

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej



Agnieszka Ćwiklińska

***Powstawanie cząstek LpE o ruchliwości
elektroforetycznej gamma podczas interakcji pomiędzy
VLDL i liposomami lecytinowymi***

Rozprawa doktorska

**Praca wykonana
w Zakładzie Chemii Klinicznej
Katedry Analityki Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Promotor pracy:
Dr hab. Anastasis Pacanis**

Gdańsk, 2013

*Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi dr. hab. A. Pacanisowi
oraz
dr hab. M. Wróblewskiej
i
dr B. Kortas-Stempak
za wielką życzliwość, nieocenioną pomoc i wsparcie
w tworzeniu i redagowaniu tej pracy*

*Serdecznie dziękuję
pracownikom Zakładu Chemii Klinicznej
A. Gliwińskiej, B. Kaus i A. Kuchcie,
oraz
pracownikom Katedry Analityki Klinicznej
i Katedry Biochemii Klinicznej
za pomoc i wspianą atmosferę pracy*

*Serdecznie dziękuję
Mojej Rodzinie i Przyjaciółom
za wiarę we mnie, cierpliwość i wsparcie*

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	7
STRESZCZENIE.....	9
SUMMARY	11
1. WSTĘP	13
1.1. Budowa i podział lipoprotein	13
1.2. Lipoproteiny a miażdżycy.....	17
1.3. Biogeneza i przemiany HDL.....	18
1.4. Heterogenność HDL a RCT	20
1.5. Apolipoproteina E.....	22
1.5.1. Budowa apoE	22
1.5.2. Oddziaływanie apoE z fosfolipidami.....	23
1.5.3. Funkcje apoE.....	23
1.5.4. Przeciwmiażdżycowe oddziaływanie apoE	24
1.5.5. Polimorfizm apoE	26
1.6. Lipoproteiny zawierające apoE	27
1.6.1. Lipoproteiny HDL zawierające apoE	28
1.6.2. Lipoproteiny HDL zawierające apoE jako jedyny składnik białkowy	29
1.6.3. Lipoproteiny γ -LpE	30
1.6.4. Rekonstruowane cząstki HDL zawierające apoE	32
1.7. Liposomy lecytynowe w terapii przeciwmiażdżycowej.....	33
1.7.1. Budowa liposomów	34
1.7.2. Oddziaływanie liposomów lecytynowych z lipoproteinami osocza.....	35
2. CEL PRACY	38
3. MATERIAŁY I METODY	39
3.1. Odczynniki, materiały zużywalne, aparatura	39
3.1.1. Odczynniki chemiczne.....	39
3.1.2. Zestawy odczynnikowe.....	40
3.1.3. Przeciwciała	40
3.1.4. Wzorce do elektroforezy.....	40
3.1.5. Inne materiały	40
3.1.6. Aparatura.....	41
3.2. Bufory i roztwory	42

3.2.1.	Bufory i inne roztwory podstawowe.....	42
3.2.2.	Bufory i inne roztwory do technik elektroforetycznych i elektrotransferu...	42
3.2.3.	Bufory i inne roztwory do immunodetekcji metodą Western blot	45
3.3.	Otrzymywanie VLDL	45
3.3.1.	Materiał badany	45
3.3.2.	Izolacja VLDL metodą ultrawierowania	46
3.3.3.	Charakterystyka VLDL.....	47
3.4.	Izolacja lecytyny i przygotowanie liposomów	48
3.5.	Inkubacja VLDL z liposomami lecytynowymi	49
3.5.1.	Podstawowe warunki inkubacji.....	49
3.5.2.	Protokół postępowania.....	49
3.6.	Rozdział VLDL od składników mieszaniny reakcyjnej niezawierających apoB metodą immunoprecypitacji	50
3.6.1.	Ustalenie warunków immunoprecypitacyjnej metody rozdziału	50
3.6.2.	Protokół postępowania dla immunoprecypitacyjnej metody rozdziału	53
3.6.3.	Odzysk dla immunoprecypitacyjnej metody rozdziału	53
3.7.	Modyfikacje warunków inkubacji VLDL z liposomami	54
3.7.1.	Badanie wpływu ilości egzogennych FL na przebieg reakcji VLDL z liposomami	55
3.7.2.	Badanie wpływu temperatury na przebieg reakcji VLDL z liposomami	56
3.7.3.	Badanie kinetyki reakcji VLDL z liposomami w temperaturze 4°C i 37°C	56
3.8.	Rozdział składników mieszaniny reakcyjnej metodą ultrawierowania	57
3.8.1.	Zagęszczanie frakcji	60
3.8.2.	Charakterystyka frakcji rozdzielonych metodą ultrawierowania.....	60
3.8.3.	Porównanie metody ultrawierowania z immunoprecypitacyjną metodą rozdziału VLDL od pozostałych produktów reakcji.....	61
3.8.4.	Ocena gęstości frakcji III metodą ultrawierowania.....	62
3.9.	Badanie oddziaływania frakcji III z HDL.....	63
3.9.1.	Otrzymywanie HDL	63
3.9.2.	Inkubacja frakcji III z HDL.....	63
3.10.	Metody stosowane do oznaczania stężenia składników lipidowych	64
3.11.	Metody stosowane do oznaczania stężenia apoE i apoB	65
3.11.1.	Immunonefelometryczne metody oznaczania apoE i apoB	65

3.11.2.	Oznaczanie stężenia apoE metodą elektroforezy rakietowej	66
3.11.3.	Porównanie metody elektroforezy rakietowej i metody immunonefelometrycznej oznaczania apoE	67
3.12.	Techniki elektroforetyczne zastosowane w pracy	67
3.12.1.	Elektroforeza w żelu agarozowym	67
3.12.2.	Elektroforeza dwukierunkowa w gradiencie żelu poliakrylamidowego nienaturującego (2D-PAGE) 2-25%.....	68
3.12.3.	Elektroforeza pionowa w gradiencie żelu poliakrylamidowego denaturującego (SDS-PAGE) 10-20%.....	70
3.13.	Detekcja białek po rozdziale w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE metodą barwienia srebrem.....	72
3.14.	Transfer białek z żelu na błonę PVDF	72
3.14.1.	Transfer pasywny z żelu agarozowego	72
3.14.2.	Elektrotransfer z żelu poliakrylamidowego	72
3.15.	Immunodetekcja apoE i apoB na błonie PVDF metodą Western blot	73
3.16.	Analiza densytometryczna rozdziałów elektroforetycznych	74
3.17.	Ocena wielkości cząstek lipoproteinowych oraz masy cząsteczkowej białek lipoprotein.....	74
3.18.	Analiza statystyczna danych	75
4.	WYNIKI.....	76
4.1.	Zmiany zachodzące na skutek oddziaływania VLDL z liposomami lecytynowymi.....	76
4.1.1.	Zmiany składu cząstek VLDL po reakcji	76
4.1.2.	Zmiany ruchliwości elektroforetycznej cząstek	78
4.1.3.	Powstawanie nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE	80
4.2.	Wpływ ilości egzogennych fosfolipidów na oddziaływanie VLDL z liposomami	83
4.2.1.	Zmiany składu cząstek VLDL dla różnego stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$	84
4.2.2.	Zmiany ruchliwości cząstek VLDL dla różnego stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$	86
4.2.3.	Powstawanie nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE, dla różnego stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$	87

4.3.	Wpływ temperatury inkubacji na reakcję VLDL z liposomami	89
4.3.1.	Zmiany składu cząstek VLDL dla różnej temperatury inkubacji.....	90
4.3.2.	Zmiany ruchliwości cząstek VLDL dla różnej temperatury inkubacji.....	92
4.3.3.	Powstawanie nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE, dla różnej temperatury inkubacji	93
4.4.	Kinetyka reakcji oddziaływania VLDL z liposomami, w zależności od temperatury inkubacji.....	95
4.5.	Skład i ruchliwość elektroforetyczna cząstek mieszaniny reakcyjnej rozdzielonych metodą ultrawirowania	98
4.6.	Charakterystyka cząstek frakcji III.....	100
4.6.1.	Ocena ruchliwości i wielkości cząstek frakcji III metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE.....	101
4.6.2.	Ocena składu białkowego cząstek frakcji III	103
4.6.3.	Ocena gęstości cząstek frakcji III.....	104
4.7.	Oddziaływanie cząstek frakcji III z HDL	105
5.	DYSKUSJA	107
6.	WNIOSKI	122
7.	PIŚMIENNICTWO	123

WYKAZ SKRÓTÓW

ABCA1	- białko błonowe mające kasetę wiążącą ATP typu A1
ABCG1	- białko błonowe mające kasetę wiążącą ATP typu G1
apo	- apolipoproteina, np.
apoE	- apolipoproteina E
BF	- bufor inkubacyjny
CETP	- białko transportujące estry cholesterolu
CH	- cholesterol
CHE	- cholesterol zestryfikowany
CHM	- chylomikrony
CHW	- cholesterol wolny
2D-PAGE	- elektroforeza dwukierunkowa, w której w pierwszym kierunku następuje rozdział lipoprotein w żelu agarozowym, a w drugim kierunku rozdział w gradiencie żelu poliakrylamidowego, w warunkach niedenaturujących
FL	- fosfolipidy
HDL	- lipoproteiny o wysokiej gęstości (<i>high density lipoproteins</i>)
HDL-apoE	- cząstki HDL zawierające apoE
HDL-LpE	→ patrz LpE
HL	- lipaza wątrobowa
HLP	- hiperlipoproteinemia
HSPG	- proteoglikany zawierające łańcuchy siarczanu heparanu
IDL	- lipoproteiny o pośredniej gęstości (<i>intermediate density lipoproteins</i>)
LCAT	- acylotransferaza lecytyna:cholesterol
LDL	- lipoproteiny o małej gęstości (<i>low density lipoproteins</i>)
LDLR	- receptor LDL
Lp	- lipoproteiny, np.
LpE	- lipoproteiny zawierające apoE jako jedyny składnik białkowy
γ -Lp	- lipoproteiny o ruchliwości elektroforetycznej gamma
LP	- liposomy lecytynowe
LP+BF	- próba kontrolna zawierająca liposomy i bufor inkubacyjny
LPL	- lipaza lipoproteinowa

LRP	- białko pokrewne receptorowi LDL
LUV	- duże jednowarstwowe liposomy
MLV	- wielowarstwowe liposomy
OS	- odchylenie standardowe
PLTP	- białko transportujące fosfolipidy
rHDL	- rekonstruowane cząstki HDL, np. rHDL-apoE - rekonstruowane cząstki HDL zawierające apoE
RCT	- zwrotny transport cholesterolu z komórek tkanek obwodowych do wątroby (<i>reverse cholesterol transport</i>)
Rf	- ruchliwość elektroforetyczna
SDS	- siarczan dodecyłu sodu
SDS-PAGE	- elektroforeza w gradiencie żelu poliakrylamidowego, w warunkach denaturujących
SUV	- małe jednowarstwowe liposomy
TG	- triacyloglicerole
WZ	- współczynnik zmienności
WO	- wartość oczekiwana
VHDL	- lipoproteiny o bardzo wysokiej gęstości (<i>very high density lipoproteins</i>)
VLDL	- lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (<i>very low density lipoproteins</i>)
VLDL+BF	- próba kontrolna zawierająca VLDL i bufor inkubacyjny
VLDL _{FL} :LP _{FL}	- stosunek wagowy fosfolipidów VLDL do fosfolipidów liposomów
VLDL+LP	- mieszanina reakcyjna VLDL z liposomami
VLDL+LP _{supernatant}	- supernatant uzyskany po immunoprecypitacji cząstek zawierających apoB z mieszaniny VLDL+LP
VLDL+LP _{osad}	- osad uzyskany po immunoprecypitacji cząstek zawierających apoB z mieszaniny VLDL+LP

STRESZCZENIE

Jedną z grup cząstek należących do lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL), biorących udział w pierwszym etapie zwrotnego transportu cholesterolu z komórek tkanek obwodowych do wątroby, są cząstki γ -LpE zawierające jako jedyny składnik białkowy apolipoproteinę E i charakteryzujące się ruchliwością elektroforetyczną gamma (γ). Nieliczne doniesienia naukowe wskazują, że stężenie γ -LpE może wzrastać w wyniku oddziaływania egzogennych fosfolipidów ze składnikami osocza, jednak które ze struktur osocza odpowiadają za ich powstawanie, do tej pory nie było wiadome.

Głównym celem pracy było zbadanie, czy oddziaływanie między lipoproteinami o bardzo niskiej gęstości (VLDL) i liposomami lecytinowymi oraz następujące w jego wyniku przemiany mogą skutkować powstawaniem cząstek γ -LpE.

Materiałem do badań była surowica uzyskiwana od zdrowych osób na czczo. Małe, jednowarstwowe liposomy lecytinowe oraz VLDL wyizolowane metodą ultrawirowania inkubowano w temperaturze 37°C lub 4°C, przez okres od 5 do 120 minut, przy stosunku wagowym fosfolipidów VLDL do fosfolipidów liposomów 1:5, 1:15 i 1:30. Po inkubacji składniki mieszaniny reakcyjnej rozdzielano metodą immunoprecypitacji lub ultrawirowania i poddawano ocenie pod względem ruchliwości elektroforetycznej, wielkości oraz składu lipidowego i białkowego.

Wykazano, że oddziaływanie VLDL z liposomami lecytinowymi prowadzi do zmian składu lipidowego i białkowego cząstek. W wyniku reakcji następowało zwiększenie stężenia fosfolipidów oraz spadek stężenia cholesterolu wolnego i apolipoproteiny E w VLDL. Zmiany te skutkowały zmniejszeniem ruchliwości elektroforetycznej VLDL. Przemiany VLDL zachodzące pod wpływem liposomów lecytinowych zależały od warunków inkubacji: ilości egzogennych fosfolipidów, czasu oraz temperatury.

Na skutek inkubacji VLDL z liposomami powstawały nowe cząstki lipoproteinowe niezawierające apolipoproteiny B. Wśród nich wyróżniono heterogenne populacje cząstek zawierających fosfolipidy oraz apolipoproteinę E jako jedyny składnik białkowy, o gęstości charakterystycznej dla HDL ($1,063 \text{ g/ml} < d < 1,21 \text{ g/ml}$), ruchliwości elektroforetycznej gamma i wielkości od 8,58 do 22,07 nm lub ruchliwości elektroforetycznej pre-beta i wielkości od 9,9 do 21,08 nm. Nowo powstałe cząstki LpE

oddziaływały z HDL w obecności białek surowicy, skutkiem czego obserwowano ich „znikanie” i powstawanie cząstek o średnicach większych od średnic HDL przed reakcją.

Na skutek inkubacji powstawały również cząstki zawierające fosfolipidy oraz cholesterol wolny i apolipoproteinę E, izolowane w zakresie gęstości od 1,006 do 1,063 g/ml, o ruchliwości elektroforetycznej gamma. Cząstki te, pod względem składu, gęstości i ruchliwości elektroforetycznej odpowiadały własnościom opisanym dla „lipoprotein pęcherzykowych”, dla których wykazano zdolność blokowania komórkowego wychwyty proaterogennych lipoprotein.

Uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład w poznanie przemian lipoprotein zachodzących pod wpływem liposomów lecytinowych, wykazując powstawanie nowych populacji cząstek, w skład których wchodzi apolipoproteina E uwalniana z VLDL. Obie grupy cząstek powstające na skutek oddziaływania VLDL z liposomami lecytinowymi mogą mieć duży udział w przeciwmiażdżycowym oddziaływaniu liposomów, obserwowanym w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

SUMMARY

One of the subfractions of high density lipoproteins (HDL) which take part in reverse cholesterol transport is the subfraction of particles with gamma (γ) mobility on electrophoresis, called γ -LpE, which contains apolipoprotein E as its sole apolipoprotein. A few scientific reports indicated that concentrations of γ -LpE increased as a result of reactions between exogenous phospholipids and plasma components, but it was not known which plasma components were responsible for γ -LpE generation.

The main objective of this study was to determine whether the interaction of lecithin liposomes with very low density lipoproteins (VLDL) and the subsequent conversions of particles can be a source of new γ -LpE particles.

Human serum was obtained from normolipidemic fasting donors. Small unilamellar phosphatidylcholine liposomes and VLDL obtained by ultracentrifugation were incubated at 37°C or 4°C for 5 to 120 minutes, with VLDL-phospholipid-to-liposome-phospholipid weight ratios of 1:5, 1:15 and 1:30. Subsequently, components of the reaction mixture were separated by immunoprecipitation or ultracentrifugation and analyzed in terms of particle dimensions, electrophoretic mobility and lipid and protein composition.

The interaction between lecithin liposomes and VLDL affected the lipid and protein composition of particles taking part in the reaction. The content of phospholipids increased and the content of free cholesterol and apolipoprotein E decreased in VLDL during the reaction with liposomes. Changes in the particles' composition resulted in reduced VLDL electrophoretic mobility on agarose gel. The changes in the VLDL under the influence of liposomes depended on the incubation conditions: the volume of exogenous phospholipids, temperature and time of incubation.

New particles, which did not contain apolipoprotein B, were generated. Heterogeneous populations of particles, containing phospholipids and apolipoprotein E as the sole apolipoprotein, with densities between 1.063 g/ml to 1.21 g/ml, either with γ -mobility on agarose gel and Stokes diameters from 8.58 to 22.07 nm or with pre β -mobility and Stokes diameters from 9.9 to 21.08 nm, were generated. The newly-formed LpE particles interacted with HDL in the presence of serum proteins.

Consequently LpE “disappeared” and new particles, with Stokes diameters larger than the diameters of HDL before the reaction, were generated.

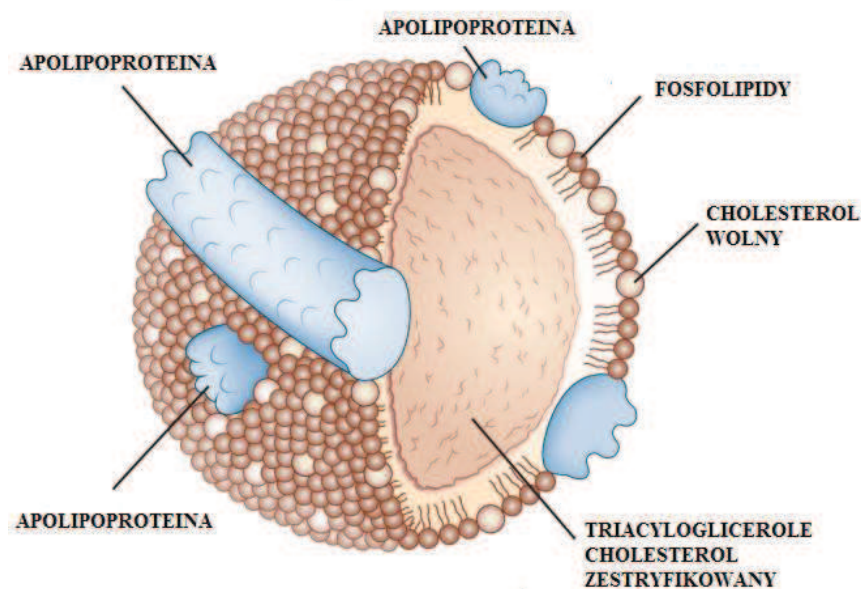
New particles containing phospholipids, free cholesterol and apolipoprotein E with densities between 1.006 g/ml and 1.063 g/ml and γ -mobility were also generated. These particles were similar in composition, density and electrophoretic mobility to vesicular lipoproteins, which have been shown to block cellular uptake of proatherogenic lipoproteins.

The obtained results make an important contribution to the understanding of changes in lipoproteins taking place under the influence of lecithin liposomes, showing the formation of new populations of particles which contain apolipoprotein E released from VLDL. Both groups of particles generated during the interaction between VLDL and lecithin liposomes can claim a large share of the antiatherogenic effects of lecithin liposomes, observed in studies both *in vitro* and *in vivo*.

1. WSTĘP

1.1. Budowa i podział lipoprotein

Lipoproteiny są kompleksami zbudowanymi z białek zwanych apolipoproteinami (apo) oraz lipidów: fosfolipidów (FL), triacylogliceroli (TG), cholesterolu wolnego (CHW) i zestryfikowanego (CHE). Hydrofobowe TG i CHE tworzą rdzeń cząstki, a amfipatyczne FL i CHW oraz apolipoproteiny tworzą otaczającą go warstwę powierzchniową (ryc. 1) [56].



Ryc. 1. Struktura lipoprotein [96]

Lipoproteiny umożliwiają transport w układzie krążenia i płynie pozakomórkowym nierozpuszczalnych w wodzie lipidów. Za wiązania między składnikami lipoprotein odpowiadają siły van der Waalsa i mostki wodorowe. Wiązania te są na tyle luźne, że możliwa jest wymiana składników warstwy powierzchniowej pomiędzy cząstkami lipoprotein, a jednocześnie na tyle silne, że możliwy jest rozdział lipoprotein na różne klasy przy zastosowaniu metod fizykochemicznych [56].

Podstawową metodą rozdziału lipoprotein osocza jest metoda ultrawirowania, w której kryterium podziału jest gęstość cząstek, wynikająca ze względnej zawartości lipidów i białek. Przy zastosowaniu tej metody izoluje się podstawowe klasy lipoprotein: chylomikrony (CHM), lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (VLDL),

lipoproteiny o pośredniej gęstości (IDL), lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) oraz lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL) (tab. 1).

Drugą powszechnie stosowaną metodą rozdziału lipoprotein jest metoda elektroforetyczna, w której kryterium rozdziału jest ruchliwość elektroforetyczna cząstek w polu elektrycznym. Zgodnie z tym kryterium wyróżnia się trzy główne klasy: lipoproteiny o ruchliwości α , $\text{pre}\beta$ i β , odpowiadające lipoproteinom HDL, VLDL i LDL. Chylomikrony, jeżeli są obecne, pozostają w miejscu nałożenia. Obecność IDL manifestuje się obecnością pasma o ruchliwości elektroforetycznej między $\text{pre}\beta$ oraz β (tab. 1).

Rozdział lipoprotein można również przeprowadzić metodami immunochemicznymi, ze względu na zawartość różnych apolipoprotein w poszczególnych klasach lipoprotein (tab. 1).

Tabela 1. Charakterystyka głównych klas lipoprotein [56, 81]

Klasa	CHM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Gęstość (g/ml)	<0,93	0,93 - 1,006	1,006 - 1,019	1,019 - 1,063	1,063 - 1,21
Średnica cząstek (nm)	500 ± 80	80 ± 30	30 ± 25	28 ± 21	13 ± 7
Ruchliwość elektroforetyczna	zostają w miejscu nałożenia	$\text{pre}\beta$	między $\text{pre}\beta$ i β	β	α
Skład (%):					
FL	3 - 7	15 - 20	15 - 20	20 - 22	20 - 30
TG	80 - 90	50 - 70	20 - 25	5 - 10	3 - 5
CHW	1 - 3	7 - 10	7 - 10	5 - 8	3 - 5
CHE	2 - 5	4 - 13	10 - 12	4 - 45	15 - 20
apo	1 - 2	8 - 12	18 - 20	20 - 25	45 - 55
Główna apolipoproteina	apoB48	apoB100			apoA

Ze względu na zawartość lipidów wyróżnia się lipoproteiny bogate w TG oraz lipoproteiny bogate w cholesterol (CH). Do pierwszej grupy zalicza się CHM i VLDL, do drugiej - LDL, IDL i HDL (tab. 1). Zawartość FL wzrasta wraz z gęstością lipoprotein i jest największa w cząstkach HDL (tab. 1). Głównym składnikiem fosfolipidowym lipoprotein jest fosfatydylocholina, stanowiąca 57 - 81% masy FL [81].

Apolipoproteiny to grupa białek różniących się budową, własnościami fizycznymi i funkcjami metabolicznymi. Są one niezbędnymi składnikami strukturalnymi lipoprotein oraz pełnią bardzo istotne funkcje metaboliczne. Posiadają zdolność wiązania się z receptorami komórkowymi i wpływają na aktywność enzymów uczestniczących w metabolizmie lipidów transportowanych w lipoproteinach. Najwyższą zawartością białka charakteryzują się lipoproteiny HDL, najniższą – CHM i VLDL (tab. 1). Wyróżnia się pięć podstawowych rodzin apolipoprotein: A, B, C, D i E (tab. 2). Wyodrębnione zostały również inne rodziny (od F do P), a prowadzone badania naukowe nadal wnoszą nowe informacje na temat roli i funkcji nie do końca jeszcze scharakteryzowanych białek tych rodzin [50, 56]. Apolipoproteiny z rodzin A, C i E mają wspólne pochodzenie genetyczne i stanowią grupę apolipoprotein powierzchniowych, zwanych też wymienialnymi. Są to białka amfipatyczne, które mogą występować w osoczu w postaci niezwiązanej z lipidami. Znaczna ich część jest wydzielana z komórek w postaci wolnych łańcuchów białkowych, które następnie wiążą się z lipidami tworząc nowe cząstki lipoproteinowe lub też przyłączają się do krążących lipoprotein. Apolipoproteiny z rodziny apoB są bardzo hydrofobowe, wiążą się z lipidami (przede wszystkim z TG) wewnątrz komórek już w trakcie translacji i w odróżnieniu do apolipoprotein z rodzin A, C i E nie podlegają wymianie między różnymi klasami lipoprotein w osoczu [50, 81].

Tabela 2. Charakterystyka głównych apolipoprotein osocza [56, 81]

Białko	Masa cząsteczkowa (kDa)	Stężenie w osoczu (g/l)	Główne miejsce syntezy	Lipoproteiny	Podstawowa funkcja
apoAI	28,1	1,0 – 1,2	jelito, wątroba	HDL, CHM	- główny białkowy składnik HDL - aktywator LCAT* - ligand receptorów komórkowych
apoAII	17,4 (dimer)	0,3 – 0,5	wątroba, jelito	HDL	- rola strukturalna w HDL
apoAIV	44,5	0,16	jelito	CHM, HDL	- transport lipidów - aktywator LCAT*, LPL*
apoB48	242		jelito	CHM	- rola strukturalna
apoB100	512	0,7 – 1,0	wątroba	LDL, VLDL	- rola strukturalna - ligand receptora LDL
apoCI	6,6	0,04 – 0,06	wątroba	VLDL, CHM, HDL	- aktywator LCAT* - inhibitor LPL*
apoCII	9	0,03 – 0,05	wątroba	VLDL, CHM, HDL	- niezbędny aktywator LPL
apoCIII	9	0,12 – 0,14	wątroba	VLDL, CHM, HDL	- inhibitor LPL
apoD	22		wątroba	HDL	- rola nie jest jeszcze dokładnie poznana
apoE	34,2	0,025 – 0,1	wątroba	VLDL, HDL, CHM	<i>rozdział 1.5</i>

* LCAT – acylotransferaza lecytyna:cholesterol, LPL – lipaza lipoproteinowa

Lipoproteiny stanowią więc zbiór cząstek różniących się składem białkowym i lipidowym, co wpływa na ich wielkość i własności fizyczne, ale różnice w składzie związane są przede wszystkim z funkcjami biologicznymi, jakie pełnią poszczególne lipoproteiny (tab. 3).

Tabela 3. Główne funkcje metaboliczne poszczególnych klas lipoprotein [56]

Lipoproteiny	Główna funkcja w ustroju
CHM	transport lipidów pochodzenia egzogenego do wątroby
VLDL	transport TG endogennych
LDL	transport CH do komórek tkanek obwodowych
HDL	transport CH z komórek tkanek obwodowych do wątroby

1.2. Lipoproteiny a miażdżyca

Miażdżyca jest przewlekłą chorobą metaboliczną naczyń krwionośnych o złożonej patogenezie. Proces miażdżycowy prowadzi do zmniejszenia, a ostatecznie do zamknięcia światła naczyń, czego konsekwencją może być choroba niedokrwienna serca, zawał mięśnia sercowego lub udar niedokrwienny mózgu [70, 81].

W patogenezie miażdżycy istotną rolę odgrywają zaburzenia metabolizmu lipidów i lipoprotein. Do podstawowych procesów biorących udział w powstawaniu uszkodzenia miażdżycowego zalicza się gromadzenie CH w ścianie naczyń krwionośnych. Pochodzi on głównie z LDL oraz remnantów CHM i VLDL, dlatego frakcje lipoprotein zawierające apoB uznaje się za proaterogenne. Ich podwyższone stężenie i retencja w osoczu sprzyjają ich modyfikacjom, głównie utlenieniu i agregacji. Zmodyfikowane lipoproteiny są wychwytywane przez makrofagi obecne w ścianie naczyń, czego efektem jest powstawanie obładowanych CH komórek piankowatych. Komórki te produkują czynniki wzrostowe, cytokiny i proteazy, co przyspiesza powstawanie i progresję blaszki miażdżycowej. Komórki piankowate ostatecznie obumierają, a zmagazynowany CH zostaje uwolniony do środowiska, uczestnicząc w tworzeniu rdzenia zaawansowanej blaszki miażdżycowej [80, 81].

Działanie przeciwmiażdżycowe przypisuje się lipoproteinom HDL, głównie ze względu na ich udział w procesie zwanym zwrotnym transportem cholesterolu do wątroby (*reverse cholesterol transport* - RCT), dzięki któremu możliwe jest zmniejszanie ilości CH w komórkach nim obciążonych. RCT obejmuje odbieranie CHW z komórek tkanek obwodowych, w tym z makrofagów, przez lipoproteiny HDL, estryfikację CH przez acylotransferazę lecytyna:cholesterol (LCAT) oraz przekazanie CHE z HDL do wątroby [59, 74].

1.3. Biogeneza i przemiany HDL

HDL stanowią heterogenną populację lipoprotein. W krążeniu obecne są zarówno prekursorowe, dyskoidalne cząstki HDL, jak i dojrzałe cząstki sferyczne, a ich wzajemne przemiany gwarantują efektywność RCT [76].

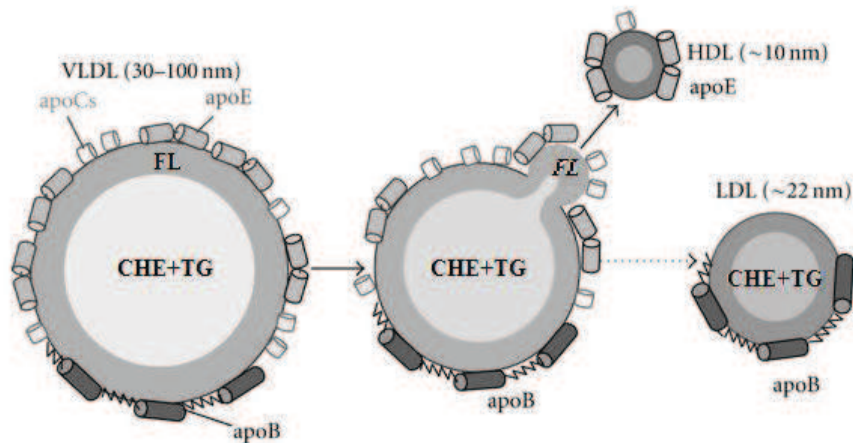
Prekursorowe cząstki HDL zbudowane są z apolipoprotein oraz FL i mogą zawierać niewielką ilość CHW. Źródła ich powstawania są różne.

Są wydzielane przez hepatocyty i enterocyty, jak również przez inne komórki, np. makrofagi. Kluczową rolę w komórkowym powstawaniu prekursorów HDL odgrywa białko ABCA1, czyli białko błonowe należące do rodziny białek mających kasetę wiążącą ATP (tzw. białek ABC) typu A1, które umożliwia łączenie się wolnych apolipoprotein z lipidami.

Prekursory HDL mogą powstawać również na drodze pozakomórkowej, np. podczas przemian dojrzałych cząstek HDL. Tworzą się one wówczas, gdy rozmiary lipidowego rdzenia dojrzałych HDL ulegają zmniejszeniu lub gdy zwiększa się ilość lipidów powierzchniowych w lipoproteinach. Zmniejszenie rdzenia obserwuje się na skutek działania lipazy wątrobowej (HL), katalizującej lipolizę TG w HDL. Zwiększenie ilości FL na powierzchni cząstek możliwe jest natomiast dzięki działaniu białka transportującego fosfolipidy (PLTP). PLTP uczestniczy w transporcie FL pomiędzy różnymi klasami lipoprotein oraz pomiędzy podfrakcjami HDL. Umożliwia fuzję cząstek HDL, podczas której powstaje cząstka większa i uwolniona zostaje ubogolipidowa cząstka prekursorowa.

Prekursory HDL powstają również na drodze lipolizy VLDL, katalizowanej przez lipazę lipoproteinową (LPL). VLDL są heterogenną populacją lipoprotein o różnej wielkości. Każda cząstka VLDL zawiera jedną cząsteczkę niewymienialnej

apoB i wiele cząsteczek wymiennalnych apoE i apoC (ryc. 2). Podczas lipolizy TG przez LPL następuje zmniejszenie rdzenia lipoprotein, co prowadzi do uwolnienia materiału powierzchniowego, z którego powstają nowe cząstki HDL (ryc. 2). W transporcie materiału powierzchniowego z VLDL do HDL uczestniczy PLTP [16, 26, 76, 81, 85].



Ryc. 2. Powstawanie HDL podczas przemian VLDL [26]

W osoczu prekursorowe cząstki HDL zostają wzbogacone w lipidy pozyskane z komórek tkanek obwodowych lub z lipoprotein zawierających apoB, a CHW podlega estryfikacji katalizowanej przez LCAT. Prowadzi to do przebudowy i powstania sferycznych, dojrzałych, małych cząstek HDL₃, a następnie dużych HDL₂.

Estry cholesterolu są następnie transportowane przez HDL do wątroby, gdzie ich wychwyt następuje poprzez oddziaływanie HDL z receptorami SR-B1. Cząstki HDL, które zawierają apoE, mogą również oddziaływać z innymi receptorami wątrobowymi, dla których apoE jest ligandem (rozdział 1.5). CHE z HDL może być również przenoszony do lipoprotein zawierających apoB. Odbywa się to przy udziale białka transportującego estry cholesterolu (CETP), które pośredniczy w wymianie CHE na TG z lipoprotein zawierających apoB. CHE jest następnie wychwytywany przez komórki wątroby na drodze zależnej od wiązania się lipoprotein zawierających apoB z receptorami LDL [16, 74, 81].

1.4. Heterogenność HDL a RCT

Główną apolipoproteiną HDL jest apoAI, ale w obrębie HDL wyodrębniono także inne białka. Różnice w składzie białkowym i lipidowym cząstek HDL powodują, że uwzględniając różne kryteria rozdziału (gęstość, ruchliwość elektroforetyczna, wielkość, skład białkowy) można wyróżnić kilkanaście podfrakcji HDL (tab. 4) [74, 76].

Tabela 4. Przykłady podfrakcji HDL [29, 39, 42, 76, 77, 88]

Metoda rozdziału	Kryterium rozdziału	Podfrakcje
ultrawiórowanie	gęstość (g/ml)	HDL ₂ (d = 1,063 – 1,125); HDL ₃ (d = 1,125 – 1,21); VHDL (d > 1,21)
chromatografia powinowactwa	skład białkowy	LpAI; LpAII; LpE; LpAIV; LpAI:AII; LpAI:E; LpAII:E; LpAI:AII:E;
elektroforeza dwukierunkowa	ruchliwość elektroforetyczna, wielkość cząstek	γ_1 -Lp – γ_5 -Lp; pre β_1 -Lp – pre β_3 -Lp ; α_1 -Lp – α_4 -Lp;

Ze względu na tak dużą heterogenność cząstek uznaje się obecnie, że termin HDL odnosi się do lipoprotein posiadających podobną gęstość, które mogą zawierać różne apolipoproteiny i lipidy i występować w osoczu w bardzo szerokim zakresie stężeń. Coraz większą uwagę poświęca się różnym, często występującym w niskich stężeniach podfrakcjom HDL, które mogą spełniać specyficzne funkcje w ustroju i odgrywać szczególnie ważną rolę w wywieraniu działania przeciwmiażdżycowego [74].

Oddziaływanie różnych podfrakcji HDL obserwuje się także w pierwszym, kluczowym etapie RCT, jakim jest przekazywanie CHW z komórek tkanek

obwodowych do HDL. Proces ten może odbywać się na drodze niespecyficznego procesu dyfuzji CH z błon komórkowych do akceptorów lub na drodze procesów specyficznych, w których udział biorą białka i receptory komórkowe (tab. 5).

Tabela 5. Drogi usuwania CH z komórek [74]

Droga usuwania CH z komórek	Preferowane akceptory	Charakterystyka
dyfuzja CH z błon komórkowych	dojrzałe cząstki HDL	transport pasywny, dwukierunkowy
oddziaływanie z białkiem ABCA1	prekursorowe, ubogolipidowe HDL zawierające apoAI lub apoE	transport aktywny, jednokierunkowy
oddziaływanie z białkiem ABCG1	dojrzałe, sferyczne cząstki HDL; preferencyjnie cząstki zawierające apoE	transport aktywny, jednokierunkowy
oddziaływanie z receptorem SR-B1	dojrzałe, sferyczne cząstki HDL; duże cząstki HDL są lepszymi akceptorami od mniejszych	transport pasywny, dwukierunkowy

Ważny udział w RCT mniejszych ilościowo podfrakcji HDL, niezawierających apoAI, może potwierdzać fakt, że u części pacjentów z niskim stężeniem HDL, spowodowanym np. niedoborem apoAI, nie obserwuje się rozwoju miażdżycy. To stymuluje naukowców do intensywnych badań mających na celu wyjaśnić mechanizmy powstawania i przemian HDL, w skład których wchodzi apolipoproteiny inne niż apoAI, a które, podobnie jak LpAI, pełnią ważne funkcje w RCT [89]. Do takich cząstek zalicza się lipoproteiny, w skład których wchodzi apoE [35].

1.5. Apolipoproteina E

1.5.1. Budowa apoE

Apolipoproteina E to bogata w argininę glikoproteina o masie cząsteczkowej 34,2 kDa, zbudowana z 299 aminokwasów [31]. Produkowana jest w różnych narządach: wątrobie, mózgu, śledzionie, płucach, jajnikach, nerkach, mięśniach i nadnerczach. Ekspresję apoE stwierdzono także w makrofagach i tkance tłuszczowej. Głównym źródłem osoczowej puli apoE jest wątroba. Szacuje się, że w tym narządzie powstaje 60 – 80% apolipoproteiny obecnej w osoczu [24].

ApoE, tak jak inne apolipoproteiny wymienne, posiada w swej strukturze 22-aminokwasowe powtarzające się fragmenty rozdzielone proliną, które tworzą amfipatyczne α -helisy [48].

ApoE zbudowana jest z dwóch domen połączonych regionem zawiasowym, wrażliwym na proteazy [52]. W stanie niezwiązanym z lipidami domena N-końcowa ma postać upakowanej struktury w kształcie pęczka, złożonego z czterech amfipatycznych α -helis. Domena N-końcowa odpowiada za wiązanie z receptorem LDL (LDLR), białkiem pokrewnym receptorowi LDL (LRP), proteoglikanami zawierającymi łańcuchy siarczanu heparanu (HSPG) oraz za wiązanie z receptorem SR-B1 [31].

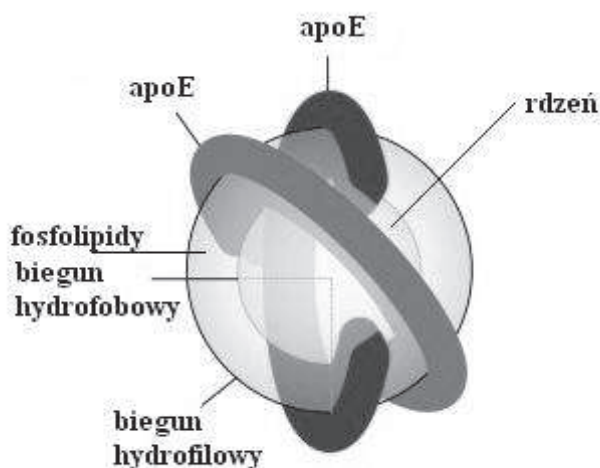
Struktura hydrofobowej domeny C-końcowej nie jest jeszcze dokładnie scharakteryzowana. Wiadomo, że w domenie tej znajduje się główne miejsce wiązania lipidów [31]. Vedhachalam wykazał, że w domenie tej znajduje się również miejsce oddziaływania z białkiem ABCA1 [87]. Domena C-końcowa odpowiada także za samoasocjację apoE w przypadku braku obecności lipidów. Skutkiem tego, w środowisku wodnym wolnym od lipidów apoE występuje w postaci mieszaniny monomerów, tetramerów, oktamerów i niewielkiej ilości wyższych oligomerów [48].

