

# Подавление ассоциации липопротеидов низкой плотности плурониками\*

Мельниченко А.А.<sup>1,3</sup>, Аксенов Д.В.<sup>1</sup>, Ярославов А.А.<sup>2</sup>, Карагодин В.П.<sup>3</sup>, Собенин И.А.<sup>1,3,4</sup>, Орехов А.Н.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт атеросклероза (Сколково), Москва

<sup>4</sup> Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития, Москва

Ранее было продемонстрировано, что модифицированные любым способом липопротеиды низкой плотности (ЛНП) образуют ассоциаты, и эти ассоциаты проявляют атерогенные свойства, вызывая накопление внутриклеточных липидов. Была выявлена прямая зависимость между размером ассоциатов ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов в клетках, причем нативные ЛНП не образовывали ассоциатов и не обладали атерогенными свойствами, т.е. не вызывали накопление внутриклеточных липидов. Можно сделать предположение, что без ассоциации ЛНП не проявляются их атерогенные свойства. Исходя из этого, особый интерес представляет поиск модуляторов процесса ассоциации ЛНП. Мы предположили, что на эту роль могут претендовать амфифильные сополимеры окиси пропилена и окиси этилена, так называемые плуроники. В данной работе изучена способность плуроников P85, L61 и F68 с различными гидрофильно-липофильными свойствами влиять на ассоциацию ЛНП. Показано, что плуроники с выраженными гидрофобными свойствами (P85 и L61) в концентрациях близких или больших к критической концентрации мицеллообразования ингибировали процесс ассоциации ЛНП, в то время как «гидрофильный» плуроник F68 в любой концентрации не влиял на ассоциацию ЛНП.

**Ключевые слова:** плуроники, липопротеиды низкой плотности, атерогенный

## Введение

Одним из первых проявлений атеросклероза на клеточном уровне является накопление липидов, в частности эфиров холестерина, в интиме артерий [1, 14, 16]. Источником липидов, накапливающихся в интиме сосудов, являются циркулирующие в крови липопротеиды низкой плотности (ЛНП) [3, 8]. При этом нативные ЛНП, циркулирующие в крови, не способны вызывать накопление липидов в культивируемых клетках, т.е. не атерогенны [4, 10, 15]. С другой стороны, многими исследователями было продемонстрировано, что модифицированные различным образом *in vitro* (ацетилированные, обработанные малоновым диальдегидом, вортексированные, гликозилированные и т.д.) ЛНП атерогенны [9, 10, 12, 13].

Ранее было продемонстрировано, что модифицированные любым способом ЛНП образуют ассоциаты, и эти ассоциаты проявляют атерогенные свойства, вызывая накопление внутриклеточных липидов. Была выявлена прямая зависимость между размером ассоциатов ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов в клетках, причем нативные ЛНП не образовывали ассоциатов и не обладали атерогенными свойствами, т.е. не вызывали накопление внутриклеточных липидов [17]. Можно сделать предположение, что без модификации ЛНП невозможна их ассоциация, без ассоциации ЛНП не проявляются их атерогенные свойства. Исходя из этого, особый интерес представляет поиск модуляторов процесса ассоциации ЛНП.

Известно несколько эндогенных ингибиторов ассоциации ЛНП [12, 17], такие, как липопротеид-дефицитная

сыворотка, бычий сывороточный альбумин (БСА), липопротеиды высокой плотности (ЛВП) здоровых доноров и основной аполипопротеид ЛВП — apoA-I. Все они обладают амфифильными свойствами и, по-видимому, взаимодействуя с гидрофобными участками на поверхности ЛНП, предотвращают взаимодействие частиц ЛНП между собой и, тем самым, ингибируют ассоциацию. Мало известно об экзогенных ингибиторах ассоциации. Между тем, поиск и изучение нетоксичных и биодоступных ингибиторов ассоциации ЛНП представляет большой практический интерес, если рассматривать подавление ассоциации ЛНП в качестве терапевтического подхода. Мы предположили, что на эту роль могут претендовать амфифильные сополимеры окиси пропилена (ОП) и окиси этилена (ОЭ), так называемые плуроники. В данной работе изучена способность различных плуроников влиять на ассоциацию ЛНП.

