

УДК 612.1+616.1+544.7

## ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ТРИБЛОК-СОПОЛИМЕРОВ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА И ПОЛИПРОПИЛЕНОКСИДА НА АГРЕГАЦИЮ И СЛИЯНИЕ АТЕРОГЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

© 2015 И.Г. Панова<sup>1\*</sup>, В.В. Спиридонов<sup>1</sup>, И.Б. Каплан<sup>2</sup>,  
С.С. Трубинов<sup>3</sup>, Н.В. Елизова<sup>3</sup>, А.А. Мельниченко<sup>3</sup>,  
А.Н. Орехов<sup>3</sup>, А.А. Ярославов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
химический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)932-8846,  
электронная почта: igpan@mail.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-2776

<sup>3</sup> Институт общей патологии и патофизиологии РАМН,  
125315 Москва; факс: +7(495)601-2366

Поступила в редакцию 27.11.14  
После доработки 12.01.15

Показано, что триблок-сополимеры полиэтиленоксида и полипропиленоксида (плюроники) влияют на агрегацию и слияние атерогенных липопротеидов низкой плотности (атЛНП) и способны ингибировать эти процессы. Характер воздействия и степень стабилизирующего эффекта зависят от строения, относительной гидрофобности сополимера и его концентрации. Наибольшей способностью подавлять агрегацию атЛНП обладают плюроники L61, P85 и L64, характеризующиеся значением гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) 3–16. Плюроник L81 с более высокой степенью гидрофобности (ГЛБ = 2) при низких концентрациях лишь частично ингибирует агрегацию атЛНП; при высоких стимулирует этот процесс. Продемонстрировано, что действие плюроников напрямую не связано с их способностью к мицеллообразованию, активным началом сополимера служат единичные макромолекулы. Высказано предположение, что вызываемые плюрониками эффекты обусловлены их взаимодействием с липидной составляющей ЛНП, а также возможным влиянием этих сополимеров на структурные и гидрофильно-липофильные характеристики липопротеидов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** липопротеиды низкой плотности, плюроники, триблок-сополимеры полиэтиленоксида и полипропиленоксида, атеросклероз; подавление агрегации, антиатерогенные свойства.

Плюроники (блок-сополимеры окиси этилена и окиси пропилена) являются водорастворимыми неионогенными поверхностно-активными соединениями, гидрофильной частью которых является блок полиэтиленоксида (ПЭО), а гидрофобной – блок полипропиленоксида (ППО). Совокупность таких разнообразных свойств как дифильность (и связанная с этим мембранотропность плюроников), выраженная химическая инертность полимерной цепи, низкая токсичность создают предпосылки для широкого применения этих полимеров в биологии и медицине. Плюроники используются в качестве мицеллярных контейнеров для доставки лекарств [1, 2], выполняют роль стабилизаторов перфтор-

углеродных эмульсий в препаратах искусственных заменителей крови [3], они включены в состав композиций для лечения ран и ожогов [4, 5], применяются для низкотемпературного консервирования тканей [6], в иммунотерапии – в качестве адъювантов [7], устраняют проявление синдрома множественной лекарственной устойчивости [8–10].

Нами было обнаружено, что отдельные плюроники способны подавлять накопление липидов в клетках интимы сосудов, что является ранним и наиболее заметным проявлением атеросклероза [11]. Основным источником накапливающихся липидов являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП), полимолекулярные ансамбли, в состав которых помимо липидов входит белок аполипопротеин В100 (апоВ) [12].

\* Адресат для корреспонденции.

Количество внутриклеточных липидов возрастает с увеличением среднего размера частиц ЛНП, циркулирующих в плазме [13–15]. Отметим, что в крови человека с ишемической болезнью сердца наряду с нативными ЛНП присутствуют множественно модифицированные липопротеиды (ммЛНП), значительно отличающиеся от нативных по ряду физико-химических показателей [16, 17]. Количество *in vivo* модифицированных липопротеидов составляет 5–20% от общего содержания ЛНП [18]. Именно ммЛНП способствуют развитию агрегации и вызывают увеличение содержания липидов в клетках, то есть являются атерогенными [17, 19]. Показано [20], что отрицательно заряженные ЛНП, составляющие одну из субфракций ммЛНП, способны стимулировать агрегацию даже нативных липопротеидов, не являющихся атерогенными.

Ранее установлено [11], что плуроники P85 и L61 с высоким содержанием гидрофобных пропиленоксидных (ПО) звеньев подавляют агрегацию липопротеидов (обладают антиатерогенным действием), а плуроник F68 с повышенным содержанием гидрофильных этиленоксидных (ЭО) звеньев практически не влияет на агрегацию липопротеидных частиц. Высказано предположение [11], что эффективность ингибирующего действия плуроников определяется их способностью формировать мицеллярные структуры в водно-солевых растворах и поэтому должна коррелировать с их критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). В настоящей работе проанализировано влияние строения и физико-химических характеристик плуроников (гидрофильно-липофильного баланса и ККМ) на подавление агрегации атерогенных липопротеидов, полученных из крови больных с атеросклерозом.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали коммерческие препараты плуроников: L61 («Serva», Германия), L64, P85, L81 («CarboMег», США).

Общую фракцию липопротеидов выделяли из сыворотки двухстадийным ультрацентрифугированием в градиенте плотности NaBr на центрифуге L8-55 (ротор 65Ti, «Beckman Instruments, Inc.», США) [21]. Концентрацию белка в ЛНП определяли по методу Лоури. Непосредственно перед каждым проводимым исследованием суспензию ЛНП освобождали от пыли и спонтанно образующихся агрегатов путем фильтрования через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм («Nalgene», США).