Podczas wiązania z lipidami następują zmiany konformacji cząsteczki apoE. Zmiany te nie są jeszcze dokładnie poznane, ponieważ apoE wykazuje dużą elastyczność i może przyjmować różne konformacje w zależności od wielkości, kształtu, składu lipidowego oraz obecności innych apolipoprotein w lipoproteinach, z którymi się łączy. Konformacja białka decyduje o powinowactwie apoE do receptorów [31]. Wolna apoE wykazuje najwyższe powinowactwo do ABCA1, natomiast nie wykazuje powinowactwa do receptora LDL [38]. Oddziaływanie z LDLR

możliwe jest po związaniu się lipidów z domeną C-kończową, prowadzącym do rozwinięcia pęczka helis tworzących domenę N-kończową [48].

1.5.2. Oddziaływanie apoE z fosfolipidami

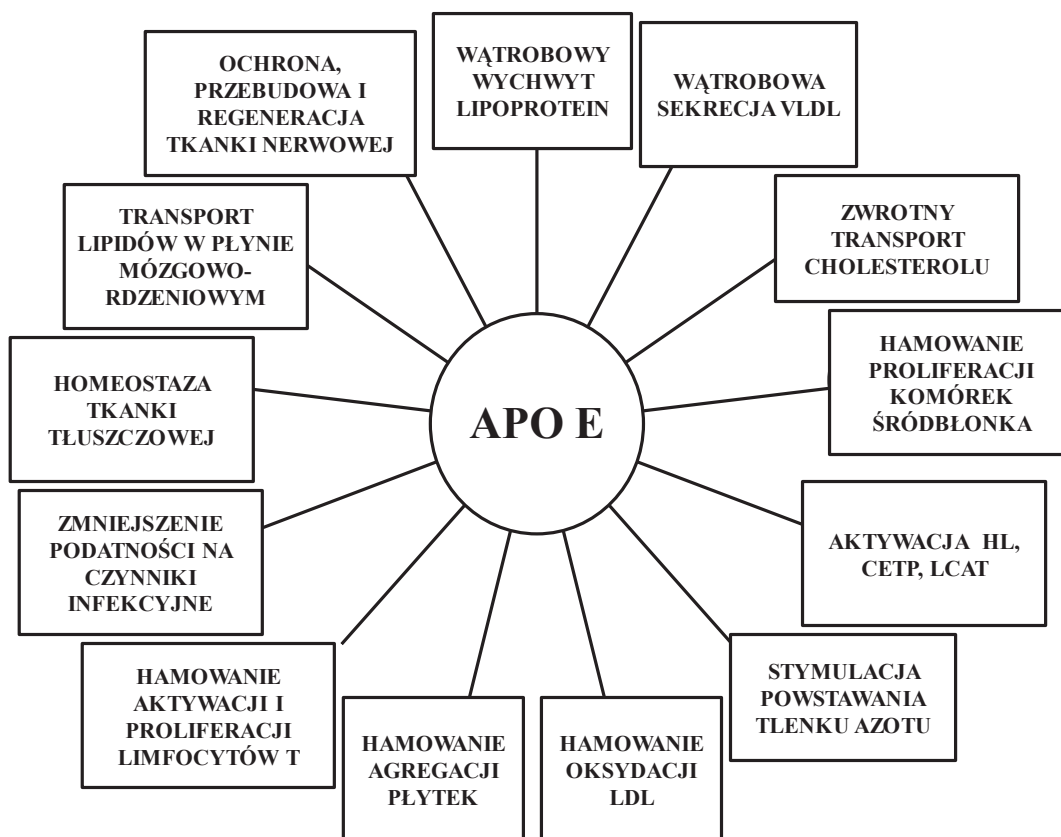
ApoE, podobnie jak apoAI, posiada zdolność spontanicznego solubilizowania FL i tworzenia struktur podobnych do HDL pod względem wielkości i gęstości [48]. Odmienne od apoAI, która tworzy z FL struktury dyskowe, w przypadku apoE uważa się, że tworzy ona preferencyjnie z FL struktury sferoidalne, gdzie cząsteczki apoE reagują z polarnym (hydrofilowym) biegunem fosfolipidów, przyjmując kształt podkowy (ryc. 3). Takie struktury mają zdolność do znacznego zwiększenia powierzchni rdzenia cząstki, w którym mogą być upakowane lipidy hydrofobowe, np. estry cholesterolu [49, 64, 102].



Ryc. 3. Model cząstki zbudowanej z dipalmitoilofosfatydylocholiny i apoE, oparty na badaniach struktury metodą dyfrakcji promieni X [49]

1.5.3. Funkcje apoE

ApoE zalicza się do białek o plejotropowym działaniu, a jej udział wykazano w różnych układach biologicznych (ryc. 4).



Ryc. 4. Funkcje apolipoproteiny E

ApoE jest składnikiem lipoprotein i bierze udział w utrzymaniu homeostazy lipidów w osoczu. Jest podstawowym białkiem biorącym udział w transporcie lipidów w płynie mózgowo-rdzeniowym. Produkowana jest przez komórki tkanki nerwowej i przypisuje się jej udział w ochronie, przebudowie i regeneracji tej tkanki. ApoE wpływa na funkcje śródbłonna, odpowiedź zapalną organizmu i hemostazę. Wykazuje działanie przeciwutleniające. Udział apoE stwierdzono w utrzymaniu homeostazy tkanki tłuszczowej. Istnieją także doniesienia naukowe o wpływie apoE na podatność organizmu na czynniki infekcyjne, takie jak bakterie i wirusy [51, 52].

1.5.4. Przeciwmiażdżycowe oddziaływanie apoE

Kluczową rolę apoE jako czynnika przeciwmiażdżycowego wykazano w badaniach na myszach *apoE-knockout*, które nie wytwarzają apoE. U zwierząt tych zaawansowana miażdżycy rozwija się spontanicznie, nawet przy zastosowaniu diety o normalnej zawartości CH. Warto podkreślić, że rozwoju miażdżycy nieindukowanego

dieta nie stwierdzono u zwierząt, u których wyciszono gen dla apoAI lub LDLR. Zastosowanie u myszy *apoE-knockout* diety bogatej w CH przyspiesza rozwój miażdżycy, prowadząc do przedwczesnej śmierci zwierząt [19, 57]. Wprowadzenie genu dla apoE, np. na drodze transplantacji szpiku kostnego lub za pomocą wektorów wirusowych hamuje rozwój miażdżycy [7, 30]. Raffai wykazał, że regresja zmian miażdżycowych jest w takich przypadkach niezależna od obniżenia stężenia CH [71].

O przeciwmiażdżycowej roli apoE decyduje przede wszystkim jej udział w utrzymaniu homeostazy lipidów w ustroju [24].

ApoE reguluje anaboliczne i kataboliczne drogi przemian lipoprotein bogatych w TG. Stymuluje wątrobową produkcję TG oraz VLDL i jest wydzielana z wątroby jako składnik VLDL. CHM w osoczu są wzbogacane w apoE pozyskaną z innych klas lipoprotein. Białko to jest ligandem umożliwiającym wiązanie się lipoprotein do receptorów komórkowych i ich endocytozę. Bardzo ważną rolą apoE jest wątrobowy wychwyty i usuwanie z osocza cząstek VLDL oraz remnantów VLDL i CHM. Odbywa się to na drodze wiązania się apoE z receptorami komórkowymi LDLR i LRP oraz wiązania się z HSPG lub kompleksem HSPG/LRP na komórkach wątroby [52].

ApoE jest aktywatorem enzymów i białek biorących udział w metabolizmie lipoprotein: HL, LCAT i CETP [24].

ApoE uczestniczy w RCT i promuje go na wszystkich jego etapach [21]. Analogicznie do apoAI, wolna lub ubogolipidowa apoE na drodze oddziaływania z białkiem ABCA1 bierze udział w wychwycie CH z komórek. W ten sposób tworzą się dyskooidalne cząstki lipoproteinowe, które następnie, na skutek estryfikacji CH przez LCAT, ulegają przekształceniu w cząstki sferyczne [38, 44]. Duże, sferyczne cząstki HDL₂ bogate w apoE akceptują CH z komórek na drodze wiązania się z białkiem ABC typu G1 (ABCG1) [53]. Do wychwyty CH z komórek zdolne są również obecne w osoczu sferyczne cząstki lipoproteinowe o ruchliwości gamma (γ), zawierające apoE jako jedyny składnik białkowy, dla których mechanizm odbierania CH komórkowego nie został jeszcze ustalony [35]. ApoE jako aktywator LCAT przyspiesza proces estryfikacji CH. Obecność apoE w lipoproteinach umożliwia znaczne powiększanie się rdzenia tych cząstek i akumulację w nich dużej ilości CHE [49]. Dzięki interakcji z receptorami SR-B1 i LDLR apoE jest też zaangażowana w ostatni etap RCT, czyli przekazywanie CHE do wątroby [74].

Bardzo istotne oddziaływanie przeciwmiażdżycowe przypisuje się apoE produkowanej przez makrofagi. Wykazano, że komórki te przy nadmiernym obciążeniu CH zwiększają ekspresję apoE w celu bardziej efektywnego jego usuwania. Niedobór apoE w makrofagach skutkuje znacznym obciążeniem CH i tworzeniem się komórek piankowatych, a zmiany te obserwuje się mimo ekspresji apoAI i białka ABCA1 [21].

ApoE przypisuje się też inne działania przeciwmiażdżycowe, niezależne od udziału w metabolizmie i transporcie lipidów, jak np. hamowanie agregacji płytek krwi, aktywacji i proliferacji limfocytów T oraz migracji i proliferacji komórek śródbłonna, jak również hamowanie oksydacji lipidów i stymulację powstawania tlenku azotu [24].

Pozytywny wpływ apo E może być jednakże niwelowany przez izoformę apoE (rozdział 1.5.5), jej całkowite stężenie w osoczu, dystrybucję pomiędzy różne klasy lipoprotein oraz typ komórek odpowiedzialnych za jej produkcję. Zarówno niedobór, jak i nadmiar apoE prowadzi do hipertriglicerydemii. Za małą ilość tej apolipoproteiny upośledza usuwanie z osocza cząstek bogatych w TG i ich remnantów, natomiast jej nadmiar stymuluje nadmierną produkcję wątrobową VLDL i upośledza ich lipolizę, głównie poprzez wypieranie z powierzchni lipoprotein aktywatora LPL – apoCII [52]. Wykazano również, że przy zwiększonej ilości lipidów w osoczu, apoE obecne w VLDL lub generowane w adipocytach promuje różnicowanie się tych komórek i zwiększoną akumulację lipidów w tkance tłuszczowej, co może prowadzić do rozwoju otyłości [43].

1.5.5. Polimorfizm apoE

ApoE jest białkiem polimorficznym, występującym w trzech głównych izoformach: apoE2, apoE3 i apoE4. Różnią się one rodzajem aminokwasów w pozycji 112 i 158 łańcucha polipeptydowego. Najczęściej w populacji występuje izoforma apoE3, która w pozycji 112 łańcucha posiada cysteinę, a w pozycji 158 łańcucha – argininę. Najrzadziej z wymienionych występująca izoforma to apoE2, w której w obu wskazanych pozycjach stwierdza się obecność cysteiny. W apoE4 w obu wymienionych pozycjach łańcucha polipeptydowego występuje arginina [21].

Polimorfizm apoE wpływa na własności strukturalne i funkcjonalne białka. Największą stabilność termiczną i chemiczną wykazuje apoE2, najmniejszą – apoE4 [24]. Izoforma apoE2 wykazuje 50 – 100-krotnie niższe powinowactwo do receptora LDL, w porównaniu do apoE3 i apoE4 [31]. W przypadku obecności apoE2 obserwuje się zmniejszony wychwyty remnantów lipoprotein związany z rozwojem hiperlipoproteinemii (HLP) typu III wg Friedricksona. ApoE2 i apoE3 preferencyjnie wiążą się z mniejszymi, bogatszymi w FL cząstkami HDL, natomiast apoE4 wykazuje większe powinowactwo do dużych, bogatych w TG, cząstek VLDL. Obecność apoE4 wiąże się z podwyższonym poziomem apoB i CH. Stwierdzono, że obecność tej izoformy predysponuje do rozwoju miażdżycy, choroby Alzheimera i zwiększonej podatności na infekcje wirusowe. U nosicieli wirusa HIV, u których występuje izoforma apoE4, AIDS rozwija się szybciej. Za przyczynę takiego oddziaływania uznaje się występowanie w cząsteczce apoE4 interakcji między domeną C- i N-końcową, prowadzącą do uzyskania bardziej ścisłej konformacji białka i zmian w jego oddziaływaniu z różnymi strukturami organizmu [52].

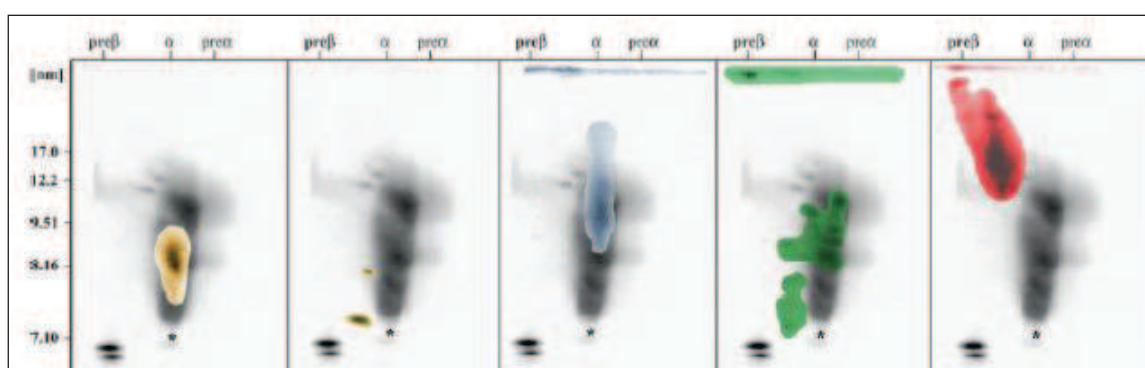
1.6. Lipoproteiny zawierające apoE

ApoE jest integralnym składnikiem wszystkich klas lipoprotein z wyjątkiem małych LDL. Stężenie apoE w poszczególnych klasach lipoprotein zależy od stężenia całkowitego apoE w osoczu, fenotypu apoE oraz stężenia i składu poszczególnych klas lipoprotein, które wpływają na wymianę krążącej apoE [14].

U osób z normolipemią ponad 60% apoE jest związane z HDL, podczas gdy w przypadku zaburzeń gospodarki lipidowej jest to tylko 8% - 40% [14]. U pacjentów z hiperlipidemią, u których występuje zwiększone ryzyko zachorowania na choroby układu sercowo-naczyniowego, obserwuje się podwyższone stężenie apoE, szczególnie na skutek wzrostu jej stężenia w lipoproteinach zawierających apoB [5, 23]. Leczenie atorwastatyną i fenofibratem powoduje obniżenie stężenia apoE w VLDL, co uznaje się za jeden z czynników normujących gospodarkę lipidową [15, 62]. Wydaje się natomiast, że wyższe stężenie apoE związanej z HDL wiąże się z efektywniejszym działaniem przeciwmiażdżycowym tej frakcji lipoprotein [53, 100].

1.6.1. Lipoproteiny HDL zawierające apoE

ApoE występuje przede wszystkim w podfrakcji HDL₂ [56]. Cząstki HDL zawierające apoE (HDL-apoE) są większe i wykazują mniejszą ruchliwość elektroforetyczną w stosunku do cząstek HDL niezawierających apoE (ryc. 5).



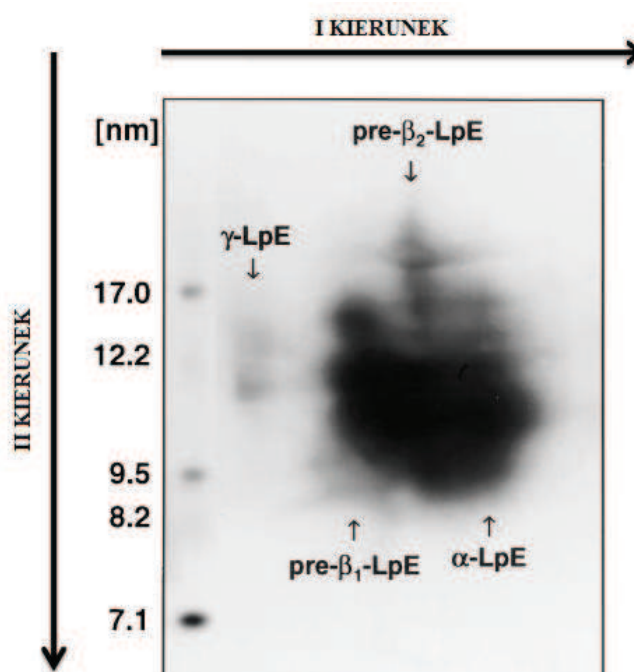
Rycina 5. Dystrybucja apolipoprotein w cząstkach HDL rozdzielonych metodą elektroforezy dwukierunkowej (2D-PAGE) [77]. Obecność apolipoprotein: apoAII (kolor żółty), apoAIV (kolor jasnożółty), apoCI (kolor srebrny), apoCIII (kolor zielony) i apoE (kolor czerwony) przedstawiono na tle cząstek zawierających apoAI (kolor szary).

HDL-apoE odgrywają ważną rolę w RCT. U myszy *apoE-knockout* cząstki HDL mają zredukowaną zdolność akceptowania CH, zmniejszoną zawartość apoAI i mniejszą aktywność przeciwutleniającą. Aktywność LCAT u tych zwierząt jest również zmniejszona, a HDL zawierają tylko 45% CH, w porównaniu do HDL zwierząt kontrolnych [21]. Hayek zaobserwował, że HDL uzyskane od myszy *apoE-knockout* miały o 40% mniejszą zdolność do promowania usuwania CH z makrofagów, w porównaniu z HDL uzyskanymi od myszy kontrolnych, a dodanie apoE do HDL pozbawionych tej apolipoproteiny skutkowało zwiększeniem zdolności akceptowania CH komórkowego do wartości obserwowanych dla HDL kontrolnych [32].

U ludzi niskie stężenie HDL₂ jest związane z wysokim ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [95]. Zwiększone stężenie HDL-apoE obserwuje się u osób z niedoborem białka CETP [100]. Uznaje się, że obecne u nich duże cząstki HDL₂, ze względu na podwyższoną zawartość LCAT i apoE, wykazują zwiększoną zdolność do promowania usuwania CH z makrofagów na drodze zależnej od ABCG1 i mogą odgrywać istotną rolę przeciwmiażdżycową [53].

1.6.2. Lipoproteiny HDL zawierające apoE jako jedyny składnik białkowy

Część osoczowej puli apoE wchodzi w skład lipoprotein, gdzie białko to jest jedynym składnikiem białkowym. Lipoproteiny te, określane jako LpE lub HDL-LpE, stanowią niejednorodną grupę cząstek, o wielkości pośredniej między LDL i HDL oraz gęstości powyżej 1,21 g/ml. Średnica cząstek waha się od 9 do 18,5 nm. LpE wykazują różną ruchliwość elektroforetyczną w żelu agarozowym, co stało się podstawą ich podziału na podfrakcje: γ -LpE, pre β -LpE i α -LpE (ryc. 6) [39].



Rycina 6. Dystrybucja lipoprotein HDL-LpE po rozdziale metodą elektroforezy dwukierunkowej (2D-PAGE) [42]

Obecność LpE wykazano w osoczu osób z normolipemią i hipoalfalipoproteinemią. Stwierdzono, że osoby z niedoborem białka CETP mają znamienne wyższe stężenie LpE w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano natomiast różnicy stężeń LpE w stosunku do grupy kontrolnej w przypadku osób z niedoborem białka ABCA1, niedoborem LCAT czy w przypadku mutacji genu apoAI [39].

ApoE w cząstkach LpE występuje przede wszystkim w postaci monomeru, podczas gdy w lipoproteinach HDL zawierających także inne apolipoproteiny, apoE

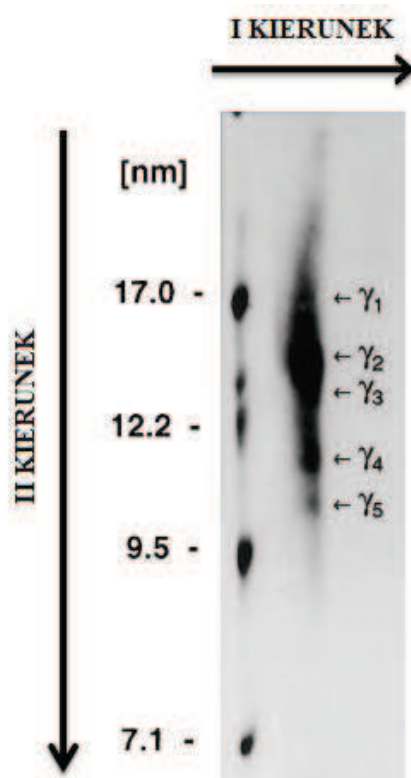
występuje także jako homodimer oraz heterodimer apoE-AII [39]. Cząstki LpE są większe i posiadają mniejszą ruchliwość elektroforetyczną (rycina 5), a ich metabolizm jest szybszy w stosunku do lipoprotein HDL, zawierających oprócz apoE także inne apolipoproteiny [41]. Cząstki te zawierają ponadto największy udział FL i najniższy stosunek CHE/CHW, w porównaniu do pozostałych klas HDL-apoE [29].

Niewiele wiadomo o powstawaniu i przemianach cząstek HDL-LpE. W badaniach na liniach komórkowych wykazano, że ludzkie komórki *hepatoma* i ludzkie makrofagi wydzielają LpE o wielkości 7,5 – 18,5 nm i gęstości powyżej 1,21 g/ml [39]. Stwierdzono także, że LpE, podobnie jak HDL-apoE [41], uczestniczą w transferze apoE do lipoprotein bogatych w TG w okresie poposiłkowym [39].

Wśród LpE szczególną uwagę przyciąga frakcja o ruchliwości elektroforetycznej gamma – γ -LpE [42]. W badaniach naukowych wykazano bowiem, że cząstki γ -LpE, obok ubogolipidowych prekursorowych pre β -LpAI, uczestniczą w procesie wychwytu CH z komórek [35].

1.6.3. Lipoproteiny γ -LpE

γ -LpE są sferycznymi lipoproteinami o wielkości cząstek w zakresie 9,5 – 16,5 nm, o gęstości powyżej 1,21 g/ml, bogatymi w sfingomielinę. Szacuje się, że z frakcją tą związane jest tylko około 1 - 2% osoczowej puli apoE. Wśród γ -LpE wyróżniono 5 podfrakcji o różnej wielkości - od największych γ_1 -LpE o średniej wielkości cząstek 16,4 nm, do najmniejszych γ_5 -LpE o średniej wielkości 9,9 nm. Frakcję o najwyższym stężeniu stanowi γ_2 -LpE o średniej wielkości 13,3 nm (ryc. 7) [42].



Ryc. 7. Dystrybucja lipoprotein γ -LpE po rozdziale metodą elektroforezy dwukierunkowej (2D-PAGE) [42]

Drogi powstawania i przemian γ -LpE nie są dokładnie poznane. Produkcję tych lipoprotein stwierdzono w komórkach *hepatoma* i w makrofagach [35]. Krimbou stwierdził powstawanie γ -LpE na skutek lipolizy cząstek bogatych w TG [42].

W badaniach na liniach komórkowych wykazano, że γ -LpE jest bardziej aktywna w wychwycie CH z komórek niż frakcja pre β -LpAI. Po inkubacji osocza ludzkiego z fibroblastami obciążonymi znakowanym CH, wyższy poziom radioaktywności stwierdzano we frakcji γ -LpE [34, 35, 88-90]. Kiedy w drugim etapie doświadczenia osocze oddzielano od komórek i poddawano inkubacji w temperaturze 37°C, poziom radioaktywności w γ -LpE spadał, a wzrastał w α -HDL i LDL [35, 88]. Ilość CH akceptowanego przez frakcję γ -LpE silnie korelowała z całkowitym poziomem CH uwalnianego z komórek ($r = 0,89$, $p < 0,01$), jak również ze stężeniem cholesterolu HDL ($r = 0,9$, $p < 0,01$) [34]. O ważnej roli γ -LpE jako akceptora CH komórkowego mogą świadczyć również wyniki badań, w których wykazano, że podczas inkubacji fibroblastów z osoczem uzyskanym od myszy pozbawionej genu dla apoA, uwalnianie CH z komórek następowało w stopniu porównywalnym dla osocza uzyskanego od myszy kontrolnych. W przypadku osocza uzyskanego

od myszy z wyciszonym genem apoE, po inkubacji osocza z fibroblastami uwolnieniu uległo zaledwie 5% CH (w porównaniu do warunków kontrolnych) [35].

Polimorfizm apoE wpływał na stężenie γ -LpE oraz na uwalnianie CH z błon fibroblastów do frakcji γ -LpE. W przypadku fenotypu apoE2/2 i apoE4/4 stwierdzono bardzo niskie stężenie γ -LpE, a po inkubacji fibroblastów obciążonych CH z osoczem osób o tych fenotypach, we frakcji γ znalazło się odpowiednio 7- i 13-krotnie mniej CH niż po inkubacji komórek z osoczem osób o fenotypie apoE3/3 [34].

Obecność γ -LpE stwierdzono w różnych rodzajach genetycznie uwarunkowanych niedoborów HDL: rodzinnym niedoborze apoAI, rodzinnym niedoborze LCAT, chorobie rybich oczu i chorobie tangierskiej. Von Eckardstein wykazał, że w przypadku tych zaburzeń transport CH z komórek do wątroby był utrzymany, choć w stosunku do osób zdrowych różnił się ilościowo i jakościowo. Stwierdził on, że we wszystkich przypadkach stopień wychwytu znakowanego CH przez γ -LpE był porównywalny do wychwytu obserwowanego dla γ -LpE obecnej w osoczu osób zdrowych [88].

W badaniach przemian γ -LpE *in vitro* wykazano, że inkubacja osocza w temperaturze 37°C skutkuje dynamicznym spadkiem stężenia tych lipoprotein i proces ten nie zależy od obecności LCAT, CETP i LPL. Spadek stężenia γ -LpE był natomiast hamowany w obecności fibroblastów, które, jak stwierdzono w badaniach na liniach komórkowych, same nie produkują γ -LpE [35, 42]. Krimbou stawia hipotezę, że FL błon komórkowych mogą odgrywać rolę w utrzymaniu osoczowej puli γ -LpE. Wykazał on także, że lipoliza VLDL lub mrożenie osocza bogatego w TG skutkuje wzrostem ich stężenia i stwierdza, że musi istnieć powiązanie między lipoproteinami bogatymi w TG a tworzeniem γ -LpE, a ocena tego oddziaływania wymaga dalszych badań [42].

1.6.4. Rekonstruowane cząstki HDL zawierające apoE

Dużą wiedzę na temat przemian cząstek HDL wniosły badania na tzw. rekonstruowanych cząstkach HDL (rHDL), preparowanych *in vitro* z FL i apolipoprotein. Dzięki uzyskaniu dużej ilości jednoznacznie scharakteryzowanych pod względem składu i struktury cząstek, możliwe są badania przemian określonych grup lipoprotein [75].

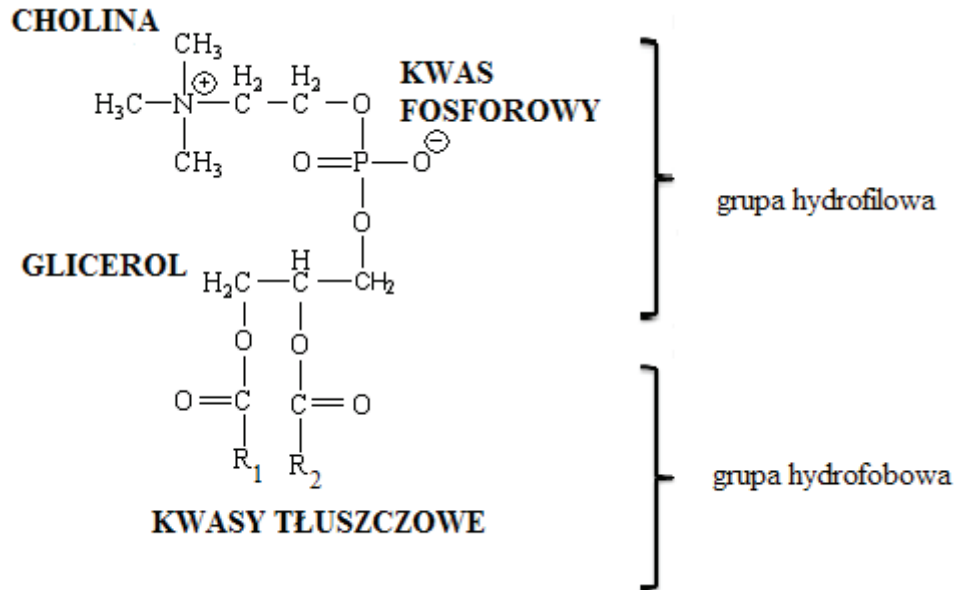
W badaniach na rekonstruowanych cząstkach HDL zawierających apoE (rHDL-apoE) wykazano, że cząstki te podlegają przemianom pod wpływem LCAT i białek transportujących lipidy. Rye wykazała, że LCAT przebudowuje dyskoidalne rHDL-apoE zawierające CHW w cząstki sferyczne, choć szybkość estryfikacji CH była mniejsza niż dla cząstek rHDL zawierających apoAI (rHDL-apoAI). CETP na drodze fuzji przekształcała sferyczne rHDL-apoE w cząstki większe i podczas tego procesu nie następowała dysocjacja apoE [75]. Settasatian wykazał, że sferyczne cząstki rHDL-apoE pod wpływem PLTP na drodze fuzji i przearanżowań w budowie ulegają przekształceniu w cząstki większe i mniejsze i podczas tego procesu również nie następuje dysocjacja apoE. Sferyczne rHDL i duże produkty reakcji z PLTP wykazywały ruchliwość między α i pre β , natomiast małe produkty reakcji – ruchliwość α [78].

Należy zaznaczyć, że zmiany, jakim podlegały rHDL-apoE były odmienne w stosunku do zmian, jakim podlegają rHDL-apoAI, gdzie podczas przemian wywołanych obecnością CETP lub PLTP następuje dysocjacja ubogolipidowej lub wolnej apoAI [75, 77].

1.7. Liposomy lecytynowe w terapii przeciwmiażdżycowej

Badaniach epidemiologicznych wykazują występowanie odwrotnej korelacji między stężeniem cholesterolu HDL a rozwojem miażdżycy. Współczesna wiedza na temat przeciwmiażdżycowego działania HDL wskazuje jednak, że to raczej nie sam poziom cholesterolu HDL, a efektywność zwrotnego transportu cholesterolu do wątroby ma większe znaczenie w wywieraniu działania przeciwmiażdżycowego [82]. Podejmowane są więc próby wzmacniania efektywności RCT, np. poprzez zastosowanie liposomów zbudowanych z fosfatydylocholiny, zwyczajowo nazywanych liposomami lecytynowymi [68].

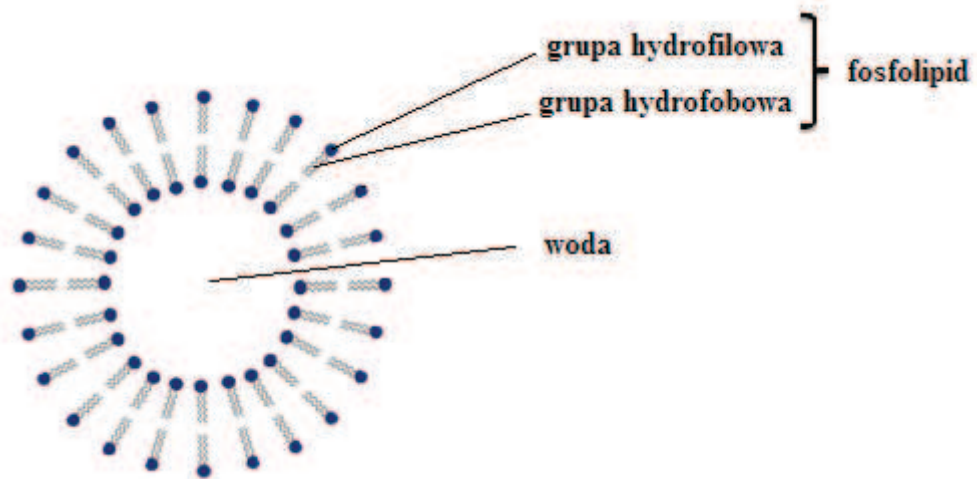
Fosfatydylocholina to fosfolipid, w którym reszta fosforanowa zestryfikowana jest choliną (ryc. 8). Związek ten jest głównym składnikiem błon komórkowych, składnikiem lipoprotein oraz substratem w reakcji estryfikacji katalizowanej przez LCAT, podczas której grupa acylowa fosfatydylocholiny przenoszona jest na cholesterol wolny, w wyniku czego powstaje ester cholesterolu i lizofosfatydylocholina.



Ryc. 8. Budowa chemiczna fosfatydylocholiny

1.7.1. Budowa liposomów

Liposomy to pęcherzykowe kuliste struktury, tworzone przez FL w środowisku wodnym. Ze względu na kształt i amfifilny charakter cząsteczek FL, tworzą one preferencyjnie zamknięte dwuwarstwowe struktury, w których grupy hydrofobowe skierowane są do siebie, a grupy hydrofilowe na zewnątrz (ryc. 9).



Ryc. 9. Budowa liposomu jednowarstwowego

Liposomy ze względu na wielkość można podzielić na trzy główne klasy: małe jednowarstwowe liposomy (SUV – *small unilamellar vesicles*) o wielkości 25 – 100 nm, duże jednowarstwowe liposomy (LUV – *large unilamellar vesicles*) o wielkości 100 – 400 nm oraz liposomy wielowarstwowe (MLV – *multilamellar vesicles*) o wielkości od 200 nm do kilku mikrometrów [37]. Bardziej efektywne w oddziaływaniu z lipoproteinami są liposomy jednowarstwowe: SUV i LUV [91].

1.7.2. Oddziaływanie liposomów lecytynowych z lipoproteinami osocza

W wielu badaniach *in vivo* i *in vitro* udowodniono, że liposomy lecytynowe spontanicznie reagują z lipoproteinami osocza, a szczególną rolę w tym oddziaływaniu przypisuje się apolipoproteinom, które posiadają zdolność solubilizowania FL. Skutkiem reakcji są zmiany w strukturze lipoprotein i liposomów. Lipoproteiny zostają wzbogacone w FL i zubożone o CHW i apolipoproteiny. Zwiększa się wielkość cząstek lipoprotein, zmniejsza się ich ruchliwość elektroforetyczna i gęstość [55, 84]. W zależności od stosunku składników mieszaniny inkubacyjnej, oddziaływanie może prowadzić do przyjęcia przez liposomy apolipoprotein bez zniszczenia struktury liposomów i/lub do rozpadu liposomów i tworzenia nowych struktur, w skład których wchodzi FL i apolipoproteiny [91].

W badaniach *in vivo* i *in vitro* po podaniu liposomów stwierdzono zwiększoną zdolność osocza do akceptacji CH komórkowego [28, 36, 94]. U zwierząt doświadczalnych po podaniu dożylnym liposomów stwierdzono regresję zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych [12, 72]. Mechanizmy przeciwmiażdżycowego oddziaływania liposomów nie są jednak nadal do końca poznane.

Wykazano do tej pory, że oddziaływanie między lipoproteinami osocza a liposomami lecytynowymi skutkuje tworzeniem nowych lipoprotein o ruchliwości pre β , podobnych do prekursorowych HDL, które oddziałują z receptorami komórkowymi uczestnicząc w odbieraniu CH komórkowego [28]. Również wzbogacenie dojrzałych cząstek HDL w FL i zubożenie ich o CHW czyni je lepszymi akceptorami CH [73, 86, 91]. Chung wykazał, że liposomy lecytynowe oraz rHDL zawierające dużą ilość FL są zdolne do solubilizowania i usuwania pozakomórkowych złogów CH, obecnych w blaszkach miażdżycowych izolowanych

z ludzkich naczyń tętniczych. Takiej zdolności nie posiadały natywne HDL, ale nabywały ją po preinkubacji z liposomami i wzbogaceniu w FL [13].

Kolejny mechanizm działania liposomów oparty jest na wykorzystaniu fosfatydylocholiny jako substratu dla reakcji estryfikacji CH, katalizowanej przez LCAT. Fosfatydylocholina zwiększa aktywność enzymu i przyspiesza estryfikację CH, w wyniku czego następuje efektywne zmniejszenie zewnątrzkomórkowego stężenia CHW i wytworzenie gradientu stężeń, który ułatwia dalsze uwalnianie CH z komórek [68].

Liposomy *per se* mają również zdolność do akceptacji dużych ilości CHW, mogą więc pełnić funkcje „gąbek” „pochłaniających” CH z błon komórkowych lub lipoprotein osocza, a po pozyskaniu apolipoprotein mogą oddziaływać z receptorami komórkowymi wątroby, dla których apolipoproteiny są ligandami, w ten sposób uczestnicząc w przekazywaniu CH do wątroby [91]. Yan wykazał, że wątrobowy wychwyt liposomów odbywa się na drodze zależnej od apoE [101]. Mendez stwierdził, że liposomy wyizolowane z osocza królików po trzech godzinach od dożylnego podania zawierały jako główny składnik białkowy apoE oraz w mniejszej ilości apoAI i apoC [55].

Przeciwniażdżycowe oddziaływanie liposomów może wynikać także z blokowania wychwytu aterogennych, obciążonych CH lipoprotein przez makrofagi. Williams prowadził badania z wykorzystaniem królików karmionych pokarmem bogatym w CH, u których rozwija się zaawansowana miażdżycza na skutek wychwytu przez makrofagi bogatych w CH, aterogennych cząstek β -VLDL. Wykazał, że liposomy po podaniu dożylnym pozyskiwały apoE z β -VLDL, a następnie efektywnie blokowały ich receptorowy wychwyt. Inkubując β -VLDL z liposomami *in vitro* stwierdził on powstanie dwóch rodzajów cząstek o różnej wielkości, zawierających FL oraz pozyskaną z β -VLDL apoE i CHW. Cząstki β -VLDL po reakcji z liposomami zostały wzbogacone w FL [92].

Najwięcej uwagi w badaniach naukowych poświęcono dotychczas oddziaływaniu liposomów z cząstkami HDL i udziałowi w tym procesie głównej apolipoproteiny HDL: apoAI [28, 36, 84]. Wykazano m.in., że apoAI pozyskana z α -HDL tworzy z FL dyskowe struktury o ruchliwości elektroforetycznej $pre\beta$, które, podobnie jak osoczowe $pre\beta$ -HDL, uczestniczą w wychwycie CH komórkowego [28, 36]. Wiadomo jednakże, że i inne apolipoproteiny oddziałują z liposomami.

Również apoAII, druga pod względem ilościowym apolipoproteina HDL, tworzy struktury o ruchliwości pre β podczas oddziaływania z liposomami [97, 98]. Guo wykazał, że wolna apoE powoduje rozpad liposomów z podobną aktywnością jak apoAI. Wykazał on również, że izolowane VLDL, podobnie jak HDL, oddziałują z liposomami powodując ich rozpad. Różnica występowała jednakże w rodzaju cząstek powstających na skutek tego oddziaływania. W przypadku inkubacji liposomów lecytynowych z HDL w przeważającej ilości powstawały struktury dyskowe. Po inkubacji liposomów z VLDL Guo stwierdził występowanie heterogennej mieszaniny cząstek, w skład której oprócz struktur dyskowych wchodziły również większe struktury wielowarstwowe, jak również cząstki bardzo małe. Główną apolipoproteiną izolowaną z kompleksów powstałych na skutek oddziaływania HDL z liposomami była apoAI. W przypadku oddziaływania VLDL z liposomami, nowo powstałe struktury zawierały apoE i niewielką ilość apoC [27].

