



Структура и функция биополимеров

УДК 532.72.097

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В ПРОЦЕССЕ НАСЫЩЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНОМ

В. А. Поскин, Г. Е. Шмелев, А. В. Ломакин, Л. Г. Петрова-Маслакова,
И. С. Парфенова, Е. В. Белова, А. Н. Климов

Введение. Известно, что липопротеины и клеточные мембраны могут обмениваться неэстерифицированным холестерином. В ранних работах, посвященных исследованию этого вопроса, высказывались предположения о механизме такого обмена и предлагались теории, основанные на недостаточных доказательствах. Так, в работе [1] рассматривалось существование водорастворимого промежуточного вещества, способного переносить холестерин между эритроцитами и плазменными липопротеинами. С другой стороны, наличие у липопротеинов специфических белков (апопротеинов) привело к предположению, что эти белки инициируют обмен [2]. Был предложен и другой механизм обмена — образование комплекса между эритроцитами и липопротеином, в пределах которого происходит обмен холестерином [3]. Немного позже, в работе [4], исследовали вероятность того, что молекулы холестерина, высвобождаясь из мембран или липопротеинов в среду, могут обмениваться друг с другом без образования такого комплекса. Однако в последующих работах [5, 6] получены результаты, которые можно объяснить, предположив, что перенос холестерина осуществляется только при соприкосновении липопротеинов с клеточными мембранами.

За последнее время транспорт холестерина в системе клеточная мембрана — липопротеин изучали различными экспериментальными методами, основным из которых является радиоактивное мечение клеток. Надо отметить, что использование меченого холестерина далеко не всегда отражает истинный транспорт (net transport) холестерина между липопротеиновой частицей и мембраной эритроцита. Авторы [1], используя меченые по холестерину липопротеины, еще в 1951 г. показали, что возможен обмен неэстерифицированным холестерином между липопротеинами плазмы и мембраной эритроцитов без каких-либо изменений содержания холестерина в последних. Этот обмен протекал до тех пор, пока удельная радиоактивность неэстерифицированного холестерина мембраны эритроцитов и плазменных липопротеинов не уравновесивалась.

Внедрение холестерина изменяет физические свойства фосфолипидного слоя [7, 8]. В частности, как показали наши предыдущие исследования [9], средний размер липопротеинов меняется в зависимости от содержания в них холестерина. Таким образом, определение функции распределения липопротеинов по размерам в зависимости от времени инкубации последних с холестериносодержащими мембранами позволяет изучать кинетику обмена холестерином и получить информацию о структурных изменениях липопротеинов.

Мы использовали метод оптического смешения [10] для исследования кинетики обмена холестерином между липопroteинами высокой плотности (ЛПВП) и мембранами эритроцитов. Достоинство такого метода заключается в том, что, не внося никаких возмущений в исследуемую среду, можно достаточно быстро и с хорошей точностью получить информацию как о среднем гидродинамическом размере изучаемых частиц, так и о ширине их распределения по размерам. В предварительных экспериментах было обнаружено, что при инкубации ЛПВП с эритроцитами наиболее заметное изменение размеров происходит во фракции ЛПВП₃ и поэтому мы сосредоточили свое внимание именно на этой фракции.

Как известно [11], роль ЛПВП₃ как акцептора холестерина обусловлена низким относительным содержанием неэстерифицированного холестерина в оболочке этого подкласса ЛПВП и наличием в нем лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ), эстерифицирующей холестерин и обеспечивающей тем самым накопление эфиров холестерина в сердцевине частицы ЛПВП₃. По этой причине представлялось интересным провести исследование кинетики обмена холестерином также и в присутствии 5,5-дитио-бис-2-нитро-бензойной кислоты (DTNB — ингибитор ЛХАТ реакции). В последнем случае можно ожидать встраивания молекул холестерина во внешний слой липопroteинов, в то время как в отсутствие ингибитора временная зависимость среднего размера липопroteинов имеет более сложный характер, обусловленный как собственно обменом холестерином между ЛПВП₃ и мембранами, так и кинетикой эстерификации холестерина и переносом образующегося эфира холестерина в центральную область липопroteина.

