



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Aterosklerosi plakako kolesterol
kristalak disolbatu ditzakeen
nanopartikula lipidiko bidezko
terapia berritzailea**

*IBeñat Larrañaga-Monasterio,
Endika Cabrera-Antón,
Aitor Ordeñana-Manso,
Telmo Santamaría-Zamorano,
Shifa Jebari-Benslaiman,
Kepa B. Uribe, Unai Galicia-Garcia,
Asier Larrea-Sebal, Cesar Martin
eta Asier Benito-Vicente*

201-208 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.24>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Aterosklerosi plakako kolesterol kristalak disolbatu ditzakeen nanopartikula lipidiko bidezko terapia berritzailea

Beñat Larrañaga-Monasterio^{1,2}, Endika Cabrera-Antón^{1,2}, Aitor Ordeñana-Manso^{1,2},
Telmo Santamaría-Zamorano^{1,2}, Shifa Jebari-Benslaiman^{1,2}, Kepa B. Uribe^{1,2},
Unai Galicia-García^{1,2}, Asier Larrea-Sebal^{1,2}, Cesar Martin^{1,2} eta Asier Benito-Vicente^{1,2}

1 Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, EHU, 48940 Leioa

2 Biofisika Institutua (CSIC-EHU), 48940 Leioa

asier.benito@ehu.eus

Laburpena

Aterosklerosia tratatzeko estrategien artean, nanopartikula lipidikoen erabilerak arreta berezia jaso du. Ikerketa honetan, HDL jaioberrien antzekoak diren rHDL eta LNP nanopartikulen kolesterol-kristalak disolbatzeko gaitasuna eta hanturazko erantzunean duten eragina aztertu da. Nanopartikulen karakterizazio biofisikoak erakutsi du egitura homogeenoa eta egonkorra direla. Gainera, *in vitro* emaitzek baieztatu dute nanopartikulek kolesterol kristalak modu eraginkorrean disolbatzen dituztela eta hanturazko markatzaileen jaitsiera nabarmena eragiten dutela J774A.1 makrofagotan. Ondorioz, nanopartikula hauek aterasklerosiaren tratamendurako estrategia terapeutiko berritzaile bat izan daitezke.

Hitz gakoak: rHDL, kolesterola, aterasklerosia, inflamazioa

Abstract

Among the strategies for treating atherosclerosis, the use of lipidic nanoparticles has gained significant attention. This study investigates the ability of rHDL and LNP nanoparticles, which resemble nascent HDL, to dissolve cholesterol crystals and their effect on the inflammatory response. Biophysical characterization of the nanoparticles confirmed their homogeneous and stable structure. Furthermore, in vitro results demonstrated that these nanoparticles effectively dissolve cholesterol crystals and significantly reduce inflammatory markers in J774A.1 macrophages. Consequently, these nanoparticles could represent an innovative therapeutic strategy for the treatment of atherosclerosis.

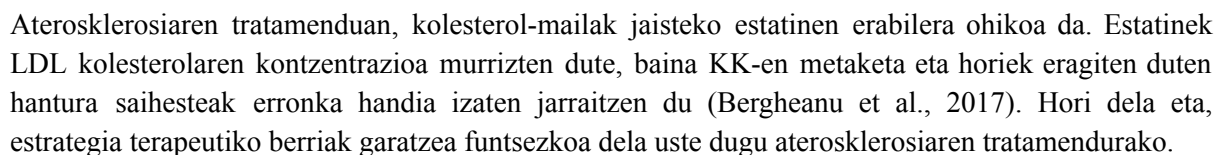
Keywords: rHDL, cholesterol, atherosclerosis, inflammation

1. Sarrera eta Motibazioa

Aterosklerosia gaixotasun kardiobaskularren ardatz nagusia da eta mundu mailako heriotza-kausa garrantzitsuenetakoa. Gaixotasun hau arteriako paretetan lipidoen eta zuntz-elementuen metaketaren, hanturaren eta kaltzifikazioaren ondorioz garatzen da, eta arterien diametroaren murrizketa eraginez, konplikazio larriak sor ditzake, hala nola, miokardio-infartua edota iktusa (Björkegren & Lusis, 2022). Gaixotasunaren konplexutasuna dela eta, azken urteotan arreta berezia jarri da aterasklerosiaren mekanismo molekularrak sakonago ulertzeko eta tratamendu berriak garatzeko.