Rodrigueza uważa, że ciekawym byłoby zbadanie, czy mobilizacja CH na skutek podawania liposomów następowałaby również u zwierząt nieposiadających apoAI i że możliwe jest, że obecność cząstek zawierających inne apolipoproteiny, np. apoE, będzie wystarczająca do tworzenia korzystnego efektu oddziaływania lipoprotein z liposomami [91].

Istnieją nieliczne doniesienia, że na skutek oddziaływania lipoprotein z liposomami lecytynowymi mogą powstawać również cząstki γ -LpE [28, 40]. Krimbou stwierdził, że inkubacja osocza z dimirystoilofosfatydylocholiną skutkowała zależnym od dawki FL wzrostem stężenia γ -LpE, a osocze po inkubacji wykazywało zwiększoną zdolność do wychwytu CH komórkowego. Takiego oddziaływania nie obserwował on w przypadku inkubacji osocza z liposomami sfingomielinowymi [40].

Nie wykazano jednakże do tej pory, które ze struktur osocza są odpowiedzialne za powstawanie γ -LpE pod wpływem działania liposomów.

2. CEL PRACY

Liposomom lecytinowym przypisuje się działanie przeciwmiażdżycowe m.in. poprzez oddziaływanie na lipoproteiny osocza. Przemiany lipoprotein zachodzące pod wpływem liposomów nadal nie są dokładnie poznane, dlatego celem pracy była:

- Ocena zmian składu i własności VLDL na skutek reakcji z liposomami lecytinowymi, dla różnych warunków inkubacji.
- Ocena, czy na skutek reakcji VLDL z liposomami lecytinowymi powstają cząstki lipoproteinowe o ruchliwości elektroforetycznej γ , zawierające apoE.
- Izolacja i charakterystyka cząstek lipoproteinowych zawierających apoE o gęstości charakterystycznej dla HDL, powstałych na skutek reakcji VLDL z liposomami lecytinowymi.
- Ocena, czy nowo powstałe cząstki oddziałują z lipoproteinami HDL.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Odczynniki, materiały zużywalne, aparatura

3.1.1. Odczynniki chemiczne

- *POCH Gliwice, Polska*
acetone; amonu siarczan; chloroform; dimetyloformamid; di-sodu wodorofosforan; etylowy alkohol bezwodny 99,8%; formaldehyd 36-38%; gliceryna; glicyna; glikol etylenowy; heksan; izopropanol; kwas chlorowodorowy 35-38%; kwas octowy 99,5-99,9%; magnezu chlorek; manganu chlorek; metanol; potasu bromek; potasu chlorek; potasu diwodorofosforan; sodu azydek; sodu chlorek; sodu diwodorofosforan; sodu tiosiarczan; sodu węglan; srebra azotan; Tris(hydroksylo)aminometan (Tris);
- *Bio-Rad, Polska*
akrylamid; amonu nadsiarczan (APS); bis-akrylamid; błękit bromofenolowy; czerń amidowa; di-sodu wersenian (EDTA); N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED); siarczan dodecyłu sodu (SDS);
- *Sigma-Aldrich, Polska*
azotan błękitu tetrazolowego (NBT), β -merkaptetoetanol, fosforan bromo-chloro-indolu (BCIP); heparyna; kwas borny;
- *Merck, Polska*
czerń sudanowa; Triton X-100;
- *Fluka AG, Polska*
kwas 5,5-dietylobarbiturowy; sól sodowa kwasu 5,5-dietylobarbiturowego;
- *GE Healthcare, Polska*
Repel-Silane ES; Tween 20;
- *Lachema, Czechy*
agaroza;

3.1.2. Zestawy odczynnikowe

- Zestaw odczynnikowy do oznaczania stężenia CHC oraz zestaw odczynnikowy do oznaczania stężenia TG; *Pointe-Scientific, Polska*
- Zestaw odczynnikowy do oznaczania stężenia FL, *WAKO Diagnostics, USA*
- Zestaw odczynnikowy do oznaczania stężenia CHW, *DiaSys, Niemcy*
- Zestaw odczynnikowy do oznaczania stężenia apoE metodą immunonefelometryczną, *Siemens Healthcare, Polska*
- Zestaw odczynnikowy do oznaczania stężenia apoB metodą immunonefelometryczną, *BioMerieux, Polska*
- Zestaw odczynnikowy do oznaczania stężeń LpE i LpE:B metodą elektroforezy rakietowej, *Sebia, Francja*

3.1.3. Przeciwciała

- Królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko ludzkiej apoB (do immunoprecypitacji i immunodetekcji) oraz królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko ludzkiej apoE (do immunodetekcji), *DAKO, Polska*
- Kozie przeciwciała znakowane fosfatazą alkaliczną, skierowane przeciwko przeciwciałom króliczym (do immunodetekcji), *Sigma-Aldrich, Polska*

3.1.4. Wzorce do elektroforezy

- Wzorzec niskocząsteczkowy LMW barwiony, *Bio-Rad, Polska*
- Wzorzec wysokocząsteczkowy HMW, *GE Healthcare, Polska*

3.1.5. Inne materiały

- Bibuła filtracyjna Whatman 3MM Chr i Whatman 1Chr, *GE Healthcare, Polska*
- Membrana z fluorku poliwinylidenu (PVDF) o średnicy porów 0,45 μm (*Immobilon-P Transfer Membrane*), *Merck Millipore, Polska*
- Mleko w proszku odtłuszczone granulowane, *Spółdzielnia Mleczarska Gostyń*

- Probówki typu otwartego (*Polycarbonate open-top thickwall centrifuge tubes*) oraz probówki „zatapialne” (typu zamkniętego) do ultrawierowania (*Polyallomer bell-top centrifuge tubes*), *Beckman Coulter, Polska*
- Sączi Diaflo Ultrafiltration Membranes PM10, *Amicon, USA*
- Worki dializacyjne, *Sigma-Aldrich, Polska*

3.1.6. Aparatura

- Aparat do elektroforezy i elektrotransferu Mini Protean 3 Cell, *Bio-Rad, Polska*
- Aparat do elektroforezy horyzontalnej, *Pharmacia LKB, Szwecja*
- Aparat do elektroforezy K20 z zasilaczem, *Sebia, Francja*
- Aparat do elektrotransferu mokrego Biotrans, *Krzysztof Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Polska*
- Homogenizator ultradźwiękowy HD z sondą KE76, *Bandelin Electronic, Niemcy*
- Mieszadło magnetyczne bezsilnikowe, *DHN-Wabel, Polska*
- Mikser do przygotowywania żeli gradientowych, *Pharmacia Biotech, Szwecja*
- Nefelometr laserowy Behring-Laser Nephelometer, *Dade Behring, Niemcy*
- Pehametr, *Mera-Elmat, Polska*, wyposażony w elektrodę kombinowaną ERH-111, *Hydromet, Polska*
- Spektrofotometr T80, *PG Instruments, Wielka Brytania*
- Spektrofotometr Epoll-2, *Polska*
- Termostat, *Cabrolab Electronic, Polska*
- Ultrawirówka Beckman TLX Optima wyposażona w rotor kątowy TLA100.3, *Beckman Coulter, USA*
- Wirówka MPW-65R, *MPW, Polska*
- Waga analityczna AS 60/220/C/2, *Radwag, Polska*
- Wytrząsarka laboratoryjna stołowa, *Elpin Plus, Polska*
- Wytrząsarka laboratoryjna stołowa typu „vortex”, *Velp Scientifica, Holandia*
- Zestaw do zatapiania i cięcia probówek, *Beckman Coulter, USA*
- Zasilacz do elektroforezy EV231, *Consort, Belgia*
- Zestaw do sączenia pod zwiększonym ciśnieniem, *Amicon, USA*

3.2. Bufory i roztwory

3.2.1. Bufory i inne roztwory podstawowe

Bufory:

- bufor dializacyjny
 - bufor do zawieszania liposomów
 - bufor inkubacyjny
 - bufor do rozpuszczania osadu
 - bufor do HDL
 - PBS (*phosphate-buffered saline*)
- bufor fosforanowy (Na^+) 0,01 mol/l,
EDTA 0,25 mmol/l, NaN_3 0,02%,
pH 7,6 [25]
- Tris-HCl 0,01 mol/l, NaCl 1 mol/l, NaN_3 0,02%, pH 7,4
- Tris-HCl 0,01 mol/l, NaN_3 0,02%, pH 7,4
- NaCl 0,14 mol/l, KCl 2,7 mmol/l, Na_2HPO_4 10 mmol/l, KH_2PO_4 1,8 mmol/l, pH 7,3

Inne roztwory:

- 0,9% NaCl, d=1,006 g/ml
- KBr d=1,063 g/ml
- KBr d=1,21 g/ml
- 10% Triton X-100
- heparyna 5000 IU/l
- 2 mol/l MnCl_2
- odczynnik „heparyna-mangan”: 1 cz. heparyny 5000 IU/l + 1,25 cz. MnCl_2 2 mol/l

3.2.2. Bufory i inne roztwory do technik elektroforetycznych i elektrotransferu

Bufory:

- bufor do elektroforezy w żelu agarozowym (Tris-barbital), pH 9,3
Tris-HCl 44,02 mmol/l, kwas 2,2-dietylobarbiturowy 12,38 mmol/l, sól sodowa kwasu 2,2-dietylobarbiturowego 43,6 mmol/l, NaN_3 0,01%;
- bufor elektrodowy z kwasem bornym, pH 8,4
kwas borny 125 mmol/l, Tris-HCl 90 mmol/l, EDTA 3,2 mmol/l, NaN_3 0,01%;

- bufor elektrodowy z SDS, pH 8,3
Tris-HCl 25 mmol/l, glicyna 192 mmol/l, SDS 0,1%;
- bufor do elektrotransferu, pH 8,3
Tris-HCl 25 mmol/l; glicyna 192 mmol/l, metanol 20%;
- bufor do żelu poliakrylamidowego rozdzielającego (2D-PAGE), pH 8,0
kwas borny 160 mmol/l, siarczan amonu 189 mmol/l, EDTA 27 mmol/l, NaN₃ 0,2%;
- bufor do żelu poliakrylamidowego zagęszczającego (2D-PAGE), pH 6,9
Tris-H₃PO₄ 236 mmol/l;
- bufor do żelu poliakrylamidowego rozdzielającego (SDS-PAGE), pH 8,8
Tris-HCl 1,5 mol/l, SDS 0,4%;
- bufor do żelu poliakrylamidowego zagęszczającego (SDS-PAGE), pH 6,8
Tris-HCl 0,5 mol/l, SDS 0,4%;
- bufor do obciążania próbek – mieszanina roztworów:
1,2 ml Tris-HCl 0,5 mol/l, pH 6,8 + 1 ml gliceryna + 2 ml SDS 10% + 5,25 ml H₂O
+ 0,05 ml błękit bromofenolowy 1%
- bufor redukujący (przygotowywany *ex tempore*) – mieszanina roztworów:
1 cz. β-merkaptetanolu + 19 cz. buforu do obciążania próbek

Inne roztwory:

- 30% roztwór akrylamidów: akrylamid:bis-akrylamid 36,5:1
- 10% APS
- 0,1% Triton X-100
- 5% izopropanol
- 10% SDS

Żele poliakrylamidowe:

- 2% żel rozdzielający (2D-PAGE)
233 μl 30% roztworu akrylamidów + 2917 μl H₂O + 350 μl buforu do żelu rozdzielającego (2D-PAGE) + 2 μl TEMED + 10,5 μl 10% APS

- 25% żel rozdzielający (2D-PAGE)
2917 μl 30% roztworu akrylamidów + 233 μl H_2O + 350 μl buforu do żelu rozdzielającego (2D-PAGE) + 2 μl TEMED + 10,5 μl 10% APS
- żel zagęszczający (2D-PAGE)
600 μl 30% roztworu akrylamidów + 3840 μl H_2O + 1500 μl buforu do żelu zagęszczającego (2D-PAGE) + 6 μl TEMED + 60 μl 10% APS
- 10% żel rozdzielający (SDS-PAGE)
667 μl 30% roztworu akrylamidów + 824 μl H_2O + 500 μl buforu do żelu rozdzielającego (SDS-PAGE) + 1 μl TEMED + 10 μl 10% APS
- 20% żel rozdzielający (SDS-PAGE)
1335 μl 30% roztworu akrylamidów + 156 μl H_2O + 500 μl buforu do żelu rozdzielającego (SDS-PAGE) + 1 μl TEMED + 10 μl 10% APS
- żel zagęszczający (SDS-PAGE)
200 μl 30% roztworu akrylamidów + 905 μl H_2O + 375 μl buforu do żelu zagęszczającego (SDS-PAGE) + 1,5 μl TEMED + 15 μl 10% APS

Roztwory wykorzystywane w barwieniu próbek lub żeli:

- 1% błękit bromofenolowy
- 0,05% roztwór czerni amidowej
- 0,5% roztwór czerni sudanowej w glikolu etylenowym
- 1% roztwór czerni sudanowej w 55° alkoholu etylowym
- odbarwiacz: 5% metanol, 7% kwas octowy
- roztwór płuczący I: 50% metanol, 10% kwas octowy
- roztwór płuczący II: 10% etanol, 5% kwas octowy
- roztwór płuczący III: 10% etanol
- roztwór płuczący IV: 10% kwas octowy
- odczynnik A: 100 μl formaldehydu + 42 μl 43% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 100 ml H_2O
- odczynnik B: 100 μl formaldehydu + 100 ml 0,4% AgNO_3
- odczynnik C: 100 μl formaldehydu + 1 μl 43% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 100 ml 6% Na_2CO_3

3.2.3. Bufory i inne roztwory do immunodetekcji metodą Western blot

- TBS (*Tris-buffered saline*) - 0,02 mol/l Tris-HCl, 0,14 mol/l NaCl, 0,01% NaN₃, pH 7,4
- roztwór blokujący } 0,5% odtłuszczone mleko w TBS
- roztwór inkubacyjny przeciwciała } 0,5% odtłuszczone mleko w TBS
- 5% Tween 20
- roztwór płuczący: 0,05% Tween 20 w TBS
- roztwór przeciwciała I: p/ciało poliklonalne skierowane przeciwko oznaczanemu białku (*rozdział 3.1.3*) z roztworem inkubacyjnym przeciwciała w stosunku objętościowym 1:1000
- roztwór przeciwciała II: p/ciało znakowane fosfatazą alkaliczną (*rozdział 3.1.3*) z roztworem inkubacyjnym przeciwciała w stosunku objętościowym 1:10000
- bufor do fosfatazy alkalicznej, pH 9,5
NaCl 100 mmol/l, MgCl₂ 5 mmol/l, Tris-HCl 100 mmol/l
- roztwór NBT: 0,05 g/ml 70% dimetyloformamidu
- roztwór BCIP: 0,05 g/ml 100% dimetyloformamidu
- roztwór substratów dla fosfatazy alkalicznej:
przygotowywany *ex tempore*; 10 ml buforu do fosfatazy alkalicznej + 66 µl roztworu NBT + 33 µl roztworu BCIP
- roztwór zatrzymujący reakcję: 20mM EDTA w TBS

3.3. Otrzymywanie VLDL

3.3.1. Materiał badany

Lipoproteiny VLDL izolowano z surowic pulowanych, otrzymanych ze zlewek surowic pozyskanych na czczo od osób zdrowych, wykonujących badania okresowe w Laboratorium Centralnym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, po zrealizowaniu zleconych badań laboratoryjnych. Wyselekcjonowane surowice pulowano i konserwowano azydkiem sodu (stężenie końcowe NaN₃ w surowicy: 0,1%).

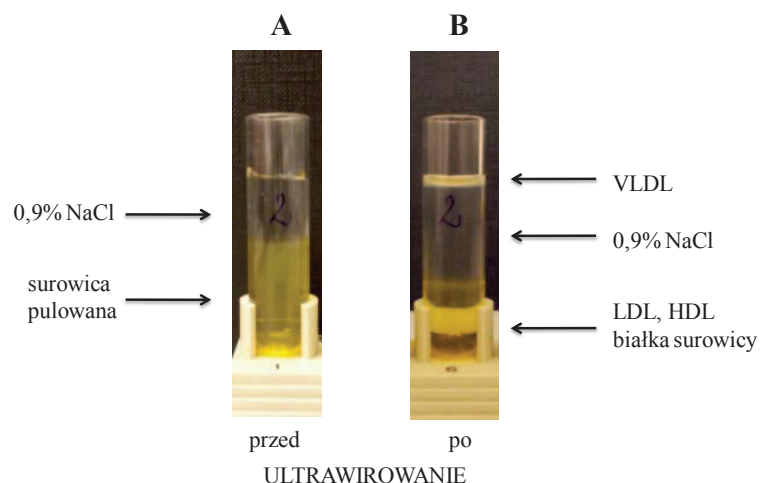
VLDL izolowano z surowic pulowanych spełniających następujące kryteria: CHC < 200 mg/dl, TG < 150 mg/dl oraz brak obecności CHM i frakcji pośrednich w lipidogramie. Pule, które nie spełniały tych kryteriów, były odrzucane. Izolacja VLDL następowała maksymalnie do 28 godzin od pobrania krwi.

3.3.2. Izolacja VLDL metodą ultrawierowania

Konserwowaną azydkiem sodu surowicę pulowaną poddawano ultrawierowaniu wg zmodyfikowanej procedury opisanej przez McEneny [54]. Zastosowano probówki typu otwartego Beckman zamiast probówek typu zamkniętego Beckman (*rozdział 3.1.5*) i wydłużono czas wirowania z 60 do 90 minut.

Do probówek przenoszono 1,8 ml surowicy pulowanej, a następnie ostrożnie nawarstwiano 1,2 ml 0,9% NaCl o $d = 1,006 \text{ g/ml}$ (ryc. 10A). Probówki umieszczano w rotorze kątowym Beckman TLA-100.3 i wirowano w ultrawirówce Beckman TLX Optima przy następujących parametrach: 100 000 obr/min (541 000 x g), 90 min, temperatura 4°C, akceleracja (acc): 5, deceleracja (decc): 9.

Po zakończeniu wirowania probówki ostrożnie wyjmowano z rotora i pozostawiano na 15 minut w statywie (ryc. 10B). Następnie ostrożnie, za pomocą pipety, ściągano górną frakcję zawierającą VLDL o objętości około 1,2 ml, tak, aby nie naruszyć dolnej frakcji, zawierającej białka i pozostałe lipoproteiny.



Ryc. 10. Otrzymywanie VLDL metodą ultrawierowania. A - obraz przed ultrawierowaniem, po nawarstwieniu 0,9% NaCl na surowicę pulowaną, B – obraz po ultrawierowaniu i 15 minutach stabilizacji frakcji w statywie

Po oddzieleniu VLDL ich objętość mierzono, a następnie frakcję niezwłocznie umieszczano w worku dializacyjnym i poddawano dializie (16 godz., temperatura 4°C, z mieszaniem, objętość buforu dializacyjnego (*rozdział 3.2.1*) około 200-krotnie większa od objętości dializowanej próbki). Po zakończeniu dializy ponownie mierzono objętość VLDL.

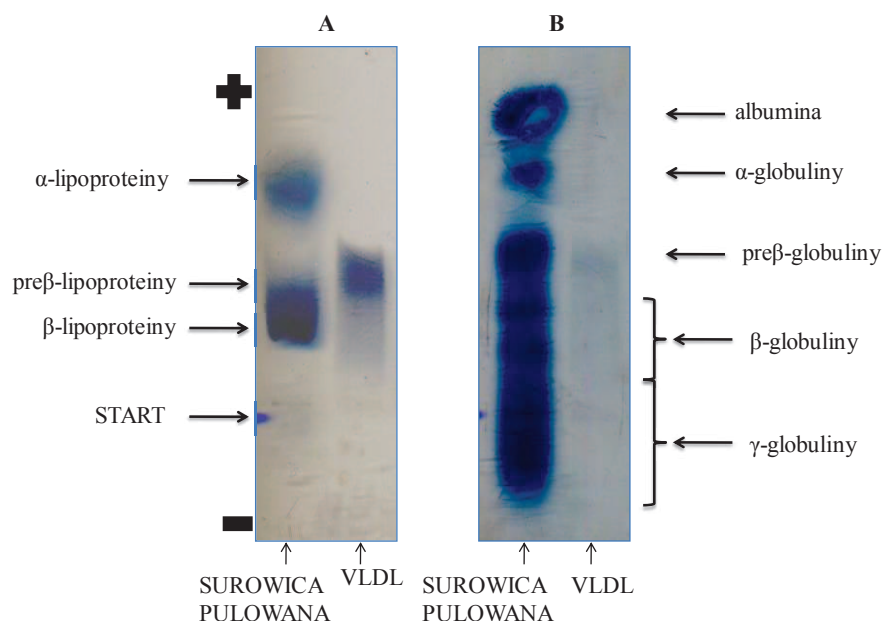
3.3.3. Charakterystyka VLDL

Po dializie w uzyskanej frakcji VLDL oznaczano stężenie FL, TG, CHC, CHW, CHE, apoE i apoB (*rozdział 3.10, 3.11*) oraz przeprowadzano rozdział elektroforetyczny frakcji w żelu agarozowym (*rozdział 3.12.1*).

W tabeli 6 przedstawiono stężenia składników lipidowych oraz apoE i apoB dla surowic pulowanych oraz izolowanych z nich VLDL. Na rycinie 11 przedstawiono przykładowy rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym surowicy pulowanej i VLDL.

Tabela 6. Stężenie składników lipidowych oraz apoE i apoB w surowicy pulowanej oraz wyizolowanych VLDL (n = 29). Wyniki dla VLDL po przeliczeniu na materiał natywny.

Składnik:		FL	TG	CHC	CHW	CHE	apoE	apoB
surowica pulowana	średnia [mg/dl]	214,8	96,0	173,0	51,1	121,9	3,7	78,9
	OS [mg/dl]	19,2	18,4	17,3	5,4	13,8	0,6	13,9
	WZ [%]	8,9	19,2	10,0	10,6	11,3	16,2	17,6
VLDL	średnia [mg/dl]	18,0	47,2	12,8	6,2	6,5	1,2	7,7
	OS [mg/dl]	3,59	13,0	3,0	1,5	1,7	0,3	1,9
	WZ [%]	19,9	27,5	23,4	24,2	26,2	25,0	24,7



Ryc. 11. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym surowicy pulowanej oraz VLDL izolowanych metodą ultrawierowania. A – barwienie na obecność lipidów, B – barwienie na obecność białek (*rozdział 3.12.1*).

3.4. Izolacja lecytyny i przygotowanie liposomów

Lecytynę izolowano w Zakładzie Chemii Klinicznej GUMed z żółtek jaj kurzych, wg procedury opisanej przez Singletona [79]. Porcje lecytyny zawieszono w heksanie przechowywano w atmosferze azotu, w temperaturze -70°C . Czystość lecytyny potwierdzano metodą chromatografii cienkowarstwowej, na płytkach pokrytych żelazem krzemionkowym, z zastosowaniem układu rozwijającego chloroform : metanol : kwas octowy : woda w stosunku 6 : 3 : 0,8 : 0,4.

Małe jednowarstwowe liposomy (SUV) uzyskiwano wg procedury opisanej przez Huanga [33]. Po rozmrożeniu porcje lecytyny osuszano w strumieniu azotu. Następnie FL zawieszano w 0,01 mol/l buforze fosforanowym (*rozdział 3.2.1*) i pozostawiano w ciemnym miejscu, w temperaturze pokojowej, na około 16 godzin, w celu spęcznienia. Zawiesinę FL sonikowano (tryb ciągły; 25% mocy; 5 cykli (gdzie 1 cykl: sonikowanie 5 minut, przerwa 5 minut); chłodzenie lodem) do uzyskania klarownego, opalizującego roztworu. Otrzymane w ten sposób małe jednowarstwowe liposomy (SUV) wirowano (10000 obr/min; temperatura 4°C , 30 min.) w celu usunięcia

zanieczyszczeń tytanowych pochodzących z sondy. Przygotowane liposomy lecytynowe (LP) przechowywano w temperaturze 4°C, w atmosferze azotu i wykorzystywano do doświadczeń w ciągu 10 dni. Stężenie FL w LP wynosiło średnio 5750 ± 900 mg/dl (średnia \pm OS, n = 17).

3.5. Inkubacja VLDL z liposomami lecytynowymi

3.5.1. Podstawowe warunki inkubacji

Podstawowe warunki inkubacji przyjęto na podstawie pracy Williamsa [92], który inkubował VLDL z LP 2 godziny w temperaturze 37°C, przy stosunku białka VLDL do FL w LP 18 mg : 900 mg. Przyjmując dla VLDL średni stosunek stężenia białka do fosfolipidów 10:17,5 [56], ustalono, że stosunek wagowy fosfolipidów VLDL do fosfolipidów liposomów ($VLDL_{FL}:LP_{FL}$) w badaniach Williamsa wynosił 1:29.

Na podstawie tych danych za podstawowe warunki inkubacji w pracy przyjęto: czas inkubacji 2 godziny, temperatura inkubacji 37°C, stosunek wagowy $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30.

3.5.2. Protokół postępowania

VLDL, LP oraz bufor inkubacyjny (BF) (rozdział 3.2.1) ogrzewano do temperatury 37°C. Następnie określoną objętość VLDL mieszano z określoną objętością LP, uzyskując mieszaninę reakcyjną VLDL z LP ($VLDL+LP$) o stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30. Objętość VLDL i LP do mieszaniny reakcyjnej wyznaczano na podstawie oznaczenia wyjściowych stężeń FL w VLDL i LP i obliczano wg schematu:

- A) mg FL w VLDL - 100 ml [na podstawie stężenia FL w VLDL (mg/dl)]
X (mg FL) - objętość VLDL do reakcji (ml)
- B) X (mg FL VLDL biorących udział w reakcji) x 30 =
Y (mg FL LP biorących udział w reakcji)
- C) mg FL w LP - 100 ml [na podstawie stężenia FL w LP (mg/dl)]
Y (mg FL-LP biorących udział w reakcji) - objętość LP do reakcji (ml)

Przygotowywano również dwie kontrole. Pierwszą: VLDL+BF stanowiła próbka VLDL z buforem inkubacyjnym (BF), dodanym w objętości równej objętości LP w mieszaninie VLDL+LP. Drugą kontrolę: LP+BF stanowiła próbka LP z buforem inkubacyjnym, dodanym w objętości równej objętości VLDL w mieszaninie VLDL+LP.

VLDL+LP oraz próbki kontrolne (VLDL+BF, LP+BF) mieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 godziny.

Po zakończeniu inkubacji próbki schładzano do temperatury 4°C i składniki mieszaniny reakcyjnej rozdzielano metodą immunoprecypitacji (*rozdział 3.6*) oraz poddawano analizie metodą elektroforezy w żelu agarozowym (*rozdział 3.12.1*) i metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE (*rozdział 3.12.2*).

3.6. Rozdział VLDL od składników mieszaniny reakcyjnej niezawierających apoB metodą immunoprecypitacji

Rozdział VLDL od pozostałych składników mieszaniny reakcyjnej przeprowadzano metodą immunoprecypitacji, wg zmodyfikowanej procedury opisanej przez Nielsena dla izolacji lipoprotein zawierających apoB z pełnej surowicy [58].

Zakładając, że apoB jest niewymienialnym, strukturalnym składnikiem cząstek VLDL, dodanie przeciwciał anty apoB będzie prowadzić do selektywnego wytrącania się z mieszaniny reakcyjnej VLDL w postaci osadu, natomiast cząstki niezawierające apoB, czyli liposomy i pozostałe produkty reakcji, pozostaną w supernatancie.

3.6.1. Ustalenie warunków immunoprecypitacyjnej metody rozdziału

Do stałej objętości VLDL dodawano różne objętości przeciwciał anty apoB (*rozdział 3.1.3*), tak, aby stosunek objętościowy VLDL:przeciwciała wynosił odpowiednio: 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 7:1 i 10:1. Kontrolę stanowiła próbka VLDL bez dodatku przeciwciał. Próbki, zgodnie z procedurą Nielsena, inkubowano 24 godz. w temperaturze 4°C. Po zakończeniu inkubacji próbki wirowano (5000 x g; 40 minut, 4°C). Następnie supernatanty ostrożnie ściągano pipetą, a osady 1-krotnie przemywano lodowatym PBS i ponownie odwirowywano (5000 x g; 15 minut, 4°C). PBS ostrożnie

ściągnano pipetą i odrzucono, a osady osuszano przez 15 minut w temperaturze 37°C i zawieszano w buforze do rozpuszczania osadu (rozdział 3.2.1).

W otrzymanych osadach i supernatantach oznaczano stężenie TG (rozdział 3.10), a następnie wyznaczano procent zawartości TG w supernatantach (a) i osadach (b) oraz odzysk całkowity (c) wg wzorów:

$$(a) \%TG_{\text{supernatant}} = (TG_{\text{supernatant}}/TG_{\text{kontrola}}) \times 100\%,$$

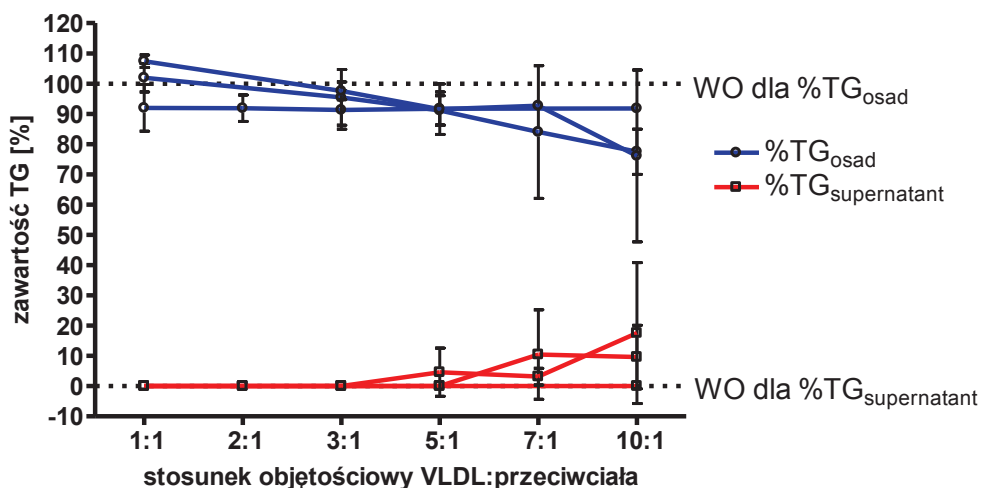
$$(b) \%TG_{\text{osad}} = (TG_{\text{osad}}/TG_{\text{kontrola}}) \times 100\% \text{ oraz}$$

$$(c) \text{odzysk całkowity } [\%] = \%TG_{\text{supernatant}} + \%TG_{\text{osad}}$$

Doświadczenie przeprowadzono dla trzech różnych puli VLDL. Odzysk całkowity przedstawiono w tabeli 7, a procentowy rozkład TG pomiędzy supernatantem i osadem na rycinie 12. W osadzie po immunoprecypitacji powinna znajdować się cała pula TG obecna w próbce kontrolnej (WO dla %TG_{osad}: 100%). W supernatancie nie powinny być obecne składniki VLDL (WO dla %TG_{supernatant}: 0%).

Tabela 7. Odzysk [%] TG VLDL po immunoprecypitacji VLDL z mieszaniny reakcyjnej, dla różnych stosunków objętościowych VLDL:przeciwciała anty apoB (średnia ± OS; n = 3).

Stosunek objętościowy VLDL:przeciwciała	Pula I [%]	Pula II [%]	Pula III [%]
1:1	102 ± 4,7	107,4 ± 2,1	92,0 ± 7,7
2:1	-	-	91,9 ± 4,4
3:1	95,4 ± 9,2	97,6 ± 2,9	91,3 ± 6,4
5:1	91,1 ± 4,9	96,1 ± 0,7	91,7 ± 5,5
7:1	94,5 ± 7,1	95,9 ± 2,3	-
10:1	87,1 ± 7,5	93,6 ± 5,2	91,8 ± 1,1



Ryc. 12. Procentowa zawartość TG w supernatantach ($\%TG_{\text{supernatant}}$) i osadach ($\%TG_{\text{osad}}$), po immunoprecypitacji VLDL przeciwciałami anti apoB, obliczona w odniesieniu do zawartości TG w próbce kontrolnej, dla różnych stosunków objętościowych VLDL:przeciwciała. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm OS, $n = 3$. *WO dla $\%TG_{\text{osad}}$* - wartość oczekiwana dla procentowej zawartości TG w osadzie; *WO dla $\%TG_{\text{supernatant}}$* - wartość oczekiwana dla procentowej zawartości TG w supernatancie

Dla stosunków objętościowych VLDL:przeciwciała od 1:1 do 3:1, w supernatantach nie stwierdzano obecności TG (ryc. 12). Cała pula VLDL ulegała strąceniu i TG oznaczano jedynie w osadzie (ryc. 12). Średni odzysk dla TG po immunoprecypitacji dla tych stosunków był zadowalający (tab. 7) i wyniósł 96,8%.

W przypadku stosunków objętościowych od 5:1 do 10:1, osad po odwirowaniu był mniej zbity, co skutkowało jego pobieraniem w trakcie oddzielania supernatantu, skutkiem czego dla 2 puli VLDL w supernatancie wykazano obecność TG (ryc. 12). Średni odzysk dla tych prób był nieco niższy niż w przypadku stosunków objętościowych 1:1 - 3:1 i wyniósł 92,8% (tab. 7).

Na podstawie uzyskanych wyników zdecydowano o zastosowaniu w prezentowanej pracy stosunku objętościowego VLDL:przeciwciała 2:1, w odróżnieniu od stosunku objętościowego 1:1 stosowanego przez Nielsena [58], co zagwarantowało mniejszą krotność rozcieńczenia roztworu liposomów i produktów reakcji niezawierających apoB po immunoprecypitacji, a jednocześnie dało pewność całkowitego wytrącenia VLDL.

3.6.2. Protokół postępowania dla immunoprecypitacyjnej metody rozdziału

Po zakończeniu inkubacji prób (*rozdział 3.5*), do próbek VLDL+LP i VLDL+BF dodawano poliklonalnych przeciwciał anty apoB (*rozdział 3.1.3*), w stosunku objętościowym 2:1. Próbkę dokładnie mieszano i inkubowano w temperaturze 4°C przez 24 godz. Następnie próbki poddawano wirowaniu (5000 x g, 40 minut, temp. 4°C), po czym ostrożnie pipetą oddzielano supernatant. Osad przemywano lodowatym PBS w objętości równej objętości próbki do immunoprecypitacji, ponownie wirowano (5000 x g, 15 minut, temp. 4°C), po czym ostrożnie usuwano PBS z nad osadu. Następnie osad osuszano w temperaturze 37°C przez 15 minut, po czym zawieszano go w buforze do rozpuszczania osadu (*rozdział 3.2.1*), dodawanego w objętości równej objętości próbki i przeciwciał. Osad w buforze dokładnie mieszano, a objętość otrzymanej próbki osadu mierzono.

W uzyskanych supernatantach i osadach oznaczano składniki lipidowe (*rozdział 3.10*). Stężenie apoE, ze względu na specyfikę stosowanej metody, oznaczano w supernatantach (*rozdział 3.11.2*). Końcowe stężenia składników wyrażano po przeliczeniu, uwzględniając rozcieńczenie prób na etapie immunoprecypitacji.

3.6.3. Odzysk dla immunoprecypitacyjnej metody rozdziału

Odzysk dla metody immunoprecypitacji oceniono na podstawie oznaczanych składników lipidowych (tab. 8). Odzysk liczono jako sumę stężeń danego składnika lipidowego w supernatancie i osadzie, w stosunku do stężenia tego składnika w pełnej mieszaninie przed immunoprecypitacją, wg wzorów:

$$[(\text{VLDL+LP}_{\text{supernatant}} + \text{VLDL+LP}_{\text{osad}})/\text{VLDL+LP}] \times 100\% \text{ oraz}$$

$$[(\text{VLDL+BF}_{\text{supernatant}} + \text{VLDL+BF}_{\text{osad}})/\text{VLDL+BF}] \times 100\%.$$

Tabela 8. Odzysk [%] składników lipidowych mieszanin VLDL+LP i VLDL+BF dla immunoprecypitacyjnej metody izolacji VLDL. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm OS; * $p < 0,0001$.

Odzysk [%]	Składnik lipidowy				
	FL (n = 30)	TG (n = 15)	CHC (n = 30)	CHW (n = 15)	CHE (n = 15)
VLDL+LP	100 \pm 12,6*	87,9 \pm 10,5	91,8 \pm 7,7	84,4 \pm 8,1	102,5 \pm 10,5
VLDL+BF	87,1 \pm 6,4*	85,3 \pm 7,8	87,6 \pm 10,8	80,6 \pm 5,4	96,9 \pm 9,4

Dla TG, CHC, CHW i CHE uzyskane wartości odzysku dla mieszaniny reakcyjnej i kontrolnej nie różniły się statystycznie znamienne (tab. 8). W przypadku odzysku dla FL stwierdzono różnicę statystycznie zmienną, która może wynikać ze zmiennie wyższego stężenia FL w VLDL+LP, w stosunku do próby kontrolnej VLDL+BF.

Średni odzysk, wyznaczony na podstawie wartości odzysków dla składników lipidowych (tab. 8), wyniósł odpowiednio: 93,3% dla VLDL+LP oraz 87,5% dla VLDL+BF. Biorąc pod uwagę specyfikę metody immunoprecypitacji, takie wartości odzysku uznano za zadowalające.

3.7. Modyfikacje warunków inkubacji VLDL z liposomami

W celu oceny wpływu warunków inkubacji na przebieg reakcji VLDL z LP przeprowadzono doświadczenia, w których modyfikowano podstawowe warunki inkubacji (*rozdział 3.5*). Oceniono wpływ stosunku wagowego VLDL_{FL}:LP_{FL}, wpływ temperatury oraz wpływ czasu inkubacji na przebieg reakcji VLDL z LP (tab. 9).

Tabela 9. Warianty warunków inkubacji VLDL z LP

Modyfikowany czynnik	Warunki inkubacji		
	Czas (minuty)	Temperatura (°C)	Stosunek wagowy VLDL _{FL} :LP _{FL}
Stosunek wagowy FL	120	37°	1:5; 1:15; 1:30
Temperatura inkubacji	120	4°; 37°	1:30
Czas inkubacji	5; 15; 30; 60; 120	4°; 37°	1:30

3.7.1. Badanie wpływu ilości egzogennych FL na przebieg reakcji VLDL z liposomami

W doświadczeniach oceniających wpływ ilości egzogennych FL na przebieg reakcji z VLDL, do stałej objętości VLDL dodawano różne objętości LP, tak, aby stosunek wagowy VLDL_{FL}:LP_{FL} wynosił odpowiednio 1:30, 1:15, 1:5. Różnice w objętościach końcowych prób niwelowano poprzez dodanie odpowiedniej objętości buforu inkubacyjnego (BF) (*rozdział 3.2.1*). Kontrolę stanowiła próbka VLDL+BF.

VLDL+LP 1:30 (czyli mieszanina reakcyjna; stosunek VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30), VLDL+LP 1:15, VLDL+LP 1:5 oraz VLDL+BF inkubowano 2 godz. w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji próbki poddawano immunoprecypitacji i wykonywano oznaczenia składników lipidowych oraz apoE (*rozdział 3.10, 3.11*) oraz przeprowadzano elektroforezy: w żelu agarozowym (*rozdział 3.12.1*) i dwukierunkową 2D-PAGE (*rozdział 3.12.2*).

Średni odzysk wszystkich składników lipidowych dla mieszanin: VLDL+LP 1:15 i VLDL+LP 1:5 po immunoprecypitacyjnej izolacji VLDL (*rozdział 3.6.2*), wyniósł odpowiednio 94,6% i 93,6% (n = 10) i był porównywalny do odzysku uzyskanego dla prób inkubowanych przy stosunku VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30 (*rozdział 3.6.3*).

