РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 755 512 (13) C1

(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/48 (2021.08)

(21)(22) Заявка: **2020134806, 23.10.2020**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.10.2020

Дата регистрации:
16.09.2021

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **23.10.2020**

(45) Опубликовано: **16.09.2021** Бюл. № **26**

Адрес для переписки:
101000, Москва, Петроверигский пер., 10, стр. 3, в отдел инновационной и патентно-правовой деятельности ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России, Учеваткиной Н.В.

(72) Автор(ы):
Дергунов Александр Дмитриевич (RU), Литвинов Дмитрий Юрьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2659211 C2, 28.06.2018. SG 10201801372, 27.04.2018. А. Д. ДЕРГУНОВ и др. ДИНАМИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ АПОБЕЛКОВ ЛИПОПРОТЕИДОВ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССА ЛИПОЛИЗА. БИОХИМИЯ, 1990. Т. 55, вып. 1., с. 134-141. Толковый словарь Ушакова. Д.Н. Ушаков. Издательство "Юность", 1935-1940, с. 54. H Q LIANG et al.** (см. прод.)

(54) Определение степени диссоциации апобелка A-I и способ прогнозирования структурных и функциональных свойств липопротеинов высокой плотности плазмы крови человека, контролирующих основной путь выхода холестерина из макрофагов

(57) Реферат:

Изобретение относится к области липопротеомики, метаболомики, клеточной биологии атерогенезу, структурной биологии, молекулярной кардиологии. Изобретение касается способа определения степени диссоциации апобелка A-I. Способ включает забор крови у пациентов-мужчин без атеросклероза и проведение денатурации мочевиной препаратов липопротеинов высокой плотности (ЛВП), полученных преципитацией апоB-содержащих липопротеинов полиэтиленгликолем; измерение происходящей при денатурации ЛВП диссоциации апоA-I по накоплению преβ-апоA-I при разделении ЛВП электрофорезом в геле агарозы с последующей иммунодетекцией апобелка в реплике геля; влияние индукции диссоциации апоA-I мочевиной на функциональные свойства ЛВП выявляют измерением ABCA1-опосредованного эффлюкса флуоресцентного аналога холестерина из линии макрофагов мыши RAW 264.7 на ЛВП пациентов как акцептор холестерина. Затем степень диссоциации апоA-I (D) рассчитывают как прирост доли преβ-апоA-I относительно нативных ЛВП по формуле. Изобретение обеспечивает выявление новых структурно-

RU 2755512 C1

функциональных свойств частиц липопротеинов высокой плотности плазмы крови человека, детерминирующих их атеропротективные свойства. 3 табл., 4 ил.

(56) (продолжение):
Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. J Lipid Res, 1994 Jul;35(7):1187-99. Наайденов PubMed, PMID: 7964180. CHRISTOPHER K. GLASS et al. Tissue Sites of Degradation of Apoprotein A-I in the R. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 258, No. 11, Issue of June 10, PP. 7161-7167,1983, 7161-7167.

RU 2755512 C1

RU 2755512 C1

RUSSIAN FEDERATION

(19) RU (11) 2 755 512 (13) C1

(51) Int. Cl.
G01N 33/48 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/48 (2021.08)

(21)(22) Application: **2020134806, 23.10.2020**

(24) Effective date for property rights:
23.10.2020

Registration date:
16.09.2021

Priority:
(22) Date of filing: **23.10.2020**

(45) Date of publication: **16.09.2021** Bull. № **26**

Mail address:
101000, Moskva, Petroverigskij per., 10, str. 3, v otdel innovatsionnoj i patentno-pravovoj deyatelnosti FGBU "NMITS TPM" Minzdrava Rossii, Uchevatkinoj N.V.

(72) Inventor(s):
Dergunov Aleksandr Dmitrievich (RU),
Litvinov Dmitrij Yurevich (RU)

(73) Proprietor(s):
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij issledovatelskij tsentr terapii i profilakticheskoj meditsiny" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (FGBU "NMITS TPM" Minzdrava Rossii) (RU)

RU 2755512 C1

(54) **DETERMINATION OF THE DEGREE OF DISSOCIATION OF AN A-I APOPROTEIN AND METHOD FOR PREDICTING THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS OF HUMAN BLOOD PLASMA CONTROLLING THE MAIN ROUTE OF RELEASE OF CHOLESTEROL FROM MACROPHAGES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of lipoproteomics, metabolomics, cellular biology, atherogenesis, structural biology, molecular cardiology. The invention pertains to a method for determining the degree of dissociation of an A-I apoprotein. The method includes collecting blood in male patients without atherosclerosis and performing denaturation of high-density lipoprotein (HDL) preparations obtained by precipitation of apoB-containing lipoproteins with polyethylene glycol by urea; measuring the dissociation of apoA-I occurring during denaturation of the HDL by the accumulation of preβ-apoA-I in separation of the HDL by electrophoresis in an agarose gel followed by immunodetection of an apoprotein in a replica of the gel; the effect of induction of dissociation of apoA-I by urea on the functional properties of the HDL is identified by measuring the ABCA1-mediated efflux of a fluorescent cholesterol analogue from the mouse macrophage line RAW 264.7 on the HDL of patients as a cholesterol acceptor. The degree of dissociation of apoA-I (D) is then calculated as the gain in the proportion of preβ-apoA-I relative to the native HDL by the formula.

EFFECT: invention ensures identification of new structural and functional properties of high-density lipoprotein particles of human blood plasma determining the atheroprotective properties thereof.

1 cl, 3 tbl, 4 dwg

RU 2755512 C1

Область техники

Липопротеомика, метаболомика, клеточная биология атерогенеза, структурная биология, молекулярная кардиология.

Уровень техники

Апобелок A-I (апо A-I) является основным апобелком липопротеинов высокой плотности плазмы крови человека (ЛВП) и вносит определяющий вклад в атеропротективный эффект ЛВП в силу их участия в обратном транспорте холестерина (ОТХ) из макрофага в печень [1]. Эффлюкс холестерина является первой скорость-лимитирующей реакцией в ОТХ. В настоящее время известны четыре механизма эффлюкса холестерина: пассивная диффузия холестерина через водную фазу, опосредованная рецептором-чистильщиком SR-B1 диффузия и активный транспорт холестерина с участием транспортеров ABCA1 и ABCG1 [2,3]. ABCA1-опосредованный эффлюкс расматривается как основной механизм выхода холестерина из пенистых клеток в атероме. АпоA-I является первичным акцептором холестерина, транспортируемого транспортером ABCA1 из нагруженных липидами макрофагов [2, 4]. Отметим, что несмотря на доминирующее присутствие апоA-I плазмы в липид-ассоциированной форме, только небольшая фракция апобелка (5-10%), существующая вне связи с липидом или в обедненной липидом структуре [5, 6], является первичным акцептором холестерина при его транспорте через транспортер ABCA1 [4]. Частицы ЛВП плазмы характеризуются высоким уровнем гетерогенности структуры, состава и функции [7]. ЛВП могут быть разделены с помощью ультрацентрифугирования на легкие $ЛВП_2$ и более плотные $ЛВП_3$ и с помощью электрофореза в агарозе на частицы с преβ-подвижностью и α-подвижностью. Связанный с липидом апобелок содержится в насцентных дискоидальных частицах ЛВП с преР-подвижностью и в зрелых сферических частицах ЛВП с α-подвижностью, тогда как свободный от липида апоA-I обладает только преβ-подвижностью [8]. В α-полосе содержатся частицы $ЛВП_2$ и $ЛВП_3$ в основном с апоA-I в качестве единственного апобелка, тогда как два апобелка апоA-I и апоA-II входят в состав оставшихся частиц.

При акцепции свободным от липида апобелком вышедших из клеток холестерина и фосфолипида образуются дискоидальные преβ-ЛВП, также акцептирующие холестерин и фосфолипиды. Эти частицы являются наиболее эффективными субстратами в катализируемой лецитин : холестерин ацилтрансферазой реакции образования эфира холестерина из холестерина [9-11]. Дискоидальные ЛВП трансформируются в сферические ЛВП при накоплении избытка эфиров холестерина. Обратный переход сферические-дискоидальные частицы происходит при ремоделировании сферических ЛВП с участием белка-переносчика эфиров холестерина и липаз [12]. Частицы $преβ_1$-ЛВП, являющиеся единственным липопротеином у гомозигот с танжерской болезнью [13], могут являться лишь субстратом для ABCA1, но не продуктом вследствие нарушенной активности ABCA1, и их идентичность со свободным от липида апоA-I остается неясной [5, 14]. Структура апоA-I включает два домена - высоко-структурированный N-домен и неструктурированный C-домен, участвующий в связывании с липидной фазой [15, 16]. Остаются во многом неизвестными физико-химические свойства липидного монослоя сферических ЛВП, определяющие силу белок-липидных взаимодействий, в свою очередь контролирующие диссоциацию апоA-I в водную фазу и участие диссоциировавшего апобелка в эффлюксе холестерина. Можно предположить, что диссоциация липид-ассоциированного апоA-I определяет его участие в эффлюксе холестерина из макрофагов в атероме. Действительно, свободный от липида

апоА-I обнаруживается в интиме при атеросклерозе в заметных количетвах [17] и предположена индукция диссоциации апоА-I от ЛВП при кислых значениях pH [18], характерных для атеромы [19]. Остается неизвестной связь между потенцией апобелка к диссоциации от ЛВП и содержанием ХС-ЛВП плазмы как широко-известного маркера атеропротективного действия ЛВП.

Диссоциация апоА-I может быть обратимой и необратимой. Первый тип описывает поведение слабо-связанного с липидной фазой апобелка, тогда как второй тип относится к прочно-связанному апобелку [20]. Необратимая диссоциация происходит после обратимой денатурации апоА-I в липидной фазе [4] и, возможно, зависит от кинетической природы стабильности апобелка в ЛВП [21] и от локальных концентраций липидной и водной фаз [22]. В основном не установлены отношение пулов слабо-связанного и прочно-связанного апоА-I и связь степени диссоциации апоА-I и степени гетерогенности частиц ЛВП. Предположенная вовлеченность обмена апобелка между липидной и водной фазами в обратный транспорт холестерина [23] не определяет с необходимостью содержание свободного от липидов апоА-I в водной фазе [24].