Endotelioaren disfuntzioak basodilatazio eta basokonstriktzioaren arteko orekaren haustea dakar, ondorioz, partikula lipidikoen infiltrazioa ematen da odol-hodiaren intiman (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Kolesterol-mailaren igoerak eta LDL-ren infiltrazio transendotelialak ateroma-plakaren

1. irudia: Ateroma plakaren garapenaren laburpen eskematikoa: kolesterola gune azpi-endotelialean filtratuko da. Endotelioa aktibatu eta makrofagoen migrazioa bultzatuko du gune azpi-endotelialera. Bertan, makrofagoek kolesterola barneratuko dute zelula apartsuetan bihurtuz. Horren ondorioz, ateroma plaka handituko da, odol fluxua oztopatuz.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1. Dentsitate handiko lipoproteina errekonbinanteen erabilera

Terapia tradizionalak senda ezin ditzakeen kolesterol kristal hauek desegiteko dentsitate handiko lipoproteina errekonbinanteen (rHDL) erabilera proposatzen da. Dagoeneko aztertua izan da nanopartikula lipidiko hauen erabilera, lehenengo aldia 80. hamarkadan izan zelarik, baina gehiengoak ez du bigarren fase klinikoa gainditu eraginkortasun falta eta albo ondorioak direla eta (Jebari eta Benslaiman et al., 2022). Hala ere, lan honetan deskribatzen diren tamaina txikiko disko itxurako nanopartikulek kolesterola zelula apartsuetatik kanporatzeko, kolesterol kristalak disolbatzeko eta hantura murrizteko gaitasun handia dute. Hauek ApoA1 lipoproteinaz zein 1,2-dipalmitoil-sn-glizero-3-fosfokolinaz (DPPC) osatuak daude eta bi teknika desberdinen bidez eratu daitezke: sonikazioz ala kolato detergentea erabiliz.

2.2. Helburua

Ikerketa honen helburua giza HDL jaioberrien antzekoak diren rHDL eta LNP nanopartikulen karakterizazio biofisiko bat eskeintzea eta KK-ak disolbatzeko zein hantura murrizteko duten gaitasuna aztertzea, aurkezten diren bi sintesi prozesuak alderatuz. Fase klinikoari begira tenperaturak izan dezakeen eragina kontuan hartzen da nanopartikularen egonkortasuna eta eraginkortasunaren kasuan.

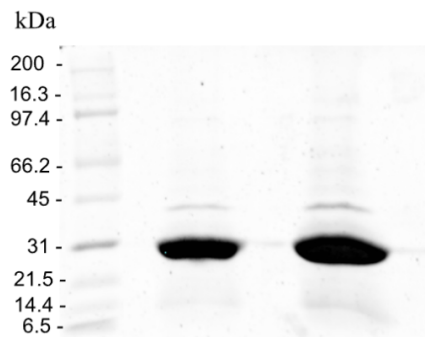
3. Ikerketaren muina

3.1. Nanopartikula lipidikoen sorrera eta karakterizazio biofisikoa

Nanopartikula lipidikoak ApoA1 proteinaz eta DPPC lipidoz osatzen dira, 1:125 erlazio molarrean. Proteina errekonbinantea *E. coli* BL21 anduietik purifikatzerakoan TEN (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8) disolbatzailean disolbatuta dauden lipidoekin elkartzen dira. Hala ere, mintz agregatuak apurtzeko eta tamaina txikiko nano-disko formako partikulak eskuratzeko hausketa-prozesu batenpetik pasa behar dira. Lehenengo metodoak sonikazioa du muin; 5 minutuz 42 °C-tan sonikatu ostean 15 minutuz 0 °C-tan sonikatzen da berriz ere. Bigarren metodoa kolato detergentean oinarritzen da. Detergentea 1:1,2 erlazio molarrean gehitu eta lagina homogeneousatzen du 42 °C-tan inkubatuta izaterakoa. Azkenik, bi gel iragazpeneko kromatografia bidez purifikatu ziren tamaina egokia zuten nanopartikulak: Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) eta GE AKTA Purifier 10 FPLC System w/ UPC-900 (GE Healthcare). Sonikazio bidezko eskuratutako nanopartikulei rHDL deritze, kolato bidezko aldiz LNP (ingeleseko lipidic nanoparticle).

