

Zakład Medycyny Laboratoryjnej  
Katedra Biochemii Klinicznej  
Gdański Uniwersytet Medyczny



**Anna Wolska**

# **Wpływ pre- $\beta$ HDL A-II na metabolizm VLDL**

Rozprawa doktorska

Praca wykonana w  
Zakładzie Medycyny  
Laboratoryjnej Katedry Biochemii  
Klinicznej Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

Promotor:  
prof. dr hab. med. Andrzej Szutowicz  
Kierownik Katedry:  
prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk  
Kierownik Zakładu:  
dr hab. Hanna Bielarczyk

Gdańsk, 2013

Pracę dedykuję wraz z serdecznymi podziękowaniami  
**dr hab. Małgorzacie Wróblewskiej**  
za inspirację, codzienną opiekę, niezwykle cenne uwagi praktyczne  
i pomoc w interpretacji wyników doświadczeń.

Serdeczne podziękowania składam również:  
dr Barbarze Kortas-Stempak,  
dr Agnieszce Ćwiklińskiej  
i mgr Annie Gliwińskiej  
za koleżeńską i życzliwą współpracę  
oraz pomoc przy wykonywaniu niniejszej pracy.

Pragnę serdecznie podziękować Wszystkim, którzy w ciągu tych lat wierzyli we mnie,  
wspierali i służyli mi pomocą.

Anna Wolska

Praca finansowana częściowo z funduszy projektu NCN NN401529940 i GUMed 01-0100/08.

## Spis treści

Wykaz rycin.....	6
Spis tabel.....	9
Wykaz stosowanych skrótów.....	10
Streszczenie .....	12
1. Wstęp .....	14
1.1. Lipoproteiny.....	14
1.1.1. Budowa lipoprotein.....	14
1.2. Lipoproteiny VLDL .....	17
1.2.1. Budowa VLDL .....	17
1.2.2. Metabolizm VLDL .....	17
1.2.3. Lipaza lipoproteinowa .....	18
1.2.3.1. Brak lub niedobór lipazy lipoproteinowej czy jej aktywatora apo C-II .....	19
1.3. Lipoproteiny HDL .....	20
1.3.1. Budowa HDL .....	20
1.3.2. Heterogenność HDL .....	20
1.3.3. Metabolizm HDL.....	21
1.3.4. Powstawanie HDL zawierających apo A-II.....	24
1.3.4.1. Cząstki pre- $\beta$ -HDL A-II.....	24
1.3.4.2. Cząstki HDL A-I/A-II.....	24
1.3.5. Promiażdżycowe właściwości apo A-II.....	25
1.3.5.1. Wpływ apo A-II na metabolizm HDL .....	26
1.3.5.2. Wpływ apo A-II na metabolizm VLDL.....	26
2. Cel .....	28
3. Materiały i metody .....	29
3.1. Odczynniki i zestawy odczynnikowe.....	29
3.2. Przeciwciała .....	31

3.3.	Bufory i roztwory podstawowe.....	31
3.4.	Bufory i roztwory do technik elektroforetycznych.....	32
3.5.	Odczynniki do metody Western blot.....	32
3.6.	Materiały.....	33
3.7.	Sprzęt.....	33
3.8.	Surowica.....	35
3.8.1.	Preparatyka HDL.....	35
3.8.2.	Preparatyka VLDL.....	37
3.9.	Izolacja lecytyny z jaja kurzego.....	37
3.10.	Preparatyka liposomów.....	38
3.11.	Inkubacja preparatu HDL z liposomami.....	38
3.12.	Izolacja frakcji pre- $\beta$ -HDL będącej produktem reakcji HDL i liposomów.....	38
3.12.1.	Rozdział HDL i frakcji pre- $\beta$ -HDL od liposomów metodą ultrawirowania.....	38
3.12.2.	Wytrącanie frakcji pre- $\beta$ -HDL z wyizolowanej mieszaniny preparatu HDL i frakcji pre- $\beta$ -HDL.....	39
3.13.	Otrzymywanie mieszanin reakcyjnych preparatu VLDL z HDL i/lub LP.....	40
3.14.	Otrzymywanie mieszaniny reakcyjnej preparatu VLDL z frakcją pre- $\beta$ -HDL ..	40
3.15.	Izolacja preparatów VLDL zmodyfikowanych.....	41
3.16.	Ocena lipolizy TG w preparatach VLDL.....	41
3.17.	Oznaczanie stężeń lipidów.....	42
3.18.	Oznaczanie stężeń apolipoprotein.....	42
3.19.	Metody elektroforetyczne.....	43
3.19.1.	Elektroforeza lipoprotein w żelu agarozowym.....	43
3.19.2.	Ilościowe pomiary cząstek Lp A-I metodą immunoelektroforezy rakietowej ...	43
3.19.3.	Detekcja cząstek Lp A-II w mieszaninie HDL+LP oraz preparacie HDL za pomocą własnej modyfikacji immunoelektroforezy rakietowej.....	45
3.19.4.	Opracowanie warunków immunoelektroforezy rakietowej dla identyfikacji cząstek Lp A-II we frakcji pre- $\beta$ -HDL.....	46

3.19.5. Elektroforeza pionowa w gradiencie żelu poliakrylamidowego w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) .....	47
3.19.6. Elektroforeza dwukierunkowa w układzie agaroz – 2 - 25% gradient żelu poliakrylamidowego w warunkach niedenaturujących (2D-PAGE) .....	47
3.20. Elektrotransfer lipoprotein z żelu poliakrylamidowego na błonę PVDF .....	48
3.21. Immunodetekcja apolipoprotein A-I i A-II na błonach PVDF metodą Western blot .....	48
3.22. Analiza densytometryczna rozdziałów elektroforetycznych frakcji lipoproteinowych .....	48
3.23. Określanie średnic Stokesa cząstek lipoproteinowych we frakcjach elektroforetycznych.....	49
3.24. Określanie masy cząsteczkowej białek cząstek lipoproteinowych.....	49
3.25. Analizy statystyczne .....	50
4. Wyniki.....	51
4.1. Charakterystyka wyjściowych frakcji HDL i VLDL .....	51
4.2. Oddziaływania między frakcją HDL i liposomami .....	53
4.3. Charakterystyka nowo-powstałej frakcji pre- $\beta$ -HDL .....	54
4.3.1. Skład frakcji pre- $\beta$ -HDL .....	54
4.3.3. Ruchliwość elektroforetyczna frakcji pre- $\beta$ -HDL .....	56
4.3.4. Heterogenność podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej i pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej .....	57
4.3.5. Czy we frakcji pre- $\beta$ -HDL znajdują się cząstki zawierające tylko apo A-II? ....	62
4.4. Wpływ różnych frakcji lipoproteinowych na skład i właściwości VLDL .....	64
4.4.1. Wpływ różnych frakcji lipoproteinowych na ruchliwość elektroforetyczną VLDL .....	64
4.4.2. Wpływ różnych frakcji lipoproteinowych na dystrybucję lipidów w VLDL .....	67
4.5. Szybkość hydrolizy triacylogliceroli w zmodyfikowanych frakcjach VLDL ....	70
5. Dyskusja.....	75
6. Wnioski .....	85
Piśmiennictwo.....	86

## Wykaz rycin

Ryc. 1. Ogólna budowa lipoprotein (PeproTech 2009).....	14
Ryc. 2. Powstawanie VLDL w wątrobie i przemiany VLDL zachodzące w osoczu (Lewis i Rader 2005, Marenah 2008, van Tol 2002, Wróblewska 2009) .....	18
Ryc. 3. Oddziaływanie LPL ze śródbłonkiem naczyń krwionośnych i VLDL (Health-7 2013).....	19
Ryc. 4. Powstawanie cząstek pre- $\beta$ -HDL i $\alpha$ -HDL (Asztalos i wsp. 2007, Blanco-Vaca i wsp. 2001, Lewis i Rader 2005, Rye i wsp. 1999).....	22
Ryc. 5. Przemiany HDL zachodzące w osoczu (Barter 2002, La Goff i wsp. 2004, Lewis i Rader 2005, Rye i wsp. 1999, van Tol 2002, Wróblewska 2009).....	23
Ryc. 6. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym surowicy pulowanej i natywnej frakcji HDL w środowisku białek surowicy wraz z analizą densytometryczną .....	36
Ryc. 7. Rozdział HDL od białek surowicy metodą ultrawierowania .....	36
Ryc. 8. Izolacja VLDL metodą ultrawierowania; A. Obraz przed ultrawierowaniem, po nawarstwieniu na surowicę 0.9% NaCl o gęstości 1.006 g/mL; B. Obraz po ultrawierowaniu.....	37
Ryc. 9. Rozdział HDL z nowo-powstałą frakcją pre- $\beta$ -HDL od liposomów metodą ultrawierowania w gęstości $d=1.042$ g/mL. ....	39
Ryc. 10. Izolacja VLDL z mieszaniny preparatu HDL i liposomów. ....	41
Ryc. 11. Rozdział wzorca cząstek Lp A-I w żelu agarozowym firmy Sebia metodą immunoelektroforezy rakietowej.....	44
Ryc. 12. Rozdział preparatu HDL w żelu agarozowym firmy Sebia metodą immunoelektroforezy rakietowej.....	46
Ryc. 13. A. Obraz densytometryczny rozdziału elektroforetycznego surowicy natywnej; B. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym białek 1. Surowicy natywnej, 2. Izolowanej frakcji VLDL, 3. Izolowanej frakcji HDL. Barwienie czernią amidową.....	51
Ryc. 14. A. Obraz densytometryczny rozdziału poniżej; B. Rozdział w żelu agarozowym 1. Surowicy natywnej, 2. Izolowanej frakcji VLDL, 2. Izolowanej frakcji HDL. Barwienie czernią Sudan.....	52
Ryc. 15. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym preparatu HDL, liposomów oraz mieszaniny HDL i LP po 60 min. inkubacji. ....	54

- Ryc. 16. Rozdział frakcji pre- $\beta$ -HDL w 4 - 20% żelu poliakrylamidowym metodą SDS-PAGE po elektrotransferze i A. Immunodetekcji na obecność apo A-I; B. Immunodetekcji na obecność apo A-II; C. Rozdział wzorca LMW..... 55
- Ryc. 17. A. Obraz densytometryczny rozdziału poniżej; B. Rozdział elektroforetyczny (pierwszy kierunek) w żelu agarozowym frakcji pre- $\beta$ -HDL wyizolowanej z mieszaniny HDL-LP-pre- $\beta$  metodą ultrawirowania, wybarwiony czernią Sudan. .... 57
- Ryc. 18. Rozdział elektroforetyczny (drugi kierunek) podfrakcji pre- $\beta$ -HDL. Dystrybucja apo-A-I w gradiencie 2 - 25% żelu poliakrylamidowego: A. Podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej; B. Podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej; C. Wzorca HMW białek surowicy..... 58
- Ryc. 19. Rozdział elektroforetyczny (drugi kierunek) podfrakcji pre- $\beta$ -HDL. Dystrybucja apo-A-II w gradiencie 2 - 25% żelu poliakrylamidowego: A. Podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej; B. Podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej; C. Wzorca HMW białek surowicy..... 59
- Ryc. 20. Dystrybucja białek apo A-I i apo A-II w gradiencie wielkości nowopowstających cząstek pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrujących (Ryc. 17). A. Zawartość białek apo A-I i apo A-II w kolejnych przedziałach wielkości cząstek; B. Zawartość całkowita białek apo A i stosunek apo A-I/apo A-II w kolejnych przedziałach wielkości cząstek. .... 60
- Ryc. 21. Dystrybucja białek apo A-I i apo A-II w gradiencie wielkości nowopowstających cząstek pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrujących (Ryc. 17). A. Zawartość białek apo A-I i apo A-II w kolejnych przedziałach wielkości cząstek; B. Zawartość całkowita białek apo A i stosunek apo A-I/apo A-II w kolejnych przedziałach wielkości cząstek. .... 61
- Ryc. 22. Rozdział w 0.9% żelu agarozowym metodą immunoelektroforezy raketowej na obecność cząstek zawierających apo A-I; A. Natywnych HDL oraz mieszaniny HDL i liposomów (HDL-LP-pre- $\beta$ ); B. Izolowanej frakcji pre- $\beta$ -HDL. .... 62
- Ryc. 23. Rozdział w 0.9% żelu agarozowym metodą immunoelektroforezy raketowej na obecność cząstek zawierających apo A-II; A. Natywnych HDL oraz mieszaniny HDL i liposomów (HDL-LP-pre- $\beta$ ); B. Izolowanej frakcji pre- $\beta$ -HDL. .... 64
- Ryc. 24. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym: A. Mieszanin poreakcyjnych (nierozdzielanych) VLDL+HDL-LP-pre- $\beta$  (ścieżka 1), VLDL+HDL (ścieżka 2), VLDL+LP (ścieżka 3), VLDL+pre- $\beta$ -HDL (ścieżka 4) oraz VLDL kontrolnych (ścieżka 5); B. Poreakcyjnych VLDL wyizolowanych ultrawiroowaniem (frakcja flotująca, Ryc. 10) z mieszanin poreakcyjnych VLDL+HDL-LP-pre- $\beta$  (ścieżka 1), VLDL+HDL (ścieżka 2), VLDL+LP (ścieżka 3), VLDL+pre- $\beta$ -HDL (ścieżka 4) oraz VLDL kontrolnych (ścieżka 5); C. Poreakcyjnych cząstek ciężkich wyizolowanych ultrawiroowaniem (frakcja opadająca na dno probówki, Ryc. 10) z mieszanin poreakcyjnych

VLDL+HDL-LP-pre- $\beta$ (ścieżka 1), VLDL+HDL (ścieżka 2), VLDL+LP (ścieżka 3) oraz VLDL+pre- $\beta$ -HDL (ścieżka 4).....	66
Ryc. 25. Zmiana zawartości FL w VLDL zmodyfikowanych w wyniku inkubacji 1. z HDL-LP-pre- $\beta$ ; 2. z natywnymi HDL; 3. z LP; 4. z frakcją pre- $\beta$ -HDL; 5. w natywnej frakcji VLDL. ....	68
Ryc. 26. Zmiana zawartości CHW w VLDL zmodyfikowanych w wyniku inkubacji 1. z mieszaniną HDL-LP-pre- $\beta$ ; 2. z natywnymi HDL; 3. z LP; 4. z frakcją pre- $\beta$ -HDL; 5. w natywnej frakcji VLDL.....	69
Ryc. 27. Szybkość hydrolizy TG w VLDL zmodyfikowanych przez różne frakcje lipoproteinowe. ....	71
Ryc. 28. Szybkość hydrolizy TG w VLDL zmodyfikowanych przez frakcję pre- $\beta$ -HDL. ....	72
Ryc. 29. Różnica między szybkością lipolizy TG przez LPL z mleka krowiego w VLDL zmodyfikowanych inkubacją z frakcjami pre- $\beta$ -HDL o niskiej i wysokiej zawartości apo A-II, i w VLDL niezmodyfikowanych.....	73
Ryc. 30. Hipotetyczny mechanizm powstawania cząstek pre- $\beta$ -HDL o różnym składzie apo A-I/apo A-II podczas reakcji HDL z błonami fosfolipidowymi (wg Wolska praca magisterska UG 2009, Wróblewska i wsp. 2009, 2010) ....	78
Ryc. 31. Korelacja między szybkością hydrolizy TG w VLDL a przyrostem w nich FL po modyfikacji z mieszaniną HDL i LP, natywną frakcją HDL, liposomami czy frakcją pre- $\beta$ -HDL.....	82



## Spis tabel

Tabela 1. Właściwości fizyczne i skład biochemiczny lipoprotein osocza .....	15
Tabela 2. Charakterystyka głównych apolipoprotein osocza .....	16
Tabela 3. Zróżnicowanie HDL wg różnych kryteriów .....	21
Tabela 4. Skład lipidowy oraz zawartość apo A-I i A-II w VLDL i HDL izolowanych metodą ultrawirowania .....	53
Tabela 5. Procentowy udział dla lipidów i białek we frakcji pre- $\beta$ -HDL.....	55
Tabela 6. Dystrybucja białek apo A-I i apo A-II we frakcjach poinkubacyjnych .....	56
Tabela 7. Rozkład apo A-I pomiędzy cząstkami Lp A-I i Lp A-I/A-II w mieszaninie HDL-LP-pre- $\beta$ oraz preparacie natywnych HDL.....	63
Tabela 8. Procentowy udział lipidów w VLDL kontrolnych oraz po reakcji z mieszaniną HDL-LP-pre- $\beta$ , preparatem HDL, liposomami lub frakcją pre- $\beta$ -HDL .....	70
Tabela 9. Procentowa zawartość apo A-I i apo A-II w cząstkach pre- $\beta$ -W-HDL i pre- $\beta$ -N-HDL, przed i po inkubacji z VLDL .....	73
Tabela 10. Procentowy udział lipidów w populacjach pre- $\beta$ -W-HDL i pre- $\beta$ -N-HDL, przed i po inkubacji z VLDL .....	74

## Wykaz stosowanych skrótów

- 2D-PAGE (ang. *two dimensional polyacrylamide gradient gel electrophoresis*) – dwukierunkowa natywna elektroforeza w gradiencie żelu poliakrylamidowego
- ABCA-1 (ang. *ATP binding cassette transporter A-1*) – transporter przez błonowy posiadający domenę wiążącą ATP typu A-1
- ABCG-1 (ang. *ATP binding cassette transporter G-1*) – transporter przez błonowy posiadający domenę wiążącą ATP typu G-1
- Apo (ang. *apolipoprotein*) – apolipoproteina
- CETP (ang. *cholesteryl ester transfer protein*) – białko przenoszące estry cholesterolu
- CHC (ang. *total cholesterol*) – cholesterol całkowity
- CHE (ang. *cholesteryl ester*) – cholesterol zestryfikowany
- ChNS (ang. *ischaemic heart disease*) – choroba niedokrwienna serca
- CHW (ang. *free cholesterol*) – cholesterol wolny, niezestryfikowany
- EL (ang. *endothelial lipase*) – lipaza endotelialna
- FL (ang. *phospholipids*) – fosfolipidy
- HDL (ang. *high density lipoproteins*) – lipoproteiny o wysokiej gęstości
- HDL+LP lub HDL-LP-pre- $\beta$  – mieszanina reakcyjna HDL z liposomami, której produktem jest frakcja pre- $\beta$ -HDL
- HDL A-I (ang. *HDL containing apo A-I without apo A-II*) – lipoproteiny HDL zawierające apo A-I, ale nie zawierające apo A-II
- HDL A-I/A-II (ang. *HDL containing both apo A-I and apo A-II*) – lipoproteiny HDL zawierające apo A-I i apo A-II
- HDL A-II (ang. *HDL containing apo A-II without apo A-I*) – lipoproteiny HDL zawierające apo A-II, ale nie zawierające apo A-I
- HDL-CH (ang. *HDL cholesterol*) – cholesterol HDL
- HDL-FL (ang. *HDL phospholipids*) – fosfolipidy HDL
- HL (ang. *hepatic lipase*) – lipaza wątrobowa
- IDL (ang. *intermediate density lipoproteins*) – lipoproteiny o pośredniej gęstości
- LCAT (ang. *lecithin:cholesterol acyltransferase*) – acylotransferaza lecytyna:cholesterol
- LDL (ang. *low density lipoproteins*) – lipoproteiny o niskiej gęstości
- LP (ang. *liposomes*) – liposomy

Lp A-I (ang. *lipoproteins containing apo A-I without apo A-II*) – lipoproteiny zawierające apo A-I, ale nie zawierające apo A-II

Lp A-I/A-II (ang. *lipoproteins containing apo A-I and apo A-II*) – lipoproteiny zawierające apo A-I i apo A-II

Lp A-II (ang. *lipoproteins containing apo A-II without apo A-I*) – lipoproteiny zawierające apo A-II, ale nie zawierające apo A-I

LP-FL (ang. *liposomal phospholipids*) – fosfolipidy liposomów

LPL (ang. *lipoprotein lipase*) – lipaza lipoproteinowa

PLTP (ang. *phospholipid transfer protein*) – białko przenoszące fosfolipidy

rHDL (ang. *reconstituted HDL*) – rekonstruowane, syntetyczne HDL

SEM (ang. *standard error of the mean*) – błąd standardowy średniej arytmetycznej

SDS (ang. *sodium dodecyl sulfate*) – siarczan dodecyłu sodu

SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gradient gel electrophoresis*) – elektroforeza w gradiencie żelu poliakrylamidowego w warunkach denaturujących

Pre- $\beta$ -HDL – nowo-powstała frakcja HDL o ruchliwości elektroforetycznej pre- $\beta$  w żelu agarozowym

Pre- $\beta$ -HDL A-I – frakcja pre- $\beta$ -HDL zawierająca tylko apo A-I

Pre- $\beta$ -HDL A-I/A-II – frakcja pre- $\beta$ -HDL zawierająca apo A-I i apo A-II

Pre- $\beta$ -HDL A-II – frakcja pre- $\beta$ -HDL zawierająca tylko apo A-II

Pre- $\beta$ -HDL-FL – fosfolipidy frakcji pre- $\beta$ -HDL

SR-BI (ang. *scavenger receptors B-I*) – receptory zmiatające klasy B typu I

TG (ang. *triacyloglycerols*) – triacyloglicerole

VLDL (ang. *very low density lipoproteins*) – lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości

VLDL-FL (ang. *VLDL phospholipids*) – fosfolipidy VLDL

VLDL+HDL+LP lub VLDL-HDL-LP-pre- $\beta$ -HDL – mieszanina reakcyjna VLDL z HDL i LP

VLDL+HDL – mieszanina reakcyjna VLDL z HDL

VLDL+LP – mieszanina reakcyjna VLDL z LP

VLDL+pre- $\beta$ -HDL – mieszanina reakcyjna VLDL z frakcją pre- $\beta$ -HDL

WKT (ang. *free fatty acids*) – wolne kwasy tłuszczowe

ZTCh (ang. *reverse cholesterol transport*) – zwrotny transport cholesterol

## Streszczenie

Obniżone stężenia zarówno cholesterolu lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL-CH), jak i apolipoproteiny (apo) A-I są czynnikami ryzyka schorzeń sercowo-naczyniowych o podłożu miażdżycowym (Asztalos i wsp. 2006). Jedną z najczęstszych przyczyn takiego niskiego stężenia HDL-CH są zaburzenia metabolizmu lipoprotein transportujących triacyloglicerole (TG) - chylomikronów i lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) (Adiels i wsp. 2008). W ostatnich latach pojawia się coraz więcej przesłanek mówiących, że jednym z czynników związanych z hipertriglicydemią i niskim poziomem HDL-CH może być apo A-II. Jak dotąd nie wyjaśniono, czy to wolna apo A-II miałyby oddziaływać z VLDL powodując ich słabszy katabolizm, czy apo A-II związana z frakcją pre- $\beta$ -HDL.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody izolacji frakcji pre- $\beta$ -HDL powstającej w wyniku reakcji HDL z liposomami, scharakteryzowanie jej, zbadanie jaki ma wpływ na skład, właściwości i lipolizę VLDL oraz czy w jej obrębie znajdują się cząstki analogiczne do natywnych pre- $\beta$ -HDL A-II.

Inkubacja liposomów fosfolipidowych z natywną frakcją HDL powodowała transfer fosfolipidów z liposomów oraz apolipoprotein z HDL do nowo-powstających cząstek pre- $\beta$ -HDL. Również cholesterol wolny z HDL ulegał przesunięciu do liposomów i frakcji pre- $\beta$ -HDL.

Praca wykazuje po raz pierwszy, że w skład nowo-powstającej frakcji pre- $\beta$ -HDL wchodzi cząstki Lp A-II, analogiczne do natywnych pre- $\beta$ -HDL A-II. Frakcja pre- $\beta$ -HDL była heterogenna. Zawierała liczne pod-podfrakcje o wielkości od 7.5 - 20.8 nm, zawierających różne proporcje apo A-I i apo A-II. Wśród cząstek o wielkościach poniżej 8.8 nm występowały cząstki zawierające wyłącznie apo A-I. Natomiast cząstki zawierające wyłącznie apo A-II stanowiły niewielką część populacji o średnicach 8.8 – 12.5 nm. Większość pod-podfrakcji pre- $\beta$ -HDL o wielkościach 8.8 – 20.8 nm zawierała obie apolipoproteiny.

Przejście fosfolipidów z liposomów, HDL lub frakcji pre- $\beta$ -HDL do VLDL, jak również utrata przez nie cholesterolu wolnego zwiększała podatność zawartych w nich TG na lipolizę przez lipazę lipoproteinową. Aktywność pro-lipolityczna frakcji pre- $\beta$ -HDL zależała również od zawartości apo A-II. Cząstki o wysokiej zawartości apo A-II obniżały, a cząstki o niskiej zawartości zwiększały podatność TG w VLDL na lipolizę.

Wskazuje to, że zmiany zawartości apo A-II i cholesterolu wolnego oraz fosfolipidów mogą w przeciwstawnym sposób regulować szybkość wewnątrznaczyniowej lipolizy TG zawartych w VLDL i prawdopodobnie w chylomikronach. Tym samym mogą stanowić istotne elementy patomechanizmów pierwotnych i wtórnych zaburzeń gospodarki lipidowej.

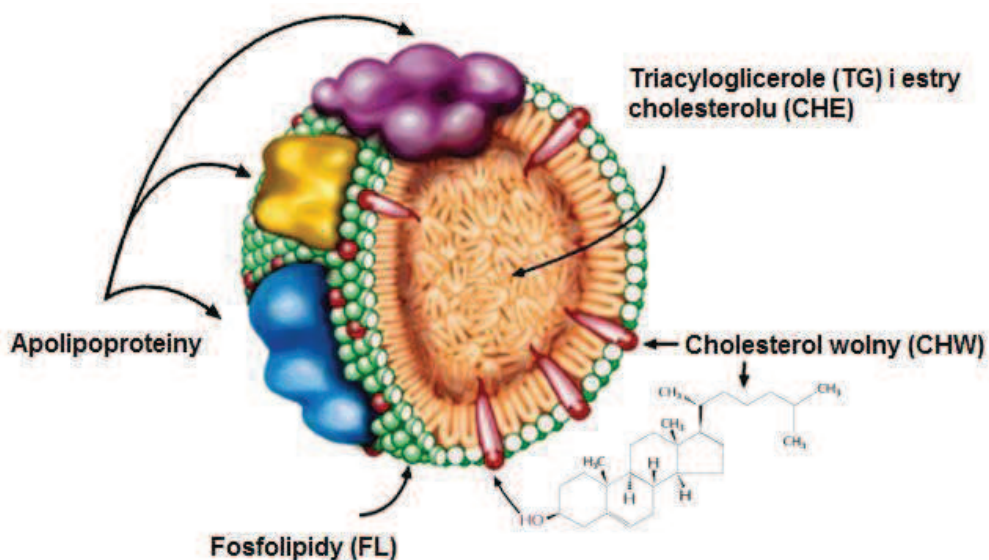
# 1. Wstęp

## 1.1. Lipoproteiny

Lipoproteiny, niestechiometryczne kompleksy białkowo-lipidowe, odpowiedzialne są za osoczowy transport lipidów (Bańkowski 2009, Nowicka 2010, Michajlik i Bartnikowska 1999).

### 1.1.1. Budowa lipoprotein

Lipoproteiny to sferyczne, przypominające micelle cząstki zbudowane z hydrofilnej warstwy białek – apolipoprotein (apo) i fosfolipidów (FL), znajdującej się bezpośrednio pod nią warstwy utworzonej z kwasów tłuszczowych pochodzących od FL i cholesterolu wolnego (CHW) oraz hydrofobowego rdzenia utworzonego przez triacyloglicerole (TG) i cholesterol zestryfikowany (CHE) (Ryc. 1) (Bańkowski 2009, Nowicka 2010, Michajlik i Bartnikowska 1999).



Ryc. 1. Ogólna budowa lipoprotein (PeptoTech 2009)

### 1.1.2. Podział lipoprotein

Lipoproteiny ze względu na gęstość właściwą dzieli się na pięć klas (Bańkowski 2009, Brousseau i wsp. 1993, Chapman i wsp. 1981, Nowicka 2010, Michajlik i Bartnikowska 1999):

- 1) chylomikrony (CHM),
- 2) lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (VLDL),
- 3) lipoproteiny o pośredniej gęstości (IDL),
- 4) lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) i
- 5) lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL).

Poszczególne klasy lipoprotein różnią się funkcjonalnymi i fizycznymi właściwościami, wynikającymi z odmiennych proporcji różnych białek i lipidów (Tabela 1 i 2) (Bańkowski 2009, Nowicka 2010, Michajlik i Bartnikowska 1999).

**Tabela 1. Właściwości fizyczne i skład biochemiczny lipoprotein osocza**

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 (nm)	500 ± 80	80 ± 30	30 ± 25	28 ± 21	13 ± 7
Ruchliwość elektroforetyczna	miejsce nałożenia	pre-β <sub>1</sub>	pre-β <sub>2</sub>	β	α
<b>Skład (% masy):</b>					
TG	80 – 90	50 – 70	20 – 25	5 – 10	3 – 5
CH	3 – 8	11 – 23	17 – 22	9 – 53	18 – 25
FL	3 – 7	15 – 20	15 – 20	20 – 22	2 – 23
apo	1 – 2	8 – 12	18 – 20	20 – 25	45 – 55
Główne białko	apo B-48	apo B-100			apo A-I i apo A-II
Funkcja	transport pobranych z pokarmem tj. egzogennych TG i CHW z jelita do tkanek obwodowych	transport syntetyzowanych w organizmie (endogennych) TG i CHW z wątroby do tkanek obwodowych			transport endogenego CHW z tkanek obwodowych do wątroby

Wg wytycznych Bańkowski 2009, Brousseau i wsp. 1993, Chapman i wsp. 1981, Kuliszkiwicz-Janus i wsp. 2006, Michajlik i Bartnikowska 1999.

Apolipoproteiny jako strukturalne składniki lipoprotein odgrywają ważną rolę w utrzymaniu ich stabilności oraz metabolizmie. Pełnią one funkcję ligandów dla receptorów lipoprotein w błonach komórkowych oraz aktywują lub hamują enzymy biorące udział w przemianach lipoprotein w osoczu (Bańkowski 2009, Kuliszkiwicz-Janus i wsp. 2006, Marenah 2008, Michajlik i Bartnikowska 1999, Nowicka 2010, Szafran i Knapik-Czajka 1994).

**Tabela 2. Charakterystyka głównych apolipoprotein osocza**

<b>Apo</b>	<b>M. cz. (kDa)</b>	<b>Stężenie w osoczu (mg/dL)</b>	<b>Miejsce syntezy</b>	<b>Obecność w lipoproteinach</b>	<b>Funkcje</b>
<b>A-I</b>	29.0	100 – 130	wątroba, jelito	CHM i HDL	Główny składnik HDL i CHM, aktywator LCAT, wiązanie z receptorem SR-B1 i ABCA1
<b>A-II</b>	17.4	30 – 40		HDL	Rola strukturalna
<b>A-IV</b>	45.0	10 – 16		CHM i HDL	Transport cholesterolu, aktywator LPL i LCAT
<b>B-48</b>	250.0	zmiennie	jelito	CHM	Rola strukturalna
<b>B-100</b>	550.0	78 – 100	wątroba	VLDL i LDL	Rola strukturalna, wiązanie z receptorem B/E
<b>C-I</b>	6.6	4 – 6	wątroba	CHM, VLDL, LDL i HDL	Aktywator LCAT
<b>C-II</b>	8.9	3 – 5			Aktywator LPL
<b>C-III</b>	8.8	12 – 14			Inhibitor LPL
<b>D</b>	20.0	10 – 20		VLDL i HDL	Nieznana
<b>E</b>	34.0	3 – 7		CHM, VLDL i HDL	Wiązanie z receptorem B/E i LRP, transport cholesterolu

Wg wytycznych Bańkowski 2009, Kuliszkiwicz-Janus i wsp. 2006, Marenah 2008, Michajlik i Bartnikowska 1999, Szafran i Knapik-Czajka 1994.



## **1.2. Lipoproteiny VLDL**

VLDL to lipoproteiny odpowiedzialne za transport lipidów endogennych z wątroby do tkanek obwodowych (Marenah 2008, Michajlik i Bartnikowska 1999, Szafran i Knapik-Czajka 1994).