В мировой научной литературе отсутствует прототип, полностью сопоставимый по целям, охвату и методам с заявляемым изобретением. Из уровня техники известны два источника, в которых описаны ряд схожих существенных признаков относительно нашего изобретения.

В первом исследовании [22] описано распределение апоА-I между ЛВП и водной фазой. При действии хаотропного агента солянокислого гуанилина Gu-HCl на изолированные с помощью ультрацентрифугирования ЛВП из одиночного пула плазмы крови пациентов обнаружены индукция нестабильности ЛВП, разворачивание структуры и диссоциация апоА-I, но не апоА-II, и образование больших апоА-I-дефицитных частиц и микроэмульсий с эфирами холестерина. Предположены: 1) индукция слияния частиц ЛВП и освобождение свободного от липидов апоА-I; 2) сохранение липидов в составе больших ЛВП-подобных частиц, образующихся при слиянии ЛВП; 3) отсутствие диссоциации апоА-II от ЛВП-подобных частиц с небольшим остаточным содержанием апоА-I при большой концентрации Gu-HCl; 4) разворачивание структуры апоА-I и его диссоциация в водную фазу различны для фракций ЛВП и большие $ЛВП_2$ с меньшей плотностью более устойчивы к действию хаотропного агента по сравнению с небольшими и более плотными $ЛВП_3$. Меньшие ЛВП более динамичны и при диссоциации с них апобелка сливаются с более крупными ЛВП, за счет чего сдвигается равновесие в пользу еще более крупных частиц и увеличенного содержания свободного от липида апоА-I. При разведении частиц ЛВП выявлена природа диссоциации апоА-I за счет распределения апобелка между водной и липидной фазами. Недостаток прототипа заключается в использовании одиночного пула ЛВП и в отсутствии оценки влияния гетерогенности ЛВП для большого числа пациентов с широко-варьирующим содержанием ХС-ЛВП плазмы. Также отсутствуют данные о функциональной значимости диссоциировавшего апоА-I в контролировании атеропротективных свойств ЛВП.

Во втором исследовании [25] с использованием линии макрофагов RAW 264.7 выявлены индукция экспрессии транспортера ABCA1 с помощью цАМФ, эффлюкс холестерина и фосфолипидов на свободный от липида апоА-I и обратимое связывание апобелка с клетками. Акцепция липидов свободным апобелком прямо пропорционально зависела от связывания апоА-I с клетками и снижалась на 70% при добавлении моноклонального антитела, специфичного к свободному от липидов апобелку. В то же время частицы ЛВП акцептировали холестерин без добавления цАМФ и добавление

индуктора незначительно увеличивало эффлюкс. Антитело также ингибировало прирост эффлюкса на 70%. Добавление апоА-II приводило к вытеснению апоА-I из ЛВП и к возрастанию цАМФ-стимулированного эффлюкса холестерина в среду с ЛВП; антитело также на 70% ингибировало этот прирост эффлюкса. В экспериментах по связыванию реконструированных ЛВП выявлено связывание с клетками только апоА-I, но не эфиров холестерина. Антитело ингибировало стимулированный эффлюкс на реконструированные ЛВП аналогично влиянию на акцепцию ЛВП плазмы. Предположено прямое участие свободного от липида апоА-I в акцепции холестерина, транспортируемого из клетки транспортером АВСА1. Недостатком этого прототипа является бездоказательность диссоциации от ЛВП свободного от липида апоА-I и данные по рассчитанной константе диссоциации, различающиеся на три порядка от известных данных для обратимого связывания апобелка с ЛВП [20]. Кроме того, этот прототип сложно использовать для анализа образцов из разных пациентов в силу отсутствия подобранных условий (а) сравнения диссоциации апоА-I от различных препаратов ЛВП и (б) нормирования эффлюкса на различную степень диссоциации. Также диссоциация апоА-I от ЛВП не рассматривается как новый маркер функциональных свойств ЛВП, определяющих их атеропротективный эффект в популяции.

Раскрытие сущности изобретения.

Технический результат заявленного изобретения заключается в выявлении новых структурно-функциональных свойств частиц липопротеинов высокой плотности плазмы крови человека, детерминирующих их атеропротективные свойства.

Для решения поставленной задачи у пациентов-мужчин без атеросклероза была взята плазма крови и проведена денатурация хаотропным агентом мочевиной препаратов ЛВП, полученных преципитацией апоВ-содержащих липопротеинов полиэтиленгликолем. Происходящая при денатурации пЛВП диссоциация апоА-I была измерена по накоплению преβ-апоА-I при разделении пЛВП электрофорезом в геле агарозы с последующей иммунодетекцией апобелка в реплике геля. Влияние индукция диссоциации апоА-I мочевиной на функциональные свойства пЛВП выявлено измерением АВСА1-опосредованного эффлюкса флуоресцентного аналога холестерина из линии макрофагов мыши RAW 264.7 на пЛВП пациентов как акцептор холестерина. Степень диссоциации апоА-I как параметр D рассчитана как прирост доли преβ-апоА-I относительно нативных пЛВП по формуле: $D = (\text{преβ}'_{4.25} - \text{преβ}'_0)/(1 - \text{преβ}'_0)$, где $\text{преβ}'_{4.25}$ и $\text{преβ}'_0$ - значения долей preβ при концентрации мочевины 4,25 М и 0 М соответственно. Для описания диссоциации использована модель распределения апобелка между фосфолипидной фазой ЛВП и водной фазой в соответствии с относительными размерами фаз. Положительное отклонение от линейной зависимости увеличения степени диссоциации при снижении содержания фосфолипидов ЛВП свидетельствует об относительном увеличении содержания небольших ЛВП при снижении содержания ХС-ЛВП плазмы. Диссоциировавший апоА-I определяет прирост АВСА1-опосредованного эффлюкса на препараты ЛВП пациентов как акцептор холестерина. Прогнозирование структурных и функциональных свойств ЛВП, контролирующих эффлюкс холестерина из макрофага сосудистой стенки, основано на совместном использовании параметра D и содержания апоА-I в ЛВП и наличия значимой положительной корреляции между АВСА1-опосредованным эффлюксом и содержанием апоА-I, диссоциировавшего от ЛВП. Это позволяет сравнить эффективность донирования свободного от липидов апоА-I частицами ЛВП разных пациентов с

различным содержанием фракций ЛВП$_2$ и ЛВП$_3$ для последующего участия в реакции ABCA1-опосредованного эффлюкса холестерина из макрофага. Атеропротективный эффект небольших ЛВП$_3$ определяется их увеличенным донированием свободного от липида апоА-I относительно более крупных ЛВП$_2$.

Краткое описание прилагаемых графических материалов.

Фиг. 1. Кинетика диссоциации апоА-I от ЛВП, индуцированной мочевиной, (а), электрофореграммы распределения апоА-I в плазме (дорожки 1 и 5), сыворотке (дорожки 2 и 6), апоВ-истощенной плазме (дорожки 3 и 7) и апоВ-истощенной сыворотке (дорожки 4 и 8) для двух пациентов с содержанием ХС-ЛВП 1,01 мМ (дорожки 1-4) и 1,33 мМ (дорожки 5-8). После проведеления электрофореза в агарозе готовили реплику геля электропереносом на нитроцеллюлозную мембрану. Распределение апоА-I детектировали с помощью антител и хемилюминесценции. Свободный от липидов и липопротеин-ассоциированный апобелок локализованы соответственно в преβ-полосе и в более быстрой α-полосе. (б), кинетика диссоциации апоА-I от пЛВП из пациента с низким (0,92 мМ) и высоким (1,44 мМ) содержанием ХС-ЛВП при их инкубации с мочевиной в концентрациях 4,5 и 6,0 М. Подстрочные индексы «н» и «в» соответствуют низкому и высокому содержанию ХС-ЛВП. Распределение апобелка между полосами рассчитано по формуле 1 и данные по относительному содержанию апоА-I в β-полосе аппроксимировали к одноэкспоненциальному росту по формуле 3. Константы скорости диссоциации апобелка от пЛВП из пациента с низким содержанием ХС-ЛВП равны k_d=1,85±0,29 и 5,59±0,74 ч$^{-1}$ при инкубации с мочевиной в концентрациях 4,5 и 6,0 М соответственно; для пЛВП из пациента с высоким содержанием ХС-ЛВП значения констант равны k_d=1,28±0,39 и 1,37±0,76 ч$^{-1}$ при 4,5 и 6,0 М мочевины соответвенно.

Фиг. 2. Зависимость диссоциации апоА-I из пЛВП от концентрации мочевины, (а), аликвоты препарата ЛВП из пациента №21 с содержанием ХС-ЛВП плазмы 2,24 мМ после инкубации в течение 6 ч с мочевиной подвергали электрофорезу в геле агарозы с последующим приготовлением реплики геля электропереносом и детекции апобелка в мембране с помощью антител и хемилюминесценции. (б), влияние содержания ХС-ЛВП на диссоциацию апоА-I из пЛВП пяти пациентов после инкубации с мочевиной в течение 6 часов. Данные аппроксимировали сигмоидальной зависимостью (формула 4) и полученные параметры включены в таблицу 3.

Фиг. 3. Связь параметров денутурационного перехода с содержанием холестерина в препарате ЛВП. (а), линейная зависимость параметра полуперехода $U_{1/2}$ от ХС-пЛВП с параметрами: пересечение = 3,58±0,20, наклон = 4,71±0,99, доведенный R^2=0,85 и p= 0,017 (n=5); (б), линейная зависимость параметра кооперативности H от от ХС-пЛВП с параметрами: пересечение = 0,036±0,242, наклон = 4,42±1,20, доведенный R^2=0,76 и p=0,034 (n=5); (с), линейная зависимость между измеренным $D_{изм}$ и рассчитанным $D_{расч}$ параметрами диссоциации апобелка с параметрами: фиксированное значение пересечения нуль, наклон = 1,08±0,06, доведенный R^2=0,98 и p=0,00006 (n=5).

Фиг. 4. Зависимость высвобождения апоА-I от содержания фосфолипидов в препарате ЛВП. Отношение свободного и связанного апобелка F/B рассчитано из параметра диссоциации D согласно формуле F/B=D/(1-D). Данные аппроксимировали аллометрической функцией $F/B=K(1/[pHDL\text{-}PC])^b$ с параметрами: K=0,069±0,022, b= 1,59±0,17 и R^2=0,58 (n=48). Область данных ограничена двумя линейными зависимостями

F/B=K(1/[pHDL-PC]) с наклонами как коэффициенты распределения для наименьшего и наибольшего распределения апобелка в липидную фазу соответсвенно. Верхняяя зависимость: К=0,272±0,005, R^2=0,998 (n=5). Нижняя зависимость: К=0,118±0,007, R^2=0,984 (n=5).