Proteina errekonbinantearen HiTrap TALON crude osteko purifikazioa aztertzeko (proteinak histidina isatsa baitu) SDS PAGE elektroforesi bat gauzatu zen. 2. irudian ikusi daitekeen bezala esperotako 28,12 kDa-eko pisu molekularra du proteinak. Ageri zen proteina nagusia ApoA1 izanik haren purutasun maila egokia zela onartu zen.

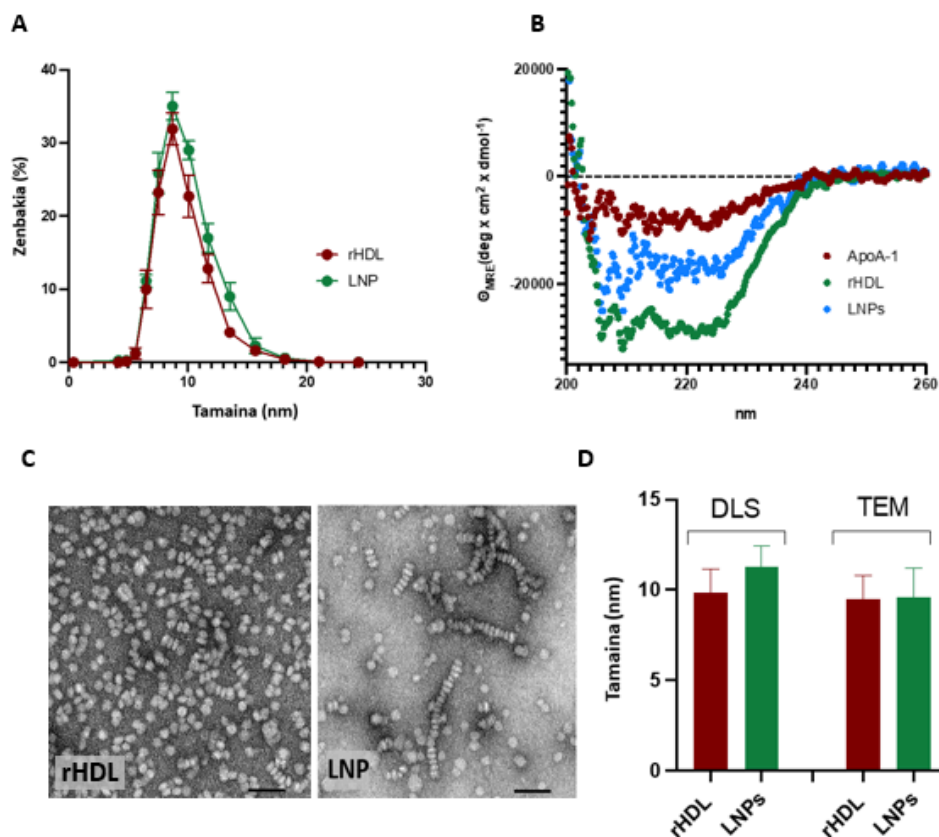
2. Irudia: ApoA-I en purifikazio poliakrilamida gelean. Purifikazioaren purutasuna SDS-PAGE elektroforesiaren bidez analisatu zen. Markatzailearen xingolen tamaina: 200, 116.3, 97.4, 66.2, 45, 31, 21.5, 14.4 eta 6.5 kDa. Lortutako tamaina, proteinaren benetako tamainarekin (~ 28,1 kDa) bat egiten du.



Nanopartikulen karakterizazio biofisikoa Dynamic Light Scattering (DLS), Dikroismo Zirkularra (DZ) eta Transmisio Mikroskopia Elektroniko (TEM) bidez gauzatu ziren. Lehenik, DLS teknika, oinarrian, nanopartikulek eragindako argiaren dispersioaren neurketaz baliatzen da molekulen diametro hidrodinamiko (tamaina) kalkulatzeko. Jarraitzeko, DZ argi polarizatu zirkularraren xurgapenean oinarritzen da proteinen egitura sekundario proportzio eta konformazio aldaketak neurtzeko. Azkenik, TEM-an elektroizpiek lagina zeharkatzen dute bereizmen handiko irudiak sortzeko.