Исследовали ЛНП, полученные от здоровых доноров (мужчин и женщин 27–45 лет), и пулированные липопротеиды, полученные из сывороток крови от 42 больных с ангиографически документированным атеросклерозом. Уровень общего холестерина в обеих группах не превышал 240 мг/дл. ЛНП от здоровых лиц характеризовались тем, что не вызывали накопления внутриклеточных липидов при инкубации в культуре моноцитов-макрофагов человека, т.е. были неатерогенными. В то время как пулированные липопротеиды от больных с подтвержденным атеросклерозом вызывали статистически значимое увеличение липидов в культивируемых клетках, т.е. являлись атерогенными.

Гидродинамические характеристики исследуемых образцов определяли методом динамического светорассеяния с помощью фотометра рассеянного лазерного света «ALV-5» фирмы «ALV» (Германия) и фотонного корреляционного спектрометра фирмы «Photocor Instruments» (Россия). Оба прибора снабжены He-Ne-лазером мощностью 25 мВт с длиной волны  $\lambda = 632,8$  нм. Растворы обеспыливали двукратным фильтрованием через мембранные фильтры «Millipore» (США) со средним размером пор 1,2 мкм. Рассеянный свет регистрировали под углом  $\theta = 90^\circ$ . Математическую обработку экспериментально регистрируемых автокорреляционных функций рассеянного света проводили с использованием пакета программ DynaLs («Alango», Израиль). Получали функции распределения  $W$  по времени релаксации  $\tau = 1/Dq^2$ , где  $D$  – коэффициент поступательной диффузии частиц,  $q = (4\pi n/\lambda) \times \sin(\theta/2)$  – волновой вектор рассеянной волны,  $n$  – показатель преломления растворителя. Гидродинамический диаметр частиц  $2 \times R_h$  рассчитывали по формуле Стокса:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D}, \quad (1)$$

где  $R_h$  – значение гидродинамического радиуса; вязкость воды  $\eta_0$  при температуре 25° принимали равной 0,89 сП.

Агрегацию липопротеидов инициировали путем непрерывного перемешивания (400 об/мин) суспензии ЛНП в концентрации 0,5–1,5 г белка/л в инкубационном растворе – 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 37°. Кинетику агрегации регистрировали методом статистического анализа флуктуаций светопропускания луча света длиной волны 860 нм с помощью лазерного анализатора ассоциации

тромбоцитов Aggregation Analyser – Viola Ltd. («Юнимед», Россия) [22, 23]. 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 и агрегации [20, 21]. Степень агрегации ЛНП и их устойчивость к агрегации оценивали по динамике изменения средних размеров образующихся частиц.

Для проведения электронно-микроскопического исследования суспензии липопротеидов при концентрации белка 0,2 г/л наносили на сеточки с формваровой пленкой-подложкой и контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата. Образцы анализировали с помощью микроскопа JEOL-1400 («JEOL», Япония) при увеличениях от 20 000 до 100 000 раз. Цифровые изображения получали с использованием камеры OSIS и программного обеспечения OSIS iTEM.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модуляторов процессов агрегации липопротеидов нами были использованы триблок-сополимеры ПЭО и ППО (плюроники) с различной степенью полимеризации гидрофильного (ПЭО) и гидрофобного (ППО) блоков и различным значением гидрофильно-гидрофобного баланса (ГЛБ), отражающим относительное содержание каждого из блоков. Меньшее значение ГЛБ соответствовало меньшему относительному содержанию гидрофильных

блоков (или большему содержанию гидрофобных блоков). Характеристики использованных плюроников приведены в табл. 1. Амфифильные молекулы плюроников в водных растворах ассоциируют, образуя мицеллы с гидрофобным ППО ядром и гидрофильной ПЭО короной, включающие от нескольких десятков до сотни молекул полимера [24–26]. Формирование мицелл начинается выше некоторой концентрации полимера, критической концентрации мицеллообразования.

Для исследования способности плюроников к самоассоциации в инкубационном растворе, содержащем неорганические соли, мы использовали метод динамического светорассеяния. Измерения проводили при 37°. В табл. 1 показано изменение среднего диаметра частиц плюроников в растворе в зависимости от концентрации полимеров. Как видно из таблицы, частицы в растворах плюроников регистрировались при концентрациях, превышавших некоторое пороговое значение  $C_{пл}$ , отмеченное звездочкой в колонке 5 табл. 1. Иными словами, определенные нами методом динамического рассеяния значения  $C_{пл}$  соответствовали ККМ плюроников в инкубационном растворе при 37° (ККМ). Размер частиц (мицелл), регистрируемый при концентрации равной ККМ, зависел от состава (ГЛБ) полимеров. Гидрофильные плюроники L64 и P85 формировали агрегативно устойчивые мицеллы со средним диаметром 18–24 нм, размер которых не менялся при дальнейшем увеличении концентрации полимера вплоть до 0,5% (растворы с концентрацией плюроников выше 0,5 вес. % не изучались). Гидрофобные плюроники L61 и L81 изначально образовывали круп-

Таблица 1. Характеристика использованных в работе плюроников

Плюроник	ММ <sup>1</sup>	Состав <sup>2</sup>	ГЛБ	Концентрация; вес. %	Гидродинамический диаметр, нм
L61	1900	ЭО <sub>2</sub> ПО <sub>30</sub> ЭО <sub>2</sub>	3	0,0008; 0,001*–0,028 0,032	не регистрируется 300 ± 10 490
L64	3000	ЭО <sub>13</sub> ПО <sub>30</sub> ЭО <sub>13</sub>	15	0,02–0,025; 0,03*–0,5	не регистрируется 20 ± 2
L81	2750	ЭО <sub>3</sub> ПО <sub>40</sub> ЭО <sub>3</sub>	2	0,0005; 0,0007*–0,02 0,025	не регистрируется 230 ± 10 1200
P85	4500	ЭО <sub>26</sub> ПО <sub>40</sub> ЭО <sub>26</sub>	16	0,01; 0,02*–0,5	не регистрируется 18 ± 2

<sup>1</sup> Молекулярная масса плюроника.