Материалы и методы. Приготовление образцов. ЛПВП₃ выделяли из донорской плазмы методом препаративного ультрацентрифугирования на центрифуге Spinco L2-65B, ротор 50.3 в диапазоне плотности раствора NaBr 1,125—1,210 (45000 об/мин, 24 ч, 18 °С). Полученную фракцию ЛПВП₃ диализовали против 0,9 % NaCl при 4 °С. Эритроциты выделяли из крови другого донора. Отмывку эритроцитов производили 3-кратно буферным раствором (0,05 М трис-HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl) при 1500 об/мин в течение 20 мин. Эритроцитарную взвесь готовили, добавляя к осадку эритроцитов объем буферного раствора, равный объему удаленной плазмы. Для инкубации брали 2 мл эритроцитарной взвеси и небольшой объем раствора ЛПВП₃, содержащий 5 мг белка. Общий объем инкубационной смеси доводили трис-HCl буферным раствором до 3 мл. Инкубацию проб проводили в течение 1—4 и 24 ч при 37 °С с медленным покачиванием. В некоторых опытах инкубацию вели с добавлением в пробы DTNB — ингибитора ЛХАТ (К.Ф.2.3.1.43). После инкубации пробы сразу же помещали в ледяную баню и затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин при 4 °С. Плотность полученного супернатанта доводили сухим NaBr до 1,21 и центрифугировали при указанных выше условиях. Выделенные ЛПВП₃ подвергали диализу против 0,9 % NaCl и использовали для оптических измерений.

Оптические измерения. Спектр света, рассеянного раствором ЛПВП с функцией распределения по размерам $N(R)$, может быть записан в виде [12]

$$I(\omega) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{A(\Gamma) \cdot \Gamma}{\omega^2 + \Gamma^2} d\Gamma \sim \int_0^{\infty} \frac{N(R) M^2(R) \Gamma(R)}{\Gamma^2(R) + \omega^2} dR, \quad (1)$$

где $\Gamma = Dq^2$, $D = K_B T / 6\pi\eta R$ — коэффициент диффузии; q — переданный волновой вектор. Так как частицы ЛПВП достаточно малы ($qR \ll 1$), формфактор $M(R)$ пропорционален массе липопroteина, т. е. $M(R) \sim R^3$. Функция $N(R)$ может быть выражена через $A(\Gamma)$ следующим образом

$$N(R) \sim A \left(\frac{K_B T q^2}{6\pi\eta R} \right) \frac{1}{R^2 M^2(R)}. \quad (2)$$

С помощью метода регуляризации [13] по экспериментально измеренному спектру $I(\omega)$ можно восстановить «сглаженную» функцию $A(\Gamma)$ и, используя формулу (2), функцию распределения частиц по размерам $N(R)$. Чем выше точность измерений $I(\omega)$, тем более детально может быть восстановлена функция распределения.

Спектры света, рассеянного раствором липопroteинов, измеряли с помощью

200-канального анализатора спектра, работающего в реальном масштабе времени. Методика измерений описана нами ранее [14]. Погрешность измерения спектров не превышала 0,5 %. Для исключения влияния посторонних примесей на измерение спектров образцы тщательно фильтровали через фильтры «Synpro» (ЧССР) диаметром 170 нм непосредственно перед измерением. Измерения проводили при комнатной температуре. Концентрация липопротеинов в растворе составляла 2 мг/мл.

Результаты исследования. На рис. 1 показана зависимость среднего размера ЛПВП₃ от времени инкубации их с эритроцитами как в присутствии DTNB (кривая 1), так и без него (кривая 2). На этом же рисунке приведен контроль — зависимость среднего размера ЛПВП₃ от времени инкубации их в буферном растворе в отсутствие эритроцитов

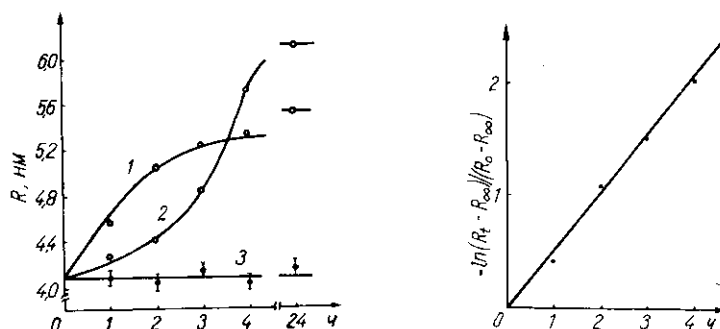


Рис. 1. Зависимость среднего по распределению радиуса ЛПВП₃ от времени инкубации их с мембранами эритроцитов: 1 — в присутствии DTNB; 2 — без DTNB; 3 — инкубация ЛПВП₃ в буфере. $T_{\text{incub}} = 37^\circ\text{C}$.