Фиг. 5. Стимуляция АВСА1-опосредованного эффлюкса свободным от липида апоА-I, диссоциировавшим от пЛВП. Линейная зависимость характеризуется параметрами: пересечение = -0,007±0,22, наклон = 0,018±0,004; значение R^2=0,622 и p=0,0008 (n=14).

Осуществление изобретения.

Получение препарата ЛВП.

Образцы плазм с ЭДТА хранились при -80°С. Отмечено отсутствие влияния хранения при -80°С на субфракционный спектр ЛВП [26, 27] и эффлюкс холестерина [28] в условиях короткого и длительного (1-2 года) периодов хранения. Возможное «слущивание» апоА-I со зрелых ЛВП с α-подвижностью, что могло бы привести к снижению интенсивности окрашивания α-полосы и накоплению свободного от липида апобелка в преβ-полосе при хранении образцов плазм, также отсутствовало в настоящей работе. Препараты ЛВП (пЛВП) получены преципитацией апоВ-содержащих липопротеинов полиэтиленгликолем (ПЭГ) [29, 30] в нашей модификации. Сразу после размораживания плазму переносили в стеклянные пробирки с высушенной пленкой смеси игибитора ЛХАТ 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ) и ингибитора сериновых протеаз фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). В некоторых экспериментах плазму конвертировали в сыворотку добавлением $CaCl_2$. Ингибиторы высушивали из изопропанола для достижения концентраций 2 мМ ДТНБ и 1 мМ ФМСФ в 200 мкл плазмы. После растворения пленки и инкубации при комнатной температуре в течение 5 мин быстро смешивали 150 мкл плазмы с 60 мкл 20% ПЭГ 7000-9000 в фосфат-солевом растворе pH 7,4 с добавленной смесью ингибиторов протеаз (минитаблетки ингибиторов протеаз и фосфатаз без ЭДТА (Thermo Fisher Scientific)), содержащей апротинин (ингибитор сериновых протеаз), бестатин (ингибитор аминопептидаз), Е-64 (ингибитор цистеиновых протеаз), лейпептин (ингибитор сериновых и цистеиновых протеаз) и ингибитор фосфатаз в концентрации, превышающей стандартную в 3,5 раза. После инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре смесь центрифугировали при 12000 g при 4°С в течение 20 мин. Отобранный супернатант является препаратом ЛВП, использованным в этом исследовании.

Электрофорез плазмы в геле агарозы и детекция распределения апоА-I.

Аликвоты ЭДТА-плазмы хранили при температуре -80°С. После размораживания образцы разбавляли 1:1 электродным буфером 0.8×, содержащим 10% глицерина. Вертикальный электрофорез проводили в пластине 0,75% агарозного геля толщиной 1 мм и шириной 8 см с электродным буфером 25 мМ трицин, 80 мМ трис, pH 8,6 при 250 В и 8°С в течение 30 мин до миграции альбумина, окрашенного бромфеноловым синим, на растояние 2,5 см. В этих условиях сигнал апоА-I из преα-зоны отсутствовал. Белки и липопротеины переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану 0,45 мкм в буфере переноса (47,9 мМ трис, 38,6 мМ глицин) при 50 В и 8°С в течение 1,5 часов. Перенесенный материал фиксировали на мембране при ее обработке 0,03% глутаровым альдегидом в течение 15 мин. Ополаскивали мембрану 10 мл PBS, после чего ставили блокировку в 2% сухом обезжиренном молоке в трис-солевом растворе с твин-20 (TCPT) в течении 10 мин. Далее мембрану инкубировали с козьими поликлональными антителами к апоА-I в течении часа (разведение 1:20000), последующей трехкратной промывкой 20 мл TCPT/мембрана по 5 минут каждая. Затем инкубировали с

поликлональными антителами кролика против антител козы, конъюгированными с пероксидазой хрена в течение часа (также в разведении 1:20000). После повторной промывки TCPT, мембраны помещали в свежеприготовленный раствор - 10 мл 100 мМ трис-HCl pH 8.8 (разбавить 666,7 мкл маточного раствора 1.5М трис-HCl pH 8.8 до 10 мл), 2,7 мкл 30% H_2O_2, 50 мкл люминола и 50 мкл пара-кумаровой кислоты). Содержание апоА-I в реплике измерено по хемилюминесцентному свечению с использованием цифровой системы Fusion-Solo 6S (Vilber Lourmat, Франция). Полученные изображения обсчитывали с помощью программы ImageJ. Измерение эффлюкса холестерина.

Эффлюкс холестерина измеряли по выходу флуоресцентного зонда BODIPY-холестерина [8, 28]. Клетки RAW 264.7 культивировали в среде DMEM с добавлением 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ Hepes и 10% ЭБС; использовали клетки с числом пассажей <20. Клетки трижды промывали натрий-фосфатным буфером (ФСР) и соскабливали с чашек Петри в среду FluoroBrite DMEM с добавлением 2 мМ L-глутамина ('FB-DMEM') до концентрации $1{,}4 \cdot 10^6$ клеток/мл. Добавляли ингибитор AXAT Sandoz 58-035 до концентрации 2 μг/мл и BODIPY-холестерин до 0,5 μМ (раствор зонда 1 мМ в ДМСО был нагрет до 37°C и после перемешивания разбавляли до 100 μМ этанолом). Для корректной загрузки клеток BODIPY-холестерином среда не должна содержать FBS. Клетки высаживали в ячейки 48-луночного планшета (0,25 мл суспензии в лунку). Через 2 часа среда была заменена таким же объемом среды FB-DMEM с 0,2% БСА в присутствии или в отсутствие 0,3 мМ Br-цАМФ. Ингибитор Sandoz 58-035 не был добавлен в среду на этом этапе, так как его добавление не влияло на эффлюкс. Измерения эффлюкса начинали после 18 часов инкубации и замены среды (0,25 мл/лунка) на FB-DMEM с 1% обедненной по апоВ плазмой (или на FB-DMEM без плазмы в некоторых лунках для измерений фонового выхода зонда). В экспериментах по денатурации ЛВП мочевиной использовали меньшее содержание ЛВП (0,08%) в силу увеличенного содержания свободного от липида апоА-I. Клетки из части лунок были собраны (0,25 мл/лунка) в фосфатный буфер (ФСР) с 1% холата натрия для измерения флуоресценции как показатель 100% загрузки. После 4 часов инкубации среду отбирали и центрифугировали в течение 10 минут при 1500g. 200 μл супернатанта переносили в пробирки с 22 мкл 10% холата натрия и хранили в течение ночи при -20°C. Образцы помещали в 96-луночный черный планшет (200 μл/лунка) и измеряли флуоресценцию с помощью флуоресцентного планшетного ридера. Флуоресценция среды без акцептора была близка к 0,5 нМ, тогда как сигнал после инкубации стимулированных или нестимулированных Br-цАМФ клеток с 1% обедненной по апоВ плазме составлял соответственно 16 и 4 нМ флуоресцеина натрия в PBS. Процент эффлюкса рассчитывали как частное от деления сигнала из среды на сигнал лизата клеток, полученного перед измерением эффлюкса (200 μл из 250 μл лизата). Процент эффлюкса без акцептора вычитали из остальных значений процента эффлюкса. Образцы пулов обедненных по апоВ плазм с высоким содержанием ХС-ЛВП и с низким содержанием ХС-ЛВП из замороженных аликвот включали в каждый набор образцов для сравнения значений эффлюкса в разных экспериментах. Среднее значение процента эффлюкса для двух пулов в первом эксперименте было разделено на значение из следующего эксперимента, и частное (k) было использовано как множитель для получения «приведенного» значения процента эффлюкса в следующем эксперименте. Значения коэффициентов вариации внутри и между отдельными экспериментами составляли 5,9% и 15,9% соответственно.

Денатурация ЛВП мочевиной.

Денатурацию пЛВП мочевиной измеряли по накоплению свободного от липидов преβ-апоА-I после инкубации в мочевине при 25°C в течение различных промежутков

аремени. Для каждого эксперимента использовали свежеприготовленный раствор мочевины. Для этого 690 мг мочевины растворяли добавлением 638 мкл ФСР pH7,4 со стандартной концентрацией ингибиторов протеаз для получения 1149 мкл ЮМ раствора мочевины. Реакционную смесь в конечном объеме 40 мкл готовили разбавлением (или без разбавления - в зависимости от конечной концентрации) ЮМ раствора мочевины с помощью ФСР со стандартной концентрацией ингибиторов и добавляли 10 мкл ЛВП в экспериментах с максимальной концентрацией мочевины 7,5 М или 8 мкл ЛВП в экспериментах с максимальной концентрацией мочевины 8М. Реакционную смесь инкубировали при 25°С. Реакцию заканчивали при разбавлении реакционной смеси 2-х кратным объемом 15% глицерина в воде (для загрузки в лунки геля для проведения электрофореза) или при разбавлении средой для эффлюкса холестерина FluoroBright DMEM (Gibco). Стандартное время инкубации в наших экспериментах составляло 4 ч и 6 ч. В некоторых случаях, для более детального наблюдения за кинетикой диссоциации, дополнительно проводили реакцию в течение 0,5 ч, 1,0 ч и 2 ч.

Анализ диссоциации апоА-I.

Степень диссоциации апоА-I от пЛВП после 6 часовой инкубации пЛВП в 4,25 М мочевине при 25°С характеризуется введенным нами параметром диссоциации D в зоне полу-перехода. Для определения параметра D необходимо знать содержание апоА-I в preβ-зоне при инкубации в отсутствие и в присутствии мочевины, поэтому каждый образец пЛВП инкубировали при концентрациях мочевины 0 М и 4,25 М. После инкубации реакционную смесь разбавляли двойным объемом 15% глицерина в воде и полученный образец наносили по 6 мкл в две лунки геля для электрофореза. Электрофорез в геле 0,75% агарозы (60*80*1 мм) проводили в трис-трициновом буфере при 8°С в течение 30 мин [31], содержимое геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0,45 мкм электропереносом и содержание апоА-I оценивали с помощью иммунодетекции по величине хемилюминесцентного сигнала. Обработку хемилюмиграмм с коррекцией фона проводили с помощью программы ImageJ в ранее подобранных условиях линейности ответов из двух зон от количества нанесенного материала. Учтена повышенная иммунореактивность апоА-I в preβ-зоне по сравнению с α-зоной введением коэффициента усиления сигнала k путем сравнения интенсивностей суммы α- и preβ-зон в нативном препарате ЛВП и полностью денатурированном препарате.