3.7.2. Badanie wpływu temperatury na przebieg reakcji VLDL z liposomami

W doświadczeniach oceniających wpływ temperatury na przebieg reakcji VLDL z liposomami, w odpowiedniej temperaturze (37°C i 4°C) mieszano doprowadzone do temperatury inkubacji VLDL i liposomy, tak, aby stosunek wagowy $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ wyniósł 1:30, uzyskując w ten sposób próby: VLDL+LP37° (gdzie VLDL+LP – mieszanina reakcyjna, 37° - temperatura inkubacji 37°C) i VLDL+LP4°. Kontrolę stanowiły próbki VLDL z buforem inkubacyjnym: VLDL+BF37° i VLDL+BF4°.

Próbki inkubowano w odpowiedniej temperaturze (37°C lub 4°C) przez 2 godz. Po zakończeniu inkubacji próbki poddawano immunoprecypitacji i wykonywano oznaczenia składników lipidowych oraz apoE (rozdział 3.10, 3.11) oraz przeprowadzano elektroforezy: w żelu agarozowym (rozdział 3.12.1) i dwukierunkową 2D-PAGE (rozdział 3.12.2).

Średni odzysk wszystkich składników lipidowych dla prób VLDL+LP4° i VLDL+BF4° wyniósł odpowiednio 92,7% i 86,8% (n = 11), co jest wartością porównywalną dla prób VLDL+LP i VLDL+BF, inkubowanych w temperaturze 37°C (rozdział 3.6.3).

3.7.3. Badanie kinetyki reakcji VLDL z liposomami w temperaturze 4°C i 37°C

W doświadczeniach oceniających wpływ czasu inkubacji na przebieg reakcji VLDL z liposomami w różnej temperaturze, równoległe przygotowywano 6 prób z tej samej puli VLDL do inkubacji z LP w temperaturze 37°C i 6 do inkubacji w temperaturze 4°C, przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30. W ten sposób uzyskiwano następujące próby badane:

- dla temperatury inkubacji 37°C:
VLDL+LP37° 5' (gdzie VLDL+LP – mieszanina reakcyjna, 37° - temperatura inkubacji 37°C, 5' – czas inkubacji 5 minut) oraz VLDL+LP37° 15';
VLDL+LP37° 30', VLDL+LP37° 60', VLDL+LP37° 120' oraz kontrola VLDL+BF37° 120',

- dla temperatury inkubacji 4°C:

VLDL+LP4° 5'; VLDL+LP4° 15'; VLDL+LP4° 30', VLDL+LP4° 60', VLDL+LP4° 120' i kontrola VLDL+BF4° 120'.

Próbki po zmieszaniu inkubowano w odpowiedniej temperaturze przez okres czasu wskazany w nazwie próbki, po czym reakcję przerywano metodą immunoprecypitacji (*rozdział 3.6.2*) albo próbę niezwłocznie poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w żelu agarozowym (*rozdział 3.12.1*).

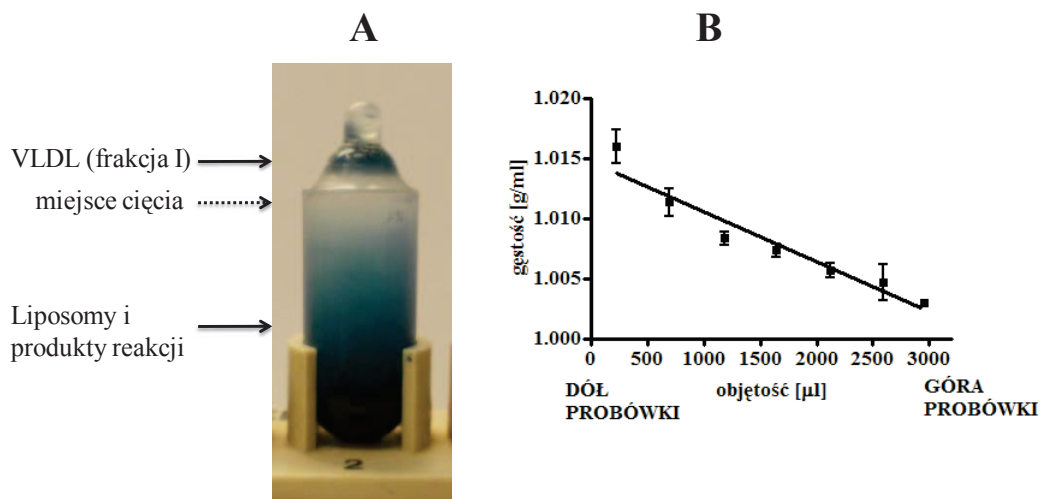
Średni odzysk składników lipidowych (FL i CHW), po immunoprecypitacyjnej izolacji VLDL, dla prób VLDL+LP37° 5', VLDL+LP37° 15', VLDL+LP37° 30', VLDL+LP37° 60' oraz VLDL+LP4° 5', VLDL+LP4° 15', VLDL+LP4° 30', VLDL+LP4° 60' wyniósł odpowiednio 100,1%, 101%, 97,1%, 104% oraz 98,7%, 95,5%, 93,2% i 98,6%, co jest porównywalne z odzyskiem dla prób VLDL+LP i VLDL+BF, inkubowanych w podanych temperaturach przez 2 godziny (*rozdział 3.6.3, 3.7.2*).

3.8. Rozdział składników mieszaniny reakcyjnej metodą ultrawierowania

Po zakończeniu inkubacji prób według procedury podstawowej (*rozdział 3.5*), schłodzoną mieszaninę reakcyjną poddawano rozdzielowi metodą ultrawierowania.

Do 6 próbek „zatapialnych” Beckman (*rozdział 3.1.5*) odpipetowywano po 1 ml mieszaniny reakcyjnej, a następnie nawarstwiano po 2,2 ml NaCl o $d=1,006$ g/ml. Probówki zatapiano, a następnie umieszczano je w rotorze kątowym Beckman TLA-100.3 i wirowano w ultrawirówce Beckman TLX Optima przy następujących parametrach: 100 000 obr/min (541 000 x g), 2 godz. 15 min, temperatura 4°C, akceleracja (acc) 5, deceleracja (decc) 9.

Po zakończeniu wirowania próbki ostrożnie wyjmowano z rotora i pozostawiano w statywie na 15 minut. Następnie, za pomocą zestawu do cięcia próbek firmy Beckman, przecinano próbkę, oddzielając VLDL od liposomów i pozostałych produktów reakcji (ryc. 13). Warunki ultrawierowania oraz miejsce cięcia ustalono na podstawie rozdziału próbek barwionych na obecność lipidów oraz oceny gradientu gęstości tworzonego w próbce w trakcie ultrawierowania (ryc. 13).



Ryc. 13. Rozdział VLDL od liposomów i pozostałych produktów reakcji metodą ultrawierowania.

A – Obraz mieszaniny reakcyjnej VLDL+LP, barwionej na obecność lipidów, po ultrawierowaniu. Po zakończeniu inkubacji próbkę VLDL+LP schładzano i dodawano do niej roztworu czerni sudanowej w glikolu etylenowym (rozdział 3.2.2) w stosunku objętościowym 10:1. Próbkę inkubowano 20 minut w temperaturze 4°C, a następnie wirowano (12000 obr/min, 10 minut). Do probówki „zatapialnej” Beckman (rozdział 3.1.5) przenoszono 1 ml barwionej próbki i nawarstwiono 2,2 ml 0,9% NaCl o $d=1,006$ g/ml. Probówkę zatapiano i wirowano (100 000 obr/min; 2 godz. 15 min, temp. 4°C, acc 5, decc 9). Po zakończeniu ultrawierowania próbkę pozostawiano w statywie na 15 minut, po czym wykonano zdjęcie. Za odpowiednie miejsce rozdziału przyjęto widoczną strefę przejaśnienia między frakcjami.

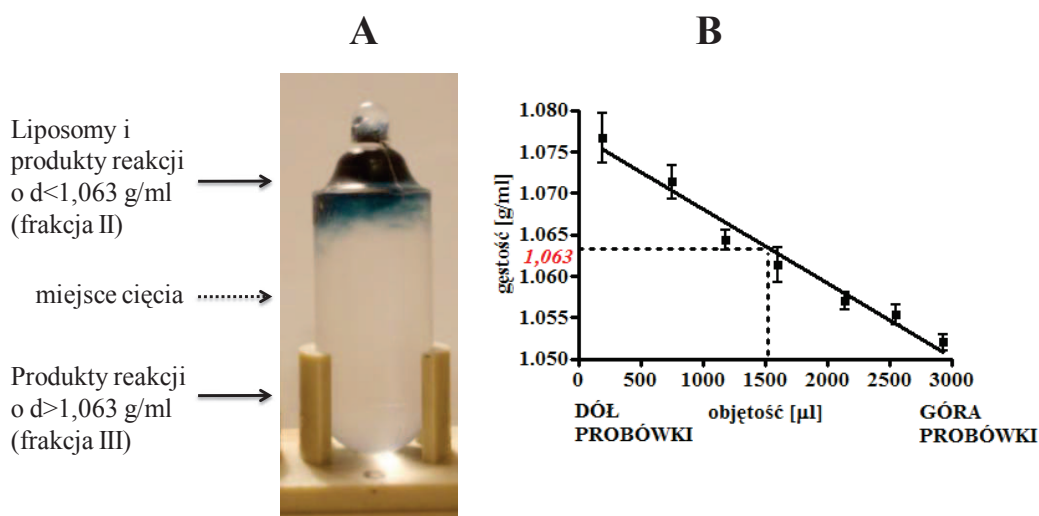
B – Gradient gęstości ($n = 3$). Po zakończeniu inkubacji do probówki „zatapialnej” Beckman przenoszono 1 ml schłodzonej próbki VLDL+LP i nawarstwiano 2,2 ml 0,9% NaCl o $d=1,006$ g/ml. Probówkę zatapiano i wirowano (warunki jw). Po zakończeniu wirowania próbkę pozostawiano w statywie na 15 minut. Następnie ostrożnie usuwano zatopiony szczyt probówki, po czym delikatnie, za pomocą kapilary szklanej i pipety automatycznej, odciągano od dołu probówki frakcje o objętości około 500 μl. Objętość frakcji mierzono, a następnie metodą wagową wyznaczano gęstość każdej z frakcji.

Frakcje górne zawierające VLDL (ryc. 13) pulowano, uzyskując w ten sposób frakcję I. Jej objętość mierzono, a frakcję poddawano dializie (warunki dializy jak dla VLDL – rozdział 3.3.2).

Frakcje dolne pulowano i mierzono objętość powstałej frakcji, po czym metodą wagową wyznaczano jej gęstość. Następnie za pomocą KBr gęstość frakcji doprowadzano do gęstości 1,063 g/ml. Tak przygotowaną frakcję rozporcjowywano

do 6 próbek „zatapialnych” Beckman (rozdział 3.1.5), a następnie nawarstwiano roztwór KBr o $d=1,063$ g/ml do objętości 3,2 ml. Probówki zatapiano, umieszczano w rotorze kątowym Beckman TLA-100.3 i wirowano w ultrawirówce Beckman TLX Optima przy następujących parametrach wirowania: 100 000 obr/min (541 000 x g), 3 godziny, temperatura 4°C, akceleracja (acc) 5, deceleracja (decc): 9.

Po zakończeniu wirowania próbki ostrożnie wyjmowano z rotora i pozostawiano w statywie na 15 minut. Następnie przecinano próbki na wysokości odpowiadającej gęstości 1,063 g/ml (ryc. 14).



Ryc. 14. Rozdział liposomów i pozostałych produktów reakcji metodą ultrawirowania na frakcje o gęstości powyżej i poniżej 1,063 g/ml.

A – Obraz liposomów i produktów reakcji barwionych na obecność lipidów po ultrawirowaniu. Po zakończeniu inkubacji i rozdziale VLDL+LP zgodnie z opisem do ryciny 13A, mierzono objętość frakcji dolnej, a następnie jej gęstość doprowadzano do gęstości 1,063 g/ml. Frakcję umieszczano w próbówce „zatapialnej” Beckman (rozdział 3.1.5) i uzupełniano roztworem KBr o $d=1,063$ g/ml. Probówkę zatapiano i wirowano (100 000 obr/min; 3 godz., temp. 4°C, acc 5, decc 9). Po zakończeniu ultrawirowania próbkę pozostawiono w statywie na 15 minut, po czym wykonano zdjęcie.

B – Gradient gęstości (n = 3). Do próbki nawarstwiano 3,2 ml roztworu KBr o gęstości $d=1,063$ g/ml, próbki zatapiano i wirowano (warunki jw); postępowanie z próbką po ultrawirowaniu zgodnie z opisem do ryciny 13B.

Frakcje górne o gęstości poniżej 1,063 g/ml pulowano, uzyskując w ten sposób frakcję II ($1,006 < d < 1,063$ g/ml). We frakcji tej znajdowały się liposomy i produkty reakcji o gęstości w zakresie $1,006 < d < 1,063$ g/ml.

Fracje dolne o gęstości powyżej 1,063 g/ml pulowano, uzyskując frakcję III ($d > 1,063$ g/ml). We frakcji III znajdowały się produkty reakcji posiadające gęstość odpowiadającą gęstości lipoprotein HDL (tab. 1).

Objętość frakcji II i III mierzono, a następnie frakcje poddawano dializie (warunki dializy jak dla VLDL - *rozdział 3.3.2*).

3.8.1. Zagęszczanie frakcji

Po uzyskaniu frakcji I, II i III metodą ultrawierowania (*rozdział 3.8*) i dializie, objętość frakcji mierzono.

Następnie frakcję II i III zagęszczano w aparacie Amicon pod ciśnieniem azotu. Frakcję II zagęszczano do objętości około 6 ml, czyli objętości odpowiadającej wyjściowej objętości mieszaniny reakcyjnej poddawanej ultrawierowaniu (6 x 1 ml). Frakcję III zagęszczano do objętości około 0,5 ml, czyli zagęszczano ją około 12-krotnie w stosunku do wyjściowej objętości mieszaniny reakcyjnej. Po zagęszczeniu frakcji II i III mierzono ich objętość.

3.8.2. Charakterystyka frakcji rozdzielonych metodą ultrawierowania

We frakcjach I, II i III oznaczano stężenie FL, CHC, CHW oraz apoE (*rozdział 3.10, 3.11*). Stężenie składników wyrażano w przeliczeniu na VLDL, uwzględniając zmiany objętości na etapie ultrawierowania, dializy i zagęszczania prób w aparacie Amicon.

Fracje poddawano analizie metodą elektroforezy w żelu agarozowym (*rozdział 3.12.1*), metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE (*rozdział 3.12.2*) oraz metodą elektroforezy w gradiencie żelu poliakrylamidowego denaturującego SDS-PAGE (*rozdział 3.26.3*).

Dla frakcji III oceniono również gęstość frakcji (*rozdział 3.8.4*).

3.8.3. Porównanie metody ultrawierowania z immunoprecypitacyjną metodą rozdziału VLDL od pozostałych produktów reakcji

Porównano procentowy rozkład FL, CHC i apoE pomiędzy VLDL (frakcja I) a liposomy i produkty reakcji (frakcja II + frakcja III), rozdzielonych metodą ultrawierowania (rozdział 3.8) z procentowym rozkładem pomiędzy VLDL (osad) a liposomy i produkty reakcji (supernatant) rozdzielonych metodą immunoprecypitacji (rozdział 3.6.2) (tab. 10).

Tabela 10. Procentowy udział FL, CHC i apoE pomiędzy VLDL oraz liposomy i produkty reakcji rozdzielone metodą ultrawierowania i metodą immunoprecypitacji. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm OS; n = 7.

	VLDL		Liposomy i produkty reakcji	
	ultrawierowanie	immuno-precypitacja	ultrawierowanie	immuno-precypitacja
FL	5,8 \pm 1,0	5,9 \pm 0,6	94,2 \pm 1,0	94,1 \pm 0,6
CHC	52,1 \pm 5,9	54,1 \pm 3,8	47,9 \pm 5,9	45,9 \pm 3,8
apoE	73,8 \pm 6,4	77,0 \pm 6,7	25,6 \pm 6,8	23,0 \pm 6,7

Nie stwierdzono różnicy statystycznie znamiennej w procentowym rozkładzie FL, CHC i apoE pomiędzy frakcje rozdzielane metodą immunoprecypitacji oraz ultrawierowania. We frakcji II i III uzyskanych metodą ultrawierowania nie stwierdzono obecności apoB, co potwierdza, że frakcje te nie zawierają VLDL.

Średni odzysk wyznaczony na podstawie odzysków dla FL, CHC i apoE (tab. 11) wyniósł 73,7%, co biorąc pod uwagę wieloetapowość procedury rozdziału frakcji metodą ultrawierowania jest wartością satysfakcjonującą.

Tabela 11. Odzysk dla FL, CHC i apoE, po rozdziale mieszaniny inkubacyjnej metodą ultrawierowania. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm OS; n = 7.

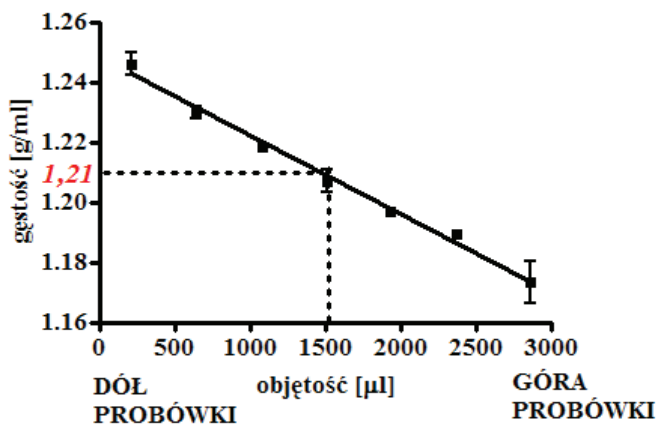
Oznaczany składnik	Odzysk [%]
FL	71 \pm 5,4
CHC	73 \pm 5,1
apoE	77 \pm 5,9

3.8.4. Ocena gęstości frakcji III metodą ultrawierowania

W celu oceny, czy cząstki lipoproteinowe obecne we frakcji III posiadają gęstość charakterystyczną dla HDL ($1,063 \text{ g/ml} < d < 1,21 \text{ g/ml}$) czy VHDL ($d > 1,21 \text{ g/ml}$) (tab. 4), frakcję III poddano dalszemu rozdzielaniu metodą ultrawierowania.

W tym celu po oddzieleniu frakcji o gęstości powyżej $1,063 \text{ g/ml}$ (rozdział 3.8), mierzono jej objętość i gęstość, a następnie za pomocą stałego KBr doprowadzano gęstość frakcji do gęstości $1,21 \text{ g/ml}$. Frakcję przenoszono do probówek „zatapialnych” Beckman (rozdział 3.1.5), a następnie nawarstwiano roztwór KBr o $d = 1,21 \text{ g/ml}$ do wypełnienia probówki (3,2 ml). Probówki zatapiano i wirowano w ultrawirówce Beckman TLX Optima przy następujących parametrach: 100 000 obr/min ($541\,000 \times g$), 3 godz., temperatura 4°C , akceleracja (acc): 5, deceleracja (decc): 9.

Po zakończeniu wirowania probówki ostrożnie wyjmowano z rotora i pozostawiano w statywie na 15 minut. Następnie za pomocą zestawu do cięcia probówek firmy Beckman dokonywano cięcia na wysokości odpowiadającej gęstości $1,21 \text{ g/ml}$ (ryc. 15).



Ryc. 15. Gradient gęstości dla rozdzielania frakcji o gęstości powyżej i poniżej $1,21 \text{ g/ml}$ ($n = 3$). Do probówki nawarstwiano $3,2 \text{ ml}$ roztworu KBr o gęstości $d = 1,21 \text{ g/ml}$, probówki zatapiano i wirowano ($100\,000 \text{ obr/min}$; 3 godz., temp. 4°C , acc 5, decc 9); postępowanie z próbką po ultrawierowaniu zgodnie z opisem do ryciny 13B.

Frakcje o gęstości powyżej $1,21 \text{ g/ml}$ (frakcja IIIA) i poniżej $1,21 \text{ g/ml}$ (frakcja IIIB) pulowano, a następnie mierzono ich objętość i poddawano dializie (warunki dializy jak dla VLDL - rozdział 3.3.2).

Po zakończeniu dializy mierzono objętość frakcji i zagęszczano je w aparacie Amicon do objętości około 0,5 ml. Objętość frakcji IIIA i IIIB po zagęszczeniu mierzono.

Następnie w obu frakcjach oznaczano stężenie FL, CHC (*rozdział 3.10*) i apoE (*rozdział 3.11*). Stężenia składników wyrażano w przeliczeniu na stężenie w VLDL, uwzględniając zmiany objętości próbek na etapie rozdziału.

3.9. Badanie oddziaływania frakcji III z HDL

3.9.1. Otrzymywanie HDL

HDL otrzymywano poprzez wytrącanie lipoprotein zawierających apoB z surowicy w obecności heparyny i jonów manganu (II).

Do 1 cz. surowicy pulowanej stabilizowanej azydkiem sodu (0,1%) dodawano 0,1 cz. odczynnika „heparyna-mangan” (*rozdział 3.2.1*) i inkubowano w temperaturze pokojowej 30 minut. Po zakończeniu inkubacji, osad z lipoproteinami zawierającymi apoB odwirowywano (10000 obr/min, 15 min, 15°C) i ostrożnie ściągnano pipetą supernatant zawierający HDL i białka surowicy. Supernatant dializowano do buforu do HDL (*rozdział 3.2.1*).

3.9.2. Inkubacja frakcji III z HDL

Frację III po rozdziale metoda ultrawierowania (*rozdział 3.8*) dializowano do buforu do HDL (*rozdział 3.2.1*), a następnie zagęszczano (*rozdział 3.8.1*). Tak przygotowaną frakcję III mieszano z HDL (*rozdział 3.9.1*) w stosunku objętościowym 4:1 i inkubowano 2 godz. w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji mieszaninę reakcyjną poddawano rozdzielowi metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE (*rozdział 3.12.2*). Kontrolę stanowiła frakcja III zmieszana z buforem do HDL (stosunek objętościowy 4:1) i HDL zmieszane z buforem do HDL (stosunek objętościowy 1:4).

3.10. Metody stosowane do oznaczania stężenia składników lipidowych

Stężenie FL, CHC, CHW i TG oznaczano manualnie przy pomocy gotowych zestawów odczynnikowych (*rozdział 3.1.2*), opartych o metody enzymatyczne z reakcją Trindera jako reakcją wskaźnikową, z odczytem absorbancji metodą „end-point” i kalibracją metod prostoliniową powtarzalną.

Stężenie FL oznaczano metodą enzymatyczną z wykorzystaniem fosfolipazy D, oksydazy choliny i peroksydazy. Odczytu absorbancji dokonywano na spektrofotometrze T80 (PG Instruments) przy długości fali $\lambda = 600$ nm. Precyzja w serii niejednoczesnej: WZ = $\pm 2,7\%$ (n = 8).

Stężenie TG oznaczano metodą enzymatyczną z wykorzystaniem lipazy, kinazy glicerolu, oksydazy glicerolofosforanowej i peroksydazy. Odczytu absorbancji dokonywano na spektrofotometrze Epoll-2 przy długości fali $\lambda = 546$ nm. Precyzja w serii niejednoczesnej: WZ = $\pm 1,4\%$ (n = 8).

Stężenie CHC oznaczano metodą enzymatyczną z wykorzystaniem esterazy, oksydazy cholesterolu i peroksydazy. Odczytu absorbancji dokonywano na spektrofotometrze Epoll-2 przy długości fali $\lambda = 546$ nm. Precyzja w serii niejednoczesnej: WZ = $\pm 2,4\%$ (n = 8).

Stężenie CHW oznaczano metodą enzymatyczną z wykorzystaniem oksydazy cholesterolu i peroksydazy. Odczytu absorbancji dokonywano na spektrofotometrze Epoll-2 przy długości fali $\lambda = 546$ nm. Precyzja w serii niejednoczesnej: WZ = $\pm 3,5\%$ (n = 8).

Stężenie CHE wyliczano jako różnicę stężeń CHC i CHW.

Krotność rozcieńczenia i objętość prób do oznaczeń modyfikowano, w zależności od stężenia analitu w próbce, a stężenie końcowe obliczano na podstawie wzoru:

$$c_{\text{badanej}} = \frac{abs_{\text{badanej}}}{abs_{\text{wzorca}}} \times c_{\text{wzorca}} \times \frac{V_{\text{odczynnika}} + V_{\text{badanej}}}{V_{\text{odczynnika}} + V_{\text{wzorca}}} \times \frac{V_{\text{wzorca}}}{V_{\text{badanej}}} \times R$$

gdzie:

c - stężenie

abs - absorbancja

V - objętość

R - krotność rozcieńczenia próby badanej przed analizą

3.11. Metody stosowane do oznaczania stężenia apoE i apoB

3.11.1. Immunonefelometryczne metody oznaczania apoE i apoB

Stężenie apoE oraz stężenie apoB w próbkach surowic, VLDL, VLDL+LP, VLDL+BF (*rozdział 3.3, 3.5*) oraz we frakcjach I, II i III (*rozdział 3.8*) oznaczano manualnie, przy zastosowaniu gotowych zestawów odczynnikowych (*rozdział 3.1.2*), wykorzystujących immunochemiczne zmętnieniowe metody oznaczania apolipoprotein, z odczytem metodą „end-point”, z kalibracją nieprostoliniową niepowtarzalną. Odczytu zmętnienia dokonywano na nefelometrze laserowym Behring-Laser Nephelometer. Próbkę zawierającą duże stężenie FL przed oznaczeniem solubilizowano (*rozdział 3.12.3*). Stężenie białka w próbce badanej odczytywano z krzywej kalibracyjnej, wyznaczonej w programie GraphPad Prism 4.0 i przeliczano, uwzględniając objętość próbki i krotność rozcieńczenia próbek przed analizą.

Precyzja w serii niejednoczesnej dla oznaczania apoE: WZ = ±4,1%, precyzja w serii niejednoczesnej dla oznaczania apoB: WZ = ±3,8% (n = 7).

3.11.2. Oznaczanie stężenia apoE metodą elektroforezy raketowej

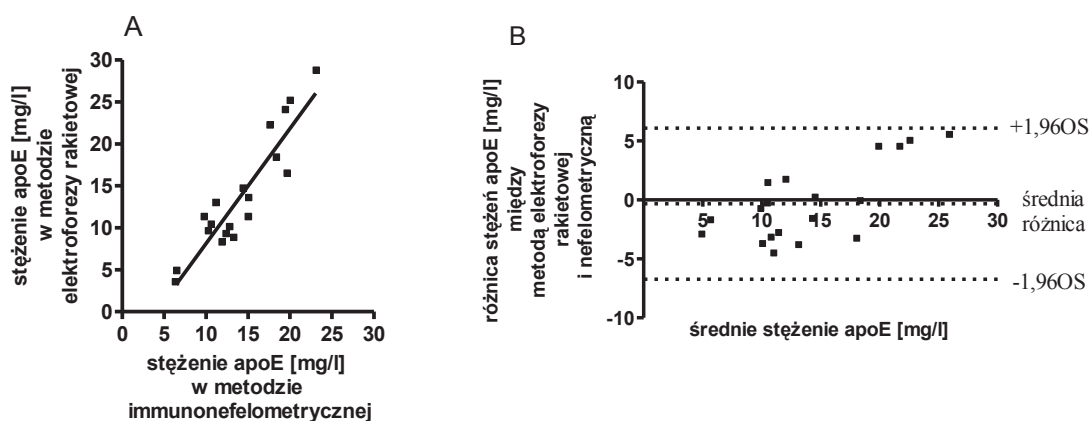
W próbkach supernatantów i osadów, uzyskanych po rozdzieleniu składników mieszaniny reakcyjnej metodą immunoprecypitacji znajdują się przeciwciała anty apoB (rozdział 3.6). Ich obecność interferuje i uniemożliwia ocenę stężenia apoE metodą immunonefelometryczną (rozdział 3.11.1). Z tego względu do oznaczenia stężenia białka w próbkach po immunoprecypitacji zastosowano zestawy odczynnikowe firmy Sebia, oparte o metodę elektroforezy raketowej (rozdział 3.1.2), w której nie obserwuje się tego typu interferencji. Zestaw odczynnikowy Sebia umożliwia oznaczenie całkowitego stężenia apoE w osoczu oraz stężenia apoE w lipoproteinach niezawierających apoB. Oznaczenie apoE w cząstkach niezawierających apoB odbywa się poprzez oznaczenie stężenia apoE w supernatancie, po wytrąceniu cząstek zawierających apoB metodą immunoprecypitacji z przeciwciałami anty apoB.

Próbki VLDL+LP oraz VLDL+LP_{supernatant} przed oznaczeniem solubilizowano (rozdział 3.12.3). Na żel agarozowy наносono po 5 µl próbek VLDL+LP, 10 µl próbek VLDL+LP_{supernatant} oraz po 5 µl roztworów kalibratora o wzrastającej zawartości apoE, przygotowanych zgodnie z instrukcją producenta. Próbki pozostawiano do wchłonięcia na 20 minut. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparacie K20 firmy Sebia, przy stabilizowanym napięciu 50V, przez okres 4 godzin, w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu elektroforezy żełe wybarwiano zgodnie z instrukcją producenta. Uzyskane rozdziały skanowano i za pomocą programu GelScan V. 1.45 (*Krzysztof Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Polska*) mierzono wysokość raketek dla próbek badanych i dla kalibratorów. Na podstawie wyników dla kalibratorów w programie GraphPad Prism 4.0 wyznaczano krzywą kalibracyjną, z której odczytywano stężenia dla prób badanych. Stężenia końcowe apoE obliczano, uwzględniając rozcieńczenie prób i objętość próbek do badania.

Stężenie apoE w próbkach VLDL+LP_{osad} obliczano jako różnicę VLDL+LP i VLDL+LP_{supernatant}.

3.11.3. Porównanie metody elektroforezy raketowej i metody immunonefelometrycznej oznaczania apoE

Na podstawie oznaczeń stężenia apoE w próbkach VLDL+LP oceniono zgodność wyników uzyskanych metodą elektroforezy raketowej i metodą immunonefelometryczną (ryc. 16).



Ryc. 16. Porównanie wyników oznaczeń stężenia apoE w próbkach VLDL+LP metodą immunonefelometryczną i elektroforezy raketowej. A – wykres korelacji, B – wykres Blanda-Altmana (n = 19).

Stwierdzono dobrą zgodność wyników oznaczania apoE metodą immunonefelometryczną i elektroforezy raketowej. Współczynnik korelacji Pearsona wyniósł $r = 0,918$ ($p < 0,0001$) (ryc. 16A). Średnia różnica między metodami wyniosła $-0,32$ mg/l (ryc. 16B).

3.12. Techniki elektroforetyczne zastosowane w pracy

3.12.1. Elektroforeza w żelu agarozowym

Na wypoziomowane i odtuszczone płytki szklane wylewano gorący, 0,75% żel agarozowy w buforze Tris-barbital (rozdział 3.2.2) i pozostawiano do zastygnięcia.

Próbki badane o objętości 2 - 20 μ l (2 μ l – immunodetekcja na obecność apoE i apoB; 5 - 20 μ l – barwienie na obecność lipidów lub białek; objętość zależna

od stężenia frakcji) наносzono za pomocą aplikatorów firmy Cormay na żel agarozowy i pozostawiano do wchłonięcia.

Elektroforezę prowadzono w buforze Tris-barbital (*rozdział 3.2.2*) przez 75 minut, przy stabilizowanym napięciu 160 V, z chłodzeniem wodą. Czas rozdziału kontrolowano poprzez obserwację rozdziału dla próbki surowicy barwionej roztworem czerni sudanowej w glikolu etylenowym (*rozdział 3.2.2*), zmieszanego z surowicą w stosunku objętościowym 1:1.

Żel agarozowy po rozdziale barwiono na obecność lipidów lub białek albo przeprowadzano transfer pasywny cząstek na błonę PVDF (*rozdział 3.14.1*) lub, w przypadku elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, wycinano fragment agarozy z rozdzielaniem lipoprotein i przeprowadzano rozdzielanie w żelu poliakrylamidowym niedenaturującym (*rozdział 3.14.2*).

W celu wybarwienia frakcji rozdzielonych na żelu agarozowym na obecność białek lub lipidów, żel suszono w strumieniu ciepłego powietrza, a następnie umieszczano w roztworze czerni sudanowej w alkoholu etylowym (*rozdział 3.2.2*) (barwienie na obecność lipidów) lub w roztworze czerni amidowej (*rozdział 3.2.2*) (barwienie na obecność białek). Barwienie prowadzono do momentu uwidocznienia się frakcji (około 5 – 10 minut). Następnie żel z nadmiaru barwnika opłukiwano wodą, a tło odbarwiano w roztworze odbarwiacza (*rozdział 3.2.2*).

3.12.2. Elektroforeza dwukierunkowa w gradiencie żelu poliakrylamidowego niedenaturującego (2D-PAGE) 2-25%

Elektroforeza dwukierunkowa w gradiencie żelu poliakrylamidowego niedenaturującego (2D-PAGE) umożliwiła rozdzielanie lipoprotein ze względu na ich ruchliwość elektroforetyczną (I kierunek, w żelu agarozowym) i wielkość cząstek (II kierunek, w żelu poliakrylamidowym). Rozdział przeprowadzono wg zmodyfikowanej procedury opisanej w [99].

Przygotowanie żelu poliakrylamidowego niedenaturującego 2-25%

Żel rozdzielający z liniowym gradientem stężenia akrylamidów od 2% do 25% (*rozdział 3.2.2*) przygotowywano za pomocą miksera do przygotowywania żeli gradientowych. Na powierzchnię przygotowanego żelu rozdzielającego nawarstwiano

około 0,5 cm 5% izopropanolu. Żel pozostawiano do polimeryzacji w temperaturze pokojowej na 1 – 1,5 godziny. Po spolimeryzowaniu żelu rozdzielającego, z jego powierzchni usuwano izopropanol, a powierzchnię żelu przepłukiwano wodą destylowaną i osuszano bibułą Whatman 1Chr. Następnie na żel rozdzielający nawarstwiano żel zagęszczający (*rozdział 3.2.2*) i pozostawiano do polimeryzacji na 1 – 1,5 godziny. Żel przechowywano w buforze elektrodowym z kwasem bornym (*rozdział 3.2.2*) w temperaturze 4°C i wykorzystywano do elektroforezy w ciągu 3 dni od przygotowania.

Przeprowadzenie elektroforezy

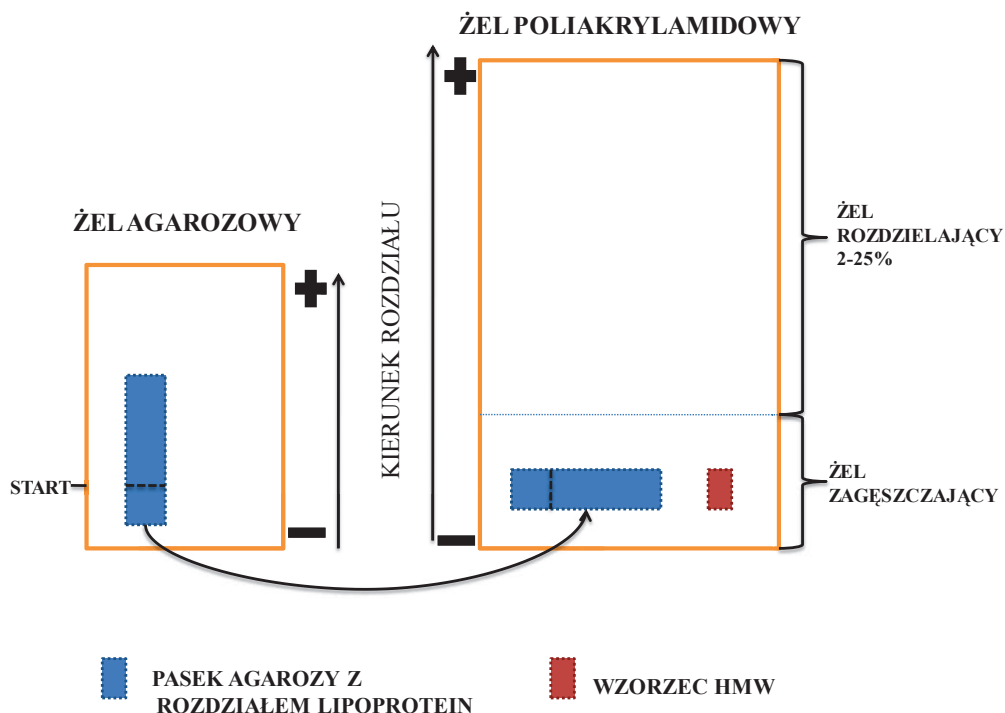
I kierunek (w żelu agarozowym)

Elektroforezę w żelu agarozowym prowadzono zgodnie z procedurą podaną w rozdziale 3.12.1, z modyfikacją dotyczącą objętości nakładanej próbki. Do I kierunku elektroforezy dwukierunkowej, do rowków wykonanych z użyciem bibuły Whatman 1Chr, nakładano 100 – 120 µl rozdzielanej próby.

II kierunek (w żelu poliakrylamidowym)

Żel poliakrylamidowy umieszczano w aparacie do elektroforezy horyzontalnej z wbudowaną chłodnicą przepływową, zapewniającą temperaturę rozdziału około 10°C. Komory aparatu wypełniano buforem elektrodowym z kwasem bornym (*rozdział 3.2.2*) i przeprowadzano pre-elektroforezę: 100 V, 30 min.

Po zakończeniu pre-elektroforezy i zakończeniu rozdziału lipoprotein w żelu agarozowym, z żelu agarozowego wycinano pasek agarozy, w którym znajdował się rozdział frakcji badanej i układano go na żelu zagęszczającym w taki sposób, aby frakcje w żelu poliakrylamidowym poruszały się prostopadle w stosunku do ruchu lipoprotein w żelu agarozowym (ryc. 17). Obok paska agarozy na żelu poliakrylamidowym наносzono 10 µl wzorca HMW (*rozdział 3.1.4*).



Ryc. 17. Schemat elektroforezy dwukierunkowej

Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym prowadzono przez 16 godz., przy stabilizowanym napięciu 160 V, z chłodzeniem wodą.

Po zakończeniu elektroforezy przeprowadzano elektrotransfer białek z żelu rozdzielającego na błonę PVDF wg procedury opisanej w rozdziale 3.14.2.

3.12.3. Elektroforeza pionowa w gradiencie żelu poliakrylamidowego denaturującego (SDS-PAGE) 10-20%

Elektroforeza pionowa w gradiencie żelu poliakrylamidowego denaturującego umożliwiła rozdział białek lipoprotein ze względu na ich masę cząsteczkową.

Przygotowanie żelu poliakrylamidowego z SDS 10-20%

Za pomocą miksera do przygotowywania żeli gradientowych przygotowywano żel rozdzielający o liniowym gradiencie stężenia akrylamidów od 10% do 20% (rozdział 3.2.2). Na powierzchnię żelu nawarstwiano około 0,5 cm 5% izopropanolu. Żel pozostawiano do polimeryzacji w temperaturze pokojowej na 1 – 1,5 godziny. Po spolimeryzowaniu żelu rozdzielającego usuwano izopropanol, a powierzchnię żelu

przepłukiwano wodą destylowaną i osuszano bibułą Whatman 1Chr. Następnie na żel rozdzielający nawarstwiano żel zagęszczający (*rozdział 3.2.2*) i w żelu umieszczano formę w kształcie grzebienia do utworzenia studzienek. Żel pozostawiano do polimeryzacji na 1 – 1,5 godziny. Żel przechowywano w buforze elektrodowym z SDS (*rozdział 3.2.2*) w temperaturze 4°C i wykorzystywano do elektroforezy w ciągu 3 dni od przygotowania.

Przygotowanie prób do rozdziału:

Solubilizacja prób

Próbki bogate w FL poddawano procesowi solubilizacji. Mieszano je z 10% Tritonem X-100 w stosunku objętościowym 1:1, dokładnie mieszano na mieszadle typu „vortex” i inkubowano w temperaturze 56°C przez 1 godzinę. Po zakończeniu inkubacji próbki schładzano w lodzie i wirowano (12000 obr/min, 3 minuty).

Przygotowanie próbek z dodatkiem β -merkaptoetanolu

Próbki mieszano z buforem redukującym (*rozdział 3.2.2*) w stosunku objętościowym 1:1, a następnie umieszczano je na 5 minut w temp. 95°C, po czym schładzano w lodzie i wirowano (12000 obr/min, 3 minuty).