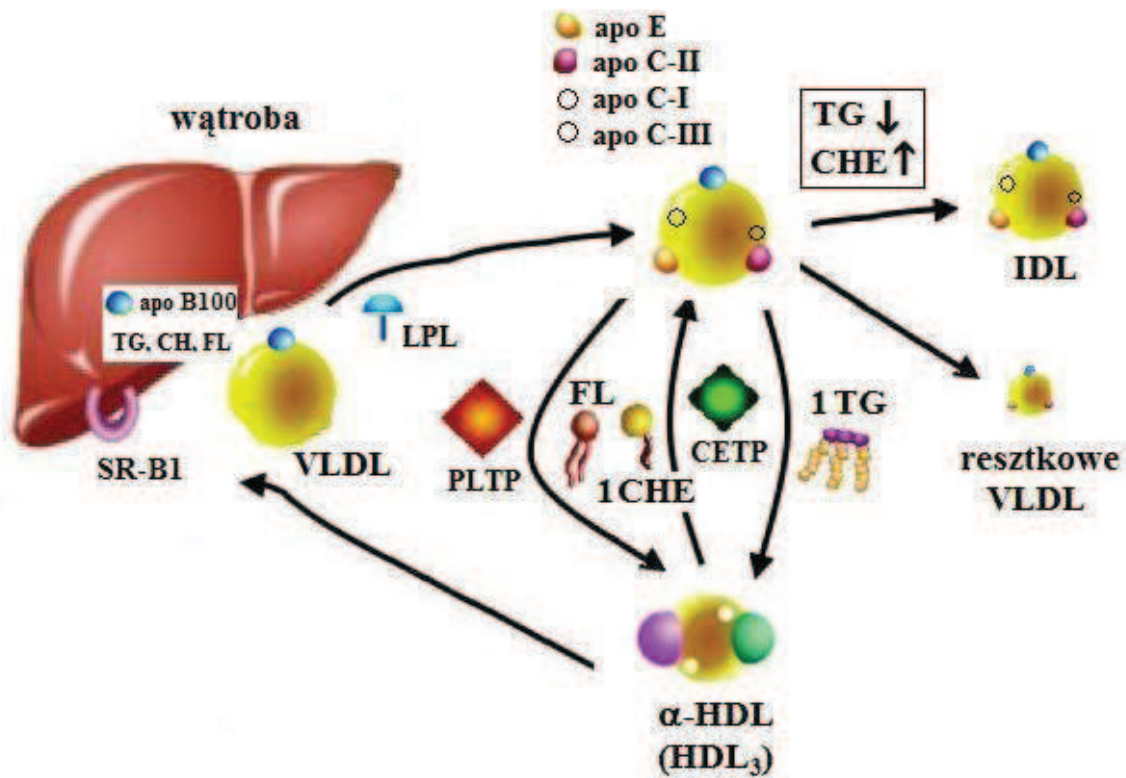
### **1.2.1. Budowa VLDL**

VLDL są największymi cząstkami spośród lipoprotein zbudowanych z endogennych lipidów. Ich średnica w zależności od ilości zawartych triacylogliceroli wynosi 30 – 80 nm. Skład stanowią w 45 – 65% triacyloglicerole, 20 – 30% cholesterol, 15 – 22% fosfolipidy i 6 – 10% białko (Bańkowski 2009, Marenah 2008, Michajlik i Bartnikowska 1999, Szafran i Knapik-Czajka 1994). VLDL zawierają 5 apolipoprotein, są to: apo B100, apo E, apo C-I, apo C-II i apo C-II (Bańkowski 2009 i Marenah 2008). VLDL wykazują w żelu agarozowym ruchliwość elektroforetyczną pre- $\beta$ . Gęstość VLDL to 0.96 – 1.006 g/mL (Bańkowski 2009 i Marenah 2008).

### **1.2.2. Metabolizm VLDL**

Lipoproteiny VLDL są syntetyzowane w hepatocytach z triacylogliceroli, cholesterolu, fosfolipidów oraz apo B100, w ciągu całej doby (Szafran i Knapik-Czajka 1994). Po wydzieleniu VLDL do naczyń krwionośnych z krążących HDL przyłączane są apo E, apo C-I, apo C-II i apo C-III, zaś cholesterol wolny przemieszcza się z VLDL do HDL (Ryc. 2). Cząstki VLDL wzbogacone w apo C-II poddawane są działaniu lipazy lipoproteinowej (LPL) odpowiedzialnej za hydrolizę triacylogliceroli. W efekcie powstają cząstki VLDL o mniejszej średnicy a większej gęstości. Pomiedzy VLDL a HDL zachodzi wymiana składników lipidowych i białkowych. Apo C-I, apo C-II i apo C-III wracają do HDL (Adiels i wsp. 2008, Bańkowski 2009, Marenah 2008). Poza tym HDL wychwytyją z VLDL fosfolipidy i triacyloglicerole. Za transport fosfolipidów odpowiada białko przenoszące fosfolipidy PLTP (van Tol 2002). Dzięki białku przenoszącemu estry cholesterolu CETP przeniesieniu jednej cząsteczki TG z VLDL do HDL zawsze towarzyszy przeniesienie 1 cząsteczki CHE z HDL do VLDL (Barter i

wsp. 1982, de Grooth i wsp. 2004). Wynikiem tych przemian jest przekształcenie się VLDL w resztkowe VLDL i frakcję pośrednią lipoprotein IDL, zawierającą równoważną ilość triacylogliceroli i cholesterolu (Ryc. 2) (Goldberg i wsp. 1996, Szafran i Knapik-Czajka 1994, Wróblewska 2009).

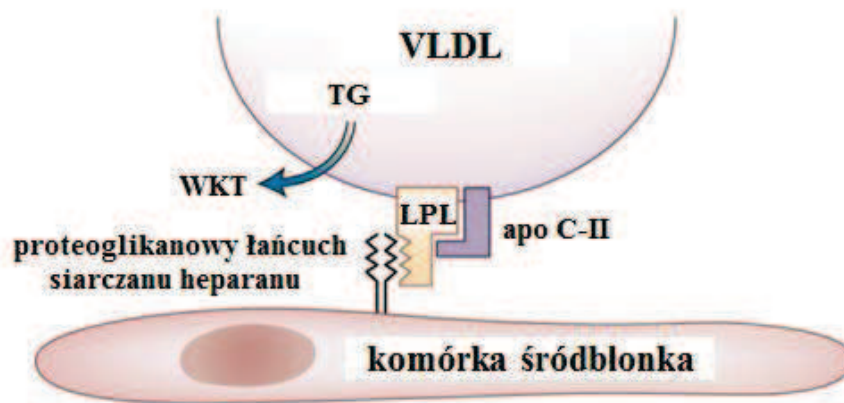


Ryc. 2. Powstawanie VLDL w wątrobie i przemiany VLDL zachodzące w osoczu (Lewis i Rader 2005, Marenah 2008, van Tol 2002, Wróblewska 2009)

### 1.2.3. Lipaza lipoproteinowa

Adipocyty i miocyty odpowiedzialne są za syntezę nieaktywnej katalitycznie LPL w formie monomeru. Następnie enzym jest transportowany do śródbłonka naczyń włosowatych, gdzie ulega związaniu poprzez proteoglikanowy łańcuch siarczanu heparanu (Havel i wsp. 1970). LPL przyjmuje wówczas formę dimeru i może oddziaływać z apo C-II, która jest niezbędna do aktywowania enzymu (Ryc.3). Inhibitorem LPL jest apo C-III (Havel 2010, Jong i wsp. 1999, Mead i wsp. 1999). Homodimer LPL - aktywna cząstka, katalizuje hydrolizę triacylogliceroli VLDL do wolnych kwasów tłuszczowych i monoacylogliceroli (Goldberg i wsp. 1996, Jong i wsp. 1999, Marenah 2008, Mead i wsp. 2002). Wolne kwasy tłuszczowe są

wychwytywane przez tkankę tłuszczową, mięśnie szkieletowe i mięsień sercowy. W tkance tłuszczowej TG są reestryfikowane i magazynowane. W mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym TG są wykorzystywane jako źródło energii. Monoacyloglicerole podlegają dalszej hydrolizie do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu, który jest pobierany przez wątrobę, mięsień sercowy i nerki. We krwi wynaczynionej aktywność LPL jest niewielka. LPL jest uwalniana do krążenia pod wpływem heparyny, jest to tzw. poheparynowa aktywność lipazy lipoproteinowej (Golberg i wsp. 1996, Marenah 2008, Szafran i Knapik-Czajka 1994, Wróblewska 2009). Działanie LPL reguluje osoczowe stężenie triacylogliceroli, a przez to VLDL oraz HDL. Mówi się także o przeciw-miażdżycowym działaniu LPL (Mead i wsp. 1999).



Ryc. 3. Oddziaływanie LPL ze śródbłonkiem naczyń krwionośnych i VLDL (Health-7 2013)

### 1.2.3.1. Brak lub niedobór lipazy lipoproteinowej czy jej aktywatora apo C-II

Defekt syntezy lub zahamowania aktywności LPL bądź apo C-II mogą być spowodowane różnego typu mutacjami genów kodujących te białka. Osoby dotknięte tymi mutacjami wykazują objawy masywnej pierwotnej hipetriglicydemii. W młodym wieku pacjenci ci chorują na nawracające zapalenie trzustki, lipemiczne zapalenie siatkówki, wykwyty ksantemiczne, wykazują powiększenie wątroby i śledziony. Jednakże, wyższe stężenia triacylogliceroli w osoczu obserwuje się w niedoborze LPL, aniżeli w niedoborze apo C-II. W obu przypadkach stężenie HDL jest obniżone. Heterozygotyczna forma niedoboru LPL występuje < 1 : 500 urodzeń, a forma

homozygotyczna < 1 : 1.000.000 urodzeń (Nowicka 2010). Bardzo rzadkie są także homozygotyczne niedobory apo C-II (Baggio 1986, Nowicka 2010). Stwierdzono, że we krwi osób mających niską poheparynową aktywność LPL występują podwyższone stężenia VLDL, a obniżone stężenia HDL. Ryzyko rozwoju miażdżycy u tych osób jest zwiększone (Nowicka i Naruszewicz 2007, Marenah 2008, Mead i wsp. 2002).

### **1.3. Lipoproteiny HDL**

HDL to lipoproteiny odpowiedzialne za zwrotny transport cholesterolu (ZTCh), tzn. transport cholesterolu wolnego niewykorzystanego przez komórki tkanek obwodowych do wątroby, skąd razem z żółcią jest wydalany z organizmu (Assmann i Nofer 2003, Nowicka i Naruszewicz 2007).

#### **1.3.1. Budowa HDL**

HDL-e spośród wszystkich klas lipoprotein są specyficzną grupą, ponieważ mają największą gęstość właściwą, największy procentowy udział białka w strukturze oraz najmniejszą średnicę. HDL w połowie składają się z białka, gdzie 90% białka całkowitego to apo A-I i apo A-II w stosunku wagowym 4 : 1 (Barter 2002, Barter i wsp. 2003, Kuliszkiewicz-Janus i wsp. 2006).

#### **1.3.2. Heterogenność HDL**

HDL są lipoproteinami jakościowo i ilościowo heterogennymi (Tabela 3), a ich podfrakcje można wyróżnić ze względu na (Barrans i wsp. 1996, Barter 2002, Barter i wsp. 2003, Kuliszkiewicz-Janus 2006):

- gęstość,
- wielkość,
- kształt,
- ładunek determinujący ruchliwość w żelu agarozowym oraz
- zawartość apo A-I i/lub apo A-II.

**Tabela 3. Zróżnicowanie HDL wg różnych kryteriów**

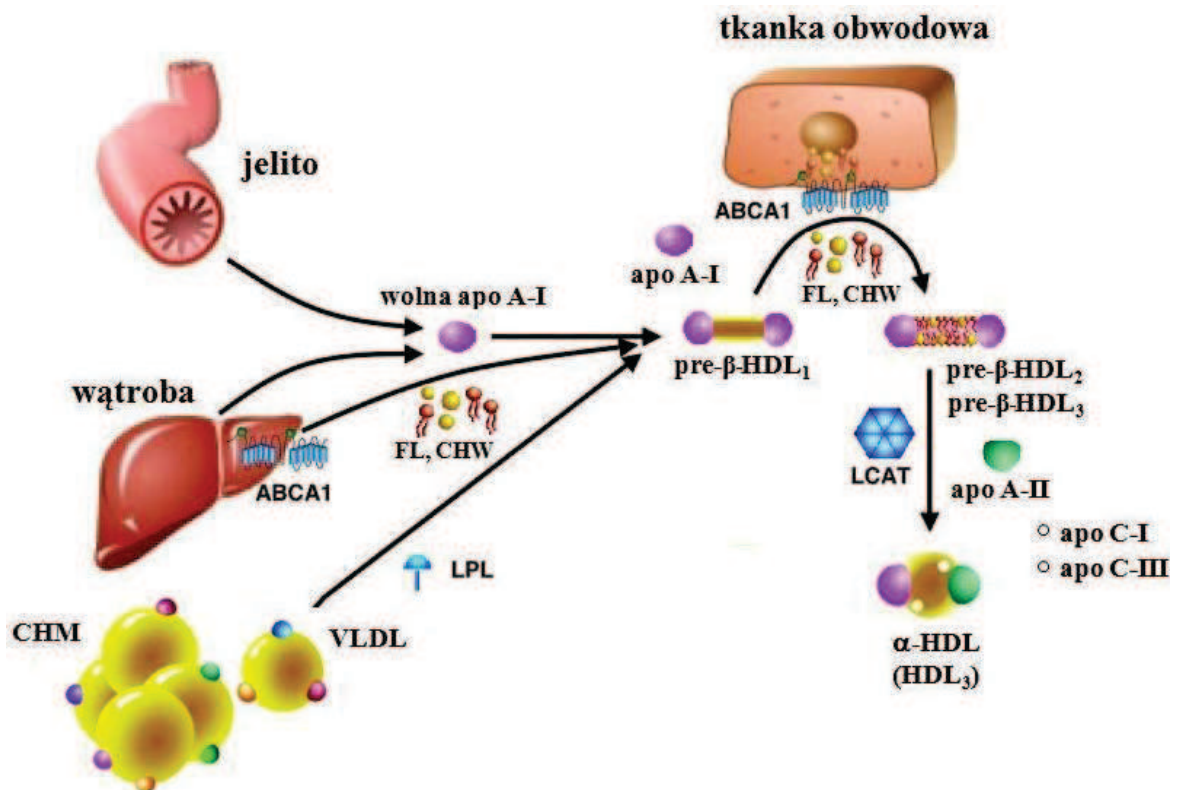
Ultrawiórowanie		Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym			Elektroforeza w żelu agarozowym	Chromatografia powinowactwowa
Fracja	Gęstość [g/mL]	Podfrakcja	Średnica [nm]	Kształt	Ruchliwość elektroforetyczna	Zawartość apo
<b>HDL<sub>2</sub></b>	1.063 – 1.1	<b>HDL<sub>2b</sub></b>	12.9 – 9.7	sferyczny	$\alpha$ -HDL	HDL A-I, HDL A-I/A-II, HDL A-II
	1.1 – 1.125	<b>HDL<sub>2a</sub></b>	9.7 – 8.7			
<b>HDL<sub>3</sub></b>	1.125 – 1.21	<b>HDL<sub>3a</sub></b>	8.7 – 8.1	sferyczny	$\alpha$ -HDL	HDL A-I, HDL A-I/A-II HDL A-II
		<b>HDL<sub>3b</sub></b>	8.1 – 7.7			
		<b>HDL<sub>3c</sub></b>	7.7 – 7.2			
<b>VHDL</b>	1.21 – 1.25	<b>pre-<math>\beta</math><sub>1</sub></b>	5.2 – 6.6	dyskowy	pre- $\beta$ -HDL	HDL A-I
		<b>pre-<math>\beta</math><sub>2</sub></b>	12.0 – 14.0			
		<b>pre-<math>\beta</math><sub>3</sub></b>				

Wg wytycznych Barrans i wsp. 1996, Barter 2002, Barter i wsp. 2003, Kuliszkiwicz-Janus 2006, Nofer 2007.

### 1.3.3. Metabolizm HDL

W powstawaniu HDL istotną rolę odgrywają cząstki wolnej apo A-I. Wolna apo A-I jest wydzielana do krążenia z hepatocytów i enterocytów oraz uwalniana z VLDL i CHM podczas lipolizy katalizowanej przez LPL oraz z dojrzałych cząstek HDL ( $\alpha$ -HDL) podczas ich przemian zachodzących w osoczu (Assmann i Nofer 2003, Barter 2002, Rye i Barter. 2004, Lewis i Rader 2005, Rey i wsp. 1999). Białko to reaguje z transporterem przezbłonowym typu A1, należącym do klasy białek z kasetą wiążącą ATP (transportery ABCA1). W wyniku tego oddziaływania wychwytywane są fosfolipidy i cholesterol wolny z błon komórkowych tkanek obwodowych i razem z apo A-I tworzone są małe dyskowe lipoproteiny o ruchliwości w żelu agarozowym pre- $\beta$

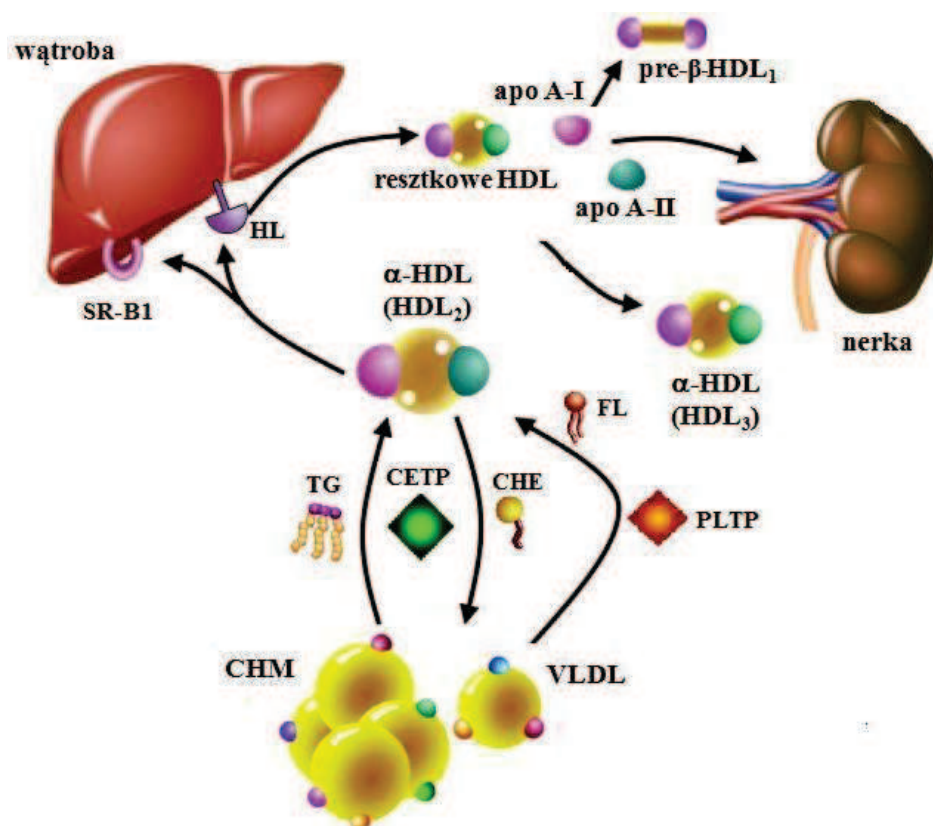
(pre- $\beta$ -HDL<sub>1</sub>) (Lewis i Rader 2005, Oram 2003, Owen i Mulcahy 2002, Rye i Barter 2004). Dalszy wychwyty lipidów przez cząstki pre- $\beta$ -HDL<sub>1</sub> powoduje zwiększenie ich masy. Takie bogato-lipidowe dyskowe cząstki nazywane są pre- $\beta$ -HDL<sub>2</sub>, pre- $\beta$ -HDL<sub>3</sub>. Cząstki te są substratem dla enzymu katalizującego estryfikację cholesterolu wolnego – LCAT. W jej wyniku powstaje hydrofobowy rdzeń utworzony przez estry cholesterolu. W ten sposób, dyskowe cząstki pre- $\beta$ -HDL<sub>2</sub> i pre- $\beta$ -HDL<sub>3</sub> są przekształcane w kuliste, dojrzałe cząstki HDL<sub>3</sub> poruszające się w żelu agarozowym z ruchliwością  $\alpha$  ( $\alpha$ -HDL) (Barrans i wsp. 1996, Barter 2002 i Hime i wsp. 2006). LCAT jest także niezbędny do włączania do tych cząstek apo A-II, apo C-I i apo C-III (Ryc. 4). Mniej więcej połowa kulistych HDL zawiera apo A-I i apo A-II (HDL A-I/A-II) (Asztalos i wsp. 2007, Blanco-Vaca i wsp. 2001, Lewis i Ryder 2005, Rye i wsp. 1999, Wróblewska 2009).



Ryc. 4. Powstawanie cząstek pre- $\beta$ -HDL i  $\alpha$ -HDL (Asztalos i wsp. 2007, Blanco-Vaca i wsp. 2001, Lewis i Rader 2005, Rye i wsp. 1999)

Cząstki HDL<sub>3</sub> wiążą się z wątrobowymi receptorami SR-B1. Wynikiem tego jest selektywny wychwyty estrów cholesterolu przez hepatocyty (Ryc. 5). Ważną rolę w przemianach HDL<sub>3</sub> odgrywa wychwyty przez nie fosfolipidów i triacylogliceroli z lipoprotein bogatych w te ostatnie lipidy tj. VLDL i CHM. Transport fosfolipidów

pomiędzy HDL<sub>3</sub> a VLDL i CHM możliwy jest dzięki białku przenoszącemu fosfolipidy - PLTP (van Tol 2002). Cząstki HDL<sub>3</sub> akceptują również cholesterol wolny z VLDL, który jest estryfikowany przez LCAT, a następnie przenoszony przez białko transportujące estry cholesterolu - CETP do VLDL. Transport ten jest dwukierunkowy tzn. każdej cząsteczce cholesterolu zestryfikowanego odprowadzonej z HDL<sub>3</sub> towarzyszy transport jednej cząsteczki triacyloglicerolu z VLDL do HDL<sub>3</sub> (Ryc. 5). Zawartość triacylogliceroli w cząstce HDL<sub>3</sub> wzrasta, przez co ulegają one przekształceniu w cząstki HDL<sub>2</sub> (Barter 2002, La Goff i wsp. 2004, Lewis i Ryder 2005, Rye i wsp. 1999). HDL<sub>2</sub> są substratem dla lipazy wątrobowej - HL, która hydrolizując triacyloglicerole i fosfolipidy zmniejsza ich wielkość. W wyniku tych przemian generowane są resztkowe  $\alpha$ -HDL, które są katabolizowane w nerkach lub ulegają fuzji z krążącymi HDL<sub>3</sub> (Wróblewska 2009). Dochodzi także do uwolnienia apo A-I, która może generować nowe cząstki pre- $\beta$ -HDL<sub>1</sub>, ponownie włączając się w cząstki HDL<sub>3</sub> (Barter 2002, Goldberg 1996, Rye i Barter 2004, Rye i wsp. 1999) czy też być degradowana w nerce (Ryc. 5) (Lewis i Ryder 2005, Liang 1994).



Ryc. 5. Przemiany HDL zachodzące w osoczu (Barter 2002, La Goff i wsp. 2004, Lewis i Rader 2005, Rye i wsp. 1999, van Tol 2002, Wróblewska 2009)

### **1.3.4. Powstawanie HDL zawierających apo A-II**

#### **1.3.4.1. Cząstki pre- $\beta$ -HDL A-II**

W osoczu ludzi zdrowych ok. 90% puli apo A-II jest związane z HDL. Niewielkie jej ilości stwierdzono w cząstkach VLDL (Blanco-Vaca 2001). Łańcuchy białkowe apo A-II zaraz po syntezie ulegają wewnątrzkomórkowej dimerylizacji i związaniu z lipidami. Przyjmują one formę dysku apo A-II (pre- $\beta$ -HDL A-II), które są wydzielane z komórek (Gillard 2009). U ludzi zdrowych nie stwierdzono takich pre- $\beta$ -HDL A-II. Natomiast obecność tej formy wykazano u ludzi z wrodzonym brakiem LCAT (Asztalos i wsp. 2007). Co więcej cząstki pre- $\beta$ -HDL A-II wykryto u transgenicznych myszy z nadprodukcją ludzkiej apo A-II (Fournier i wsp. 2002).

W Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej GUMed po raz pierwszy wykazano, że w wyniku inkubacji ultrawirowanych HDL i roztworu LP z lecytyny jaja kurzego dochodzi do tworzenia nowej frakcji lipidowej o ruchliwości w żelu agarozowym pre- $\beta$  zawierającej w swym składzie apo A-II (Wróblewska i wsp. 2009). Mało tego, połowa apo A-II uwolnionej z HDL wiązała się z LP (Wróblewska i wsp. 2009, 2010).

#### **1.3.4.2. Cząstki HDL A-I/A-II**

Mechanizm powstawania dojrzałych cząstek HDL A-I/A-II pozostaje niewyjaśniony. Część pre- $\beta$ -HDL A-II powinna ulegać przekształceniu w cząstki kuliste HDL A-II, a reszta budować cząstki HDL A-I/A-II. Niestety wiadomo, że LCAT nie reaguje z pre- $\beta$ -HDL A-II, a więc nie dochodzi do tworzenia hydrofobowego rdzenia nadającego cząstkom kształt kulisty (Forte i wsp. 1995). Przypuszcza się, że mechanizm włączania cząstek pre- $\beta$ -HDL A-II do  $\alpha$ -HDL A-I/A-II zachodzi bardzo szybko. Badania Hime i wsp. (2006) wykazały, że wolne apo A-II oraz rekonstruowane pre- $\beta$ -HDL A-II (rHDL) po wstrzyknięciu dożylnie królikom natychmiast ulegały fuzji z kulistymi  $\alpha$ -HDL A-I, powodując formowanie się cząstek  $\alpha$ -HDL A-I/A-II. Rye i wsp. (1999) w swoich badaniach *in vitro* wykazali, że dojrzałe cząstki HDL A-I/A-II powstają na skutek łączenia się dyskowych HDL A-II z kulistymi HDL A-I oraz, że proces ten odbywa się przy udziale LCAT. W badaniach na hodowlach komórkowych wykryto, że wydzielana *de novo* apo A-II już po 30 min. jest wbudowywana w cząstki



$\alpha$ -HDL A-I/A-II (Gillard i wsp. 2009). Ponadto przedstawiono hipotezę, wg której wolne apo A-II może wypierać apo A-I z  $\alpha$ -HDL A-I, i przez to tworzyć cząstki  $\alpha$ -HDL A-I/A-II (Hime i wsp. 2006). Zdolność apo A-II do wypierania apo A-I z HDL tłumaczy się dużo wyższym powinowactwem apo A-II do fosfolipidów (Rosseneu i wsp. 1981). Dwie cząsteczki apo A-II wypierają z HDL jedną cząsteczkę apo A-I (Lagocki i Scanu 1980). Co więcej, szybkość powstawania apo A-II jest czynnikiem regulującym dystrybucję apo A-I między dojrzałymi cząstkami HDL A-I i HDL A-I/A-II (Ikewaki i wsp. 1995).

### **1.3.5. Promiażdżycowe właściwości apo A-II**

Rola apo A-II w rozwoju miażdżycy jest wciąż niewyjaśniona. Na podstawie doświadczeń na transgenicznym myszom apo A-II uznano za białko promiażdżycowe. U myszy z wbudowanym genem ludzkiej apo A-II stwierdzono nasilenie powstawania zmian miażdżycowych spowodowanych dietą bogatą w tłuszcze (Escolà-Gil i wsp. 1998). Zachorowalność na miażdżycę myszy z wbudowanym genem ludzkiej apo A-I i apo A-II była 15 razy większa niż u myszy, które miały wbudowany tylko gen ludzkiej apo A-I (Schultz i wsp. 1993). Nadekspresja ludzkiej apo A-II u transgenicznym myszy skutkowało obniżeniem u nich poziomu cholesterolu HDL (Julve i wsp. 2002). Mysie HDL zawierające apo A-II traciły swoje właściwości antyoksydacyjne i antyzapalne, poprzez wyparcie z nich paraoksanazy 1 (PON-1) (Castellani i wsp. 1997).

Są także wyniki badań na transgenicznym myszom, które przeczą promiażdżycowej roli apo A-II. Fournier i wsp. (1997) porównali osocze myszy niemodyfikowanych i myszy z wbudowanym genem ludzkiej apo A-II. Stwierdzili, że u tych drugich generowane cząstki pre- $\beta$ -HDL A-II zdolne są do większego wychwytu cholesterolu wolnego z błon komórkowych mysich makrofagów linii J774. Apo A-II, podobnie jak apo A-I, dodana do hodowli komórkowej oddziałuje z transporterem przezbłonowym ABCA1 i wychwytuje lipidy z błon komórkowych (Forte i wsp. 1995). Badania epidemiologiczne jednoznacznie wskazują istnienie odwrotnej korelacji między stężeniem apo A-II w osoczu, a odległym ryzykiem zachorowania na miażdżycę (Birjmohun i wsp. 2007, Winkler i wsp. 2008).

### **1.3.5.1. Wpływ apo A-II na metabolizm HDL**

Apo A-II wpływa na metabolizm HDL, ich stężenie i skład. Na podstawie badań eksperymentalnych wiadomo, że apo A-II stabilizuje cząstki HDL, w wyniku hamowania aktywności HL i zależnej od CETP dysocjacji ubogiej w lipidy apo A-I (Rye i wsp. 2003). Ponadto u transgenicznych myszy apo A-II hamuje przemiany HDL, które zachodzą na skutek działania EL (Broedl i wsp. 2006). Badania z rekonstruowanymi HDL A-I/A-II wykazują, że oddysocjowanie wolnej apo A-I z takiej cząstki jest niemożliwe, podczas gdy z rHDL A-I przeciwnie. Przypuszcza się, że związane jest to z powstawaniem wiązań jonowych pomiędzy apo A-I i apo A-II. Również oddziaływanie LCAT z takimi cząstkami rHDL A-I/A-II jest obniżone. Apo A-II poprzez silne wiązanie apo A-I w HDL A-I/A-II może wpływać na zdolność HDL do aktywowania ZTC (Rye i wsp. 2003). Myszy z wyłączonym genem apo A-II charakteryzują się obniżonym o połowę stężeniem cholesterolu HDL oraz cząstkami HDL o mniejszych rozmiarach (Weng i Breslow 1996). Natomiast myszy z nadekspresją ludzkiego genu apo A-II cechują się podwyższonym stężeniem cholesterolu HDL, które dodatnio koreluje ze stężeniem apo A-II w osoczu (Hedrick i wsp. 1993).

### **1.3.5.2. Wpływ apo A-II na metabolizm VLDL**

Ostatnio pojawiła się hipoteza, wg której apo A-II mogłaby wpływać na metabolizm lipoprotein transportujących triacyloglicerole, czyli VLDL i chylomikronów (Dugué-Pujol i wsp. 2006, Castellani i wsp. 2008). Na podstawie wyników badań na myszach transgenicznych z nadekspresją ludzkiego genu apo A-II wykazano, że zwierzęta te stają się otyłe i rozwija się u nich insulinooporność oraz hipertriglicerydemia (Dugué-Pujol i wsp. 2006). Castellani i wsp. (2008) w badaniach na tych samych myszach stwierdzili, że apo A-II może przemieszczać się z HDL do VLDL powodując słabszy katabolizm tych ostatnich poprzez hamowanie aktywności LPL. U królików, które nie mają apo A-II, po dożylnym jego wstrzyknięciu, podwyższa się stężenie TG w osoczu. Sugeruje to, że apo A-II wiążąc HL i LPL zmniejsza ich dostępność dla substratów (Dugué-Pujol i wsp. 2006). Spowolnienie katabolizmu lipoprotein bogatych w triacyloglicerole w wyniku działania apo A-II, powoduje spadek

podąży fosfolipidów i cholesterolu wolnego do HDL<sub>2</sub>, a przez to do obniżenia stężenia  $\alpha$ -HDL (Blanco-Vaca i wsp. 2001, Dugué-Pujol i wsp. 2006). Osoby chore na rodzinną hiperlipidemię złożoną mają podwyższone stężenia apo A-II, mimo niskiego poziomu cholesterolu HDL, które korelują z ich stężeniami triacylogliceroli i cholesterolu w osoczu (Allayee i wsp. 2003).

