

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет

На правах рукописи



БУДКИНА Ольга Александровна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ
ВОЗДЕЙСТВИЯ АМФИФИЛЬНЫХ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ
НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки

03.01.04 – биохимия, химические науки

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

д.б.н. Гроздова Ирина Дмитриевна,

д.х.н. Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Список сокращений.....	4
Введение.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Синтез и физико-химические свойства амфифильных блок-сополимеров.....	9
1.1.1. Плюроники	9
1.1.2. Полиглицерины.....	14
1.1.3. Сополимеры на основе полидиметилсилоксана.....	17
1.1.4. Взаимодействие амфифильных блок-сополимеров с модельными липидными мембранами и особенности структуры клеточных мембран	18
1.2. Множественная лекарственная устойчивость раковых клеток и ее преодоление с помощью плюронигов	22
1.2.1. Влияние плюронигов на устойчивость раковых клеток к лекарствам.....	23
1.2.2. Предполагаемые механизмы подавления активности Р-гликопротеина плюрониками	27
1.3. Токсичность плюронигов	34
1.4. Защитная роль плюронигов	38
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	42
2.1. Материалы.....	42
2.2. Методы исследования.....	43
2.2.1. Определение молекулярно-массовых характеристик полимеров.....	43
2.2.2. Определение ККМ с помощью флуоресцентного зонда.....	43
2.2.3. Определение ККМ методом статического светорассеяния	44
2.2.4. Культивирование клеток	45
2.2.5. Определение цитотоксичности доксорубина и полимеров.....	47
2.2.6. Влияние полимеров на цитотоксичность доксорубина.....	48
2.2.7. Анализ накопления DOX в клетках	48
2.2.8. Получение меченных тритием полимеров	49
2.2.9. Радиоавтография	49
2.2.10. Получение конъюгата плюроника L61 с флуоресцеинизотиоцианатом	52

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
3.1 Характеристика исследованных соединений	54
3.1.1. Структура.....	54
3.1.2. Расчет гидрофильно-липофильного баланса	57
3.1.3. Критическая концентрация мицеллообразования.....	58
3.2. Цитотоксичность исследованных соединений.....	65
3.2.1. Определение цитотоксичности: обоснование метода.....	65
3.2.2. Токсичность доксорубицина для клеток MCF7/R	66
3.2.3. Цитотоксичность исследованных соединений.....	67
3.2.4. Сопоставление цитотоксичности и мицеллообразования исследованных соединений.....	73
3.3. Увеличение жизнеспособности клеток под действием ПЭО-содержащих блок-сополимеров	76
3.4. Влияние исследованных соединений на устойчивость раковых клеток к доксорубину	86
3.4.1. Влияние плуроника L61 на чувствительность раковых клеток к доксорубину.....	86
3.4.2. Определение минимальной концентрации соединения, достаточной для подавления лекарственной устойчивости.....	88
3.4.3. Зависимость степени подавления лекарственной устойчивости от концентрации исследованного соединения.....	89
3.4.4. Особенности действия некоторых блок-сополимеров на лекарственную устойчивость раковых клеток.....	93
3.4.5. Предполагаемый механизм подавления лекарственной устойчивости раковых клеток.....	98
3.5. Исследование локализации рассматриваемых соединений при их взаимодействии с клетками.....	100
3.5.1. Получение FITC-меченых блок-сополимеров	100
3.5.2. Влияние присоединенного FITC на свойства блок-сополимеров.....	101
3.5.3. Исследование локализации блок-сополимеров флуоресцентным методом	101
3.5.4. Исследование локализации методом радиоавтографии	105
Заключение.....	111
Выводы.....	116
Список цитированной литературы.....	117

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс
- ГПХ – гель-проникающая хроматография
- ДМС - диметилсилоксан
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДФГТ – дифенилгексатриен
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
- КМП - минимальная концентрация полимера, при которой прирост клеток максимален
- ННК – наибольшая нетоксичная концентрация
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- ПДМС - полидиметилсилоксан
- ПО – пропиленоксид
- ППО – полипропиленоксид
- ПЭГ - полиэтиленгликоль
- ПЭО – полиэтиленоксид
- ТГФ – тетрагидрофуран
- ТНБС - тринитробензолсульфо кислота
- ЭО – этиленоксид
- ЭК^{МЛУ} – минимальная концентрация полимера, достаточная для максимального подавления множественной лекарственной устойчивости раковых клеток
- DAPI – флуоресцентный краситель, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium - среда для культивирования клеток
- DOX – доксорубицин
- FITC – изотиоцианат флуоресцеина
- G - глицерин
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
- MRA - micoplasma removing agent, препарат от микоплазмы
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид
- PBS – phosphate-buffered saline – буфер (10 мМ фосфата и 145 мМ NaCl, pH 7,4)
- PG – полиглицерин
- P-gr – P-гликопротеин
- PEP - (Radical, Ethylene oxide, Propylene oxide) двублочный сополимер ЭО и ПО
- IC₅₀ - концентрация полимера, вызывающая гибель 50% клеток
- IC₅₀^{DOX} - концентрация доксорубицина, вызывающая гибель 50% клеток

