



УДК 577.112.856.083:543.544

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА АФФИННОГО СОРБЕНТА ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ АТЕРОГЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ

*Андрианова И. П., Рабовский А. Б., Зуевский В. В.,
Цыбульская М. В., Самойлова Н. А.*, Давидович Ю. А.*,
Рогожин С. В.**

*Научно-исследовательский институт физико-химической медицины
Министерства здравоохранения РСФСР, Москва;*

**Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова
Академии наук СССР, Москва*

С использованием гидрофильного полимерного носителя осуществлен синтез дигитонинсодержащего аффинного сорбента. Установлена корреляция между строением и степенью сшивки полимера, с одной стороны, и способностью сорбента связывать холестерин, белок и липопротеины — с другой. Показано, что сорбент преимущественно извлекает из плазмы крови атерогенные липопротеины.

Развитие экстракорпоральных методов детоксикации организма, включающих сорбционную очистку крови (плазмы), требует создания высокоэффективных сорбентов, избирательно связывающих токсины или метаболиты, накопление которых может приводить к функциональным расстройствам.

Критическим состоянием для организма в развитии склеротических поражений сосудов является возрастание содержания в крови липопротеинов низкой (ЛНП) и очень низкой (ЛОНП) плотности, которые определяются в патогенезе атеросклероза как атерогенные комплексы холестерина [1, 2]. Для избирательного удаления этих комплексов из плазмы крови к настоящему времени предложен ряд специфических сорбентов, где в качестве лигандов использованы сульфатированные полисахариды [3, 4] или специфические антитела к белкам, входящим в состав липопротеинов [5]. Однако сложность приготовления сорбентов в обоих названных вариантах и высокая стоимость лигандов заставляют искать новые возможности создания аффинных сорбентов для удаления атерогенных липопротеинов из крови.

В данной работе изучено связывание липопротеиновых комплексов холестерина из плазмы крови с помощью гидрофильных нерастворимых гелевых сорбентов, модифицированных стероидным гликозидом — дигитонином. В качестве исходной матрицы использовали сополимеры со строго чередующимися мономерными звеньями: сополимер N-винилпирролидона с малеиновым ангидридом, полученный по методу [6], а также коммерческие препараты сополимеров малеинового ангидрида со стиролом или этиленом. Нами было синтезированы сорбенты двух типов: А — сферически гранулированные сшитые гели, полученные при одновременном введении в полимер дигитонина и сшивающего агента — 4,4'-диаминодифенилоксида (DDO); Б — сорбенты, сшивание которых (гексаметилендиамином) проводили после присоединения к исходному сополимеру остатков дигитонина.

Во всех случаях гидроксильные группы гликозидных остатков дигитонина связывались с остатками малеинового ангидрида с образованием сложнэфирной связи.

Принятые сокращения: ЛНП — липопротеин низкой плотности, ЛОНП — липопротеин очень низкой плотности, DDO — 4,4'-диаминодифенилоксид.

Свойства дигитонинсодержащих сорбентов типа А *

Сорбент	Количество сшивающего агента (DDO), мол.%	Набухаемость в воде, мл/г сорбента	Содержание дигитонина, мг/г сорбента	Емкость по холестерину **, мг/г сорбента
I	2	49	130	62
II	4	11	70	19
III	6	9	260	0,2

* Сорбенты — на основе сополимера малеинового ангидрида с N-винилпирролидоном.

** Исходное содержание холестерина в плазме крови доноров 200 мг/100 мл.

Таблица 2

Свойства дигитонинсодержащих сорбентов типа Б *

Сорбент	Сополимер малеинового ангидрида с	Емкость, мг/г сорбента		
		по общему холестерину **	по холестерину ЛНП и ЛОНП	по белку
IV	N-винилпирролидоном	55	44	270
V	этиленом	60	42	850
VI	стиролом	70	42	500

* Сшивание гексаметилендиаминном (10% по весу); содержание дигитонина 45—50 мг/г.