Fig. 1. Dependence of an average HDL₃ radius upon incubation time: 1 — in the presence of DTNB; 2 — without DTNB; 3 — in a buffer. $T_{\text{incub}} = 37^\circ\text{C}$.

Рис. 2. Зависимость от времени $\ln(R(t) - R_\infty) / (R(0) - R_\infty)$ для ЛПВП₃ в присутствии DTNB. $T_{\text{incub}} = 37^\circ\text{C}$.

Fig. 2. $\ln(R(t) - R_\infty) / (R(0) - R_\infty)$ versus time of incubation in the presence of DTNB. $T_{\text{incub}} = 37^\circ\text{C}$.

(кривая 3). Данные контрольных экспериментов показывают, что наблюдаемое увеличение размеров (кривые 1 и 2) связано, по всей вероятности, с переносом холестерина с мембран эритроцитов на ЛПВП₃, а не является следствием возможных агрегационных процессов.

Стандартной формой изучения кинетики химических процессов является анализ зависимости концентрации реагентов, участвующих в нем, от времени. Таким образом, казалось бы, мы лишены возможности провести такой анализ, не выбрав какой-либо модели, описывающей зависимость радиуса ЛПВП₃ от концентрации холестерина в них. Однако в присутствии DTNB, как видно из рис. 1, размер ЛПВП₃ со временем стремится к некоторому равновесному значению R_∞ . Это позволяет считать, что по крайней мере вблизи равновесия справедливо приближение:

$$R_\infty - R(C) = \left. \frac{dR}{dC} \right|_{C=C_\infty} (C_\infty - C). \quad (3)$$

Отсюда следует, что наклон K зависимости $\ln(R_\infty - R(C))$ от времени равен постоянной скорости переноса холестерина, т. е., если считать, что

$\left. \frac{dR}{dC} \right|_{C=C_\infty}$ слабо зависит от температуры T , мы можем провести расчет

активационной энергии без дополнительных предположений о виде функции $R(C)$. На рис. 2 приведена зависимость от времени величины $\ln(R_\infty - R(t)) / (R_\infty - R(0))$ для ЛПВП₃ в присутствии DTNB (в качестве R_∞ брали значение радиуса ЛПВП₃ при времени инкубации, равном 24 ч). Линейную зависимость, естественно, можно объяснить тем, что перенос холестерина в этом случае описывается реакцией первого порядка и соотношение (3) выполняется во всем диапазоне изменения

размеров. Интерпретация зависимости в отсутствие DTNB сложнее. В этом случае одновременно происходит ряд процессов — перенос холестерина из мембран эритроцитов на липопroteины, эстерификация холестерина и перенос эфиров холестерина внутрь липопroteинов. Поэтому, с одной стороны, этот процесс особенно вдали от равновесия вряд ли описывается реакцией первого порядка, а с другой стороны, так как размеры липопroteинов определяются конкуренцией нескольких механизмов, трудно ожидать повсеместного выполнения соотношения (3). Учитывая это обстоятельство, мы ограничились исследованием

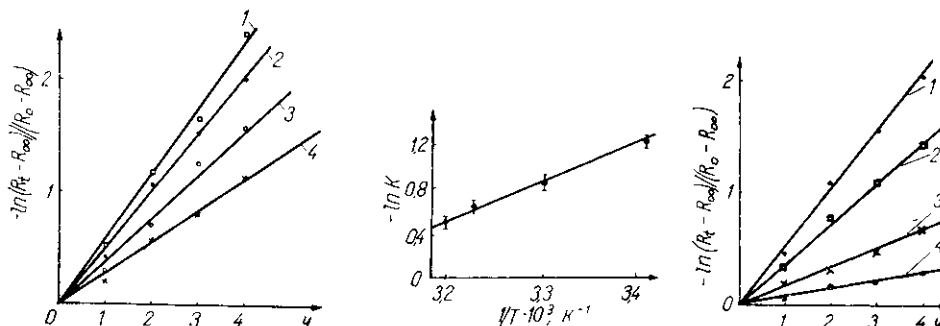


Рис. 3. Зависимость от времени $\ln(R(t) - R_\infty) / (R(0) - R_\infty)$ для ЛПВП₃ в присутствии DTNB при различных температурах: 1—40; 2—37; 3—30; 4—20 °C.