<sup>2</sup> Нижний индекс соответствует числу звеньев соответствующего мономера.

\* Отмечены концентрации, соответствующие ККМ плюроников в водно-солевом буферном растворе.

ные мицеллы со средним диаметром 220–310 нм; последующее повышение концентрации гидрофобных п्लуроников инициировало процесс ассоциации первичных мицелл и появление частиц микронного размера.

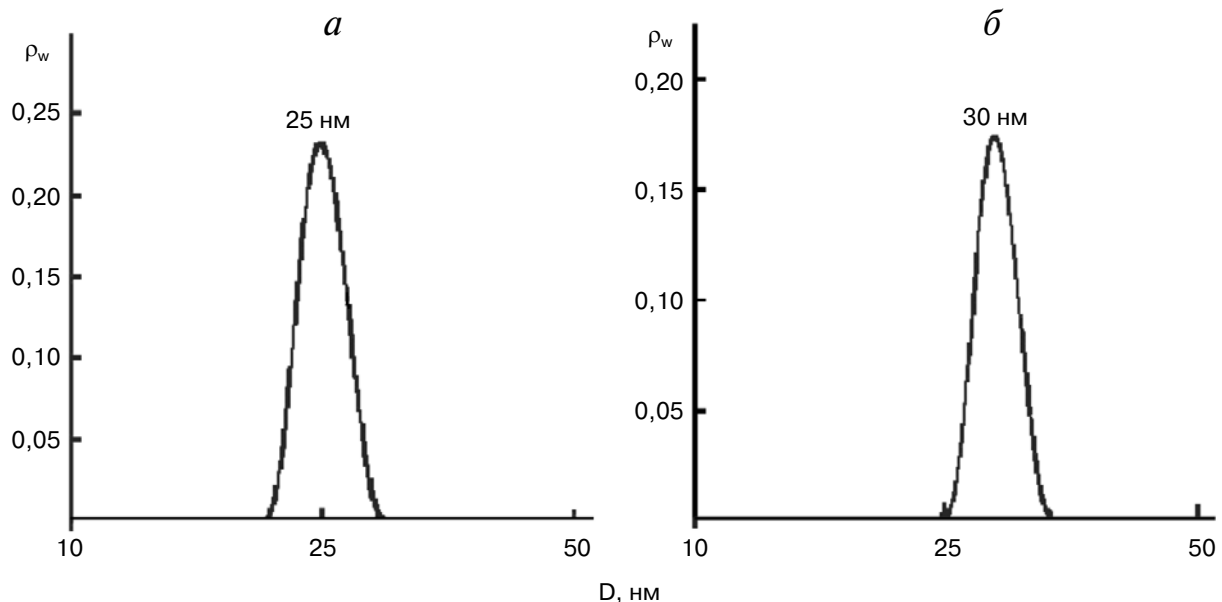
Методом динамического светорассеяния были также изучены растворы исходных липопротеидов, выделенных из сыворотки крови здоровых доноров и больных с подтвержденным атеросклерозом. На рис. 1, *а* показана кривая распределения частиц по размеру в инкубационном растворе атерогенных ЛНП (атЛНП) с концентрацией, равной 0,5 г белка/л. Наличие одного максимума свидетельствует о монодисперсности образца атЛНП, средний гидродинамический диаметр частиц в растворе составляет 25 нм. Для сравнения на рис. 1, *б* представлена кривая распределения частиц по размеру в инкубационном растворе нативных (неатерогенных) ЛНП той же концентрации (0,5 г белка/л), выделенных из крови здорового человека. В этом случае растворенные частицы ЛНП характеризуются узким распределением по размеру со средним диаметром, равным 30 нм. Необходимо отметить, что при инкубации исследуемых растворов при температуре 37° без перемешивания оба типа липопротеидов – нативные и модифицированные – агрегативно устойчивы: профили кривых на рис. 1, *а* и *б* не меняются с течением времени. Монодисперсность растворов обоих типов ЛНП и устойчивость частиц к

агрегации в стационарных условиях сохраняются при увеличении концентрации липопротеидов до 1,5 г белка/л.