## Методика

В работе использованы плуроники® P85 и L61 (BASF (Wyandotte, MI)).

Общую фракцию ЛНП выделяли двухстадийным ультрацентрифугированием в градиенте плотности NaBr из сыворотки больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (мужчины в возрасте 40—74 лет с ранним бессимптомным атеросклерозом сонных артерий) [20]. Концентрация белка в образцах ЛНП определялась с помощью метода Лоури.

Для изучения ассоциации ЛНП суспензию предварительно освобождали от имеющихся в ней спонтанно образующихся ассоциатов путем фильтрования через фильтр с

\* Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант №11-04-01101-а

диаметром пор 0,45 мкм (Nalgene, США). Затем ЛНП в концентрации 0,5 мг белка/мл инкубировали при 37°C в изотоническом фосфатном буфере (ИФБ; GIBCO, Paisley, Великобритания; KCl 0,2 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 г/л, NaCl 8 г/л,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,15 г/л, pH 7,2) при постоянном перемешивании — 100 оборотов в минуту. Степень ассоциации ЛНП оценивали методом регистрации флуктуации светопропускания луча лазерного света длиной волны 860 нм при помощи прибора Агрегометр (Aggregation analyzer, Viola, RF) [19]. Метод основан на том, что относительная дисперсия колебаний оптической плотности, вызванных случайными изменениями в количестве частиц, попадающих в оптический путь лазерного луча, отражает отклонения от их среднего размера, то есть степень их ассоциации. Через определенные промежутки времени регистрировали флуктуацию светопропускания.

Средний размер образовавшихся ассоциатов оценивали методом квазиупругого лазерного рассеивания на приборе Аутосайзер 2-Малверн (Autosizer 2-Malvern, Malvern Instruments, UK). Для этого образцы ЛНП с концентрацией 2,5 мг белка/мл инкубировали при 37°C в изотоническом фосфатном буфере при постоянном перемешивании — 1000 оборотов в минуту. Через определенные промежутки времени проводили измерение размера частиц.

## Результаты

Частицы ЛНП склонны к самопроизвольной ассоциации. В условиях инкубации суспензии частиц ЛНП при 37°C при постоянном перемешивании происходит так называемая спонтанная, не индуцированная внешними факторами ассоциация ЛНП. Для оценки ассоциации ЛНП и влияния плюроники на этот процесс мы использовали два метода — метод флуктуации светопропускания и метод квазиупругого лазерного рассеивания. Во всех случаях результаты, полученные при помощи двух методов оценки ассоциации ЛНП, полностью совпадали.

В данной работе мы провели сравнительное исследование действия плюроники с различными гидрофильно-липофильными свойствами на процесс ассоциации

ЛНП. Так, нами были использованы плюроник L61, характеризующийся значительной гидрофобностью (ГЛБ 3), и плюроник P85 с умеренными гидрофильными и липофильными свойствами (ГЛБ 16).

На рис. 1 приведены типичные кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП в случае спонтанной ассоциации и в присутствии плюроника P85. Видно, что при спонтанной ассоциации происходит увеличение среднего размера частиц в зависимости от времени инкубации (рис. 1). В то же время при добавлении различных концентраций плюроника P85 формирование ассоциатов заметно ингибировалось. Так, добавление к суспензии ЛНП до начала инкубации плюроника P85 в концентрации 0,1% (в/в %) ингибировало процесс ассоциации после 4,5 ч инкубации на 93% (рис. 1). Эффект подавления зависел от концентрации плюроника, в концентрации P85 0,01% наблюдалось подавление ассоциации после 4,5 ч инкубации на 79% (рис. 1).