Przygotowanie próbek bez dodatku β -merkaptoetanolu

Próbki mieszano z buforem do obciążania próbek (*rozdział 3.2.2*), w stosunku objętościowym 1:1.

Przeprowadzenie elektroforezy

Płytkę z żelem poliakrylamidowym umieszczano w aparacie do elektroforezy pionowej firmy Bio-Rad. Komorę wypełniano buforem elektrodowym z SDS (*rozdział 3.2.2*) i ostrożnie usuwano formę w kształcie grzebienia. Następnie przeprowadzano pre-elektroforezę: 25V, 15 min.

Po zakończeniu pre-elektroforezy do studzienek w żelu nanoszono odpowiednio przygotowane próbki badane o objętości 10 – 23 μ l (w zależności od stężenia białka) oraz próbkę wzorca LMW (*rozdział 3.1.4*) o objętości 10 μ l.

Elektroforezę prowadzono przez 30 minut przy stabilizowanym napięciu 70 V, a następnie zwiększano napięcie do 155 V i prowadzono rozdział przez 1,5 godz. Przebieg rozdziału śledzono na podstawie rozdziału wzorca LMW.

Po zakończeniu elektroforezy żel rozdzielający wybarwiano metodą barwienia srebrem (*rozdział 3.13*) lub przeprowadzano elektrotransfer białek na błonę PVDF (*rozdział 3.14.2*).

3.13. Detekcja białek po rozdiale w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE metodą barwienia srebrem

Żel poliakrylamidowy inkubowano kolejno: w roztworze płuczącym I (*rozdział 3.6.2*) przez 12 godzin; w roztworze płuczącym II (*rozdział 3.6.2*) przez 25 minut; w roztworze płuczącym III (*rozdział 3.6.2*) dwukrotnie po 10 minut.

Następnie żel inkubowano w odczynniku A (*rozdział 3.6.2*) przez 1 minutę, po czym nadmiar odczynnika usuwano płucząc żel w wodzie (trzykrotnie po 1 minucie). Następnie żel umieszczano w odczynniku B (*rozdział 3.6.2*) i inkubowano go 20 minut, po czym nadmiar odczynnika usuwano jak wyżej. W ostatnim etapie żel umieszczano w odczynniku C (*rozdział 3.6.2*) i inkubowano do momentu pojawienia się prążków. Reakcję przerywano umieszczając żel w roztworze płuczącym IV (*rozdział 3.6.2*).

3.14. Transfer białek z żelu na błonę PVDF

3.14.1. Transfer pasywny z żelu agarozowego

Po zakończeniu elektroforezy w żelu agarozowym przeprowadzano transfer pasywny cząstek na błonę PVDF (*rozdział 3.1.5*). Transfer prowadzono przy obciążeniu około 1,5 kg przez okres 1,5 godz., w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzano immunodetekcję na obecność apoE lub apoB, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.15.

3.14.2. Elektrotransfer z żelu poliakrylamidowego

Po zakończeniu elektroforezy 2D-PAGE (*rozdział 3.12.2*) lub SDS-PAGE (*rozdział 3.12.3*) przeprowadzano elektrotransfer lipoprotein lub białek z żelu na błonę PVDF. Elektrotransfer prowadzono w buforze do elektrotransferu (*rozdział 3.2.2*),

w temperaturze 4°C, przy stabilizowanym napięciu 30 V, przez 26 godz. dla żeli po rozdziale 2D-PAGE i 8 godz. dla żeli po rozdziale SDS-PAGE.

Po zakończeniu elektrotransferu część błony z rozdziałem dla wzorca oddzielano od części błony z rozdziałem dla próbek badanych. Błonę z rozdziałem elektroforetycznym lipoprotein lub białek poddawano immunodetekcji (*rozdział 3.15*).

Błonę z rozdziałem dla wzorca HMW (*rozdział 3.1.4*) umieszczano w roztworze czerni amidowej (*rozdział 3.2.2*) i barwiono 3 godz., po czym odbarwiano tło w roztworze odbarwiacza (*rozdział 3.2.2*), a następnie błonę suszono w strumieniu ciepłego powietrza. Błonę z rozdziałem dla barwionego wzorca LMW (*rozdział 3.1.4*) bezpośrednio po elektrotransferze suszono w strumieniu ciepłego powietrza.

3.15. Immunodetekcja apoE i apoB na błonie PVDF metodą Western blot

Błonę po transferze pasywnym (*rozdział 3.14.1*) lub elektrotransferze (*rozdział 3.14.2*) umieszczano w roztworze blokującym (*rozdział 3.2.3*) na okres 1 godz, z ciągłym mieszaniem. Po zakończeniu inkubacji, roztwór blokujący usuwano, wytrząsając błonę w roztworze płuczącym (*rozdział 3.2.3*) 5 razy po 5 minut.

Następnie błonę umieszczano w roztworze przeciwciała I, specyficznego dla identyfikowanego białka (*rozdział 3.2.3*). Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej, przez 12 - 18 godz., z ciągłym mieszaniem. Po zakończeniu reakcji roztwór przeciwciała I usuwano wytrząsając błonę w roztworze płuczącym (*jak wyżej*).

Następnie błonę umieszczano w roztworze przeciwciała II skoniugowanego z fosfatazą alkaliczną (*rozdział 3.2.3*). Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej, przez 1 godz., z ciągłym mieszaniem. Po zakończeniu reakcji roztwór przeciwciała II usuwano wytrząsając błonę w roztworze płuczącym (*jak wyżej*).

Następnie błony umieszczano w roztworze substratu dla fosfatazy alkalicznej (*rozdział 3.2.3*) i inkubowano do momentu wywołania plam na błonie (około 5 - 10 minut). Reakcję przerywano umieszczając błonę w roztworze przerywającym (*rozdział 3.2.3*) na około 10 minut, z ciągłym mieszaniem.

Błonę suszono w strumieniu ciepłego powietrza i razem z błonami wzorców przechowywano bez dostępu światła.

3.16. Analiza densytometryczna rozdziałów elektroforetycznych

Po rozdziałach elektroforetycznych frakcji żele agarozowe po wybarwieniu (*rozdział 3.12.1*), żele SDS-PAGE po wybarwieniu (*rozdział 3.13*) i błony PVDF po immunodetekcji (*rozdział 3.15*) skanowano, a następnie przy użyciu programu komputerowego do obróbki żeli GelScan V. 1.45 (*Krzysztof Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Polska*) przeprowadzano analizę densytometryczną uzyskanych rozdziałów.

3.17. Ocena wielkości cząstek lipoproteinowych oraz masy cząsteczkowej białek lipoprotein

Średnice Stokesa cząstek lipoproteinowych oceniano na podstawie analizy densytometrycznej rozdziałów elektroforetycznych 2D-PAGE (*rozdział 3.12.2*), po transferze cząstek na błonę PVDF (*rozdział 3.14.2*) i immunodetekcji apoE (*rozdział 3.15*). W programie GelScan V. 1.45, na podstawie densytogramu rozdziału frakcji, wyodrębniano populacje cząstek lipoproteinowych. Następnie dla maksymalnego piku w wyodrębnionej populacji program GelScan wyznaczał drogę migracji cząstek. Droga migracji wyznaczana była również dla białek wzorca HMW (*rozdział 3.1.4*).

Wielkość cząsteczek białek wzorca HMW (tyreoglobulina – 17 nm; ferrytyna – 12,2 nm; katalaza – 9,51 nm; dehydrogenaza mleczanowa – 8,16 nm; albumina – 7,1 nm) i wyznaczona dla nich droga migracji służyły do wyznaczenia w programie GraphPad Prism krzywej kalibracyjnej, z której odczytywano średnice cząstek lipoproteinowych dla wyodrębnionych populacji cząstek. Wyznaczoną średnicę cząstek dla danej populacji przyjmowano jako modalną średnicę dla tej populacji.

Masy cząsteczkowe białek lipoprotein oceniano na podstawie analizy densytometrycznej rozdziałów elektroforetycznych SDS-PAGE (*rozdział 3.12.3*) po barwieniu żeli srebrem (*rozdział 3.13*) lub po transferze białek na błonę PVDF (*rozdział 3.14.2*) i immunodetekcji apoE (*rozdział 3.15*). Na podstawie densytogramu rozdziału białek, w programie GelScan V. 1.45, wyznaczano drogę migracji dla białek wzorca LMW (*rozdział 3.1.5*) oraz drogę migracji badanych białek. Na podstawie masy cząsteczkowej białek wzorca LMW (miozyna – 200 kDa; β -galaktozydaza - 127 kDa; albumina wołowa – 85 kDa; anhidraza węglanowa – 40,7 kDa; inhibitor trypsyny –

31,9 kDa; lizozym – 18,7 kDa; aprotynina – 7,5 kDa) i ich drogi migracji, za pomocą programu GraphPad Prism wyznaczano krzywą kalibracyjną, z której odczytywano masy cząsteczkowe białek.

3.18. Analiza statystyczna danych

Ocenę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 4.03 (*GraphPad Software Inc., San Diego, USA*).

Normalność rozkładu cechy oceniano testem Shapiro-Wilka. Dla zmiennych podlegających rozkładowi normalnemu wyniki przedstawiano jako średnią \pm OS (odchylenie standardowe). Znamienność różnic między grupami oceniano przy pomocy testu t-studenta dla zmiennych powiązanych. Zależność między cechami oceniano na podstawie współczynnika korelacji Pearsona (r).

Średnice Stokesa cząstek lipoproteinowych podlegały rozkładowi nieparametrycznemu i ich rozkład przedstawiono jako medianę i zakres wartości (od minimalnej i maksymalnej).

Znamienność statystyczną przyjęto na poziomie $p < 0,05$.

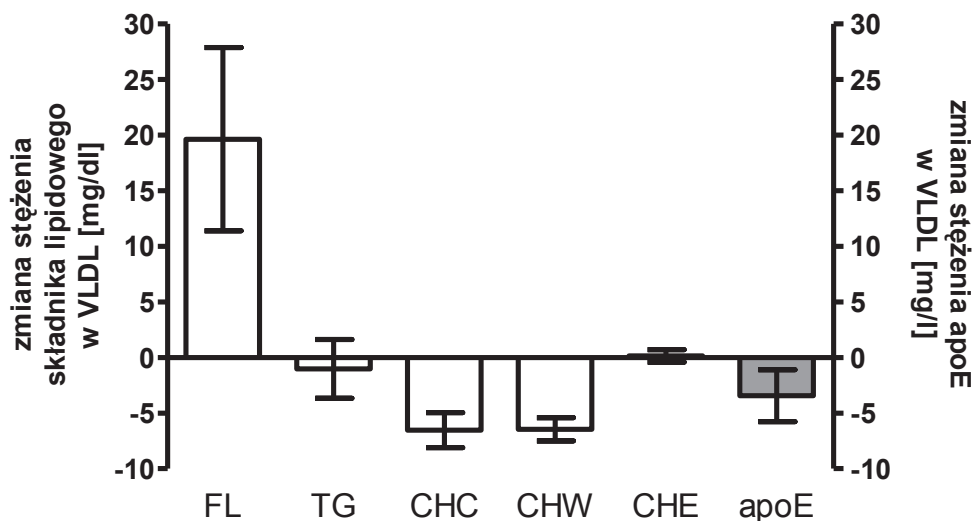
4. WYNIKI

4.1. Zmiany zachodzące na skutek oddziaływania VLDL z liposomami lecytinowymi

VLDL inkubowano z LP 2 godz. w temperaturze 37°C, przy stosunku wagowym VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30. Po zakończeniu inkubacji VLDL oddzielano metodą immunoprecypitacji. W uzyskanych osadach (VLDL) i supernatantach (liposomy i produkty reakcji niezawierające apoB) oceniano stężenie składników lipidowych. Zawartość apoE oznaczano w supernatantach. Mieszaniny reakcyjne poddawano rozdzielaniu metodą elektroforezy na agarozie i metodą elektroforezy dwukierunkowej (2D-PAGE).

4.1.1. Zmiany składu cząstek VLDL po reakcji

Reakcja VLDL z LP skutkowała zmianami w składzie lipidowym i białkowym cząstek VLDL (ryc. 18).

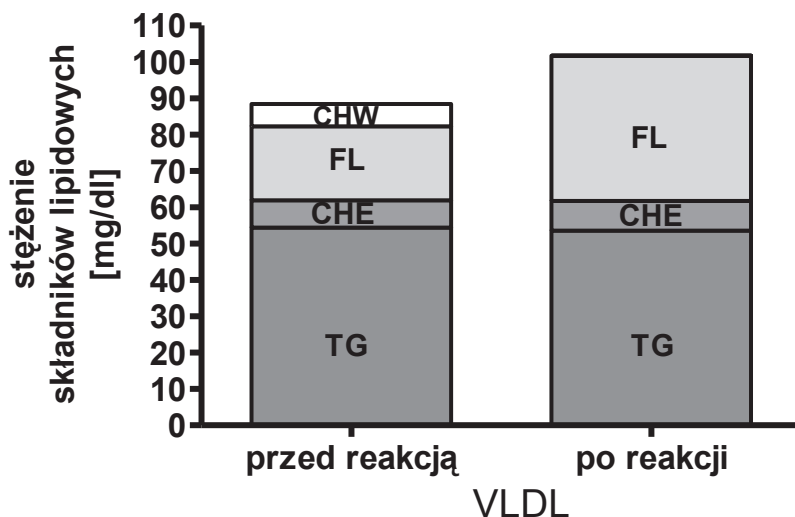


Ryc. 18. Zmiana stężenia składników lipidowych oraz apoE w VLDL po reakcji z LP. Warunki inkubacji: 2 godz., temp. 37°C, VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± OS, n = 15. FL – fosfolipidy, TG – triacyloglicerole, CHC – cholesterol całkowity, CHW – cholesterol wolny, CHE – cholesterol zestryfikowany, apoE – apolipoproteina E

Zawartość FL w VLDL znacząco wzrastała (średnio o 19,6 mg/dl), co stanowiło średnio 96% wyjściowej zawartości FL VLDL. Potencjał cząstek do przyjmowania FL był różny dla różnych puli VLDL. Procent wzrostu FL wahał się od 37% do 153% (WZ = $\pm 40,0\%$) i nie zależał od wyjściowych stężeń składników lipidowych oraz stężenia apoE i apoB w VLDL.

VLDL traciły na rzecz liposomów i produktów reakcji niezawierających apoB średnio 6,5 mg/dl CHC. Stanowiło to średnio 48% puli CHC w VLDL przed reakcją. Uwolnieniu ulegał tylko CHW. Po 2 godz. inkubacji z liposomami VLDL nie zawierały już CHW. Nie stwierdzono natomiast wpływu liposomów na stężenie TG oraz CHE (ryc. 18).

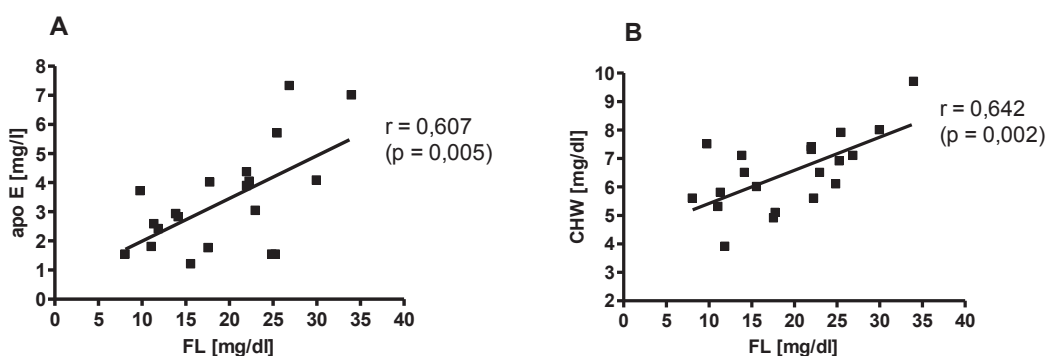
Po reakcji z LP stężenie składników lipidowych w VLDL wzrastało średnio o 13,3 mg/dl, czyli o 15,0% w stosunku do początkowej zawartości lipidów VLDL ($p < 0,0001$). Zmiany nie obejmowały jednak lipidów rdzenia cząstek lipoproteinowych (TG i CHE), a tylko lipidy powierzchniowe (FL i CHW), które przed reakcją stanowiły średnio 30,0% składników lipidowych VLDL, a po reakcji z liposomami 39,3% (ryc. 19).



Ryc. 19. Średnie stężenie składników lipidowych w VLDL przed i po reakcji z LP. Warunki inkubacji: 2 godz., temp. 37°C, VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30; n = 15. FL – fosfolipidy, TG – triacyloglicerole, CHC - cholesterol całkowity, CHW – cholesterol wolny, CHE – cholesterol zestryfikowany

Podczas reakcji z liposomami VLDL traciły apoE (ryc. 18). Spadek zawartości apoE w VLDL po 2 godz. inkubacji wyniósł średnio 3,43 mg/l, co stanowiło 24% wyjściowej puli apoE w VLDL. Różne pule VLDL uwalniały od 7 do 51% apoE (WZ = $\pm 50,3\%$), a ilość uwalnianej apolipoproteiny nie zależała od wyjściowych stężeń składników lipidowych oraz apoE i apoB w VLDL.

Stwierdzono występowanie korelacji pomiędzy stężeniem FL przyjmowanych przez VLDL a stężeniem apoE i CHW traconych na rzecz liposomów i pozostałych produktów reakcji niezawierających apoB (ryc. 20).



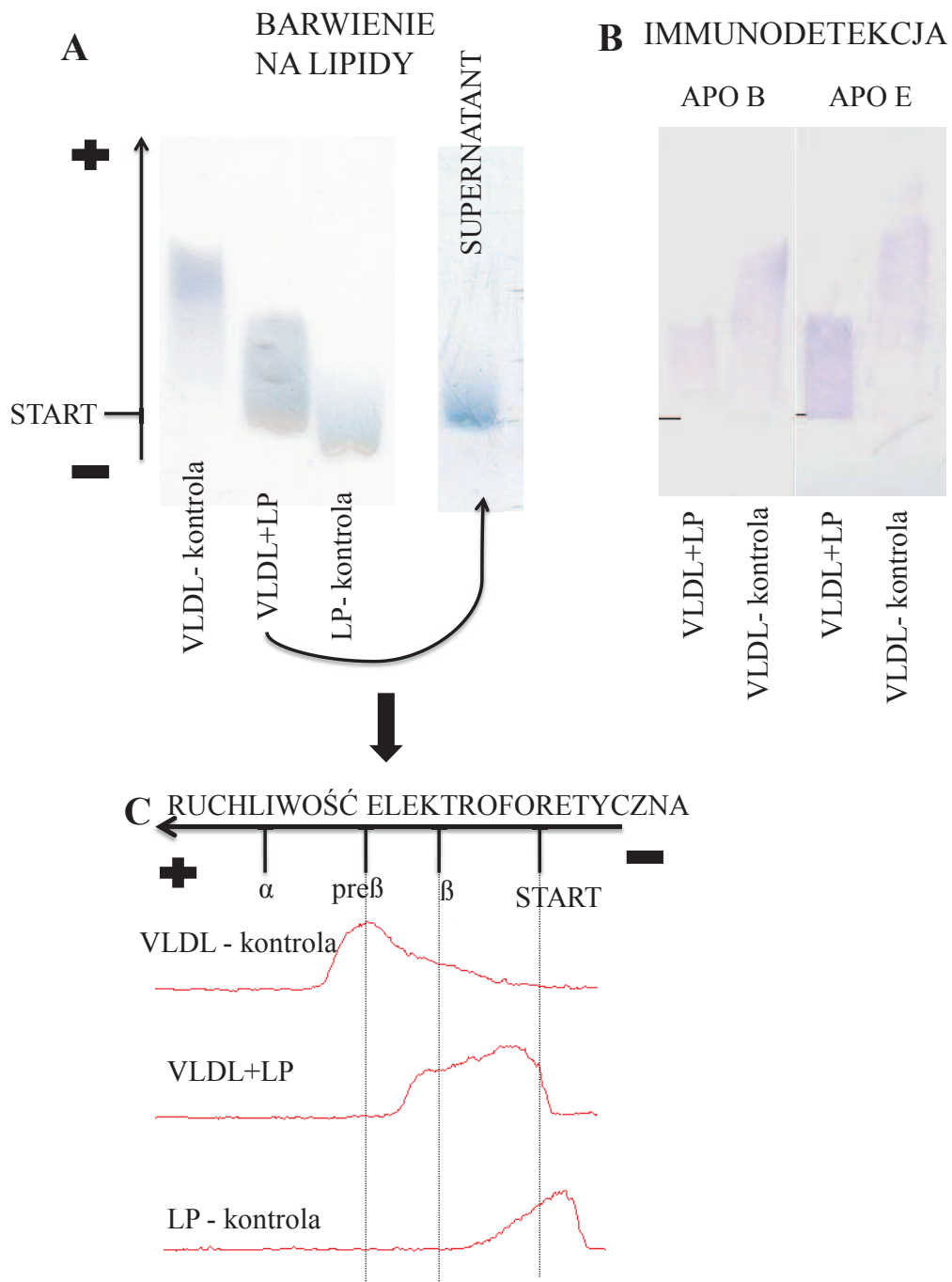
Ryc. 20. A - korelacja między stężeniem FL przyjmowanych przez VLDL a stężeniem traconej apoE; B - korelacja między stężeniem FL przyjmowanych przez VLDL a stężeniem traconego CHW; n = 20.

Średni stosunek molowy składników lipidowych wymienianych między VLDL a liposomami podczas reakcji wynosił FL:CHW 1:0,66. Na 1 mol przyjętych FL VLDL traciły średnio 0,39 mmola apoE (n = 20).

4.1.2. Zmiany ruchliwości elektroforetycznej cząstek

Wykonywano rozdziały elektroforetyczne w żelu agarozowym mieszaniny VLDL+LP, kontrolnych VLDL i LP oraz supernatantów po immunoprecypitacji. Uzyskane rozdziały barwiono na obecność lipidów lub przeprowadzano transfer pasywny lipoprotein na błonę PVDF, a następnie immunodetekcję apoE i apoB. Rozdziały barwione na obecność lipidów poddawano analizie densytometrycznej.

Reakcja VLDL z liposomami wpływała na ruchliwość elektroforetyczną składników mieszaniny reakcyjnej (ryc. 21).



Ryc. 21. Reprezentatywny obraz rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym kontrolnych VLDL, mieszaniny VLDL+LP, kontrolnych liposomów (LP) oraz supernatantu mieszaniny VLDL+LP po immunoprecypitacji. A – barwienie na obecność lipidów, B – immunodetekcja apoB i apoE po transferze pasywnym lipoprotein na błonę PVDF, C – analiza densytmetyczna rozdziału A. Warunki inkubacji: 2 godz., temp. 37°C, VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30.

Analizę ruchliwości elektroforetycznej w żelu agarozowym lipoprotein VLDL przed i po reakcji z liposomami przedstawia tabela 12.

Tabela 12. Ruchliwość elektroforetyczna (Rf) w żelu agarozowym lipoprotein surowicy oraz VLDL kontrolnych i po reakcji z LP. Rf wyliczono jako procent drogi, jaką przebyła frakcja od miejsca startu w stosunku do drogi, jaką przebyła albumina.

Próba		Rf [%] (średnia \pm OS, n = 10)
Surowica	frakcja α -lipoprotein	84,8 \pm 2,9
	frakcja pre β -lipoprotein	48,2 \pm 3,9
	frakcja β -lipoprotein	31,2 \pm 3,3
VLDL - kontrola		53,9 \pm 4,4
VLDL - po inkubacji z LP		32,1 \pm 5,0***

*** p<0,0001 w stosunku do VLDL – kontrola

Ruchliwość elektroforetyczna wyizolowanych VLDL nie różniła się istotnie od ruchliwości frakcji pre β -lipoprotein w pełnej surowicy (tab. 12). Cząstki VLDL po inkubacji z liposomami poruszały się wolniej w polu elektrycznym. Dowodzą tego zarówno obrazy rozdziałów elektroforetycznych barwionych na lipidy, jak i wyniki immunodetekcji apo B i apo E w mieszaninach VLDL z LP i kontrolnych VLDL (ryc. 21). Jak pokazuje tabela 12, droga, jaką przebywała frakcja VLDL po inkubacji z liposomami, odpowiadała ruchliwości β -lipoprotein w pełnej surowicy i była istotnie mniejsza w porównaniu do kontrolnych VLDL.

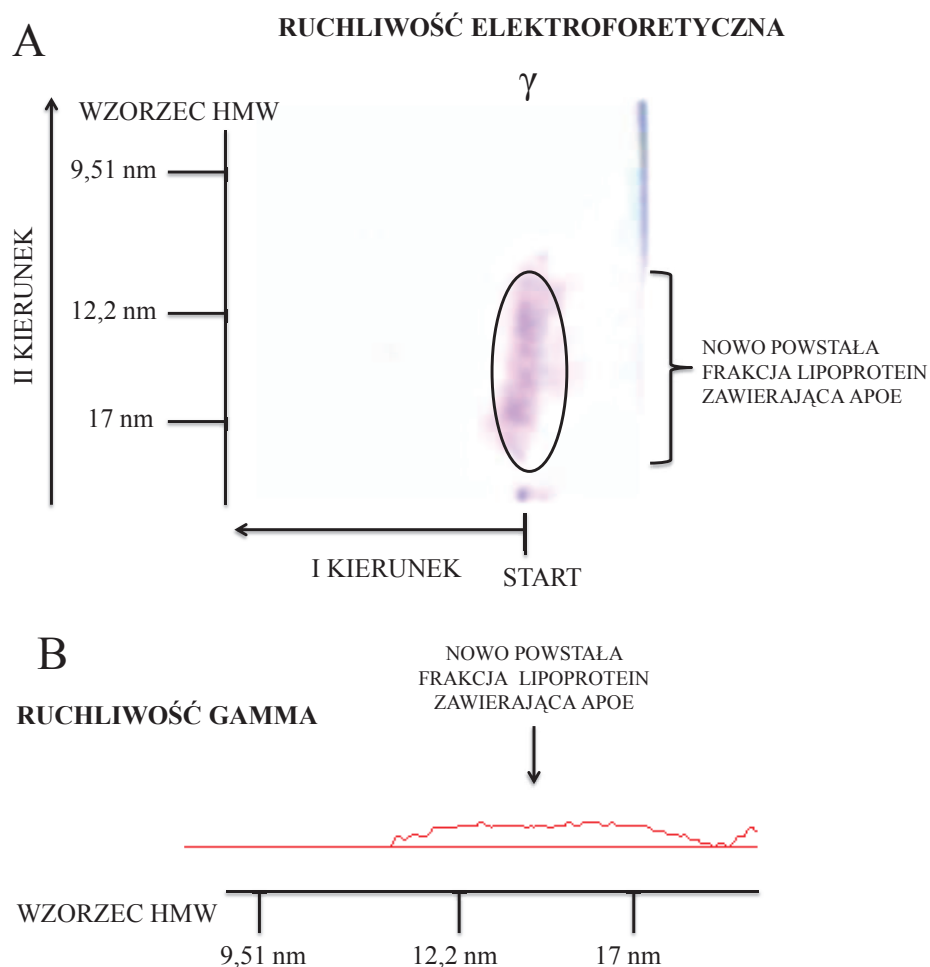
Liposomy kontrolne pozostawały w miejscu nałożenia lub poruszały się w kierunku katody, natomiast po reakcji z VLDL przemieszczały się w kierunku anody (ryc. 21).

4.1.3. Powstawanie nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE

Wykonywano rozdziały mieszanin inkubacyjnych VLDL+LP i kontrolnych VLDL metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, a następnie przeprowadzano elektrotransfer lipoprotein na błonę PVDF i immunodetekcję na obecność apoE. Błony skanowano i przeprowadzano analizę densytometryczną rozdziałów, po czym oceniano ruchliwość elektroforetyczną i wielkość średnic cząstek dla populacji lipoprotein

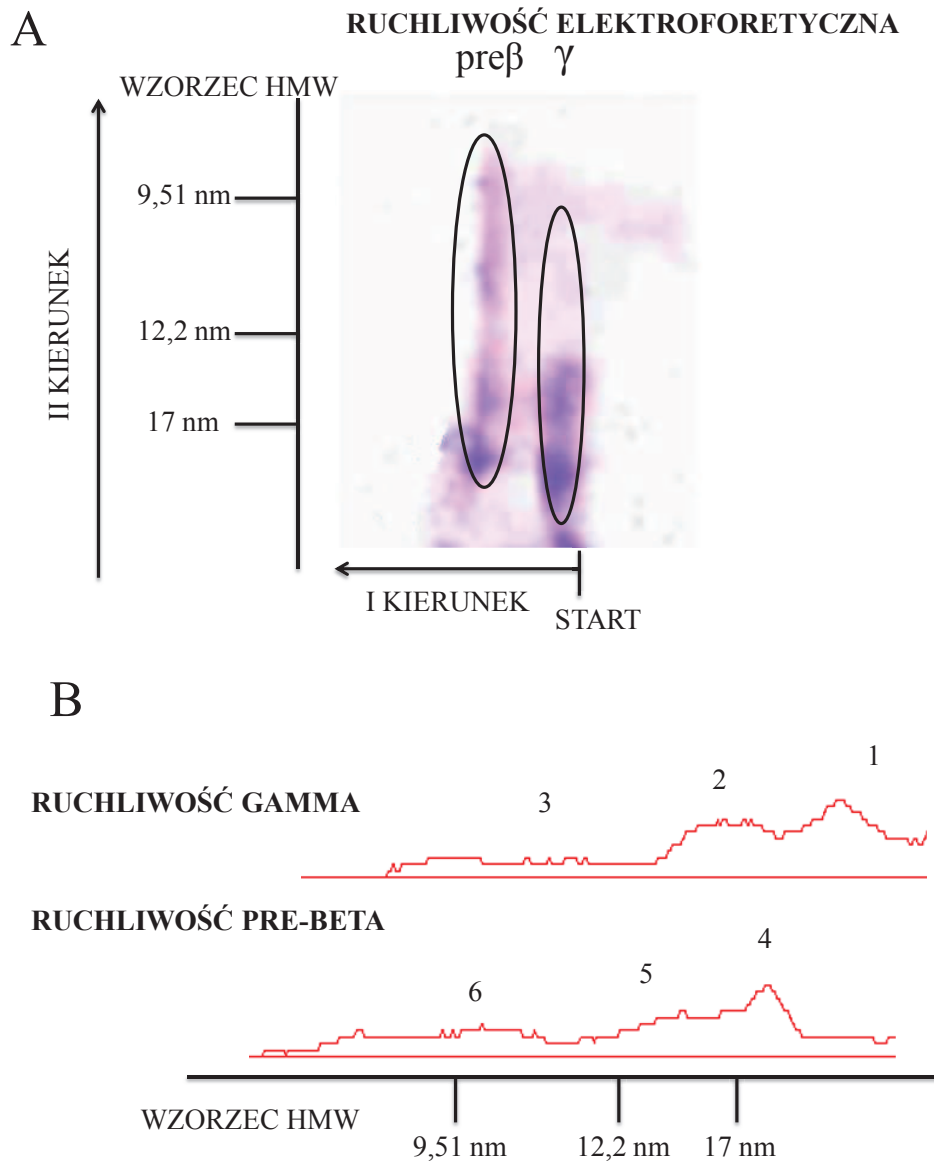
wyodrębnionych w rozdziale. W sumie przeprowadzono 17 doświadczeń. W 13 stwierdzono powstawanie nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE o wielkości umożliwiającej migrację w żelu poliakrylamidowym 2 - 25%.

Jak oczekiwano, kontrolne VLDL ze względu na swoją wielkość nie migrowały w żelu poliakrylamidowym niedenaturującym 2 - 25%. Natomiast w rozdziale mieszanin inkubacyjnych VLDL+LP stwierdzano obecność cząstek zawierających apoE, migrujących w żelu agarozowym (I kierunek) z ruchliwością γ i o wielkości umożliwiającej migrację w 2 - 25% żelu poliakrylamidowym (ryc. 22).



Ryc. 22. Obecność cząstek zawierających apoE o ruchliwości γ w mieszaninie VLDL+LP. A - Przykładowy obraz dla mieszaniny VLDL+LP po rozdziale metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, elektrotransferze i immunodetecji apoE; B - analiza densytometryczna obrazu A. Warunki inkubacji: 2 godz., temp. 37°C, VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30. W rozdziale wyodrębniono jedną populację cząstek o modalnej średnicy 13,39 nm.

W 5 doświadczeniach, oprócz powstawania cząstek o ruchliwości γ , zaobserwowano również powstawanie cząstek zawierających apoE o ruchliwości pre β (ryc. 23).



Ryc. 23. Obecność cząstek zawierających apoE o ruchliwości γ i pre β w mieszaninie VLDL+LP. A - Przykładowy obraz dla mieszaniny VLDL+LP po rozdziale metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, elektrotransferze i immunodetekcji apoE; B - analiza densytometryczna obrazu A. Warunki inkubacji: 2 godz., temp. 37°C, VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30. Cyframi arabskimi zaznaczono wyodrębnione populacje cząstek o różnej wielkości, o modalnych średnic odpowiednio 20,89 nm, 13,96 nm, 11,13 nm, 19,15 nm, 14,73 nm i 9,90 nm, odpowiednio dla populacji 1, 2, 3, 4, 5 i 6.

Populacje cząstek o ruchliwości γ , jakie obserwowano w przeprowadzonych doświadczeniach, były w większości przypadków heterogenne, a modalne ich średnic wahały się od 8,58 nm do 22,07 nm. W 4 doświadczeniach zaobserwowano pojedyncze populacje cząstek γ zawierających apoE. Modalne średnic populacji cząstek o ruchliwości $\text{pre}\beta$ mieściły się w podobnym zakresie wielkości, od 9,9 nm do 21,08 nm. Nowo powstałe cząstki, ze względu na ich wielkość, podzielono na trzy grupy (tab. 13). Do grupy I zaliczono cząstki duże, o średnicy powyżej 16 nm, do grupy II – cząstki o średnicy w zakresie 11,5 – 16 nm, a grupę III stanowiły cząstki małe, o średnicy poniżej 11,5 nm. Najczęściej w rozdzielach obserwowano występowanie cząstek o ruchliwości γ o średniej wielkości, klasyfikowanych do grupy II (tab. 13).

Tabela 13. Charakterystyka nowo powstałych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE, identyfikowanych po rozdziale VLDL+LP metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE. Warunki inkubacji: 2 godz., temp. 37°C, VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30; n = 13. *W nawiasach podano ilość wyodrębnionych populacji cząstek o danej wielkości.*

Ruchliwość elektroforetyczna	Grupa cząstek	Średnica Stokesa [nm]	
		Mediana dla modalnych średnic cząstek	Zakres dla modalnych średnic cząstek (min – max)
γ	I (7)	18,20	16,75 – 22,07
	II (11)	13,66	11,73 – 14,34
	III (6)	9,25	8,58 – 11,13
$\text{pre}\beta$	I (3)	21,08	19,15 – 21,08
	II (5)	14,73	14,20 – 15,24
	III (1)	9,90	-

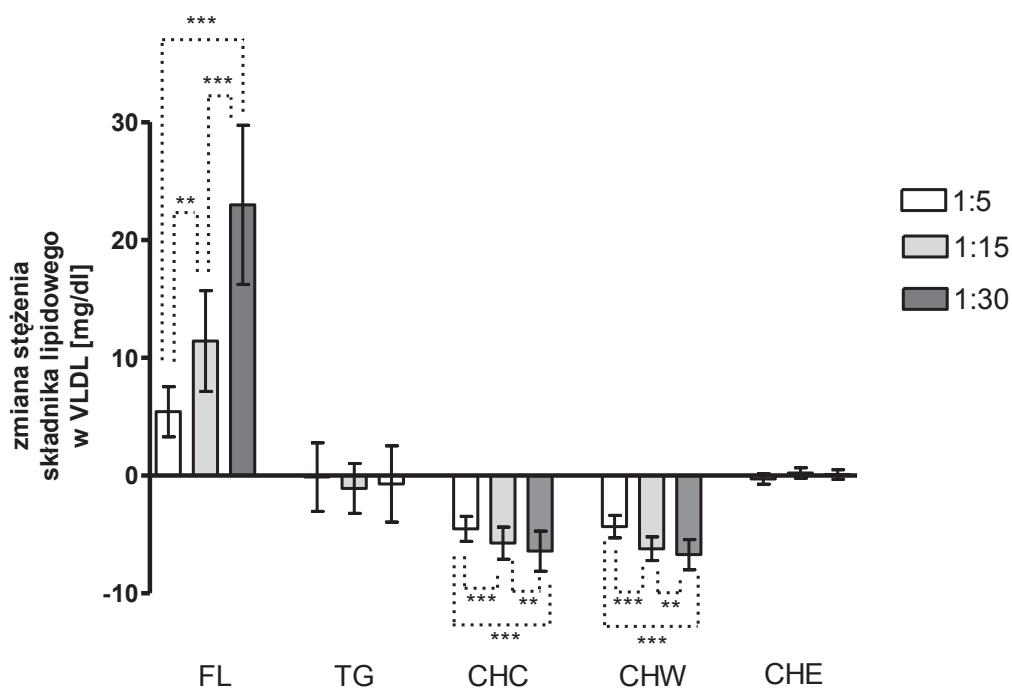
4.2. Wpływ ilości egzogennych fosfolipidów na oddziaływanie VLDL z liposomami

VLDL inkubowano z LP 2 godz. w temp. 37°C, dla trzech różnych stosunków wagowych VLDL_{FL}:LP_{FL}, odpowiednio 1:5, 1:15, 1:30. Po zakończeniu inkubacji

reakcję przerywano poprzez dodanie przeciwciał anty apoB. W supernatantach i osadach oceniano stężenie składników lipidowych. W supernatantach oznaczano stężenie apoE. Mieszanki reakcyjne poddawano rozdzielaniu metodą elektroforezy w żelu agarozowym i metodą elektroforezy dwukierunkowej (2D-PAGE).

4.2.1. Zmiany składu cząstek VLDL dla różnego stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$

Stosunek wagowy $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ wpływał na zmiany składu cząstek VLDL zachodzące pod wpływem egzogennych FL. Im więcej egzogennych FL brało udział w reakcji, tym większe zmiany obserwowano w składzie VLDL (ryc. 24).



Ryc. 24. Zmiana stężenia składników lipidowych w VLDL po reakcji z LP, dla stosunków wagowych $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5, 1:15 i 1:30; inkubacja 2 godz., temp. 37°C. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm OS, n = 8; ***p < 0,0001, **p < 0,005. FL – fosfolipidy, TG – triacyloglicerole, CHC – cholesterol całkowity, CHW – cholesterol wolny, CHE – cholesterol zestryfikowany

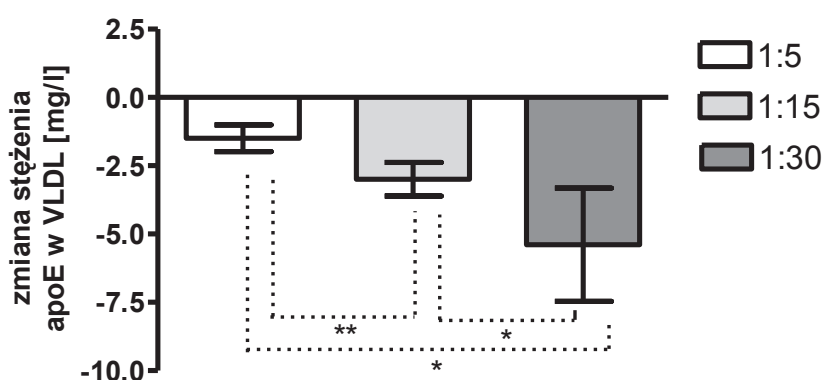
Dla badanych VLDL ($n = 8$), dla stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ odpowiednio 1:5, 1:15 i 1:30, VLDL przyjęły średnio 5,4 mg/dl, 11,4 mg/dl i 23,0 mg/dl FL, co stanowiło średnio 27%, 56% i 113% początkowej zawartości FL w VLDL.