** Исходное содержание холестерина в плазме крови доноров 200 мг/100 мл.

Таблица 3

Результаты испытания сорбента (IV) при плазмосорбции кролику с экспериментальной гиперхолестеринемией

Плазма	Содержание холестерина и белка, мг/100 мл плазмы		
	общий холестерин	холестерин ЛНП и ЛОНП	белок (общий)
До сорбции	340	160	72
После сорбции (30 мин)	150	60	51

Сорбенты типа А (I—III) (табл. 1), синтезированные на основе сополимера малеинового ангидрида с N-винилпирролидоном, сорбировали значительные количества холестерина из плазмы крови только при низких степенях сшивки. Однако высокая набухаемость таких гелей в водных системах ухудшала их гидродинамические и эксплуатационные характеристики. Вследствие этого в дальнейшем для плазмосорбции применяли сорбенты типа Б (табл. 2), полученные сшиванием гексаметилендиаминном (10% по весу). Эти сорбенты обладали близкими значениями набухаемости в водной среде (~15—20 мл/г) и содержания дигитонина (45—50 мг/г сорбента). Однако сорбент (IV), сохраняя высокую емкость по холестерину, обнаруживал несколько большую селективность в сравнении с сорбентами (V) и (VI) по отношению к атерогенным комплексам холестерина и сорбировал из плазмы значительно меньше белка (табл. 2).

Емкость сорбентов по холестерину зависела от его исходного уровня в плазме крови. На плазме крови здоровых доноров (содержание холестерина 150—200 мг/100 мл) она обычно составляла 40—50 мг/г сорбента. Смешением образцов плазмы крови кроликов с различным содержанием холестерина были приготовлены препараты, содержащие 700, 400

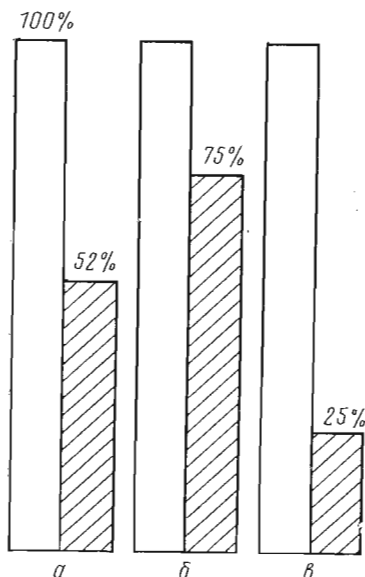


Рис. 1

Рис. 1 Содержание холестерина (а) и аполипротеинов А (б) и В (в) в плазме крови до и после сорбции с использованием сорбента (IV)

Рис. 2. Зависимость сорбции на сорбенте (IV) холестерина из плазмы крови в отсутствие (1) и в присутствии в ней 5 мг/100 мл гепарина (2)

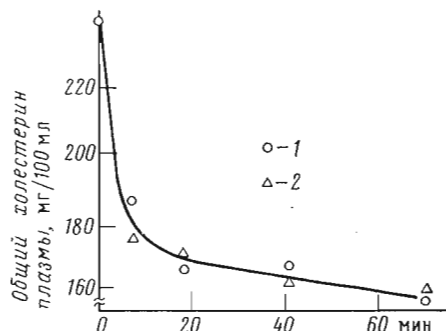


Рис. 2

и 130 мг на 100 мл. Емкости сорбента (IV), полученные при испытании на этих образцах, составили соответственно 100, 95 и 27 мг/г.

Одной из целей настоящей работы было выяснение вопроса, какие холестеринсодержащие компоненты плазмы предпочтительно связываются синтезированным сорбентом. В связи с этим мы исследовали содержание холестерина и аполипротеинов в плазме крови до и после сорбции с использованием сорбента (IV) (рис. 1). Согласно полученным данным, удаление холестерина происходило в основном за счет его атерогенных комплексов, в состав которых входит аполипротеин В.

Для выяснения механизма связывания липопротеиновых частиц с сорбентом была проведена обработка аффинного сорбента (IV) после сорбции сначала буферным раствором для вытеснения плазмы из свободного объема геля, затем смесью органических растворителей для экстракции холестерина. Смесью хлороформ — метанол, 2 : 1, экстрагировалось 85% всего сорбированного холестерина; 15% его было удалено буферным раствором. Так как известно, что в условиях экстракции органическими растворителями комплекс холестерин — дигитонин не разрушается [7], очевидно, что холестерин, переходящий в раствор, входит в состав липопротеиновых глобул, распадающихся в этих условиях. Количество холестерина, участвующего в специфическом связывании с сорбентом, было пренебрежимо мало.

Сорбент, приготовленный аналогичным образом, но не содержащий дигитонина, не сорбировал холестерин. Полученные данные позволяют сделать следующий вывод: на полимере происходила сорбция целиком липопротеиновых частиц, фиксация которых, очевидно, осуществлялась через образование комплекса между отдельными молекулами холестерина, входящего в состав липопротеиновых глобул, и дигитонина, иммобилизованного на сорбенте. В пользу такого объяснения свидетельствует также тот факт, что при сорбции свободного холестерина емкость сорбента не могла бы превышать 15 мг/г, так как комплекс холестерин — дигитонин образуется в эквимолекулярном соотношении (или 1:3 в весовом), а содержание дигитонина на сорбенте составляло 45 мг/г.