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Синтетические амфифильные блок-сополимеры привлекли внимание биохимиков, когда 25 лет назад было обнаружено, что трехблочные сополимеры строения полиэтиленоксид (ПЭО) - полипропиленоксид (ППО) – полиэтиленоксид (плюроники) способны снижать устойчивость раковых клеток к лекарствам (множественную лекарственную устойчивость, МЛУ), подавляя выброс лекарства из клетки и тем самым повышая эффективность химиотерапии [1]. Разработана лекарственная форма SP1049C, представляющая собой смесь плюроники с противоопухолевым антибиотиком доксорубицином, которая успешно прошла вторую фазу клинических испытаний по лечению пациентов с раком пищевода [2].

Позднее были обнаружены два других биологических эффекта плюроники. Наиболее гидрофильные представители этого класса с массовой долей ПЭО 70 - 80% способны защищать живые клетки от механических повреждений, увеличивая модуль упругости клеточной мембраны, и в случае таких повреждений – способствуют восстановлению ее целостности. В то же время плюроники могут вызывать прямо противоположный эффект - гибель клеток.

В связи с этим возникает вопрос, какие особенности структуры и физико-химических свойств плюроники обуславливают проявление столь различных биологических эффектов.

Степень разработанности темы. Данные литературы о защитных свойствах и токсичности плюроники для клеток в культуре (цитотоксичность) носят весьма фрагментарный характер. Практически нет информации о проведении систематических исследований связи между молекулярным строением, физико-химическими свойствами амфифильных блок-сополимеров и их влиянием на раковые клетки. Неизвестно, какова роль гидрофильных и гидрофобных блоков во взаимодействии плюроники с клеточной мембраной, а также какие особенности структуры (химическая природа и топология блоков) амфифильных полимеров лежат в основе их биологических эффектов. В связи с этим данная работа представляется **актуальной**, так как посвящена изучению влияния структуры, химической природы и физико-химических свойств амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ на их взаимодействие с раковыми клетками.

Цель настоящей работы состояла в выявлении структурных параметров и физико-химических свойств амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ, обуславливающих их биологические эффекты: влияние на жизнеспособность опухолевых клеток и их устойчивость к действию лекарств.

Для выяснения этих вопросов представлялось целесообразным исследовать широкий круг амфифильных соединений, различающихся:

- по химической природе гидрофобного блока;
- по химической природе гидрофильного блока;
- по архитектуре гидрофильного блока;
- по степени блочности.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- исследовать способность указанных выше амфифильных соединений к мицеллообразованию;
- на одной линии клеток изучить влияние рассматриваемых соединений на жизнеспособность клеток в культуре и их устойчивость к лекарствам;
- определить локализацию тех же соединений при их взаимодействии с клетками.

Научная новизна результатов. Впервые проведенное систематическое исследование взаимосвязи между физико-химическими свойствами, структурой водорастворимых амфифильных неионогенных блок-сополимеров и их влиянием на раковые клетки в культуре позволило сделать следующие выводы:

- в отличие от низкомолекулярных ПАВ, все исследованные блок-сополимеры только в мицеллярной форме вызывают гибель клеток;
- цитотоксическая концентрация неионогенного амфифильного блок-сополимера определяется массовой долей гидрофильного блока (ГЛБ): чем гидрофильнее полимер, тем он менее токсичен;
- сополимеры, гидрофильный блок которых представлен линейным полиэтиленоксидом, способствуют увеличению количества раковых клеток. Чем больше степень полимеризации полиэтиленоксида, тем меньше концентрация полимера, вызывающая этот эффект. Сополимеры, гидрофильный блок которых представлен разветвленным полиглицерином, подобным эффектом не обладают. Таким образом, впервые показано, что способность неионогенных блок-сополимеров увеличивать выживаемость клеток определяется молекулярной структурой гидрофильного блока и химической природой его звеньев;
- впервые обнаружено, что общая гидрофобность макромолекулы блок-сополимера и объем его гидрофобного блока обуславливают способность подавлять устойчивость раковых клеток к противоопухолевому препарату доксорубину. Чем больше гидрофобность полимера и объем гидрофобного блока, тем ниже концентрация полимера, достаточная для подавления устойчивости раковых клеток к лекарствам;
- показано, что все исследованные тритий-меченые соединения локализуются на поверхности раковых клеток в тех же условиях эксперимента, при которых они вызывают наблюдаемые биологические эффекты.