Spadek stężenia CHC w VLDL zależał od stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ (ryc. 24). W odniesieniu do zawartości początkowej CHC, jego zawartość w VLDL po 2-godzinnej inkubacji z LP była mniejsza średnio o 33%, 41% i 46%, odpowiednio dla stosunku $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5, 1:15, 1:30. Przesunięciu ulegała tylko frakcja CHW. Po 2 godzinach inkubacji VLDL utraciły na rzecz liposomów i produktów reakcji niezawierających apoB odpowiednio średnio 65%, 96% i 100% puli CHW.

Średnie stężenie składników lipidowych przed reakcją dla badanych VLDL wynosiło 89,6 mg/dl, a po reakcji z LP: 89,8 mg/dl, 94,2 mg/dl i 106,2 mg/dl, odpowiednio dla inkubacji przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5, 1:15 i 1:30.

Dla stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5 i 1:15 lipidy powierzchniowe po reakcji z LP stanowiły średnio 31,4% i 34,0% masy lipidów VLDL, pośrednio między 30-procentową zawartością materiału powierzchniowego dla VLDL kontrolnych i 40-procentową zawartością lipidów powierzchniowych po inkubacji z LP przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30.

Wraz ze wzrostem stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$, VLDL podczas reakcji z liposomami uwalniały więcej apoE (ryc. 25).



Ryc. 25. Zmiana stężenia apoE w VLDL po reakcji z LP, dla stosunków wagowych $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5, 1:15 i 1:30; inkubacja 2 godz., temp. 37°C. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm OS, $n = 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

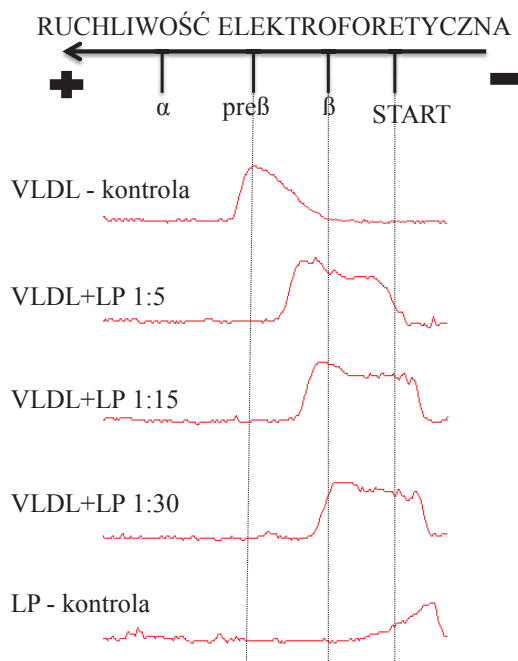
W porównaniu ze stosunkiem wagowym VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30, dla VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:15 i 1:5 utrata apoE przez VLDL po 2 godzinach inkubacji z LP była średnio 1,8-krotnie i 3,6-krotnie niższa i stanowiła odpowiednio 20% i 9,8% początkowej zawartości apoE w VLDL.

Dla badanych VLDL, stosunek molowy składników lipidowych wymienianych podczas inkubacji z LP wynosił FL:CHW 1:1,55, 1:1,07 i 1:0,56, odpowiednio dla stosunku wagowego VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:5, 1:15 i 1:30. Na 1 mol przyjętych FL VLDL traciły średnio 0,62 mmola, 0,58 mmola i 0,59 mmola apoE, odpowiednio dla VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:5, 1:15 i 1:30 (n = 4).

4.2.2. Zmiany ruchliwości cząstek VLDL dla różnego stosunku wagowego VLDL_{FL}:LP_{FL}

Po zakończeniu inkubacji przeprowadzano elektroforezę próbek badanych w żelu agarozowym, a następnie żele wybarwiano na obecność lipidów, skanowano i poddawano analizie densytometrycznej.

Ilość dodanych FL liposomów wpływała na ruchliwość cząstek VLDL (ryc. 26).



Ryc. 26. Obraz densytometryczny przykładowego rozdzielania elektroforetycznego w żelu agarozowym kontrolnych VLDL i LP oraz VLDL+LP, dla stosunków wagowych VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:5, 1:15 i 1:30, inkubacja 2 godz., temp. 37°C.

Im ilość dodanych FL była większa, tym cząstki VLDL po inkubacji z LP poruszały się wolniej w polu elektrycznym (tab. 14). Dla stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5, po zakończeniu reakcji nie obserwowano frakcji o ruchliwości zbliżonej do ruchliwości LP w rozdziale elektroforetycznym, obserwowanej dla prób $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:15 i 1:30.

Tabela 14. Ruchliwość elektroforetyczna w żelu agarozowym VLDL kontrolnych i po reakcji z LP, dla różnego stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$. *Rf* wyliczono jako procent drogi, jaką przebyła frakcja od miejsca startu w odniesieniu do drogi, jaką przebyła albumina.

Próba (stosunek wagowy $VLDL_{FL}:LP_{FL}$)	Rf [%] (średnia \pm OS, n = 4)
VLDL - kontrola	54,5 \pm 5,3
VLDL - po inkubacji z LP (1:5)	45,2 \pm 9,6* ^{#^}
VLDL - po inkubacji z LP (1:15)	37,3 \pm 6,1* [#]
VLDL - po inkubacji z LP (1:30)	31,8 \pm 4,4*

* $p < 0,05$ w stosunku do VLDL - kontrola; [#] $p < 0,05$ w stosunku do VLDL+LP 1:30; [^] $p < 0,05$ w stosunku do VLDL+LP 1:15

4.2.3. Powstawanie nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE, dla różnego stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$

Dla trzech różnych puli VLDL przeprowadzono inkubację VLDL z LP, przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5, 1:15 i 1:30. Następnie każdą z mieszanin reakcyjnych poddano rozdzielaniu metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, elektrotransferowi i immunodetekcji apoE. Rozdziały dla danej puli VLDL, dla różnych stosunków $VLDL_{FL}:LP_{FL}$, były wykonywane równolegle, aby możliwe było porównanie cząstek generowanych w danej puli VLDL pod wpływem różnej ilości egzogennych FL.

W przypadku inkubacji VLDL z LP przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5 i 1:15, podobnie jak przy stosunku wagowym 1:30, obserwowano powstawanie heterogennych populacji cząstek zawierających apoE i wyróżniono różniące się wielkością 3 populacje cząstek o ruchliwości elektroforetycznej γ oraz 3 populacje cząstek o ruchliwości β (tab. 15).

Tabela 15. Charakterystyka nowo powstałych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE, identyfikowanych po rozdziale VLDL+LP metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, po inkubacji VLDL z LP przy stosunku wagowym VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:5 i 1:15, w odniesieniu do cząstek generowanych z tych samych pul VLDL dla VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30; inkubacja 2 godz., temp. 37°C; n = 3. W nawiasach podano ilość wyodrębnionych populacji cząstek o danej wielkości.

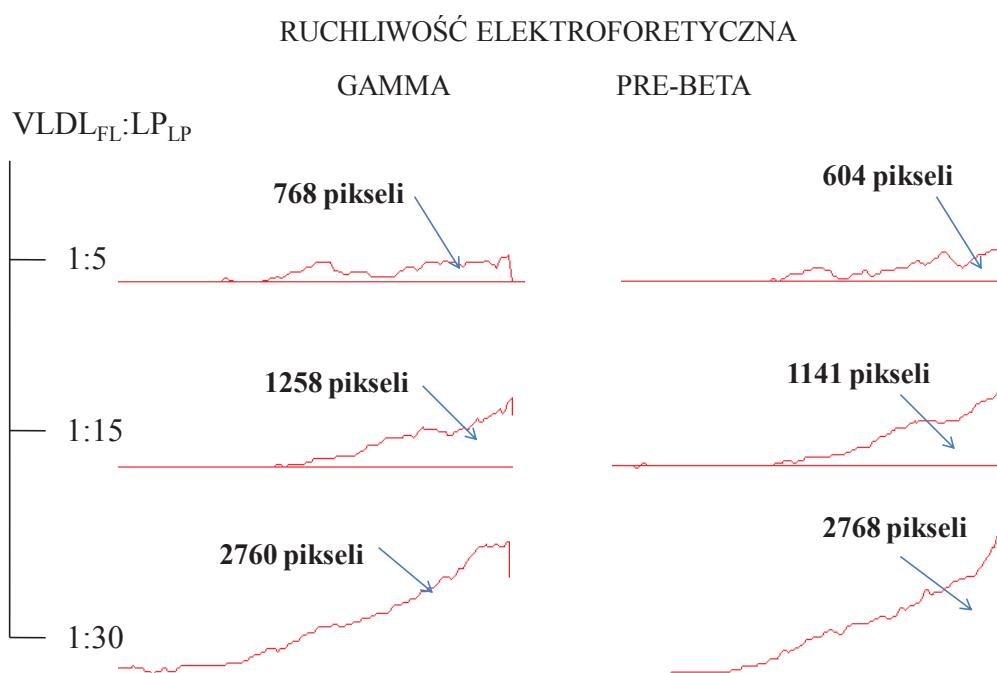
Ruchliwość elektroforetyczna	Grupa cząstek	Średnica Stokesa [nm]					
		Stosunek VLDL _{FL} :LP _{FL}					
		1:5		1:15		1:30	
	Mediana*	Zakres* (min – max)	Mediana*	Zakres* (min – max)	Mediana*	Zakres* (min – max)	
γ	I	19,4 (2)	18,4 – 20,4	20,6 (3)	16,4 – 22,7	21,7 (3)	16,4 – 22,07
	II	14,4 (2)	13,0 – 15,7	13,6 (2)	12,3 – 14,9	13,9 (2)	13,8 – 14,1
	III	10,1 (1)	-	10,9 (1)	-	8,9 (2)	8,86 – 8,92
preβ	I	18,3 (2)	15,7 – 20,9	18,6 (3)	16,3 – 22,2	20,7 (3)	16,0 – 22,7
	II	14,9 (1)	-	13,1 (2)	12,7 – 13,5	14,1 (2)	13,9 – 14,2
	III	11,0 (2)	10,2 – 11,7	10,4 (2)	9,8 – 11,0	-	-

*- mediana dla modalnych średnic cząstek; zakres dla modalnych średnic cząstek (rozdział 3.17)

Cząstki generowane po inkubacji VLDL z LP przy stosunku wagowym VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:5 i 1:15 pod względem ruchliwości elektroforetycznej i wielkości były zbliżone do cząstek powstających z tych samych VLDL przy stosunku wagowym VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30 (tab. 15).

Na podstawie obrazu densytometrycznego elektroforegramu, uzyskanego dla cząstek rozdzielanych na tym samym żelu poliakrylamidowym, przy takiej samej ilości frakcji nakładanej na żel i przy identycznym czasie ekspozycji na czynniki

wywołujące barwę na błonie PVDF stwierdzono, że stosunek wagowy $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ wpływał na wielkość powierzchni pod pikami, mierzonymi dla nowo powstałych cząstek lipoproteinowych (ryc. 27). Najmniejsze powierzchnie pod pikami, zarówno dla cząstek o ruchliwości γ , jak i $\text{pre}\beta$, uzyskano dla cząstek generowanych podczas inkubacji przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5. W porównaniu do tych warunków inkubacji, dla stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:15 powierzchnie pod pikami były większe o 64% i 88,9%, a dla stosunku $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30 o 260% i 358%, odpowiednio dla cząstek o ruchliwości elektroforetycznej γ i $\text{pre}\beta$.



Ryc. 27. Analiza densytometryczna rozdzielów $VLDL+LP$ po elektroforezie 2D-PAGE, elektrotransferze i immunodetekcji apoE. *Wielkość powierzchni pod pikami w pikselach obrazuje ilość powstających cząstek zawierających apoE, powstałych po inkubacji $VLDL$ z LP przy stosunkach wagowych $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5, 1:15 i 1:30. Wielkość powierzchni pod pikami wyznaczono za pomocą programu GelScan.*

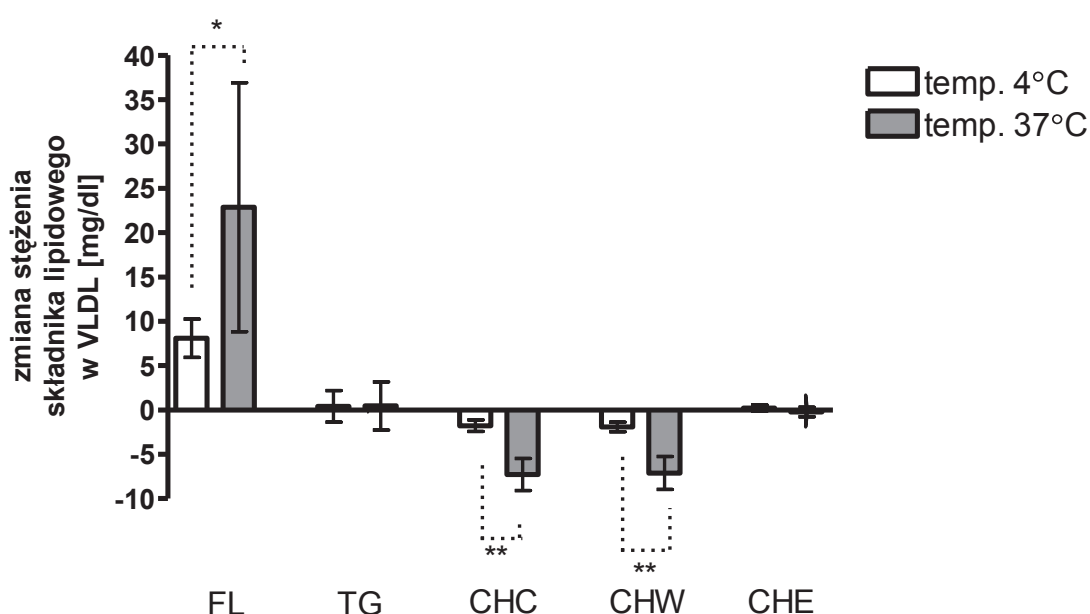
4.3. Wpływ temperatury inkubacji na reakcję $VLDL$ z liposomami

$VLDL$ inkubowano z LP 2 godz. w temp. $4^{\circ}C$ lub $37^{\circ}C$, przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30. Po zakończeniu inkubacji reakcję przerywano poprzez dodanie przeciwciał anty apoB. W supernatantach i osadach oznaczano stężenie

składników lipidowych. W supernatantach oznaczano stężenie apoE. Mieszanki reakcyjne poddawano rozdzielni metodą elektroforezy w żelu agarozowym i metodą elektroforezy dwukierunkowej (2D-PAGE).

4.3.1. Zmiany składu cząstek VLDL dla różnej temperatury inkubacji

Na rycinie 28 przedstawiono zmiany stężenia składników lipidowych w VLDL, zachodzące pod wpływem liposomów lecytynowych, w zależności od temperatury inkubacji.



Ryc. 28. Zmiana stężenia składników lipidowych w VLDL po reakcji z LP dla temperatury inkubacji 4°C i 37°C; 2 godz., VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± OS, n = 7; *p<0,05, **p<0,005, FL – fosfolipidy, TG – triacyloglicerole, CHC - cholesterol całkowity, CHW – cholesterol wolny, CHE – cholesterol zestryfikowany

Reakcja między VLDL a LP zachodziła podczas inkubacji w obu badanych temperaturach, ale w przypadku temperatury inkubacji 4°C obserwowano mniejsze zmiany w składzie VLDL.

Dla badanych VLDL, po inkubacji z LP w temperaturze 4°C, zawartość FL w VLDL zwiększyła się średnio o 7,7 mg/dl, co stanowiło 37% początkowej zawartości

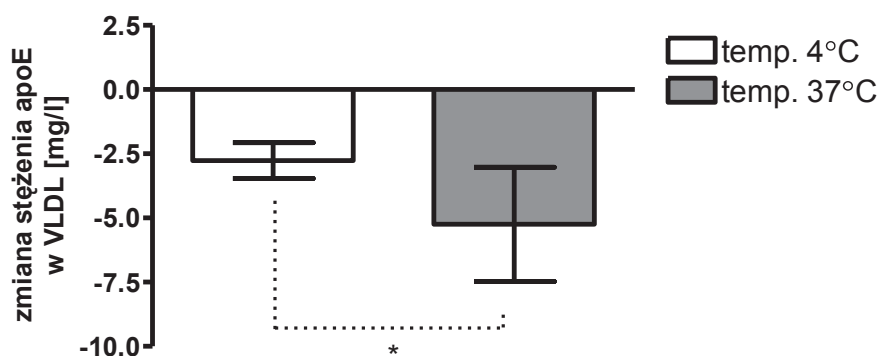
FL w VLDL. W temperaturze 37°C przyrost FL był około 3-krotnie wyższy i wyniósł średnio 22,9 mg/dl (ryc. 28).

Spadek stężenia CHC w VLDL był większy podczas inkubacji w temperaturze 37°C i wyniósł średnio 49% w odniesieniu do początkowej zawartości CHC w lipoproteinach. W temperaturze 4°C VLDL utraciły na rzecz liposomów i produktów reakcji średnio 13% puli CHC. Zmiana stężenia CHC wynikała tylko ze spadku stężenia CHW. W przypadku temperatury 4°C, po 2 godzinach inkubacji, stężenie CHW spadło średnio o 27% w stosunku do wyjściowej zawartości CHW w VLDL, podczas gdy w temperaturze 37°C spadek ten wyniósł 100%.

Średnie stężenie składników lipidowych przed reakcją dla badanych VLDL wynosiło 91 mg/dl, a po reakcji z LP 99,2 i 104,9 mg/dl, odpowiednio dla temperatury inkubacji 4°C i 37°C.

Lipidy powierzchniowe VLDL po reakcji z LP w temperaturze 4°C stanowiły średnio 34,3% zawartości lipidów, pośrednio między 30-procentową zawartością lipidów powierzchniowych w VLDL kontrolnych i 41-procentową zawartością lipidów powierzchniowych po inkubacji z LP w temperaturze 37°C.

VLDL po inkubacji w temperaturze 37°C traciły średnio 1,9-krotnie więcej apoE, w porównaniu do temperatury inkubacji 4°C (ryc. 29).



Ryc. 29. Zmiana stężenia apoE w VLDL po reakcji z LP dla temperatury inkubacji 4°C i 37°C; 2 godz., VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± OS, n = 6; *p<0,05.

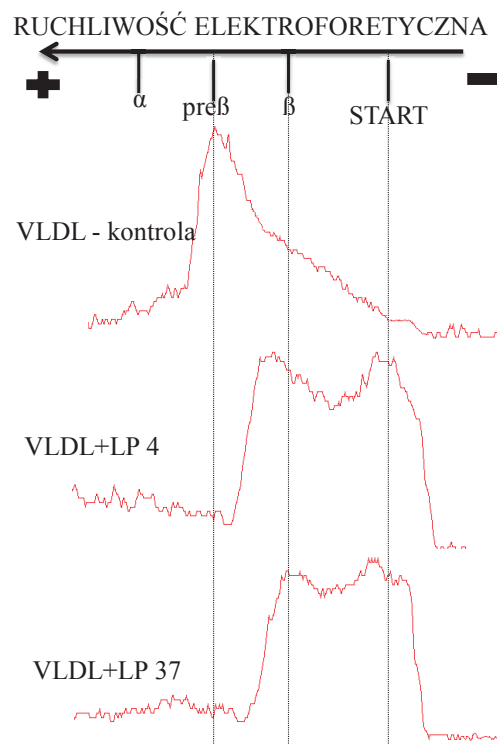
Dla badanych pul VLDL, stosunek molowy składników lipidowych wymienianych podczas inkubacji VLDL z LP wyniósł FL:CHW 1:0,41 i 1:0,53, odpowiednio dla temperatury inkubacji 4°C i 37°C. Na 1 mol przyjętych FL VLDL

traciły średnio 0,76 mmola apoE i 0,43 mmola, odpowiednio dla temperatury inkubacji 4°C i 37°C (n = 6).

4.3.2. Zmiany ruchliwości cząstek VLDL dla różnej temperatury inkubacji

Po zakończeniu inkubacji przeprowadzano rozdział prób badanych metodą elektroforezy na agarozie, a następnie żele wybarwiano na obecność lipidów.

Inkubacja VLDL z LP w obu temperaturach inkubacji wpływała na ruchliwość elektroforetyczną cząstek. W przypadku temperatury inkubacji 4°C zmiana ruchliwości elektroforetycznej VLDL była mniejsza niż w przypadku temperatury inkubacji 37°C. VLDL po reakcji z LP w temperaturze 4°C osiągały ruchliwość między β i pre β , po inkubacji w temperaturze 37°C – ruchliwość β (ryc. 30, tab. 16).



Ryc. 30. Obraz densytometryczny przykładowego rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym kontrolnych VLDL oraz mieszanin VLDL+LP, dla temperatury inkubacji 4°C i 37°C; 2 godz., $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30.

Tabela 16. Ruchliwość elektroforetyczna w żelu agarozowym VLDL kontrolnych i po reakcji z LP dla różnej temperatury inkubacji. *R_f* wyliczono jako procent drogi, jaką przebyła frakcja od miejsca startu w odniesieniu do drogi, jaką przebyła albumina.

Próba	R _f [%] (średnia ± OS, n = 6)
VLDL - kontrola	53,6 ± 4,4
VLDL - po inkubacji z LP w temp. 4°C	37,7 ± 6,1 ^{#*}
VLDL - po inkubacji z LP w temp. 37°C	32,3 ± 3,9 [#]

[#]p<0,001 w stosunku do VLDL - kontrola; *p<0,05 w stosunku do VLDL inkubowanych w temp. 37°C

4.3.3. Powstawanie nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE, dla różnej temperatury inkubacji

Dla trzech różnych puli VLDL przeprowadzono inkubację VLDL z LP w dwóch temperaturach: 4°C i 37°C. Następnie każdą z mieszanin reakcyjnych poddano rozdzielowi metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, elektrotransferowi i immunodetekcji apoE. Rozdziały dla danej puli VLDL, dla dwóch różnych temperatur inkubacji, były wykonywane równolegle, aby możliwe było porównanie cząstek generowanych przez daną pulę VLDL w różnej temperaturze.

W przypadku inkubacji VLDL z LP w temperaturze 4°C, podobnie jak w temperaturze 37°C, obserwowano powstawanie heterogennych populacji cząstek lipoproteinowych o ruchliwości γ i β . Wielkość i ruchliwość elektroforetyczna cząstek generowanych w temperaturze 4°C odpowiadała cząstkom generowanym z tych samych pul VLDL podczas inkubacji z LP w temperaturze 37°C (tab. 17).

Tabela 17. Charakterystyka nowo powstałych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE, identyfikowanych po rozdziale VLDL+LP metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, po inkubacji VLDL z LP w temperaturze 4°C, w odniesieniu do cząstek generowanych z tych samych pul VLDL podczas inkubacji z LP w temperaturze 37°C; inkubacja 2 godz., VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30; n = 3. W nawiasach podano ilość wyodrębnionych populacji cząstek o danej wielkości.

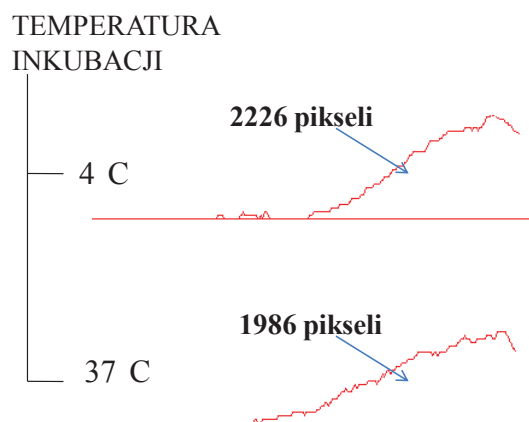
Ruchliwość elektroforetyczna	Grupa cząstek	Średnica Stokesa [nm]			
		Temperatura inkubacji			
		4°C		37°C	
		Mediana*	Zakres* (min – max)	Mediana*	Zakres* (min – max)
γ	I	18,3 (3)	16,28 – 19,66	19,95 (3)	16,15 - 20,13
	II	13,46 (1)	-	12,69 (1)	-
	III	9,66 (4)	8,59 – 10,37	8,84 (3)	8,76 – 9,45
preβ	I	20,9 (1)	-	20,01 (1)	-
	II	13,10 (1)	-	13,49 (1)	-
	III	9,89 (1)	-	8,95 (1)	-

*- mediana dla modalnych średnic cząstek; zakres dla modalnych średnic cząstek (rozdział 3.17)

Powierzchnie pod pikami dla cząstek lipoproteinowych powstających podczas inkubacji VLDL z LP w temperaturze 4°C i 37°C były porównywalne (ryc. 31). Dla cząstek rozdzielanych na tym samym żelu poliakrylamidowym, przy takiej samej ilości frakcji nakładanej na żel i przy identycznym czasie ekspozycji na czynniki wywołujące barwę, różnica w wielkości powierzchni pod pikami wyniosła 12%.

RUCHLIWOŚĆ ELEKTROFORETYCZNA

GAMMA

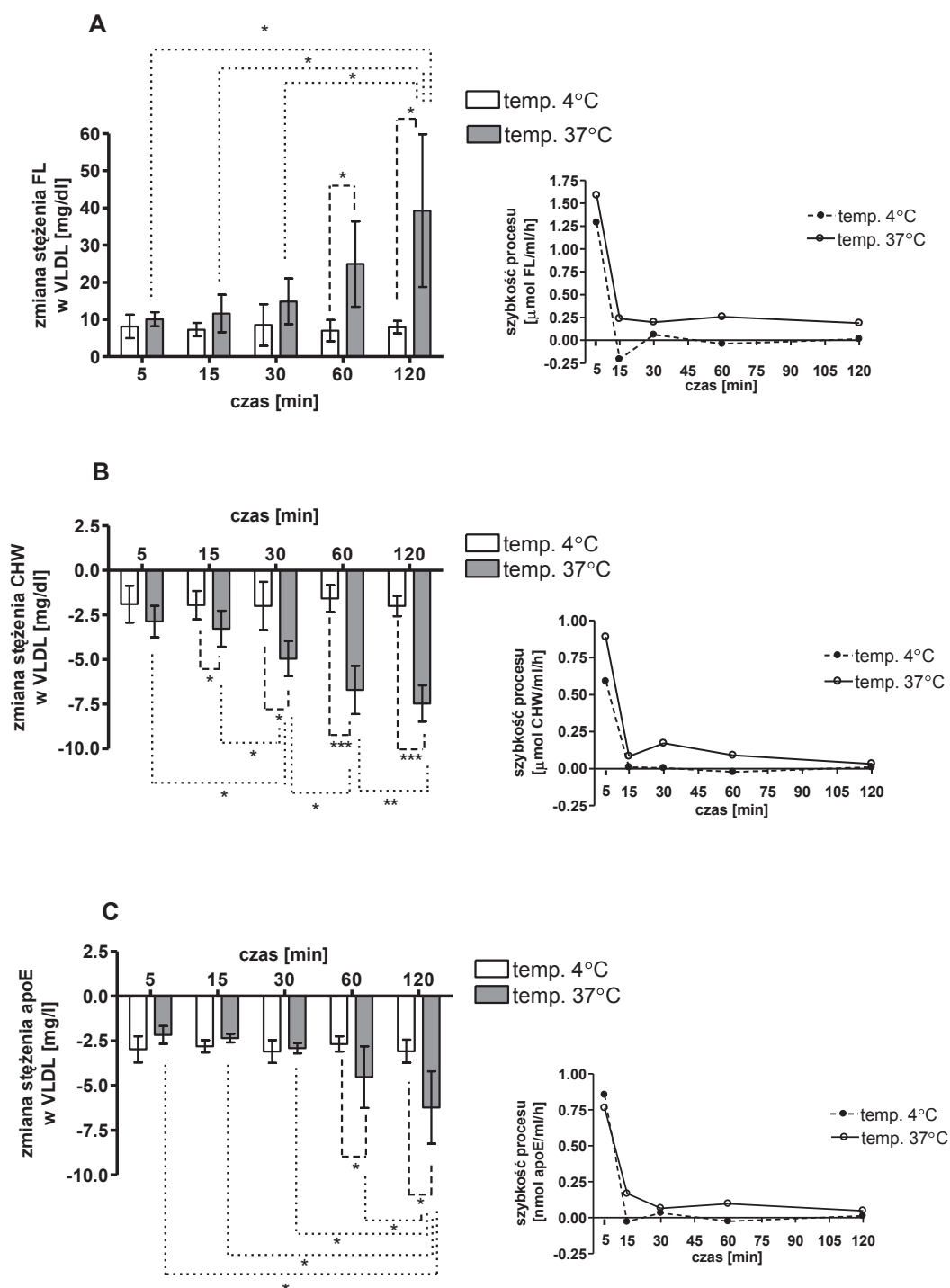


Ryc. 31. Analiza densytometryczna rozdziałów VLDL+LP po elektroforezie 2D-PAGE, elektrotransferze i immunodetekcji apoE. *Wielkość powierzchni pod pikami w pikselach obrazuje ilość cząstek zawierających apoE, powstałych po inkubacji VLDL z LP w temperaturze 4°C i 37°C. Wielkość powierzchni pod pikami wyznaczono za pomocą programu GelScan.*

4.4. Kinetyka reakcji oddziaływania VLDL z liposomami, w zależności od temperatury inkubacji

VLDL inkubowano z LP w temperaturze 4°C i 37°C, przy stosunku wagowym VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30. W określonych punktach czasowych mieszaniny reakcyjne niezwłocznie poddawano rozdzielowi metodą elektroforezy agarozowej, po czym wybarwiano na obecność lipidów lub reakcję przerywano poprzez dodanie przeciwciał anty apoB, a następnie oznaczano zawartość FL, CHW i apoE.

Przebieg reakcji VLDL z LP zależał od czasu i temperatury inkubacji (ryc. 32).



Ryc. 32. Zmiany stężenia FL (A), CHW (B) i apoE (C) oraz szybkość procesu transferu składników w zależności od czasu inkubacji, dla temperatury 4°C i 37°C; stosunek wagowy VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± OS, n = 4; *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0001.

Dla badanych puli VLDL, podczas reakcji z LP w temperaturze 4°C, w ciągu pierwszych 5 minut reakcji następowało zwiększenie zawartości FL w VLDL średnio o 8,2 mg/dl, co stanowiło średnio 33% początkowej zawartości tego składnika w VLDL. Dalszego transportu FL do VLDL wraz z czasem trwania inkubacji w tej temperaturze nie obserwowano (ryc. 32A).

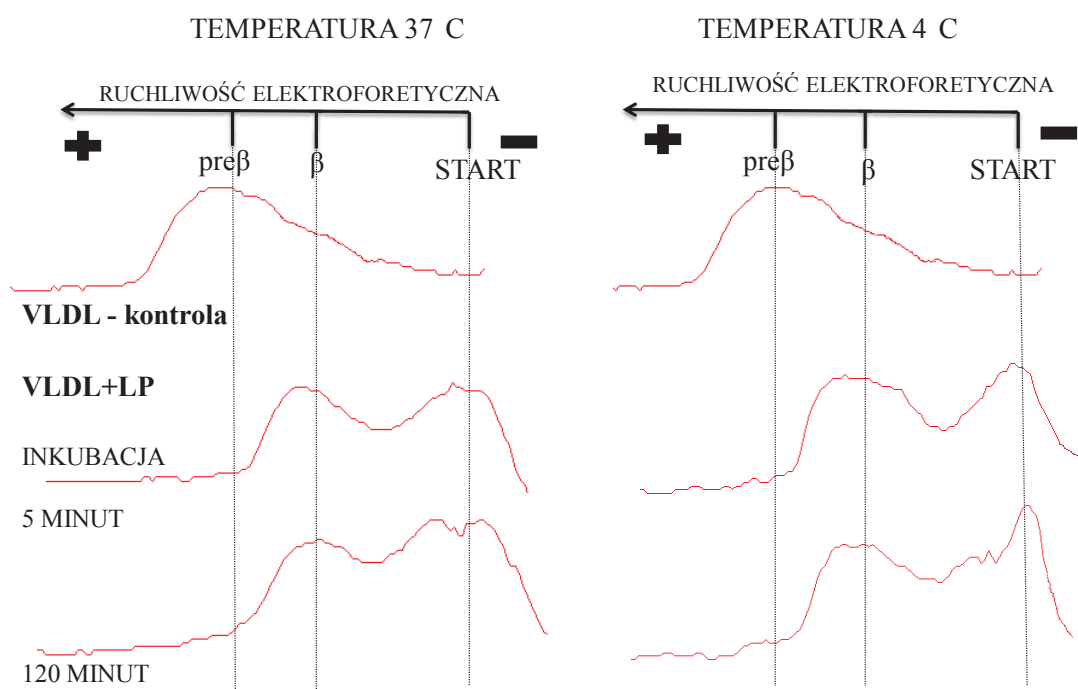
W przypadku inkubacji VLDL z LP w temperaturze 37°C, w ciągu pierwszych 5 minut reakcji następowało zwiększenie udziału FL w VLDL średnio o 46%. Na tym etapie inkubacji obserwowano największą szybkość transferu FL do VLDL. Dłuższa inkubacja skutkowała dalszym transportem FL, choć szybkość tego procesu była około 7-krotnie mniejsza niż w początkowej fazie inkubacji. Transport FL do VLDL obserwowano do końca trwania procesu inkubacji. Po 2 godz. zawartość FL w VLDL wzrosła średnio 3,2-krotnie, w odniesieniu do początkowego okresu reakcji (ryc. 32A).

Podobną dynamikę zmian obserwowano dla CHW (ryc. 32B). Podczas reakcji zachodzącej w temperaturze 4°C spadek stężenia CHW w VLDL obserwowano tylko w pierwszych 5 minutach inkubacji, podczas których VLDL utraciły średnio 24% CHW.

Dla temperatury inkubacji 37°C najwyższą szybkość procesu spadku stężenia CHW w VLDL obserwowano w początkowych 5 minutach inkubacji (ryc. 32B). Po tym okresie VLDL utraciły średnio 36% swej zawartości CHW. Wraz z czasem trwania reakcji następowała dalsza utrata CHW, choć szybkość tego procesu była mniejsza niż w początkowym okresie. Utrata cholesterolu z VLDL po 2 godzinach w temperaturze 37°C wyniosła 100%.

W przypadku apoE, w ciągu pierwszych 5 minut reakcji, VLDL utraciły w obu temperaturach średnio 13% białka (ryc. 32C). Podobnie jak w przypadku składników lipidowych, dalsza inkubacja w temperaturze 4°C nie prowadziła do dalszego spadku stężenia apoE. W przypadku temperatury 37°C utratę białka przez VLDL obserwowano przez cały okres inkubacji. Po 2 godzinach wyniosła ona średnio 36%, w odniesieniu do wyjściowej zawartości apoE w VLDL.

Zmianę ruchliwości elektroforetycznej cząstek VLDL w obu temperaturach inkubacji obserwowano już po 5 minutach od rozpoczęcia reakcji z LP. Dłuższa inkubacja nie wpływała na ruchliwość cząstek (ryc. 33).



Ryc. 33. Obraz densytometryczny przykładowego rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym kontrolnych VLDL oraz mieszanin VLDL+LP, dla temperatury 4°C i 37°C i czasu inkubacji 5 i 120 minut; VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30.

4.5. Skład i ruchliwość elektroforetyczna cząstek mieszaniny reakcyjnej rozdzielonych metodą ultrawierowania

Po zakończeniu inkubacji VLDL z LP i schłodzeniu prób do temperatury 4°C, mieszaninę reakcyjną poddawano procedurze sekwencyjnego ultrawierowania, dzięki której cząstki obecne w mieszaninie reakcyjnej rozdzielano ze względu na ich gęstość. W ten sposób uzyskano następujące frakcje: frakcję I o gęstości poniżej 1,006 g/ml zawierającą lipoproteiny VLDL, frakcję II o gęstości między 1,006 g/ml i 1,063 g/ml zawierającą liposomy i część produktów reakcji oraz frakcję III, o gęstości powyżej 1,063 g/ml, czyli gęstości odpowiadającej lipoproteinom HDL. W uzyskanych frakcjach oznaczano stężenie FL, CHC, CHW oraz stężenie apoE. Stężenie oznaczanych składników wyrażano po przeliczeniu na stężenie wyjściowe w mieszaninie VLDL+LP, uwzględniając zmiany objętości prób na etapie ultrawierowania i zagęszczania.

Rozkład stężeń oznaczanych składników pomiędzy otrzymane frakcje przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 18. Stężenie FL, CHE i CHW oraz apoE we frakcjach uzyskanych z mieszaniny reakcyjnej VLDL+LP po rozdziale metodą ultrawierowania. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm OS, n = 7.

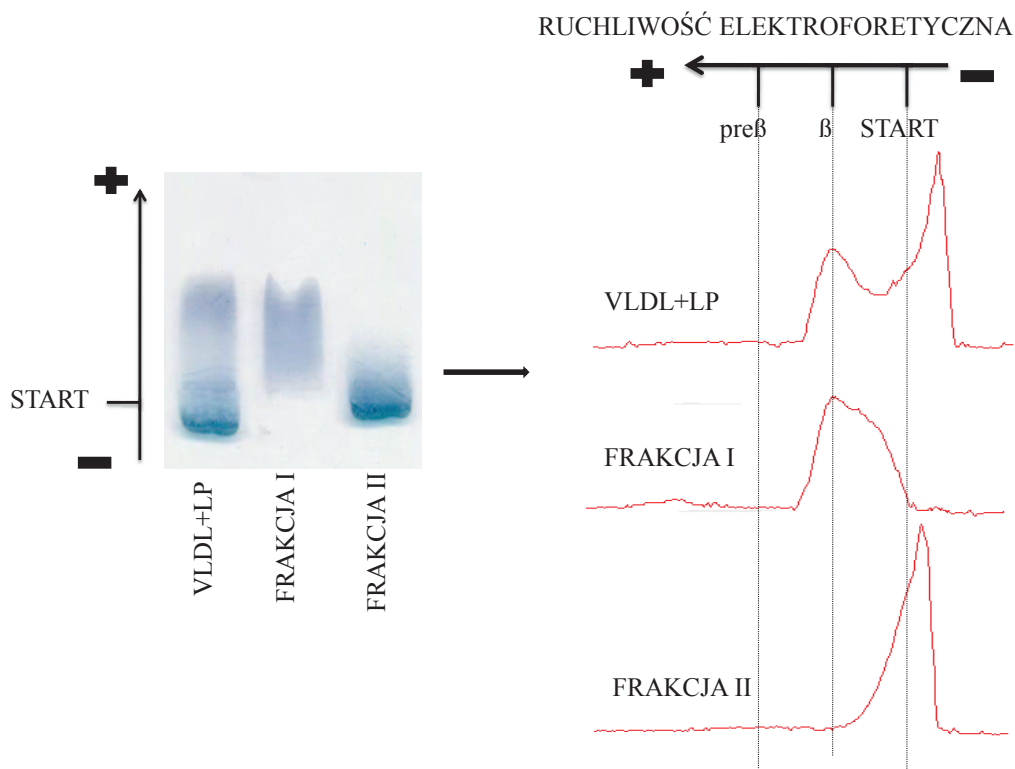
	Fracja I	Fracja II	Fracja III
Gęstość [g/ml]	< 1,006	1,006 < d < 1,063	> 1,063
FL [mg/dl]	29,3 \pm 9,3	474 \pm 80	0,97 \pm 0,61
CHE [mg/dl]	6,6 \pm 1,7	-	-
CHW [mg/dl]	-	5,9 \pm 0,90	-
apo E [mg/l]	9,9 \pm 2,1	3,3 \pm 0,99	0,20 \pm 0,056

Najwyższe stężenie FL stwierdzono we frakcji II. We frakcji tej znajdowało się średnio 94,5% FL, podczas gdy we frakcji I było średnio 5,7%, a we frakcji III średnio 0,2% FL mieszaniny inkubacyjnej (tab. 18).

Obecność CHC stwierdzono we frakcji I i II. We frakcji I znajdowało się średnio 52,1% CHC, a całą pulę stanowił CHE. We frakcji II znajdowało się średnio 47,9% CHC, a całą pulę stanowił CHW (tab. 18).

Obecność apoE stwierdzono we wszystkich frakcjach (tab. 18). Procentowy rozkład białka we frakcjach uzyskanych metodą ultrawierowania wyniósł 73,8%, 24,7% i 1,5%, odpowiednio dla frakcji I, II i III.

Na rycinie 34 przedstawiono rozdział elektroforetyczny frakcji w żelu agarozowym.