DLS-ak nanopartikulen 10 nm inguruko diametroa (diámetro hidrodinamiko) zela aitortu zuen. Jarraituz, DZ egitura α -helikoidala zehazteko baliagarria izan zen helizitate handiena rHDL-ek erakusten zutelarik, LNP-ek baino 1,69 aldiz handiagoa. Emaizta honek nanodiskoko proteinen tolesketa egokia zela frogatu zuten. TME irudiak egiteko partikulen tindaketa negatiboa egin zen. Horren bidez, rHDL eta LNP-en homogeneitatea eta nanopartikulen diametroa kualitatiboki zehaztu zen. Ez ziren desberdintasun nabarmenak eskuratu egiturari zegokionez. Partikula indibidual gisa ala bata besteari elkarrekin lotuta kateak sortuz ageri ziren bai LNP zein rHDL kasuetan, kate batzuk arinki luzeagoak izanik LNP-tan. 3C. irudian osaera desberdina dutela diruditen arren argazkiko nanodisko kopuruan besterik desberdintzen ez dira. TEM irudiek nanopartikulen banaketa homogeneoa eta egitura-osotasuna ere erakusten zuten, DLS bidez lortutako balioak egiaztatuz.

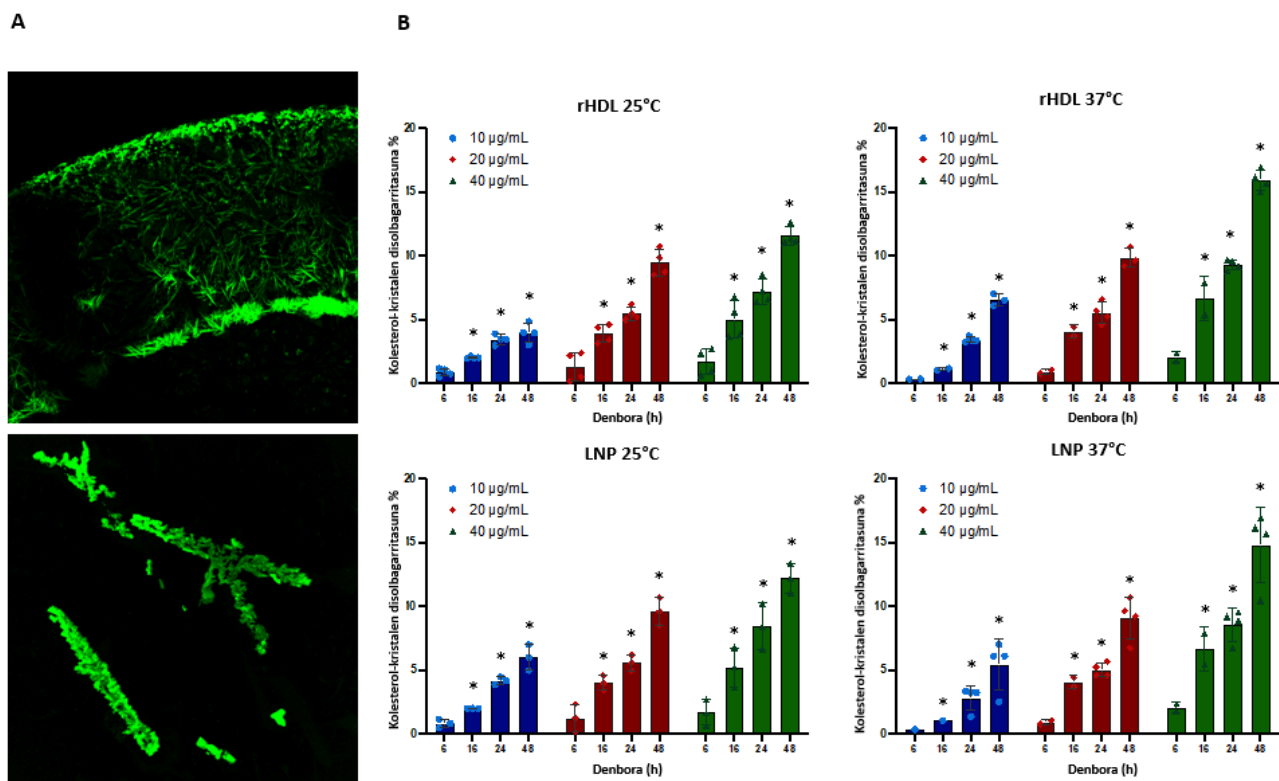
3. Irudia. Nanopartikulen karakterizazio biofisikoa. **A)** rHDL eta LNP tamaina-profila DLS bidez zehaztuta. Ez zen rHDL eta LNP arteko desberdintasun esanguratsurik zehaztu. **B)** rHDL, LNP eta apoA-I soluzioen dikroismo zirkularra. θ_{MRE} : Mean Residue Ellipticity. **C)** rHDL eta LNP-en itxura eta tamainaren azterketa Transmisiozko Mikroskopia Elektronikoaren bidez. Urail azetatoaren tindaketa negatiboa egin zen. 100 $\times$ handipena. 50 nm-ko eskala-barra. **D)** rHDL eta LNP-en diametroa DLS (diametro hidrodinamikoa) eta NS-EM irudien bidez zehaztuta.