Fig. 3. $\ln(R(t) - R_\infty) / (R(0) - R_\infty)$ versus time of incubation with DTNB at different temperatures.

Рис. 4. Зависимость постоянной скорости обмена холестерином от обратной температуры.

Fig. 4. Temperature dependence of cholesterol exchange rate constant.

Рис. 5. Зависимость от времени $\ln(R(t) - R_\infty) / (R(0) - R_\infty)$ при различных объемах эритроцитарной взвеси в инкубационной среде (3 мл): 1—3; 2—2; 3—1; 4—0,5 мл. $T_{\text{ин}} = 37$ °C.

Fig. 5. $\ln(R(t) - R_\infty) / (R(0) - R_\infty)$ versus time at different amounts of erythrocyte suspension added in an incubation volume (3 ml). $T_{\text{incub}} = 37$ °C.

температурной зависимости скорости переноса холестерина только в условиях ингибирования ЛХАТ. На рис. 3 показаны зависимости $\ln(R_\infty - R(t)) / (R_\infty - R(0))$ при различных температурных условиях в присутствии DTNB, а на рис. 4 — зависимость соответствующих наклонов от обратной температуры. Линейность зависимости $K(1/T)$ свидетельствует об активационном характере процесса переноса молекул холестерина. Ее наклон дает значение энергии активации $E_a = 6,5 \pm \pm 0,2$ ккал/моль.

Мы провели также исследование зависимости скорости переноса холестерина от концентрации эритроцитов в инкубационной среде. На рис. 5 показана зависимость $\ln(R_\infty - R(t)) / (R_\infty - R(0))$ от времени при четырех различных концентрациях эритроцитов в присутствии DTNB. По этим данным построена зависимость $K(C_s)$ на рис. 6, показывающая, что скорость переноса холестерина пропорциональна концентрации эритроцитов.

Обсуждение результатов. Начнем с обсуждения кинетики обмена холестерином между ЛПВП₃ и мембранами эритроцитов в присутствии ингибитора ЛХАТ. Рис. 1 демонстрирует установление в течение нескольких часов равновесного значения среднего гидродинамического радиуса $R_\infty = 5,5$ нм. Естественно считать, что это отражает установление равновесной объемной концентрации холестерина C_∞ во внешнем слое липопroteина, т. е.

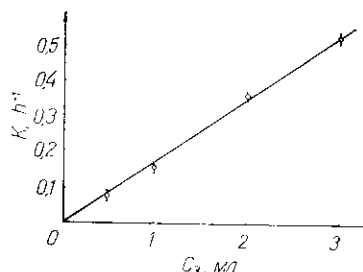
$$C_\infty = C_m \left(\frac{\mu_a - \mu_m}{K_B T} \right), \quad (4)$$

где C_m — объемная концентрация холестерина в мембранах эритроцитов, а μ_m и μ_a — химические потенциалы холестерина в мембране и липопroteине соответственно. Как известно [15], из-за структурных огра-

ничений, возникающих вследствие того, что поверхность липопротейна должна быть покрыта гидрофильными участками молекул внешнего слоя, существует предельная концентрация холестерина C_{\max} . Действительно, так как у молекул холестерина площадь гидрофильной головки меньше отношения объема гидрофобного хвоста к его длине, свободный холестерин не может сам по себе формировать монослой [16]. Будем считать, что μ_a слабо зависит от концентрации холестерина при $C \ll C_{\max}$ и резко возрастает при $C \rightarrow C_{\max}$. Таким образом, при обсуждении кинетики обмена холестерином следует различать области концентраций вблизи и вдали от C_{\max} . Если предполо-

Рис. 6. Зависимость постоянной скорости обмена холестерином от количества эритроцитов в инкубационной среде. $T_{\text{и}} = 37^\circ\text{C}$.

Fig. 6. Rate constant K versus erythrocyte concentration at 37°C .