Zasadniczą luką powyższych doniesień jest brak koncepcji w jakiej postaci apo A-II mogłaby być transportowana pomiędzy lipoproteinami HDL i VLDL. Nie wiadomo, czy hamowanie katabolizmu TG następuje po wbudowaniu się apo A-II do VLDL, czy też jest wynikiem interakcji cząstek pre- $\beta$ -HDL A-II w proces lipolizy.

## 2. Cel

Celem pracy było zbadanie oddziaływania frakcji pre- $\beta$ -HDL na skład, właściwości i lipolizę VLDL. Cel ten został zrealizowany poprzez:

- izolację frakcji pre- $\beta$ -HDL, będącej produktem reakcji HDL z liposomami lecytynowymi,
- charakterystykę frakcji pre- $\beta$ -HDL,
- wykazanie obecności we frakcji pre- $\beta$ -HDL cząstek Lp A-II,
- zbadanie wpływu frakcji pre- $\beta$ -HDL, mieszaniny HDL z liposomami, natywnej frakcji HDL oraz liposomów na skład, właściwości i szybkość lipolizy TG w VLDL.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Odczynniki i zestawy odczynnikowe

Aceton	POCH, Polska
Agarozą	BDH Chemicals, Anglia
Akrylamid	Bio-Rad, Polska
Amonu siarczan	POCH, Polska
Amonu nadsiarczan (APS)	Bio-Rad, Polska
Azotan błękitu tetrazolowego (NBT)	Sigma-Aldrich, Polska
Bis-akrylamid	Bio-Rad, Polska
Błękit bromofenolowy	Bio-Rad, Polska
$\beta$ -merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, Polska
Bufory D i R oraz suplementy do pomiarów stężeń apo A-I i apo A-II w surowicy	Siemens Healthcare Diagnostics, Polska
Chloroform	POCH, Polska
Czerń amidowa	POCH, Polska
Czerń Sudan	BDH, England
Dimetyloformamid (DMF)	Merck, Polska
Fosforan bromo-chloro-indolu (BCIP)	Sigma-Aldrich, Polska
Gliceryna	POCH, Polska
Glicyna	POCH, Polska
Glikol etylenowy	POCH, Polska
Etanol	POCH, Polska
Heksan	POCH, Polska
Heparyna	Sigma-Aldrich, Polska
Heptan	POCH, Polska
Izopropanol	POCH, Polska
Kalibrator do pomiarów apo A-I i apo A-II (N-apolipoprotein Standard Serum)	Siemens Healthcare Diagnostics, Polska
Surowica kontrolna (Apolipoprotein Control Serum)	Siemens Healthcare Diagnostics, Polska
Kwas borny	Sigma-Aldrich, Polska

Kwas 5.5-dietylobarbiturowy	Fluka AG, Polska
Kwas octowy 99.5-99.9%	POCH, Polska
Lipaza lipoproteinowa z mleka krowiego	Sigma-Aldrich, Polska
Magnezu chlorek	POCH, Polska
Manganu chlorek	POCH, Polska
Metanol	POCH, Polska
Mleko odłuszczone granulowane	Spółdzielnia Mleczarska w Gostyniu, Polska
N, N, N', N'- tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Bio-Rad, Polska
Potasu bromek	POCH, Polska
Repel-Silane ES	GE Healthcare, Polska
Siarczan dodecyłu sodu (SDS)	Bio-Rad, Polska
Sodu azydek	POCH, Polska
Sodu chlorek	POCH, Polska
Sodu cytrynian	POCH, Polska
Sól sodowa heparyny	Sigma-Aldrich, Polska
Sól sodowa kwasu 5.5-dietylobarbiturowego	Fluka AG, Polska
Tlenek glinowy standaryzowany do chromatograficznej analizy adsorpcyjnej o stopniu aktywności I	Sigma-Aldrich, Polska
Tris(hydroksymetylo)aminometan (TRIS)	POCH, Polska
Triton X-100	Merck, Polska
Tween 20	Bio-Rad, Polska
Wzorzec białek niskocząsteczkowych LMW	Bio-Rad, Polska
Wzorzec białek wysokocząsteczkowych HMW	GE Healthcare, Polska
Zestawy odczynnikowe do enzymatycznego oznaczania stężenia cholesterolu całkowitego	Pointe Scientific, Polska
Zestawy odczynnikowe do enzymatycznego oznaczania stężenia cholesterolu wolnego	DiaSys, Niemcy
Zestawy odczynnikowe do enzymatycznego oznaczania stężenia fosfolipidów	WAKO Diagnostics, USA
Zestawy odczynnikowe do enzymatycznego oznaczania triacylogliceroli	Pointe Scientific, Polska
Zestawy odczynnikowe do enzymatycznego oznaczania	Randox, United Kingdom

wolnych kwasów tłuszczowych

Żele poliakrylamidowe – Mini Protean TGX Precast  
Gels

Bio-Rad, Polska

### 3.2. Przeciwciała

Koźmie przeciwciała poliklonalne przeciwko ludzkiej  
apo A-I i apo A-II do immunodetekcji metodą  
Western blot

Sigma-Aldrich, Polska

Przeciwciała poliklonalne przeciwko ludzkiej apo A-I  
i apo A-II, do pomiarów stężeń apo A-I i apo A-II  
metodą immunonefelometryczną oraz do  
immunoelktroforezy rakietowej

Siemens Healthcare  
Diagnostics, Polska

Koźmie przeciwciała skompleksowane z fosfatazą  
alkaliczną przeciwko przeciwciałom króliczym

Sigma-Aldrich, Polska

### 3.3. Bufory i roztwory podstawowe

- I bufor dializacyjny HDL i frakcji pre- $\beta$ -HDL (100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.1%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4),
- II bufor dializacyjny HDL i frakcji pre- $\beta$ -HDL, bufor dializacyjny VLDL, bufor do zawieszania LP oraz VLDL (100 mM Tris-HCl, 0.1%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4),
- roztwór 5% cytrynianu sodu do rozpuszczania osadu pre- $\beta$ -HDL,
- 0.9% NaCl o  $d=1.006$  g/mL,
- roztwór KBr o  $d=1.042$  g/mL,
- roztwór KBr o  $d=1.21$  g/mL,
- roztwór heparyny 5000 U/L,
- 2 M  $\text{MnCl}_2$ ,
- odczynnik heparyna-mangan wytrącający lipoproteiny zawierające apo B (stosunek objętościowy heparyny 5000 U/L do 2 M  $\text{MnCl}_2$  równy 1 : 1.25)

### 3.4. Bufory i roztwory do technik elektroforetycznych

- Bufor do elektroforezy w żelu agarozowym (100 mM Tris-Barbital, 0.01%  $\text{NaN}_3$ , pH 8.6),
- Bufor do żelu poliakrylamidowego zagęszczającego do 2D-PAGE (236 mM Tris- $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH 6.9).
- Bufor do żelu poliakrylamidowego rozdzielającego do 2D-PAGE i bufor elektrodowy do PAGE (160 mM kwas borny, 189 mM siarczan amonu, 27 mM EDTA, 0.2%  $\text{NaN}_3$  pH 8.0).
- Bufor elektrodowy do 2D-PAGE (90 mM Tris-HCl, 125 mM kwas borny, 3.2 mM EDTA, 0.01 %  $\text{NaN}_3$ , pH 8.4).
- Bufor elektrodowy do SDS-PAGE (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyna, 0.1% SDS, pH 8.3)
- Bufor do obciążania próbek do rozdzielania metodą PAGE (62.5 mM Tris-HCl, 33% glicerol, 0.005% błękit bromofenolowy (v/v), pH 6.8).
- Bufor do obciążania próbek do rozdzielania metodą SDS-PAGE (60 mM Tris-HCl, 10% glicerol, 2% SDS, 0.005% błękit bromofenolowy (v/v), pH 6.8).
- Bufor do elektrotransferu (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% metanol pH 8.3).
- 30% roztwór akrylamid/bis akrylamid (stosunek objętościowy akrylamidu do bis-akrylamidu równy 36.5 : 1),
- 10% roztwór nadsiarczanu amonowego (APS),
- 1% roztwór błękitu bromofenolowego,
- 0.05% roztwór czerni amidowej,
- 0.5% roztwór czerni sudanowej w glikolu etylenowym,
- Odbarwiacz (5% metanol, 7% kwas octowy),
- Zestaw do elektroforezy agarozowej Hydragel LIPO + Lp(a) firmy Sebia,
- Zestaw do immunoelektroforezy rakietowej Hydragel Lp A-I firmy Sebia.

### 3.5. Odczynniki do metody Western blot

- Roztwór soli fizjologicznej buforowanej Trisem – TBS (2 mM Tris-HCl, 14 mM NaCl, 0.01%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4),
- 5% Tween 20,



- Odczynnik blokujący miejsca wiążące białko na błonie celulozowej PVDF oraz roztwór inkubacyjny przeciwciała (odtłuszczone 0.5% mleko w TBS),
- Roztwór płuczący (0.05% Tween 20 w TBS),
- Roztwór surowicy specyficznej dla analizowanego antygeny (anty apoA-I lub anty apoA-II), rozcieńczonej roztworem inkubacyjnym w stosunku objętościowym 1 : 1000,
- Roztwór surowicy specyficznej anty-IgG sprzężonej z fosfatazą alkaliczną, rozcieńczonej roztworem inkubacyjnym w stosunku objętościowym 1 : 10000,
- Bufor do fosfatazy alkalicznej (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 9.5),
- 5% roztwór BCIP w 100% DMF,
- 5% roztwór NBT w 70% DMF,
- Roztwór substratu dla fosfatazy alkalicznej (30 mL buforu do fosfatazy alkalicznej + 198 μL roztworu NBT + 99 μL roztworu BCIP),
- Roztwór przerywający reakcję (20 mM EDTA w TBS).

### 3.6. Materiały

Bibuła filtracyjna 3MM i 1MM	Whatman, Polska
Błona Immobilon wiążąca białka z fluorku poliwinylidenu (PVDF)	Millipore Corporation, USA
Płytki aluminiowe z żelem krzemionkowym 60F <sub>254</sub> do chromatografii cienkowarstwowej	Merck, Polska
Probówki wirówkowe poliwęglanowe grubościennie o poj. 3.5 mL	Beckman Coulter, USA
Probówki wirówkowe polialomerowe zatapialne o poj. 3.5 mL	Beckman Coulter, USA
Woreczki dializacyjne	Sigma-Aldrich, Polska

### 3.7. Sprzęt

Aparat do elektroforezy pionowej Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, Polska
Aparat do elektroforezy poziomej dwukierunkowej	Kucharczyk, Techniki

Aparat do elektroforezy poziomej K20	Elektroforetyczne, Polska
Aparat do elektrotransferu „mokrego” Biotrans	Sebia, Francja
Aparat do elektrotransferu „mokrego” Mini Protean 3 Cell	Kucharczyk, Techniki Elektroforetyczne, Polska
Aplikator do nakładania próbek na żel K20	Bio-Rad, Polska
Cieplarka BD 115	Sebia, Francja
Czytnik testów ELISA typu fluorometrycznego ETI-MAX 3000	Binder, USA
Homogenizator ultradźwiękowy HD z sondą KE76	DiaSorin, Niemcy
Inkubator do żeli IS 80	Bandelin Electronic, Niemcy
Łaźnia wodna, typ 357	Sebia, Francja
Mieszadło magnetyczne bezsilnikowe	Elpan, Polska
Mieszadło Vortex Genie 2	DHN-Wabel, Polska
Mikser do żelu poliakrylamidowego	Scientific Industries
Nefelometr laserowy	Beckman, USA
Pehametr	Dade Behring, Niemcy
Spektrofotometr UV-VIS Helios Beta	Mera-Elmat, Polska
Ścinarka do probówek Beckman	Unicam, Anglia
Termostat	Beckman Coulter, USA
Ultrawirówka Beckman TLX Optima z rotorem kątowym TLA100.3	Epoll
Waga analityczna AS 60/20/C/2	Beckman Coulter, USA
Waga analityczna WPS 36/C	Radwag, Polska
Wirówka MiniSpin Plus	Radwag, Polska
Wirówka MPW-223e	Eppendorf AG, Niemcy
Wytrząsarka laboratoryjna stołowa	MPW, Polska
Wytwornica lodu AF 80	Elpin Plus, Polska
Zasilacz EV231	Scotsman, Włochy
Zasilacz MG 300	Consort, Belgia
Zasilacz Power Pac 3000	Sebia, Francja BioRad, USA

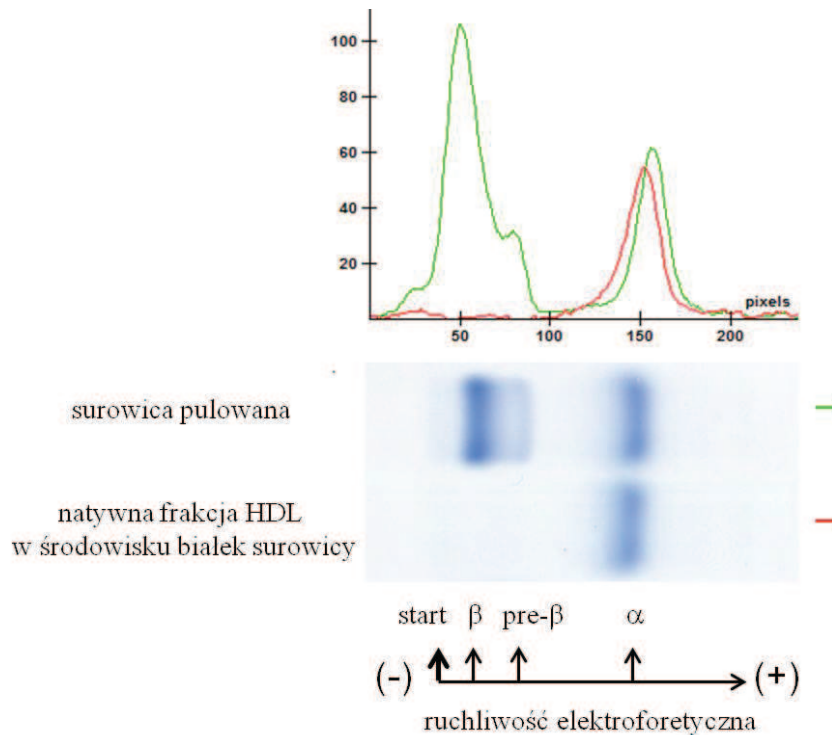
### 3.8. Surowica

Pulowaną surowicę uzyskiwano ze zlewek pozostających po wykonaniu badań laboratoryjnych w Akademickim Centrum Medycyny Laboratoryjnej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego (UCK) Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed), pochodzących od osób zdrowych, pracowników GUMed i UCK kierowanych na badania okresowe oraz studentów GUMed. Do badań kwalifikowano próbki, w których stężenia lipidów wynosiły: TG<150 mg/dL (preparatyka HDL) lub TG>150 mg/dL (preparatyka VLDL), CHC<250 mg/dL, HDL-CH>40 mg/dL, LDL-CH<100 mg/dL a stężenie glukozy było <100 mg/dL. Surowice na obecność hemolizy kontrolowano w autoanalyzerze Abbott ci 8000. Próbki ze śladami hemolizy wykluczano z badań. Materiał był zbierany w dniu pobrania krwi. Na wykorzystanie surowic pozostających po badaniach rutynowych uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do spr. Badań Naukowych przy GUMed o nr NKEBN/8/2009, a studenci dodatkowo podpisali dobrowolną zgodę zaakceptowaną przez komisję.

#### 3.8.1. Preparatyka HDL

Populację cząstek HDL zawierającą dojrzałe HDL o ruchliwości elektroforetycznej  $\alpha$  w żelu agarozowym, uzyskiwano z pulowanej surowicy (Ryc. 6) metodą dwustopniową będącą połączeniem wytrącania i ultrawierowania (Wróblewska i wsp. 2009). W pierwszym etapie z surowicy wytrącano lipoproteiny zawierające apo B, heparyną i  $MnCl_2$  (końcowe stężenia odpowiednio 200 U/mL i 90 mM). Całość inkubowano w temp. pokojowej z cyklicznym wytrząsaniem przez 30 min., po czym wirowano przy 10.000 obr./min. przez 20 min. Otrzymany supernatant zawierający natywną frakcję HDL (Ryc. 6) w środowisku białek surowicy zlewano, doprowadzając do gęstości 1.21 g/mL poprzez dodanie stałego KBr, rozlewano w porcjach 2 mL do probówek otwartych Beckman o poj. 3.5 mL i wirowano przez 3 godz. w temp. 15°C, przy 89.000 obr./min, akceleracji (acc) 5, deakceleracji (decc) 9. Zebrane frakcje HDL (Ryc. 7) dializowano kolejno wobec 100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.1%  $NaN_3$  pH 7.4,

a następnie wobec 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4. Obie dializy prowadzono przez ok. 20 godz. w temp. 4 - 8°C z ciągłym mieszaniem.



**Ryc. 6. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym surowicy pulowanej i natywnej frakcji HDL w środowisku białek surowicy wraz z analizą densytometryczną.**

Surowicę pulowaną i natywną frakcję HDL w środowisku białek surowicy rozdzielano w żelu agarozowym firmy Sebia i wybarwiano na obecność lipidów (pkt. 3.19.1), po czym przeprowadzano analizę densytometryczną (pkt. 3.22). Obraz jest reprezentatywny dla 18 doświadczeń.

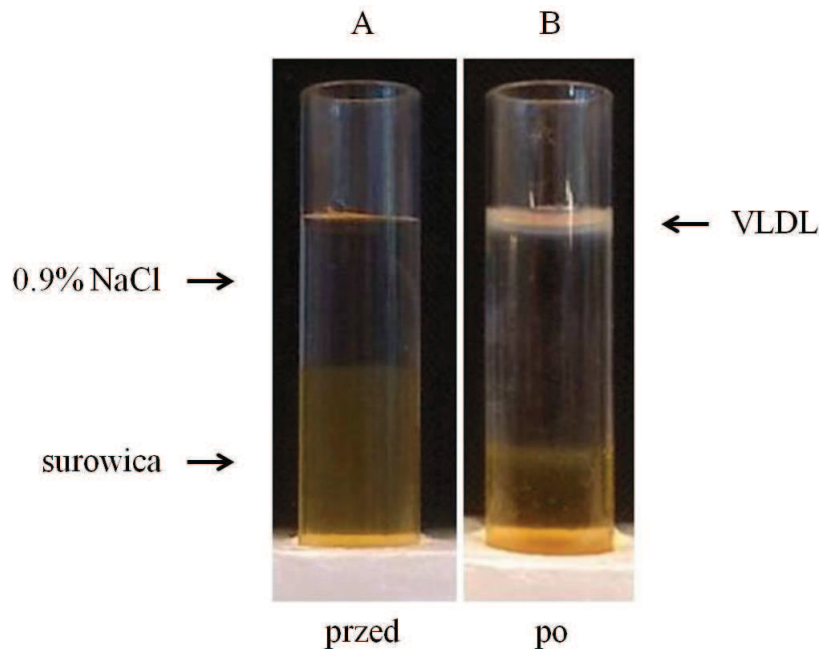


**Ryc. 7. Rozdział HDL od białek surowicy metodą ultrawierowania.**

Natywną frakcję HDL w środowisku białek surowicy doprowadzono do gęstości 1.21 g/mL za pomocą stałego KBr i ultrawierowano 3 godz., w temp. 15°C, przy 89.000 obr./min., acc 5, decc 9. Obraz jest reprezentatywny dla 18 doświadczeń.

### 3.8.2. Preparatyka VLDL

Na próbki surowic o objętości 1.8 mL nawarstwiano po 1.2 mL 0.9% NaCl o gęstości 1.006 g/mL (Ryc. 8 A) i ultrawirowano przez 1.15 godz., w temp. 4°C, przy 100.000 obr./min., acc 5, dec 9. Zebrane frakcje VLDL (Ryc. 8 B) dializowano przez ok. 16 godz. w temp. 4 - 8°C z ciągłym mieszaniem w 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4.



**Ryc. 8. Izolacja VLDL metodą ultrawirowania; A. Obraz przed ultrawirowaniem, po nawarstwieniu na surowicę 0.9% NaCl o gęstości 1.006 g/mL; B. Obraz po ultrawirowaniu.**

Obraz jest reprezentatywny dla 18 doświadczeń.

### 3.9. Izolacja lecytyny z jaja kurzego

Lecyтынę uzyskaną ze świeżych kurzych jaj izolowano metodą chromatografii na kolumnie z tlenkiem glinu, zgodnie z procedurą opisaną przez Singletona i wsp. (1965). Z 6 jaj otrzymywano jednorazowo od ok. 7 do ok. 9 g lecytyny. Porcje lecytyny zawieszano w heksanie i przechowywano w temp. -70°C. Czystość lecytyny badano za pomocą metody chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żelalem krzemionkowym w układzie rozwijającym chloroform : metanol : kwas octowy : woda w stosunku 6 : 3 : 0.8 : 0.4.

### **3.10. Preparatyka liposomów**

Na podstawie procedury opisanej przez Huanga (1969) z lecytyny otrzymywano małe jednowarstwowe liposomy (SUV). Porcje lecytyny odparowywano w atmosferze azotu przemywając ją 99.8% etanolem w celu usunięcia potencjalnie obecnej śladowej ilości wody. Suche lipidy zalewano buforem 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4 i pozostawiano na ok. 16 godzin w temp. pokojowej bez dostępu światła w celu spęcznienia. Po wymieszaniu zawiesiny fosfolipidów pozostawiano ją do dalszego spęcznienia na 60 min., po czym przenoszono do naczynia do sonikacji, umieszczonego w lodzie i sonikowano w atmosferze azotu 4 razy po 5 min. (sonikator Bandelin HD 2070 z sondą KE 76, sonikacja ciągła, moc sonikatora około 10 - 20%). Uzyskane w ten sposób liposomy (LP) wirowano przy 14.000 obr./min., przez 30 min., w temp. 10°C w celu pozbycia się zanieczyszczeń tytanowych pochodzących z sondy. Gotowe LP przechowywano do 7 dni w temp 4 - 8°C, w atmosferze azotu. Stężenie fosfolipidów w LP wynosiło średnio około 5895 ± 183.8 mg/dL (średnia ± SEM dla 5 doświadczeń).

### **3.11. Inkubacja preparatu HDL z liposomami**

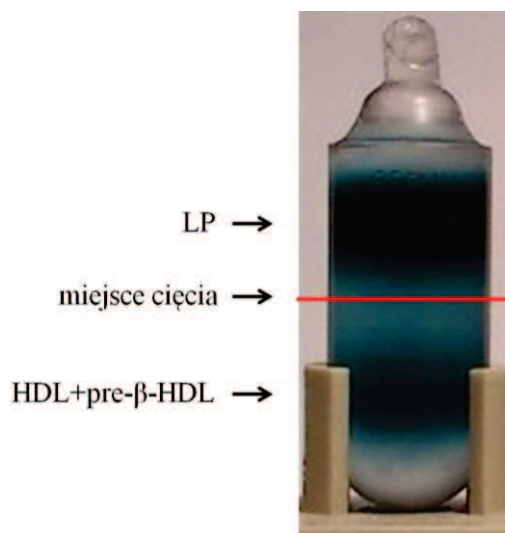
Preparaty HDL, zawiesinę LP i bufor 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4 doprowadzano do temp. 37°C. Preparaty HDL mieszano z LP (HDL+LP) w taki sposób, żeby przy tej samej końcowej objętości mieszanin uzyskać wyjściowe wagowe proporcje fosfolipidów LP do fosfolipidów HDL (LP-FL/HDL-FL) równe 5 : 1. Kontrole stanowiły LP i preparaty HDL rozcieńczone odpowiednio buforem 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4. Inkubację prowadzono przez 60 min. w temp. 37°C. Reakcję przerywano umieszczając próbki w lodzie na 5 min.

### **3.12. Izolacja frakcji pre-β-HDL będącej produktem reakcji HDL i liposomów**

#### **3.12.1. Rozdział HDL i frakcji pre-β-HDL od liposomów metodą ultrawierowania**

Mieszaninę reakcyjną preparatu HDL i zawiesiny LP (HDL+LP) doprowadzano do gęstości 1.042 g/mL, poprzez dodanie stałego KBr, po czym po 1.5 mL rozporcjowywano do probówek zatapialnych Beckman o poj. 3.5 mL. Do końcowej objętości probówki nawarstwiano roztwór KBr o gęstości 1.042 g/mL i wirowano przez

5 godz. w temp. 4°C, przy 100.000 obr./min., acc 5, decc 9. Po zakończonym wirowaniu i 15 min. odstaniu probówki w statywie wykonywano cięcie (Ryc. 9). Zebrane dolne frakcje HDL i pre-β-HDL (HDL+pre-β-HDL) dializowano kolejno wobec 100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4, oraz 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4. Obie dializy prowadzono przez ok. 20 godz. w temp. 4 - 8°C z ciągłym mieszaniem.



**Ryc. 9. Rozdział HDL z nowo-powstałą frakcją pre-β-HDL od liposomów metodą ultrawirowania w gęstości  $d=1.042$  g/mL.**

Obraz po ultrawirowaniu mieszaniny reakcyjnej HDL+LP wybarwionych na obecność lipidów (pkt. 3.4). Obraz jest reprezentatywny dla 10 doświadczeń.

### **3.12.2. Wytrącanie frakcji pre-β-HDL z wyizolowanej mieszaniny preparatu HDL i frakcji pre-β-HDL**

Nowo-powstałą frakcję pre-β-HDL wytrącano, z wyizolowanej wcześniej metodą ultrawirowania mieszaniny preparatu HDL i frakcji pre-β-HDL (HDL+pre-β-HDL), za pomocą heparyny i CaCl<sub>2</sub> (końcowe stężenia odpowiednio 440 U/mL i 40 mM) (Wróblewska i wsp. 2009). Po 30 min. inkubacji w temp. pokojowej powstały precypitat odwirowywano przy 6.000 obr./min., przez 20 min., w temp. 10°C. Supernatanty HDL zlewano, natomiast osady pre-β-HDL przepłukiwano 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4 z dodatkiem heparyny i CaCl<sub>2</sub> (w końcowych stężeniach takich jakie stosowano do precypitacji), w celu usunięcia ewentualnych pozostałości HDL i ponownie odwirowywano przy 6.000 obr./min., przez 20 min., w temp. 10°C. Tak

uzyskane osady frakcji pre- $\beta$ -HDL rozpuszczano w 5% roztworze cytrynianu sodu z dodatkiem 0.1% NaN<sub>3</sub>, w objętości 10-cio krotnie mniejszej niż objętość mieszaniny HDL+pre- $\beta$ -HDL, co pozwalało na uzyskanie znacznego zagęszczenia frakcji pre- $\beta$ -HDL. Rozpuszczony osad frakcji pre- $\beta$ -HDL dializowano kolejno wobec 100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4, oraz 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4. Obie dializy prowadzono przez ok. 20 godz. w temp. 4 - 8°C z ciągłym mieszaniem.

### **3.13. Otrzymywanie mieszanin reakcyjnych preparatu VLDL z HDL i/lub LP**

Preparaty VLDL i HDL, zawiesinę LP i bufor 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4 doprowadzano do temp. 37°C. Preparaty VLDL mieszano z HDL i liposomami (VLDL+HDL+LP) w taki sposób, żeby przy tej samej końcowej objętości mieszanin uzyskać wyjściowe wagowe proporcje fosfolipidów LP do fosfolipidów HDL i do fosfolipidów VLDL (LP-FL/HDL-FL/VLDL-FL) równe 25 : 5 : 1. Analogicznie przygotowywano mieszaniny inkubacyjne VLDL z preparatem HDL (VLDL+HDL) oraz VLDL z zawiesiną LP (VLDL+LP), z tym, że brak trzeciego składnika mieszaniny zastępowano buforem 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4, w taki sposób, żeby objętość końcowa była taka sama jak mieszaniny VLDL+HDL+LP. Kontrolę stanowiły VLDL rozcieńczone odpowiednio buforem 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4. Inkubację prowadzono przez 60 min. w temp. 37°C. Reakcję przerywano umieszczając próbki w lodzie na 5 min.

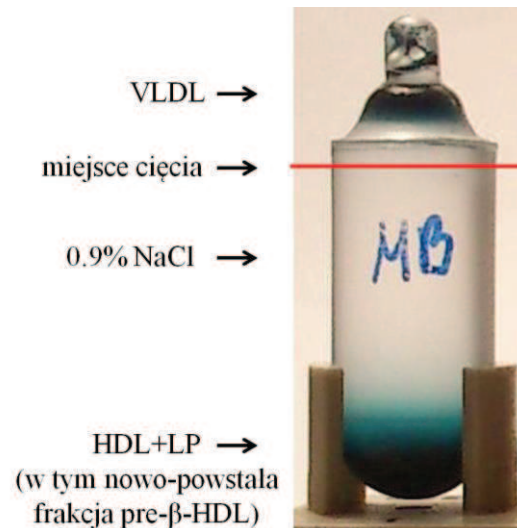
### **3.14. Otrzymywanie mieszaniny reakcyjnej preparatu VLDL z frakcją pre- $\beta$ -HDL**

Preparat VLDL, frakcję pre- $\beta$ -HDL oraz bufor 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4 doprowadzano do temp. 37°C. Preparat VLDL mieszano z frakcją pre- $\beta$ -HDL (VLDL+pre- $\beta$ -HDL) w taki sposób, żeby przy tej samej końcowej objętości mieszaniny uzyskać wyjściowe wagowe proporcje fosfolipidów pre- $\beta$ -HDL do fosfolipidów VLDL (pre- $\beta$ -HDL-FL/VLDL-FL) równe 5 : 1. Kontrolę stanowiły preparaty VLDL rozcieńczone odpowiednio buforem 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4. Inkubację prowadzono przez 60 min. w temp. 37°C. Reakcję przerywano umieszczając próbki w lodzie na 5 min.



### 3.15. Izolacja preparatów VLDL zmodyfikowanych

Preparaty VLDL zmodyfikowane w wyniku inkubacji z preparatem HDL (VLDL+HDL), zawiesiną LP (VLDL+LP), mieszaniną HDL i LP (VLDL+HDL+LP), frakcją pre- $\beta$ -HDL (VLDL+pre- $\beta$ -HDL) oraz 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4 (VLDL kontrolne) izolowano metodą ultrawierowania. Do probówek zatapialnych Beckman przenoszono mieszaniny reakcyjne w objętości ok. 1 mL, na co nawarstwiano do pełnej objętości probówki 0.9% NaCl o gęstości 1.006 g/mL i wirowano przez 2 godz. 15 min., w temp. 4°C, przy 100.000 obr/min., acc 5, decc 9. Po zakończonym wirowaniu i odstaniu probówki 15 min. w statywie wykonywano cięcie (Ryc. 10). Frakcje górne i dolne pulowano i poddawano analizie.



**Ryc. 10. Izolacja VLDL z mieszaniny preparatu HDL i liposomów.**

Obraz po ultrawierowaniu w gradiencie gęstości mieszaniny reakcyjnej VLDL+HDL+LP wybarwionej na obecność lipidów (pkt. 3.4). Obraz jest reprezentatywny dla 18 doświadczeń.

### 3.16. Ocena lipolizy TG w preparatach VLDL

Preparaty VLDL, wyizolowane z mieszanin reakcyjnych VLDL+HDL+LP, VLDL+HDL, VLDL+LP, VLDL+pre- $\beta$ -HDL oraz VLDL kontrolnych (rozdział 3.15) doprowadzano do takiego samego stężenia TG poprzez dodanie 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4 i poddawano działaniu lipazy lipoproteinowej z mleka krowiego wg opisu Castellani i wsp. (2008) tak, aby stężenie końcowe enzymu w próbce wynosiło 24

µg/mL. Lipolizę prowadzono przez 60 min. w temp. 37°C, po czym hamowano reakcję poprzez umieszczanie próbek w lodzie i dodanie mocznika w końcowym stężeniu 2 M.

Ocenę lipolizy przeprowadzono w oparciu o pomiar stężenia WKT w VLDL niemodyfikowanych, jak i VLDL zmodyfikowanych w wyniku inkubacji z mieszaniną HDL+LP, preparatem HDL, zawiesiną LP oraz frakcją pre-β-HDL. Stężenie WKT uwolnionych w wyniku hydrolizy wykorzystywano do wyznaczenia ilości zhydrolizowanych TG w preparatach VLDL przyjmując, że 3 mole WKT odpowiadają 1 molowi zhydrolizowanych TG.