Аналогичные данные были получены методом флуктуации светопропускания. Как видно из рис. 1, наименьшая концентрация плюроника P85 — 0,005% не оказывала влияния на процесс ассоциации ЛНП. Таким образом, очевидно, что плюроник P85 является ингибитором ассоциации ЛНП только в концентрации близкой или большей, чем критическая концентрация мицеллообразования (ККМ), которая составляет в его случае 0,03%.

Когда плюроник P85 добавлялся в суспензию ЛНП в ходе инкубации, то есть, когда процесс ассоциации частиц уже был инициирован, и произошло увеличение среднего размера частиц ЛНП, также наблюдалась остановка дальнейшей ассоциации липопротеидов (рис. 2). Плуроник P85 в концентрации 0,1% добавлялся к суспензии ЛНП после первого и после второго часа инкубации, в обоих случаях не происходило дальнейшего увеличения среднего размера частиц, т.е. ассоциация полностью подавлялась. Необходимо отметить, что добавление плюроника не вызывало уменьшение среднего размера частиц, можно предположить, что под действием плюроника не происходило диссоциации образовавшихся ассоциатов ЛНП. Следовательно, ассоциация имеет необратимый характер, и является, скорее всего, слипанием частиц ЛНП.

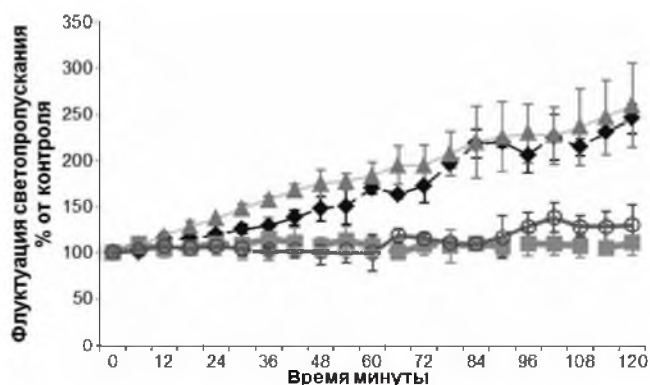


Рис. 1. Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии под влиянием плюроника P85. Среда инкубации — ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°C, скорость перемешивания 100 об./мин. Кривая (1) — суспензия ЛНП в отсутствие плюроника P85, кривые (2), (3) и (4) в присутствии соответственно 0,005%

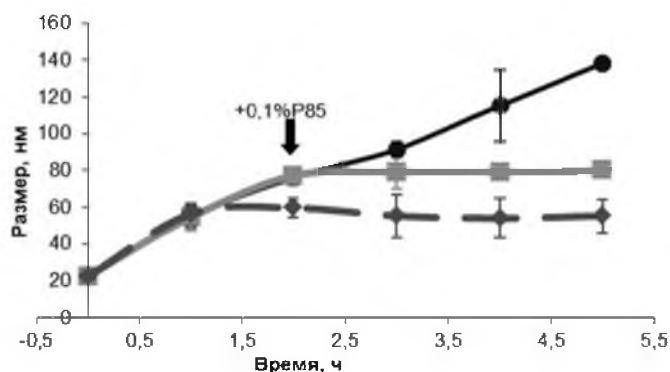


Рис. 2. Кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП под влиянием плюроника P85. Среда инкубации — ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 2,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°C, скорость перемешивания 1000 об./мин. Кривая (1) — суспензия ЛНП в отсутствие плюроника P85, кривая (2) — в присутствии 0,1% плюроника P85, добавленного после 2 ч инкубации, кривая (3) — в присутствии 0,1% плюроника P85, добавленного после 1 ч инкубации

Помимо плюроники P85, мы изучили способность обладающего выраженными гидрофобными свойствами и низким значением ГЛБ плюроника L61 ингибировать ассоциацию ЛНП. Так, в концентрации 0,022% плюроник L61 ингибировал рост флуктуации светопропускания суспензии ЛНП после 2 ч инкубации на 78%. Использование большей концентрации плюроника L61 — 0,22% приводило к почти полному подавлению процесса ассоциации ЛНП, а применение меньшей концентрации — 0,0022% не влияло на ассоциацию частиц ЛНП (данные не приводятся).