Интенсивности сигналов α- и preβ-зон обозначены как α и preβ. Для каждого трека рассчитана относительная доля содержания апоА-I (preβ') в preβ-зоне по формуле 1:

$$\text{preβ}' = ((\text{preβ}/k)/(\alpha + \text{preβ}/k)) \quad (1),$$

где k - коэффициент усиления сигнала. Параметр диссоциации D в зоне полуперехода рассчитывается по формуле 2:

$$D = (pre\beta'_{4.25} - pre\beta'_0)/(1 - pre\beta'_0) \quad (2),$$

где $\text{preβ}'_{4.25}$ и $\text{preβ}'_0$ - значения долей preβ при 4,25 М и 0 М, соответственно. Для установления значимости параметра D, полученного при фиксированной концентрации мочевины 4,25 М для сравнения диссоциации апобелка от пЛВП из 48 пациентов, было проведено детальное исследование кинетики и концентрационных зависимостей денатурации с несколькими препаратами ЛВП из пациентов с различным содержанием ХС-ЛВП плазмы. Кинетические зависимости диссоциации апоА-I аппроксимировали однофазной экспонциальной зависимостью прироста (формула 3) для расчета константы

диссоциации k_d:

$$\text{преβ'} = A - B(\exp(-k_d t)) \quad (3).$$

Концентрационные зависимости диссоциации апоА-I аппроксимировали сигмоидальной зависимостью (формула 4):

$$\text{преβ'} = A_1 + A_2/(1 + \exp(-(U - U_{1/2})/H)) \quad (4),$$

где A_1 и A_2 - соответственно начальная и конечная доли преβ-апоА-I, $U_{1/2}$ и H - соответственно параметры полуперехода и кооперативности и меньшее значение H соответствует большей кооперативности. Зависимость освобождения апоА-I при действии мочевины от содержания фосфолипидов в препаратах ЛВП включает коэффициент распределения апобелка К между водной и липидной фазами, нормированный на молярность воды (формула 5):

$$K = (F/B)[\text{pHDL-PL}] \quad (5),$$

где F и B - соответственно число молекул апобелка в водной фазе и липопротеин-ассоциированном состоянии [22]. Отношение F/B рассчитано из параметра D, измеренного при 4.25 М мочевины (формула 6):

$$F/B = D/(1 - D) \quad (6).$$

В противоположность ожидаемой линейной зависимости F/B от 1/[HDL-PC], результаты наилучшим образом описывались аллометрической функцией (формула 7):

$$F/B = K(1/[\text{pHDL-PC}])^b \quad (7).$$

Влияние ПЭГ на стабильность ЛВП

ПЭГ может быть использован в определении функциональности ЛВП с учетом его свойств [30]. Полиэтиленгликоли преимущественно исключаются из белков с эквивалентным эффектом избытка воды в белковом домене и преимущественной гидратацией белка [32]. В то же время ПЭГ не индуцировал разворачивание нескольких глобулярных белков в силу сохранения специфичного парциального объема белка [33]. Однако было обнаружено дестабилизирующее действие ПЭГ при температурной денатурации [34]. В основе дестабилизирующего действия может быть взаимодействие ПЭГ с гидрофобными участками белка вследствие неполярной природы струткуры полимера [35]. Возможный дестабилизирующий эффект ПЭГ 6000-8000, использованного нами для приготовления препаратов ЛВП осаждением апоВ-содержащих липопротеинов и присутствующем в остаточной концентрации 1,43%, может влиять на стабильность пЛВП. Сниженная стабильность пЛВП может соответствовать увеличению константы скорости диссоциации мочевиной по сравнению с денатурацией солянокислым гуанидином препарата ЛВП, полученного ультрацентрифугированием [22]; в изобретении весь пул апоА-I диссоциировал от ЛВП при действии 7,5 М мочевины, тогда как в полученных ультрацентрифугированием ЛВП существовал пул недиссоциирующего апоА-I [22]. Однако известно отсутствие диссоциации апоА-I при действии ПЭГ в концентрации 15% [36], гораздо большей по сравнению с использованной нами концентрацией 1,43%. Мы полагаем возможным присутствие ПЭГ в остаточной низкой концентрации, постоянной для различных препаратов ЛВП при их одинаковой степени разведения, для изучения структурных и функциональных свойств пЛВП. Использование ПЭГ позволяет проводить масштабное (сотни образцов плазм) и быстрое (30 мин по сравнению с несколькими сутками при выделении с помощью ультрацентрифуг, отсутвующих в клинической лаборатории) выделение пЛВП из когорты пациентов с использованием имеющегося в клинической лаборатории

оборудования.

Обратимость денатурации ЛВП и механизм диссоциации апоА-I

Кинетическая природа стабильности ЛВП [21] предполагает обратимый переход для ассоциированных с липидной фазой молекул апобелка и необратимую диссоциацию апоА-I в водную фазу [4]. Gu-HCl индуцировал денатурацию ЛВП и диссоциацию свободного от липидов апоА-I [22]. Анализ влияния состава ЛВП на эти процессы не проведен, хотя отмечено увеличение сродства апоА-I к липидной фазе ЛВП при увеличении размеров ЛВП [22]. Обмен апоА-I, но не диссоциация апобелка изучен в нескольких исследованиях [23, 24, 37]. Однако обмен не определяет содержание в водной фазе свободного от липида апоА-I, необходимого для АВСА1-опосредованного эффлюкса холестерина [24]. Таким образом, способность к диссоциации апоА-I, описанная в настоящем изобретении и в работе Pownall и соавт. [22], является более прямым индикатором функциональности ЛВП по сравнению с обменом апобелка.

Гетерогенность ЛВП определяет положительное отклонение в зависимости распределения апоА-I от обратной величины содержания фосфолипидов в пЛВП (фиг. 4), характеризуемое b-параметром. Если разницу в распределении апобелка между водной и липидной фазами $ЛВП_2$ и $ЛВП_3$ аппроксимировать b-параметром, тогда различие в стандартной свободной энергии $\Delta\Delta G^0=\Delta G^0(HDL_2)-\Delta G^0(HDL_3)=-RTlnb=-1.2$ кДж/моль. Максимальное значение $\Delta\Delta G^0$ рассчитанное из отношения граничных коэффициентов распределения, равно -2,08 кДж/моль. Следовательно, апоА-I в $ЛВП_3$ относительно $ЛВП_2$ обладает большей свободной энергией и большей способностью к диссоциации. Обмен апоА-I между липидной и водной фазами включает переходное состояние с большим энтальпийным барьером, который преодолевается увеличением энтропии при обмене апобелка [24]. Перенос липида, движимый изменением энтропии, продемонстрирован для нанодисков из апоА-I и ДМФХ [38]. Различие движимого энтропией процесса диссоциации апоА-I из частиц ЛВП может быть ассоциировано со сниженной стандартной энтропией липидов в частицах $ЛВП_3$ по сравнению с $ЛВП_2$ вследствие более прочной упаковки липидов. Действительно, значения анизотропии флуоресценции флуоресцентного зонда триметиламинодифенилгексатриена [39], параметра упорядоченности двух доксил-меченных жирных кислот, ширины линий Cα фосфолипидов и углерода метальных групп жирных кислот [40] и анизотропии химического сдвига голов фосфолипидов [41] выше для $ЛВП_3$ по сравнению с $ЛВП_2$, свидетельствуя о большей ограниченности подвижности фосфолипидов в $ЛВП_3$. Однако эти результаты не согласуются с данными о большей подвижности липидов в частицах $ЛВП_3$ относительно $ЛВП_2$: поляризация флуоресценции флуоресцентного зонда Лаурдана снижена в $ЛВП_3$ относительно $ЛВП_2$ из-за дефектов упаковки липидов [42]. Pownall и соавт.предположили экспонированность гидрофобных аминокислотных остатков апоА-I в водную фазу в активированном состоянии при диссоциации апобелка, индуцированной солянокислым гуанидином [22].

АВСА1-опосредованный эффлюкс холестерина.

Получено совпадение концентрационных зависимостей диссоциации апоА-I от пЛВП под действием мочевины и стимуляции АВСА1-опосредованного эффлюкса холестерина из макрофагов мыши RAW 264.7. Совпадение зависимостей подтверждает прямое участие свободного от липидов апобелка в транспорте холестерина транспортером АВСА1 - наиболее значимого теста функциональности ЛВП как акцептора холестерина. Более того, полученная линейная зависимость между АВСА1-опосредованным

эффлюксом и содержанием свободного от липидов апоА-I (рассчитанным как произведение параметра диссоциации D и содержания апоА-I в α-ЛВП) подтверждает правомерность использования параметра диссоциации D - индикатора силы апобелок-липидных взаимодействий - в расчете содержания свободного от липидов апоА-I, доступного для транспорта холестерина через АВСА1.

Зависимый от апоА-I эффлюкс липидов прямо пропорционально зависел от цАМФ-индуцированного связывания апоА-I и выраженно ингибировался моноклональным антителом к свободному от липидов апобелку как в случае изолированного апоА-I, так и в случае ЛВП в качестве акцептора холестерина [25]. Авторами была предположена основная роль апоА-I, диссоциировавшего при разведении ЛВП, при акцепции холестерина, транспортированного АВСА1. Хотя использованы $ЛВП_2$ и $ЛВП_3$, в работе не проводилось сравнение степени диссоциации апобелка от этих ЛВП [25]. Также расчетное значение константы диссоциации 10^{-8}-10^{-9} М для реакции связывания апоА-I с ЛВП [25] контрастирует с известным значением этой величины 10^{-5} М для $ЛВП_2$ и $ЛВП_3$, полученным Lund-Katz и соавт. [20]. Okuhira и соавт.заключили о необходимости дальнейшей работы по идентификации участка и природы связывания апоА-I [25]. В нашем изобретении впервые получена значимая положительная корреляция между АВСА1-опосредованным эффлюксом и содержанием апоА-I, диссоциировавшего от ЛВП. Независимо от отмеченных ограничений и несовпадений, одним из главных заключений в нашем изобретении и в работе Okuhira и соавт.[25] является вывод об участии только апобелка, но не целой частицы ЛВП в АВСА1-опосредованном эффлюксе холестерина.