### 3.17. Oznaczanie stężeń lipidów

Stężenia FL, CHC, CHW, TG i WKT oznaczano manualnie za pomocą metod enzymatycznych. Absorbancje prób odczytywano z użyciem spektrofotometru UV-VIS Helios Beta, za wyjątkiem WKT, których absorbancje mierzono w aparacie ETI MAX 3000. Stężenie badanego lipidu wyliczano na podstawie wzoru:

$$C_{próbki} = \frac{A_{próbki}}{A_{wzorca}} \cdot C_{wzorca} \cdot \frac{V_{próbki} + V_{odczynnika}}{V_{wzorca} + V_{odczynnika}} \cdot \frac{V_{wzorca}}{V_{próbki}}$$

A – absorbancja, C – stężenie, V – objętość

Wartości stężeń CHE wyliczano na podstawie różnicy stężeń CHW i CHC.

### 3.18. Oznaczanie stężeń apolipoprotein

Stężenia apolipoprotein A-I i A-II oznaczano manualnie metodą immunochemiczną. Dla każdego pomiaru przeprowadzono wielopunktową kalibrację poprzez rozcieńczanie kalibratora do oznaczeń apo A-I i apo A-II za pomocą 100 mM Tris-HCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> pH 7.4 odpowiednio 5, 10, 20, 40, 80 i 160 razy. Preparaty HDL i frakcje pre-β-HDL rozcieńczano do 40 razy, w zależności od oczekiwanych stężeń apolipoprotein. Odczynniki do pomiarów apolipoprotein przygotowywano mieszając swoiste dla każdego z przeciwciał odczynniki dodatkowe (tzw. suplementy), przeciwciała poliklonalne, bufory D i R w proporcjach objętościowych 1 : 4 : 8 : 8. Przygotowany odczynnik mieszano i inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej. Do

210  $\mu$ L odczynnika dodawano 10 lub 40  $\mu$ L badanej próbki, odpowiednio do oznaczeń apo A-I i apo A-II. Po wymieszaniu próbki i jej 30 min. inkubacji w temp. pokojowej dokonywano pomiaru światła rozproszonego z użyciem nefelometru laserowego (Behring Laser Nephelometer, Niemcy). Przy użyciu programu GraphPad Prism 4.03 z wykresów wzorcowych odczytywano stężenie apolipoprotein.

### **3.19. Metody elektroforetyczne**

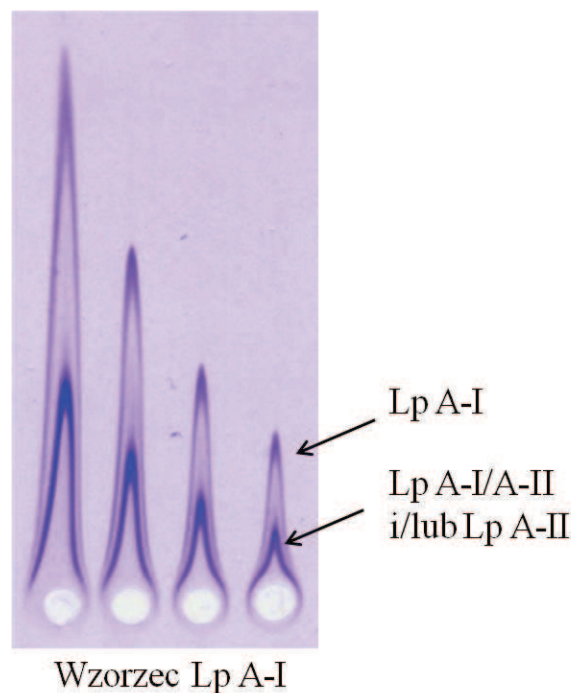
#### **3.19.1. Elektroforeza lipoprotein w żelu agarozowym**

Do rozdzielania elektroforetycznego lipoprotein i frakcji pre- $\beta$ -HDL w żelu agarozowym używano zestawów Hydragel LIPO + Lp(a) firmy Sebia. Zestaw zawiera: gotowe do użycia żele agarozowe (agarozą 0.8 g/dL, pH 7.5), roztwór stężony do przygotowania buforu do elektroforezy (pH 8.2), roztwór stężony do przygotowania czerni Sudan (pH 8.2), roztwór stężony do przygotowania roztworu płuczącego (pH 8.8), gotowe do użycia aplikatory do nakładania próbek oraz cienkie bibuły. Roztwór odbarwiający przygotowuje się poprzez zmieszanie 99.8% alkoholu etylowego z wodą dejonizowaną w stosunku objętościowym 45% : 55%. Rozdział elektroforetyczny lipoprotein i frakcji pre- $\beta$ -HDL oraz procedurę wybarwienia lipidów prowadzi się wg protokołu firmy Sebia.

#### **3.19.2. Ilościowe pomiary cząstek Lp A-I metodą immunoelektroforezy raketowej**

Wykrywanie i ilościowe pomiary cząstek Lp A-I w preparatach HDL, mieszaninach HDL+LP i frakcji pre- $\beta$ -HDL, przeprowadzono za pomocą immunoelektroforezy raketowej z użyciem zestawów Hydragel Lp A-I firmy Sebia. Zestaw zawiera: liofilizowaną ludzką surowicę wzorcową o znanym stężeniu Lp A-I, roztwór stężony do przygotowania buforu do elektroforezy [Tris-glicyna- kwas 2-(N-morfolino)-etanosulfonowy (MES) pH 7.8], roztwór stężony do przygotowania barwnika roboczego (fiolet kwasowy 0.2 g/dL, 3.5% glikol etylenowy, pH 2), roztwór stężony do przygotowania odbarwiacza (kwas cytrynowy 0.8 g/dL, 20% etanol) oraz gotowe do użycia żele agarozowe zawierające przeciwciała przeciwko ludzkiej apo A-I i apo A-II. Przeciwciał anty apo A-II w żelach agarozowych jest więcej niż przeciwciał

anty apo A-I. Kompleksy wielkocząsteczkowe przeciwciał anty apo A-II z cząstkami mającymi w swym składzie apo A-II (Lp A-II i Lp A-I/A-II) tworzone są w pobliżu miejsca nałożenia próbki, natomiast kompleksy wielkocząsteczkowe przeciwciał anty apo A-I z cząstkami zawierającymi apo A-I (Lp A-I) ulegają dalszej migracji. Wysokość raket cząstek Lp A-I jest proporcjonalna do stężenia apo A-I w tych cząstkach (Ryc. 11). Immunoelktroforezę preparatów lipoprotein i frakcji pre- $\beta$ -HDL oraz wybarwienie prowadzono wg instrukcji firmy Sebia. Przed rozdzieleniem próbki o wysokich stężeniach apo A-I były dodatkowo rozcieńczane 0.9% NaCl. Surowicę wzorcową o stężeniu apo A-I wynoszącym 0.36 g/L rozpuszczano w 0.5 mL wody dejonizowanej i rozcieńczano 30, 50, 100 i 200 razy za pomocą 0.9% NaCl (Ryc. 11). Immunoelktroforezę prowadzono przez 4 godz. przy stałym napięciu 50 V, przy użyciu aparatu K20 firmy Sebia. W oparciu o rozdziały serii rozcieńczeń wzorca wyznaczano krzywą kalibracyjną, względem której odczytywano stężenia apo A-I w cząstkach Lp A-I badanych próbek.



**Ryc. 11. Rozdział wzorca cząstek Lp A-I w żelu agarozowym firmy Sebia metodą immunoelktroforezy raketowej.**

Próbki wzorca przed nałożeniem na żel rozcieńczano 0.9% NaCl 30, 50, 100 i 200-krotnie. Obraz jest reprezentatywny dla 9 doświadczeń.

Na podstawie analizy elektroforegramów oraz całkowitej ilości apo A-I w próbkach wyliczono jaka część apo A-I w próbkach badanych tworzy cząstki Lp A-I, a jaka Lp A-I/A-II. Procentową zawartość apo A-I w cząstkach Lp A-I obliczono wg wzoru:

$$\% \text{ ilość apo A-I w cząstkach Lp A-I} = \frac{\mu\text{g apo A-I w cząstkach Lp A-I}}{\mu\text{g apo A-I w badanej próbce}} \times 100\%$$

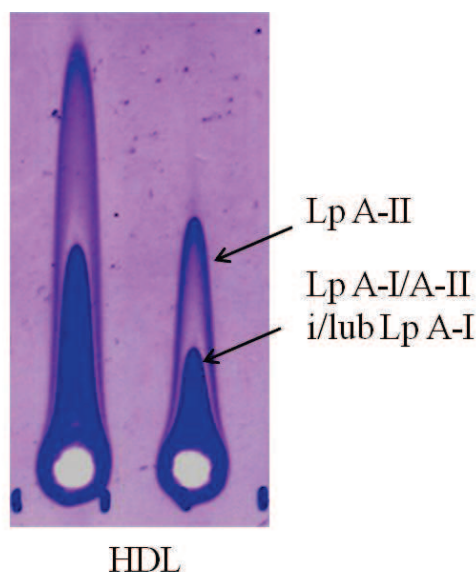
Procentową zawartość apo A-I w cząstkach Lp A-I/A-II obliczono wg wzoru:

$$\% \text{ ilość apo A-I w cząstkach Lp A-I/A-II} = 100\% - \% \text{ ilość apo A-I w cząstkach Lp A-I}$$

### **3.19.3. Detekcja cząstek Lp A-II w mieszaninie HDL+LP oraz preparacie HDL za pomocą własnej modyfikacji immunoelektroforezy raketowej**

Detekcję cząstek Lp A-II w mieszaninach HDL+LP oraz preparatach HDL przeprowadzano za pomocą własnej modyfikacji immunoelektroforezy raketowej wg Laurell (1972), którą opracowano na podstawie pracy Swaney'a i wsp. (1984). Płytki do immunoelektroforezy przygotowywano dodając do 0.9% żelu agarozowego w buforze 100 mM Tris-Barbital pH 8.6 (schłodzonego do temp. 56°C) przeciwciał anty apo A-I i anty apo A-II w stosunku objętościowym 8.75 : 1. Żel wylewano na folię poliestrową i po jego zestaleniu wykonywano dołki, do których наносzono 5 µL objętości próbek. Przed rozdzieleniem próbek o wysokich stężeniach apo A-II były dodatkowo rozcieńczane 0.9% NaCl. Kompleksy wielkocząsteczkowe przeciwciał anty apo A-I z cząstkami zawierającymi apo A-I (Lp A-I/A-II i/lub Lp A-I) tworzone są w pobliżu miejsca nałożenia próbki, natomiast kompleksy wielkocząsteczkowe przeciwciał anty apo A-II z cząstkami mającymi w swym składzie apo A-II (Lp A-II) ulegają dalszej migracji (Ryc. 12). Immunoelektroforezę prowadzono przez 3 godz. przy stałym napięciu 75 V w buforze do elektroforezy Tris-glicyna- kwas 2-(N-morfolino)-etanosulfonowy (MES) pH 7.8 firmy Sebia, przy użyciu aparatu K20 tej firmy. Po zakończeniu elektroforezy przeciwciała niezwiązane z antygenami były 3-krotnie wypłukiwane z żelu za pomocą 0.9% NaCl przez 30 min., przy czym przed rozpoczęciem płukania i przy każdej zmianie roztworu płuczącego woda była mechanicznie wyciskana z żelu agarozowego poprzez obciążanie masą 1 kg przez 30 min. Procedurę barwienia i odbarwiania żelu

prowadzono używając odczynników firmy Sebia z zestawu Hydragel Lp A-I (pkt. 3.19.2).



**Ryc. 12. Rozdział preparatu HDL w żelu agarozowym firmy Sebia metodą immunoelektroforezy raketowej.**

Preparat HDL przed nałożeniem na żel rozcieńczano 0.9% NaCl 2 i 4-krotnie. Obraz jest reprezentatywny dla 6 doświadczeń.

#### **3.19.4. Opracowanie warunków immunoelektroforezy raketowej dla identyfikacji cząstek Lp A-II we frakcji pre- $\beta$ -HDL**

Uwidocznienie cząstek Lp A-II we frakcji pre- $\beta$ -HDL wymagało zwiększenia stosunku przeciwciał anty apo A-I do anty apo A-II. W tym celu zmodyfikowano, metodę immunoelektroforezy raketowej na obecność cząstek Lp A-II (pkt. 3.18.3). Aby ograniczyć migrację w żelu agarozowym wielkocząsteczkowych kompleksów zawierających apo A-I (Lp A-I/A-II i/lub Lp A-I) i umożliwić dalszy rozdział kompleksów zawierających tylko apo A-II (Lp A-II) do 0.9% żelu agarozowego dodano 75 razy więcej przeciwciał anty apo A-I, aniżeli przeciwciał anty apo A-II. Wydłużono czas prowadzonej immunoelektroforezy raketowej do 4 godz. pozostawiając napięcie prądu wynoszące 75 V oraz bufor firmy Sebia (MES) (pkt. 3.19.3). Próbkę frakcji pre- $\beta$ -HDL nakładano na żel w ilości 5  $\mu$ L.

### **3.19.5. Elektroforeza pionowa w gradiencie żelu poliakrylamidowego w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)**

Gotową płytkę z żelem poliakrylamidowym o liniowym gradiencie 4 – 20% firmy Bio-Rad umieszczano w aparacie do elektroforezy pionowej Mini Protean 3 Cell. Elektroforezę wstępną prowadzono przez 15 min. przy stałym napięciu 25 V, po której nakładano wzorzec LMW (pkt. 3.24) oraz próbki frakcji pre- $\beta$ -HDL natywnej i zmodyfikowanej oddziaływaniem z VLDL. Próbki mieszano z buforem obciążającym w stosunku objętościowym 1 : 1 (pkt. 3.4). Rozdział w żelu zagęszczającym odbywał się przy stałym napięciu 70 V przez 30 min., natomiast rozdział w żelu rozdzielającym przy 155 V przez 40 – 50 min. w temp. pokojowej. Po zakończonej elektroforezie przeprowadzano elektrotransfer białek na błonę PVDF (pkt. 3.20).

### **3.19.6. Elektroforeza dwukierunkowa w układzie agaroz – 2 - 25% gradient żelu poliakrylamidowego w warunkach niedenaturujących (2D-PAGE)**

Elektroforezę dwukierunkową prowadzono wg zmodyfikowanej procedury opisanej przez Huang i wsp. (1995). W pierwszym kierunku prowadzono elektroforezę w 0.75% żelu agarozowym w 100 mM buforze Tris-Barbital, pH 8.6, przy spadku napięcia na żelu 10 V/cm przez 1.5 godz. w aparacie do elektroforezy poziomej z wbudowaną chłodnicą przepływową utrzymującą temp. rozdziału ok. 10 - 12°C. Rozdział kontrolowano zabarwiając badaną próbkę nasyconym roztworem czerni Sudan (pkt. 3.4). W drugim kierunku prowadzona była elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w aparacie do elektroforezy horyzontalnej Subdna (Kucharczyk, Techniki Elektroforetyczne, Polska) z wbudowaną chłodnicą przepływową, utrzymującą temp. rozdziału ok. 10 - 12°C. Liniowy gradient żelu poliakrylamidowego w zakresie 2 – 25% formowano z użyciem miksera (Beckman, USA). Po zakończeniu pierwszego rozdziału wycinano pasek żelu agarozowego i przenoszono na warstwę żelu zagęszczającego. Obok nanoszono wzorzec HMW (pkt. 3.23) zabarwiony błękitem bromofenolowym (pkt. 3.4). Podczas rozdziału prowadzonego przy stałym napięciu 100 V przez 60 min. próbki z 0.75% żelu agarozowego wnikały do 3% żelu zagęszczającego, po czym dalszy rozdział odbywał się przy stałym napięciu 160 V w temp. 10 - 12°C przez 17 godz. (około 2700 Vh).

### **3.20. Elektrotransfer lipoprotein z żelu poliakrylamidowego na błonę PVDF**

Elektrotransfer prowadzono przez 24 godz., w temp. 4 - 8°C, przy stałym napięciu 30 V w aparacie Biotrans (Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Polska) lub Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, Polska), w zależności od rozmiaru żelu. Dla żeli, w których próbki rozdzielano w warunkach denaturujących elektrotransfer prowadzono j. w., ale przez 8 godz.

Po zakończonym elektrotransferze część błony zawierającej rozdzielone próbki oddzielano od części błony z rozdzielonym wzorcem, a następnie poddawano immunodetekcji. Natomiast błonę ze wzorcem HMW barwiono przez 3 godz. w roztworze czerni amidowej i odbarwiano tło w roztworze odbarwiacza (pkt. 3.4). Na koniec błonę suszono w strumieniu ciepłego powietrza. Błonę ze wzorcem LMW od razu po zakończonym elektrotransferze suszono w strumieniu ciepłego powietrza.

### **3.21. Immunodetekcja apolipoprotein A-I i A-II na błonach PVDF metodą Western blot**

Immunodetekcję apolipoprotein A-I i A-II na błonach PVDF przeprowadzano z wykorzystaniem pierwszorzędowych kozich przeciwciał poliklonalnych przeciwko ludzkim apo A-I lub apo A-II i drugorzędowych przeciwciał przeciwko kozim IgG skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Po zakończeniu elektrotransferu błonę PVDF blokowano 60 min. w 0.5% odtłuszczonego mleku i 5-krotnie płukano w roztworze płuczającym (pkt. 3.5) po 5 min. Błonę inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym przez 12 – 18 godz. godz. z ciągłym mieszaniem w temp. pokojowej, po czym 5-krotnie po 5 min. płukano w roztworze płuczającym (pkt. 3.5). Następnie błonę przez 60 min. inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym, po czym 5-krotnie płukano po 5 min. Na koniec błonę PVDF przenoszono do roztworu z substratem dla fosfatazy alkalicznej (pkt. 3.5) i inkubowano do chwili uwidocznienia się frakcji elektroforetycznych. Reakcję przerywano zanurzając błonę w roztworze przerywającym (pkt. 3.5), po czym błonę suszono.

### **3.22. Analiza densytometryczna rozdziałów elektroforetycznych frakcji lipoproteinowych**



Analizę densytometryczną rozdziałów elektroforetycznych frakcji lipoproteinowych przeprowadzano za pomocą programu komputerowego do skanowania żeli GelScan V. 1.45 (Kucharczyk, Techniki Elektroforetyczne, Polska).

### **3.23. Określanie średnic Stokesa cząstek lipoproteinowych we frakcjach elektroforetycznych**

Na podstawie analizy densytometrycznej (pkt. 3.22) rozdziałów elektroforetycznych frakcji pre- $\beta$ -HDL metodą 2D-PAGE po elektrotransferze cząstek na błonę PVDF i immunodetekcji apo A-I lub apo A-II określano średnice Stokesa badanych cząstek. Populacje cząstek lipoproteinowych wyróżniano za pomocą wykreślanego densytogramu w programie GelScan V. 1.45. Dla najwyższego piku w danej populacji cząstek lipoproteinowych program GelScan ustalał drogę migracji cząstek. Również dla białek wzorca HMW wyznaczano drogę migracji. Na jej podstawie kreślono w programie GraphPad Prism krzywą kalibracyjną, z której odczytywano średnice Stokesa badanych cząstek lipoproteinowych. Mieszanina wzorcowa HMW zawierała: albuminę, dehydrogenazę mleczanową, katalazę, ferrytynę i tyreoglobulinę o średnicach wynoszących odpowiednio 7.1, 8.16, 9.51, 12.2 i 17 nm.

### **3.24. Określanie masy cząsteczkowej białek cząstek lipoproteinowych**

Masy cząsteczkowe białek cząstek lipoproteinowych frakcji pre- $\beta$ -HDL określano za pomocą analizy densytometrycznej (pkt. 3.22) rozdziałów elektroforetycznych metodą SDS-PAGE po elektrotransferze białek na błonę PVDF i immunodetekcji apo A-I lub apo A-II. W programie GelScan V. 1. 45. ustalano drogę migracji białek wzorca LMW i białek badanych cząstek lipoproteinowych. W oparciu o wyznaczoną w programie GraphPad Prism krzywą wzorcową dla białek wzorca LMW określano masy cząsteczkowe białek. Mieszanina wzorcowa LMW zawierała: aprotyninę, lizozym, inhibitor trypsyny, anhydrazę węglanową, albuminę wołową,  $\beta$ -galaktozydozę i miozynę o masach cząsteczkowych wynoszących odpowiednio 7.5, 18.7, 31.9, 40.7, 85, 127 i 200 kDa.

### **3.25. Analizy statystyczne**

Analizy statystyczne wykonywano z użyciem programu GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Normalność rozkładu wyników sprawdzano testem Shapiro-Wilka. Wyniki danych podlegających rozkładowi normalnemu przedstawiano w postaci wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej, SEM. Istotność statystyczną (wartość p) wyliczano testem t Studenta dla prób powiązanych. Za minimalną znamioną różnicę między wynikami przyjęto wartość  $p < 0.05$ .

## 4. Wyniki

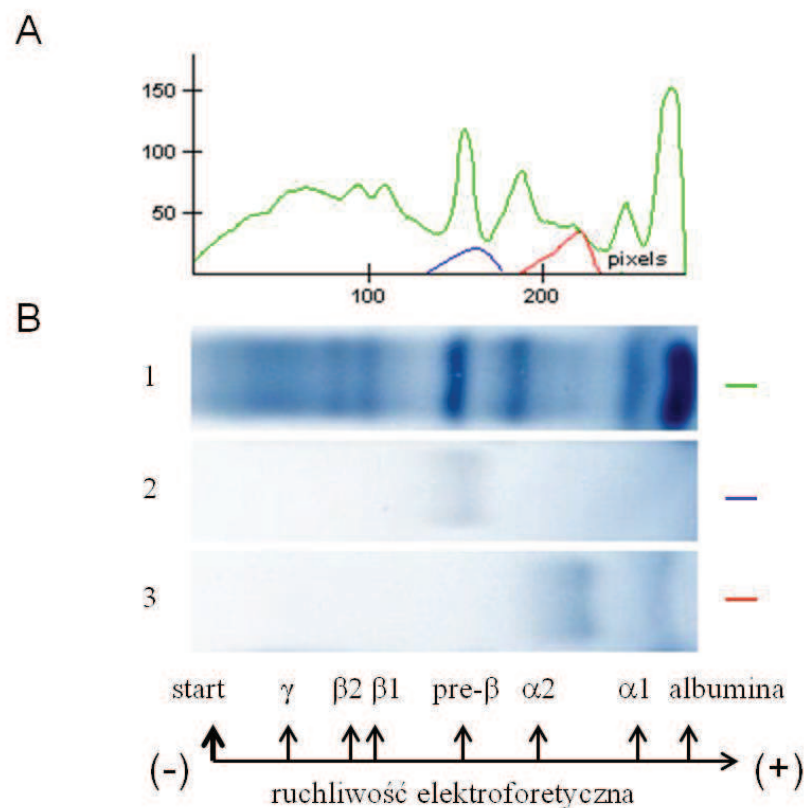
### 4.1. Charakterystyka wyjściowych frakcji HDL i VLDL

Frakcje HDL i VLDL do badań transportu białek i lipidów uzyskiwano w odrębnych procedurach oczyszczania.

- Frakcję HDL uzyskiwano poprzez ultrawierowanie nadsącza surowic po wytrąceniu frakcji proteolipidowych zawierających apo B (pkt. 3.8.1).

- Frakcję VLDL wyodrębniano poprzez ultrawierowanie natywnej surowicy w gradiencie gęstości NaCl (pkt. 3.8.2).

Ruchliwość tych izolowanych frakcji w rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym odpowiadała ich ruchliwości w natywnej surowicy (Ryc. 13).

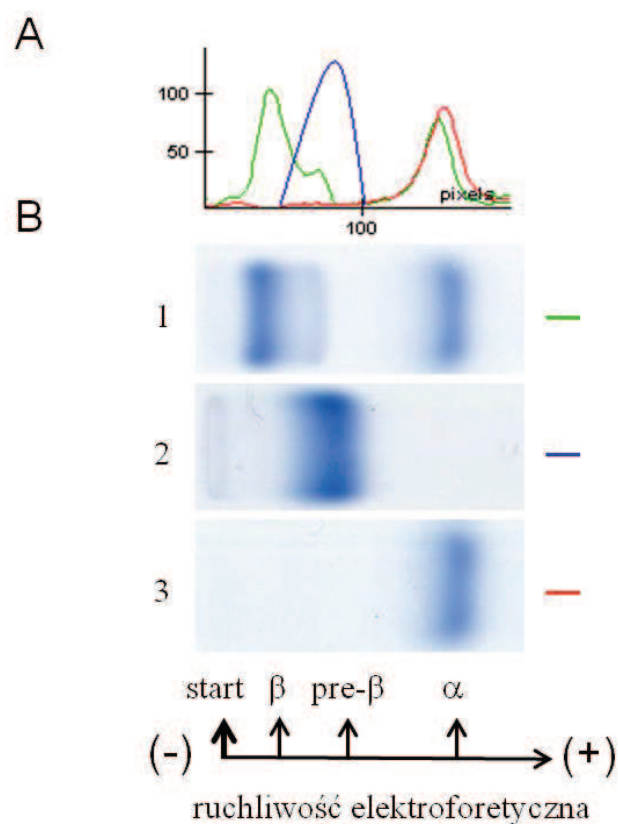


**Ryc. 13. A. Obraz densytometryczny rozdziału elektroforetycznego surowicy natywnej; B. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym białek 1. Surowicy natywnej, 2. Izolowanej frakcji VLDL, 3. Izolowanej frakcji HDL. Barwienie czernią amidową.**

Surowicę natywną, VLDL wyizolowane metodą ultrawierowania oraz HDL wyizolowane metodą wytrącania i ultrawierowania rozdzielano w żelu agarozowym firmy Sebia, wybarwiono na obecność białek czernią amidową (pkt. 3.19.1), po czym przeprowadzano analizę densytometryczną (pkt. 3.22). Obraz jest reprezentatywny dla 2 doświadczeń.

Izolowane preparaty HDL i VLDL pod względem swojego składu (Tabela 4) oraz ruchliwości w żelu agarozowym (Ryc. 13 i 14) odpowiadały danym literaturowym (Tabela 1). Izolowane VLDL po rozdzielaniu w żelu agarozowym i wybarwieniu na obecność białek wykazywały ruchliwość pre- $\beta$ -globulin. Natomiast HDL poruszały się z ruchliwością  $\alpha$ -globulin (Ryc. 13).

Takie same rozdziały elektroforetyczne, po wybarwieniu czernią Sudan na zawartość lipidów również wykazały obecność frakcji HDL i VLDL w typowych miejscach elektroforegramu odpowiadającym rozdziałowi natywnej surowicy (Ryc. 14).



**Ryc. 14. A. Obraz densytometryczny rozdziału poniżej; B. Rozdział w żelu agarozowym 1. Surowicy natywnej, 2. Izolowanej frakcji VLDL, 2. Izolowanej frakcji HDL. Barwienie czernią Sudan.**

Surowicę natywną oraz preparaty natywnych VLDL, HDL i liposomów rozdzielano w żelu agarozowym firmy Sebia i wybarwiano na obecność lipidów (pkt. 3.19.1), po czym przeprowadzano analizę densytometryczną (pkt. 3.22). Obraz jest reprezentatywny dla 3 doświadczeń.

W preparatach VLDL głównym składnikiem lipidowym były TG przy nieobecnych apo A-I i apo A-II. Natomiast w HDL stwierdzano obecność apo A-I i apo A-II, a w ich komponentach lipidowej dominowały FL (Tabela 4).

**Tabela 4. Skład lipidowy oraz zawartość apo A-I i A-II w VLDL i HDL izolowanych metodą ultrawirowania**

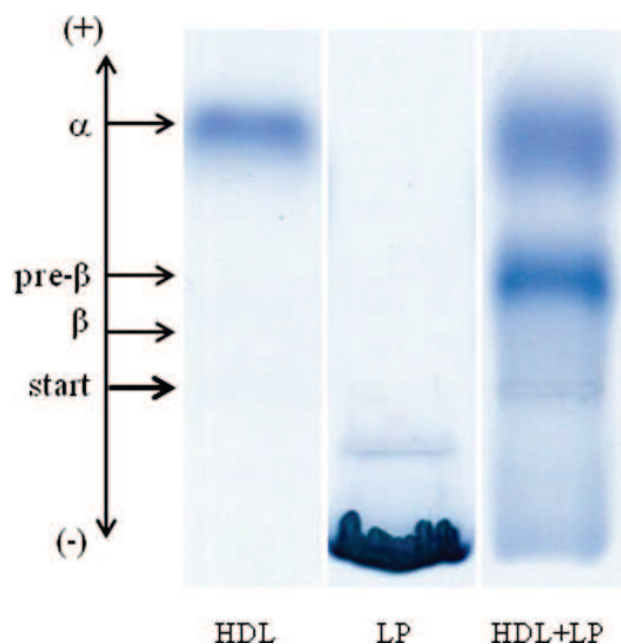
Fracja	Skład lipidowy [%]				Skład białkowy [%]	
	FL	CHW	CHE	TG	apo A-I	apo A-II
<b>VLDL</b>	21.1 ± 1.3	7.1 ± 0.2	9.9 ± 1.6	61.9 ± 3.1	nieobecne	nieobecne
<b>HDL</b>	63.9 ± 1.8	8.4 ± 0.4	27.7 ± 1.9	nieobecne	74.4 ± 0.7	25.6 ± 0.7
	<b>Zawartość lipidów i białek [%]</b>					
<b>HDL</b>	33.2 ± 1.1	4.4 ± 0.2	14.5 ± 1.3	-	35.7 ± 1.5	12.2 ± 0.3

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 11 doświadczeń dla VLDL, a z 9 dla HDL.

We frakcji HDL, białka stanowiły 48 ± 1.6, a lipidy 52 ± 1.6% masy tej cząstki (nie pokazano w Tabeli).

#### **4.2. Oddziaływania między frakcją HDL i liposomami**

Wiadomo, że w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* dochodzi do wymiany elementów białkowych i lipidowych pomiędzy wszystkimi cząstkami uczestniczącymi w metabolizmie lipoprotein (Barter 2002, Lewis i Ryder 2005, Michajlik i Bartnikowska 1999). W celu obserwacji tego zjawiska w naszych doświadczeniach, mieszaninę reakcyjną zawierającą preparat natywnych HDL i zawiesinę LP (HDL+LP), gdzie stosunek wagowy LP-FL/HDL-FL wynosił 5 : 1, oraz próby kontrolne: preparat natywnych HDL i LP inkubowano 60 min. w temp. 37°C (pkt. 3.11), po czym rozdzielano w żelu agarozowym. Preparat HDL wędrował w żelu agarozowym z ruchliwością  $\alpha$ . LP pozostawały w miejscu nałożenia lub cofały się w kierunku katody (Ryc. 15). Natomiast rozdział mieszaniny reakcyjnej HDL+LP wykazał powstawanie nowej frakcji lipoproteinowej wędrującej w żelu agarozowym z ruchliwością pre- $\beta$  (Ryc. 15).



**Ryc. 15. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym preparatu HDL, liposomów oraz mieszaniny HDL i LP po 60 min. inkubacji.**

Preparat HDL, liposomy oraz mieszaninę HDL+LP rozdzielano w żelu agarozowym firmy Sebia i wybarwiano na obecność lipidów (pkt. 3.19.1). Obraz jest reprezentatywny dla 6 doświadczeń.

Ze względu na powstawanie nowej frakcji lipoproteinowej, w wyniku oddziaływania preparatu HDL z LP, w dalszej części pracy przyjęto w oznaczeniach produktów reakcji mieszaniny HDL+LP symbol „HDL-LP-pre-β”.

#### **4.3. Charakterystyka nowo-powstałej frakcji pre-β-HDL**

W celu charakterystyki frakcji pre-β-HDL, powstałej w wyniku reakcji HDL z LP (pkt. 4.1), przeprowadzano jej izolację z mieszaniny reakcyjnej metodą dwustopniową opisaną w rozdziale Materiały i Metody (pkt. 3.12.1 i 3.12.2). We frakcji tej oznaczano skład białkowo-lipidowy, ruchliwość elektroforetyczną (wyliczana średnica cząstek) oraz dystrybucję/zawartość apo A-I i apo A-II.