Таким образом, плюроники с выраженными гидрофобными свойствами P85 и L61 в концентрациях близких или больших ККМ ингибировали процесс ассоциации ЛНП.

### Обсуждение

Ассоциация частиц ЛНП может выражаться как в обратимой агрегации частиц, так и в необратимом слиянии модифицированных частиц ЛНП. Механизмы ассоциации частиц ЛНП до сих пор полностью не ясны. Имеются данные, свидетельствующие о том, что при модификации ЛНП происходят изменения поверхностного гидрофильного слоя частицы, нарушения ее гидратно-солевой оболочки, приводящие к повышению гидрофобности частицы и потере ее стабильности в растворе [12, 17]. На основании этого, предполагается, что ассоциация частиц ЛНП обусловлена гидрофобными взаимодействиями модифицированных частиц ЛНП.

Мы изучили влияние плюрононов на процесс ассоциации ЛНП. Плюроники состоят из липофильной части, образованной окисью пропиленом, и гидрофильной части, построенной окисью этилена, и имеют следующую структуру: (ОЭ)N-(ОП)M-(ОЭ)N. Такая структура определяет основные свойства плюрононов, в том числе способность взаимодействовать с биологическими мембранами и вызывать в них структурные перестройки [21]. Важными характеристиками плюрононов являются критическая концентрация мицеллообразования, при превышении которой происходит сборка отдельных сополимеров в мицеллы, а также гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ), отражающий соотношение гидрофильных и гидрофобных свойств вещества. В настоящее время существует большое количество плюрононов, отличающихся количеством мономеров ОЭ и ОП, и соответственно характеризующихся разными гидрофильными и липофильными свойствами, молекулярной массой и ККМ [5]. Так, полимеры, характеризующиеся значительным количеством остатков ОП и небольшим ОЭ отличаются высокой липофильностью, относительно низкими ККМ и ГЛБ, например, плюроник L61. Напротив, плюроники в составе которых ОЭ преобладает гидрофильны и характеризуются высокими значениями ККМ и ГЛБ — плюроник F68. Наконец, существует группа плюрононов с промежуточными свойствами, например P85.

Мы исследовали способность плюрононов P85, L61 и F68 с различными характеристиками ККМ и ГЛБ. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что способность амфифильных сополимеров окиси пропиленом и окиси этилена ингибировать ассоциацию ЛНП прямо зависит от выраженности гидрофобных свойств

плюроники. Плюроники с выраженными и умеренными гидрофобными свойствами L61 и P85 способны значительно ингибировать ассоциацию ЛНП, но происходит это только в концентрации, близкой к критической концентрации мицеллообразования. Из этого можно сделать вывод о том, что именно мицеллярная форма плюроники способна вызывать ингибирование ассоциации частиц ЛНП, а унимеры плюрононов ингибирующими свойствами не обладают. Эти данные подтверждают предположение, впервые выдвинутое Khoo и соавторами [12] о роли гидрофобных взаимодействий в процессе ассоциации ЛНП. Предположительно, в ходе инкубации при постоянном перемешивании происходят конформационные изменения структуры ЛНП, приводящие к экспозиции гидрофобных участков на поверхности частиц. Далее начинает происходить взаимодействие гидрофобных участков разных частиц, приводящее к ассоциации ЛНП. В случае присутствия в суспензии ЛНП амфифильных веществ, липофильная часть амфифильной молекулы может взаимодействовать с гидрофобными доменами на поверхности частицы ЛНП экранировать их и, таким образом, предотвращать процесс ассоциации ЛНП.