жить, что C_∞ близка к C_{\max} , следует ожидать сильной зависимости скорости обмена холестерином от его концентрации в липопротейнах. При этом наблюдаемый в эксперименте (рис. 2) одноэкспоненциальный характер приближения радиуса липопротейна R к равновесному значению R_∞ придется интерпретировать как результат случайной компенсации быстрого замедления скорости обмена и резкого нарастания радиуса липопротейна по мере приближения концентрации холестерина к C_{\max} . Такая возможность представляется маловероятной. Более того, так как нет оснований считать, что химические потенциалы холестерина в липопротейнах и мембранах эритроцитов сильно различаются, предположение о близости C_∞ к C_{\max} означает, что концентрация холестерина в мембранах эритроцитов близка к предельной, что также представляется маловероятным.

Таким образом, естественно предположить, что $C_\infty \ll C_{\max}$, и считать $\Delta\mu = \mu_a - \mu_m$ константой. Как видно из рис. 1, полное изменение среднего размера липопротейнов относительно невелико — около 30%. Так как при $C_\infty \ll C_{\max}$ $R(C)$ — плавно меняющаяся функция, малое полное изменение R позволяет считать разложение (3) справедливым во всей области наблюдения. Тогда, согласно рис. 2, константа скорости не меняется, и следовательно, размер R_∞ и концентрация C_∞ определяются просто достижением равновесия между концентрациями холестерина в мембранах эритроцитов и липопротейнах без существенных изменений физико-химических свойств последних. Другими словами, предположение о том, что конечная концентрация холестерина в липопротейнах меньше предельной, оказывается самосогласованным.

Сделанные предположения позволяют оценить разность химических потенциалов холестерина в мембране эритроцитов и липопротейна $\Delta\mu$ по данным температурной зависимости равновесного размера липопротейна R_∞ , приведенным ниже.

$T, ^\circ\text{C}$. . .	20	30	37	40
$R_\infty, \text{нм}$. . .	5,30	5,37	5,52	5,50

Действительно, подставив (3) и (4) в соотношение

$$\frac{dR_\infty}{dT} = \frac{dR}{dC} \Big|_{C=C_\infty} \frac{dC_\infty}{dT},$$

получим:

$$\frac{\Delta\mu}{k_B T} = \frac{dR_\infty}{dT} \frac{T}{R_\infty - R(0)} \left(1 - \frac{C(0)}{C_\infty} \right). \quad (5)$$

Отсюда, пользуясь данными по температурной зависимости равновесного размера липопротейна R_∞ и полагая $C(0) \ll C_\infty$, получаем

оценку сверху для $\Delta\mu$: $\Delta\mu \leq 1$ ккал/моль. Хотя предположение о независимости $\Delta\mu$ от температуры позволяет по соотношению (3) получить и само значение разности химических потенциалов, точность измерения размеров ($\sim 0,5\%$) для этого недостаточна ввиду малости величины $\Delta\mu$. В приведенных рассуждениях игнорируется зависимость $\Delta\mu$ от температуры, так как трудно ожидать существенных изменений свойств липопротеинов вблизи физиологических температур (имеется в виду, в частности, фазовый переход жидкость—жидкий кристалл [16]). Мы не обнаружили каких-либо указаний на такого рода явления и не будем их обсуждать. Отметим также, что зависимость размера липопротеина от температуры для нас незначительна, так как при различных температурах вели лишь инкубацию липопротеинов с мембранами, а измерения проводили в стационарных условиях.

По температурной зависимости скорости реакции (рис. 3) получено значение активационной энергии $E_a = 6,5 \pm 0,2$ ккал/моль. Это существенно меньше энергии гидрофобного взаимодействия молекулы холестерина (~ 13 ккал/моль) и, следовательно, передача холестерина происходит при непосредственном контакте липопротеина с мембраной эритроцита, а не путем выхода холестерина в раствор. Этот факт подтверждается и пропорциональностью постоянной скорости обмена холестерином K содержанию мембран (рис. 4). Действительно, если бы обмен происходил путем выхода холестерина из мембран в раствор и последующим встраиванием в липопротеины, скорость изменения размера последних была бы пропорциональна концентрации холестерина в растворе, которая при избытке мембран, естественно, определяется концентрацией холестерина в мембранах, а не полным количеством мембран.

Интересно сравнить полученное нами значение активационной энергии с литературными данными по активационной энергии для обмена холестерина между везикулами и липопротеинами (17 ккал/моль) [6] и кинетикой насыщения холестерином клеточных мембран *Acholeplasma laidlawii* (6 ккал/моль) [17]. Липопротеины обмениваются холестерином с мембранами намного легче, чем с везикулами, что, возможно, является отражением физиологической роли липопротеинов в организме.