Ryc. 34. Przykładowy rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (barwienie na obecność lipidów) oraz analiza densytometryczna rozdziału dla VLDL+LP oraz frakcji I i II uzyskanych z VLDL+LP metodą ultrawierowania. Warunki inkubacji: 2 godz., 37°C, VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30. Nie przedstawiono rozdziału frakcji III, ponieważ ze względu na niskie stężenie lipidów (tab. 18) nie była ona widoczna w rozdziale.

Frakcja I posiadała ruchliwość odpowiadającą ruchliwości frakcji VLDL po inkubacji z LP (ryc. 21). Frakcja II posiadała ruchliwość odpowiadającą ruchliwości LP po reakcji z VLDL (ryc. 21).

4.6. Charakterystyka cząstek frakcji III

W nowo powstałych cząstkach frakcji III stosunek molowy składników wynosił średnio FL:apoE 2203:1.

4.6.1. Ocena ruchliwości i wielkości cząstek frakcji III metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE

Po rozdziale frakcji metodą ultrawirowania przeprowadzono rozdział cząstek uzyskanych frakcji metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, elektrotransfer cząstek na błonę PVDF i immunodetekcję apoE.

Cząstki obecne we frakcji I i II ze względu na swoją wielkość nie migrowały w żelu poliakrylamidowym niedenaturującym 2 - 25%. We frakcji III stwierdzono występowanie cząstek zawierających apoE o wielkości umożliwiającej migrację w żelu 2 - 25% (tab. 19).

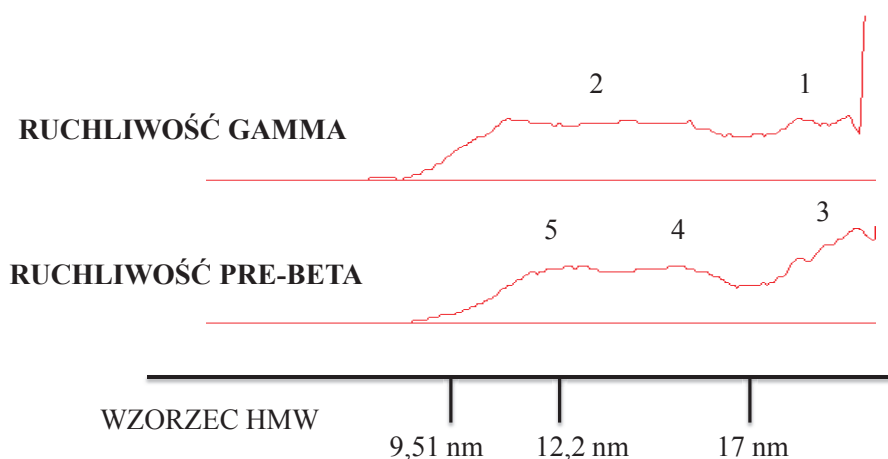
Tabela 19. Charakterystyka cząstek lipoproteinowych zawierających apoE, identyfikowanych po rozdziale frakcji III metodą 2D-PAGE, w odniesieniu do cząstek identyfikowanych dla pełnej mieszaniny reakcyjnej VLDL+LP, z których izolowano frakcję III; inkubacja 2 godz., temp. 37°C, VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30; n = 4. *W nawiasach podano ilość wyodrębnionych populacji cząstek o danej wielkości.*

Ruchliwość elektroforetyczna	Grupa cząstek	Średnica Stokesa [nm]			
		Frakcja III		VLDL+LP	
		Mediana*	Zakres* (min – max)	Mediana*	Zakres* (min – max)
γ	I	21,41 (4)	19,4 – 22,09	20,89 (3)	16,75 – 22,07
	II	14,22 (3)	14,17 – 14,54	13,98 (3)	13,96 – 14,24
	III	-	-	9,63 (3)	8,87 – 11,13
preβ	I	20,33 (4)	16,43 – 22,47	20,12 (2)	19,15 – 21,08
	II	12,59 (1)	-	14,62 (4)	14,51 – 15,24

*- mediana dla modalnych średnic cząstek; zakres dla modalnych średnic cząstek (rozdział 3.17)

Ruchliwość elektroforetyczna cząstek obserwowanych we frakcji III odpowiadała ruchliwości cząstek, obserwowanych w rozdzielach pełnych mieszanin inkubacyjnych VLDL+LP, z których to izolowano frakcje III metodą ultrawierowania. Wielkość izolowanych cząstek również odpowiadała wielkości cząstek identyfikowanych w rozdzielach pełnych mieszanin, trudniej jednak było wyodrębnić poszczególne frakcje o różnej wielkości. Obserwowano natomiast występowanie cząstek w postaci szerokiego pasma. Stwierdzono także tendencję do występowania cząstek większych (tab. 19).

Przykładowo dla pełnej mieszaniny reakcyjnej VLDL+LP, przedstawionej na rycinie 23, wyodrębniono 3 populacje cząstek o ruchliwości elektroforetycznej γ i 3 populacje o ruchliwości pre β . W rozdziale frakcji III, uzyskanej metodą ultrawierowania z tej mieszaniny inkubacyjnej, wyodrębniono 2 populacje cząstek o ruchliwości γ oraz 3 populacje cząstek o ruchliwości pre β (ryc. 35).

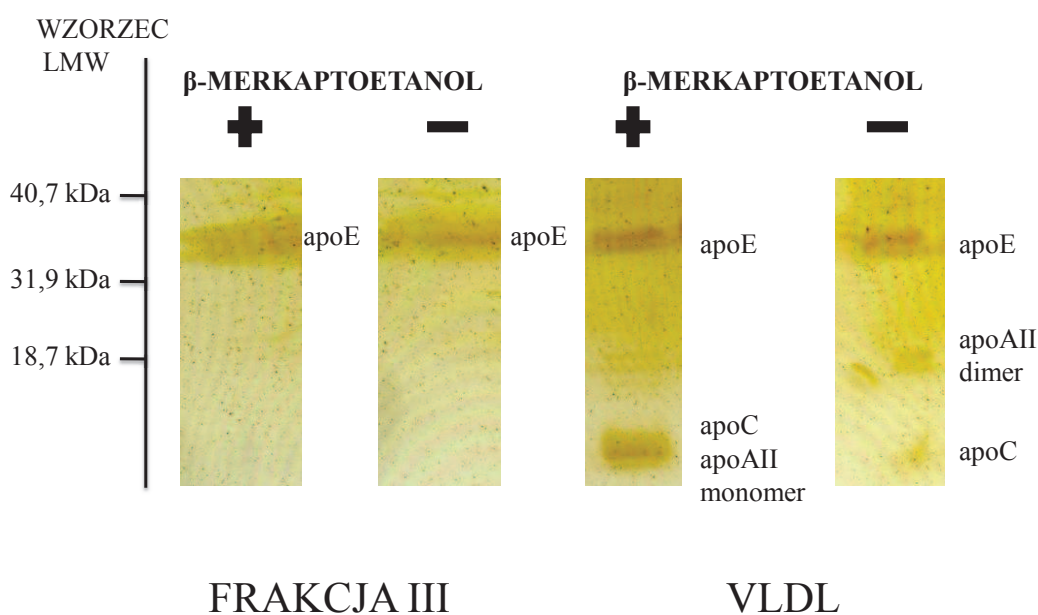


Ryc. 35. Obraz densytometryczny cząstek zawierających apoE po rozdziale frakcji III metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE. Frakcję tu przedstawioną uzyskano z mieszaniny inkubacyjnej VLDL+LP, dla której rozdziel 2D-PAGE przedstawiono na ryc. 23. Cyframi arabskimi zaznaczono wyodrębnione populacje cząstek, o modalnych średnic 21,38 nm, 14,22 nm, 22,14 nm, 16,43 nm i 12,59 nm, odpowiednio dla populacji 1, 2, 3, 4 i 5.

4.6.2. Ocena składu białkowego cząstek frakcji III

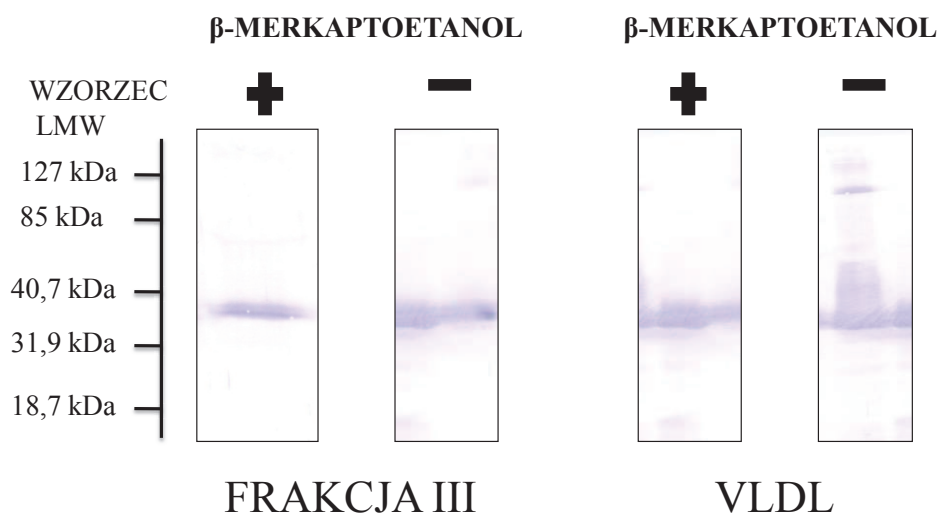
Przeprowadzono elektroforetyczny rozdział białek obecnych w VLDL i w cząstkach frakcji III ze względu na ich masę cząsteczkową. Rozdział prowadzono w żelu poliakrylamidowym 10 - 20% w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) z uprzednią redukcją i bez redukcji próbek za pomocą β -merkaptoetanolu. Żel po rozdzieleniu wybarwiano metodą barwienia srebrem lub przeprowadzono elektrotransfer białek z żelu na błonę PVDF, a następnie immunodetekcję na obecność apoE.

Zarówno w VLDL, jak i we frakcji III, stwierdzono obecność białka odpowiadającego masą cząsteczkową (m.cz.) apolipoproteinie E (ryc. 36). We frakcji III nie stwierdzono występowania obecnych w VLDL białek o m.cz. odpowiednio 18 kDa i poniżej 10 kDa, których m.cz. odpowiada w przypadku próbki nieredukowanej odpowiednio dimerowi apoAII (m.cz. 18 kDa) i białkom z rodziny apoC (m.cz. około 10 kDa), a monomerowi apo AII (m.cz. 8 kDa) i białkom z rodziny apoC w przypadku zastosowania warunków redukujących (ryc. 36).



Ryc. 36. Przykładowy rozdział białek frakcji III, w porównaniu do rozdzielenia białek VLDL, po rozdzieleniu w 10 - 20% żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE bez lub po redukcji próbek za pomocą β -merkaptoetanolu, po wybarwieniu srebrem.

Obecność apoE potwierdzono metodą immunochemiczną po uprzednim przeniesieniu białek na błonę PVDF (ryc. 37). W cząstkach VLDL apoE występowała w postaci monomeru o średniej m.cz. $36,3 \pm 3,42$ kDa oraz w postaci homodimeru o m.cz. $100,2 \pm 14$ kDa. W przypadku frakcji III stwierdzono obecność monomeru apoE o średniej m.cz. $38,7 \pm 1,13$ kDa ($n = 3$).



Ryc. 37. Reprezentatywny obraz po immunodetekcji apoE, po rozdziale białek frakcji III i VLDL metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym denaturującym (SDS-PAGE) 10 – 20%, po uprzedniej redukcji lub bez redukcji prób za pomocą β -merkaptanoetanolu.

4.6.3. Ocena gęstości cząstek frakcji III

W celu oceny gęstości cząstek, wyizolowaną frakcję III doprowadzano do gęstości 1,21 g/ml i wirowano, a następnie frakcje o gęstości poniżej (frakcja IIIA) i powyżej (frakcja IIIB) 1,21 g/ml rozdzielano poprzez cięcie probówki. Frakcje zagęszczano w aparacie Amicon, a następnie oznaczano w nich stężenie FL i apoE. Wyniki wyrażono po przeliczeniu uwzględniającym zmiany objętości na etapie preparatyki próbek.

Cała pula FL i apoE znajdowała się we frakcji o gęstości poniżej 1,21 g/ml (tab. 20) co dowodzi, że nowo powstałe cząstki posiadają gęstość w zakresie 1,063 – 1,21 g/ml, charakterystyczną dla frakcji HDL.

Tabela 20. Stężenie FL i apoE we frakcji IIIA i IIIB po rozdzieleniu frakcji III metodą ultrawierowania. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm OS, n = 3.

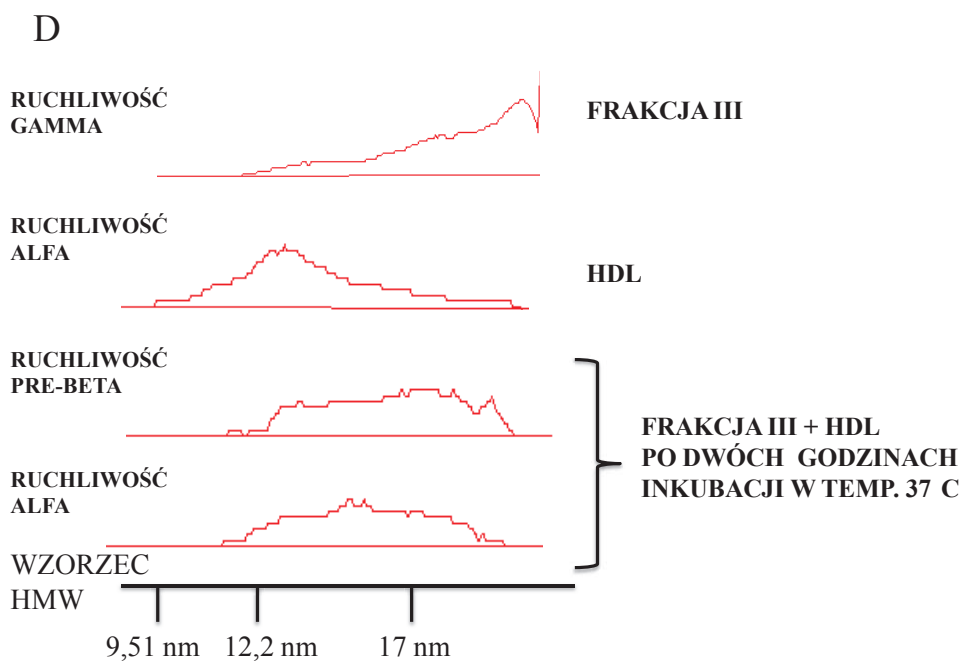
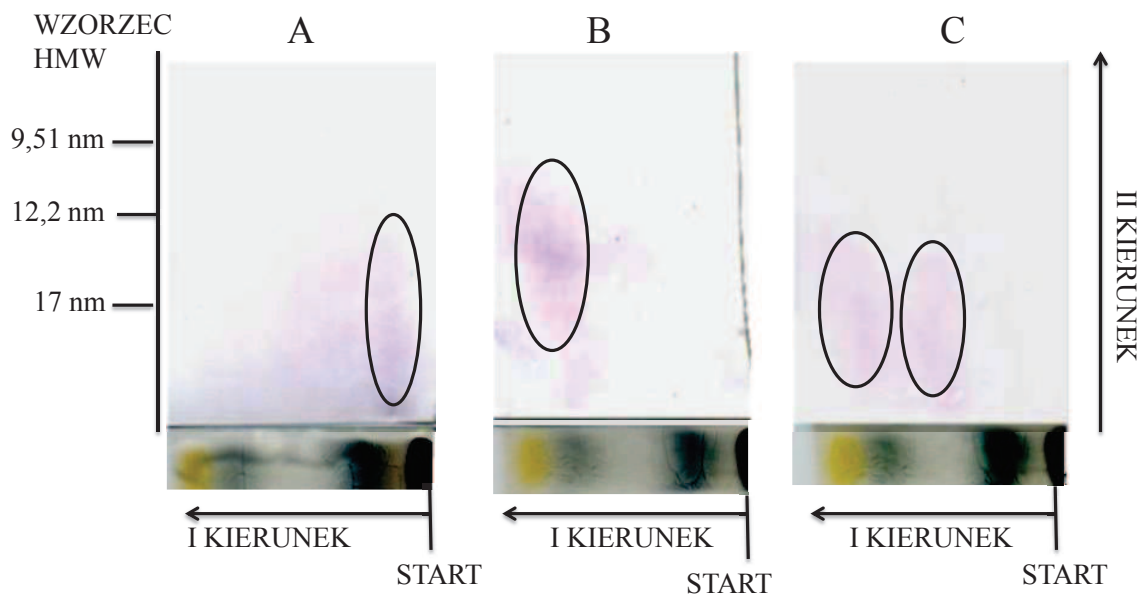
	Frakcja IIIA	Frakcja IIIB
Gęstość [g/ml]	< 1,21	> 1,21
FL [mg/dl]	0,86 \pm 0,59	0
apoE [mg/l]	0,12 \pm 0,05	0

4.7. Oddziaływanie cząstek frakcji III z HDL

Wyizolowaną frakcję III inkubowano z HDL przez 2 godz. w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji przeprowadzono rozdział mieszaniny reakcyjnej metodą elektroforezy dwukierunkowej 2D-PAGE, elektrotransfer oraz immunodetekcję apoE.

Stwierdzono występowanie oddziaływania między obecnymi we frakcji III cząstkami o ruchliwości γ a cząstkami HDL surowicy (ryc. 38).

W wyizolowanej frakcji III (ryc. 38A) przed reakcją z HDL wyodrębniono dwie populacje cząstek o ruchliwości γ , o modalnych średnicach 22,09 i 14,54 nm. We frakcji HDL (ryc. 38B) obecne były cząstki o ruchliwości α , o modalnej średnicy 12,52 nm. Po zakończeniu inkubacji w mieszaninie reakcyjnej nie stwierdzono obecności cząstek o ruchliwości elektroforetycznej γ (ryc. 38C). Stwierdzono natomiast obecność populacji cząstek o ruchliwości elektroforetycznej β , o modalnej średnicy 19,37 nm oraz cząstek o ruchliwości α , o średnicach większych niż w przypadku cząstek obecnych w HDL przed reakcją (ryc. 38B), o modalnej równej 14,5 nm.



Ryc. 38. Obecność cząstek zawierających apoE we frakcji III (A), HDL (B) i mieszaninie reakcyjnej: frakcja III+HDL po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C (C), po rozdziale metodą 2D-PAGE; D - analiza densytometryczna obrazów A, B i C.

5. DYSKUSJA

Miażdżyca i jej powikłania są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie [20]. Kluczem do zrozumienia patogenezy tej choroby jest obciążenie komórek CH, dostarczonym przez lipoproteiny LDL i remnanty CHM i VLDL. Jako że komórki tkanek obwodowych ssaków potrafią syntetyzować CH, a nie potrafią go degradować, efektywny mechanizm usuwania jego nadmiaru z komórek na drodze RCT mediowanego przez lipoproteiny HDL jest niezbędny do zapobiegania i hamowania rozwoju miażdżycy [81].

Kluczowe znaczenie ma pierwszy etap RCT, czyli wychwyt CH z komórek, szczególnie z makrofagów. Proces ten przebiega na drodze różnych mechanizmów i angażuje różne podfrakcje HDL (tab. 5). Choć największy udział w RCT przypisuje się cząstkom HDL zawierającym apoAI, to wiadomo, że lipoproteiny te stanowią heterogenną grupę cząstek i także inne podfrakcje HDL, zawierające inne apolipoproteiny, biorą udział w RCT [74]. Do populacji HDL zaangażowanych w RCT zalicza się cząstki zawierające apoE jako jedyny składnik białkowy, o ruchliwości elektroforetycznej γ [35]. O potencjalnie dużym znaczeniu tej populacji lipoprotein mogą świadczyć wyniki badań na liniach komórkowych, w których wykazano, że frakcja ta jest bardziej efektywna w odbieraniu CH komórkowego niż pre β -LpAI [88, 89]. Cząstki γ -LpE występują w osoczu w bardzo niskim stężeniu, a ich metabolizm jest bardzo szybki, co powoduje, że drogi ich powstawania i metabolizmu nie są nadal dokładnie poznane [29, 42].

Fosfatydylocholina jest głównym składnikiem fosfolipidowym błon komórkowych, a jednocześnie kluczowym, cholesterofilowym składnikiem HDL, determinującym efektywność usuwania CH komórkowego. Jest również donorem reszt acylowych do reakcji estryfikacji CH katalizowanej przez LCAT. Cavusoglu wykazał, że stężenie FL w osoczu jest silnym i niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia nagłego zdarzenia sercowo-naczyniowego (w tym zakończonego śmiercią) u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym [9]. Stwierdzono również, że zdolność HDL do promowania usuwania CH komórkowego lepiej koreluje z zawartością FL niż apoAI, a stężenie FL w HDL koreluje odwrotnie do ostrości choroby niedokrwiennej serca ocenionej angiograficznie [12, 86].

Podjęmowane są więc próby zwiększania stężenia FL w ustroju, a jedną z potencjalnych grup leków o działaniu przeciwmiażdżycowym są liposomy fosfatydylocholinowe [18, 67, 68, 86]. Nie są jednak nadal do końca poznane mechanizmy przemian, jakie następują w osoczu po wprowadzeniu liposomów [2, 72, 91]. Najwięcej uwagi poświęcono oddziaływaniu HDL z liposomami oraz udziałowi apoAI w tym procesie [27, 55, 83, 91, 98], ale istnieją doniesienia, że i inne lipoproteiny oraz apolipoproteiny również oddziałują z liposomami.

Tylko nieliczne prace naukowe zwracają uwagę na fakt, że stężenie γ -LpE w osoczu zwiększa się po dodaniu egzogennych FL [28, 40]. Nie wykazano jednakże do tej pory, które ze struktur osocza uczestniczą w powstawaniu γ -LpE. Z badań przeprowadzonych na rHDL-apoE wynika, że osoczym źródłem γ -LpE raczej nie będą cząstki HDL, ponieważ wykazano, że podczas ich przemian nie następuje dysocjacja apoE [75, 78]. Również von Eckardstein wykazał, że przemiany HDL pod wpływem PLTP skutkują powstawaniem pre β -HDL, ale nie γ -LpE [90]. Krimbou wnioskował, że osoczym źródłem γ -LpE mogą być lipoproteiny bogate w TG [42]. Nie istniały jednak do tej pory dowody naukowe potwierdzające tą tezę.

Taki stan wiedzy stał się podstawą do przeprowadzenia badań będących tematem niniejszej rozprawy doktorskiej. Ich głównym celem była ocena, czy przemiany cząstek VLDL następujące pod wpływem liposomów lecytynowych mogą być źródłem powstawania cząstek γ -LpE.

W badaniach wykorzystano lipoproteiny VLDL izolowane metodą ultrawierowania z surowic pulowanych. Zastosowano tzw. „bardzo szybkie ultrawierowanie”, gdzie próbki poddaje się wirowaniu przez krótki czas (1,5 godz.) przy wysokich wartościach krotności przyspieszenia ziemskiego (541 000 x g). Takie warunki, wg badań naukowych, nie wpływają na zmiany struktury cząstek i nie prowadzą do utraty apolipoprotein wymienialnych z powierzchni lipoprotein podczas ultrawierowania, w odróżnieniu do procedury ultrawierowania przy zastosowaniu długiego czasu (24 - 48 godz.) i niższych krotności przyspieszenia ziemskiego (np. 285 000 x g) [8, 66].

VLDL izolowano z surowic pulowanych o fizjologicznych stężeniach lipidów (tab. 6). Skład lipidowy, zawartość apoE i apoB oraz ruchliwość elektroforetyczna izolowanych VLDL odpowiadały lipoproteinom VLDL, izolowanym metodą ultrawierowania przez innych badaczy [8, 54].

W prezentowanej pracy nie oceniano wpływu polimorfizmu apoE na potencjał tworzenia γ -LpE. Zależność ta będzie przedmiotem dalszych badań. Biorąc natomiast pod uwagę wyniki badań populacyjnych, w których stwierdza się, że około 60% populacji posiada genotyp apoE3/apoE3, około 12% populacji - genotyp apoE2/apoE3 i 21% - genotyp apoE3/apoE4 można przyjąć, że w surowicach pulowanych, pochodzących od osób zdrowych, dominującą izoformą apoE była izoforma apoE3 [45, 69].

VLDL dializowano do buforu fosforanowego (*rozdział 3.2.1*), dla którego Guha stwierdziła wysoką stabilność VLDL, nawet do 7 dni [25]. Reakcję VLDL z LP przeprowadzano niezwłocznie po zakończeniu dializy. Wszystkie procedury przygotowawcze przeprowadzano w temperaturze 4°C, a surowic, VLDL oraz mieszanin reakcyjnych nie poddawano mrożeniu do czasu rozdzielania składników mieszaniny reakcyjnej. Takie postępowanie miało zapobiec ewentualnej redystrybucji składników lipoprotein podczas przechowywania próbek [42].

Podstawowym stosunkiem wagowym VLDL_{FL}:LP_{FL}, zastosowanym w prezentowanej pracy, był stosunek 1:30 [92]. Końcowe stężenie FL liposomów w mieszaninie reakcyjnej VLDL+LP dla tego stosunku wagowego wynosiło 740 ± 114 mg/dl (średnia \pm OS, n = 26). Odpowiada to stężeniu FL liposomów, uzyskiwanemu w osoczu zwierząt po dożylnym podaniu FL. Biorąc bowiem pod uwagę dawkę podawanych FL: 30 – 40 mg/100 g masy ciała oraz objętość osocza u tych zwierząt około 4 ml/100 g masy ciała, to stężenie FL liposomów w osoczu po podaniu wynosiło 750 – 1000 mg/dl [12, 47, 72, 92]. W badaniu prowadzonym u ludzi pacjentom podawano dożylnie 2 lub 8 g FL [2]. Przyjmując za średnią masę ciała dorosłego człowieka 75 kg i 4,5% tej masy jako procent zawartości osocza [3], to końcowe stężenie FL liposomów w osoczu po ich infuzji wynosiło od około 60 mg/dl do 240 mg/dl. Tym stężeniom odpowiadają stężenia końcowe FL liposomów w mieszaninach VLDL+LP, uzyskane dla zastosowanych w prezentowanej pracy stosunków wagowych VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:15 i 1:5, które wyniosły odpowiednio 388 ± 72 mg/dl i 130 ± 23 mg/dl (średnia \pm OS, n = 8).

W pierwszym etapie pracy oceniono wpływ liposomów lecytinowych na skład cząstek VLDL. Cel ten zrealizowano, wykorzystując do rozdziału VLDL od liposomów i innych produktów reakcji metodę immunoprecypitacji z przeciwciałami anty apoB.

Obecność egzogennych FL wpływała na skład lipidowy cząstek VLDL (ryc. 18). Po reakcji następował wzrost stężenia FL oraz spadek stężenia CHW w VLDL. Nie stwierdzono natomiast wpływu egzogennych FL na zawartość lipidów rdzenia lipoprotein: TG i CHE. Po 2 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C, przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30, VLDL zwiększyły swoją zawartość FL średnio o około 100% i utraciły całą pulę CHW. Skutkiem zmian zawartości tych składników był całkowity wzrost stężenia lipidów oraz wzrost procentowego udziału lipidów stanowiących materiał powierzchniowy z 30% do 40% masy lipidów (ryc. 19). Zmiany te jednakże nie prowadziły do dezintegracji cząstek, co potwierdza możliwość izolowania VLDL przy zastosowaniu metody immunoprecypitacji (rozdział 3.6) lub ultrawierowania (rozdział 3.8).

Nie stwierdzono zależności zmian stężenia FL w VLDL na skutek dodania LP od wyjściowego składu lipidowego oraz zawartości apoB i apoE w VLDL. Obserwowano natomiast dużą zmienność w potencjale różnych puli VLDL do przyjmowania FL (ryc. 18). Możliwe, że na potencjał ten wpływają własności cząstek VLDL. Lipoproteiny VLDL stanowią bowiem heterogenną grupę cząstek, w obrębie której wyróżnić można podfrakcje różniące się wielkością, gęstością i zawartością apolipoprotein. Metoda ultrawierowania umożliwia rozdzielenie VLDL na dwie główne podfrakcje: $VLDL_1$ o stałej flotacji (S_f) 60 - 400 i $VLDL_2$ o S_f 20 - 60. W porównaniu do $VLDL_1$ cząstki $VLDL_2$ są mniejsze, zawierają więcej CHE, mniej TG i charakteryzują się niższym stosunkiem apolipoprotein wymiennalnych (apoE i apoC) do apoB [63]. U osób zdrowych dominuje podfrakcja $VLDL_2$. U osób z hipertriglicydemią lub w przypadku insulinooporności dominuje podfrakcja bogatych w TG $VLDL_1$ [17]. Dalsze badania przeprowadzone na VLDL izolowanych z jednoimiennych surowic o różnym stężeniu lipidów oraz frakcjonowanie VLDL na podfrakcje umożliwi ocenę wpływu czynników odpowiadających za podatność VLDL na przemiany pod wpływem egzogennych FL.

Na skutek reakcji z liposomami VLDL traciły apoE na rzecz liposomów i pozostałych produktów reakcji niezawierających apoB. Podczas 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30, VLDL traciły średnio 27% swojej puli apoE (ryc. 18). Ten wynik jest zgodny z wynikami badań Guo, który wykazał, że apoE jest główną apolipoproteina obecna w liposomach po inkubacji VLDL z liposomami [27].

Wzrost stężenia FL w VLDL korelował ze stężeniem CHW i apoE traconych przez VLDL podczas reakcji z liposomami (ryc. 20).

Zmiany w składzie lipidowym i białkowym VLDL wpływały na ich własności fizyczne, co przejawiało się zmniejszeniem ruchliwości elektroforetycznej cząstek (ryc. 21). Dla stosunku $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30, po reakcji z liposomami, VLDL osiągały ruchliwość elektroforetyczną β (tab. 12). Zmianę ruchliwości elektroforetycznej cząstek obserwowaną po wybarwieniu frakcji czernią sudanową potwierdza immunodetekcja apoB i apoE wykonana po transferze lipoprotein na błonę PVDF, gdzie wyraźnie widać, że frakcja zawierająca apoB znajduje się na wysokości odpowiadającej ruchliwości β (ryc. 21). Obecność apoE stwierdzono w szerszym zakresie – od punktu nałożenia do frakcji o ruchliwości β . Taki rozkład apolipoprotein po rozdziale elektroforetycznym potwierdza, że apoE zostaje uwolniona z VLDL i przemieszcza się do frakcji niezawierających apoB. Zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej lipoprotein na skutek reakcji z liposomami obserwował również Mendez [55].

Po reakcji z liposomami VLDL uzyskiwały ruchliwość β , charakterystyczną dla β -VLDL występujących u osób z hiperlipoproteinemią typu III wg klasyfikacji Fredricksona lub pojawiającej się u zwierząt karmionych dietą bogatą w CH. Jednakże β -VLDL zawierają mniej TG i więcej CHE w stosunku do fizjologicznych VLDL [6], co nie odpowiada składowi VLDL uzyskanych po inkubacji z liposomami (ryc. 19). Zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej cząstek nie jest więc spowodowane przekształceniem VLDL w aterogenne β -VLDL. Zmniejszenie ruchliwości wynika tutaj najprawdopodobniej ze zmniejszenia ładunku cząstek na skutek spadku stężenia białka oraz zwiększenia rozmiarów cząstek na skutek wzrostu zawartości lipidów, czyli wzrostu stosunku lipidy/białko w lipoproteinach.

Zmiany składu lipidowego i białkowego VLDL zależały od ilości egzogennych FL biorących udział w reakcji oraz od temperatury i czasu inkubacji.

Im mniej egzogennych FL brało udział w reakcji, tym zmiany obserwowane w składzie VLDL były mniejsze (ryc. 24). Dla stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5 i 1:15, VLDL przyjmowały odpowiednio średnio 4,2-krotnie i 2,0-krotnie mniej FL niż podczas inkubacji przy stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30. Podczas inkubacji przy zastosowaniu niższych stosunków wagowych FL, utrata CHW przez VLDL również była mniejsza, choć różnice tutaj obserwowane nie były tak duże jak w przypadku FL. W przypadku stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5 i 1:15, VLDL

traciły średnio o 35% i 4% mniej CHW niż podczas inkubacji przy stosunku 1:30. CHW ulegał bowiem uwolnieniu z VLDL do wyczerpania swojej puli. Proporcjonalnie do zmian stężenia FL, w zależności od stosunku wagowego $VLDL_{FL}:LP_{FL}$, obserwowano natomiast zmiany stężenia apoE w VLDL (ryc. 25). Średnia utrata apolipoproteiny dla $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:5 i 1:15 była odpowiednio 3,6-krotnie i 1,8-krotnie niższa niż dla $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ 1:30. Przy niższym stosunku wagowym $VLDL_{FL}:LP_{FL}$ ruchliwość elektroforetyczna VLDL była większa niż dla stosunku 1:30, ale mniejsza niż dla VLDL kontrolnych (ryc. 26), co potwierdza, że zmiany stosunku FL/białko są przyczyną zmniejszenia ruchliwości cząstek.

Zmiany VLDL zachodzące pod wpływem egzogennych FL zależały także od temperatury inkubacji (ryc. 28). W temperaturze 37°C VLDL przyjmowały średnio 3-krotnie więcej FL i traciły na rzecz liposomów i innych produktów reakcji średnio 3,7-krotnie więcej CHW oraz prawie 2-krotnie więcej apoE niż w temperaturze 4°C. Wzrost całkowitego stężenia lipidów VLDL oraz wzrost udziału lipidów materiału powierzchniowego obserwowano dla obu temperatur inkubacji. Dla obu temperatur inkubacji obserwowano też zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej, a zmiana ta była tym większa, im większe zmiany w składzie VLDL nastąpiły na skutek reakcji z liposomami (ryc. 30). O tym, że reakcja lipoprotein z liposomami zachodzi także w niskiej temperaturze świadczą wyniki badań Jiana, który po inkubacji FL z surowicą stwierdził wzrost zdolności tej surowicy do usuwania CH z komórek, choć zdolność ta po inkubacji w temperaturze 0°C była niższa niż po inkubacji w temperaturze 37°C [36].

Dla obu temperatur inkubacji transfer FL do VLDL oraz CHW i apoE z VLDL był najefektywniejszy w początkowym okresie inkubacji, w ciągu 5 minut od rozpoczęcia reakcji (ryc. 32). W przypadku inkubacji w temperaturze 37°C dla transferu FL i apoE można wyróżnić dwie fazy reakcji. Pierwszą, w początkowym okresie reakcji (do 5 minuty), gdzie szybkość transferu składników była wysoka i drugą fazę – od 5 do 120 minuty, gdzie transfer następował, ale jego szybkość utrzymywała się na względnie stałym poziomie i była średnio 7,2-krotnie niższa dla FL i 7,9-krotnie niższa dla apoE niż w początkowym okresie reakcji (ryc. 32). Dla CHW również można wyróżnić fazę szybkiego transferu w pierwszym etapie reakcji, natomiast w drugim okresie nie obserwowano stałej szybkości reakcji, a jej spadek. Przyczyną tego było wyczerpywanie puli CHW w VLDL. Po 120 minutach inkubacji nie obserwowano

już transferu CHW do liposomów i produktów reakcji (ryc. 32). Dla temperatury inkubacji 4°C transfer FL, CHW i apoE stwierdzono tylko w początkowym okresie reakcji - do 5 minuty inkubacji. Zmiana ruchliwości elektroforetycznej cząstek VLDL w obu temperaturach następowała już po 5 minutach inkubacji VLDL z liposomami i nie stwierdzono, aby dłuższy czas inkubacji wpływał na ten parametr (ryc. 33). Możliwe jest, że pierwsza, szybka faza reakcji zachodzi błyskawicznie po zmieszaniu składników i trwa ona krócej niż 5 minut. Bardzo szybką reakcję liposomów z lipoproteinami osocza obserwowali też inni badacze [27, 99].

Oddziaływanie pomiędzy VLDL i liposomami posiada wiele cech charakterystycznych dla interakcji obserwowanej pomiędzy HDL i liposomami. Należą do nich: wzrost zawartości FL, spadek zawartości CHW, utrata apolipoprotein oraz brak wpływu obecności liposomów na zawartość lipidów rdzenia lipoprotein (TG i CHE) [73, 84, 98], występowanie korelacji między wzrostem zawartości FL a spadkiem zawartości składników (CHW i apo) w lipoproteinach po reakcji z liposomami [98], wzrost stosunku FL/białko w lipoproteinach [36], zależność obserwowanych zmian w składzie i własnościach lipoprotein od temperatury i czasu inkubacji [27], jak również wzrost zawartości FL w lipoproteinach zależny od dawki egzogennych FL [98] i dwufazowy przebieg reakcji transferu FL do lipoprotein w temperaturze 37°C [99]. Można zatem postawić hipotezę, że w interakcji liposomów z różnymi klasami lipoprotein udział odgrywają podobne mechanizmy.

Transport FL z liposomów do lipoprotein osocza wynika z transferu spontanicznego opartego na oddziaływaniu fizykochemicznym cząstek oraz z oddziaływania PLTP [99]. W osoczu PLTP związana jest głównie z lipoproteinami zawierającymi apoAI. Niewielką aktywność PLTP ($3 \pm 2\%$ aktywności całkowitej) stwierdzono natomiast we frakcji VLDL+LDL, wyizolowanej metodą chromatografii sitowej [11]. W VLDL uzyskanych metodą ultrawierowania obecności PLTP nie stwierdzono, najprawdopodobniej ze względu na utratę białka z powierzchni lipoprotein podczas ultrawierowania i jego przemieszczenie się do frakcji o gęstości powyżej 1,21 g/ml [61]. Obserwowano to jednak po zastosowaniu długiego czasu wirowania (kilkanaście godzin), podczas gdy w przeprowadzonych badaniach zastosowano „bardzo szybką metodę ultrawierowania”, gdzie nie obserwuje się znamiennych różnic w stężeniu białka w lipoproteinach po ultrawierowaniu [66]. Nie można więc wykluczyć śladowej obecności PLTP i jego wpływu na transfer FL,

ale najprawdopodobniej wielkość obserwowanych zmian w składzie VLDL na skutek inkubacji z liposomami wynika ze spontanicznego transferu FL. Zarówno transfer spontaniczny FL, jak i transfer PLTP-zależny, zależy od temperatury, co tłumaczy różnice obserwowane w składzie VLDL po inkubacji mieszaniny reakcyjnej w różnej temperaturze [46, 65].

Z prezentowanych doświadczeń wynika, że inkubacja VLDL z liposomami lecytynowymi skutkuje dużymi zmianami w składzie VLDL, które wpływają na własności tych cząstek (*rozdział 4.1 – 4.4*). Inni badacze, opisując oddziaływanie lipoprotein z liposomami w środowisku surowicy, wskazują natomiast przede wszystkim na zmiany w składzie HDL. Cho po wstrzyknięciu liposomów królikom stwierdził asymilację dimirystoilofosfatydylocholiny głównie do HDL i tylko w niewielkim stopniu do VLDL i LDL [12]. Inni, prowadzący badania *in vitro* i *in vivo*, również podkreślają asymilację FL i zmiany głównie w obrębie HDL [28, 83, 84]. Porównując natomiast wyniki badań oddziaływania z liposomami HDL i VLDL w układach izolowanych, zmiany jakościowe, obserwowane dla obu typów lipoprotein, są analogiczne. Trudno natomiast porównywać wpływ oddziaływania liposomów na HDL i VLDL pod względem ilościowym, ponieważ praktycznie niemożliwa jest standaryzacja warunków takiego doświadczenia. Z cząstkami HDL związane jest PLTP, a na transfer spontaniczny wpływ ma nie tylko skład i stężenie cząstek będących donorami FL, ale również skład i stężenie akceptorów [65]. Aby móc porównać efektywność VLDL i HDL jako akceptorów FL, powinny więc być zachowane podobne warunki zarówno dla transportu PLTP-zależnego, jak i transferu spontanicznego, a więc zbliżone prawdopodobieństwo zderzeń między liposomami a lipoproteinami oraz porównywalne stężenie FL i apolipoprotein w lipoproteinach. Biorąc pod uwagę znacznie większy rozmiar cząstek, a mniejszą zawartość FL i białek w VLDL niż w HDL (tab. 1), nie wydaje się to możliwe [46].