Результатом изобретения является обнаружение значимости распределения апоА-I между водной и липидной фазами и сниженного содержания фосфолипидов в пЛВП в увеличенную диссоциацию апобелка от ЛВП. В условиях локального ацидоза в атероме увеличенная диссоциация свободного от липидов апоА-I - основного акцептора холестерина в АВСА1-опосредованном эффлюксе холестерина - может приводить к увеличенному выходу холестерина из нагруженных липидами макрофагов с манифестацией эффекта для пациентов со сниженным содержанием ХС-ЛВП. Способность ЛВП к диссоциации апоА-I может определять их новую функциональную характеристику, значимую в атеропротективном эффекте ЛВП. Наблюдается баланс между атеропротективными свойствами больших частиц $ЛВП_2$ и увеличенной потенцией небольших $ЛВП_2$ к освобождению свободного от липида апоА-I. Существование баланса разрешает парадокс между вкладом преβ-ЛВП и α-ЛВП в атеропротективный эффект ЛВП [43].

Таким образом, предложен новый подход количественной оценки стабильности частиц ЛВП для большого числа пациентов, основанный на измерении степени диссоциации липопротеин-ассоциированного апоА-I в водную фазу. Основу подхода составляет измерение накопления апоА-I в преβ-зоне при электрофорезе денатурированных мочевиной пЛВП в геле агарозы и последующей иммунодетекции апобелка в реплике геля. Препараты ЛВП приготовлены быстрой преципитацией апоВ-содержащих липопротеинов полиэтиленгликолем в соответствии с известным применением метода в клинических исследованиях функциональных свойств ЛВП [1, 44]. Кроме того, использование BODIPY-холестерина позволяет проводить масштабное количественное определение эффлюкса холестерина на доступном оборудовании без использования радиоактивного трейсера [8, 28].

Примеры осуществления изобретения.

В исследовании участвовали 48 пациентов-мужчин 40-60 лет без коронарного атеросклероза и с широко-варьирующим содержанием ХС-ЛВП плазмы. Критериями включения служили отсутствие коронарной недостаточности и стеноза коронарных/сонных артерий по данным коронарной ангиографии и ультразвукового исследования, отсутствие гипертонии, диабета и алкоголизма, отсутствие терапии кортикостероидами и липид-понижающими препаратами по крайней мере за последние три месяца. Получены информированное согласие от каждого пациента на участие в исследование и разрешение локального этического комитета в соответствии с Хельсинской декларацией 1975 года. Содержание липидов плазмы измерено ферментными методами с использованием автоанализатора Architect c8000 (Abbott, USA). Содержание апобелков апоА и апоВ измерены турбидиметрией с наборами DiaSys на автоанализаторе Sapphire 400. Содержание холин-содержащих фосфолипидов и общего холестерина в препарах ЛВП измеряли ферментными методами с использованием наборов Sentinel (Italy) и HUMAN (Germany) соответственно.

Изучен механизм диссоциации хаотропным агентом мочевиной препаратов ЛВП из плазмы крови 48 пациентов-мужчин без атеросклероза с содержанием ХС-ЛВП плазмы от 0,59 до 2,24 мМ (Таблица 1). Препараты ЛВП получены преципитацией апоВ-содержащих липопротеинов плазмы полиэтиленгликолем и оценено влияние ПЭГ на распределение апоА-I. Результаты по распределению апобелка между двумя полосами для плазмы, сыворотки, апоВ-истощенной плазмы и апоВ-истощенной сыворотки для двух пациентов с содержанием ХС-ЛВП плазмы 1,01 и 1,33 мМ представлены на фиг. 1а. Доля преβ-апоА-I составляла соответственно 0,04 и 0,08 и существенно не изменялась для различно-приготовленных образцов, хотя нельзя полностью исключить некоторую потерю апоА-I при обработке полиэтиленгликолем. Доля преβ-апоА-I хорошо соответствовала результатам Asztalos и соавт.[26, 27]. Во всей работе использованы препараты ЛВП при одинаковом разведении при фиксированной концентрации ПЭГ 1,43%, что нивелирует возможное влияние ПЭГ. В предварительных экспериментах по денатурации пЛВП с сопутствующей диссоциацией апобелка, изученной с использованием электрофореза в геле агарозы с последующей иммунодетекцией распределения апоА-I между преβ-полосой и α-полосой, выявлено непропорциональное увеличение преβ-апоА-I при денатурации вследствие увеличенной иммунореактивности свободного от липидов апобелка. Для коррекции этого эффекта использован коэффициент коррекции k 1,82, рассчитанный из отношения сумм (преβ+α) для полностью денатурированного и нативного препаратов ЛВП. Во всех экспериментах хемилюминесцентный преβ-сигнал делили на коэффициент коррекции.

Таблица 1

Содержание липидов и антропометрические данные пациентов.

	среднее значение ± СО	Вариабельность
ХС плазмы, мМ	5.08 ± 1.19	2.4 – 7,8
ХС-ЛВП, мМ	1.18 ± 0.33	0.59 – 2,24
ХС-ЛНП, Мм	3.18 ± 0.98	1.14 - 5,98
ТГ плазмы, мМ	1.57 ± 0.74	0.59 – 3,42
возраст, год	49.1 ± 5.8	40 - 60
ИМТ, кг/м^2	28.7 ± 3.1	21 - 36
Приведены среднее значение ± стандартное отклонение СО и размах вариабельности как минимальное и максимальное значения параметров (n = 48). ИМТ – индекс массы тела.		

Кинетика и концентрационная зависимость денатурации пЛВП.

Кинетика денатурации пЛВП изучена по диссоциации апоА-I с соответствующим

снижением интенсивности α-ЛВП и увеличением интенсивности свободного от липидов апоА-I в преβ-зоне для двух групп пациентов с низким и высоким содержанием ХС-ЛВП плазмы при инкубации пЛВП до 6 ч при 25°С с мочевиной в различной концентрации. Результаты репрезентативного эксперимента с одиночными препаратами ЛВП из двух групп представлены на фиг. 1б. Данные подгоняли под одноэкспоненциальную функцию связывания (формула 3) и параметры аппроксимации даны в таблице 2. Параметр В как амплитуда связывания зависит от концентрации мочевины и концентрации ХС-ЛВП плазмы; для группы с высоким содержанием ХС-ЛВП амплитуда возрастала от 0,55±0,13 до 0,73±0,10 при увеличении концентрации мочевины от 4,5 М до 6 М.

Таблица 2

Кинетика диссоциации апоА-I от пЛВП при действии мочевины.

Набор данных	мочевина, М	*A*	*B*	k_d, $ч^{-1}$
Н4,5	4,5	0,79 ± 0,05	0,77 ± 0,06	2,30± 0,76
Н6,0	6,0	0,91 ±0,04[a]	0,89 ±0,05	4,57 ± 1,49[a]
В4,5	4,5	0,61 ± 0,11[b,c]	0,55 ± 0,13[b,c]	0,81 ± 0,32[b,c]
В6,0	6,0	0,79 ± 0,09[d,e]	0,73 ± 0,10[d,e]	1,68 ± 0,85[d]

$p < 0,05$ для множественного сравнения с помощью Fisher LSD теста. [a] значимое различие между наборами Н4,5 и Н6,0; [b] значимое различие между наборами Н4,5 и В4,5; [c] значимое различие между наборами Н6,0 и В4,5; [d] значимое различие между наборами Н6,0 и В6,0; [e] значимое различие между наборами В4,5 и В6,0.

Препараты ЛВП из двух групп пациентов с низким (Н) и высоким (В) содержанием ХС-ЛВП инкубировали с 4,5 и 6,0 М мочевины до 6 часов. Содержание ХС-ЛВП в Н- (0.74 ± 0.14 mM (n = 4)) и В-группах (1.74 ± 0.36 mM (n = 4)) значимо различалось при сравнении с помощью парного двустороннего *t* теста ($p = 0,026$).Параметры диссоциации получены при нелинейной аппроксимации однофазной экспоненциальной ассоциацией (формула 3). Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

Амплитуды степени диссоциации апобелка от пЛВП из пациентов с низким содержанием ХС-ЛВП были больше значений для группы с высоким содержанием ХС-ЛВП при обеих концентрациях мочевины, свидетельствуя о снижении стабильности. Константы скорости диссоциации апоА-I от пЛВП k_d изменялись аналогичным образом.

Отметим, что значение k_d 0,81±0,32 $ч^{-1}$ при 4,5 М мочевины в зоне полуперехода при денатурации пЛВП из пациентов с высоким содержанием ХС-ЛВП было в 4 раза больше аналогичного значения для диссоциации апобелка при Gu-HCl-индуцированной денатурации ЛВП, изолированных ультрацентрифугированием [22]. Инкубация с мочевиной в течение 6 часов приводила к полной диссоциации апоА-I от пЛВП и инкубация в течение 24 часов не приводила к росту диссоциации. Для репрезентативной группы из пяти пациентов с содержанием ХС-ЛВП 0,72-2,24 мМ получены концентрационные зависимости денатурации пЛВП после инкубации с мочевиной в различных концентрациях в течение 6 ч при pH 7,4 и 25°С (фиг. 2а). Результаты аппроксимировали сигмоидальной функцией с одним переходом (фиг. 2б) и параметры аппроксимации даны в таблице 3. Переход от нативного к полностью денатурированному состоянию приводит к полной диссоциации апоА-I от α-ЛВП с накоплением свободного от липидов апобелка в преβ-зоне. Отметим отсутствие в нашей работе пула апобелка, устойчивого к хаотропному агенту, в отличие от данных Pownall и соавт. [22]. Параметры перехода зависели от содержания ХС-ЛВП плазмы (таблица 3) и содержания холестерина в полученных преципитацией пЛВП. Величина

полуперехода $U_{1/2}$

Таблица 3

Параметры сигмоидальной зависимости диссоциации апоА-I от пЛВП при действии мочевины.