3.2. Kolesterol kristalen solubilizazioa

Hautagai bakoitzaren kolesterol-kristalen solubilizazio-ahalmena aztertu zen nanodiskoak gehitu eta aldiune zein tenperatura desberdinetan fluoreszentzia intentsitatea neurtuta. Eratutako kolesterol-kristalek 0,015 mg/ml-ko kontzentrazioa zuten. TopFluor® Cholesterol %1 fluorokromoarekin bidez markatuta zeudenez, horien egitura Mikroskopia Konfokalaren bidez aztertu zen (4A. irudia). Lortutako emaitzek adierazi zuten 25 °C eta 37 °C egoeren arteko desberdintasuna arbuigarria zela. Hau da, kolesterola disolbatzeko ahalmena antzekoa zen. Hala ere, kolesterolaren solubilizazio-ehunekoaren igoera ikusi zen inkubazio-denbora eta nanopartikulen kontzentrazioa handitu ahala (4B. irudia).

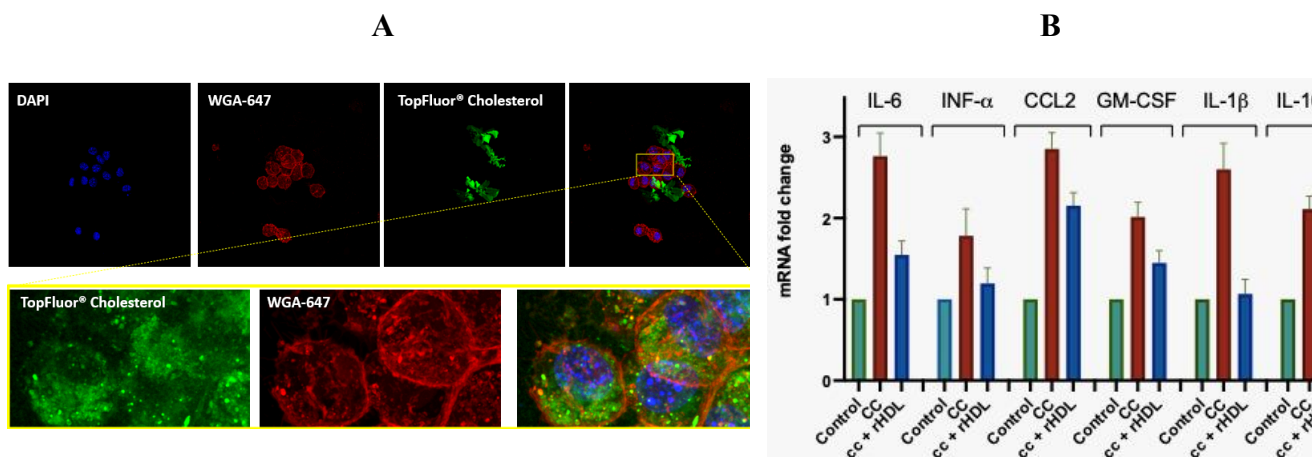
4. Irudia: rHDL eta LNP-en efektua kolesterol-kristalen disolbagarritasunean. **A)** Kolesterol eta TopFluor® Cholesterol bidez osatutako kristalen irudiak Mikroskopia Konfokalaren bidez (goiko irudia x10 handipena; beheko irudia x60 handipena). **B)** Kolesterol- kristalen disolbagarritasuna rHDL eta LNP-kin denbora eta kontzentrazio desberdinetan tratatuz 25 eta 37 °C-tan. Neurketa guztiak modu independentean egin ziren 3 aldiz eta esangura-mailak Student-en t-testaren bidez zehaztu ziren.*p <0,01 6h-rekin alderatuta.