Jest jednak bardzo prawdopodobne, że mniejsze zmiany w składzie VLDL obserwowane po reakcji z liposomami w pełnej surowicy niż obserwowane w układzie izolowanym, wynikają z dalszych oddziaływań, którym podlegają lipoproteiny w obecności białek, np. FL z VLDL są przenoszone do HDL na skutek działania PLTP [85]. Potwierdzać to mogą również pilotażowe badania prowadzone w Zakładzie Chemii Klinicznej GUMed, w których VLDL zmodyfikowane na skutek oddziaływania z liposomami inkubowano z HDL w obecności białek surowicy. Na skutek tej inkubacji

VLDL „oddawały” do HDL FL pozyskane z liposomów, a ich ruchliwość elektroforetyczna zwiększała się i osiągała po reakcji ruchliwość pre β (doświadczenia w toku, nieprezentowane w pracy).

Oprócz zmian w składzie i własnościach VLDL, reakcja z liposomami skutkowała powstawaniem nowych cząstek lipoproteinowych. Williams w swojej pracy, po inkubacji β -VLDL królika z liposomami i rozdzieleniu składników za pomocą chromatografii adsorpcyjnej z wykorzystaniem hydroksyapatytu, wykazał powstawanie dwóch różnych populacji cząstek, które nie zawierały apoB, natomiast zawierały CHW i białko pochodzące z VLDL, głównie apoE [92]. Na zdjęciach z mikroskopu elektronowego heterogenną populację cząstek powstałą na skutek inkubacji VLDL z liposomami zaobserwował również Guo [27]. W doświadczeniach wykonanych w ramach prezentowanej pracy, rozdział produktów reakcji przeprowadzono metodą ultrawierowania, stosując jako kryterium rozdziału gęstość cząstek (rozdział 3.8). Rozdział przeprowadzono dla prób inkubowanych 2 godziny w temperaturze 37°C, przy stosunku wagowym VLDL_{FL}:LP_{FL} 1:30, gdzie zaobserwowano największe zmiany w składzie lipoprotein VLDL po reakcji z liposomami (ryc. 24, ryc. 25).

W pierwszym etapie oddzielano metodą ultrawierowania lipoproteiny VLDL. Prawidłowość rozdziału VLDL od liposomów i innych produktów reakcji potwierdza zgodność procentowa zawartości składników frakcji I i II+III w stosunku do rozdziału składników mieszaniny reakcyjnej metodą immunoprecypitacji (tab. 10), brak obecności apoB we frakcji II i III oraz ruchliwość elektroforetyczna β frakcji I (ryc. 34), odpowiadająca ruchliwości VLDL w mieszaninie reakcyjnej VLDL+LP (ryc. 21).

Po oddzieleniu VLDL, roztwór liposomów i produktów reakcji doprowadzano do gęstości 1,063 g/ml i wirowano, uzyskując dwie frakcje, o gęstości powyżej i poniżej 1,063 g/ml. We frakcji II, o gęstości poniżej 1,063 g/ml, znajdowały się cząstki o dużych średnicach, które nie migrowały w żelu poliakrylamidowym 2 - 25%. Były to liposomy, które zawierały FL oraz CHW i apoE pozyskane z VLDL (tab. 18). Obecność liposomów zawierających apoE oraz CHW po reakcji z VLDL stwierdził również Guo [27]. Mendez stwierdził obecność apoE, CHW i apoAI w liposomach w układzie *in vivo*, po wstrzyknięciu liposomów lecytynowych królikom [55]. We frakcji II, oprócz liposomów, które pozyskały apoE i CHW z VLDL, najprawdopodobniej znajdowały się również liposomy, które w reakcji nie wzięły udziału. O obecności tych dwóch grup cząstek mogą świadczyć rozdziały elektroforetyczne mieszanin VLDL+LP w żelu

agarozowym, w których po wybarwieniu frakcji za pomocą czerni sudanowej można zaobserwować obecność lipidów obecnych we frakcjach poruszających się zarówno w stronę anody (+), jak i katody (-). Immunodetekcja apoE dla tej samej próbki wykazywała natomiast obecność białka tylko w cząstkach przemieszczających się od punktu nałożenia w kierunku anody (ryc. 21). Dokładna ocena ilości liposomów, które pozyskały CHW i apoE z VLDL oraz ilości liposomów, które nie brały udziału w reakcji w zastosowanych warunkach inkubacji, wymaga rozdzielenia składników frakcji II z wykorzystaniem innych metod analitycznych, np. chromatografii immunopowinowactwa z przeciwciałami anty apoE.

Gęstość wyizolowanej frakcji II w zakresie 1,006 – 1,063 g/ml, jej ruchliwość elektroforetyczna (ryc. 34) oraz zawartość CHW, FL i białka odpowiada własnościom cząstek LpX, obecnych w osoczu osób z niedoborem LCAT lub w przypadku cholestazy. LpX to frakcja lipoprotein o gęstości 1,019 – 1,063 g/ml i wielkości cząstek 30 - 70 nm. Zbudowana jest głównie z FL (60%) i CHW (30%) oraz apolipoprotein (6%). Zawiera śladowe ilości CHE i TG. Cząstki LpX nie zawierają apoB, natomiast zawierają apolipoproteiny wymienne: apoE, apoC i apoAI [60, 93]. Stwierdzono, że cząstki LpX tworzą się w osoczu po dożylnym podaniu bogatego w FL i TG Intralipidu lub po dożylnym podaniu FL. Są one nazywane również „lipoproteinami pęcherzykowymi”, ponieważ wodny rdzeń cząstek otoczony jest przez podwójną warstwę tworzoną przez FL i CHW, w której znajdują się zaadsorbowane apolipoproteiny. Uważa się, że powstawanie „lipoprotein pęcherzykowych” może być związane z przeciwmiażdżycowym działaniem liposomów [93]. Wykazano, że infuzja Intralipidu, mimo obserwowanej w osoczu hiperlipidemii, prowadzi do zmniejszenia wychwytu i degradacji komórkowej LDL oraz do zwiększenia efektywności usuwania CH komórkowego [4]. Abe stwierdza, że hiperlipidemia indukowana przez dożylną infuzję lipidów nie musi wywoływać działania proaterogennego, a wręcz przeciwnie, może mieć skutek przeciwmiażdżycowy [1]. Zmniejszenie komórkowego wychwytu aterogennych lipoprotein zawierających apoB odbywa się na drodze współzawodniczenia „lipoprotein pęcherzykowych” z tymi lipoproteinami o miejsce wiązania z receptorami, co wykazał Williams. Stwierdził on, że liposomy podane królikom, po pozyskaniu apoE z lipoprotein blokują receptorowy wychwyt β -VLDL przez komórki makrofagów [92]. Chang wykazał natomiast, że LpX mogą zmniejszać aterogenność frakcji LDL poprzez zmniejszanie ich podatności na utlenianie [10].

Obserwowane więc w tej pracy pozyskiwanie apoE z VLDL przez liposomy i tworzenie frakcji o własnościach „lipoprotein pęcherzykowych” może być jednym z mechanizmów przeciwmiażdżycowego oddziaływania liposomów.

We frakcji III, o gęstości powyżej 1,063 g/ml charakterystycznej dla HDL, stwierdzono obecność cząstek zawierających FL i apoE, wykazujących ruchliwość elektroforetyczną γ lub β w polu elektrycznym i posiadających wielkość umożliwiającą migrację w żelu poliakrylamidowym 2 - 25% (tab. 18, tab. 13, ryc. 22, ryc. 23). Cząstki te nie zawierały wykrywalnej ilości CH, podobnie jak cząstki β -HDL, izolowane przez Hajj Hassana po inkubacji surowicy z liposomami [28]. Możliwe jednak, że cząstki te zawierają bardzo małą ilość CH, jak to stwierdzono dla frakcji β -HDL po jej wyizolowaniu za pomocą metody precypitacyjnej z wykorzystaniem heparyny i chlorku wapnia [97].

Stężenie nowo powstałych cząstek było bardzo niskie, a ich obecność wykrywalna dopiero po zagęszczeniu frakcji w stosunku do VLDL co najmniej 10-krotnym. Nawet po zagęszczeniu frakcja nie była widoczna po wybarwieniu na obecność lipidów czernią sudanową, a ocena wielkości i ruchliwości elektroforetycznej cząstek była możliwa dopiero po immunodetekcji apoE na błonie PVDF.

Cząstki lipoproteinowe obecne we frakcji III odpowiadały ruchliwością i wielkością cząstkom obserwowanym w mieszaninie reakcyjnej, poddanej rozdziałowi 2D-PAGE bezpośrednio po zakończeniu inkubacji VLDL z liposomami (tab. 19). Powstawanie nowych cząstek nie było też skutkiem zastosowania układu izolowanego dla VLDL, bez obecności innych składników surowicy, ponieważ inni badacze obserwowali powstawanie γ -LpE podczas inkubacji liposomów z surowicą [28, 40].

Nie można jednak zaprzeczyć, że ultrawierowanie sekwencyjne, zastosowane do wyizolowania frakcji III, wpłynęło na wielkość cząstek. Były one po ultrawierowaniu nieznacznie większe od cząstek obserwowanych w pełnych mieszaninach reakcyjnych i trudniej było rozróżnić poszczególne populacje (tab. 19, ryc. 35). Bardziej wiarygodną ocenę wielkości i ruchliwości cząstek LpE zapewnia więc ocena rozdziałów 2D-PAGE pełnej mieszaniny inkubacyjnej (tab. 13, ryc. 22, ryc. 23), ponieważ na wielkość cząstek nie wpływają dodatkowe etapy analizy, a w żelu poliakrylamidowym 2 - 25% VLDL i liposomy, ze względu na swoją wielkość, nie migrują.

Stwierdzono, że na skutek reakcji VLDL z liposomami powstawały nowe cząstki lipoproteinowe o ruchliwości elektroforetycznej γ lub γ i $\text{pre}\beta$, o średnicach od 8,58 nm do 22,07 nm dla cząstek o ruchliwości γ i od 9,9 nm do 21,08 nm dla cząstek o ruchliwości $\text{pre}\beta$ (tab. 13). Wielkość i ruchliwość nowo powstałych cząstek odpowiadała wielkości i ruchliwości cząstek LpE, obserwowanych w surowicy [39, 42]. Krimbou wykazał występowanie w surowicy heterogennej populacji cząstek LpE o ruchliwości elektroforetycznej γ i $\text{pre}\beta$ oraz niewielkiej populacji o ruchliwości α (rycina 6). W obrębie populacji o danej ruchliwości elektroforetycznej wyróżnił on podfrakcje o różnej wielkości. Obserwował występowanie w surowicy 5 podfrakcji cząstek o ruchliwości γ : od najmniejszych γ_5 -LpE o średnicy cząstek wynoszącej 9,9 nm do największych γ_1 -LpE o średnicy 16,4 nm. Największą ilościowo frakcję stanowiła γ_2 -LpE o średnicy 13,3 nm [42]. W doświadczeniach przeprowadzonych w ramach prezentowanej pracy najczęściej obserwowano powstawanie populacji cząstek o ruchliwości γ , o medianie dla średnic 13,66 nm (tab. 13). Mediana dla najmniejszych cząstek wyniosła 9,25 nm i była zbliżona do wielkości γ_5 -LpE. W przypadku populacji największych cząstek obserwowanych w rozdzielach, mediana dla średnic wyniosła 18,2 nm, co jest wartością wyższą od średniej wielkości wyznaczonej przez Krimbou dla γ_1 -LpE. Można byłoby przypuszczać, że te największe cząstki to małe, niezdezintegrowane liposomy, które pozyskały apoE, jednakże podobne cząstki obserwowano po rozdziale elektroforetycznym frakcji III, gdzie liposomy nie były obecne (tab. 19). Ponadto obserwując rozdział dla γ -LpE w pełnej surowicy, uzyskany przez Krimbou, można zauważyć, że cząstki występują w postaci szerokiego pasma, obejmującego również lipoproteiny o średnicach większych niż 17 nm (rycina 7) [42]. Dla populacji cząstek o ruchliwości $\text{pre}\beta$ Krimbou obserwował 5 lub 6 podfrakcji o wielkości od 9,0 do 18,5 nm [41]. W prezentowanej pracy również obserwowano powstawanie heterogennej populacji cząstek, o modalnych średnicach w zakresie od 9,9 do 21,08 nm (tab. 13).

Obserwowane przez Krimbou rozkłady podfrakcji γ -LpE i $\text{pre}\beta$ -LpE, obecnych w surowicy, różniły się osobniczo [41]. W przeprowadzonych badaniach dla różnych puli VLDL również obserwowano powstawanie heterogennej populacji cząstek, o różnej ruchliwości i wielkości (tab. 13). Krimbou w 25-33% badanych próbek osocza nie stwierdził wykrywalnej ilości γ -LpE przy zastosowanych przez niego warunkach

detekcji [42]. Podobnie w prezentowanej pracy, w 4 z 17 (24%) przeprowadzonych doświadczeń nie stwierdzono wykrywalnej ilości nowo powstającej frakcji LpE. Na tym etapie badań nie udało się wykazać, jakie czynniki decydowały o tym, czy powstawały cząstki o ruchliwości elektroforetycznej γ , czy o ruchliwości γ i pre β oraz jakie czynniki decydowały o ilości powstającej frakcji. Można jednak wnioskować, że potencjał VLDL do tworzenia LpE jest różny. Ocena wpływu czynników decydujących o jakości i ilości powstających cząstek wymaga dalszych badań, przeprowadzonych na VLDL izolowanych z jednoimiennych surowic.

Stosunek wagowy VLDL_{FL}:LP_{FL} w mieszaninie reakcyjnej nie wpływał na rodzaj powstających cząstek LpE, ale wpływał na ich ilość (tab. 15, ryc. 27). Wzrost stężenia γ -LpE w surowicy zależy od dawki liposomów lecytynowych stwierdził Krimbou [40]. Analogiczną sytuację zależności od dawki egzogennych FL stwierdzono dla powstawania frakcji pre β -HDL podczas inkubacji HDL z liposomami [98]. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono natomiast wpływu temperatury ani na ilość, ani na jakość powstających cząstek LpE (tab. 17, ryc. 31).

Można więc stwierdzić, że jakość i ilość powstających cząstek zależała od VLDL biorących udział w reakcji, ilość egzogennych FL wpływała na ilość powstających cząstek, a temperatura inkubacji mogła ewentualnie wpływać na szybkość tworzenia nowej frakcji lipoprotein, choć obecność nowych cząstek LpE stwierdzono już po 5-minutowej inkubacji w obu temperaturach, czyli po pierwszej, „szybkiej” fazie oddziaływania VLDL z liposomami (wyniki nieprezentowane w pracy).

W obrębie nowo powstałej frakcji lipoprotein stwierdzono występowanie apoE jako jedynej apolipoproteiny pozyskanej z VLDL (ryc. 36). ApoE występowała w postaci monomeru (ryc. 37). Podobnie, Krimbou w LpE surowicy stwierdził występowanie apoE w formie monomeru i uważa on, że ta forma może reprezentować biologicznie aktywną formę wymienialnej apoE [39]. Peters-Libeu również stwierdził, że w cząstkach zbudowanych z dimirystoilofosfatydylocholiny i apoE występują co najmniej 2 cząsteczki apolipoproteiny w formie monomeru, a Garai wykazał, że dysocjacja oligomerów do monomerów jest niezbędna do uzyskania wysokiego powinowactwa i oddziaływania apoE z cząstkami zbudowanymi z FL [22, 64].

W przeprowadzonych doświadczeniach średnie stężenie apoE w nowo powstałej frakcji wyniosło 0,2 mg/l. Wartość ta odpowiada stężeniu apoE obecnej w γ -LpE w surowicy ludzkiej, które wynosi 0,1 - 1,0 mg/l [42].

Odmienne jednak od LpE izolowanej z surowicy, nowo powstała frakcja posiadała gęstość w zakresie charakterystycznym dla HDL ($1,063 < d < 1,21$ g/ml), a nie VHDL ($d > 1,21$ g/ml). Wpłynąć na to mógł wysoki stosunek FL:białko w izolowanych cząstkach.

Drogi przemian γ -LpE w osoczu nie są dokładnie poznane [34]. W pracy oceniono więc również, czy nowo powstała frakcja lipoprotein zawierająca apoE może oddziaływać z dojrzałymi lipoproteinami HDL, występującymi w środowisku białek surowicy. W tym celu frakcję III, zawierającą cząstki o ruchliwości γ , inkubowano z HDL przez 2 godziny w temperaturze 37°C . Po zakończeniu inkubacji nie obserwowano już frakcji lipoprotein o ruchliwości γ (ryc. 38C). Stwierdzono natomiast występowanie frakcji o ruchliwości β oraz frakcji o ruchliwości α , ale o średnicach większych niż dla natywnych HDL (ryc. 38). Te obserwacje potwierdzają, że nowo powstała frakcja oddziałuje z lipoproteinami HDL. Huang obserwował szybkie przesunięcie CH znakowanego z γ -LpE do lipoprotein o ruchliwości α [35]. Krimbou stwierdził szybki spadek stężenia γ -LpE na skutek inkubacji osocza w temperaturze 37°C , a spadek ten nie zależał od obecności LCAT, CETP i LPL [42]. Możliwe więc, że za oddziaływanie LpE z HDL odpowiada PLTP. Taką tezę mogą wspierać wyniki badań Settasiana, który wykazał, że PLTP uczestniczy w przebudowie sferycznych rHDL zawierających apoE, a przemiany te nie prowadzą do dysocjacji apoE [78]. Podobnie w prezentowanej pracy nie obserwowano powstawania cząstek o mniejszych średnicach na skutek oddziaływania nowo powstałych cząstek z HDL. Z drugiej strony von Eckardstein nie wykazał, aby inkubacja osocza w obecności lub bez PLTP miała wpływ na przemiany cząstek HDL-apoE [90]. Dalsze badania, w których zostanie przeprowadzona inkubacja frakcji III z HDL w obecności PLTP i po zahamowaniu aktywności tego białka, pozwolą więc wykazać jego wpływ na obserwowane przemiany.

Nasuwa się pytanie, czy nowo powstałe cząstki LpE, podobnie do osoczowych γ -LpE, będą zdolne do odbioru CH z komórek tkanek obwodowych. Ze względu na skład tych lipoprotein można przypuszczać, że mogą być one efektywnym akceptorem CH komórkowego. Obecność apoE umożliwia oddziaływanie z receptorami komórkowymi, a FL jako składnik cholesterofilowy i substrat dla LCAT może zwiększać efektywność odbioru CH i jego estryfikację.

Mechanizm, na drodze którego osoczowe γ -LpE odbierają CH z komórek, nie jest znany. Mało prawdopodobne, aby proces ten zależał od oddziaływania z białkiem ABCA1, ponieważ z ABCA1 oddziałuje wolna lub ubogolipidowa apoE. γ -LpE jest natomiast lipoproteiną o wysokiej zawartości FL. Przypuszcza się, że osoczowe γ -LpE uczestniczą w procesie dyfuzji pasywnej, ale wydaje się, że możliwym byłoby też oddziaływanie z receptorami ABCG1 lub SR-B1 [28].

Podsumowując, przeprowadzone badania wnoszą istotny wkład w poznanie mechanizmów oddziaływania liposomów lecytynowych z lipoproteinami osocza. Wykazują one, że oddziaływanie liposomów lecytynowych z lipoproteinami VLDL prowadzi do powstawania nowych populacji cząstek o potencjalnych właściwościach przeciwmiażdżycowych. Tworzenie nowych populacji lipoprotein HDL zawierających apoE o wielkości i ruchliwości odpowiadającej występującym w osoczu cząstkom HDL-LpE może odgrywać istotną rolę w zwiększeniu puli akceptorów cholesterolu komórkowego. Tworzenie lipoprotein o właściwościach „lipoprotein pęcherzykowych” może potencjalnie odgrywać rolę w blokowaniu komórkowego wychwytu lipoprotein proaterogennych.

6. WNIOSKI

1. Oddziaływanie VLDL z liposomami lecytinowymi prowadzi do zwiększenia zawartości fosfolipidów i spadku zawartości cholesterolu wolnego oraz apoE w VLDL, co skutkuje zmniejszeniem ruchliwości elektroforetycznej VLDL. Wielkość zmian w składzie i własnościach VLDL zależy od warunków inkubacji: ilości egzogennych fosfolipidów, temperatury i czasu inkubacji.
2. Oddziaływanie VLDL z liposomami lecytinowymi jest źródłem powstawania cząstek o składzie (FL, CHW i apo) i ruchliwości elektroforetycznej γ , charakterystycznych dla „lipoprotein pęcherzykowych”, obserwowanych po dożylniej infuzji FL.
3. Na skutek oddziaływania VLDL z liposomami lecytinowymi powstają heterogenne populacje nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apoE jako jedyny składnik białkowy (LpE), o gęstości odpowiadającej gęstości HDL, charakteryzujące się ruchliwością elektroforetyczną γ , o wielkości od 8,58 nm do 22,07 nm oraz o ruchliwości elektroforetycznej $\beta\beta$ i wielkości od 9,9 nm do 21,08 nm.
4. Nowo powstałe cząstki LpE oddziałują z HDL w środowisku białek surowicy, co skutkuje przemianą i powstawaniem cząstek HDL o ruchliwości elektroforetycznej $\beta\beta$ i α , o średnicach większych od obserwowanych dla HDL przed reakcją.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abe M, Kawano M, Tashiro T, Yamamori H, Takagi K, Morishima Y, Shirai K, Saitou Y, Nakajima N. Catabolism of lipoprotein-X induced by infusion of 10% fat emulsion. *Nutrition* 1997;13(5):417-421.
2. Anderson T, Charbonneau F, Chan S, Lonn E. The effect of large unilamellar vesicles on vascular function in patients with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008;200:424-431.
3. Angielski S. (red.), Biochemia kliniczna i analityka: podręcznik dla słuchaczy medycznych szkół zawodowych wydziałów analityki medycznej. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1990.
4. Aviram M, Williams KJ, McIntosh RA, Carpentier YA, Tall AR, Deckelbaum RJ. Intralipid infusion abolishes ability of human serum to cholesterol-load cultured macrophages. *Arteriosclerosis* 1989;9:67-75.
5. Barbagallo CM, Rizzo M, Noto D, Frasheri A, Pernice V, Rubino A, Pieri D, Pinto V, Cefalu AB, Giordano C, Notarbartolo A, Averna MR. Accumulation of apoE-enriched triglyceride-rich lipoproteins in patients with coronary artery disease. *Metabolism* 2006;55:662-668.
6. Bates SR, Coughlin BA, Mazzone T, Borensztajn J, Getz GS. Apoprotein E mediates the interaction of beta-VLDL with macrophages. *J Lipid Res* 1987;28(7):787-797.
7. Boisvert WA, Spangenberg J, Curtiss LK. Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1995;96:1118-1124.
8. Brousseau T, Clavey V, Bard JM, Fruchart JC. Sequential ultracentrifugation micromethod for separation of serum lipoproteins and assays of lipids, apolipoproteins, and lipoprotein particles. *Clin Chem* 1993;39(6):960-964.
9. Cavusoglu E, Chhabra S, Jiang XC, Hojjati MR, Chopra V, Eng C, Gupta A, Yanamadala S, Pinsky DJ, Marmur JD. Relation of baseline plasma phospholipid levels to cardiovascular outcomes at two years in men with acute coronary syndrome referred for coronary angiography. *Am J Cardiol* 2007;100:1739-1743.

10. Chang PY, Lu SC, Su TC, Chou SF, Huang WH, Morrisett JD, Chen CH, Liao CS, Lee YT. Lipoprotein-X reduces LDL atherogenicity in primary biliary cirrhosis by preventing LDL oxidation. *J Lipid Res* 2004;45:2116-2122.
11. Cheung MC, Albers JJ. Active plasma phospholipid transfer protein is associated with apoA-I- but not apoE-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 2006;47:1315-1321.
12. Cho BH, Park JR, Nakamura MT, Odintsov BM, Wallig MA, Chung BH. Synthetic dimyristoylphosphatidylcholine liposomes assimilating into high-density lipoprotein promote regression of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Exp Biol Med* 2010;235:1194-1203.
13. Chung BH, Franklin F, Liang P, Doran S, Cho BH, Curcio CA. Phosphatidylcholine-rich acceptors, but not native HDL or its apolipoproteins, mobilize cholesterol from cholesterol-rich insoluble components of human atherosclerotic plaques. *Biochim Biophys Acta* 2005;1733(1):76-89.
14. Cohn JS, Tremblay M, Amiot M, Bouthillier D, Roy M, Genest JJ, Davignon J. Plasma concentration of apolipoprotein E in intermediate-sized remnant-like lipoproteins in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(1):149-159.
15. Cohn JS, Tremblay M, Batal R, Jacques H, Veilleux L, Rodriguez C, Barrett PH, Dubreuil D, Roy M, Bernier L, Mamer O, Davignon J. Effect of atorvastatin on plasma apoE metabolism in patients with combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2002;43:1464-1471.
16. Cybulska B, Kłosiewicz-Latoszek L. (red.), Zaburzenia lipidowe. Wyd. II uaktualnione. Poznań: Termedia Wydawnictwa Medyczne, 2011.
17. Czyżewska M, Wolska A, Ćwiklińska A, Kortas-Stempak B, Wróblewska M. Zaburzenia metabolizmu lipoprotein w zespole metabolicznym. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2010;64:1-10.
18. Dass CR, Jessup W. Apolipoprotein A-I, cyclodextrins and liposomes as potential drugs for the reversal of atherosclerosis. A review. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:731-761.
19. Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chim Acta* 1999;286:115-143.

20. Faxon DP, Creager MA, Smith SC Jr, Pasternak RC, Olin JW, Bettmann MA, Criqui MH, Milani RV, Loscalzo J, Kaufman JA, Jones DW, Pearce WH. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Executive summary: Atherosclerotic Vascular Disease Conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association. *Circulation* 2004;109(21):2595-2604.
21. Fielding JC. (red.), High-Density Lipoproteins: From Basic Biology to Clinical Aspects. Weinheim (Niemcy): John Wiley & Sons, 2007.
22. Garai K, Baban B, Frieden C. Dissociation of apolipoprotein E oligomers to monomers is required for high affinity binding to phospholipid vesicles. *Biochemistry* 2011;50(13):2550-2558.
23. Genest JJ Jr, Bard JM, Fruchart JC, Ordovas JM, Wilson PF, Schaefer EJ. Plasma apolipoprotein A-I, A-II, B, E and C-III containing particles in men with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1991;90(2-3):149-157.
24. Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med* 2005;83:329-342.
25. Guha M, England C, Herscovitz H, Gursky O. Thermal transitions in human very-low-density lipoprotein: fusion, rupture, and dissociation of HDL-like particles. *Biochemistry* 2007;46(20):6043-6049.
26. Guha M, Gursky O. Human plasma very low-density lipoproteins are stabilized by electrostatic interactions and destabilized by acidic pH. *J Lipids* 2011; Article ID:493720.
27. Guo LS, Hamilton RL, Goerke J, Weinstein JN, Havel RJ. Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1980;21:993-1003.
28. Hajj Hassan H, Blain S, Boucher B, Denis M, Krimbou L, Genest J. Structural modification of plasma HDL by phospholipids promotes efficient ABCA1-mediated cholesterol release. *J Lipid Res* 2005;46:1457-1465.
29. Hannuksela ML, Brousseau ME, Meyn SM, Nazih H, Bader G, Shamburek RD, Alaupovic P, Brewer HB Jr. In vivo metabolism of apolipoprotein E within the HDL subpopulations LpE, LpE:A-I, LpE:A-II and LpE:A-I:A-II. *Atherosclerosis* 2002;165:205-220.

30. Harris JD, Schepelmann S, Athanasopoulos T, Graham IR, Stannard AK, Mohri Z, Hill V, Hassall DG, Owen JS, Dickson G. Inhibition of atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice following muscle transduction with adeno-associated virus vectors encoding human apolipoprotein-E. *Gene Ther* 2002;9:21-29.
31. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci* 2006;31(8):445-454.
32. Hayek T, Oiknine J, Brook JG, Aviram M. Role of HDL apolipoprotein E in cellular cholesterol efflux: studies in apo E knockout transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205(2):1072-1078.
33. Huang C. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* 1969;8(1):344-352.
34. Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Assmann G. Effects of the apolipoprotein E polymorphism on uptake and transfer of cell-derived cholesterol in plasma. *J Clin Invest* 1995;96:2693-2701.
35. Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Maeda N, Assmann G. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with γ mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:1834-1838.
36. Jian B, de la Llera-Moya M, Royer L, Rothblat G, Francone O, Swaney JB. Modification of the cholesterol efflux properties of human serum by enrichment with phospholipid. *J Lipid Res* 1997;38:734-744.
37. Kozubek A. Wstęp do technologii liposomowej. Wrocław 2004. <http://www.ibmb.uni.wroc.pl/studia/liposomes.pdf> (stan z 12.09.2011 roku).
38. Krimbou L, Denis M, Haidar B, Carrier M, Marcil M, Genest J Jr. Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation. *J Lipid Res* 2004;45:839-848.
39. Krimbou L, Marcil M, Chiba H, Genest J Jr. Structural and functional properties of human plasma high density-sized lipoprotein containing only apoE particles. *J Lipid Res* 2003;44:884-892.
40. Krimbou L, Marcil M, Doyle N, Genest J Jr, Davignon J. Gamma-LpE (γ -LpE) concentrations was regulated by cell membranes and phospholipids (abstract). *Atherosclerosis* 2000;151:182-183.

41. Krimbou L, Tremblay M, Davignon J, Cohn JS. Characterization of human plasma apolipoprotein E-containing lipoproteins in the high density lipoprotein size range: focus on pre- β_1 -LpE, pre- β_2 -LpE, and α -LpE. *J Lipid Res* 1997;38:35-48.
42. Krimbou L, Tremblay M, Jacques H, Davignon J, Cohn JS. In vitro factors affecting the concentration of gamma-LpE (γ -LpE) in human plasma. *J Lipid Res* 1998;39:861-872.
43. Kypreos KE, Karagiannides I, Fotiadou EH, Karavia EA, Brinkmeier MS, Giakoumi SM, Tsompanidi EM. Mechanisms of obesity and related pathologies: role of apolipoprotein E in the development of obesity. *FEBS J* 2009;276(20):5720-5728.
44. Kypreos KE, Zannis VI. Pathway of biogenesis of apolipoprotein E-containing HDL *in vivo* with the participation of ABCA1 and LCAT. *Biochem J* 2007;403:359-367.
45. Lahoz C, Schaefer EJ, Cupples LA, Wilson PW, Levy D, Osgood D, Parpos S, Pedro-Botet J, Daly JA, Ordovas JM. Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001;154(3):529-537.
46. Lalanne F, Ponsin G. Mechanism of the phospholipid transfer protein-mediated transfer of phospholipids from model lipid vesicles to high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 2000;1487:82-91.
47. Little RA. Changes in the blood volume of the rabbit with age. *J Physiol* 1970;208:485-497.
48. Lund-Katz S, Phillips MC. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Subcell Biochem* 2010;51:183-227.
49. Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest* 2006;116(5):1226-1229.
50. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984;25:1277-1294.
51. Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507-537.

52. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res* 2009;50(Suppl):S183-188.
53. Matsuura F, Wang N, Chen W, Jiang XC, Tall AR. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J Clin Invest* 2006;116(5):1435-1442.
54. McEneny J, Loughrey CM, McNamee PT, Trimble ER, Young IS. Susceptibility of VLDL to oxidation in patients on regular haemodialysis. *Atherosclerosis* 1997;129:215-220.
55. Mendez AJ, He JL, Huang HS, Wen SR, Hsia SL. Interaction of rabbit lipoproteins and red blood cells with liposomes of egg yolk phospholipids. *Lipids* 1988;23(10):961-967.
56. Michajlik A, Bartnikowska E. Lipidy i lipoproteiny osocza. Wyd. I. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1999.
57. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994;14(1):133-140.
58. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 2006;80(5):2418-2428.
59. Nofer J-R. Rola lipoprotein wysokiej gęstości (HDL) w miażdżycy. W: Naruszewicz M. (red.), Kardiologia zapobiegawcza II. Wyd. II uzupełnione. Warszawa: eMKA, 2007, 86 - 121.
60. O K, Frohlich J. Role of lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein A-I in cholesterol esterification in lipoprotein-X in vitro. *J Lipid Res* 1995;36:2344-2354.
61. Oka T, Kujiraoka T, Ito M, Egashira T, Takahashi S, Nanjee MN, Miller NE, Metso J, Olkkonen VM, Ehnholm C, Jauhiainen M, Hattori H. Distribution of phospholipid transfer protein in human plasma: presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive. *J Lipid Res* 2000;41:1651-1657.

62. Ooi EM, Ng TW, Watts GF, Chan DC, Barrett PH. Effect of fenofibrate and atorvastatin on VLDL apoE metabolism in men with the metabolic syndrome. *J Lipid Res* 2012;53:2443-2449.
63. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3542-3556.
64. Peters-Libeu CA, Newhouse Y, Hall SC, Witkowska HE, Weisgraber KH. Apolipoprotein E•dipalmitoylphosphatidylcholine particles are ellipsoidal in solution. *J Lipid Res* 2007;48:1035-1044.
65. Petrie GE, Jonas A. Spontaneous phosphatidylcholine exchange between small unilamellar vesicles and lipid-apolipoprotein complexes. Effects of particle concentrations and compositions. *Biochemistry* 1984;23:720-725.
66. Pietzsch J, Subat S, Nitzsche S, Leonhardt W, Schentke KU, Hanefeld M. Very fast ultracentrifugation of serum lipoproteins: influence on lipoprotein separation and composition. *Biochim Biophys Acta* 1995;1254(1):77-88.
67. Pownall HJ. Detergent-mediated phospholipidation of plasma lipoproteins increases HDL cholesterophilicity and cholesterol efflux via SR-BI. *Biochemistry* 2006;45(38):11514-11522.
68. Pownall HJ, Ehnholm C. Enhancing reverse cholesterol transport: the case for phosphatidylcholine therapy. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:265-268.
69. Raber J, Huang Y, Ashford JW. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 2004;25:641-650.
70. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008;451:904-913.
71. Raffai RL, Loeb SM, Weisgraber KH. Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:436-441.
72. Rodriguez WV, Klimuk SK, Pritchard PH, Hope MJ. Cholesterol mobilization and regression of atheroma in cholesterol-fed rabbits induced by large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1998;1368:306-320.
73. Rodriguez WV, Williams KJ, Rothblat GH, Phillips MC. Remodeling and shuttling: mechanisms for the synergistic effects between different acceptor particles in the mobilization of cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(2):383-393.

74. Rosenson RS, Brewer HB Jr, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang X-C, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH, Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* 2012;125:1905-1919.
75. Rye K-A, Bright R, Psaltis M, Barter PJ. Regulation of reconstituted high density lipoprotein structure and remodeling by apolipoprotein E. *J Lipid Res* 2006;47:1025-1036.
76. Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res* 2009;50(suppl):S195-200.
77. Schaefer EJ. (red.), High Density Lipoproteins, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease. Wyd. I. New York (USA): Springer New York, 2010.
78. Settasatian N, Barter PJ, Rye K-A. Remodeling of apolipoprotein E-containing spherical reconstituted high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 2008;49:115-126.
79. Singleton WS, Gray MS, Brown ML, White JL. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J Am Oil Chem Soc* 1965;42:53-56.
80. Skoczyńska A. Rola lipidów w powstawaniu miażdżycy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005;59:346-357.
81. Skoczyńska A. Patogeneza miażdżycy. Wrocław: Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o., 2006.
82. Soran H, Hama S, Yadav R, Durrington PN. HDL functionality. *Curr Opin Lipidol* 2012;23(4):353-366.
83. Tall AR. Studies on the transfer of phosphatidylcholine from unilamellar vesicles into plasma high density lipoproteins in the rat. *J Lipid Res* 1980;21:354-363.
84. Tall AR, Green PH. Incorporation of phosphatidylcholine into spherical and discoidal lipoproteins during incubation of egg phosphatidylcholine vesicles with isolated high density lipoproteins or with plasma. *J Biol Chem* 1981;256(4):2035-2044.

85. Tall AR, Krumholz S, Olivecrona T, Deckelbaum RJ. Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis. *J Lipid Res* 1985;26:842-851.
86. Tchoua U, Gillard BK, Pownall HJ. HDL superphospholipidation enhances key steps in reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2010;209(2):430-435.
87. Vedhachalam C, Narayanaswami V, Neto N, Forte TM, Phillips MC, Lund-Katz S, Bielicki JK. The C-terminal lipid-binding domain of apolipoprotein E is a highly efficient mediator of ABCA1-dependent cholesterol efflux that promotes the assembly of high-density lipoproteins. *Biochemistry* 2007;46(10):2583-2593.
88. von Eckardstein A, Huang Y, Wu S, Funke H, Nosedá G, Assmann G. Reverse cholesterol transport in plasma of patients with different forms of familial HDL deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:691-703.
89. von Eckardstein A, Huang Y, Wu S, Sarmadi AS, Schwarz S, Steinmetz A, Assmann G. Lipoproteins containing apolipoprotein A-IV but not apolipoprotein A-I take up and esterify cell-derived cholesterol in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1755-1763.
90. von Eckardstein A, Jauhiainen M, Huang Y, Metso J, Langer C, Pussinen P, Wu S, Ehnholm C, Assmann G. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre β ₁-HDL. *Biochim Biophys Acta* 1996;1301:255-262.
91. Williams KJ, Phillips MC, Rodriguez WV. Structural and metabolic consequences of liposome-lipoprotein interactions. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;32:31-43.
92. Williams KJ, Tall AR, Bisgaier C, Brocia R. Phospholipid liposomes acquire apolipoprotein E in atherogenic plasma and block cholesterol loading of cultured macrophages. *J Clin Invest* 1987;79:1466-1472.
93. Williams KJ, Tall AR, Tabas I, Blum C. Recognition of vesicular lipoproteins by the apolipoprotein B,E receptor of cultured fibroblasts. *J Lipid Res* 1986;27:892-900.

94. Williams KJ, Vallabhajosula S, Rahman IU, Donnelly TM, Parker TS, Weinrauch M, Goldsmith SJ. Low density lipoprotein receptor-independent hepatic uptake of a synthetic, cholesterol-scavenging lipoprotein: implications for the treatment of receptor-deficient atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:242-246.
95. Wilson HM, Patel JC, Russell D, Skinner ER. Alterations in the concentration of an apolipoprotein E-containing subfraction of plasma high density lipoprotein in coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1993;220(2):175-187.
96. Wilson JD, Foster FD. (red.), Williams textbook of endocrinology. Wyd. 8. Philadelphia (USA): WB Saunders, 1992, <http://health-7.com/Textbook%20of%20Endocrinology/CHAPTER%2036%20-%20DISORDERS%20OF%20LIPID%20METABOLISM/1> (stan z 20.09.2012 roku)
97. Wróblewska M, Czyżewska M, Wolska A, Kortas-Stempak B, Szutowicz A. Apo A-II participates in HDL-liposome interaction by the formation of new pre β mobility particles and the modification of liposomes. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:1323-1329.
98. Wróblewska M, Kortas-Stempak B, Szutowicz A, Badzio T. Phospholipids mediated conversion of HDLs generates specific apoA-II pre- β mobility particles. *J Lipid Res* 2009;50:667-675.
99. Wróblewska M. Powstawanie nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apolipoproteinę A-II podczas przemian lipoprotein wysokiej gęstości zachodzących pod wpływem fosfolipidów (rozprawa habilitacyjna). Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny. *Ann Acad Med Gedan* 2011; t. 41, supl. 8.
100. Yamashita S, Sprecher DL, Sakai N, Matsuzawa Y, Tarui S, Hui DY. Accumulation of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic human subjects with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 1990;86(3):688-695.
101. Yan X, Kuipers F, Havekes LM, Havinga R, Dontje B, Poelstra K, Scherphof GL, Kamps JA. The role of apolipoprotein E in the elimination of liposomes from blood by hepatocytes in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:57-62.

102. Zhang L, Song J, Newhouse Y, Zhang S, Weisgraber KH, Ren G. An optimized negative-staining protocol of electron microscopy for apoE4•POPC lipoprotein. *J Lipid Res* 2010;51:1228-1236.