Учитывая большое значение ассоциации ЛНП в патогенезе атеросклероза, полученные данные о возможности подавления ассоциации с помощью плюрононов могут стимулировать разработку новых подходов к терапии и профилактике атеросклероза. Активно исследуется возможность применения плюрононов в качестве переносчиков лекарственных средств, отличающихся низкой биодоступностью. Например, при лечении мультирезистентных опухолей [2] мицеллы плюрононов с лекарством проявляют гораздо более высокую цитотоксичность по отношению к раковым клеткам, чем лекарство без добавления плюрононов. Плюроник P85 также используется при необходимости проникновения лекарств через гематоэнцефалический барьер [6].

Различные плюроники давно используются в качестве «носителя» лекарств, который способствует транспорту лекарств в неизменном виде. Но их роль гораздо более значительна. Были изучены механизмы действия плюрононов на мультирезистентные клетки. Было показано, что они уменьшают микровязкость мембраны клетки, значительно увеличивают уровень АТФ в раковых и соседних клетках, уменьшают эффлюкс лекарств и многое другое [7]. Кроме того, плюроники проявляют собственную разностороннюю биологическую активность, в том числе и способность влиять на обмен липидов. Так, при пероральном приеме плюроник L81 нарушал сборку и секрецию хиломикрон, способствовал снижению уровня холестерина ЛНП и липопротеидов очень низкой плотности (ЛОНП) и предотвращал развитие индуцированных диетой гиперхолестеринемии и атеросклероза у крыс [20]. С другой стороны, плюроник P-407 вызывает гиперлипидемию у мышей [11].

Описанная в работе возможность модуляции ассоциации ЛНП различными плюрониками можно рассматривать как предпосылку к созданию лекарственного средства, которое будет влиять на развитие атеросклероза на самой начальной стадии — стадии накопления липидов в сосудистой стенке.