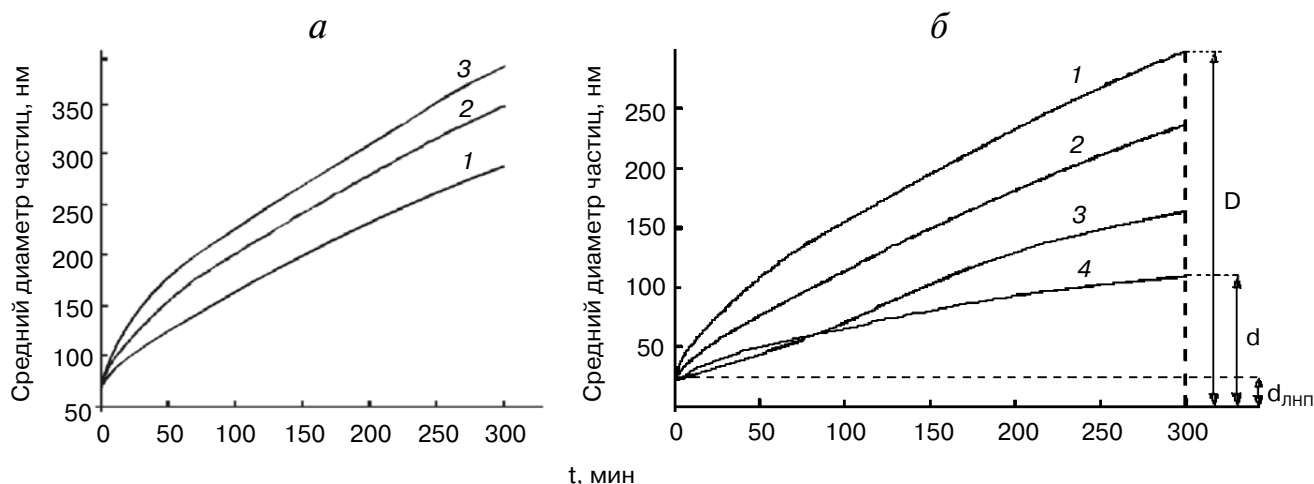
Как было показано ранее [11], перемешивание атЛНП при 37° (моделирующее циркуляцию частиц в кровяном русле) приводит к образованию крупных частиц. При этом исследуемый дисперсионный раствор теряет прозрачность. Нативные липопротеиды стабильны и не агрегируют. Для наблюдения за кинетикой агрегации атЛНП использовали метод, основанный на анализе флуктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале, относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему размеру агрегатов [27]. Это позволяет следить за изменением среднего размера агрегатов в растворе (суспензии) в реальном времени. Описанный метод широко используется для исследования ассоциации клеток, тромбоцитов и липопротеидов [28–31].

На рис. 2, *а* приведены кинетические кривые процесса агрегации атЛНП в инкубационном растворе, индуцированного непрерывным перемешиванием образца, для трех концентраций липопротеида. Видно, что, во-первых, во всех случаях средний размер частиц со временем увеличивался и, во-вторых, укрупнение частиц усиливалось при повышении содержания атЛНП в растворе.

Этим же методом было исследовано влияние п्लуроников на агрегацию атЛНП. В качестве



**Рис. 1.** Распределение частиц по размерам в инкубационном растворе атерогенных липопротеидов, выделенных из крови больных с подтвержденным атеросклерозом (*а*) и нативных ЛНП, выделенных из крови здоровых доноров (*б*); концентрация ЛНП по белку составляет 0,5 г/л



**Рис. 2.** Кинетические кривые агрегации атЛНП в инкубационном растворе при непрерывном перемешивании со скоростью 400 об/мин; 37°. Концентрация атЛНП: 0,5 (1), 1 (2) и 1,5 г белка/л (3) (а). Кинетические кривые агрегации атЛНП в инкубационном растворе при перемешивании в отсутствие полимера (1) и в присутствии плуроника L81 (2–4); 37° (б). Концентрация атЛНП составляла 1,5 г белка/л. Концентрация полимера: 0,0005 (2), 0,00065 (3) и 0,002 вес.% (4)

примера на рис. 2, б приведена серия кинетических кривых агрегации атЛНП в присутствии разных концентраций гидрофобного плуроника L81. Видно, что повышение концентрации добавленного L81 от 0,0005 до 0,002 вес.% ингибировало агрегационные процессы: скорость роста размера частиц уменьшалась.

Эффект плуроника на агрегативную устойчивость атЛНП оценивали следующим образом:

$$\delta = (D - d) \times 100\% / (D - d_{\text{ЛНП}}), \quad (2)$$

где  $d_{\text{ЛНП}}$  – средний диаметр частиц исходных атЛНП,  $D$  и  $d$  – средние диаметры частиц после перемешивания раствора атЛНП в течение 5 ч при 37° в отсутствие и в присутствии плуроника соответственно (рис. 2, б). Очевидно, чем выше значение  $\delta$ , тем больше система устойчива к агрегации. Рассчитанные по уравнению 2 значения  $\delta$  для всех исследованных систем «атЛНП + плуроник» сведены в табл. 2.

Таким образом, можно заключить, что все исследованные плуроники оказывали влияние на процесс агрегации атЛНП. При этом эффект действия плуроников на устойчивость липопротеидов к укрупнению (количественным выражением которого является величина  $\delta$ ) зависел от состава и концентрации ( $C$ ) полимеров. Ингибирующее действие относительно гидрофильных плуроников L64 и P85 усиливалось с ростом их концентрации и достигало предельного значения ( $\delta = 95\%$ ) при некотором оптимальном значении  $C_{\text{опт}}$ : 0,01 вес. % L64 и 0,03 вес. %

для P85. Похожим образом вел себя гидрофобный плуроник L61: возрастание  $\delta$  по мере повышения его концентрации в системе и достижение предельного значения  $\delta = 95\%$  в 0,008 вес. %

**Таблица 2.** Влияние плуроников на агрегативную устойчивость атЛНП

Плуроник	Конц., вес. %	$\delta$ , %
L 61	0,0005	10
	0,003	30
	0,005	50
	0,007	70
	0,008	95
	0,02	90
L 64	0,005	35
	0,0075	60
	0,01	95
	0,02	95
	0,05	95
L 81	0,0005	25
	0,0007	47
	0,002	65
	0,005	25
	0,008	<0
	0,01	<0
P85	0,005	10
	0,01	60
	0,02	70
	0,03	95
	0,05	95

растворе L61. Вторым использованным нами гидрофобный плуроник L81 характеризовался максимальной длиной гидрофобного ППО блока и наименьшим значением ГЛБ = 2. В низких концентрациях этот блок-сополимер частично подавлял агрегацию атЛНП, максимальный эффект  $\delta = 65\%$  достигался в 0,008 вес. % растворе L81. Дальнейшее повышение концентрации полимера сопровождалось резким увеличением размера образующихся в системе частиц; при концентрации L81, равной 0,002 вес. % и выше средний размер частиц в два раза превышал регистрируемый в контрольном эксперименте — суспензии атЛНП в отсутствие плуроника (это соответствовало значениям  $\delta$  меньше 0). Отметим, что в инкубационном растворе при 37° при концентрациях 0,0007–0,02% плуроник L81 находится в форме стабильного мицеллярного раствора (табл. 1), при перемешивании мицеллы не агрегируют.