##### **4.3.1. Skład frakcji pre-β-HDL**

Nowa frakcja pre-β-HDL powstała w wyniku oddziaływania HDL z LP w stosunku 1 : 5, była cząstką lipidowo-białkową, w której średni stosunek wagowy lipidów do białek wynosił 5.3 : 1. Podstawowymi lipidami frakcji pre-β-HDL były fosfolipidy, które

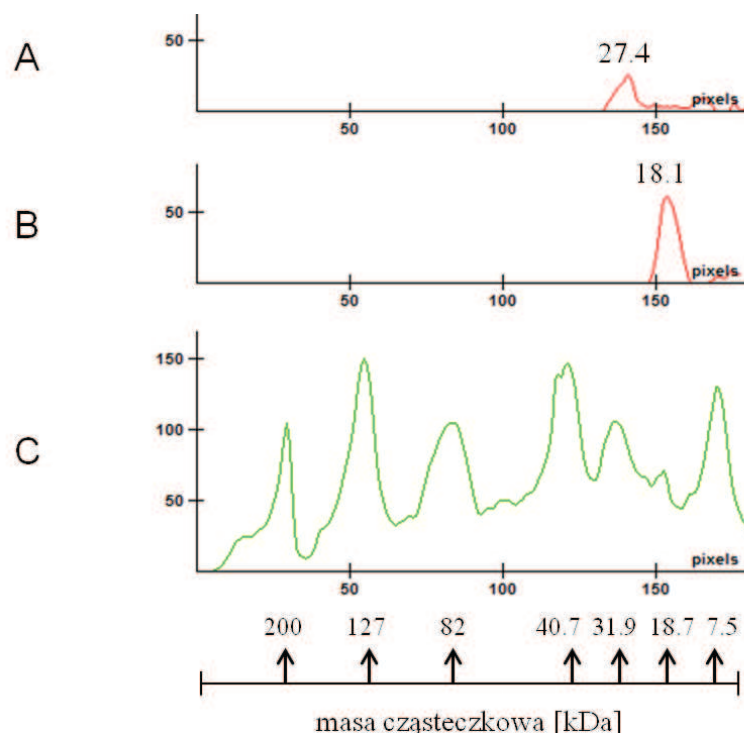
stanowiły 96.7% lipidów, a resztę stanowił cholesterol wolny, którego wagowo było ok. 30-krotnie mniej niż fosfolipidów. W skład komponenty białkowej frakcji pre- $\beta$ -HDL wchodziły apo A-I i apo A-II. Stosunek wagowy apo A-I do apo A-II we frakcji pre- $\beta$ -HDL wynosił 20.8 : 1 (Tabela 5) i był znacznie niższy niż w wyjściowej frakcji HDL, będącej donatorem tych białek, w której wynosił on 3.5 : 1 (Tabela 4).

**Tabela 5. Procentowy udział dla lipidów i białek we frakcji pre- $\beta$ -HDL**

Lipidy [%]		Białka [%]	
FL	CHW	apo A-I	apo A-II
96.7 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.3	96.65 $\pm$ 0.7	3.35 $\pm$ 0.7
Zawartość lipidów i białek [%]			
81.3 $\pm$ 1.5	2.8 $\pm$ 0.2	15.5 $\pm$ 1.6	0.4 $\pm$ 0.1

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 12 doświadczeń.

Obecność apo A-I i apo A-II we frakcji pre- $\beta$ -HDL potwierdzano metodą Western blot z immunodetekcją na obecność tych apolipoprotein po przeniesieniu białek frakcji pre- $\beta$ -HDL rozdzielonych metodą SDS-PAGE na błonę PVDF. Stwierdzono obecność monomeru apo A-I o m. cz. 27.4 kDa oraz dimeru apo A-II o m. cz. 18.1 kDa (Ryc. 16).



**Ryc. 16. Rozdział frakcji pre- $\beta$ -HDL w 4 - 20% żelu poliakrylamidowym metodą SDS-PAGE po elektrotransferze i A. Immunodetekcji na obecność apo A-I; B. Immunodetekcji na obecność apo A-II; C. Rozdział wzorca LMW.**

Frację pre- $\beta$ -HDL rozdzielano metodą SDS-PAGE (pkt. 3.19.5), przeprowadzano elektrotransfer i wykrywano obecność apo A-I lub apo A-II na błonie PVDF (pkt. 3.20, 3.21 metodą Western blot), a następnie analizowano densytometrycznie (pkt. 3.22). Obraz jest reprezentatywny dla 4 doświadczeń.

#### 4.3.2. Stechiometria reakcji powstawania i charakterystyka frakcji $\alpha$ -HDL i pre- $\beta$ -HDL

W celu oceny stechiometrii reakcji przemieszczania apolipoprotein między frakcjami, oznaczono również ich zawartość w nadsączu pozostałym po wytrąceniu pre- $\beta$ -HDL (Tabela 6). Oddziaływanie preparatu HDL z liposomami prowadziło do przeniesienia  $14.17 \pm 0.72\%$  apo A-I i  $1.13 \pm 0.07\%$  apo A-II do nowo powstającej frakcji pre- $\beta$ -HDL (Tabela 6). Odzysk apo A-I i A-II z frakcji poinkubacyjnych wynosił odpowiednio 80.3 i 84.1% (Tabela 6).

**Tabela 6. Dystrybucja białek apo A-I i apo A-II we frakcjach poinkubacyjnych**

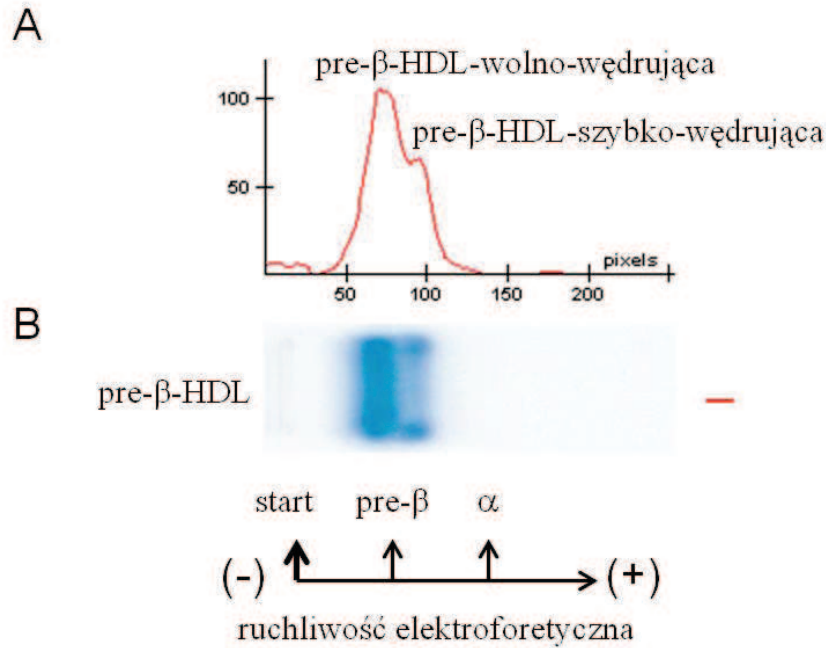
Apolipoproteiny	Substrat HDL [ $\mu\text{g}/\text{próbe}$ ]	Frakcje poinkubacyjne (warunki reakcji 60 min., 37°C) [ $\mu\text{g}/\text{próbe}$ ]		Odzysk % HDL
		$\alpha$ -HDL	pre- $\beta$ -HDL	
<b>apo A-I</b>	$949.5 \pm 40.3$	$622.7 \pm 6.1$	$134.0 \pm 6.9$	$80.3 \pm 2.9$
<b>apo A-II</b>	$319.0 \pm 6.2$	$264.2 \pm 5.6$	$3.63 \pm 0.2$	$84.1 \pm 2.1$

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 6 doświadczeń. Zawartość apo A-I i apo A-II w próbach oznaczano metodą immunochemiczną (pkt. 3.18).

#### 4.3.3. Ruchliwość elektroforetyczna frakcji pre- $\beta$ -HDL

Rozdział frakcji pre- $\beta$ -HDL w pierwszym kierunku (1-D) przeprowadzano w żelu agarozowym. W jego obrębie wykazano obecność dwóch podfrakcji lipidowych, odpowiednio o dużej i małej ruchliwości elektroforetycznej (Ryc. 17). Frację pre- $\beta$ -HDL o mniejszej ruchliwości nazwano frakcją pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującą, a frakcję pre- $\beta$ -HDL o większej ruchliwości – frakcją pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującą. Zawartości komponenty białkowej w podfrakcjach pre- $\beta$ -HDL-szybko- i wolno-wędrujących stanowiły odpowiednio  $35.8 \pm 1.3$  i  $64.2 \pm 1.3\%$  wyjściowej frakcji pre- $\beta$ -HDL.

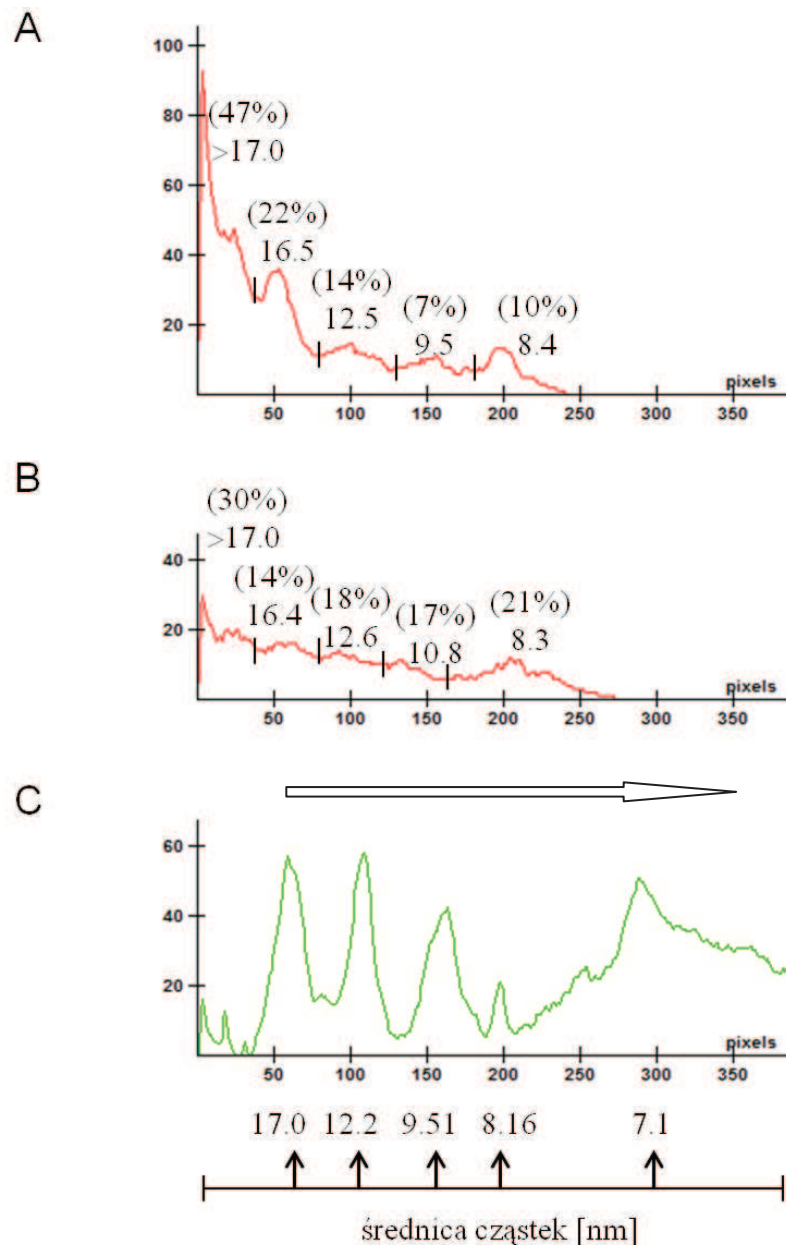




Ryc. 17. A. Obraz densytometryczny rozdziału poniżej; B. Rozdział elektroforetyczny (pierwszy kierunek) w żelu agarozowym frakcji pre-β-HDL wyizolowanej z mieszaniny HDL-LP-pre-β metodą ultrawierowania, wybarwiony czernią Sudan. Obraz jest reprezentatywny dla 6 doświadczeń.

#### 4.3.4. Heterogenność podfrakcji pre-β-HDL-wolno-wędrującej i pre-β-HDL-szybko-wędrującej

Rozdział tych dwóch podfrakcji pre-β-HDL w drugim kierunku, w niedenaturującym 2 – 25% żelu poliakrylamidowym, połączony z immunodetekcją Western-blot na obecność apo A-I wykazał w każdej z nich obecność licznych subpopulacji cząstek o średnicy od 8.4 do 17 nm. (Ryc. 18 A i B). I tak, podfrakcja pre-β-HDL-szybko-wędrująca rozdzielała się na pod-podfrakcje apo A-I o średnich wielkościach wynoszących 8.4 (7.4 – 8.8), 9.5 (8.8 – 10.8), 12.5 (10.8 – 15.5), 16.5 (15.5 – 17.0) i powyżej 17.0 nm. Natomiast podfrakcja pre-β-HDL-wolno-wędrująca rozdzielała się na pod-podfrakcje apo A-I o średnicach 8.3 (7.2 – 9.3), 10.8 (9.3 – 11.3), 12.6 (11.3 – 15.1), 16.4 (15.1 – 17.0) i powyżej 17 nm (Ryc. 18 A i B). Analiza ilościowa densytogramu wykazuje, że zawartość cząstek o małych średnicach <12 nm (17%), zawierających apo A-I była dużo niższa niż cząstek o dużych średnicach (83%) w podfrakcji pre-β-HDL-szybko-wędrującej (Ryc. 18 A). Natomiast w podfrakcji pre-β-HDL-wolno-wędrującej stosunek małych i dużych cząstek apo A-I był podobny (Ryc. 18 B).

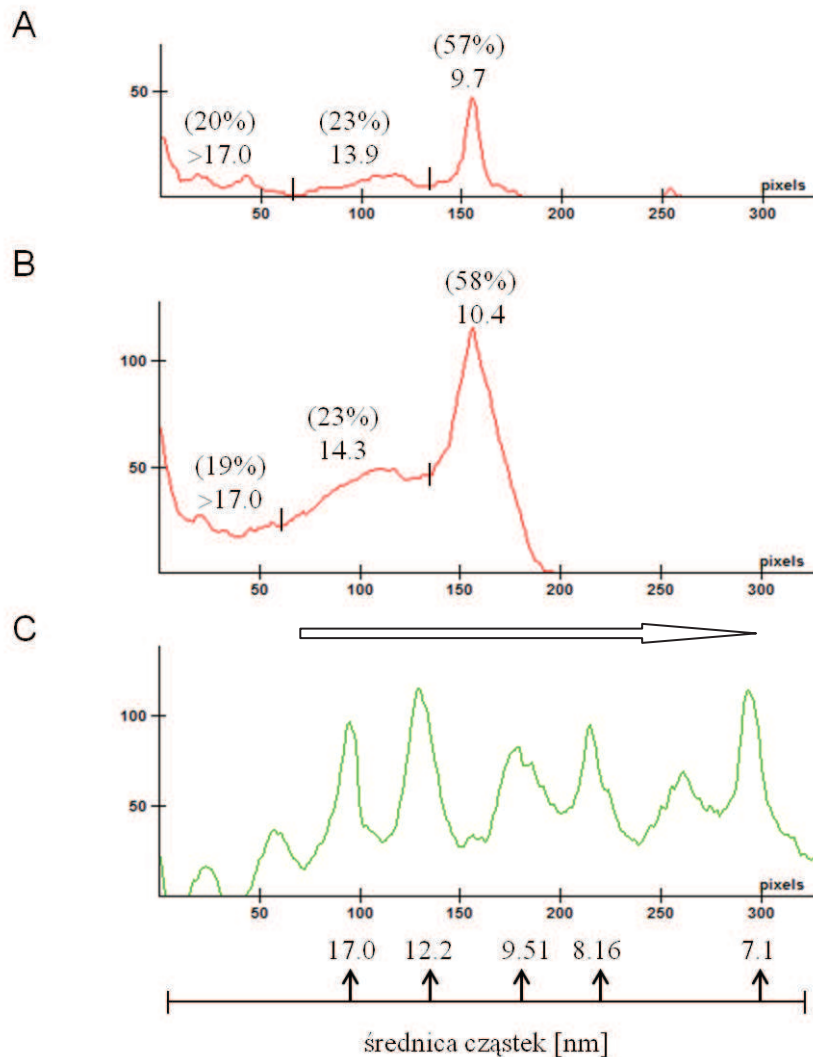


**Ryc. 18. Rozdział elektroforetyczny (drugi kierunek) podfrakcji pre- $\beta$ -HDL. Dystrybucja apo-A-I w gradiencie 2 - 25% żelu poliakrylamidowego: A. Podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej; B. Podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej; C. Wzorca HMW białek surowicy.**

Frakcję pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującą oraz pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującą uzyskane w żelu agarozowym (Ryc. 17) rozdzielano metodą 2D-PAGE (pkt. 3.19.6), przeprowadzono elektrotransfer (pkt. 3.20) i wykonywano oznaczenie zawartości apo A-I na błonie PVDF, za pomocą specyficznych przeciwciał, metodą Western blot (pkt. 3.21), którą poddawano analizie densytometrycznej (pkt. 3.22). Obraz jest reprezentatywny dla 6 doświadczeń.

Ryc. 19 przedstawia reprezentatywne profile rozdziałów podfrakcji pre- $\beta$ -HDL metodą 2D-PAGE, po immunodetekcji na obecność apo A-II. Obecność apo A-II obserwowano

zarówno w podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej, jak i pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej. Każda z tych podfrakcji zawierała heterogenne pod względem wielkości populacje cząstek zawierających apo A-II. W odróżnieniu od apo A-I dystrybucja apo A-II wykazywała trzy wyraźnie wyróżniające się piki. I tak, z podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej wyodrębniono pod-podfrakcje zawierające apo A-II o średnich wielkościach odpowiednio: 9.7 (8.9 – 11.9), 13.9 (11.9 – 15.2) i powyżej 17 nm.

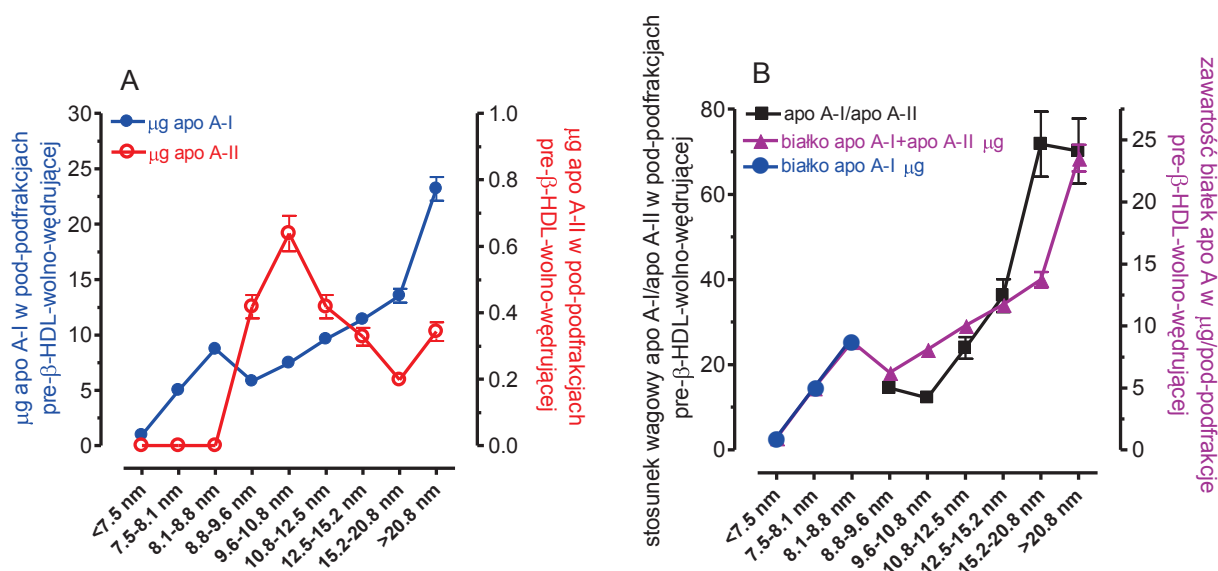


**Ryc. 19. Rozdział elektroforetyczny (drugi kierunek) podfrakcji pre- $\beta$ -HDL. Dystrybucja apo-A-II w gradiencie 2 - 25% żelu poliakrylamidowego: A. Podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej; B. Podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej; C. Wzorca HMW białek surowicy.**

Frację pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującą oraz pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującą uzyskane w żelu agarozowym (Ryc. 15) rozdzielano metodą 2D-PAGE (pkt. 3.19.6), przeprowadzono elektrotransfer (pkt. 3.20) i wykonywano immunodetekcję na obecność apo A-II na błonie PVDF metodą Western blot (pkt. 3.21), którą poddawano analizie densytometrycznej (pkt. 3.22). Obraz jest reprezentatywny dla 6 doświadczeń.

Natomiast z podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej wyodrębniono pod-podfrakcje o średnicach 10.4 (8.5 – 12.8), 14.3 (12.8 – 15.6) i powyżej 17 nm (Ryc. 19 A i B). W odróżnieniu od apo A-I najwyższe zawartości apo A-II, wykazywano w pod-podfrakcjach pre- $\beta$ -HDL o małej średnicy. Około 57 i 58% całkowitej zawartości apo A-II odzyskiwano w podfrakcjach pre- $\beta$ -HDL, odpowiednio szybko- i wolno-wędrujących (Ryc. 19 A i B).

Z przedstawionych danych wynika (Ryc. 18 i 19), że zarówno średnie wielkości poszczególnych pików dla apo A-I i apo A-II, jak i wyznaczone granice związanych z nimi pod-podfrakcji nie pokrywały się. Dlatego analizę wzajemnych stosunków apo A-I i apo A-II w przebiegu gradientu PAGE, przeprowadzono na podstawie arbitralnie wyznaczonych przedziałów wielkości cząstek (Ryc. 20 i 21).

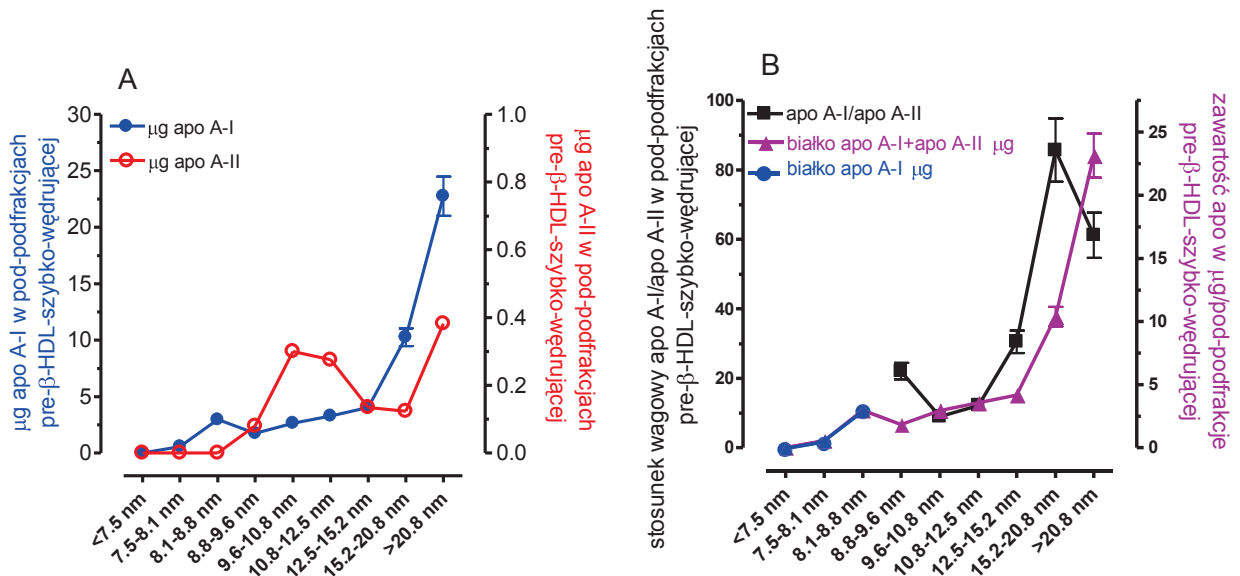


**Ryc. 20. Dystrybucja białek apo A-I i apo A-II w gradiencie wielkości nowo-powstających cząstek pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrujących (Ryc. 17). A. Zawartość białek apo A-I i apo A-II w kolejnych przedziałach wielkości cząstek; B. Zawartość całkowita białek apo A i stosunek apo A-I/apo A-II w kolejnych przedziałach wielkości cząstek.**

Uwaga. Pierwsze frakcje w zakresie od <7.5 do 8.8 nm nie zawierały białka apo A-II. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 6 doświadczeń. Skale na lewej i prawej osi rzędnych są różne.

Zawartość apo A-I w poszczególnych, arbitralnie wyznaczonych, pod-podfrakcjach pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrujących ulegała 24-krotnemu zwiększeniu w miarę wzrostu ich wielkości z <7.5 nm do >20.8 nm (Ryc. 20 A). Z kolei cząstki pod-podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrujących o wielkości do 8.8 nm nie zawierały apo A-II. W zakresie wielkości od 8.8 do 10.8 nm dochodziło do szybkiej akumulacji apo A-II, a przy większych rozmiarach cząstek do spadku o 31% (Ryc. 20 A). W efekcie stosunek apo

A-I do apo A-II zwiększał się ze wzrostem wielkości cząstek z <8.8 do >20.8 nm odpowiednio z 14.5 do 70.1 (Ryc. 20 B).



**Ryc. 21. Dystrybucja białek apo A-I i apo A-II w gradiencie wielkości nowo-powstających cząstek pre-β-HDL-szybko-wędrujących (Ryc. 17). A. Zawartość białek apo A-I i apo A-II w kolejnych przedziałach wielkości cząstek; B. Zawartość całkowita białek apo A i stosunek apo A-I/apo A-II w kolejnych przedziałach wielkości cząstek.**

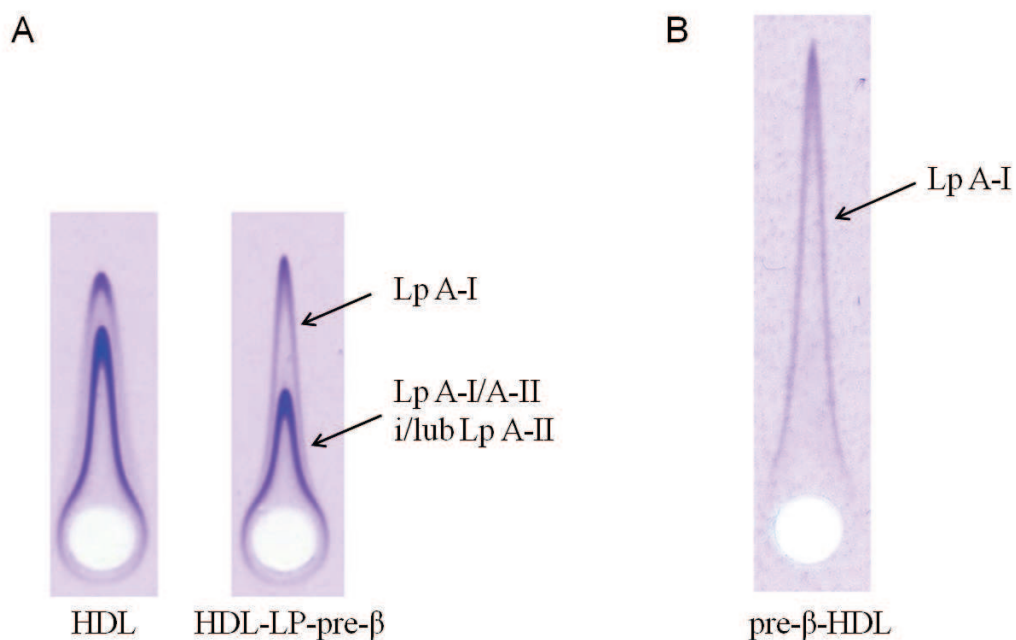
Uwaga. Pierwsze frakcje w zakresie od <7.5 do 8.8 nm nie zawierały białka apo A-II. Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 6 doświadczeń. Skale na lewej i prawej osi rzędnych są różne.

Podfrakcja pre-β-HDL-szybko-wędrująca nie zawierała pod-podfrakcji o wielkości poniżej 7.5 nm (Ryc. 21 A). Z kolei dwie następne pod-podfrakcje 7.5 - 8.1 - 8.8 nm zawierały wyłącznie białko apo A-I, którego zawartość pozostawała na względnie stałym poziomie aż do wielkości 12.5 nm (Ryc. 21 A). Dopiero poza tą granicą pojawiały się większe ilości cząstek o dużych wielkościach. Odzwierciedleniem tego były 40-krotnie, wyższe niż w cząstkach 7.5 - 8.1 nm, poziomy apo A-I w cząstkach o średnicy 15.2 - 20.8 nm (Ryc. 21 A). Apo A-II nie występowała w cząstkach o wielkości poniżej 8.8 nm. Jej zawartość w poszczególnych pod-podfrakcjach wahała się jedynie od 1.7 do 4.6% zawartości apo A-I (Ryc. 21 A). Niemniej przy wielkościach pod-podfrakcji od 8.5 do 12.5 nm następował przejściowy wzrost, a przy 15.2 - 20.8 nm spadek zawartości apo A-II (Ryc. 21 A). W ostatniej pod-podfrakcji zawierającej cząstki powyżej 20.8 nm zawartość apo A-II ulegała ponownemu podwyższeniu. W efekcie stosunek apo A-I/apo A-II wzrastał wraz ze wzrostem wielkości cząstek od 10.8 nm do 20.8 nm odpowiednio z 8.9 do 85.7 (Ryc. 21 B). Tak więc mimo różnic ilościowych profile zmian zawartości apo A-I i apo A-II w cząstkach pre-β-HDL-

wolno- i szybko-wędrujących były podobne, z wyraźną tendencją do większego przyrostu zawartości białka apo A-I (Ryc. 20 i 21). Doświadczenia te wykazały obecność cząstek pre- $\beta$ -HDL o małej wielkości zawierających wyłącznie apo A-I (Ryc. 20 B i 21 B). Nie wykazano natomiast cząstek, które zawierałyby wyłącznie apo A-II.

#### 4.3.5. Czy we frakcji pre- $\beta$ -HDL znajdują się cząstki zawierające tylko apo A-II?

Opisane wyżej wyniki analizy Western blot dotyczącej dystrybucji apo A-I i apo A-II w pod-podfrakcjach pre- $\beta$ -HDL o różnej wielkości nie wykazały obecności pod-podfrakcji, które zawierałyby tylko apo A-II. Należy jednak pamiętać, że metoda ta ma stosunkowo małą czułość, w stosunku do ogólnie niskiej zawartości tego białka w tej frakcji (Tabela 5). Dlatego wyniki rozdzielania elektroforetycznego frakcji pre- $\beta$ -HDL pod względem zawartości apo A-I i apo A-II zweryfikowano metodą immunoelektroforezy raketowej (Ryc. 11, 12, 22 B i 23 B). Metoda ta pozwala na zwiększenie czułości detekcji białek o niskim poziomie w badanej próbce.



**Ryc. 22. Rozdział w 0.9% żelu agarozowym metodą immunoelektroforezy raketowej na obecność cząstek zawierających apo A-I; A. Natywnych HDL oraz mieszaniny HDL i liposomów (HDL-LP-pre- $\beta$ ); B. Izolowanej frakcji pre- $\beta$ -HDL.**

Wyjściowe HDL, mieszaninę HDL-LP-pre- $\beta$  i frakcję pre- $\beta$ -HDL rozdzielano w żelu agarozowym firmy Sebia i wybarwiano (pkt. 3.19.2). Próbkę HDL, mieszaniny HDL-LP-pre- $\beta$  i frakcji pre- $\beta$ -HDL przed nałożeniem na żel 30-krotnie rozcieńczano 0.9% NaCl. Obraz jest reprezentatywny dla 6 doświadczeń.