Пациент	ХС-ЛВП, мМ	A_1	A_2	$U_{1/2}$, mM	H	D
16	1,76	0,015 ± 0,020	0,996 ± 0,041	4,434 ± 0,088	0,968 ± 0,088	0,426
21	2,24	-0,024 ± 0,048	1,152 ± 0,142	4,879 ± 0,299	1,335 ± 0,265	0,377
28	0,72	0,027 ± 0,018	0,990 ± 0,029	4,121 ± 0,055	0,741 ± 0,059	0,646
33	0,90	-0,007 ± 0,020	1,013 ± 0,035	4,392 ± 0,068	0,578 ±0,072	0,509
34	1,22	-0,003 ± 0,030	1,053 ± 0,068	4,694 ± 0,144	0,876 ± 0,126	0,477

Данные для пяти пациентов аппроксимировали сигмоидальной зависимостью (формула 4). Параметры A_1 и A_2 –начальное и конечное значение доли содержания апоА-I в преβ-полосе, $U_{1/2}$ и H – значения полу-перехода и кооперативности (меньшее значение H соответствует большей кооперативности). Независимо измеренный параметр диссоциации D является степенью диссоциации апобелка после инкубации пЛВП с 4,25 М мочевины в течение 6 ч и рассчитан с использованием формулы 2.

(фиг. 3а) и параметр кооперативности Н (фиг. 3б), увеличивающийся при снижении кооперативности, линейно возрастали при увеличении содержания холестерине в препаратах ЛВП. Эти зависимости свидетельствуют об увеличении стабильности и гетерогенности частиц ЛВП при увеличении содержания ХС-ЛВП плазмы и холестерина в препаратах ЛВП. Кроме того, независимо измеренный параметр диссоциации $D_{изм}$ линейно возрастал при увеличении рассчитанного из параметров перехода параметра диссоциации $D_{расч}$ (фиг. 3в). Линейная зависимость с углом наклона 1,08±0,06 свидетельствует о возможности использования одиночного параметра диссоциации D в серийных измерениях стабильности ЛВП к денатурирующему действию мочевины.

Механизм диссоциации апоА-I.

Измерен параметр диссоциации D апоА-I от препаратов ЛВП из 48 пациентов после инкубации при 25°С в течение 6 ч при pH 7,4 пЛВП с мочевиной в концентрации 4,25 М в зоне полуперехода. Параметр D рассчитан по формуле 2 как прирост доли преβ-апоА-I относительно нативных пЛВП. Диссоциацию описывали моделью распределения апобелка между фосфолипидной фазой ЛВП и водной фазой в соответствии с относительными размерами фаз. В этом случае ожидается линейная зависимость отношения F/B концентраций свободного от липидов (F) и липопротеин-ассоциированного апобелка (B) от обратной величины молярности фосфолипидов 1/[PL], полученная для серийных разведений одиночного препарата ЛВП [22] с коэффициентом распределения К. Отношение F/B рассчитано из параметра D по формуле 6. Зависимость F/B от 1/[PL] для 48 индивидуальных препаратов ЛВП отклонялась от линейной и хорошо описывалась аллометрической функцией $F/B=AT(1/[pHDL\text{-}PC])^b$ с параметрами К=0.069±0.022 мМ и b=1.59±0.17 (фиг. 4). Значение К превышало в три раза аналогичное значение в работе Pownall и соавт. [22]. Область варьирования данных заключена между верхней и нижней линейными зависимостями с наклонами, равными наименьшему и наибольшему распределению апобелка в липидную фазу с изменением коэффициента распределения в 2.32 раза (фиг. 4).

Полученное положительное отклонение от линейной зависимости F/B=K/[PL], то есть увеличение диссоциации при снижении содержания фосфолипидов ЛВП, происходит вследствие относительного увеличения содержания небольших ЛВП при снижении содержания ХС-ЛВП плазмы [45, 46]. Действительно, вариация содержания ЛВП в популяции обусловлена вариацией содержания больших частиц ЛВП [47]. С

использованием скоростного зонального ультрацентрифугирования установлен состав больших частиц ЛВП$_2$ как 37,6% белка и 27,7% фосфолипидов, тогда как небольшие ЛВП$_{3D}$ содержат 59,5% белка и 21,9% фосфолипидов [48]. Состав небольших ЛВП характеризуется сниженным содержанием основного фосфатидилхолина 18:2/16:0; среднее значение молярного отношения ФХ:апоА-I для больших ЛВП$_{2b}$ и ЛВП$_{2a}$ варьирует от 11,2 до 13,8, тогда как это значение для небольших ЛВП$_{3a}$ и ЛВП$_{3c}$ варьирует от 13,2 до 4,0. Пределы вариаций рассчитаны нами из данных Kontush и соавт. [49]. Таким образом, липидная фаза небольших частиц ЛВП$_3$ относительно больших ЛВП$_2$ обеднена фосфолипидом относительно белка. Увеличенное отношение ФЛ:белок в пЛВП из плазм с увеличенным содержанием ХС-ЛВП может определять увеличение сродства апоА-I к липидной фазе ЛВП вследствие увеличенной площади контакта белка с липидом. Кроме того, Pownall и соавт.выявили сниженную стабильность вторичной структуры апоА-I в небольших ЛВП и их увеличенный вклад в содержание свободного от липидов апобелка [22]. Основное преимущество нашей работы относительно работы Pownall и соавт.заключается в использовании в нашей работе 48 индивидуальных препаратов ЛВП с варьирующей степенью гетерогенности частиц. Степень диссоциации апоА-I от различных пЛВП изменялась внутри области, ограниченной линейными зависимостями для небольших обедненных по фосфолипидам частиц ЛВП$_3$ и больших по размеру фосфолипид-обогащенных частиц ЛВП$_2$ (фиг. 4), тогда как Pownall и соавт. использовали единственный препарат ЛВП с постоянным относительным содержанием больших и небольших ЛВП при разведении [22]. Это лежит в основе аллометрической зависимости распределения апоА-I в нашей работе и линейной зависимости без признаков гетерогенности частиц ЛВП в работе Pownall и соавт.

Участие апоА-I в акцепции холестерина.

Зависимость эффлюкса BODIPY-холестерина из линии макрофагов мыши RAW 264.7 от содержания пЛВП, предварительно инкубированных с мочевиной при pH 7,4 в течение 6 ч при 25°C, также подчинялась сигмоидальной зависимости. В серийных экспериментах 14 препаратов ЛВП предварительно инкубировали с мочевиной в концентрации 4,25 M в течение 6 ч при 25°C и затем измеряли эффлюкс холестерина при добавлении пЛВП в среду в разведении 0,08%. ABCA1-опосредованный эффлюкс рассчитан как разница между ц-АМФ-стимулированным и базальным эффлюксом и нормирован на флуоресценцию флуоресцеина. Получена значимая положительная корреляция между величиной ABCA1-опосредованного эффлюкса и содержанием диссоциировавшего апоА-I, рассчитанным как произведение параметра диссоциации D и содержания апобелка в α-ЛВП (фиг. 5). Последняя величина измерена с помощью электрофореза цельной плазмы в геле агарозы с последующей иммунодетекцией распределения апоА-I. Таким образом, ABCA1-опосредованный эффлюкс как наиболее значимый процесс в выходе клеточного холестерина определяется содержанием свободного от липида апоА-I. Полученная линейная зависимость подтверждает возможность использования параметра D в расчете содержания необходимого для ABCA1-опосредованного эффлюкса свободного от липида апоА-I в качестве акцептора холестерина в экспериментах с использованием стандартной линии клеток в качестве донора холестерина.

Список источников

1. Rohatgi A., Khera A., Berry J.D., Givens E.G., Ayers C.R., Wedin K.E., Neeland I.J., Yuhanna I.S., Rader D.R., de Lemos J.A., Shaul P.W. HDL cholesterol efflux capacity and incident

cardiovascular events // N. Engl. J Med - 2014. - Vol. 371 No. 25. - P. 2383-2393.

2. Litvinov D.Y., Savushkin E.V., Garaeva E.A., Dergunov A.D. Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport: Experimental Approaches // Curr Med Chem - 2016. - Vol. 23 No. 34. - P. 3883-3908.

3. Phillips M.C. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux // J. Biol. Chem. - 2014. - Vol. 289 No. 35. - P. 24020-24029.

4. Dergunov A.D., Garaeva E.A., Savushkin E.V., Litvinov D.Y. Significance of Lipid-Free and Lipid-Associated ApoA-I in Cellular Cho-lesterol Efflux // Curr Protein Pept. Sci - 2017. - Vol. 18 No. 1. - P. 92-99.

5. Miyazaki O., Ogihara J., Fukamachi I., Kasumi T. Evidence for the presence of lipid-free monomolecular apolipoprotein A-1 in plasma // J Lipid Res. - 2014. - Vol. 55 No.2. - P. 214-225.

6. Phillips M.C. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins: Thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism // J Lipid Res. - 2013. - Vol. 54 No. 8. - P. 2034-2048.

7. Kontush A., Lhomme M., Chapman M.J. Unraveling the complexities of the HDL lipidome // J Lipid Res. - 2013. - Vol. 54 No. 11. - P. 2950-2963.

8. Dergunov A.D., Litvinov D.Y., Bazaeva E.V., Dmitrieva V.G., Nosova E.V., Rozhkova A.V., Dergunova L.V. Relation of High-Density Lipoprotein Charge Heterogeneity, Cholesterol Efflux Capacity, and the Expression of High-Density Lipoprotein-Related Genes in Mononuclear Cells to the HDL-Cholesterol Level // Lipids - 2018. - Vol. 53 No. 10. - P. 979-991.

9. Dergunov A.D. Sequence-specific apolipoprotein A-I effects on lecithinxholesterol acyltransferase activity // Mol Cell Biochem - 2013. - Vol. 378 No. 1-2. - P. 283-290.

10. Dergunov A.D. A mechanistic model of lecithinxholesterol acyltransferase activity exploits discoidal HDL composition and structure // Arch Biochem Biophys - 2012. - Vol. 520 No. 2. - P. 81-87.

11. Dergunov A.D. Kinetic analysis of lecithinxholesterol acyltransferase activity toward discoidal HDL // Lipids - 2011. - Vol. 46 No. 11. - P. 1075-1079.