Обращает на себя внимание тот факт, что ингибирующий эффект плуроников проявлялся при концентрациях меньших тех, при которых происходило формирование мицелл в инкубационных растворах полимеров, т.е. меньше ККМ. Так, гидрофильный L64 оказывал заметное ингибирующее действие ( $\delta = 60\%$ ) при концентрации 0,005 вес. % и практически полностью подавлял агрегацию атЛНП при  $C_{\text{опт}} = 0,01$  вес. %; при этом экспериментально найденное ККМ для L64 соответствовало 0,03 вес. %. В случае гидрофобного P85 заметное ингибирование ( $\delta = 60\%$ ) наблюдалось при концентрации 0,01 вес. %, практически полная стабилизация происходила при  $C_{\text{опт}} = 0,03$  (сравним с ККМ = 0,02 вес. %). Эти результаты указывают на то, что ингибирующий эффект демонстрируют не только мицеллярные формы плуроников, но и неассоциированные (юнимерные) формы этих полимеров. В некоторых случаях (например, в растворе гидрофильного L64) юнимеры могут практически полностью ( $\delta = 95\%$ ) заблокировать агрегацию атЛНП.

Для визуализации исходных и агрегировавших липопротеидов был использован метод просвечивающей электронной микроскопии. На рис. 3, а представлены микрофотографии исходных атЛНП, выделенных из крови больных с атеросклерозом. Для сравнения на этом же рисунке приведено изображение нативных ЛНП, выделенных из крови здоровых людей (рис. 3, б). В обоих случаях видны отдельные липопротеиды, форма которых близка к сферической. Средний диаметр частиц равен 25–30 нм, что хорошо коррелирует с оценкой размера липопротеидов методом динамического светорассеяния.

На рис. 3, в–д показано, как меняется морфология атЛНП частиц в процессе перемешивания

в инкубационном растворе при 37°. На начальной стадии, уже через 10 мин после начала перемешивания, наряду с исходными в растворе фиксируются значительно более крупные частицы, неоднородные по размеру, с отсутствием четких внутренних границ (рис. 3, в). Возможно, они образуются в результате слияния нескольких исходных липопротеидов и перераспределения их содержимого в пределах новой слившейся частицы. Помимо этого, на фотографии видны ассоциаты липопротеидов, в которых исходные атЛНП слипаются, но сохраняют свою индивидуальность, и более сложные структуры произвольной формы, объединяющие слившиеся частицы и ассоциаты.

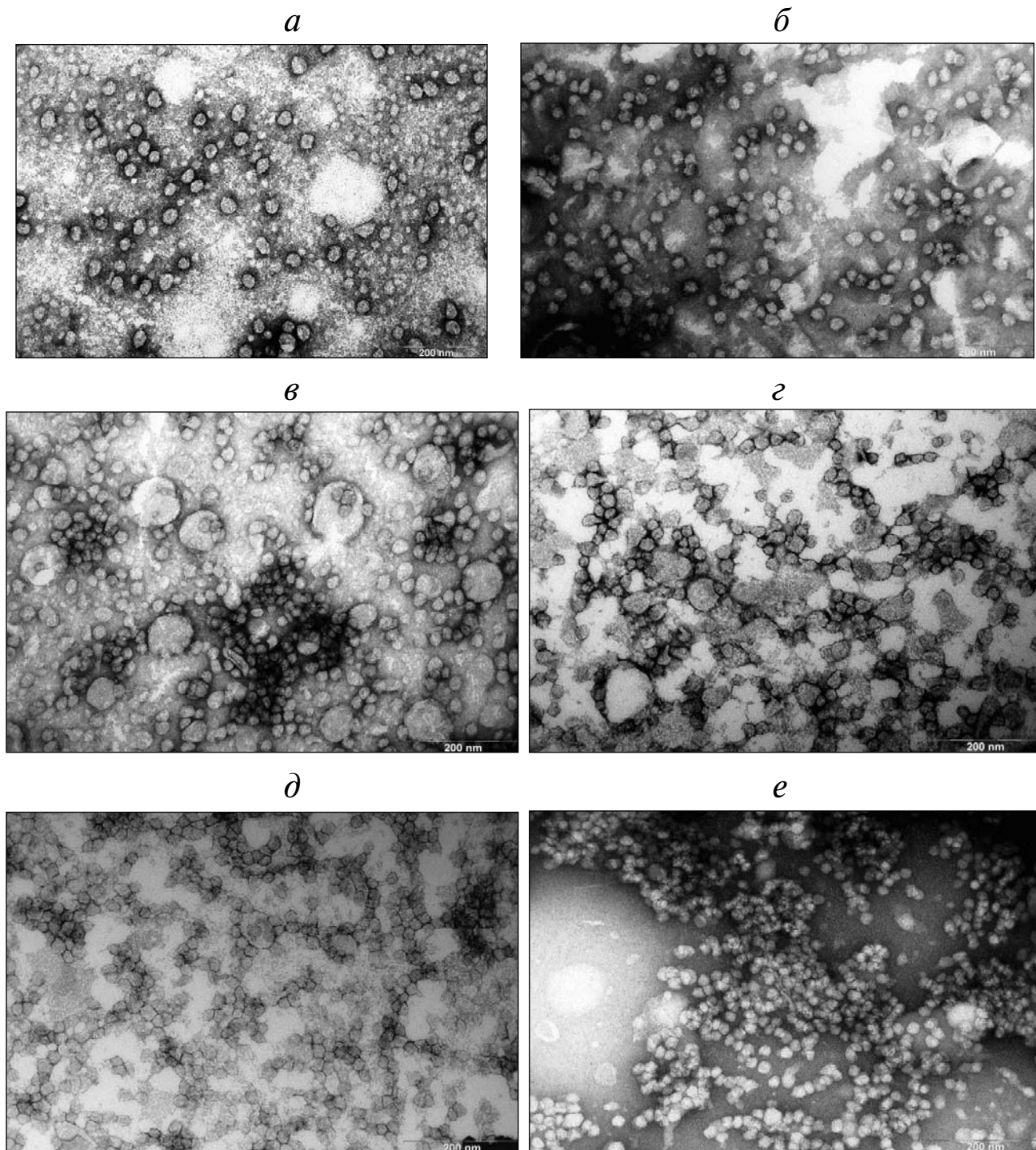
Со временем тенденция к слиянию и слипанию ЛНП сохраняется: растет число частиц с размытыми (нечеткими) границами и крупных скоплений (1 ч спустя, рис. 3, з). После 5-часового перемешивания количество слившихся частиц и крупных ассоциатов оказывается достаточно для формирования фона, на котором хорошо различимы скопления отдельных частиц атЛНП (рис. 3, д). Влияние плуроника L64 на ассоциацию и слияние атЛНП отражено на рис. 3, е. Добавление полимера значительно снижает количество слившихся частиц и ограничивает степень ассоциации липопротеидов.