Известно, что сульфатированные полиаминоглюканы образуют комплексы с аполипротеин-В-содержащими липопротеинами [8]. Поэтому с помощью гепарина проводят выделение ЛНП и ЛОНП из плазмы крови [9], а также получают сорбенты для аффинной хроматографии этих комплексов [3, 10].

В связи с тем что плазмо- или гемосорбцию проводят при гепаринизации крови, следовало выяснить влияние гепарина на извлечение ЛНП и ЛОНП. Данные, представленные на рис. 2, указывают на то, что присутствие значительного количества гепарина не меняет емкости сорбента. Таким образом, испытания сорбентов *in vivo* можно проводить в стандартных условиях.

Полученный сорбент (IV) испытывали в системе *in vivo* проведением плазмсорбции кролику с экспериментальной гиперхолестеринемией. Результаты показали, что за 30-минутную сорбцию содержание холестерина у животного снизилось более чем в 2 раза (табл. 3). После обработки сорбента, использованного в плазмсорбции, смесью хлороформ — метанол было определено, что всего из организма животного выведено 200 мг холестерина. Через 20 ч, когда обычно после гемосорбции наблюдается наибольший выброс холестерина в кровь [11], концентрация его составляла 200 мг/100 мл плазмы.

Таким образом, показана принципиальная возможность создания сорбентов на основе синтетических гидрофильных полимеров с иммобилизованным дигитонином, преимущественно извлекающих из плазмы крови атерогенные комплексы холестерина.

Экспериментальная часть

Сополимер малеинового ангидрида со стиролом (M_r 40 000–60 000) отечественного производства и сополимер малеинового ангидрида с этиленом (M_r 25 000) фирмы Monsanto (США) использовали без дополнительной очистки.

Сополимер малеинового ангидрида с N-винилпирролидоном (M_r 50 000) получали в лаборатории биополимеров ИХЭОС АН СССР [6]. Найдено, %: С 57,10; Н 5,33; N 6,71. ($C_{16}H_{11}NO_4$)_n. Вычислено, %: С 57,42; Н 5,26; N 6,70. ИК (вазелиновое масло, ν , см⁻¹): 1860 с. и 1790 оч. с. (карбонил ангидридной группы). Потенциометрическое титрование по методике [12] подтвердило состав сополимера — 1 : 1.

Дигитонин получен на экспериментальной базе Института фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе АН ГССР.

Диметилформамид очищали согласно [13]. 4,4'-Диаминодифенилоксид марки ч. д. а. и гексаметилендиамин марки ч. использовали без дополнительной очистки.

Общий холестерин, белок и холестерин фракции липопротеинов высокой плотности, полученной после осаждения ЛНП и ЛОНП по методу [14], определяли на приборе Centrifichem-400 (Baker, США) в лаборатории экспресс-методов анализа НИИФХМ. Холестерин фракций ЛНП и ЛОНП определяли по разности общего холестерина и холестерина липопротеинов высокой плотности. Количество дигитонина, иммобилизованного на полимерах, определяли по содержанию углеводов методом [15]. Аполипопротеины определяли по методу [16] в отделе биохимии ИЭМ АМН СССР.

Свободный объем геля определяли по голубому декстрану (M_r 2 000 000) и учитывали при определении содержания холестерина в сорбенте после сорбции (см. ниже).

Типичная методика получения сорбента типа А (I). К раствору 1 г сополимера малеинового ангидрида с N-винилпирролидоном в 1,5 мл диметилформамида прибавляли раствор 1 г дигитонина и 0,018 г (2 мол. %) DDO в 2 мл диметилформамида. Полученный раствор выливали при перемешивании в 75 мл полиэтиленоксановой жидкости ПЭС-5 и перемешивали образовавшуюся эмульсию 2 ч при 70°С и затем 6 ч при 20°С до завершения свивания. Полимер отфильтровывали, промывали эфиром, ацетоном, водой, ацетоном, эфиром (по 20 мл каждого растворителя) и высушивали до постоянного веса. Выход 1,3 г, размер сферических гранул полимера 0,1–0,3 мм. Свойства сорбентов приведены в табл. 1.