12. Nanjee M.N., Brinton E.A. Very small apolipoprotein A-I-containing particles from human plasma: isolation and quantification by high-performance size-exclusion chromatography // Clin Chem - 2000. - Vol. 46 No. 2. - P. 207-223.

13. Asztalos B.F., Brousseau M.E., McNamara J.R., Horvath K.V., Roheim P.S., Schaefer E.J. Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease // Atherosclerosis - 2001. - Vol. 156 No. 1. - P. 217-225.

14. Chen Y., Dong J., Chen X., Jiang H., Bakillah A., Zhang X., Li Z., Yin J., Liang D., Zou Y., Hussain M., Cuchel M., Rader D., Chen H., Ge J., Jiang X.C. Human serum preOIl-high density lipoprotein levels are independently and negatively associated with coronary artery diseases // Nutr. Metab (Lond) - 2016. - Vol. 1336.

15. Borhani D.W., Rogers D.P., Engler J.A., Brouillette C.G. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation // Proc Natl Acad Sci USA - 1997. - Vol. 94 No. 23. - P. 12291-12296.

16. Mei X., Atkinson D. Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein A-I reveals the assembly of high density lipoprotein (HDL) by dimerization // J Biol Chem. - 2011. - Vol. 286 No. 44. - P. 38570-38582.

17. Mucchiano G.I., Jonasson L., Haggqvist B., Einarsson E., Westermark P. Apolipoprotein A-I-derived amyloid in atherosclerosis. Its association with plasma levels of apolipoprotein A-I and cholesterol // Am. J Clin Pathol. - 2001. - Vol. 115 No. 2. - P. 298-303.

18. Nguyen S.D., Oorni K., Lee-Rueckert M., Pihlajamaa T., Metso J., Jauhiainen M., Kovanen P.T. Spontaneous remodeling of HDL particles at acidic pH enhances their capacity to induce

cholesterol efflux from human macrophage foam cells // J Lipid Res - 2012. - Vol. 53 No. 10. - P. 2115-2125.

19. Oorni K., Rajamaki K., Nguyen S.D., Lahdesmaki K., Plihtari R., Lee-Rueckert M., Kovanen P.T. Acidification of the intimal fluid: the perfect storm for atherogenesis // J Lipid Res - 2015. - Vol. 56 No. 2. - P. 203-214.

20. Lund-Katz S., Nguyen D., Dhanasekaran P., Kono M., Nickel M., Saito H., Phillips M.C. Surface plasmon resonance analysis of the mechanism of binding of apoA-I to high density lipoprotein particles // J Lipid Res - 2010. - Vol. 51 No.3. - P. 606-617.

21. Gursky O. Structural stability and functional remodeling of high-density lipoproteins // FEBS Lett. - 2015. - Vol. 589 No. 19 Pt A. - P. 2627-2639.

22. Pownall H.J., Hosken B.D., Gillard B.K., Higgins C.L., Lin H.Y., Massey J.B. Speciation of human plasma high-density lipoprotein (HDL): HDL stability and apolipoprotein A-I partitioning // Biochemistry - 2007. - Vol. 46 No. 25. - P. 7449-7459.

23. Borja M.S., Zhao L., Hammerson B., Tang C, Yang R., Carson N., Fernando G., Liu X., Budamagunta M.S., Genest J., Shearer G.C., Duclos F., Oda M.N. HDL-apoA-I exchange: rapid detection and association with atherosclerosis // PLoS. One. - 2013. - Vol. 8 No. 8. - P. e71541.

24. Handa D., Kimura H., Oka T., Takechi Y., Okuhira K., Phillips M.C, Saito H. Kinetic and thermodynamic analyses of spontaneous exchange between high-density lipoprotein-bound and lipid-free apolipoprotein A-I // Biochemistry - 2015. - Vol. 54 No.4. - P. 1123-1131.

25. Okuhira K., Tsujita M., Yamauchi Y., Abe-Dohmae S., Kato K., Handa T., Yokoyama S. Potential involvement of dissociated apoA-I in the ABCA1-dependent cellular lipid release by HDL // J Lipid Res. - 2004. - Vol. 45 No. 4. - P. 645-652.

26. Asztalos B.F., Roheim P.S., Milani R.L., Lefevre M., McNamara J.R., Horvath K.V., Schaefer E.J. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease // Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. - 2000. - Vol. 20 No. 12. - P. 2670-2676.

27. Asztalos B.F., Cupples L.A., Demissie S., Horvath K.V., Cox C.E., Batista M.C, Schaefer E.J. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study // Arterioscler Thromb Vase Biol - 2004. - Vol. 24 No. 11. - P. 2181-2187.

28. Sankaranarayanan S., Kellner-Weibel G., Llera-Moya M., Phillips M.C, Asztalos B.F., Bittman R., Rothblat G.H. A sensitive assay for ABC A1-mediated cholesterol efflux using BODIPY-cholesterol // J Lipid Res - 2011. - Vol. 52 No.12. - P. 2332-2340.

29. Briggs C.J., Anderson D., Johnson P., Deegan T. Evaluation of the polyethylene glycol precipitation method for the estimation of high-density lipoprotein cholesterol // Ann. Clin. Biochem. - 1981. - Vol. 18 No. Pt 3. - P. 177-181.

30. Davidson W.S., Heink A., Sexmith H., Melchior J.T., Gordon S.M., Kuklenyik Z., Woollett L., Barr J.R., Jones J.I., Toth C.A., Shah A.S. The effects of apolipoprotein B depletion on HDL subspecies composition and function // J Lipid Res. - 2016. - Vol. 57 No.4. - P. 674-686.

31. Asztalos B.F., Sloop C.H., Wong L., Roheim P.S. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations // Biochim Biophys Acta - 1993. - Vol. 1169 No.3. - P. 291-300.

32. Lee J.C, Lee L.L. Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols // J Biol Chem - 1981. - Vol. 256 No. 2. - P. 625-631.

33. Bhat R., Timasheff S.N. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols // Protein Sci - 1992. - Vol. 1 No.9. - P. 1133-1143.

34. Lee L.L., Lee J.C. Thermal stability of proteins in the presence of poly(ethylene glycols) // Biochemistry - 1987. - Vol. 26 No. 24. - P. 7813-7819.

35. Arakawa T., Timasheff S.N. Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins // Biochemistry - 1985. - Vol. 24 No. 24. - P. 6756-6762.

36. Jayaraman S., Gantz D.L., Gursky O. Poly(ethylene glycol)-induced fusion and destabilization of human plasma high-density lipoproteins // Biochemistry - 2004. - Vol. 43 No. 18. - P. 5520-5531.

37. Borja M.S., Ng K.F., Irwin A., Hong J., Wu X., Isquith D., Zhao X.Q., Prazen B., Gildengorin V., Oda M.N., Vaisar T. HDL-apolipoprotein A-I exchange is independently associated with cholesterol efflux capacity // J Lipid Res. - 2015. - Vol. 56 No. 10. - P. 2002-2009.

38. Matsuzaki N., Handa T., Nakano M. Kinetic and Thermodynamic Analysis of Cholesterol Transfer between Phospholipid Vesicles and Nanodiscs // J. Phys. Chem. B - 2015. - Vol. 119 No. 30. - P. 9764-9771.

39. Ben-Yashar V., Barenholz Y. Characterization of the core and surface of human plasma lipoproteins. A study based on the use of five fluorophores // Chem. Phys. Lipids - 1991. - Vol. 6O No. 1. - P. 1-14.

40. Brainard J.R., Knapp R.D., Patsch J.R., Gotto A.M., Jr., Morrisett J.D. Dynamics of lipid motions in high-density lipoprotein subtractions HDL2 and HDL3: magnetic resonance studies // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1980. - Vol. 348299-317.

41. Fenske D.B., Chana R.S., Parmar Y.I., Treleaven W.D., Cushley R.J. Structure and motion of phospholipids in human plasma lipoproteins. A 31P NMR study // Biochemistry - 1990. - Vol. 29 No. 16. - P. 3973-3981.

42. Nguyen D., Nickel M., Mizuguchi C, Saito H., Lund-Katz S., Phillips M.C. Interactions of apolipoprotein A-I with high-density lipoprotein particles // Biochemistry - 2013. - Vol. 52 No. 11. - P. 1963-1972.

43. Asztalos B.F., Horvath K.V., Schaefer E.J. High-Density Lipoprotein Particles, Cell-Cholesterol Efflux, and Coronary Heart Disease Risk // Arterioscler Thromb Vase Biol - 2018. - Vol. 38 No.9. - P. 2007-2015.

44. Shea S., Stein J.H., Jorgensen N.W., McClelland R.L., Tascau L., Shrager S., Heinecke J. W., Yvan-Charvet L., Tall A.R. Cholesterol Mass Efflux Capacity, Incident Cardiovascular Disease, and Progression of Carotid Plaque // Arterioscler Thromb Vase Biol - 2019. - Vol. 39 No.1. - P. 89-96.

45. Rosenson R.S., Brewer H.B., Jr., Chapman M.J., Fazio S., Hussain M.M., Kontush A., Krauss R.M., Otvos J.D., Remaley A.T., Schaefer E.J. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events // Clin Chem - 2011. - Vol. 57 No. 3. - P. 392-410.

46. Mendivil CO., Furtado J., Morton A.M., Wang L., Sacks F.M. Novel Pathways of Apolipoprotein A-I Metabolism in High-Density Lipoprotein of Different Sizes in Humans // Arterioscler Thromb Vase Biol - 2016. - Vol. 36 No. 1. - P. 156-165.

47. Anderson D.W., Nichols A.V., Pan S.S., Lindgren F.T. High density lipoprotein distribution. Resolution and determination of three major components in a normal population sample // Atherosclerosis - 1978. - Vol. 29 No.2. - P. 161-179.

48. Patsch W., Schonfeld G., Gotto A.M., Jr., Patsch J.R. Characterization of human high density lipoproteins by zonal ultracentrifugation // J Biol Chem. - 1980. - Vol. 255 No.7. - P. 3178-3185.

49. Kontush A., Therond P., Zerrad A., Couturier M., Negre-Salvayre A., de Souza J.A., Chantepie S., Chapman M.J. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities // Arterioscler Thromb Vase Biol - 2007. - Vol. 27 No. 8. - P. 1843-1849.

