белок взаимодействует с $C_{(5)}$ и $C_{(12)}$ стеароильного остатка зонда, но не с $C_{(16)}$. Наконец, Хендерсон и сотр. [22] при изучении с помощью спектроскопии ^{31}C-ЯМР липопротеинов высокой плотности в присутствии парамагнитных ионов (комплекс Mn^{2+} с EDTA) нашли, что ~20% полярных групп фосфолипидов недоступны для Mn^{2+}, и заключили, что эти группы непосредственно взаимодействуют с аполипопротеинами.

Частично эти противоречия могут быть разрешены исходя из высказанного нами предположения о наличии на поверхности липопротеиновой

глобулы двух фосфолипидных пулов, слабо связанного и аннулярного, согласно которому только часть фосфолипидов (вероятно, меньшая) взаимодействует с белками своими полярными головками. Не исключено, что сигналы ядер, входящих в состав этих полярных головок, не разрешаются в спектрах ЯМР в достаточной степени и остаются незамеченными. Возможно, конечно, также, что указанные выше расхождения частично объясняются различиями в использованных методиках и объектах исследований, например тем, что рекомбинантные липопротеины по своей структуре отличаются от нативных липопротеинов.

Как бы то ни было, обнаруженный нами факт избирательного переноса энергии триптофана на расположенный в неполярной части сфингомиелиновой молекулы антрильный флуорофор и несравненно меньший перенос на аналогичный фосфатидилхолиновый зонд свидетельствуют, что в нативных глобулах $ЛВП_2$ аполипопротеины дискриминируют полярные головки фосфолипидов при одновременном значительном гидрофобном взаимодействии белков с жирнокислотными цепями фосфолипида.

Экспериментальная часть

$ЛВП_2$ из крови доноров выделяли по методу [8]. Образцы, растворенные в физиологическом растворе с добавкой 0,01% азида натрия (1—1,5 мг суммы фосфолипидов в 2 мл), хранили при 2—3° С и использовали в течение не более 2 недель со дня выделения.

Холестерин определяли с использованием автоанализатора «Technicon AA11» (США) [23], фосфолипиды — по методу [24], аполипопротеины — по методу [25]. Для проведения флуоресцентных измерений 2 мл исходного раствора ЛВП доводили до объема 6 мл с помощью 0,05 мМ трис-HCl (pH 7,4 при 36° С). К аликвотам полученного раствора при интенсивном перемешивании микрошприцем добавляли раствор зонда в этаноле (1 мг/мл) до соотношения зонд/сумма фосфолипидов 1 : 100; содержание этанола при этом не превышало 0,6%. Образцы, содержащие флуоресцентные зонды, предохраняли от действия солнечного или другого актиничного света; допускалось слабое освещение лампами накаливания.

Спектры флуоресценции (не корректированы) регистрировали на приборе MPF-3 (Hitachi, Япония) с термостатированной камерой в кварцевых кюветах сечением 10×10 мм. Спектры возбуждения регистрировали при $\lambda_{фл}$ 430 нм; при съемке спектров испускания для белка $\lambda_{возб}$ 280 нм, для антрильных зондов $\lambda_{возб}$ 370 нм. Ширина щелей 5 нм. Поляризацию флуоресценции рассчитывали по формуле

$$P = \frac{(I_{\parallel} - I^0_{\parallel}) - (I_{\perp} - I^0_{\perp})}{(I_{\parallel} - I^0_{\parallel}) + (I_{\perp} - I^0_{\perp})} .$$

Интенсивности флуоресценции измеряли при этом на длине волны 370 нм в спектрах возбуждения образцов ЛВП с зондом (I) и без зонда (I°) с параллельными ($I_{\parallel}$) и скрещенными ($I_{\perp}$) поляризатором и анализатором. Погрешность при измерениях вычисляли по формуле [26]

$$\frac{\Delta P}{P} = \frac{I - P^2}{2P} \cdot \frac{\Delta I}{I} ,$$

где I — интенсивность флуоресценции при 370 нм и ΔI — наибольшая амплитуда отклонений при измерении I.