Таким образом, взаимодействие частиц атЛНП при перемешивании приводит к образованию гетерогенной смеси морфологически разных компонентов, в которой присутствуют исходные частицы липопротеидов, их ассоциаты/агрегаты и крупные частицы, полученные в результате слияния (обобществления содержимого) нескольких атЛНП. Сочетание оптических методов и электронной микроскопии показало, что добавление плуроников в раствор атЛНП существенно замедляет агрегацию и ингибирует слияние липопротеидов.

Можно предположить, что ингибирующее действие плуроников обусловлено их связыванием с частицами ЛНП путем встраивания гидрофобного блока полипропиленоксида в аполярную липидную фазу. При этом ПЭО блоки сополимера образует на поверхности ЛНП гидрофильную прослойку, которая препятствует сближению и последующей агрегации, и слиянию липопротеидовых частиц. Такая гипотеза является вполне состоятельной, принимая во внимание многочисленные работы, свидетельствующие о способности плуроников взаимодействовать с липидными составляющими биологических мембран [32–38]. Плуроники встраиваются в мембраны ППО-блоком в виде полимерного клубка, который не смешивается с окружающим его липидом.

Эффективность ингибирующего действия зависит от состава плуроника. Суммирование полученных данных и ранее представленных результатов [11] говорит о том, что рост содержа-

ния этиленоксида при одинаковом размере гидрофобного блока (30 звеньев ПО) в ряду сополимеров L61 (4 блока ЭО), L64 (26 блока ЭО), F68 (152 блока ЭО) приводит к постепенному



**Рис. 3.** Электронные микрофотографии липопротеидов, выделенных из крови больных с атеросклерозом (*a*) и крови здоровых доноров (*б*); образцов атЛНП, полученных спустя 10 мин (*в*), 1 ч (*г*) и 5 ч (*д*) после начала перемешивания в инкубационном растворе при 37°; атЛНП после 5-часового перемешивания в присутствии плуроника L64 (*е*). Концентрация ЛНП в суспензиях составляла 0,2 г белка/л; концентрация L64 – 0,01 вес. %

снижению ингибирующего эффекта. Это можно объяснить тем, что связывания гидрофильных плуроников с высоким содержанием ЭО с липопротеинами, по-видимому, практически не происходит.

Отметим, что увеличение количества звеньев ПО в плурониках с 30 (L61) до 40 (L81) при фактически одинаковом содержании гидрофильных звеньев ЭО (4 и 6 соответственно) привело к снижению эффективности действия сополимеров. Полного подавления агрегации при введении в среду липопротеида гидрофобного L81 не наблюдалось ни при одной использованной концентрации полимера. Более того, увеличение концентрации плуроника до 0,008% и выше привело к противоположному эффекту – росту скорости агрегации в 1,5–2 раза. Возможное объяснение такого поведения L81 состоит в следующем. Встраивание протяженных гидрофобных ППО блоков в частицу ЛНП вызывает значительные конформационные перестройки в упаковке фосфолипидов и приводит к дополнительной гидрофобизации частиц ЛНП за счет высвобождения аполярных доменов, прежде скрытых от контакта с водой. По достижении некоторой концентрации L81 количество таких дефектов становится крити-

ческим для того, чтобы агрегация ЛНП стала необратимой.