Wyjściowe HDL, mieszaninę reakcyjną preparatu HDL z liposomami (HDL-LP-pre- $\beta$ ) po 60 min. inkubacji w temp. 37°C, oraz wyizolowaną z jej części frakcję pre- $\beta$ -HDL (pkt. 3.19.2) rozdzielano metodą immunoelektroforezy raketowej w firmowym żelu agarozowym zawierającym przeciwciała anty apo A-I i anty apo A-II (Sebia, Hydragel). Jest on dostosowany do oznaczania tych apolipoprotein w stężeniach obecnych w surowicy. I tak, w preparacie natywnych HDL oraz mieszaninie poreakcyjnej HDL i liposomów stwierdzono obecność cząstek zawierających wyłącznie apo A-I (Lp A-I) oraz cząstek zawierających zarówno apo A-I jak i apo A-II (Lp A-I/A-II) (Ryc. 22 A). Natomiast we frakcji pre- $\beta$ -HDL, przy użyciu żelu „firmowego” wykazano obecność cząstek zawierających wyłącznie apo A-I (Ryc. 22 B).

Wykorzystując wyniki uzyskane metodą nefelometryczną oraz metodą immunoelektroforezy raketowej dotyczące apolipoproteiny A-I obliczono odsetkową zawartość apo A-I w cząstkach Lp A-I. Ze wzoru opisanego w pkt. 3.19.2 wyliczono odsetkową zawartość apo A-I w cząstkach Lp A-I i Lp A-I/A-II.

Stwierdzono, że średnio 21.0% apo A-I w preparacie HDL wchodziło w skład cząstek Lp A-I, a 79.0% w skład cząstek Lp A-I/A-II. Po inkubacji preparatu HDL z liposomami udział apo A-I w cząstkach Lp A-I wzrastał i wynosił średnio 33.5% całkowitej ilości apo A-I (Tabela 7). Ocena rozkładu apo A-I między cząstkami Lp A-I a Lp A-I/A-II dla wyizolowanej frakcji pre- $\beta$ -HDL nie była możliwa, ponieważ w rozdziale obserwowano tylko obecność cząstek Lp A-I (Ryc. 22 B).

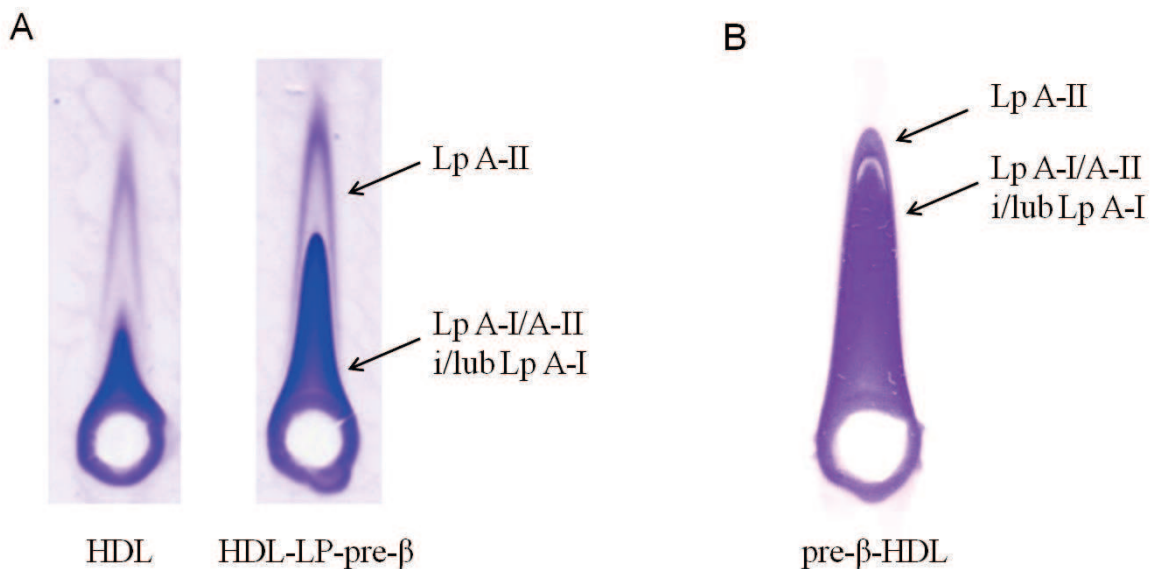
**Tabela 7. Rozkład apo A-I pomiędzy cząstkami Lp A-I i Lp A-I/A-II w mieszaninie HDL-LP-pre- $\beta$  oraz preparacie natywnych HDL**

	apo A-I w cząstkach Lp A-I [%]	apo A-I w cząstkach Lp A-I/A-II [%]
<b>HDL</b>	20.9 $\pm$ 1.6	79.1 $\pm$ 1.6
<b>HDL-LP-pre-<math>\beta</math></b>	33.5 $\pm$ 1.1*	66.5 $\pm$ 1.1*

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 6 doświadczeń. Wartości znamienne różne od HDL  
\* p<0.05.

W celu zwiększenia czułości oznaczania apo A-II metodą immunoelektroforezy raketowej zwiększono poziom przeciwciał anty apo A-I tak aby cząstki Lp A-I i Lp A-I/A-II ulegały precypitacji jak najbliżej punktu nałożenia. Proporcje obu przeciwciał dobierano indywidualnie dla każdej badanej frakcji (Ryc. 23 A i B). Umożliwiło to możliwie długą drogę elektrodyfuzji cząstek zawierających wyłącznie apo A-II (Ryc. 23

A i B). Wykazano, że zarówno w natywnych HDL, jak i w mieszaninie poreakcyjnej HDL i liposomów znajdowały się cząstki Lp A-II (Ryc. 23 A). Również nowo-powstała frakcja pre- $\beta$ -HDL wykazywała obecność cząstek zawierających wyłącznie apo A-II, aczkolwiek w znacznie mniejszych ilościach niż w opisanych wyżej frakcjach (Ryc. 23 B).



**Ryc. 23. Rozdział w 0.9% żelu agarozowym metodą immunoelektroforezy raketowej na obecność cząstek zawierających apo A-II; A. Natywnych HDL oraz mieszaniny HDL i liposomów (HDL-LP-pre- $\beta$ ); B. Izolowanej frakcji pre- $\beta$ -HDL.**

A. Wyjściowe HDL oraz mieszaninę poreakcyjną HDL-LP-pre- $\beta$  rozdzielano w 0.9% żelu agarozowym, przy stosunku p-ciał anty apo A-I do apo A-II wynoszącym 70 : 8. Próbkę mieszaniny HDL-LP-pre- $\beta$  oraz preparatu HDL przed nałożeniem na żel rozcieńczano 0.9% NaCl odpowiednio 10 i 30-krotnie (pkt. 3.19.3). Obraz jest reprezentatywny dla 6 doświadczeń. B. Frakcję pre- $\beta$ -HDL rozdzielano w 0.9% żelu agarozowym, przy stosunku p-ciał anty apo A-I do apo A-II wynoszącym 300 : 4. Próbkę pre- $\beta$ -HDL nie rozcieńczano (pkt. 3.19.4). Obraz jest reprezentatywny dla 3 doświadczeń.

#### 4.4. Wpływ różnych frakcji lipoproteinowych na skład i właściwości VLDL

##### 4.4.1. Wpływ różnych frakcji lipoproteinowych na ruchliwość elektroforetyczną VLDL

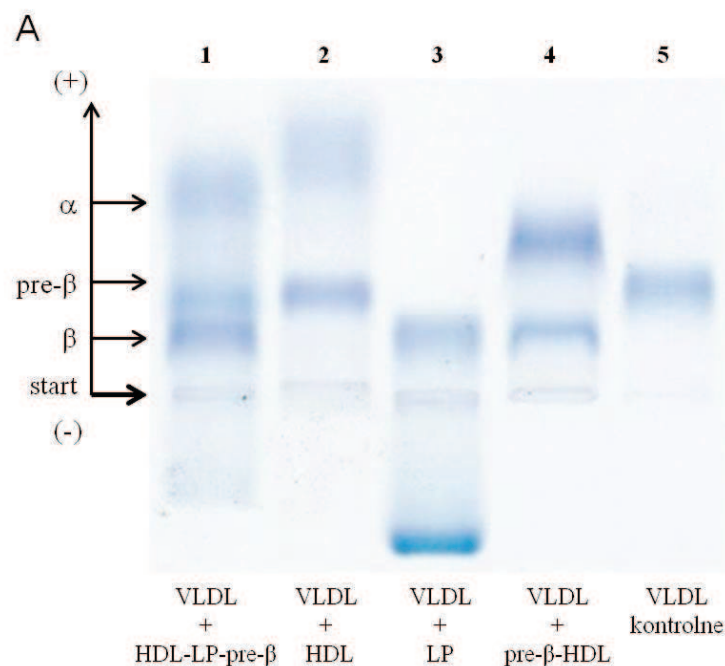
Frakcję VLDL (pkt. 3.13 i 3.14) inkubowano przez 60 min. w temp. 37°C z różnymi frakcjami lipoproteinowymi, a następnie ultrawirowano celem oddzielenia VLDL od pozostałych składników mieszaniny reakcyjnej (pkt. 3.15, Ryc. 10). Zarówno pełne mieszaniny reakcyjne, jak i frakcje VLDL (frakcja flotująca) i HDL (frakcja z dna

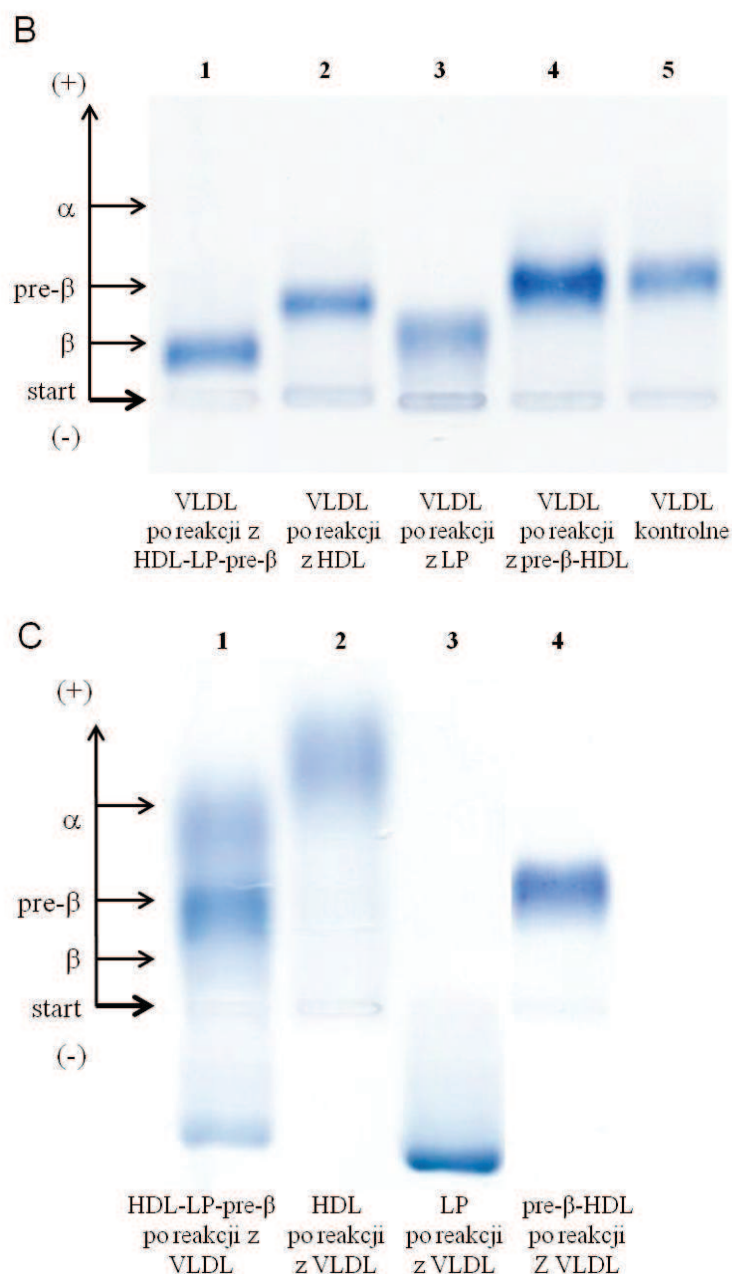


próbówki) wyodrębnione z tych mieszanin reakcyjnych, oraz natywne VLDL rozdzielano w 0.8% żelu agarozowym.

Natywne VLDL, inkubowane bez dodawania innych frakcji lipoproteinowych, wykazywały ruchliwość pre- $\beta$  w żelu agarozowym (Ryc. 24 A i B, ścieżka 5). Podobną ruchliwość elektroforetyczną wykazywały VLDL po reakcji z natywną frakcją HDL. Również ruchliwość HDL nie ulegała w tym układzie zmianie (Ryc. 24 A, ścieżka 2).

Natomiast ruchliwość VLDL po reakcji z mieszaniną HDL-LP-pre- $\beta$  lub zawiesiną LP zmniejszała się. Jej obecność wykazywano w zakresie ruchliwości  $\beta$  (Ryc. 24 A i B, ścieżka 1 i 3). Oprócz tego w obrazie rozdziału elektroforetycznego nierozdzielanej mieszaniny poreakcyjnej VLDL+HDL-LP-pre- $\beta$  pojawiała się nowa frakcja o ruchliwości pre- $\beta$ , której powstawanie wykazano również podczas inkubacji natywnych HDL z LP (porównaj Ryc. 15 i 24 A, ścieżka 1).





**Ryc. 24. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym: A. Mieszanin poreakcyjnych (nierozdzielanych) VLDL+HDL-LP-pre-β (ścieżka 1), VLDL+HDL (ścieżka 2), VLDL+LP (ścieżka 3), VLDL+pre-β-HDL (ścieżka 4) oraz VLDL kontrolnych (ścieżka 5); B. Poreakcyjnych VLDL wyizolowanych ultrawirowaniem (frakcja flotująca, Ryc. 10) z mieszanin poreakcyjnych VLDL+HDL-LP-pre-β (ścieżka 1), VLDL+HDL (ścieżka 2), VLDL+LP (ścieżka 3), VLDL+pre-β-HDL (ścieżka 4) oraz VLDL kontrolnych (ścieżka 5); C. Poreakcyjnych cząstek ciężkich wyizolowanych ultrawirowaniem (frakcja opadająca na dno probówki, Ryc. 10) z mieszanin poreakcyjnych VLDL+HDL-LP-pre-β (ścieżka 1), VLDL+HDL (ścieżka 2), VLDL+LP (ścieżka 3) oraz VLDL+pre-β-HDL (ścieżka 4). Mieszaniny reakcyjne VLDL+HDL-LP-pre-β, VLDL+HDL, VLDL+LP, VLDL+pre-β-HDL, VLDL wyizolowane z tych mieszanin oraz VLDL kontrolne rozdzielano w żelu agarozowym firmy Sebia i wybarwiano na obecność lipidów (pkt. 3.19.1). Obraz jest reprezentatywny dla 3 doświadczeń.**

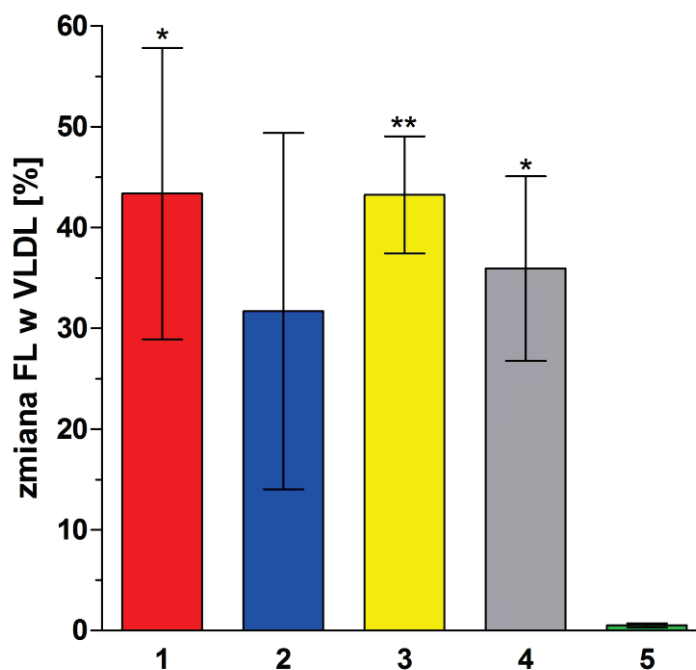
W mieszaninie poreakcyjnej VLDL z frakcją pre- $\beta$ -HDL obie frakcje lipoproteinowe nabywały niespecyficznej dla siebie ruchliwości elektroforetycznej (Ryc. 24 A, ścieżka 4). VLDL wyizolowane ultrawirowaniem z mieszaniny poreakcyjnej VLDL+pre- $\beta$ -HDL również poruszały się w żelu agarozowym w ruchliwością pre- $\beta$  (Ryc. 24 B, ścieżka 4).

We frakcji powirowniczej cząstek o wysokiej gęstości izolowanej wirowaniem z mieszaniny reakcyjnej VLDL+pre- $\beta$ -HDL frakcja pre- $\beta$ -HDL wykazywała niezmienną ruchliwość elektroforetyczną (Ryc. 24 C, ścieżka 4). Również w rozdzielonej mieszaninie poreakcyjnej HDL-LP-pre- $\beta$  ruchliwość zarówno pre- $\beta$ -HDL jak i HDL, nie ulegały zmianie (Ryc. 24 C, ścieżka 1). Natomiast w wyniku reakcji z VLDL, natywna frakcja HDL zwiększała swoją mobilność elektroforetyczną (Ryc. 24 C, ścieżka 3).

#### **4.4.2. Wpływ różnych frakcji lipoproteinowych na dystrybucję lipidów w VLDL**

Frakcje VLDL wyodrębnione ultrawirowaniem z różnych mieszanin poreakcyjnych po pierwszej inkubacji (Ryc. 24 B) poddawano analizie pod kątem zawartości poszczególnych klas lipidów: FL, CHW, CHE i TG (pkt. 3.17).

W stosunku do zawartości lipidów w natywnych preparatach VLDL, najwyższy 43% wzrost zawartości FL obserwowano w VLDL po reakcji z mieszaniną HDL i LP ( $p < 0.05$ ) oraz LP ( $p < 0.001$ ) (Ryc. 25, słupek 1 i 3).



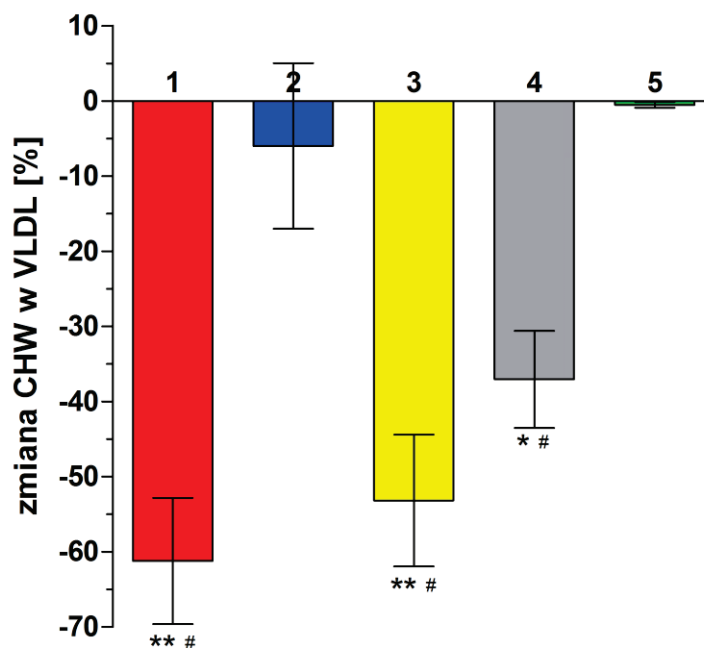
Pierwsza inkubacja 60 min., temp. 37°C	VLDL	+	+	+	+	+
	HDL	+	+	-	-	-
	LP	+	-	+	-	-
	Pre-β-HDL	-	-	-	+	-

Ryc. 25. Zmiana zawartości FL w VLDL zmodyfikowanych w wyniku inkubacji 1. z HDL-LP-pre-β; 2. z natywnymi HDL; 3. z LP; 4. z frakcją pre-β-HDL; 5. w natywnej frakcji VLDL.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 7 doświadczeń. Liczby na osi rzędnych odpowiadają względnej zawartości FL (%) w stosunku do niemodyfikowanych VLDL. Znamienne różne od VLDL kontrolnych \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .

Natomiast po inkubacji z preparatem HDL, zawartość FL w VLDL wzrastała o 32% (Ryc. 25, słupek 2), a po inkubacji z frakcją pre-β-HDL o 36% ( $p < 0.05$ ) (Ryc. 25, słupek 4).

W wyniku reakcji VLDL z mieszaniną HDL-LP-pre-β, zawiesiną LP i frakcją pre-β-HDL, traciły one od 37 do 61% swojej pierwotnej zawartości CHW (Ryc. 26, słupek 1, 3, 4). Natomiast w przypadku inkubacji z izolowaną frakcją natywnych HDL nie dochodziło do istotnej statystycznie utraty CHW z VLDL (Ryc. 26, słupek 2).



Pierwsza inkubacja 60 min., temp. 37°C	VLDL	+	+	+	+	+
	HDL	+	+	-	-	-
	LP	+	-	+	-	-
	Pre-β-HDL	-	-	-	+	-

**Ryc. 26. Zmiana zawartości CHW w VLDL zmodyfikowanych w wyniku inkubacji 1. z mieszaniną HDL-LP-pre-β; 2. z natywnymi HDL; 3. z LP; 4. z frakcją pre-β-HDL; 5. w natywnej frakcji VLDL.**

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 7 doświadczeń. Liczby na osi rzędnych odpowiadają względnej zawartości FL (%) w stosunku do niemodyfikowanych VLDL. Znamienne różne od VLDL kontrolnych \* p<0.05, \*\* p<0.001; znamienne różne od VLDL po reakcji z HDL # p<0.05.

W skutek opisanych wyżej (Ryc. 25 i 26) zróżnicowanych przesunięć poszczególnych klas lipidów pomiędzy frakcjami, powstawały pochodne VLDL o różnym składzie lipidowym (Tabela 8). W porównaniu do VLDL kontrolnych, w VLDL zmodyfikowanych oddziaływaniem z mieszaniną HDL-LP-pre-β, zawiesiną LP i frakcją pre-β-HDL dochodziło do istotnych statystycznie zmian procentowej zawartości lipidów powierzchniowych, FL i CHW, natomiast nie ulegała zmianie zawartość lipidów rdzenia tj. TG i CHE. I tak, zawartość lipidów powierzchniowych w VLDL po reakcji z mieszaniną HDL-LP-pre-β, zawiesiną samych LP, lub pre-β-HDL wzrastała z

20.2% odpowiednio do 27.6, 28.5 i 26.0% (Tabela 8). Natomiast zawartość CHW obniżała się z 7.1 odpowiednio do 2.5, 3.0 i 4.2% (Tabela 8).

**Tabela 8. Procentowy udział lipidów w VLDL kontrolnych oraz po reakcji z mieszaniną HDL-LP-pre- $\beta$ , preparatem HDL, liposomami lub frakcją pre- $\beta$ -HDL**

Rodzaj VLDL	Lipidy [%]			
	FL	CHW	CHE	TG
VLDL kontrolne	20.2 $\pm$ 2.2	7.1 $\pm$ 0.6	5.8 $\pm$ 0.5	66.9 $\pm$ 2.8
VLDL po reakcji z mieszaniną HDL-LP-pre- $\beta$	27.6 $\pm$ 1.9*	2.5 $\pm$ 0.3*	5.2 $\pm$ 0.7	64.7 $\pm$ 1.6
VLDL po reakcji z HDL	24.8 $\pm$ 1.6	6.3 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 1.5	63.4 $\pm$ 1.7
VLDL po reakcji z LP	28.5 $\pm$ 2.3***	3.0 $\pm$ 0.4*	5.8 $\pm$ 0.8	62.7 $\pm$ 2.2
VLDL po reakcji z pre- $\beta$ -HDL	26.0 $\pm$ 2.2*	4.2 $\pm$ 0.5*	5.8 $\pm$ 0.6	64.0 $\pm$ 2.4

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 7 doświadczeń. Znamienne różne od VLDL kontrolnych \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

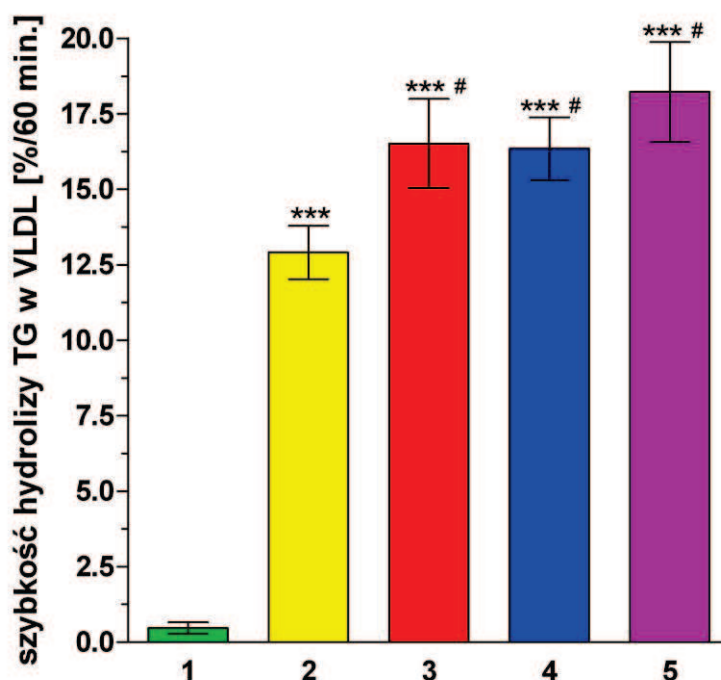
Natomiast inkubacja VLDL z HDL nie powodowała istotnych zmian w składzie jej lipidów powierzchniowych. W efekcie, wszystkie zmodyfikowane VLDL zawierały podobną zawartość procentową TG, lecz różne zawartości FL i CHW (Tabela 8).

#### 4.5. Szybkość hydrolizy triacylogliceroli w zmodyfikowanych frakcjach VLDL

Wiadomo, że *in vivo* LPL związana z endotelium hydrolizuje triacyloglicerole zawarte w krążących z osoczem cząstkach VLDL i chylomikronach (Goldberg 1996). Jednakże, nie wiadomo czy i jak proces modyfikacji VLDL przez inne krążące frakcje lipoproteinowe wpływa na proces hydrolizy zawartych w nich TG. Druga 60 min. inkubacja uprzednio zmodyfikowanych VLDL (Tabela 8, Ryc. 24 B) z LPL mleka krowiego, wykazała znaczne różnice szybkości hydrolizy TG, mierzonej akumulacją WKT, w zależności od rodzaju modyfikacji. I tak hydroliza TG w VLDL uprzednio zmodyfikowanych przez interakcję z mieszaniną HDL-LP-pre- $\beta$ , natywnymi HDL, zawiesiną LP, frakcją pre- $\beta$ -HDL w obecności LPL z mleka krowiego była istotnie szybsza niż w VLDL niemodyfikowanych (Ryc. 27).

W środowisku bez LPL, TG zawarte we frakcji VLDL nie ulegały hydrolizie (Ryc. 27, słupek 1). Natomiast inkubacja niemodyfikowanych VLDL z LPL powodowała

hydrolizę 12.9% zawartych w nich TG (Ryc. 27, słupek 2). Uprzednia modyfikacja VLDL przez HDL, LP lub HDL z LP powodowało przyspieszenie hydrolizy TG VLDL do 16.3 - 18.2% (Ryc. 27, słupki 3 - 5).



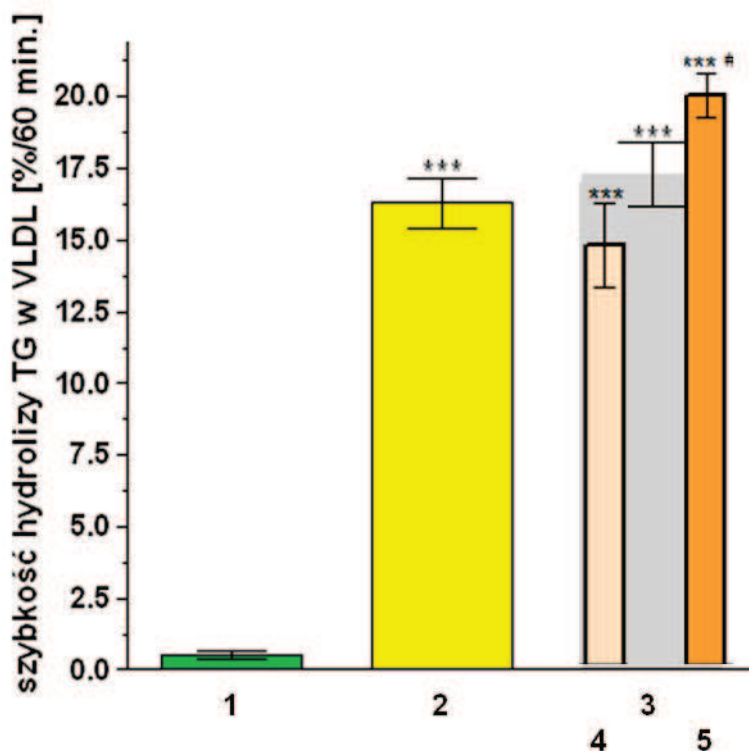
Zmodyfikowane VLDL przez		NM	NM	HDL	LP	HDL+LP
Druga inkubacja 60 min, temp. 37°C	LPL	-	+	+	+	+

**Ryc. 27. Szybkość hydrolizy TG w VLDL zmodyfikowanych przez różne frakcje lipoproteinowe.**

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 6 doświadczeń. Frakcje dodawano w ilościach opisanych w materiałach i metodach (pkt. 3.16). Znamienne różne od VLDL kontrolnych \*\*\*  $p < 0.0001$ ; znamienne różne od VLDL po inkubacji z LPL #  $p < 0.05$ . Skróty: NM – nie modyfikowane.

Natomiast dodanie LPL do VLDL zmodyfikowanych wspólną inkubacją frakcją pre- $\beta$ -HDL powstałą w wyniku inkubacji natywnych HDL i LP, wywierało w poszczególnych doświadczeniach działanie hamujące lub aktywujące reakcje LPL w zależności od zawartości apo A-II (Ryc. 28, słupek 3 - 5). Należy przy tym zaznaczyć, że na 12 doświadczeń w 6 przypadkach uzyskano cząstki pre- $\beta$ -HDL o niskiej 1.2% (pre- $\beta$ -N-HDL), a w 6 o wysokiej 5.5% zawartości apo A-II (pre- $\beta$ -W-HDL) (Tabela 9). I tak: hydroliza TG w VLDL modyfikowanych pre- $\beta$ -W-HDL (14.6%) była wolniejsza niż w

VLDL modyfikowanych wspólną inkubacją z pre-β-N-HDL (20%) (Ryc. 28, słupek 4 i 5).



Zmodyfikowane VLDL przez		NM	NM	pre-β-HDL	
				Pre-β-W-HDL	Pre-β-N-HDL
Druga inkubacja 60 min, temp. 37°C	LPL	-	+	+	+

**Ryc. 28. Szybkość hydrolizy TG w VLDL zmodyfikowanych przez frakcję pre-β-HDL.**

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 6 doświadczeń (słupek 3 z 12 doświadczeń). Znamienne różne od VLDL kontrolnych \*\*\* p<0.0001; znamienne różne od VLDL modyfikowanych pre-β-W-HDL (słupek 4) # p<0.01. Skróty: NM – nie modyfikowane.

W cząstkach pre-β-W-HDL przed inkubacją z VLDL stosunek wagowy apo A-I do apo A-II wynosił 17.2 : 1, a po reakcji z VLDL – 37.5 : 1. Odpowiadało to zmianie zawartości procentowej apo A-II z 5.5 do 2.6% całkowitego białka tej frakcji. Natomiast w cząstkach pre-β-N-HDL wagowy stosunek apo A-I/apo A-II przed inkubacją z VLDL wynosił 82.3 : 1, a po inkubacji z VLDL – 75.9 : 1 (Tabela 9). Tak więc, inkubacja z VLDL powodowała istotny spadek zawartości apo A-II w pre-β-W-HDL. Natomiast we frakcji pre-β-N-HDL niska wyjściowa zawartość apo A-II nie ulegała zmianie.

