

©Коллектив авторов

## ПОВЫШЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ К ВЫВЕДЕНИЮ ХОЛЕСТЕРИНА ИЗ МАКРОФАГОВ ПРИ ИНКУБАЦИИ ПЛАЗМЫ С УЛЬТРАМАЛЫМИ ФОСФОЛИПИДНЫМИ ЧАСТИЦАМИ

*В.А. Кудинов, Т.С. Захарова\*, Т.И. Торховская, В.А. Каширцева, Г.Е. Морозевич, О.М. Ипатов, А.И. Арчаков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ),  
119221, Москва, ул. Погодинская, 10; эл.почта: tz-post@list.ru

Исследовали возможность повышения способности липопротеинов высокой плотности (ЛВП) к выведению холестерина (ХС) с помощью ультрамалых частиц фосфолипидов (ФЛ) диаметром до 30 нм. Плазму инкубировали с разработанной ранее стабильной эмульсией таких наночастиц и исследовали способность фракций плазмы после удаления апо В-липопротеинов извлекать  $^3\text{H}$ -ХС из макрофагов ТНР-1. При добавлении в клеточную среду инкубированной плазмы с повышенным отношением ФЛ/апопротеин А1 выход  $^3\text{H}$ -ХС был почти вдвое выше, чем под действием нативных ЛВП, достигая максимума уже при небольшом повышении отношения ФЛ/апопротеин А-1 – до 1,06 (по сравнению с исходным отношением – 0,85.) Результаты указывают на возможность использования ультрамалых частиц ФЛ для восстановления нарушенных при атеросклерозе функциональных антиатерогенных свойств ЛВП.

**Ключевые слова:** фосфолипидные наночастицы; липопротеины высокой плотности; акцепция холестерина; макрофаги

**DOI:** 10.18097/PBMC20186403253

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы резко возросло число публикаций, свидетельствующих о важной роли в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) не только концентрации, но и свойств ЛВП плазмы крови [1, 2]. Способность этих липопротеинов (ЛП) извлекать из клеток ХС с последующим его транспортом в печень для катаболизма, известна уже несколько десятков лет, что дало основания считать уровень ЛВП в плазме информативным антиатерогенным показателем, отрицательно коррелирующим с распространённостью и выраженностью атеросклероза [3]. В последние годы продемонстрирована значимость не только уровня этих ЛП, но и их способности к выведению ХС из клеток, которая, как оказалось, варьирует у многих пациентов [1]. На больших группах пациентов с ССЗ было показано снижение ХС-акцептирующих свойств ЛВП [4, 5] независимо от концентрации ХС ЛВП в плазме [2].

Хотя ещё не выяснено, какое из их свойств является определяющим для обеспечения ХС-акцепторного потенциала ЛВП, эти результаты стимулировали поиск возможных путей повышения ХС-акцепторной активности ЛВП. По мнению ряда исследователей, дисфункциональность ЛВП, а именно ослабление их ХС-акцепторной активности, может быть связано с уровнем ряда белков липидного метаболизма, в частности – апоА-1, апо С-III и апо D [6]. В то же время было показано, что акцепция ХС частицами ЛВП пропорциональна содержанию в них ФЛ [7, 8]. Направленное повышение в них ФЛ, (так называемая “фосфолипидация”) путём инкубации с эмульсией фосфатидилхолина (ФХ) значительно повышало способность ЛВП к акцепции ХС из макрофагов – начальному звену обратного

транспорта ХС, определяющему антиатерогенный эффект ЛВП [2, 3]. Для фосфолипидации ЛВП использовали два возможных подхода, позволяющих преодолеть водонерастворимость ФХ – эмульгирование с помощью холата натрия [7, 8] или получение комплексов с вариантами апо А-1 (CSL-111 или ETC-216) [9]. Ежедневное введение таких комплексов больным с выраженными проявлениями атеросклероза приводило к улучшению ангиографических показателей, что, по мнению авторов [7], связано с действием не апопротеина, а именно ФХ.