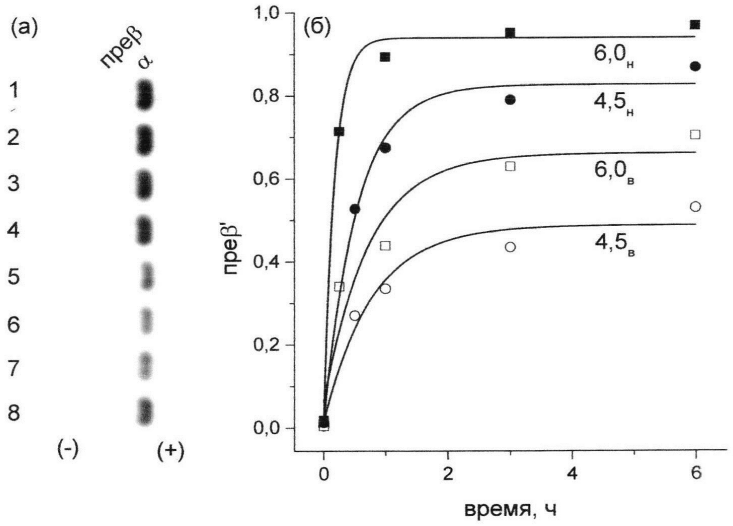
(57) Формула изобретения

Способ определения степени диссоциации апобелка A-I включает забор крови у пациентов-мужчин без атеросклероза и проведение денатурации мочевиной препаратов липопротеинов высокой плотности (ЛВП), полученных преципитацией апоB-содержащих липопротеинов полиэтиленгликолем, измерение происходящей при денатурации ЛВП диссоциации апоA-I по накоплению преβ-апоA-I при разделении ЛВП электрофорезом в геле агарозы с последующей иммунодетекцией апобелка в реплике геля, влияние индукции диссоциации апоA-I мочевиной на функциональные свойства ЛВП выявляют измерением ABCA1-опосредованного эффлюкса флуоресцентного аналога холестерина из линии макрофагов мыши RAW 264.7 на ЛВП пациентов как акцептор холестерина, затем степень диссоциации апоA-I (D) рассчитывают как прирост доли преβ-апоA-I относительно нативных ЛВП по формуле:

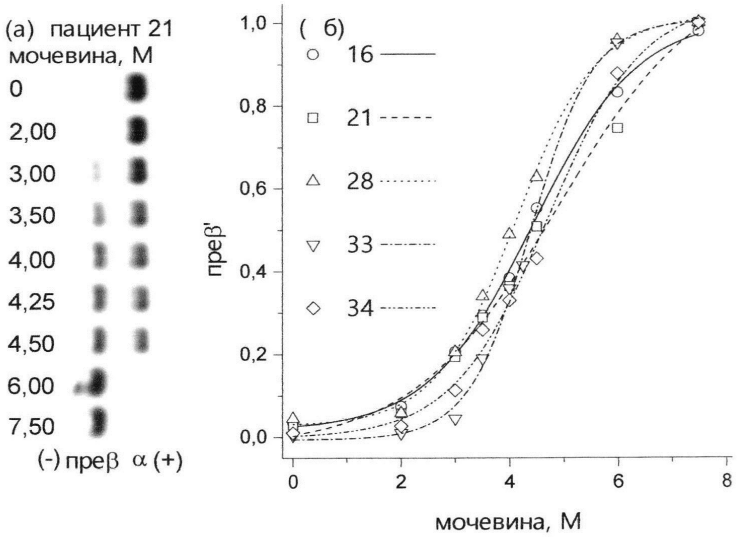
$$D = (\text{преβ}'_{4.25} - \text{преβ}'_0)/(1 - \text{преβ}'_0),$$

где $\text{преβ}'_{4.25}$ и $\text{преβ}'_0$ - значения долей prep при концентрации мочевины 4,25 М и 0 М соответственно.

1

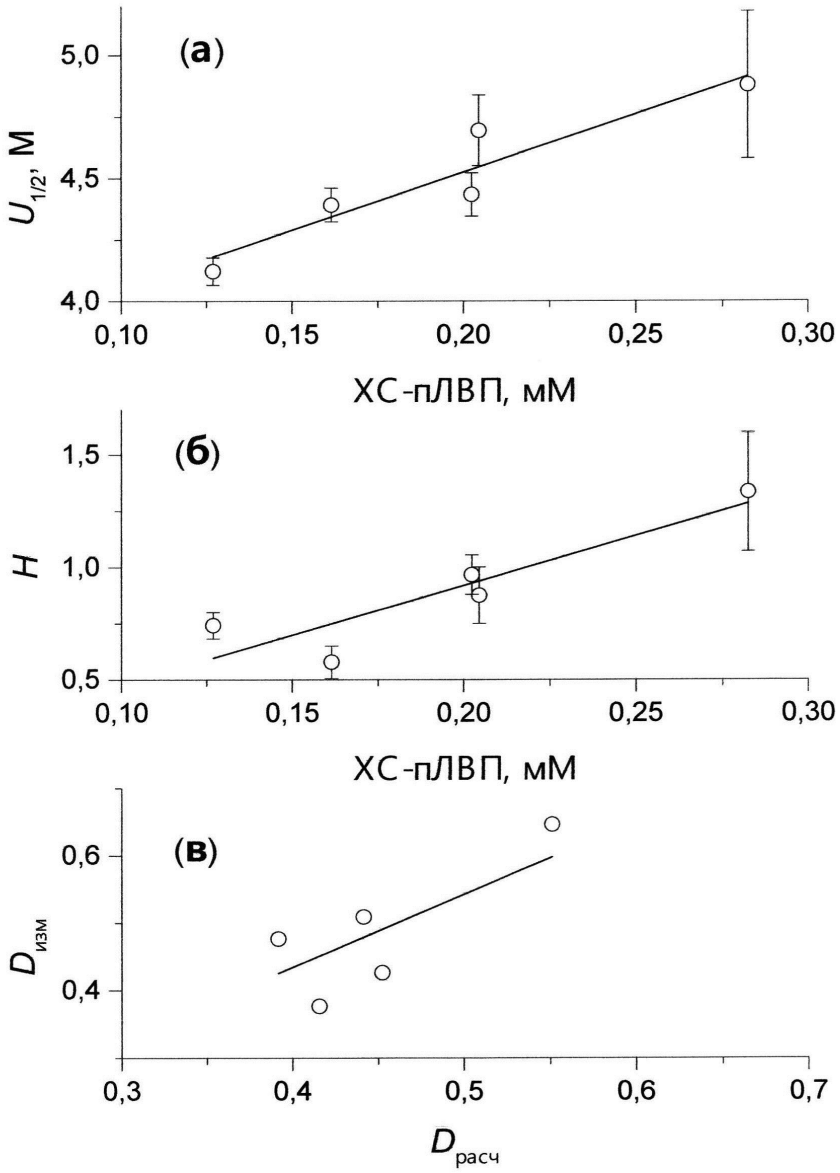

(а)
преβ
α
1
2
3
4
5
6
7
8
(-)
(+)
(б)
6,0н
4,5н
6,0в
4,5в
преβ'
время, ч

Фиг. 1


(а) пациент 21
мочевина, М
0
2,00
3,00
3,50
4,00
4,25
4,50
6,00
7,50
(-) преβ α (+)
(б)
16
21
28
33
34
преβ'
мочевина, М

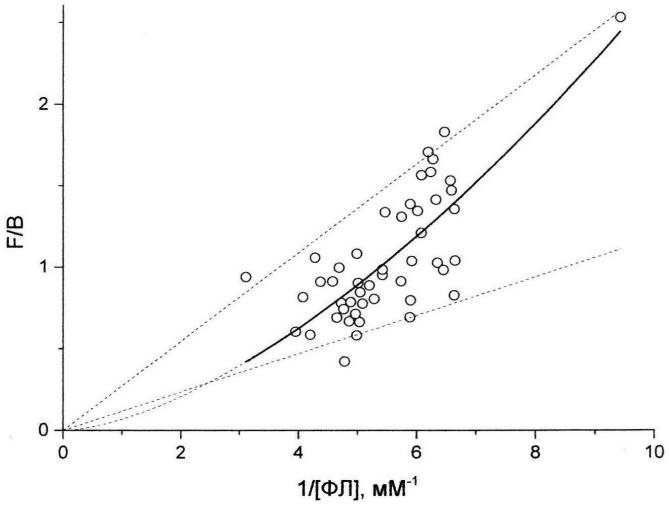
Фиг. 2

2

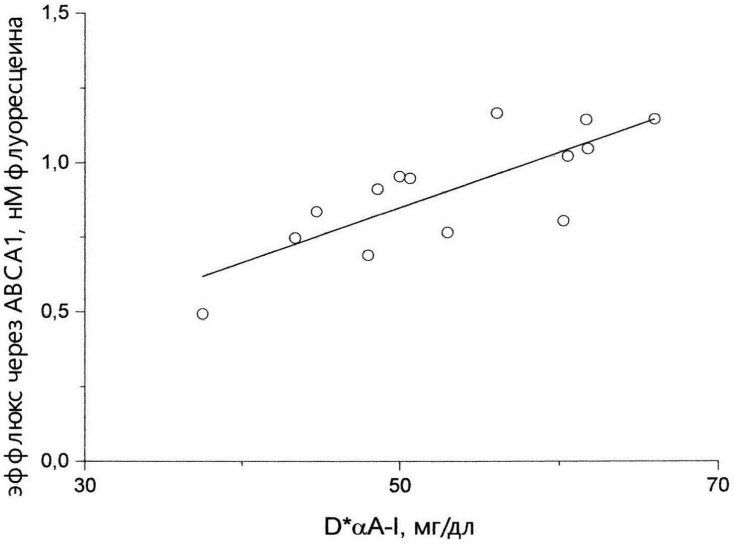

(а)
5,0
4,5
4,0
$U_{1/2}$, М
0,10
0,15
0,20
0,25
0,30
ХС-пЛВП, мМ
(б)
1,5
1,0
0,5
H
0,10
0,15
0,20
0,25
0,30
ХС-пЛВП, мМ
(в)
0,6
0,4
$D_{изм}$
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
$D_{расч}$

Фиг. 3

3


F/B
0
1
2
0
2
4
6
8
10
1/[ФЛ], мМ-1

Фиг. 4


эффлюкс через ABCA1, нМ флуоресцеина
0,0
0,5
1,0
1,5
30
50
70
D*αA-I, мг/дл

Фиг. 5