Таким образом, сопоставляя структурные особенности использованных плуроников с их способностью подавлять агрегацию атЛНП можно отметить, что параметром, определяющим ингибирующее действие сополимера, является соотношение его гидрофобно-гидрофильных характеристик, т.е. ГЛБ. Наиболее эффективными для подавления агрегации липопротеидов являются плуроники, массовое соотношение блоков в которых обеспечивает значение ГЛБ 3–16. Следует также отметить, что ингибирующим действием обладают не только мицеллярные формы плуроников, но и их неассоциированные (юнимерные) формы. Ранее в экспериментах с клетками было продемонстрировано [39], что плуроники проявляют цитотоксичность только в виде мицелл, отдельные макромолекулы инертны к культуре клеток. С учетом этого, особый интерес представляет гидрофильный плуроник L64, который способен практически полностью подавлять агрегацию атЛНП при концентрациях ниже ККМ. Это позволяет рекомендовать его в качестве основы для разработки препаратов для профилактики атеросклероза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Melik-Nubarov, N.S., Fedoseev, N.A., Dorodnich, T.Y., Alakhov, V.Y., Chekhonin, V.P., Nazarova, I.R., and Kabanov, V.A. (1992) A new class of drug carriers – micelles of poly(oxyethylene)–poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain, *J. Control. Release*, **22**, 141–157.
- Batrakova, E.V., Dorodnych, T.Y., Klinskii, E.Y., Kliushnenkova, E.N., Shemchukova, O.B., Goncharova, O.N., Arjakov, S.A., Alakhov, V.Y., and Kabanov, A.V. (1996) Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: *in vivo* evaluation of anti-cancer activity, *Br. J. Cancer*, **74**, 1545–1552.
- Моисеенко О.М., Воробьев С.И., Средняков В.А., Лузганов Ю.В., Беляев Б.Л. (2009) Коллоидно-химические и медико-биологические свойства перфторуглеродного преперата «Фторэмульсия III», *Химико-фармацевтический журнал*, **5**, 37–43.
- Schmolka, I.R. (1972) Artificial skin. Preparation and properties of Pluronic F127 gels for the treatment of burns, *J. Biomed. Mater. Res.*, **6**, 571–582.
- Rodeheaver, G.T., Kurtz, L., Kircher, B.J., and Edlich, R.F. (1980) Pluronic F-68: a promising new skin wound cleanser, *Ann. Emerg. Med.*, **9**, 572–576.
- Segel, L.D., Minten, J.M., and Schweighardt, F.K. (1992) Fluorochemical emulsion APE-LM substantially improves cardiac preservation, *Am. J. Physiol.*, **263**, 730–739.
- Hunter, R.L., and Bennett, B. (1984) The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. II. Antibody formation and inflammation related to the structure of triblock and octablock copolymers, *J. Immunology*, **133**, 3167–3175.
- Alakhov, V.Y., Moskaleva, E.Y., Batrakova, E.V., and Kabanov, A.V. (1996) Hypersensitization of Multidrug Resistant Human Ovarian Carcinoma Cells by Pluronic P85 Block Copolymer, *Bioconjug. Chem.*, **7**, 209–216.
- Alakhov, V.Y., Klinski, E., Li, S.M., Pietrzynski, G., Venne, A., Batrakova, E.V., Bronitch, T.K., and Kabanov, A.V. (1999) Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials, *Colloids Surfaces B*, **16**, 113–134.
- Batrakova, E.V., Miller, D.W., Li, S.M., Alakhov, V.Y., Kabanov, A.V., and Elmquist, W.F. (2001) Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: *in vitro* and *in vivo* studies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 551–557.
- Melnichenko, A.A., Aksenov, D.V., Myasoedova, V.A., Panasenko, O.M., Yaroslavov, A., Sobenin, I.A., Bobryshev, Y.V., and Orekhov, A.N. (2012) Pluronic block copolymers inhibit low density lipoprotein self-association, *Lipids*, **47**, 995–1000.
- Packard, C.J., and Shepherd, J. (1988) Low density lipoprotein metabolism, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **255**, 117–123.
- Khoo, J.C., Miller, E., McLoughlin, P., and Steinberg, D. (1988) Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation, *Arteriosclerosis*, **8**, 348–358.
- Панасенко О.М., Тертов В.В., Мельниченко А.А., Аксенов Д.В., Собенин И.А., Каплун В.В., Супрун И.В.,