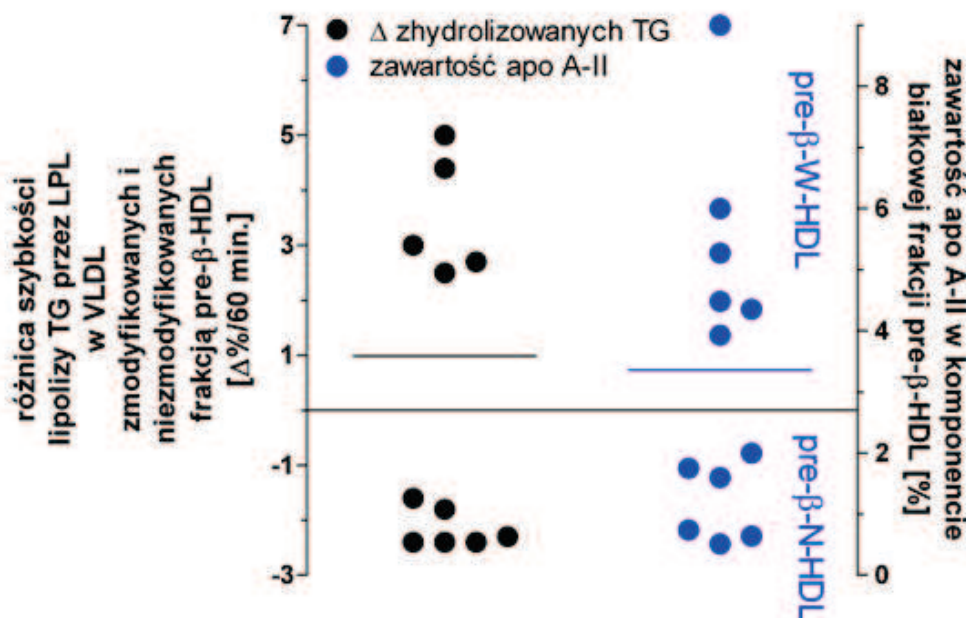


Tabela 9. Procentowa zawartość apo A-I i apo A-II w cząstkach pre-β-W-HDL i pre-β-N-HDL, przed i po inkubacji z VLDL

Subpopulacja pre-β-HDL	apo A-I [%]		apo A-II [%]	
	Przed inkubacją	Po inkubacji z VLDL	Przed inkubacją	Po inkubacji z VLDL
pre-β-W-HDL	94.5 ± 0.8†	97.4 ± 0.1* †††	5.5 ± 0.8†	2.6 ± 0.1* †††
pre-β-N-HDL	98.8 ± 0.3	98.7 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.1

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 6 doświadczeń. Znamiennie różne od populacji pre-β-HDL przed inkubacją z VLDL \* p<0.05; znamiennie różne od populacji pre-β-W-HDL przed inkubacją z VLDL † p<0.05; znamiennie różne od populacji pre-β-N-HDL po inkubacji z VLDL ††† p<0.0001.

Analiza różnic w szybkości lipolizy TG w VLDL modyfikowanych przez poszczególne preparaty pre-β-HDL wykazała, że wszystkie pre-β-N-HDL powodujące wzrost ich podatności na lipolizę cechowały się niską zawartością apo A-II (Ryc. 28, słupek 5, Ryc. 29). Natomiast, wszystkie preparaty VLDL cechujące się niską podatnością na lipolizę były uprzednio modyfikowane przez pre-β-W-HDL o wysokiej zawartości apo A-II (Ryc. 28, słupek 4, Ryc. 29).



Ryc. 29. Różnica między szybkością lipolizy TG przez LPL z mleka krowiego w VLDL zmodyfikowanych inkubacją z frakcjami pre-β-HDL o niskiej i wysokiej zawartości apo A-II, i w VLDL niezmodyfikowanych.

Przedstawiono poszczególne wyniki z 12 doświadczeń. Wartość średnią oznaczono na wykresie linią poziomą. Wartość 0 oznacza nieobecność różnicy pomiędzy szybkością hydrolizy TG w VLDL zmodyfikowanych i niezmodyfikowanych.

Niezależnie od różnic w zawartości apo A-II, obie populacje pre-β-W-HDL i pre-β-N-HDL charakteryzowały się podobną frakcyjną zawartością FL i CHW (Tabela 10). Również inkubacja z VLDL powodowała w obu grupach cząstek podobny, istotny statystycznie, spadek zawartości FL i wzrost CHW (Tabela 10).

**Tabela 10. Procentowy udział lipidów w populacjach pre-β-W-HDL i pre-β-N-HDL, przed i po inkubacji z VLDL**

Subpopulacja pre-β-HDL	FL [%]		CHW [%]	
	Przed inkubacją	Po inkubacji z VLDL	Przed inkubacją	Po inkubacji z VLDL
pre-β-W-HDL	96.6 ± 0.3	92.0 ± 0.4**	3.4 ± 0.3	7.9 ± 0.4**
pre-β-N-HDL	96.9 ± 0.3	91.8 ± 0.7**	3.1 ± 0.3	8.2 ± 0.7**

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 6 doświadczeń. Znamienne różne od populacji pre-β-HDL przed inkubacją z VLDL \*\* p<0.001.

Przedstawione wyniki wykazują, że HDL mogą oddziaływać zarówno ze strukturami lipidowymi podobnymi do błon biologicznych, jak i z VLDL. W wyniku tych interakcji mogą powstawać liczne subpopulacje pre-β-HDL, które wykazują odmienne właściwości biologiczne i katalityczne.

## 5. Dyskusja

Aterogenna dyslipidemia, czyli jednoczesne występowanie zwiększonego stężenia TG i niskiego stężenia cholesterolu HDL w osoczu krwi, jest charakterystycznym zaburzeniem lipidowym u osób z zespołem metabolicznym, różnymi zaburzeniami endokrynologicznymi, nakładającymi się na czynniki środowiskowe związane z nawykami dietetycznymi i stylem życia. Pacjenci z aterogenną dyslipidemią mają zwiększone ryzyko rozwoju miażdżycy i związanych z tym powikłań (Arca i wsp. 2007, Malik i wsp. 2004, Wilson i wsp. 2005). Doświadczenia na myszach transgenicznym z nadekspresją genów *APOA-II* mysiego lub ludzkiego, wykazują, że wiąże się to z jednoczesnym występowaniem hipertriglicydemii i wysokiego poziomu apo A-II, przy niskim stężeniu HDL-CH. Apo A-II poprzez hamowanie aktywności lipazy lipoproteinowej może powodować zwiększone stężenie TG w osoczu oraz zmniejszoną podaż FL z chylomikronów i VLDL do krążących HDL (Boisfer i wsp. 1999, Dugué-Pujol i wsp. 2006). Dlatego przedstawiana rozprawa doktorska podjęła próbę wyjaśnienia tego zjawiska na poziomie oddziaływań pomiędzy izolowanymi cząstkami lipoproteinowymi będącymi potencjalnymi uczestnikami tego procesu.

Fracje lipoproteinowe HDL i VLDL izolowane na potrzeby obecnej pracy wykazywały właściwości typowe dla tego rodzaju cząstek uzyskiwanych w naszych poprzednich pracach, jak również przez innych autorów (Li i wsp. 1994, McEneny i wsp. 1997, Shuhei i wsp. 2010, Wróblewska i wsp. 2009, 2010). Zarówno frakcja HDL izolowana wytrącaniem i ultrawirowaniem, jak i frakcja VLDL izolowana ultrawirowaniem wykazywały ruchliwości w rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym identyczne z frakcjami w natywnej surowicy (pkt. 3.8.1, 3.8.2) (Ryc. 13, 14, 15). Również zawartości składników lipidowych były typowe dla tych frakcji. HDL zawierała głównie FL (64%) i małe ilości CHE (28%) i CHW (8%) (Tabela 4). Natomiast VLDL cechowała wysoka zawartość procentowa TG (62%) i mniejsze zawartości FL (21%) oraz CHE (10%) i CHW (7%) (Tabela 4). Parametry te są zbliżone do wartości uzyskiwanych w naszych poprzednich pracach oraz podawanych przez innych autorów (Li i wsp. 1994, McEneny i wsp. 1997, Shuhei i wsp. 2010, Wróblewska i wsp. 2009, Wróblewska i wsp. 2010). Wskazuje to, że nasze nowe dane dotyczące metabolizmu lipidów oraz apo A-I i apo A-II nie wynikają z różnic

metodycznych, powodujących nietypowe właściwości wyjściowych substratów lipoproteinowych.

Wykazanie powstawania frakcji pre- $\beta$ -HDL w wyniku oddziaływań FL liposomalnych i HDL, oraz wykrycie w jej składzie apo A-II jest oryginalnym osiągnięciem zespołu Zakładu Medycyny Laboratoryjnej GUMed (Wróblewska i wsp. 2009, 2010). Wiadomo również, że ilościowe i jakościowe przesunięcia składników lipidowych i apolipoprotein zależą od wyjściowych stosunków poszczególnych frakcji natywnych (Wolska praca magisterska UG 2009, Wróblewska i wsp. 2010). I tak, przy stosunku wagowym fosfolipidów w wyjściowych frakcjach LP i HDL równym 5 : 1, po ich wspólnej inkubacji wykazywano największą szybkość uwalniania obu apolipoprotein z HDL a FL z liposomów (Wolska praca magisterska UG 2009, Wróblewska i wsp. 2010). Szybkość transferu apolipoprotein i FL przy niższych stosunkach LP-FL/HDL-FL ulegała znacznemu spowolnieniu. Dane te stanowiły podstawę zastosowania stosunku LP-FL/HDL-FL 5 : 1 w przedstawianej rozprawie (pkt. 3.11) (Ryc. 15). Identyczny stosunek 5 : 1 poziomów FL we frakcjach lipoproteinowych zachowano dla badań interakcji HDL z VLDL, LP z VLDL, mieszaniny HDL i LP z VLDL oraz frakcji pre- $\beta$ -HDL z VLDL (pkt. 3.13 i 3.14) (Ryc. 14, Tabela 8).

Również dobór czasu i temperatury inkubacji mieszanin reakcyjnych HDL z liposomami, VLDL z HDL i innych zestawów frakcji lipoproteinowych (pkt. 3.11, 3.13 i 3.14) wynoszących odpowiednio 60 min. i 37°C wynikał z naszych poprzednich wyników badań (Wróblewska i wsp. 2010). Wykazały one, że w opisanych wyżej warunkach inkubacji procesy wielokierunkowej dystrybucji FL i CHW oraz apo A-I i apo A-II pomiędzy HDL a frakcją pre- $\beta$ -HDL i liposomami osiągały stan równowagi po 30 min. inkubacji w temp. 37°C. W związku z tym, stosowana w tej pracy 60 min. inkubacja mieszanin zapewniała analizę możliwych maksymalnych przesunięć lipidowo-białkowych między cząstkami w tych warunkach doświadczalnych *in vitro*.

Istotnym elementem w naszych doświadczeniach była możliwie wysoka czystość uzyskiwanych natywnych frakcji lipoproteinowych. Stosowane tutaj połączenie techniki wytrącania i ultrawierowania zapewniało wysoką czystość frakcji HDL (Ryc. 7). Podobnie wysoką czystość uzyskiwano dla VLDL flotujących ponad warstwą izotonicznego roztworu NaCl (Ryc. 8). Ich czystość została potwierdzona rozdziałem elektroforetycznym w żelu agarozowym (Ryc. 13 i 14).

Dotychczasowe badania frakcji pre- $\beta$ -HDL były prowadzone po jej odzyskaniu z żelu niedenaturującego metodą elucji (Wolska praca magisterska UG 2009, Wróblewska i

wsp. 2010). Jednakże ilości tej frakcji uzyskiwane poprzez elucję były niewielkie i nie pozwalały na jej zastosowanie w ilościowych badaniach wymiany cząstek lipidowych i białkowych. Dlatego do celów przedstawianej pracy opracowano oryginalną metodę izolacji dużych, preparatywnych ilości frakcji pre- $\beta$ -HDL (pkt. 3.12) (Wolska i wsp. 2013). Metoda ta opiera się na rozdzieleniu liposomów od HDL i nowo-powstałej frakcji pre- $\beta$ -HDL metodą ultrawierowania (pkt. 3.12.1) (Ryc. 9) oraz precypitacyjnej izolacji frakcji pre- $\beta$ -HDL od frakcji  $\alpha$ -HDL (pkt. 3.12.2). Umożliwiło to uzyskanie ok. 10-krotnie zagęszczonej frakcji pre- $\beta$ -HDL w ilościach preparatywnych.

Główną komponentą lipidową frakcji pre- $\beta$ -HDL, powstającej w wyniku reakcji HDL z liposomami, były FL (81%), a białkową apo A-I (15%) (Tabela 5). Komponenty tej frakcji, w naszych warunkach doświadczalnych, znajdowały się w stanie równowagi dynamicznej z pozostałymi uczestnikami procesu wymiany – LP i HDL (Wróblewska i wsp. 2010). Dlatego oznaczane w tej pracy zawartości lipidów i białek odzwierciedlają stabilne, w warunkach równowagi dynamicznej, właściwości frakcji pre- $\beta$ -HDL (Tabela 5). W stosunku do natywnej frakcji HDL powstająca pre- $\beta$ -HDL miała dużo wyższą zawartość FL i niemal dwukrotnie niższą zawartość apo A-I (por. Tabela 4 i 5). Podobnie wysoką zawartość FL i apo A-I stwierdzano wcześniej we frakcji pre- $\beta_2$ -HDL izolowanej bezpośrednio z surowicy krwi człowieka (Asztalos i wsp. 1993, Barrans i wsp. 1996). Z drugiej strony były to wartości dużo wyższe od zawartości FL we frakcji pre- $\beta_1$ -HDL (Asztalos i wsp. 1993, Barrans i wsp. 1996, O'Connor i wsp. 1998). Wskazuje to, że uzyskana przez nas, na drodze manipulacji *in vitro*, frakcja pre- $\beta$ -HDL, odpowiada parametrom przynajmniej części heterogennej populacji naturalnie występujących cząstek frakcji pre- $\beta$ -HDL. W związku z tym obserwowane zjawisko transferu FL i CHW między tą frakcją a frakcją natywnych VLDL może odzwierciedlać sytuację mającą miejsce w krążeniu *in vivo* (Barter 2002, La Goff i wsp. 2004, Lewis i Rader 2005, Rye i wsp. 1999, van Tol 2002).

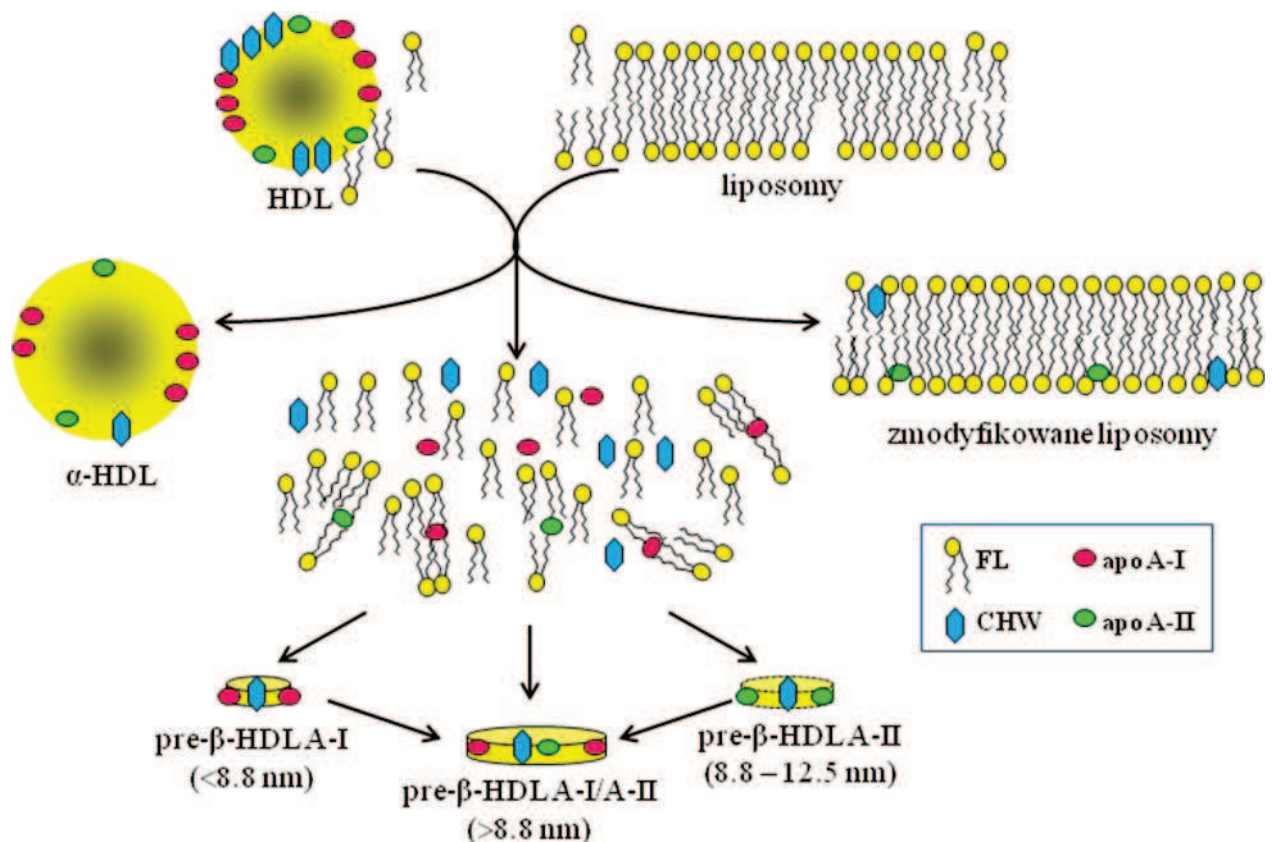
Nasze poprzednie badania wykazały po raz pierwszy, że frakcja pre- $\beta$ -HDL, eluowana z żelu agarozowego, zawiera obok apo A-I, małe ilości apo A-II (Bednarek rozprawa doktorska GUMed 2013, Wolska praca magisterska UG 2009, Wróblewska i wsp. 2009, 2010). W przedstawianej pracy wyniki te zostały potwierdzone za pomocą alternatywnej, niezależnej metody izolacji pre- $\beta$ -HDL poprzez ultrawierowanie i następowe wytrącanie heparyną/ $\text{CaCl}_2$  (pkt. 3.12). Pozwala to wnioskować, że obecność małych ilości apo A-II we frakcji pre- $\beta$ -HDL i jej ewentualne właściwości

funkcjonalne nie są artefaktem doświadczalnym (Ryc. 16 B, 19 A, B, 20, 21, 23, 29, Tabela 5, 6 i 9).

Taki wniosek potwierdza również, wykazanie po raz pierwszy, metodą immunoelektroforezy rakietowej, obecności apo A-II, w wyizolowanej frakcji pre- $\beta$ -HDL, analogicznych do natywnych pre- $\beta$ -HDL A-II (pkt. 3.19.4) (Ryc. 23). Ta oryginalna metoda została opracowana dla potrzeb przedstawianej pracy (Ryc. 23). Za jej pomocą wykazano istnienie małej subpopulacji pre- $\beta$ -HDL zawierającej wyłącznie apo A-II (Ryc. 23). Obecność obu białek apo A-I i apo A-II we frakcji pre- $\beta$ -HDL potwierdzono dodatkowo metodą Western-blot (Ryc. 16).

Po za tym wykazano, że w powstającej *in vitro* frakcji pre- $\beta$ -HDL znajdują się zarówno cząstki Lp A-I jak i Lp A-I/A-II odpowiadające natywnym pre- $\beta$ -HDL A-I oraz pre- $\beta$ -HDL A-I/A-II, których obecność stwierdzano w surowicy krwi (Ryc. 22 i 23) (Hime i wsp. 2006, Tall i Green 1981, Wróblewska i wsp. 2009).

Przedstawione dane pozwalają na sformułowanie zmodyfikowanej hipotezy dotyczącej mechanizmu powstawania cząstek pre- $\beta$ -HDL o zróżnicowanej zawartości apo A-I i apo A-II jako wyniku interakcji HDL z błonowymi strukturami lipidowymi (Ryc. 30).



Ryc. 30. Hipotetyczny mechanizm powstawania cząstek pre- $\beta$ -HDL o różnym składzie apo A-I/apo A-II podczas reakcji HDL z błonami fosfolipidowymi (wg Wolska praca magisterska UG 2009, Wróblewska i wsp. 2009, 2010)

Zgodnie z Ryc. 30, HDL wychwytyjąc z liposomów FL powodują dezintegrację dwuwarstwy lipidowej liposomów, same tracąc apolipoproteiny i CHW. Apo A-I oddziela się od HDL w dwóch postaciach: związanej z niewielką ilością FL lub wolnej (Liang i wsp. 1994 i 1995), a apo A-II ze względu na swoją wysoką hydrofobowość najprawdopodobniej tylko w połączeniu z FL uwalnia się z HDL (Edelstein i wsp. 1982, Wróblewska i wsp. 2009). Następnie apo A-I i apo A-II oddziałując z FL liposomalnymi tworzą dyskowe struktury pre- $\beta$ -HDL A-I czy pre- $\beta$ -HDL A-II (Fukuda i wsp. 2007, Gillotte i wsp. 1999, Massey i wsp. 1980, 1981, Swaney i Palmieri 1984). Natomiast dyskoidalne cząstki pre- $\beta$ -HDL A-I/A-II mogą powstawać w wyniku wypierania apo A-I z pre- $\beta$ -HDL A-I przez apo A-II (Ryc. 20 A, 21 A) (Edelstein i wsp. 1982, Rosseneu i wsp. 1981, Rye i wsp. 2003, Van Tornout i wsp. 1981). Apo A-II częściowo wbudowuje się również do niezdezintegrowanych liposomów (Van Tornout i wsp. 1980, Yokoyama i wsp. 1984), które poza cząstkami pre- $\beta$ -HDL są także efektywnymi akceptorami CHW (Ryc. 30) (Bednarek rozprawa doktorska GUMed 2013, Kirby i wsp. 1980, Wolska praca magisterska UG 2009, Wróblewska i wsp. 2009, 2010). Wyniki obecnej pracy dokumentują powstawanie w warunkach *in vitro* trzech rodzajów cząstek pre- $\beta$ -HDL: zawierających wyłącznie apo A-I, wyłącznie apo A-II oraz największej ilościowo podfrakcji zawierającej obie apolipoproteiny (Ryc. 18, 19, 20, 21, 22, 23, 30).

Wiadomo, że cząstki dyskoidalne niemające hydrofobowego rdzenia lipidowego, posiadają większy ujemny powierzchniowy ładunek elektryczny. Dzięki temu wędrują one w żelu agarozowym z ruchliwością elektroforetyczną pre- $\beta$  (Davidson i wsp. 1994). Dlatego uzyskiwana przez nas frakcja pre- $\beta$ -HDL, która nie zawierała CHE, poruszała się w żelu agarozowym z ruchliwością elektroforetyczną pre- $\beta$  (Ryc. 17, Tabela 3).

Co więcej, na podstawie rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym stwierdzono, że frakcja pre- $\beta$ -HDL tworzy 2 podfrakcje o ruchliwości pre- $\beta$ , z których jedna porusza się nieco szybciej (podfrakcja pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrująca) w żelu agarozowym od drugiej (podfrakcja pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrująca) (Ryc. 17). Rozdział obu podfrakcji metodą elektroforezy 2D-PAGE pozwala przypuszczać, że przyczyną różnic mobilności tych podfrakcji może być względnie wysoka zawartość hydrofilnej apo A-I w podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej, a względnie wysoka zawartość hydrofobowej apo A-II w podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej (Ryc. 18, 19) (Brasseur i wsp. 1992).

Fracje pre- $\beta$ -HDL zawierają w swoim składzie jedynie dwa białka – apo A-I i A-II (Bednarek rozprawa doktorska GUMed 2013, Wolska praca magisterska UG 2009, Wróblewska i wsp. 2009, 2010). Dzięki temu elektroforeza 2D-PAGE daje względnie przejrzysty rozdział pod-podfrakcji pre- $\beta$ -HDL pod względem ich wielkości (Ryc. 18 i 19). Z kolei, analiza Western-blot umożliwiła wyodrębnienie i ilościowe oznaczenie zawartości apo A-I i apo A-II w kontynuum cząstek o różnej wielkości (Ryc. 20, 21) (Asztalos i wsp. 1993, Huang i wsp. 1995, Wróblewska i wsp. 2009). W ten sposób można wyodrębnić 5 niezbyt wyraźnie odgraniczonych pików o wyższej zawartości apo A-I (Ryc. 18). Z kolei apo A-II tworzyła wyraźne piki w przedziale cząstek o medianie wielkości 9.7 i 10.4 nm, odpowiednio we frakcji pre- $\beta$ -HDL-szybko- i wolno-wędrującej (Ryc. 19). Wskazuje to na zrandomizowany mechanizm nabywania przez frakcję pre- $\beta$ -HDL obu białek oraz lipidów. Jednakże, dzięki arbitralnie wyznaczonym przedziałom wielkości wykazano, że zarówno w obrębie podfrakcji pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej i pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej znajdują się pod-podfrakcje nie tylko o różnej wielkości, ale też o zmiennej zawartości i stosunku apo A-I i apo A-II (Ryc. 18, 19, 20, 21). W obu podfrakcjach pre- $\beta$ -HDL pod-podfrakcje o średnicy od <7.7 do 8.8 nm zawierały wyłącznie apo A-I (Ryc. 20, 21, 30). Cząstki o tej wielkości są charakterystyczne dla frakcji osoczowej pre- $\beta_1$ -HDL (Tabela 3) (Barrans i wsp. 1996, Barter 2002, Barter i wsp. 2003, Nofer 2007). Z kolei, w pod-podfrakcjach pre- $\beta$ -HDL-wolno-wędrującej i pre- $\beta$ -HDL-szybko-wędrującej cząstki o pośredniej wielkości 8.8 – 12.5 nm zawierały poza apo A-I najwyższą zawartość apo A-II (Ryc. 20 A i 21 A). Taka średnica cząstek odpowiadałaby frakcji pre- $\beta_2$ -HDL i pre- $\beta_3$ -HDL *in vivo* (Tabela 3) (Barrans i wsp. 1996, Barter 2002, Barter i wsp. 2003, Nofer 2007). Autorzy Ci nie stwierdzali jednak obecności apo A-II w tych frakcjach. Obecność obu apolipoprotein A wykazywano dopiero w cząstkach lipoproteinowych o średnicach nieco poniżej 14 nm o ruchliwości elektroforetycznej pre- $\beta$ , powstających *in vivo*, u myszy transgenicznym, podczas wychwytu FL i CHW z błon komórkowych przez krążące „wolne” apo A-I i apo A-II (Forte i wsp. 1995, Hara i Yokoyama 1991, Jauhiainen i wsp. 1993). Z kolei, cząstki większe niż 14 nm mogłyby stanowić struktury przeładowane FL na wzór liposomów micelarnych. Dane te byłyby zgodne z naszymi wynikami wykazującymi spadek ruchliwości elektroforetycznej pod-podfrakcji pre- $\beta$ -HDL w miarę zwiększania ich wielkości (Ryc. 18, 19, 20, 21). Z drugiej jednak strony znaczny wzrost zawartości apo A-I w tych pod-podfrakcjach wskazuje, że proces ich powiększania może odbywać się przy zrównoważonym nabywaniu przez te cząstki zarówno FL jak i apo A-I.



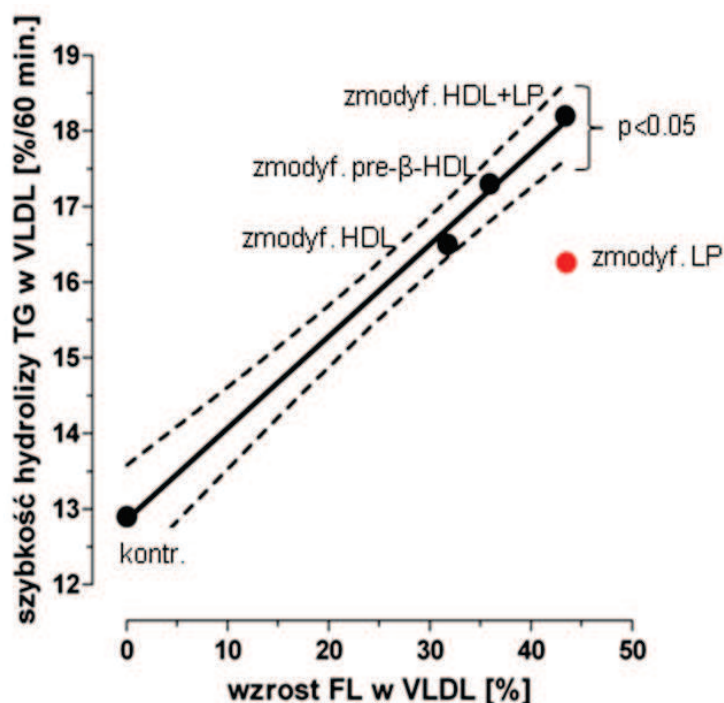
Innym zjawiskiem była nieobecność apo A-II w pod-podfrakcjach o małej średnicy i ich pojawianie się w cząstkach większych niż 8.8 nm (Ryc. 20, 21, 30). Wskazuje to, że pierwszym etapem tworzenia frakcji pre- $\beta$ -HDL jest reakcja apo A-I z fosfolipidami (Ryc. 30).

Za taką interpretacją tego zjawiska przemawia fakt, że cząstki apo A-II są bardziej hydrofobowe (Edelstein i wsp. 1982, Segrest i wsp. 1992). W związku z tym trudniej uwalniają się do środowiska inkubacyjnego *in vitro* lub osocza *in vivo* (Saito i wsp. 2004, Segrest i wsp. 1992, Van Tornout i wsp. 1981). Z drugiej jednak strony małe kompleksy apo A-II z FL uwalniające się z HDL mogłyby również łatwo łączyć się z hetero-oligomerami apo A-I-FL lub z mniejszym prawdopodobieństwem z mniej licznymi homo-oligomerami apo A-II-FL (Ryc. 30). Na istnienie zjawiska preferencyjnego wiązania apo A-II z tymi cząstkami może wskazywać wyraźny pik apo A-II zlokalizowany w pod-podfrakcjach o pośredniej wielkości (Ryc. 19, 20 A, 21 A). Natomiast „wolne” apo A-I mogłyby łatwo tworzyć połączenia zarówno z FL jak i z oligomerami apo A-I-FL tworząc „młode” formy pre- $\beta$ -HDL o najmniejszych średnicach (<8.8 nm), zawierające wyłącznie apo A-I (Ryc. 18, 20, 21, 30). W dalszej kolejności powiększanie średnicy („dojrzewanie”) cząstek pre- $\beta$ -HDL polegałoby na nabywaniu jedynie apo A-I i FL, o czym świadczy spadek bezwzględnej i względnej zawartości apo A-II (Ryc. 20, 21). Jest więc wysoce prawdopodobne, że cząstki pre- $\beta$ -HDL A-II lokalizują się głównie w obrębie cząstek 8.8 - 12.5 nm (Ryc. 19, 20, 23, 30). Tak więc, zarówno homogenne cząstki pre- $\beta$ -HDL apo A-I lub apo A-II dawałyby początek większym pre- $\beta$ -HDL zawierającym obie apolipoproteiny, ze stopniowo wzrastającą zawartością apo A-I (Ryc. 18, 20, 21, 30).

Przedstawione tu badania wykazały, że zarówno frakcja natywnych HDL, mieszanina HDL i liposomów, jak i same liposomy modyfikowały frakcję VLDL w ten sposób, że zawarte w niej TG stawały się bardziej podatne na hydrolizę przez LPL (Ryc. 27, słupek 3, 4, 5). Szybkość hydrolizy TG przez LPL w VLDL modyfikowanych czy to natywną frakcją HDL, czy też mieszaniną HDL i liposomów była odpowiednio o 28% i 41% szybsza niż w niemodyfikowanych VLDL (Ryc. 27, słupek 2, 3 i 5). Natomiast same fosfolipidy z LP przyspieszały ten proces o 27% (Ryc. 27, słupek 2 i 4).