Теоретическая и практическая значимость работы.

✓ Впервые проведено систематическое исследование взаимосвязи между физико-химическими свойствами, структурой водорастворимых амфифильных неионогенных блок-сополимеров и их влиянием на раковые клетки в культуре. Понимание взаимосвязи между молекулярным строением полимеров и вызываемыми ими биологическими эффектами необходимо для направленного синтеза блок-сополимеров с заданными свойствами.

✓ Найдена зависимость между ГЛБ неионогенного амфифильного блок-сополимера и его цитотоксичностью. Показана возможность использования этой зависимости для прогнозирования области цитотоксических концентраций блок-сополимеров при их практическом применении.

✓ Разработан новый методический прием определения концентрации водорастворимого амфифильного неионогенного блок-сополимера, оптимальной для подавления лекарственной устойчивости раковых клеток.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования послужили подходы к изучению влияния водорастворимых неионогенных амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки в культуре, а также теоретические и экспериментальные наработки по выяснению взаимосвязи между физико-химическими свойствами, структурой указанных блок-сополимеров и их воздействием на раковые клетки. В работе применялись следующие экспериментальные методы исследований и методики: флуоресцентный анализ, флуоресцентная микроскопия, статическое светорассеяние, радиоавтография, методы работы с клеточными культурами (исследование цитотоксичности амфифильных блок-сополимеров, их влияния на множественную лекарственную устойчивость клеток и др.), а также статистическая обработка результатов.

Положения, выносимые на защиту:

- изучение связи молекулярной структуры и способности к мицеллообразованию широкого круга водорастворимых неионогенных амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ с их токсичностью по отношению к клеткам в культуре;

- исследование связи молекулярного строения неионогенных амфифильных блок-сополимеров и эффекта повышения количества раковых клеток в присутствии указанных блок-сополимеров;

- результаты систематического исследования способности водорастворимых неионогенных амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ подавлять устойчивость раковых клеток к противоопухолевому антибиотику доксорубицину и связь данного эффекта с молекулярной структурой указанных соединений;

- исследование локализации тритий-меченых амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащего ПАВ при их взаимодействии с раковыми клетками.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были доложены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2011» , Москва, Россия; на 76-й Международной научной конференции «Полимеры в медицине», Прага, Чехия, 2012.

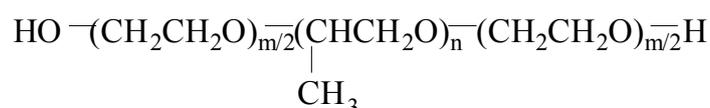
Степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждена публикацией научных результатов диссертационной работы в двух научных статьях, из них 1 статья опубликована в научном журнале из перечня Высшей аттестационной комиссии российских рецензируемых научных журналов, и 1 статья опубликована в рецензируемом научном журнале, индексируемом по базе Web of Science.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

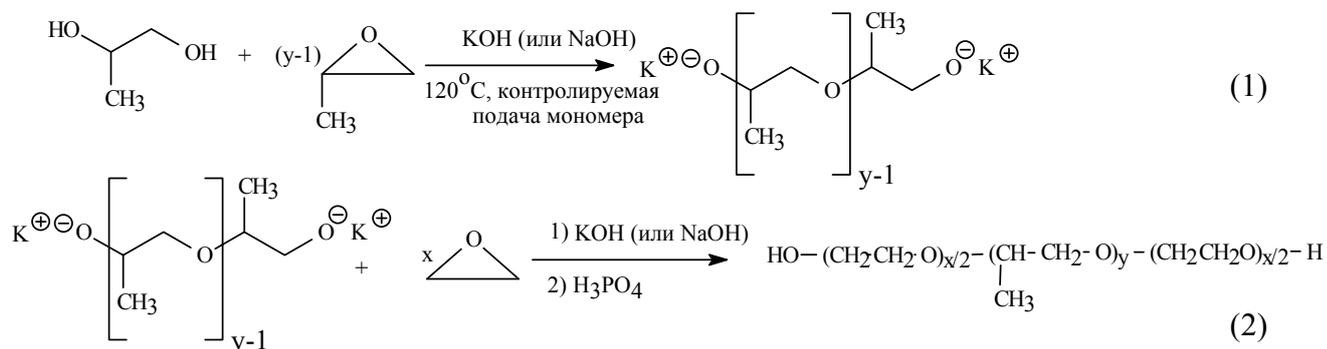
1.1. Синтез и физико-химические свойства амфифильных блок-сополимеров