Везикулы из яичного лецитина готовили и поляризацию флуоресцентных зондов в них определяли как описано ранее [7], но при 36,5° С.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jonas A.* Microviscosity of lipid domains in human serum lipoproteins.— Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 486, № 1, p. 10—22.
2. *Jonas A., Hesterberg L. K., Drengler S. M.* Incorporation of excess cholesterol by high density serum lipoproteins.— Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 528, № 1, p. 47—57.
3. *Rosseneau M., Vercaemst R., Caster H., Lievens M. J., van Tornout P., Herbert P. N.* Fluorescence depolarisation studies of fluidity and phase transition in human apoprotein-phospholipid complexes.— Eur. J. Biochem., 1979, v. 96, № 2, p. 357—362.
4. *Sklar L. A., Doody M. C., Gotto A. M., Pownall H. J.* Serum lipoprotein structure: resonance energy transfer localisation of fluorescent lipid probes.— Biochemistry, 1980, v. 19, № 7, p. 1294—1301.
5. *Добрецов Г. Е., Спирин М. М., Карманский И. М.* Оценка глубины погружения остатков триптофана в липидную фазу сывороточных липопротеидов низкой плотности.— Биохимия, 1980, т. 45, № 4, с. 622—628.
6. *Молотковский Юл. Г., Дмитриев П. И., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д.* Синтез новых флуоресцентномеченых фосфатидилхолинов.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 588—594.
7. *Молотковский Юл. Г., Маневич Е. М., Дмитриев П. И., Молотковская И. М., Бергельсон Л. Д.* Синтез новых флуоресцентномеченых фосфолипидов и изучение их поведения в модельных мембранах.— Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 586—600.
8. *Lindgren F. T.* Analysis of lipids and lipoproteins. Champaign (Ill.): Amer. Chem. Soc., 1975, p. 204.
9. *Edelstein C., Kezdy F. J., Scanu A. M., Shen B. W.* Apolipoproteins and the structural organization of plasma lipoproteins: human plasma high density lipoprotein-3.— J. Lipid. Res., 1979, v. 20, № 2, p. 143—153.
10. *Osborn J. C., Brewer H. B.* The plasma lipoproteins.— Adv. Protein Chem., 1977, v. 31, p. 253—327.
11. *Morrisett J. D., Jackson R. L., Gotto A. M.* Lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins.— Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 472, № 2, p. 93—133.
12. *Stoffel W., Zierenberg O., Tunggal B. D., Schreiber E.* ^{13}C Nuclear magnetic resonance studies on lipid-protein interactions in human high-density lipoprotein (HDL).— Z. Physiol. Chem., 1974, B. 355, № 11, S. 1381—1390.
13. *Delahunty T., Baker H. N., Gotto A. M., Jackson R. L.* The primary structure of human plasma high density apolipoprotein glutamine I (ApoA-I). I. The amino acid sequence and alignment of cyanogen bromide fragment II.— J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 7, p. 2718—2724.
14. *Baker H. N., Gotto A. M., Jackson R. L.* The primary structure of human plasma high density apolipoprotein glutamine I (ApoA-I). II. The amino acid sequence and alignment of cyanogen bromide fragments IV, III and I.— J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 7, p. 2725—2738.
15. *Brewer H. B., Fairwell T., LaRue A., Ronan R., Houser A., Bronzert T. J.* The amino acid sequence of human ApoA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoprotein.— Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1978, v. 80, № 3, p. 623—630.
16. *Буштейн Э. А.* Собственная люминесценция белка.— Итоги науки и техники. Биофизика. М.: ВИНИТИ, 1977, т. 7, с. 13—39.
17. *Miller N. E., Rao S., Lewis B., Bjornswick G., Myhre K., Mijos O. D.* High-density lipoprotein and physical activity.— Lancet, 1979, v. 1, № 8107, p. 111—112.
18. *Assman G., Sokoloski E. A., Brewer H. B.* ^{31}P Nuclear magnetic resonance spectroscopy of native and recombined lipoproteins.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 2, p. 549—553.
19. *Assman G., Higliet R. J., Sokoloski E. A., Brewer H. B.* ^{13}C Nuclear magnetic resonance spectroscopy of native and recombined lipoproteins.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 9, p. 3701—3705.
20. *Hauser H.* Lipid-protein interaction in porcine high-density (HDL_3) lipoprotein.— FEBS letters, 1975, v. 60, № 1, p. 71—75.
21. *Vaughan D. J., Breckenridge W. C., Stanacev N. Z.* Reconstitution of lipoproteins. I. Lipid-protein interaction of high density apoproteins, purified apoA-I and apoA-II with dimyristoyl-lecithin and dimyristoyl-lecithin: cholesterol vesicles studied by isomeric spin-labelled lecithins.— Can. J. Biochem., 1980, v. 58, № 7, p. 581—591.
22. *Henderson T. O., Kruski A. W., Davies L. G., Glonek T., Scanu A. M.* ^{31}P Nuclear magnetic resonance studies on serum low and high density lipoproteins: effect of paramagnetic ion.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 9, p. 1915—1920.
23. *Burstein M., Scholnick H. R.* Lipoprotein-polyanion-metal interactions.— Adv. Lipid Res., 1973, v. 11, p. 68—75.
24. *Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M.* A universal reagent for phospholipid analysis.— J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129—141.
25. *Перова Н. В., Метельская В. А., Озерова И. Н., Гаджалова С. И., Чернышева Н. П., Полесский В. А., Жуковский Г. С., Герасимова Е. Н.* Апопротеин AI в подфракциях липопротеинов высокой плотности и активность лецитинхолестеринацилтрансферазы при гиперальфахолестеринемии.— Вопр. мед. химии, 1980, № 5, с. 688—694.

26. *Гуринович Б. П., Савченко А. Н., Соловьев К. Н.* Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск: Наука и техника, 1968, с. 238.

Поступила в редакцию
10.III.1981

INVESTIGATION OF HIGH DENSITY LIPOPROTEINS BY LIPID-SPECIFIC FLUORESCENT PROBES

MOLOTKOVSKY Jul. G., BERGELSON L. D., MANEVICH E. M., GERASIMOVA E. N., POLESSKY V. A.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow; All-Union Cardiology Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Molecular organization of phospholipids in human plasma high density lipoproteins (HDL_2) has been investigated with the aid of lipid-specific probes, phosphatidylcholine and sphingomyelin. These probes are close to natural phospholipids by their physicochemical properties and unequivocally located in the polar region of the lipoprotein globule. It is found that phosphatidylcholine and sphingomyelin interact in a different way with apolipoprotein tryptophan residues and form different pools on the lipoprotein surface. A correlation was disclosed between the phospholipid fluidity parameters, extent of the sphingomyelin binding to apolipoproteins and the blood α-cholesterol level.