Эти результаты позволяют предположить, что повысить эффективность удаления ХС из макрофагов можно при помощи ФЛ частиц, путём фосфолипидации ими ЛВП. При этом для эффективного взаимодействия частиц с ЛВП они должны быть достаточно устойчивыми и иметь минимальный размер, необходимые для обеспечения большей поверхности и стабильности. В ИБМХ разработана технология получения на основе соевых ФЛ стабильной эмульсии частиц с диаметром до 30 нм с предполагаемой мицеллярной структурой [10]. Инкубация плазмы с такими частицами приводила к обогащению ЛВП основным ФЛ сои – дилинолеил-ФХ [11]. Ультрамалый размер частиц обеспечивает хорошую переносимость при инфузионном введении пациентам [12].

Целью настоящей работы было исследование возможности использования разработанной ФЛ системы для повышения способности ЛВП плазмы извлекать из макрофагов ТНР-1  $^3\text{H}$ -ХС. Для этого из плазмы, обработанной ФЛ эмульсией, с помощью преципитации удаляли ЛП, содержащие апо В, а оставшуюся обеднённую по апо В плазму, содержащую только ЛВП, инкубировали с макрофагами, с последующим анализом выхода  $^3\text{H}$ -ХС по радиоактивности [2, 13]. Поскольку

\* - адресат для переписки

механизмы взаимодействия ЛВП с клеткой выяснены не полностью [1, 2], представляло также интерес исследовать зависимость ХС-экстрагирующей способности ЛВП от степени их фосфолипидации, оцениваемой по величине отношения ФЛ/апо А-1.

## МЕТОДИКА

Для получения ФЛ эмульсии [10] использовали соевый ФХ – Lipoid S100 (“Lipoid GMBH”, Германия). Грубую эмульсию 500 мг ФЛ в 10 мл дистиллированной воды обрабатывали 7 мин на ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin Sonopuls HD 2200 (Германия) с использованием стержня KE 78 при мощности 60–65%, и затем фильтровали с помощью шприца через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Размер частиц в полученной эмульсии составлял 26–30 нм [10]. Полученную ФЛ эмульсию разводили дистиллированной водой последовательно до концентраций ФЛ 25 мг/мл, 12,5 мг/мл и 6,25 мг/мл, разводя в 2, 4 или 8 раз, соответственно.

Полученные разведённые ФЛ эмульсии (0,1 мл) инкубировали с 0,9 мл донорской плазмы в течение 40 мин при комнатной температуре. В контрольные образцы добавляли 0,1 мл физиологического раствора. Оценку ХС-акцепторной активности ЛВП проводили в обеднённой по апо В плазме. Для её получения обработанную ФЛ эмульсиями плазму инкубировали с 20% раствором ПЭГ 6000 в 200 мМ глициновом буфере в течение 20 мин с последующим центрифугированием 30 мин при 10000 об/мин (центрифуга Eppendorf 5810R, Германия) [13]. Степень обогащения ЛВП плазмы ФЛ оценивали на биохимическом анализаторе Global 240, ВРС+ “BioSed” (Италия), измеряя концентрации ФЛ и апо А-1 в супернатантах с использованием наборов “Sentinel Diagnostics” (Италия) и “Erbo Lachema” (Чехия), соответственно.

Оценку ХС-акцепторной активности апо В обеднённой плазмы проводили на макрофагах, полученных из клеток лейкоцитарной лейкемии человека ТНР-1 с включением <sup>3</sup>Н-ХС ([1,2-<sup>3</sup>Н(N)]-cholesterol, “Amersham Life Science”, Великобритания) [8]. Клетки получали из коллекции клеточных культур ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) и культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Для превращения в макрофаги клетки отмывали средой RPMI 1640 без сыворотки, суспендировали в среде роста по 500 тыс. клеток/мл, добавляли РМА (phorbol 12-myristate-13 acetate, “Sigma” (США)) до концентрации 100 нг/мл и высевали на 24-луночные планшеты по 500 тыс. клеток на лунку. После инкубации в течение 48 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, прикрепившиеся макрофаги трижды промывали RPMI 1640 без сыворотки, затем добавляли в лунку свежую порцию ростовой среды, содержащей Н<sup>3</sup>-ХС (0,5 мКи/мл), и инкубировали 24 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После 2-кратной промывки той же средой клетки инкубировали