1.1.1. Плюроники

Тройные блок-сополимеры этиленоксида (ЭО) и пропиленоксида (ПО), известные также под названиями плюроники, проксанолы и полуксамеры, представляют собой симметричные полимеры общей формулы:



Процесс получения плюроников основан на анионной полимеризации и включает два этапа: на первой стадии в присутствии щелочи и пропиленгликоля полимеризуют пропиленоксид (реакция 1), а затем, после исчерпания мономера, к живым цепям полипропиленоксида добавляют этиленоксид, и продолжают полимеризацию (реакция 2). В результате образуются трехблочные полимеры типа АВА [3].



Длина гидрофобного блока полипропиленоксида (ППО) у разных плюроников варьирует от 20 до 70 звеньев, а каждого гидрофильного блока полиэтиленоксида (ПЭО) – от 2 до 150. Коммерческим препаратам плюроников приписывают буквенно-цифровое обозначение (L61, P85, F87 и т.д.), в котором закодирована информация об агрегатном состоянии и составе полимера. Буква в названии плюроников (F, L или P) показывает, являются ли они твердыми хлопьями (Flakes), жидкими (Liquid) или пастообразными (Paste). Первые 1-2 цифры, умноженные на 5, указывают количество звеньев в гидрофобном блоке ППО, а последняя цифра умноженная на 10 - процентное по весу содержание ПЭО в макромолекуле. Название «полуксамеры» было предложено их создателем Ирвингом Шмолкой, который получил патент на эти соединения в 1973. Полуксамеры обозначают буквой «P» (Poloxamer), за которой следуют три цифры. Первые две умноженные на 100 приблизительно соответствуют

молекулярной массе ППО блока, а последняя цифра, так же как в плурониках, умноженная на 10, показывает процентное содержание ПЭО блока. Например, согласно этим обозначениям плуроник L61 = полксамер P181 содержит 30 звеньев пропиленоксида, образующих гидрофобный блок молекулярной массы 1800, и блок ПЭО, масса которого составляет 10% от массы всей макромолекулы.

При сравнении одностипных блочных амфифильных соединений часто используется безразмерная величина, характеризующая гидрофильно-липофильный баланс макромолекулы (ГЛБ). Значение ГЛБ вычисляют по специальным формулам или определяют экспериментально. Например, по формуле Гриффина ГЛБ рассчитывают как отношение молекулярной массы гидрофильного блока, умноженной на 20, к молекулярной массе всего полимера (формула I):

$$\text{ГЛБ} = 20 \times (\text{Мм гидрофильного блока} / \text{Мм макромолекулы}) \quad [4] \quad (\text{I}).$$

Чем больше значение ГЛБ, тем гидрофильнее полимер. Значения ГЛБ одного и того же соединения, определенные разными методами, часто не совпадают. В то же время, величина ГЛБ не зависит от химической природы блоков в составе сополимера.

В очень разбавленных растворах и/или при низкой температуре плуроники существуют в виде неассоциированных молекул, которые представляют собой Гауссовы клубки [5]. По мере увеличения температуры или концентрации полимера в растворе появляются мицеллярные агрегаты, которые находятся в равновесии с единичными молекулами (юнимерами). Внутреннее, гидрофобное ядро таких мицелл состоит из участков полипропиленоксида, а внешняя гидрофильная оболочка – из полиэтиленоксида. В зависимости от структуры полимера, его концентрации в растворе и температуры, могут образовываться сферические или цилиндрические мицеллы, гексагональные или кубические фазы. Размер мицелл плуроников, а значит и число агрегации (количество макромолекул в одной мицелле), сильно зависит от молекулярного веса полимера и температуры. В сферической мицелле число агрегации варьирует от 30 до 100 [6, 7]. Плуроники L121 и P123 вместо мицелл образуют бислойные везикулы, имеющие полости, заполненные водой [8, 9, 10, 11].