3.3. J774.A1 makrofagoetako hantura markatzaileen determinazioa

Saguetatik eratorritako J774.A1 makrofagoek kolesterola jasotzen zutela baieztatzeko, hainbat markaketa teknika erabili ziren. Zelulak TopFluor® Cholesterol, DAPI eta WGA-647 markatzaileekin tindatu ziren. Mikroskopia bidez egindako analisiak erakutsi zuen TopFluor® Cholesterol fluorokromoarekin markatutako kolesterola zelulek barneratu zutela. Betsalde, DAPI tindaketak zelulen nukleoa bistartzea ahalbidetu zuen, eta WGA-647 tindatzaileak, berriz, mintz plasmolikoak markatu zituen (5A. irudia). Horrela, zelulek kolesterola barneratzen zutela egiaztatzeaz gain, zelula barnean kolesterolak hartzen zuen banaketa ikus zitekeen. Horrez gain, zelulak KK-ekin eta rHDL-kin inkubatu eta hantura markatzaileak qRT-PCR bidez analizatu ziren. 5B. irudian ikus daitekeen moduan, zelulak rHDL-kin tratatu ondoren, IL-6, INF- α , CCL2, GM-CSF eta IL-1 β mailen murrizketa nabarmena gertatu zen tratamendurik gabeko kontrol-zelulekin alderatuta, ez hainbeste aldiz, IL-10 ren kasuan. Aurreko esperimenduetan rHDL eta LNP-ek karakterizazio ezberdintasun nabarmenik erakutsi ez zutenez, hanturaren azterketa rHDL-ekin soilik egitea erabaki zen, hura baizen bi prozesuetan efizienteena.

5. Irudia: A) KK-ekin hazitako J774.A1 makrofagoen kolesterol bilketa. J774.A1 zelulak KK zituzten plaketan hazi ziren. Goiko irudietan: J774.A1 zelulak DAPI (nukleoak), Gari Germen Aglutina (WGA-647) eta TopFluor® Cholesterol bidez tindatuta. Beheko irudiek txertaketaren irudi anplifikatuak erakusten dituzte. **B)** J774.A1 zelulen inkubazioa rHDL-kin nabarmen murriztu zuen hanturazko hainbat markatzailerren maila tratatu gabeko zelulekin alderatuta. Kontrola kolesterolik gabeko zelulen hantura maila da. mRNA adierazpen-maila qRT-PCR bidez zehatu zen. Neurketa guztiak modu independentean egin ziren 3 aldiz eta esangura-mailak Student-en t-testaren bidez zehaztu ziren. * $p < 0,01$ kontrolarekin alderatuta.



4. Ondorioak

Ikerketak frogatu du rHDL eta LNP nanopartikulek kolesterol-kristalak modu eraginkorrean disolbatzeko gaitasuna dutela, haien artean ezberdintasun handirik gabe. DPPC-ak kolesterolarekin duen afinitate altua da horren arrazoa, eta tenperaturak ez du eragin adierazgarrikerik izan kolesterolaren bilketan.

Bestetik, DLS, DZ eta TEM tekniken bidezko karakterizazio biofisikoen emaitzek nanopartikulen homogeneotasuna eta egitura-egonkortasuna berresten dute, bi kasuetan 10 nm inguruko diska-formako nanopartikulak osatzen direlarik, zeintzuek α -helizezko egitura sekundario nagusi bat duten. Hala ere, rHDL-en sintesia LNP-ena baino efizienteagoa da, denbora eta produkzio tasa dela eta.