в свежей порции среды ещё 24 ч, после чего проводили эксперименты по акцепции ХС [2]. Для этого в планшет вносили предварительно разведённую апо В-обеднённую плазму (40 мкл на 2000 мкл среды), по 250 мкл на лунку, и проводили инкубацию в интервалах от 0 ч до 3 ч. Клетки отделяли центрифугированием (800 g × 5 мин), лизировали 0,1 М NaOH в течение 16–18 ч, после чего в аликвотах клеточного лизата определяли радиоактивность с помощью счётчика Tri-Carb 2800TR (“Perkin Elmer”, США). Каждое измерение повторяли 3 раза. Рассчитывали процент выхода ХС из клеток по отношению к контролю (инкубация в среде RPMI 1640, без добавления плазмы).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация плазмы с ультрамалыми ФЛ частицами приводила к возрастанию в апо В обеднённой плазме (то есть во фракции ЛВП [1–3, 13]) отношения ФЛ/апо А-1 (таблица). По мере увеличения концентрации добавленных к плазме ФЛ (0,625 мг/мл, 1,25 мг/мл и 2,5 мг/мл) во фракции ЛВП происходило повышение отношения ФЛ/апо А-1 – от 0,85 в исходной плазме до 1,49 (при концентрации добавленных ФЛ 2,5 мг/мл). Возрастание относительного уровня ФЛ, очевидно, отражает обогащение ими субфракций ЛВП, а также пре-β-ЛВП, исходно состоящих из свободного и “слабо липидированного” апо А-1 [1].

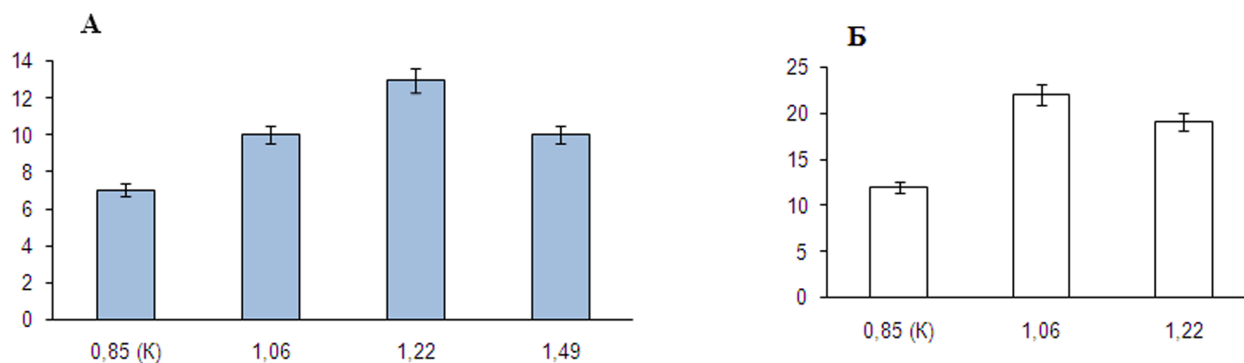
Таблица. Влияние инкубации плазмы с ФЛ частицами на отношение ФЛ/апо А-1 в ЛВП

Концентрация добавленных ФЛ при инкубации с плазмой, мг/мл	Отношение ФЛ/ апоА1 после инкубации	
	без ФЛ частиц	с ФЛ частицами диаметром 20–30 нм
0*	0,85±0,01	-
0,625	-	1,06±0,01
1,25	-	1,22±0,03
2,5	-	1,49±0,03

Примечание: \* - контроль - нативная плазма.

Для выяснения ХС-акцепторной активности ЛВП плазму после удаления апо В-ЛВП вносили в планшеты с макрофагами ТНР-1, насыщенными <sup>3</sup>Н-ХС, и оценивали выход ХС из клеток. Выход ХС в среду (в процентах от общего в клетках) после одного и трёх ч инкубации показан на рисунке. Из рисунка А видно, что за 1 ч исходные ЛВП (контроль с отношением ФЛ/апо А-1 0,85) извлекают из макрофагов в среднем 7% клеточного ХС, что близко к данным других авторов [2, 8]. Процент выведения ХС возрастал до 10% и до 13% при использовании фракций ЛВП обогащённой ФЛ плазмы при отношении ФЛ/апо А-1 1,06 и 1,22, соответственно (полученных при добавлении к плазме соответственно 0,625 мг/мл и 1,25 мг/мл ФЛ, таблица).