Мицеллообразование в водном растворе конкретного плуроника определяется, главным образом, концентрацией полимера и температурой. Концентрация, при которой начинается образование мицелл, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). Это понятие довольно условное, поскольку практически мицеллообразование происходит в интервале (хотя и узком) концентраций. Обычно ККМ определяют, измеряя поверхностное натяжение, светорассеяние растворов полимеров, солюбилизацию красителей в мицеллах и другие методы [12, 13, 14]. Поверхностное натяжение уменьшается с ростом

концентрации ПАВ и достигает предела вблизи ККМ. Интенсивность светорассеяния, как и интенсивность флюоресценции гидрофобных красителей, напротив, увеличиваются при образовании мицелл.

Значения ККМ плуроников варьируют в широком диапазоне от 10^{-7} М до 10^{-4} М в зависимости от структуры молекулы блок-сополимера. ККМ плуроников обычно уменьшаются с ростом степени полимеризации ППО и общей гидрофобности блок-сополимера [15]. Так, например, при близком содержании этиленоксида (~50 звеньев) увеличение количества звеньев пропиленоксида с 40 (P85) до 60 (P105) приводит к уменьшению ККМ на порядок: с 65 мкМ до 6,2 мкМ [16]. В работе Р. Alexandridis с соавт. была обнаружена линейная корреляция с отрицательным наклоном между \lg ККМ и количеством гидрофобных групп ПО в молекуле плуроника [17]. В то же время, влияние гидрофильного фрагмента ПЭО на критические параметры мицеллообразования оказалось менее выражено. При постоянной величине блока ППО увеличение степени полимеризации ЭО приводит к незначительному возрастанию ККМ. Таким образом, именно гидрофобный блок ППО определяет мицеллообразование плуроников в водном растворе. При постоянном соотношении ПО/ЭО увеличение молекулярной массы плуроника приводит к уменьшению ККМ, т.е. блок-сополимеры с большей молекулярной массой в большей степени склонны к образованию мицелл в водных растворах [18, 19].

Способность блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида образовывать мицеллы зависит от количества блоков в молекуле сополимера и их расположения (архитектуры макромолекулы) [20]. Методом малоуглового светорассеяния было показано, что двублочные сополимеры ППО и ПЭО характеризуются значительно меньшим значением ККМ, чем трехблочные плуроники. Интересно, что триблок-сополимеры строения $\text{POm}/2\text{EO}_n\text{POm}/2$ образуют мицеллы при меньшей концентрации, чем сополимеры архитектуры $\text{EO}_n/2\text{POmEO}_n/2$. Этот факт указывает на важность топологии укладки цепей для формирования мицеллярных структур.

Полимерная природа плуроников проявляется ещё в одном существенном свойстве их водных растворов. Несмотря на то, что мицеллы образуются сразу после растворения полимера в воде, в течение приблизительно 30 часов наблюдаются перестройки растворов, сопровождающиеся поглощением тепла [21]. Явление «старения» растворов наблюдалось для плуроников F88 и F87, однако можно предполагать, что аналогичные процессы должны происходить и в растворах других плуроников.

Водные растворы плуроников относятся к системам, характеризующимся нижней критической температурой растворения (НКТР), ниже которой в системе не наблюдается расслоения при любой концентрации полимера. Существование НКТР полиалкиленоксидов

обусловлено образованием водородных связей между полярными эфирными группами –C–O–C и водой, вследствие чего уменьшается энтропия смешения $\Delta S_{см} < 0$. При повышении температуры водородные связи разрушаются, в то время как гидрофобные взаимодействия между метильными группами усиливаются, и в системе происходит фазовое разделение [22]. Мицеллообразование плуроников, а также их поверхностная активность обусловлены разной растворимостью в воде пропиленоксида и этиленоксида. Так, например, НКТР гомополимера ПЭО равна $\sim 100^\circ\text{C}$, а для ППО – эта величина существенно меньше: $+10^\circ\text{C}$ и ниже. При комнатной температуре ППО практически не растворим в воде [23]. Поэтому вода при температуре $20\text{--}40^\circ\text{C}$ является селективным растворителем для плуроников: блоки ПЭО в ней хорошо набухают и растворяются, а блоки ППО, напротив, коллапсируют и стремятся ограничить поверхность контакта с водой. При этом может происходить выделение их в отдельную фазу с образованием мицелл, адсорбция на гидрофобной поверхности или встраивание в гидрофобную микрофазу.