- Орехов А.Н. (2006) Связь размера дегликозилированных различными ферментами апо-В-содержащих липопротеидов с их атерогенным потенциалом, *Биологические мембраны*, **23**, 43–52.
15. Панасенко О.М., Мельниченко А.А., Аксенов Д.В., Тертов В.В., Каплун В.В., Собенин И.А., Орехов А.Н. (2007) Агрегация ЛПНП, индуцированная окислением, приводит к увеличению их захвата гладкомышечными клетками аорты человека, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **2**, 159–162.
  16. Tertov, V.V., Sobenin, I.A., Tonevitsky, A.G., Orekhov, A.N., and Smirnov, V.N. (1990) Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 1122–1127.
  17. Tertov, V.V., Orekhov, A.N., Sobenin, I.A., Gabbasov, Z.A., Popov, E.G., Yaroslavov, A.A., and Smirnov, V.N. (1992) Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation, *Circulation Res.*, **71**, 218–228.
  18. Avogaro, P., Bon, G.B., and Cazzolato, G. (1988) Presence of a modified low density lipoprotein in humans, *Arteriosclerosis*, **8**, 79–87.
  19. Orekhov, A.N., Tertov, V.V., Mukhin, D.N., and Mikhailenko, I.A. (1989) Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells: discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 206–211.
  20. Bancells, C., Villegas, S., Blanco, F.J., Benitez, S., Gallego, I., Beloki, L., Perez-Cuellar, M., Ordóñez-Llanos, J., and Sanchez-Quesada, J.L. (2010) Aggregated electronegative low density lipoprotein in human plasma shows a high tendency toward phospholipolysis and particle fusion, *J. Biol. Chem.*, **285**, 32425–32435.
  21. Tertov, V.V., Kaplun, V.V., and Orekhov, A.A. (1998) Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of *in vivo* lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification, *Atherosclerosis*, **138**, 183–195.
  22. Tertov, V.V., Sobenin, I.A., Gabbasov, Z.A., Popov, E.G., Jaakkola, O., Solakivi, T., Nikkari, T., Smirnov, V.A., and Orekhov, A.A. (1992) Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization, *Lab. Invest.*, **67**, 665–667.
  23. Gabbasov, Z.A., Gavrillov, I.Yu., and Popov, E.G. (1992) Optical density fluctuations for determination of platelet concentration in stirred suspension, *Platelets*, **3**, 281–282.
  24. Alexandridis, P., and Hatton, T.A. (1995) Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloids Surfaces A*, **96**, 1–46.
  25. Alexandridis, P., Holzwarth, J.F., and Hatton, T.A. (1994) Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules*, **27**, 2414–2425.
  26. Batrakova, E.V., and Kabanov, A.V. (2008) Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers, *J. Control. Release*, **130**, 98–106.
  27. Tertov, V.V., Sobenin, I.A., Gabbasov, Z.A., Popov, E.G., and Orekhov, A.N. (1989) Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation caused by modified low density lipoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 489–494.
  28. Gavin, E.J. (2004) Platelet Aggregation in Whole Blood, *Methods Mol. Biol.*, **272**, 77–87.
  29. Попонина Т.М., Капилевич Н.А., Кистенева И.В., Марков В.А., Новицкий В.В. (2006) Влияние дезагрегантов на агрегацию тромбоцитов у больных с острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST, *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*, **5**, 41–45.
  30. Chang, M.C., Chang, H.H., Chan, C.P., Chou, H.Y., Chang, B.E., Yeung, S.Y., Wang, T.M., and Jeng, J.H. (2012) Antiplatelet effect of phloroglucinol is related to inhibition of cyclooxygenase, reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **263**, 287–295.
  31. Камиллов Ф.Х., Тимирханова Г.А., Самородова А.И., Халиулин Ф.А., Губаева Р.А. (2013) Антиагрегационная активность новой циклогексиламмониевой соли на основе 1-этилксантина в условиях *in vitro*, *Казанский медицинский журнал*, **94**, 549–552.
  32. Johnsson, M., Silvander, M., Karlsson, G., and Edwards, K. (1999) Effect of PEO–PPO–PEO triblock copolymers on structure and stability of phosphatidylcholine liposomes, *Langmuir*, **15**, 6314–6325.
  33. Batrakova, E.V., Lee, S., Li, S., Venne, A., Alakhov, V., and Kabanov, A.V. (1999) Fundamental relationships between the composition of Pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells, *Pharm. Res.*, **16**, 1373–1379.
  34. Firestone, M.A., Wolf, A.C., and Seifert, S. (2003) Small-angle X-ray scattering study of the interaction of poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) triblock copolymers with lipid bilayers, *Biomacromolecules*, **4**, 1539–1549.
  35. Firestone, M.A., and Seifert, S. (2005) Interaction of non-ionic PEO–PPO diblock copolymers with lipid bilayers, *Biomacromolecules*, **6**, 2678–2687.
  36. Liang, X., Mao, G., and Ng, K.Y. (2005) Effect of chain lengths of PEO–PPO–PEO on small unilamellar liposome morphology and stability: an AFM investigation, *J. Colloid Interface Sci.*, **285**, 360–372.
  37. Жирнов А.Е., Павлов Д.Н., Демина Т.В., Бадун Г.А., Гроздова И.Д., Мелик-Нубаров Н.С. (2006) Влияние строения блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида на их взаимодействие с биологическими мембранами, *Высокомолек. соед. А*, **48**, 2023–2033.
  38. Жирнов А.Е. (2007) *Взаимодействие полиалкиленоксидов с компонентами клеточных мембран*, Дисс. канд. хим. наук, Москва, с. 153.
  39. Будкина О.А., Демина Т.В., Дородных Т.Ю., Мелик-Нубаров Н.С., Гроздова И.Д. (2012) Цитотоксичность незаряженных амфифильных сополимеров, *Высокомолек. соед. А*, **54**, 1385–1395.

**INHIBITORY EFFECT OF POLYETHYLENE OXIDE  
AND POLYPROPYLENE OXIDE TRIBLOCK COPOLYMERS  
ON AGGREGATION AND FUSION OF ATHEROGENIC  
LOW DENSITY LIPOPROTEINS**

**I. G. Panova<sup>1\*</sup>, V. V. Spiridonov<sup>1</sup>, I. B. Kaplan<sup>2</sup>,  
S. S. Turbinov<sup>3</sup>, N. V. Eylisova<sup>3</sup>, A. A. Melnichenko<sup>3</sup>,  
A. N. Orekhov<sup>3</sup>, A. A. Yaroslavov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry,  
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-8846,  
E-mail: igpan@mail.ru*

<sup>2</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,  
Moscow, 119991, Russia; fax: +7(495)939-2776,  
E-mail: info@mail.bio.msu.ru*

<sup>3</sup> *Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Moscow 125315, Russia; fax: +7(495)601-2366,  
E-mail: niiopp@mail.ru*

Received November 27, 2014  
Revision received January 12, 2015

We show that triblock copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide) (so-called pluronics) influence the aggregation and fusion of atherogenic low density lipoproteins (atLDL). These copolymers can also inhibit this process. The character of influence and stabilizing effect degree depends on the structure, relative hydrophobic area of copolymer, and its concentration. Pluronic L61, P85, and L64 characterized by value of hydrophilic–lipophilic balance (HLB) from 3 to 16 have the greatest ability to suppress the aggregation of atLDL. Pluronic L81, having higher degree of hydrophobicity, inhibits aggregation of atLDL only partially at low concentrations. But this atLDL initiates the association process. The action of pluronics was demonstrated to have no direct connection with its ability for micelle formation. The active principles of copolymer are single macromolecules. We assumed that effects caused by pluronics are due to their interaction with the lipid fragment of LDL and by possible influence of these copolymers on the structure and hydrophilic–lipophilic characteristics of lipoproteins.

*Key words:* low density lipoproteins, pluronics, triblock copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide), atherosclerosis, antiatherogenic properties, inhibition of aggregation and fusion