## Список литературы

1. Аничков Н.Н. Частная патологическая анатомия. Выпуск II. Сердце и сосуды. Второе издание. — М. — Ленинград: Медгиз, 1947.
2. Alakhova D.Y., Rapoport N.Y., Batrakova E.V., Timoshin A.A., Li S., Nicholls D., Alakhov V.Y., Kabanov A.V. Differential metabolic responses to pluronic in MDR and non-MDR cells: a novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers // *J. Control Release*. — 2010. — Feb. 25. — 142(1). — P. 89–100.
3. Alaupovic P. Apolipoproteins and lipoproteins // *Atherosclerosis*. — 1971. — Vol. 13(2). — P. 141–146.
4. Bates S.R., Wissler R.W. Effect of hyperlipemic serum on cholesterol accumulation in monkey aortic medial cells // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1976. — Vol. 450(1). — P. 78–88.
5. Batrakova E.V., Li S., Alakhov V.Y., Miller D.W., Kabanov A.V. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells // *Farmacol. Exp. Ther.* — 2003. — Vol. 304. — P. 845.
6. Batrakova E.V., Li S., Li Y., Alakhov V.Y., Kabanov A.V. Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters // *Pharm. Res.* — 2004. — Dec. — 21(12). — P. 2226–2233.
7. Batrakova E.V., Li S., Li Y., Alakhov V.Y., Elmquist W.F., Kabanov A.V. Distribution kinetics of a micelle-forming block copolymer Pluronic P85 // *J. Control Release*. — 2004. — Dec. 10. — 100(3). — P. 389–397.
8. Cookson FB. The origin of foam cells in atherosclerosis // *Br. J. Exp. Pathol.* — 1971. — Feb. — Vol. 52(1). — P. 62–69.
9. Fogelman A.M., Shechter I., Seager J., Hokom M., Child J.S., Edwards P.A. Malondialdehyde Alteration of Low Density Lipoproteins Leads to Cholesteryl Ester Accumulation in Human Monocyte-Macrophages // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1980. — Vol. 77. — P. 2214–2218.
10. Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K., Brown M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1979. — Vol. 76. — P. 333–337.
11. Johnston T.P., Baker J.C., Hall D., Jamal A.S., Emeson E.E., Palmer W.K. Potential downregulation of HMG-CoA reductase following chronic administration of P-407 to C57BL/6 mice // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* — 1999. — Vol. 34. — P. 831–842.
12. Khoo J.C., Miller E., McLoughlin P., Steinberg B. Prevention of low density lipoprotein aggregation by high density lipoprotein or apolipoprotein A-I // *J. Lipid Res.* — 1990. — Vol. 31. — P. 645.
13. Lopes-Virella M.F., Klein R.L., Lyons T.J., Stevenson H.C., Witztum J.L. Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages // *Diabetes*. — 1988. — Vol. 37. — P. 550.
14. Mahley R.W., Innerarity T.L., Weisgraber K.H., Oh S.Y. Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins after selective modification of lysine residues of apoproteins // *J. Clin. Invest.* — 1979. — Vol. 64. — P. 743–750.
15. Ross R., Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis // *Science*. — 1976. — Vol. 193. — P. 1094–1100.
16. Smith EB. The relationship between plasma and tissue lipids in human atherosclerosis // *Adv. Lipid Res.* — 1974. — Vol. 12. — P. 1–49.
17. Talbot R.M., del Rio J.D., Weinberg P.D. Effect of fluid mechanical stresses and plasma constituents on aggregation of LDL // *J. of Lipid Research*. — 2003. — Vol. 44. — P. 837.
18. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Orekhov A.N. Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid caused by modified low density lipoproteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1989. — Vol. 16. — P. 489.
19. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Jaakkola O., Solakivi T., Nikkari T., Smirnov V.A., Orekhov A.A. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization // *Laboratory Investigation*. — 1992. — Vol. 67. — P. 665–675.
20. Tertov V.V., Kaplun V.V., Orekhov A.A. Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification // *Atherosclerosis*. — 1998. — Vol. 138. — P. 183–195.
21. Vinogradov S.V., Batrakova E.V., Li S., Kabanov A.V. Mixed polymer micelles of amphiphilic and cationic copolymers for delivery of antisense oligonucleotides // *J. Drug Target* 2004. — Vol. 12. — P. 517.

## Pluronic block copolymers suppress LDL association

Mel'nichenko A.A.<sup>1,3</sup>, Aksenov D.V.<sup>1</sup>, Yaroslavov A.A.<sup>2</sup>,  
Karagodin V.P.<sup>3</sup>, Sobenin I.A.<sup>1,3,4</sup>, Orekhov A.N.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences; Moscow

<sup>2</sup> Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo, Moscow

<sup>4</sup> Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research Center

*It was previously shown that modified in any way low-density lipoprotein (LDL) form associates, and associates these properties exhibit atherogenic, causing accumulation of intracellular lipids. Was found a direct correlation between the size of LDL associates and their ability to cause accumulation of lipids in cells with native LDL did not form associates and did not possess atherogenic properties, ie did not cause the accumulation of intracellular lipids. You can make the assumption that no association of LDL-C do not show their atherogenic properties. Based on this, particular interest is the search for modulators of the process of association of LDL. We hypothesized that this role can claim amphiphilic copolymers of propylene oxide and ethylene oxide, the so-called Pluronic. In this paper we studied the ability of Pluronic P85, L61 and F68 with different hydrophilic-lipophilic influence on the association of LDL. It is shown that Pluronic with strong hydrophobic properties (P85 and L61) at concentrations similar to or greater than the critical micelle concentration inhibited the process of association of LDL, whereas «hydrophilic» Pluronic F68 at any concentration had no effect on the association of LDL.*

**Key words:** Pluronic, low-density lipoprotein, atherogenic