После 3 ч инкубации (рисунок Б) в присутствии Апо В обеднённой плазмы с минимальным обогащением ФЛ (ФЛ/Апо А-1 1,06) выход ХС



**Рисунок.** Процент выведения  $^3\text{H}$ -ХС из макрофагов ТНР-1 апо В обеднённой фракцией плазмы, предварительно инкубированной с ФЛ наночастицами - в зависимости от достигнутого уровня фосфолипидации (отношения ФЛ/апо А-1). А) Инкубация 1 ч. Б) Инкубация 3 ч. По оси абсцисс - отношение ФЛ/апо А-1 во фракции плазмы, по оси ординат - процент выхода метки в среду. Контрольное значение отношения ФЛ/апо А-1 для нативной плазмы 0,85. Концентрации добавленных ФЛ наночастиц соответствуют указанным в таблице.

увеличивался до 22-23%. Увеличение обогащения ЛВП фосфолипидами (до ФЛ/Апо А-1 1,49), не приводило к дальнейшему увеличению выведения  $^3\text{H}$ -ХС из клеток. При этом к 3 ч инкубации сглаживаются различия для супернатантов с отношением ФЛ/Апо А-1 1,06 и 1,22, и процент выхода ХС для них оказывается вдвое выше (22-23%), чем под действием исходных ЛВП (фракции нативной плазмы) – 11,2%.

Таким, образом, даже небольшое обогащение ЛВП фосфолипидами (на 25%, до отношения ФЛ/апо А-1 1,06 по сравнению с исходным 0,85) путём инкубации с ультрамалыми ФЛ частицами, приводит к двукратному повышению их ХС-акцептирующей активности. Неожиданным оказалось отсутствие влияния большего обогащения (с повышением отношения ФЛ/Апо А-1 до 1,22, и выше) на конечный уровень выведения  $^3\text{H}$ -ХС (рисунок Б). Так как точные механизмы выведения ХС из макрофагов к ЛВП считают пока не выясненными [8], то можно предполагать возможность происходящих уже при небольшом обогащении ФЛ каких-либо структурных изменений акцептирующих частиц, оказавшихся оптимальными для акцепции ХС.

Следует отметить, что наблюдаемое повышение ХС-акцепторной активности оказалось в наших экспериментах почти вдвое выше, чем показанное в работе [8] для ЛВП, подвергнутых предварительной “суперфосфолипидации” в присутствии детергента – в этой работе выход  $^3\text{H}$ -ХС повышался не более чем на 12%. Авторы объясняют механизм повышения выхода ХС через участие клеточного рецептора SR-BI, так как ранее была показана корреляция отношения ФЛ/ Апо А-1 плазмы со связанным с этим рецептором путём выхода клеточного ХС [14]. По мнению других авторов, ФЛ стимулируют выведение клеточного ХС через транспортер ABCA1, с наибольшим участием обогащенных ФЛ пре- $\beta$ -ЛВП [15], что, возможно, имеет место и в наших экспериментах. В целом, вопрос о том, какой из путей выведения клеточного ХС оказывается более чувствительным к уровню ФЛ в ЛПВП, требует дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, присутствие в плазме крови ФЛ частиц ультрамалого размера может за счёт обогащения ЛВП фосфолипидами повышать их ХС-акцепторную активность, восстанавливая тем самым их часто нарушенные при ССЗ [4] функциональные антиатерогенные свойства. В отличие от предлагавшихся ранее подходов это не требует использования детергента [10, 13] или апопротеина [12]. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования полученных ФЛ частиц ультрамалого размера – как относительно простого способа повышения обратного транспорта ХС при терапии, или/и профилактике прогрессирования атеросклеротических сосудистых поражений.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Annema W., von Eckardstein A. (2016) Transl. Res., **173**, 30-57.
2. Khera A.V., Cuchel M., de la Llera-Moya M. et al. (2011) N. Engl. J. Med., **364**(2), 127-135.
3. Choi H.Y., Hafiane A., Schwertani A., Genest J. (2017) Can. J. Cardiol., **33**(3), 325-333.
4. Ishikawa T., Ayaori M., Uto-Kondo H., Nakajima T., Mutoh M., Ikewaki K. (2015) Atherosclerosis, **242**(1), 318-322.
5. Rosenson R. (2016) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **36**(5), 777-782.
6. Pamir N., Hutchins P., Ronsein G., Vaisar T. et al. (2016) J. Lipid Res., **57**(2), 246-257.
7. Pownall H.J. (2006) Biochemistry, **45**(38), 11514-11522.
8. Tchoua U., Gillard B.K., Pownall H.J. (2010) Atherosclerosis, **209**(2), 430-435.
9. Tardif J.C. (2010) J. Clin. Lipidol., **4**(5), 399-404.