Tak więc, w tym ostatnim przypadku przyczyną wzrostu szybkości hydrolizy TG w VLDL zmodyfikowanych inkubacją z LP (Ryc. 27, słupek 4) mógł być wyłącznie wzrost stężenia FL w tych cząstkach (Ryc. 25, słupek 3). Wbudowywanie FL do VLDL zwiększałoby ich hydrofilność, ułatwiając hydrolizę zawartych w nich TG przez LPL

(Ryc. 27, słupek 4) (Fisher i wsp. 1995) oraz zmianę ich ruchliwości elektroforetycznej (Ryc. 24 B, ścieżka 3 i 5). Również w przypadku modyfikacji VLDL innymi frakcjami lipoproteinowymi za przyspieszenie hydrolizy TG odpowiedzialny był transfer FL (Ryc. 25 i 27, Tabela 8). Innym czynnikiem zwiększającym hydrofilność modyfikowanych VLDL mogłoby być jednoczesne usuwanie z nich CHW, mniej hydrofilnego niż FL (Ryc. 26), co także mogło wpływać na zmianę ruchliwości elektroforetycznej VLDL (Ryc. 27, ścieżka 1, 3 i 5). Akceptorem CHW byłyby tutaj frakcje HDL, LP lub pre- $\beta$ -HDL aktualnie używane do modyfikacji VLDL (Ryc. 26, Tabela 8 (Favari i wsp. 2009, Rodrigueza i wsp. 1997, 1998), których ruchliwość elektroforetyczna w żelu agarozowym, za wyjątkiem HDL, nie zmieniała się (Ryc. 24). Tak więc, można postulować, że w warunkach *in vivo* akceptacja FL z HDL i błon biologicznych z jednoczesną utratą CHW w VLDL byłyby istotnymi czynnikami przyspieszającymi hydrolizę TG w VLDL (Mendez i wsp. 1988). Za taką hipotezą przemawia fakt, że szybkość hydrolizy TG wykazywała silną korelację ze stopniem absorpcji FL tylko dla VLDL modyfikowanych frakcjami lipoproteinowymi zawierającymi CHW (Ryc. 31).



Ryc. 31. Korelacja między szybkością hydrolizy TG w VLDL a przyrostem w nich FL po modyfikacji z mieszaniną HDL i LP, natywną frakcją HDL, liposomami czy frakcją pre- $\beta$ -HDL.

Natomiast punkt odpowiadający interakcji LP z VLDL lokalizował się poza 95% prawdopodobieństwem krzywej regresji, co wynikałoby z nieobecności CHW w tym preparacie (Ryc. 31). Potwierdza to naszą tezę o interakcji FL i CHW w zwiększaniu dostępności TG w VLDL dla LPL.

Z drugiej strony, stała zawartość lipidów rdzeniowych CHE i TG w VLDL podczas ich modyfikacji wskazuje, że nie odgrywały one roli w procesie aktywacji procesu lipolizy przez LPL (Ryc. 27, Tabela 8).

Doświadczenia na myszach transgenicznym z nadekspresją ludzkiej apo A-II wykazały, że rozwija się u nich hipertriglicerydemia (Julve i wsp. 2000, 2010). Jej przyczyną może być wzrost produkcji VLDL (Julve i wsp. 2000) oraz spowolnienie hydrolizy TG chylomikronów i VLDL przez wbudowanie się do nich apo A-II (Castellani i wsp. 2008, Dugué-Pujol i wsp. 2006). Osoby z rodzinną złożoną hiperlipidemią mają podwyższone stężenia apo A-II, mimo niskiego poziomu cholesterolu HDL, które korelują ze wzrostem poziomu TG i CH w surowicy (Allayee i wsp. 2003). Zauważono, że zamiana T na C w allelu 265 genu *APOA-II* u 50-letnich mężczyzn wiąże się z obniżonym stężeniem apo A-II i wzmożonym poposiłkowym metabolizmem dużych VLDL sprzyjającym otyłości brzusznej (Van't Hooft i wsp. 2001). Taką samą zależność zaobserwowano u białych kobiet będących po menopauzie (Lara-Castro i wsp. 2005). Za możliwość udziału apo A-II w tym zjawisku, przemawia jej zdolność do przemieszczania się między syntetycznymi strukturami lipidowymi przez fazę wodną (Pownall i wsp. 1981, Shen 1985, Yokoyama i wsp. 1984), jak i wbudowywanie się do VLDL (Mao i wsp. 1981). Również nasze poprzednie badania wykazały zdolność apo A-II do wiązania się z LP (Bednarek rozprawa doktorska GUMed 2013, Wolska praca magisterska UG 2009, Wróblewska i wsp. 2009, 2010).

Co więcej, obecna praca wykazała, że w poszczególnych doświadczeniach uzyskiwana frakcja pre- $\beta$ -HDL oddziaływała w połowie badań hamująco na szybkość lipolizy TG, a w połowie - przyspieszająco, w stosunku do niemodyfikowanej frakcji VLDL (Ryc. 28, słupki 2, 4, 5, Ryc. 29). Frakcję pre- $\beta$ -HDL hamującą szybkość hydrolizy TG nazwano pre- $\beta$ -W-HDL, a przyspieszającą – pre- $\beta$ -N-HDL (pkt. 4.5), gdyż zaobserwowano, że frakcja pre- $\beta$ -W-HDL ma 4.5-krotnie więcej apo A-II niż frakcja pre- $\beta$ -N-HDL, przy podobnych zawartościach apo A-I (Tabela 9). Dlatego, można przypuszczać, że to zwiększona ilość apo A-II we frakcji pre- $\beta$ -W-HDL miała wpływ na katabolizm VLDL poprzez hamowanie aktywności LPL, co byłoby zgodne z wynikami Castellani i wsp. (2008) (Ryc. 28, słupki 4 i 5, Ryc. 29). Nasze wyniki sugerują, że apo A-II, której

nośnikiem jest nowo-powstała frakcja pre- $\beta$ -HDL A-II, może wbudowywać się w cząstki VLDL powodując słabsze jej oddziaływanie z LPL i przez to obniżoną lipolizę tych lipoprotein (Ryc. 23 B, Tabela 9). Tak więc, zmiany zawartości FL oraz CHW i apo A-II wywierałyby przeciwstawny wpływ na podatność TG w cząstkach VLDL na lipolizę (Castellani i wsp. 2008, Dugué-Pujol i wsp. 2006, Fisher i wsp. 1995). Można przypuszczać, że taki mechanizm może regulować lipolizę w warunkach *in vivo*. Również zaburzenia tego procesu mogą być jedną z przyczyn powstawania hipertriglicydemii w przebiegu różnych zespołów chorobowych (Allayee i wsp. 2003, Lara-Castro i wsp. 2005, Van't Hooft i wsp. 2001, Warden i wsp. 1993).

## 6. Wnioski

1. Metoda izolacji frakcji pre- $\beta$ -HDL z mieszaniny HDL i liposomów, opracowana dla potrzeb rozprawy, pozwala uzyskiwać frakcję pre- $\beta$ -HDL w ilościach preparatywnych, umożliwiającą badanie jej składu, właściwości oraz funkcji.
2. Frakcja pre- $\beta$ -HDL powstająca w wyniku reakcji HDL i liposomów, jest heterogenna pod względem składu białkowego, średnicy cząstek i ruchliwości elektroforetycznej. W jej skład wchodzi zarówno cząstki: małe zawierające tylko apo A-I, o pośredniej wielkości zawierające tylko apo A-II oraz średniej i dużej wielkości zawierające apo A-I i apo A-II.
3. Wszystkie lipoproteiny oraz liposomy fosfolipidowe mogą być donatorami FL dla VLDL, a frakcja VLDL donatorem CHW dla tych frakcji. Istnieje prawdopodobieństwo transferu apo A-II z HDL i frakcji pre- $\beta$ -HDL do VLDL.
4. Przyspieszenie hydrolizy TG w zmodyfikowanych VLDL przez LPL może wynikać ze wzrostu zawartości FL i spadku zawartości CHW. Inkorporacja apo A-II może z kolei hamować ten proces.
5. Wielokierunkowe przemieszczenia składników lipidowych i apolipoprotein do frakcji VLDL mogą spełniać istotną rolę regulującą poziom triglicydemii potrawiennej zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych.

## Piśmiennictwo

- Adiels, M., S. V. Olofsson, M. R. Taskinen, J. Borén.** 2008. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**: 1225-1236.
- Allayee, H., L. W. Castellani, R. M. Cantor, T. W. de Bruin, A. J. Lusis.** 2003. Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia. *Circ. Res.* **92**: 1262-1267.
- Arca, M., A. Montali, S. Valiante, F. Campagna, G. Pigna, V. Paoletti, R. Antonini, F. Barill, G. Tanzilli, A. Vestri, C. Gaudio.** 2007. Usefulness of atherogenic dyslipidemia for predicting cardiovascular risk in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **100**: 1511-1516.
- Assmann, G., J. R. Nofer.** 2003. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu. Rev. Med.* **54**: 321-341.
- Asztalos, B. F., S. Demissie, L. A. Cupples, D. Collins, C. E. Cox, K. V. Horvath, H. E. Bloomfield, S. J. Robins, E. J. Schaefer.** 2006. LpA-I, LpA-I:A-II HDL and CHD-risk: The Framingham Offspring Study and the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Atherosclerosis.* **188**: 59-67.
- Asztalos, B. F., E. J. Schaefer, K. V. Horvath, S. Yamashita, M. Miller, G. Franceschini, L. Calabresi.** 2007. Role of LCAT in HDL remodelling: investigation of LCAT deficiency states. *J. Lipid Res.* **48**: 592-599.
- Asztalos, B. F., C. H. Sloop, L. Wong, P. S. Roheim.** 1993. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. *Biochem. Biophys. Acta.* **1169**: 291-300.
- Bańkowski, E.** Lipoproteiny osocza., [w:] *Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych.* Bańkowski E. (red.), Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2009, ss. 214-220.
- Barrans, A., B. Jaspard, R. Barbaras, H. Chap, B. Perret, X. Collet.** 1996. Pre- $\beta$  HDL: structure and metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1300**: 73-85.
- Barter, P. J.** 2002. Hugh Sinclair Lecture: The regulation and remodelling of HDL by plasma factors. *Atherosclerosis Suppl.* **3**: 39-47.
- Barter, P. J., G. J. Hopkins, G. D. Calvert.** 1982. Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochem. J.* **208**: 1-7.

- Barter, P., J. Kastelein, A. Nunn, R. Hobbs, Future Forum Editorial Board.** 2003. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis*. **168**: 195-211.
- Bednarek, M.** *Udział apolipoproteiny A-II w przemianach zachodzących pod wpływem egzogennych fosfolipidów.* (rozprawa doktorska) Promotor: prof. dr hab. Andrzej Szutowicz, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, 2013.
- Birjmohun, R. S., G. M. Dallinga-Thie, J. A. Kuivenhoven, E. S. G. Stroes, J. D. Otvos, N. J. Wareham, R. Luben, J. J. P. Kastelein, K. T. Khaw, S. M. Boekholdt.** 2007. Apolipoprotein A-II is inversely associated with risk of future coronary artery disease. *Circulation*. **116**: 2029-2035.
- Blanche, P. J., A. V. Nichols, T. M. Forte, E. L. Gong.** 1988. Characterization of complexes of egg yolk phosphatidylcholine and apolipoprotein A-II prepared in the absence and presence of sodium cholate. *Biochim. Biophys. Acta*. **958**: 143-152.
- Blanco-Vaca, F., J. C. Escolà-Gil, J. M. Martin-Campos, J. Julve.** 2001. Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein. *J. Lipid Res*. **42**: 1727-1739.
- Boisfer, E., G. Lambert, V. Atger, N. Q. Tran, D. Pastier, C. Benetollo, J. F. Trottier, I. Beaucampst, M. Antonucci, M. Laplaud, S. Griglio, J. Chambaz, A. D. Kalopissis.** 1999. Overexpression of human apolipoprotein A-II in mice induces hypertriglyceridemia due to defective very low density lipoprotein hydrolysis. *J. Biol. Chem*. **274**: 11564-11572.
- Brasseur, R., L. Lins, B. Vanloo, J. M. Ruyschaert, M. Rosseneu.** 1992. Molecular modeling of the amphipathic helices of the plasma apolipoproteins. *Proteins*. **13**: 246-257.
- Broedl, U. C., W. Jin, I. V. Fuki, J. S. Millar, D. J. Rader.** 2006. Endothelial lipase is less effective at influencing HDL metabolism in vivo in mice expressing apo A-II. *J. Lipid Res*. **47**: 2191-2197.
- Brousseau, T., V. Clavey, J. M. Bard, J. C. Fruchart.** 1993. Sequential ultracentrifugation micromethod for separation of serum lipoproteins and assays of lipids, apolipoproteins, and lipoprotein particles. *Clin. Chem*. **39 (6)**: 960-964.
- Castellani, L. W., M. Navab, B. J. Van Lenten, C. C. Hedrick, S. Y. Hama, A. M. Goto, A. M. Fogelman, A. J. Lusis.** 1997. Overexpression of apolipoprotein AII

- in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J. Clin. Invest.* **100**: 464-474.
- Castellani, L. W., C. N. Nguyen, S. Charugundla, M. W. Weinstein, C. X. Doan, W. S. Blaner, N. Wongsiriroj, A. J. Lusic.** 2008. Apolipoprotein A-II is a regulator of VLDL metabolism and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **283**: 11633-11644.
- Chapman, M. J., S. Goldstein, D. Lagrange, P. M. Laplaud.** 1981. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J. Lipid Res.* **22**: 339-358.
- Davidson, W. S., D. L. Sparks, S. Lund-Katz, M. C. Philips.** 1994. The molecular basis for the difference in charge between pre- $\beta$  and  $\alpha$ -migrating high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **269 (12)**: 8959-8965.
- De Grooth, G. J., A. H. E. M. Klerkx, E. S. G. Stroes, A. F. H. Stalenhofen, J. J. P. Kastelein, J. A. Kuivenhoven.** 2004. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **45**: 1967-1974.
- Dugué-Pujol, S., X. Rousset, D. Pastier, N. T. Quang, V. Pautre, J. Chambaz, M. Chabert, A. D. Kalopissis.** 2006. Human apolipoprotein A-II associates with triglyceride-rich lipoproteins in plasma and impairs their catabolism. *J. Lipid Res.* **47**: 2631-2639.
- Edelstein, C., M. Halari, A. M. Scanu.** 1982. On the mechanism of the displacement of apolipoprotein A-I by apolipoprotein A-II from the high density lipoprotein surface. Effect of concentration and molecular forms of apolipoprotein A-II. *J. Biol. Chem.* **257**: 7189-7195.
- Escolà-Gil, J. C., A. Marzal-Casacuberta, J. Julve-Gil, B. Y. Ishida, J. Ordóñez-Llanos, L. Chan, F. González-Sastre, F. Blanco-Vaca.** 1998. Human apolipoprotein A-II is a pro-atherogenic molecule when it is expressed in transgenic mice at a level similar to that in humans: evidence of a potentially relevant species-specific interaction with diet. *J. Lipid Res.* **39**: 457-462.
- Favari, E., L. Calabresi, M. P. Adorni, W. Jessup, S. Simonelli, G. Franceschini, F. Bernini.** 2009. Small discoidal pre- $\beta$ 1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry.* **48**: 11067-11074.
- Fisher, R. M., S. W. Coppack, S. M. Humphreys, G. F. Gibbons, K. N. Frayn.** 1995. Human triacylglycerol-rich lipoprotein subfractions as substrates for lipoprotein lipase. *Clinica Chimica Acta.* **236**: 7-17.



- Forte, T. M., R. Goth-Goldstein, R. W. Nordhausen, M. R. McCall.** 1993. Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles. *J. Lipid Res.* **34**: 317-324.
- Forte, T. M., J. K. Bielicki, R. Goth-Goldstein, J. Selmek, M. R. McCall.** 1995. Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT. *J. Lipid. Res.* **36**: 148-157.
- Fournier, N., A. Cogny, V. Atger, D. Pastier, D. Goudouneche, A. Nicoletti, N. Moatti, J. Chambaz, J. L. Paul, A. D. Kalopissis.** 2002. Opposite effects of plasma from human apolipoprotein A-II transgenic mice on cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**: 638-643.
- Fournier, N., J. L. Paul, V. Atger, A. Cogny, T. Soni, M. de la Llera-Moya, G. Rothblat, N. Moatti.** 1997. HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 2685-2691.
- Fukuda, M., M. Nakano, S. Sriwongsitanont, M. Ueno, Y. Kuroda, T. Handa.** 2007. Spontaneous reconstitution of discoidal HDL from sphingomyelin-containing model membranes by apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* **48**: 882.
- Gillard, B. K., H. Y. Lin, J. B. Massey, H. J. Pownall.** 2009. Apolipoproteins A-I, A-II and E are independently distributed among intracellular and newly secreted HDL of human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1791**: 1125-1132.
- Gillotte, K. L., Z. Mohamed, S. Lund-Katz, G. M. Anantharamaiah, P. Holvoet, A. Dhoest, M. N. Palgunachari, J. P. Segrest, K. H. Weisgraber, G. H. Rothblat, M. C. Phillips.** 1999. Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolvubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J. Biol. Chem.* **274 (4)**: 2021-2028.
- Goldberg, I. J.** 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.* **37**: 693-707.
- Hara, H., S. Yokoyama.** 1991. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* **266**: 3080-3086.

- Havel, R. J., V. G. Shore, B. Shore, D. M. Bier.** 1970. Role of specific glycopeptides of human serum lipoproteins in the activation of lipoprotein lipase. *Circ. Res.* **27**: 595-600.
- Hedrick, C. C., L. W. Castellani, C. H. Warden, D. L. Puppione, A. J. Lusis.** 1993. Influence of mouse apolipoprotein A-II on plasma lipoproteins in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **268 (27)**: 20676-20682.
- Hime, N. J., K. J. Drew, K. Wee, P. J. Barter, K. A. Rye.** 2006. Formation of high density lipoproteins containing both apolipoprotein A-I and A-II in the rabbit. *J. Lipid Res.* **47**: 115-122.
- Huang, C.** 1969. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry.* **8**: 344-352.
- Huang, Y., A. von Eckardstein, S. Wu, C. Langer, G. Assmann.** 1995. Generation of pre-beta 1-HDL and conversion into alpha-HDL. Evidence for disturbed HDL conversion in Tangier disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 1746-1754.
- Ikewaki, K., Zech, L. A., M. Kindt, H. B. Brewer, D. J. Rader.** 1995. Apolipoprotein A-II production rate is a major factor regulating the distribution of apolipoprotein A-I among HDL subclasses LpA-I and LpA-I:A-II in normolipidemic humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 306-312.
- Jauhiainen, M., J. Metso, R. Pahlman, S. Blomqvist, A. Van Tol, C. Ehnholm.** 1993. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J. Biol. Chem.* **268**: 4032-4036.
- Jong, M. C., M. H. Hofker, L. M. Havekes.** 1999. Role of apoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between apoC1, apoC2, and apoC3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 472-484.
- Julve, J., J. C. Escolà-Gil, A. Marzal-Casacuberta, J. Ordonez-Llanos, F. Gonzales-Sastre, F. Blanco-Vaca.** 2000. Increased production of very-low-density lipoproteins in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II and fed with a high-fat diet. *Biochim. Biophys. Acta.* **1488**: 233-244.
- Julve, J., J. C. Escolà-Gil, V. Ribas, F. González-Sastre, J. Ordóñez-Llanos, J. L. Sánchez-Quesada, F. Blanco-Vaca.** 2002. Mechanisms of HDL deficiency in mice overexpressing human apoA-II. *J. Lipid Res.* **43**: 1734-1742.
- Julve, J., J. C. Escolà-Gil, N. Rotllan, C. Fievet, E. Vallez, C. de la Torre, V. Ribas, J. H. Sloan, F. Blanco-Vaca.** 2010. Human apolipoprotein A-II determines

- plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high density lipoprotein proteome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**: 232-238.
- Kirby, C., J. Clarke, G. Gregoriadis.** 1980. Cholesterol content of small unilamellar liposomes controls phospholipid loss to high density lipoproteins in the presence of serum. *Febs Letters.* **111**: 324-328.
- Kuliszkiwicz-Janus, M., A. S. Mohammed, N. Abod.** 2006. Biologia lipoproteiny HDL i jej przeciwmiażdżycowe działanie. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **60**: 307-315.
- Lagocki, P. A., A. M. Scanu.** 1980. *In vitro* modulation of the apolipoprotein composition of high density lipoprotein. *J. Biol. Chemistry.* **255 (8)**: 3701-3706.
- La Goff, W., M. Guerin, M. J. Chapman.** 2004. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol. Ther.* **101**: 17-38.
- Lara-Castro, C., G. R. Hunter, J. C. Lovejoy, B. A. Gower, J. R. Fernandez.** 2003. Apolipoprotein A-II polymorphism and visceral adiposity in African-american and white women. *Obesity Research.* **13 (3)**: 507-512.
- Laurell, C. B.** 1972. Electroimmuno assay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **124**: 21-37.
- Lewis, G. F., D. J. Rader.** 2005. New insight into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* **96**: 1221-1232.
- Li, Z., J. R. McNamara, J. M. Ordovas, E. J. Schaefer.** 1994. Analysis of high density lipoproteins by a modified gradient gel electrophoresis method. *J. Lipid Res.* **35**: 1698-1711.
- Liang, H. Q., K. A. Rye, P. J. Barter.** 1994. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J. Lipid Res.* **35**: 1187-1199.
- Liang, H. Q., K. A. Rye, P. J. Barter.** 1995. Cycling of apolipoprotein A-I between lipid-associated and lipid-free pools. *Biochim. Biophys. Acta.* **1257**: 31-37.
- Malik, S., N. D. Wong, S. S. Franklin, T. V. Kamath, G. J. L'Italien, J. R. Pio, G. Rhys Williams.** 2004. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in united states adults. *Circulation.* **110**: 1245-1250.
- Mao, S. J. T., K Kluge, S. J. Squillace.** 1981. Apolipoprotein A-II can incorporate plasma very low density lipoproteins. *FEBS.* **132 (2)**: 289-292.

- Marenah, C. B.** Lipid metabolism, hyper- and hypolipidaemias., [w:] Clinical biochemistry, Marshall W. J i Bangert S. K. (red.), *Churchill Livingstone Elseviere*, China, 2008, ss. 749-782.
- Massey, J. B., A. M. Gotto, H. J. Pownall.** 1980. Dynamics of lipid-protein interactions. Interaction of apolipoprotein A-II from human plasma high density lipoproteins with dimyristoylphosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **255**: 10167-10173.
- Massey, J. B., M. F. Rohde, W. B. Van Winkle, A. M. Gotto, H. J. Pownall.** 1981. Physical properties of lipid-protein complexes formed by the interaction of dimyristylphosphatidylcholine and human high-density apolipoprotein A-II. *Biochemistry.* **20**: 1569-1574.
- Matz, C. E., A. Jonas.** 1982. Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J. Biol. Chemistry.* **257 (8)**: 4535-4540.
- McEneny, J., C. M. Loughrey, P. T. McNamee, E. R. Trimble, I. S. Young.** 1997. Susceptibility of VLDL to oxidation in patients on regular haemodialysis. *Atherosclerosis.* **129**: 215-220.
- Mead, J. R., S. A. Irvine, D. P. Ramji.** 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med.* **80**: 753-769.
- Mendez, A. J., J. L. He, H. S. Huang, S. R. Wen, S. L. Hsia.** 1988. Interaction of rabbit lipoproteins and red blood cells with liposomes of egg yolk phospholipids. *Lipids.* **23 (10)**: 961-967.
- Michajlik, A., E. Bartnikowska.** Lipidy i lipoproteiny osocza. *Wyd. Lek. PZWL*, Warszawa, 1999.
- Nowicka, G.** Fizjologiczna rola lipoprotein., [w:] Zaburzenia lipidowe, Cybulska B. i Kłosiewicz-Latoszek L. (red.), *Termedia Wydawnictwa Medyczne*, Poznań, 2010, ss. 9-16.
- Nowicka, G i Naruszewicz M.** Patogeneza miażdżycy., [w:] Biochemia kliniczna i diagnostyka laboratoryjna chorób układu krążenia, Sitkiewicz S. (red.), *OINPHARMA*, Warszawa, 2007, ss. 35-47.
- O'Connor, P. M., B. R. Zysow, S. A. Schoenhaus, B. Y. Ishida, S. T. Kunitake, J. M. Naya-Vigne, P. N. Duchateau, R. F. Redberg, S. J. Spencer, S. Mark, M. Mazur, D. C. Heilbron, R. B. Jaffe, M. J. Malloy, J. P. Kane.** 1998. Prebeta-1

- HDL in plasma of normolipidemic individuals: influences of plasma lipoproteins, age and gender. *J. Lipid Res.* **39**: 670-678.
- Oram, J. F.** 2003. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**: 720-727.
- Owen, J. S., J. V. Mulcahy.** 2002. ATP-binding cassette A1 protein and HDL homeostasis. *Atherosclerosis Suppl.* **3**: 13-22.
- Pietzsch, J., S. Subat, S. Nitzsche, W. Leonhardt, K. U. Schentke, M. Hanefeld.** 1995. Very fast ultracentrifugation of serum lipoproteins: influence on lipoprotein separation and composition. *Biochim. Biophys. Acta.* **1254 (1)**: 77-88.
- Pownall, H. J., D. Hickson, A. M. Gotto Jr.** 1981. Thermodynamics of lipid-protein association. The free energy of association of lecithin with reduced and carboxymethylated apolipoprotein A-II from human plasma high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **256 (19)**: 9849-9854.
- Rodrigueza, W. V., K. J. Williams, G. H. Rothblat, M. C. Phillips.** 1997. Remodeling and shuttling: mechanisms for the synergistic effects between different acceptor particles in the mobilization of cellular cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17 (2)**: 383-393.
- Rodrigueza, W. V., M. C. Phillips, K. J. Williams.** 1998. Structural and metabolic consequences of lipidome-lipoprotein interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **32**: 31-43.
- Rosseneu, M., P. Van Tornout, M. J. Lievens, G. Assmann.** 1981. Displacement of the human apoprotein A-I by the human apoprotein A-II from complexes of (apoprotein A-I)-phosphatidylcholine-cholesterol. *Eur. J. Biochem.* **117**: 347-352.
- Rye, K. A., P. J. Barter.** 2004. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 421-428.
- Rye, K. A., A. C. Moira, P. J. Barter.** 1999. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Artherosclerosis.* **145**: 227-238.
- Rye, K. A., K. Wee, L. K. Curtiss, D. J. Bonnet, P. J. Barter.** 2003. Apolipoprotein A-II inhibits high density lipoprotein remodelling and lipid-poor apolipoprotein A-I formation. *J. Biol. Chem.* **278 (25)**: 22530-22536.
- Saito, H., S. Lund-Kutz, M. C. Philips.** 2004. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog. Lipid Res.* **43**: 350-380.

- Schultz, J. R., J. G. Verstuyft, E. L. Gong, A. V. Nichols, E. M. Rubin.** 1993. Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL transgenic mice. *Nature*. **365**: 762-764.
- Segrest, J. P., M. K. Jones, H. De Loof, C. G. Brouillette, Y. V. Venkatachalapathi, G. M. Anantharamaiah.** 1992. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* **33**: 141-166.
- Shen, B. W.** 1985. Lipid-protein interaction at solid-water interface. Adsorption of human apo-high density lipoprotein to amphiphilic interfaces. *J. Biol. Chem.* **260**: 1032-1039.
- Shuhei, N., S. Söderlund, M. Jauhiainen, M. R. Taskinen.** 2010. Effect of HDL composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation. *Lipids in health and disease*. **9**: 104.
- Singleton, W. S., M. S. Gray, M. L. Brown, J. L. White.** 1965. Chromatographically homogenous lecithin from egg phospholipids. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **42**: 53-56.
- Swaney, J. B., E. Palmieri.** 1984. Hybrid association between human apolipoproteins A-I and A-II in aqueous solution and in phospholipid recombinants. *Biochim. Biophys. Acta.* **792**: 164-171.
- Szafran, H., M. Knapik-Czajka.** Apolipoproteiny i receptory na te białka., [w:] Podstawy biochemiczne gospodarki lipidowej organizmu człowieka. Szafran H. i Knapik-Czajka M. (red.), *Collegium Medicum UJ*, Kraków, 1994, ss. 22-27.
- Tall, A. R. and P. H. R. Green.** 1981. 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.* **256**: 2035-2044.
- Van Tol.** 2002. Phospholipid transfer protein. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**: 135-139.
- Van Tornout, P., H. Caster, M. J. Lievens, M. Rosseneu, G. Assmann.** 1981. In vitro interaction of human HDL with human apolipoprotein A-II. Synthesis of apolipoprotein A-II-rich HDL. *Biochim. Biophys. Acta.* **663**: 630-636.
- Van Tornout, P., R. Vercaemst, M. J. Lievens, H. Caster, M. Rosseneu, G. Assmann.** 1980. Reassembly of human apoproteins A-I and A-II with unilamellar phosphatidylcholine-cholesterol liposomes. Association kinetics and characterization of the complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **601**: 509-523.

- Van't Hoof, F. M., G. Ruotolo, S. Boquist, U. de Faire, G. Eggertsen, A. Hamsten.** 2001. Human evidence that the apolipoprotein A-II gene is implicated in visceral fat accumulation and metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Circulation*. **104**: 1223-1228.
- Warden, C. H., A. Daluiski, X. Bu, D. A. Purcell-Huynh, C. De Meester, B. H. Shieh, D. L. Puppione, R. M. Gray, G. M. Reaven, Y. D. I. Chen, J. I. Rotter, A. J. Lusis.** 1993. Evidence for linkage of the apolipoprotein A-II locus to plasma apolipoprotein A-II and free fatty acid levels in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 10886-10890.
- Weng, W., J. L. Breslow.** 1996. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 13788-147994.
- Wilson, O. W. F., R. B. D'Agostino, H. Parise, L. Sullivan, J. B. Meigs.** 2005. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. **112**: 3066-3072.
- Winkler, K., M. Nauck, R. Siekmeier, W. Marz, H. Wieland.** 1995. Determination of triglycerides in lipoproteins separated by agarose gel electrophoresis. *J. Lipid. Res.* **36**: 1839-1847.
- Wolska, A.** *Izolacja i wstępna charakterystyka frakcji o ruchliwości pre-β powstającej w wyniku oddziaływania pomiędzy HDL a liposomami lecytinowymi.* (praca magisterska) Promotor: prof. dr hab. Andrzej Szutowicz, Uniwersytet Gdański, Gdynia, 2009.
- Wolska, A., U. Walkusz, B. Kortas-Stempak, M. Wróblewska.** *Izolacja frakcji pre-β-HDL z mieszaniny HDL i liposomów lecytinowych.* XVIII Zjazd PTDL, 15 – 18 wrzesień, 2013 r., Warszawa.
- Wróblewska, M.** *Powstawanie nowych cząstek lipoproteinowych zawierających apolipoproteinę A-II podczas przemian lipoprotein wysokiej gęstości zachodzących pod wpływem fosfolipidów.* (rozprawa habilitacyjna) Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 2011, t. 41, supl. 8.
- Wróblewska, M.** Diagnostyka zaburzeń metabolizmu lipoprotein osocza., [w:] *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I.* A. Szutowicz, A. Raszeja-Specht (red.), Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, 2009, ss: 78-101.

- Wróblewska, M.** 2009. Rola apolipoprotein A-I i A-II w przemianach HDL w osoczu. *Postępy Biochemii*. **55 (3)**: 315-322.
- Wróblewska, M., M. Czyżewska, A. Wolska, B. Kortas-Stempak, A. Szutowicz.** 2010. Apo A-II participates in HDL-liposome interaction by the formation of new pre- $\beta$  mobility particles and the modification of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1801**: 1323-1329.
- Wróblewska, M., B. Kortas-Stempak, A. Szutowicz, T. Badzio.** 2009. Phospholipids mediated conversion of HDLs generates specific apo A-II pre- $\beta$  mobility particles. *J. Lipid Res.* **50**: 667-675.
- Wróblewska, M., A. Wolska, M. Czyżewska, A. Gliwińska, B. Kortas-Stempak, A. Szutowicz.** Primary characterization of pre- $\beta$  mobility fraction containing apo A-I and/or apo A-II subpopulations generated during phospholipid-mediated conversion of HDL., [w:] *New approaches In coronary artery disease. Proceedings of the 8th International Congress on Coronary Artery Disease*. S. B. Lewis, P. Widimsky, M. Y. Flugelman, D. A. Halon (red.), Medimont International Proceedings, 2009, ss: 71-74.
- Yokoyama, S., S. Tajima, A. Yamamoto.** 1984. Association of apolipoprotein A-II with egg phosphatidylcholine unilamellar vesicles. *J. Biochem.* **96**: 871-880.