Интерпретация кинетики изменения среднего размера ЛПВП₃ в отсутствие DTNB (рис. 1, кривая 2) менее однозначна. Ситуация еще более осложняется тем, что в процессе накопления эфиров холестерина в центральной области и свободного холестерина во внешнем слое липопротеиновой частицы может меняться форма последней. Мы же с помощью метода оптического смещения определяем гидродинамический размер частицы, т. е. радиус сферы, имеющей такой же коэффициент трансляционной диффузии, как и исследуемые частицы. Поэтому, если исходные ЛПВП₃ имеют дискообразную форму [18], которая становится все более сферической по мере накопления во внутренней области эфиров холестерина, заметного изменения R может не происходить. Наоборот, встраивание свободного холестерина во внешний слой увеличивает поверхность липопротеина, слабо меняя его объем. При этом возможно дальнейшее сплющивание липопротеина и, как следствие, быстрое нарастание наблюдаемого гидродинамического размера. Эти рассуждения объясняют более медленное нарастание размера при отсутствии ингибитора ЛХАТ. Эстерификация холестерина и его поступление во внутреннюю область липопротеина должны, в конце концов, прекратиться из-за невозможности дальнейшего увеличения площади поверхности, которая достигает своего предельного значения либо при приближении концентрации свободного холестерина в липопротеине к C_{\max} , либо к такой концентрации C'_∞ , при которой изменение свободной энергии при эстерификации холестерина ΔF компенсируется дополнительным энтропийным вкладом, связанным с переходом холестерина внутрь липопротеина, равным $K_B T \ln(C'_\infty/C_\infty)$. Так как в отсутствие DTNB конечный размер липопротеинов больше, то $\Delta F < 0$. Качественно это связано с тем, что при $\Delta F < 0$ эфиры холестерина эффективно «накачивают»

ЛПВП₃, в результате чего его внешняя оболочка растягивается, делая внедрение свободного холестерина более выгодным.

Как уже отмечалось, количественное обсуждение временной кинетики гидродинамического размера возможно лишь в рамках конкретной модели, позволяющей выяснить зависимость $R(C)$. Вся совокупность наших данных получает естественное объяснение на основе следующих предположений. 1. В начальном состоянии ЛПВП₃ представляют собой слегка сплюснутые эллипсоиды. 2. Объем V и площадь S липопротенинов определяются соотношениями:

$$V = V_0 + Nv + N_1v_1; \quad S = S_0 + Na, \quad (9)$$

где N — число молекул свободного холестерина; N_1 — число молекул эфиров холестерина; a и v — площадь гидрофильной головки и объем гидрофобного хвоста холестерина соответственно; v_1 — объем эфиров холестерина. 3. Эстерификация холестерина происходит быстро, т. е. до достижения сферической формы весь поступающий холестерин, а после этого — часть холестерина, определяемая соотношениями (6), мгновенно эстерифицируется и перемещается во внутреннюю часть липопротенина. 4. C'_∞ и $C_\infty \ll C_{\max}$.

Обсудим эти предположения. Первое предположение необходимо для объяснения увеличения скорости нарастания размера липопротенинов на начальной стадии обмена в отсутствие DTNB (рис. 1). Такое нестандартное поведение системы по мере приближения к равновесию свидетельствует о «переключении» механизма нарастания R . Сплюснутость ЛПВП₃ в начальном состоянии естественным образом объясняет такое «переключение». На первой стадии до тех пор, пока ЛПВП₃ не примет сферическую форму, холестерин, в основном, эстерифицируется и поступает внутрь, а на второй стадии происходит рост сферической частицы. Такое предположение представляется вполне оправданным с точки зрения установленной эволюции липопротенинов в организме [18]: ЛПВП выделяются печенью в кровяное русло в виде сплюснутых дисков (нацентные частицы), которые принимают все более сферическую форму по мере заполнения их объема эфирами холестерина. Таким образом, выделенная из организма фракция ЛПВП₃ должна представлять собой частицы с разным содержанием эфиров холестерина, в том числе, возможно, и эллипсоидные.