10. Арчаков А.И., Гусева М.К., Медведева Н.В., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Тихонова Е.Г. Широинин А.В., Сторожак Г.И. (2012) Патент РФ 2448715, опубл. 27.04.12, Бюл. N12.
11. Кудинов В.А., Ипатова О.М., Фёдоров И.Г., Тотолян Г.Г., Мерзликина Н.Н., Ковалёв О.Б., Торховская Т.И., Учайкин В.Ф., Старовойтова И.Э., Милютин Д.В., Никонова С.М. (2016) Биомед. химия, **62**, 704-707. DOI: 10.18097/PBMC20166206704.
12. Лохов П.Г., Маслов Д.П., Балашова Е.Е., Трифонова О.П., Медведева Н.В., Торховская Т.И., Ипатова О.М., Арчаков А.И., Мальцев П.П., Кухарчук В.В., Шестакова Е.А., Шестакова М.В., Дедов И.И. (2015) Биомед. химия, **61**, 7-18. DOI: 10.18097/PBMC20156101007.
13. Zimetti F., Weibel G.K., Duong M., Rothblat G.H. (2006) J. Lipid Res., **47**(3), 605-613.
14. Yancey P.G., Kawashiri M.A., Moore R., Glick J.M., Williams D.L., Connelly M.A., Rader D.J., Rothblat G.H. (2004) J. Lipid Res., **45**(2), 337-346.
15. Hajj Hassan H., Blain S., Boucher B., Denis M., Krimbou L., Genest J. (2005) J. Lipid Res., **46**(7), 1457-1465.

Поступила: 01. 12. 2017.  
Принята к печати: 22. 02. 2018.

# IMPROVING OF HDL CAPACITY FOR MACROPHAGES CHOLESTEROL EFFLUX AFTER PLASMA INCUBATION WITH PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES

*V.A. Kudinov, T.S. Zakharova, T.I. Torkhovskaya, V.A. Kashirtseva, G.E. Morosevich, O.M. Ipatova, A.I. Archakov*

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: tz-post@list.ru

In connection with recent data about antiatherogenic importance of not only plasma HDL concentration, but of their cell cholesterol efflux capacity as well, the possibility of its correction by phospholipid (PL) nanoparticles was studied. Blood plasma was incubated with earlier elaborated PL nanoparticles emulsion with the particle diameter up to 30 nm, and HDL cholesterol efflux capacity of apo B-depleted plasma was studied. Using macrophages THP-1 preloaded <sup>3</sup>H-cholesterol were used. The addition of incubated plasma supernatants with the elevated PL/apo A-1 ratio to cell media resulted in almost increase in two fold <sup>3</sup>H-cholesterol efflux as compared with native HDL. The maximal efflux was observed at the PL/apo A-1 ratio of 1.06 as compared with native apo B-depleted plasma (the PL/apo A-1 ratio of 0.85). Results suggest possible usage of ultrasmall PL nanoparticles for regeneration of impaired antiatherogenic HDL functionality. This approach seems to be predominant compared with the usage of PL emulsions with detergent or apoprotein A1.

**Key words:** phospholipid nanoparticles; HDL; cholesterol efflux capacity; macrophages