Azkenik, J774.A1 makrofagoetan, nanopartikulek inflamazio-markatzaileen murrizketa nabarmena eragin dute, ateroklerosiaren tratamendurako aukera terapeutiko berritzailea bihurtuz. Hala ere, nanopartikulen protokoloa optimizatu beharra dago, dosia eta esposizio-denbora egokituz, eraginkortasuna areagotzeko bai *in vitro*, bai *in vivo*.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Sintetizatu diren nanopartikula lipidiko hauek pre-HDL heldugabeen parekoak dira. Klinikoki erabiltzeko ideiak odol bidezko insertzioa dakar, hori dela eta, plasman duten heltze prozesua aztertuta beharko litzateke bai proteikoki, bai lipidikoki. Bestetik, nanopartikulen purifikazio metodologia optimizatu beharko litzateke. Amaitzeko, hantura murrizteko seinale eta erregulatzaile antiinflamatorioak gehitzeko aukera azter liteke.

6. Erreferentzia

- Björkegren, J. L., & Lusis, A. J. (2022). Atherosclerosis: recent developments. *Cell*, 185(10), 1630-1645. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.004>
- Duivenvoorden, R., Tang, J., Cormode, D. P., Mieszawska, A. J., Izquierdo-Garcia, D., Ozcan, C., Searle, K., Silvera, S., Fayad, Z. A., & Mulder, W. J. (2014). A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nature Communications*, 5(1), 3065. <https://doi.org/10.1038/ncomms4065>
- Ho-Tin-Noé, B., Vo, S., Bayles, R., Ferrière, S., Ladjal, H., Toumi, S., Morin, B., Dubois, C., Meilhac, O., & Michel, J. B. (2017). Cholesterol crystallization in human atherosclerosis is triggered in smooth muscle cells during the transition from fatty streak to fibroatheroma. *The Journal of Pathology*, 241(5), 671-682. <https://doi.org/10.1002/path.4873>
- Jebari-Benslaiman, S., Uribe, K. B., Benito-Vicente, A., Galicia-Garcia, U., Larrea-Sebal, A., Santin, I., Baila-Rueda, L., Cenarro, A., Tejedor, M. T., Civeira, F., & Martín, C. (2022). Boosting cholesterol efflux from foam cells by sequential administration of rHDL to deliver microRNA and to remove cholesterol in a triple-cell 2D atherosclerosis model. *Small*, 18(13), 21059. <https://doi.org/10.1002/sml.202105915>
- Kong, P., Cui, Z. Y., Huang, X. F., Zhang, D. D., Guo, R. J., & Han, M. (2022). Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 131. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00955-7>
- Kratz, J. D., Chaddha, A., Bhattacharjee, S., & Goonewardena, S. N. (2016). Atherosclerosis and nanotechnology: diagnostic and therapeutic applications. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 30, 33-39. <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6649-2>
- Luo, Y., Guo, Y., Wang, H., Yu, M., Hong, K., Li, D., Yang, D., Wu, X., Zhao, X., Liu, X., & Chen, Y. E. (2021). Phospholipid nanoparticles: Therapeutic potentials against atherosclerosis via reducing cholesterol crystals and inhibiting inflammation. *EBioMedicine*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103725>
- Nagenborg, J., Jin, H., Ruder, A. V., Temmerman, L., Mees, B., Schalkwijk, C., Döring, Y., Drechsler, M., Lutgens, E., & Biessen, E. A. (2023). GM-CSF-activated STAT5A regulates macrophage functions and inflammation in atherosclerosis. *Frontiers in Immunology*, 14, 1165306. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1165306>

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzaren 2021eko Talde Kontsolidatuek (449IT1720-22) eta Zientzia, Berrikuntza eta Unibertsitate Ministerioaren Ezagutza Sortzeko Proiektuak (PID2022-136788OB-I00) finantziatu zuten. T. S-Z., B. L-M. eta E. C-A. Ikasikerrek (2024–2025) emandako dirulaguntzaren bidez sostengatuak izan ziren, A. O-M. aldiz, JAE Introk (CSIC 24-25) emandako dirulaguntza baten bidez.