Второе предположение означает наличие жестких стерических ограничений, которые и определяют форму липопротенина. Эти представления в настоящее время общеприняты [16]. Третье предположение мы вводим для простоты, тем более, что, по крайней мере, вблизи равновесия, когда скорость поступления холестерина из мембран эритроцитов мала, оно заведомо выполняется. Вопрос о выполнении этого условия на начальной стадии обмена в отсутствие DTNB мы обсудим ниже. Наконец, четвертое предположение позволяет считать, что константа скорости K передачи свободного холестерина от эритроцитарной мембраны к липопротенину не зависит от концентрации холестерина, т. е.

$$\dot{N} + \dot{N}_1 = K(N_\infty - N), \quad (7)$$

где N_∞ — равновесное количество молекул свободного холестерина во внешнем слое липопротенина (разное в присутствии и отсутствии DTNB).

Пользуясь сделанными предположениями и учитывая, что полное изменение размера невелико, можно получить уравнения, описывающие изменения во времени. В присутствии DTNB $N_1 = \text{const}$ и

$$\dot{R} = \frac{R}{N} \dot{N} = K \frac{R}{N} (N_\infty - N) \approx K(R_\infty - R), \quad (8)$$

т. е. наблюдаемый размер экспоненциально приближается к равновесному значению R_∞ . Этот рост происходит как за счет роста поверхности

липопротеина, так и за счет его постепенного сплющивания, причем, пользуясь выражением для гидродинамического размера эллипсоида, можно показать, что, если в начальном состоянии липопротеины практически сферические, 30 %-ное увеличение размера происходит при 30 %-ном увеличении (примерно) площади поверхности. При этом отношение осей получившегося эллипсоида около 1 : 2.

В отсутствие DTNB на первой стадии, как уже упоминалось, липопротеин должен принимать сферическую форму без изменения поверхности. Однако, что можно доказать, при этом должно наблюдаться уменьшение гидродинамического размера, противоречащее данным рис. 1. Это противоречие легко устраняется, если в начальном состоянии часть липопротеинов уже имеет сферическую форму и не проходит первой стадии, и, определяя средний по распределению гидродинамический размер, можно наблюдать его медленный рост. При этом определенным образом должна меняться дисперсия распределения по размерам. К сожалению, точность определения дисперсии, составляющей примерно 20 % среднего R , недостаточна (относительная погрешность $\sim 10\%$) для того, чтобы подтвердить или опровергнуть эту возможность. Другое объяснение состоит в возможной несправедливости предположения 3 на начальной стадии обмена. Тогда поступающий свободный холестерин не успевает полностью перерабатываться, и наряду с «накачиванием» ЛПВП₃ происходит рост его поверхности. Медленное нарастание гидродинамического радиуса связано с суммарным действием этих двух тенденций, дающих противоположный вклад.

На второй стадии, после того как все липопротеины приняли сферические размеры, изменение числа молекул свободного и эстерифицированного холестерина ΔN и ΔN_1 связаны между собой соотношениями (7), из которых легко получить, что

$$\Delta N_1 = \Delta N \left(\frac{Ra}{2v_1} - \frac{v}{v_1} \right) \quad (9)$$

и

$$\dot{R} \approx \frac{K}{\left(\frac{Ra}{2v_1} - \frac{v}{v_1} + 1 \right)} (R'_\infty - R), \quad (10)$$

т. е. эффективная скорость нарастания R примерно в два раза меньше, чем в присутствии DTNB. Этот результат хорошо согласуется с данными, приведенными на рис. 1.

В заключение отметим, что для проверки и уточнения выдвинутых предположений чрезвычайно полезным было бы непосредственное определение концентрации свободного холестерина и эфиров холестерина в липопротеинах. К сожалению, полученные нами к настоящему времени результаты таких измерений недостаточно точны и, хотя они не противоречат сделанным выводам, мы не можем считать это веским свидетельством справедливости изложенной картины эволюции размеров и формы липопротеинов в процессе обмена холестерином.

HIGH DENSITY LIPOPROTEIN CONFORMATION CHANGES IN THE PROCESS OF SATURATION BY CHOLESTEROL

*V. A. Noskin, G. E. Shmelev, A. V. Lomakin,
L. G. Petrova-Maslakova, N. S. Parfenova, E. V. Belova, A. N. Klimov*

B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad
Research Institute of Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

S u m m a r y

By means of quasielastic light scattering the size of human high density lipoproteins (HDL₃) has been determined depending on the time of their incubation with erythro-

cytes both in the presence of the lecithin-cholesterol-acyltransferase inhibitor (DTNB) and without it. It has been shown that in the presence of DTNB the exchange of cholesterol between HDL₃ and membranes of erythrocytes is a first-order reaction. From the temperature dependence of rate constant the activation energy of cholesterol exchange $E_a = 6.5 \pm 0.2$ kkal/mol has been calculated. The reaction rate appears to be proportional to membrane concentration, which evidences in favour of contact transfer of cholesterol. In the absence of DTNB the cholesterol exchange has a more complicated kinetics. An attempt has been made to explain the behaviour of HDL₃ average size during incubation with erythrocytes both in the presence of DTNB and without it.