Типичная методика получения сорбента типа В (приведен синтез сорбента IV). К раствору 1 г дигитонина в 10 мл сухого диметилформамида добавляли 1 г сополимера малеинового ангидрида с N-винилпирролидоном, нагревали 2 ч при 70°С, добавляли 0,1 г гексаметилендиамина в 10 мл диметилформамида и перемешивали еще 2 ч при 70°С, осадок отделяли центрифугированием, промывали диметилформамидом до отсутствия углеводов в промывных водах, затем водой, ацетоном и сушили в вакууме при 40°С. Выход 1,13 г, набухаемость в воде 15 мл/г. Свойства сорбентов приведены в табл. 2.

Плазмсорбция с помощью синтезированных сорбентов. При испыта-

нии сорбентов *in vitro* использовали плазму крови доноров с содержанием холестерина 150–200 мг в 100 мл, а также плазму крови кроликов с моделью гиперхолестеринемии (содержание холестерина 100–700 мг в 100 мл).

Модель экспериментальной гиперхолестеринемии создавали скормливанием животным холестерина (в растительном масле), ежедневно по 0,4 г/кг веса в течение 1 мес.

1 г сорбента помещали в 100 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (рН 7,4) и оставляли суспензию на 2 ч. Избыток буфера отделяли фильтрованием или центрифугированием, полимер встряхивали с 10 мл плазмы крови в течение 1 ч. После центрифугирования определяли в плазме остаточную концентрацию общего холестерина, холестерин липопротеинов высокой плотности и содержание аполиipoproteинов А и В. Количество сорбированного холестерина определяли по разности с учетом стерина, остающегося в свободном объеме сорбента.

Испытание сорбента (IV) на кролике с моделью гиперхолестеринемии проводили путем 7-кратного последовательного отделения 50 мл плазмы, встряхивания с сорбентом в течение 30 мин, отделения сорбента и возвращения плазмы в общий кровоток (объем набухшего сорбента 20 мл; соотношение сорбент — плазма 1 : 10 по весу).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. М.: Медицина, 1983, с. 256.
2. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. М.: Медицина, 1984, с. 79–93.
3. Lupien P. J., Moorjani S., Awad J. *Lancet*, 1976, v. 1, № 7973, p. 1261–1264.
4. Kikkawa T., Tani N., Takada C., Hatana K., Yamamoto A. *Artherosclerosis*, 1984, v. 4, № 3, p. 276–282.
5. Stoffel W., Demant T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, № 1, p. 611–615.
6. Conix A., Smets G. J. *Polym. Sci.*, 1955, v. 15, № 79, p. 221–229.
7. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. Т. 5. М.: Мир, 1971, с. 104–108.
8. Nakashima J., Di Ferrante N., Jackson R. L., Pownall H. J. *Biol. Chem.*, 1976, v. 250, № 14, p. 5386–5392.
9. Карманский И. М., Шпикунер В. О. Биохимия. 1981, т. 46, № 5, с. 859–862.
10. Burgstaller E. A., Pineda A. A., Ellefson R. D. *Mayo Clin. Proc.*, 1980, v. 55, № 3–4, p. 180–183.
11. Лопухин Ю. М., Молодецков М. И. Гемосорбция. М.: Медицина, 1985, с. 235.
12. Garret E. R., Guile R. L. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1951, v. 73, № 10, p. 4533–4540.
13. Бекер Г., Бергер В. и др. Органикум. Т. 2. М.: Мир, 1979, с. 360.
14. Burstein M., Scholnick H. R., Mortin R. J. *Lipid. Res.*, 1970, v. 11, № 6, p. 583.
15. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. *Anal. Chem.*, 1956, v. 28, p. 350–356.
16. Климов А. Н., Усатенко М. С., Денисенко А. Д., Кожевникова К. А., Олейник И. А. Биохимия, 1981, т. 46, № 4, с. 590–602.

Поступила в редакцию

22.X.1985

После доработки

21.III.1986

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF AFFINITY SORBENT FOR ELIMINATION OF ATHEROGENIC LIPOPROTEINS

ANDRIANOVA I. P., RABOVSKY A. B., ZUYEVSKY V. V., TSYBULSKAYA M. V., SAMOILOVA N. A.*, DAVIDOVICH Yu. A.*, ROGOZHIN S. V.*

Research Institute of Physico-Chemical Medicine, RSFSR Health Ministry, Moscow;
**N. A. Nesmeyanov Institute of Organo Element Compounds Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A digitonin-containing affinity sorbent was prepared using a hydrophilic polymer carrier. The correlation was found between the polymer structure and crosslinking degree, on the one hand, and the sorbent capacity to bind cholesterol, protein and lipoproteins — on the other. The sorbent was demonstrated to extract predominantly atherogenic lipoproteins from blood plasma.