1. Hagerman I. S., Gould R. G. The *in vitro* interchange of cholesterol between plasma and red cells // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.—1951.—78, N 3.—P. 329—339.
2. Scanu A. M., Hugher W. L. Recombining capacity toward lipids of the protein moiety of human serum lipoprotein // J. Biol. Chem.—1960.—235, N 10.—P. 2876—2883.
3. Gurd F. R. N. Some naturally occurring lipoprotein systems // Lipid Chem. / Ed. D. J. Hanahan.—New York: Willey, 1960.—P. 283.
4. Yandenheuvel F. A. Lipid-protein interaction and cohesional forces in the lipoprotein systems of membranes // J. Amer. Oil Chem. Soc.—1966.—43, N 2.—P. 258—264.
5. Giraud F., Claret M. A study of cholesterol transfer between erythrocytes and lipid vesicles // FEBS Letters.—1979.—103, N 2.—P. 186—191.
6. Jonas A., Maine G. T. Kinetics and mechanism of phosphatidyl-choline and cholesterol exchange between single bilayer vesicles and bovine serum high-density lipoprotein // Biochemistry.—1979.—18, N 8.—P. 1722—1728.
7. Johanson S. M. The effect of charge and cholesterol on the size and thickness of sonicated phospholipid vesicles // Biochim. et biophys. acta.—1973.—307, N 1.—P. 27—33.
8. Ломакин А. В., Носкин В. А., Шмелев Г. Е. Термодинамика двух компонентных систем. Расслоение везикул и липопротеинов, содержащих холестерин.—Л., 1981.—С. 249—255.—(Препринт / АН СССР. Ин-т ядер. физики; № 719).
9. Измерение распределения по размерам липопротеинов плазмы крови человека / А. Н. Климов, Г. Е. Шмелев, В. А. Носкин и др. // Биофизика.—1982.—27, № 4.—С. 458—461.
10. Dubin S. B., Lunacek J. H., Benedek G. B. Observation of the spectrum of light scattered by solutions of biological macromolecules // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1967.—57, N 5.—P. 1164—1179.
11. Albers J. J., Cheung M. C. High density lipoprotein particle distribution: characterization of H, L subclasses // The first lipoprotein symp. USSR-USA: Abstracts.—Leningrad, 1981.—P. 35—36.
12. Selser J. C., Yen Y., Baskin R. J. A light-scattering characterization of membrane vesicles // Biophys. J.—1976.—16, N 3.—P. 337—342.
13. Гурари М. Л., Рукман Г. И., Толпина С. П. О решении уравнения Фредгольма 1-го рода с лоренцевским ядром в задачах доплеровской спектроскопии // Метрология.—1977.—№ 7.—С. 26—30.
14. Клубин В. В., Носкин В. А. Анализ релеевских спектров света, рассеянного растворами макромолекул методом оптического смешения.—Л., 1979.—35 с.—(Препринт / АН СССР. Ин-т ядер. физики; № 485).
15. Atkinson D., Small D. M., Shipley A. X-ray and neutron scattering studies of plasma lipoproteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. USA.—1980.—348.—P. 284—298.
16. Tanford G. The hydrophobic effects.—New York: Willey, 1973.—385 p.
17. Gershfeld N. L., Wormser M., Razin S. Cholesterol in mycoplasma membranes. I. Kinetics and equilibrium studies of cholesterol uptake by the cell membrane of *Acholeplasma laidlawii* // Biochim. et biophys. acta.—1974.—352, N 4.—P. 371—378.
18. Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver / R. L. Hamilton, M. C. Williams, G. J. Fielding, R. J. Havel // J. Clin. Invest.—1976.—583, N 5.—P. 667—680.

Ленингр. ин-т ядер. физики
им. Б. П. Константинова АН СССР
НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 10.10.85