Таблица 1. Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) исследованных соединений по данным литературы

Соединения	ККМ, мкМ (температура определения, °C)
ЭО ₂ ПО ₃₀ ЭО ₂ (L61)	110 [24]
ЭО ₁₃ ПО ₃₀ ЭО ₁₃ (L64)	1379 (35°) и 344 (40°) [18], 480 [24], 5,6 [25]
ЭО ₇₆ ПО ₃₀ ЭО ₇₆ (F68)	480 (370) [24], 1140 (370) [26], 1400 (25°) [27], 8333 (40°) [18], 12000 (370) [28]
ЭО ₃ ПО ₄₀ ЭО ₃ (L81)	23 [24]
ЭО ₂₆ ПО ₄₀ ЭО ₂₆ (P85)	66 (40°) [29], 65 [30], 100 [31], 434 (35°) и 108 (40°) [18], 22 [32], 8,7 [28], 8,1 [25]
ЭО ₆₁ ПО ₄₀ ЭО ₆₁ (F87)	91 [24]
ЭО ₂₀ ПО ₇₀ ЭО ₂₀ (P123)	0,57 (43°) и 1,7 (35°) [33], 2 (35°) [18], 2,5 (25°) [34], 4,4 (37°) [24]
ЭО ₁₀₀ ПО ₆₉ ЭО ₁₀₀ (F127)	635 [35], 555-794 [19, 36], 800 [27], 0,08 и 500 [37], 0,8 [38], 2,8 [39], 4 (42°) [33], 19 (35°) и 6 (40°) [18]
t-Bu-ЭО ₂₄ ПО ₁₉ (REP)	37 [40]
Трет-октил-Ph-ЭО ₁₀ (Triton X-100)	215 [18] и 279 [41].
C ₁₂ H ₂₅ ЭО ₂₄ (Brij 35)	45 (30°) [42], 41-163 (25°) [43.], 85 [44]

Определение ККМ плуроников и других поверхностно-активных соединений описано в работах многих исследователей. В табл. 1 приведены значения ККМ соединений, использованных в настоящей работе. Сравнение данных литературы показывает, что значения

ККМ плуроника P123, определенные разными авторами, совпадают (табл. 1). Аналогичные результаты были получены для Triton X-100. Однако значения ККМ большинства других интересующих нас соединений оказались чрезвычайно разнообразны. Так, описанные в литературе значения ККМ плуроника P85 варьируют от 8,1 [25] до 434 мкМ [18], а плуроника F127 - от 0,08 [37] до 800 мкМ [27]. В статьях даже одних и тех же авторов приводятся различные значения ККМ полимеров, например, ККМ плуроника F68 снижалась со временем с 12000 мкМ в 1995 г. [28] до 1140 в 1998 г. [26] и 480 мкМ в 1999 г. [24] при одной и той же температуре определения (37°C). Значения ККМ для плуроника L64, опубликованные разными авторами, также изменяются в широком диапазоне концентраций – от 5,6 мкМ [25] до 1379 мкМ [18].

В литературе неоднократно поднимался вопрос о причинах варибельности значений ККМ, опубликованных разными авторами [45, 46, 18]. Большую роль в этом вопросе играют температурные условия, при которых проводится определение ККМ. Учитывая физико-химические основы мицеллообразования плуроников, можно ожидать, что дегидратация ЭО-цепей полимера при повышении температуры может снижать свободную энергию мицеллообразования и таким образом приводить к уменьшению ККМ [31, 47].

Формирования мицелл в растворах плуроников не наблюдается вплоть до температуры, называемой критической температурой мицеллообразования – КТМ, которая, также как и ККМ, увеличивается с уменьшением гидрофобности плуроника при фиксированной длине гидрофобного блока. Иными словами, повышение общей гидрофильности блок-сополимера вызывает увеличение КТМ. КТМ зависит от концентрации плуроника, а ККМ – зависит от температуры. Поэтому и ККМ, и КТМ плуроников изменяются в зависимости от состава симбатно: уменьшение ККМ сопровождается уменьшением и КТМ, и наоборот. Критические концентрации мицеллообразования некоторых плуроников в зависимости от температуры приведены в табл. 2. Видно, что при повышении температуры ККМ плуроников падает в разы и даже на порядки (табл. 2).

По всей видимости, это свойство плуроников объясняется зависимостью гидратации гидрофобного блока от температуры. Поскольку с ростом температуры уменьшение гидратации гидрофобного блока происходит постепенно, размеры мицелл и параметры мицеллообразования плавно изменяются с изменением температуры. Зависимость параметров мицеллообразования от температуры обычно не наблюдается в растворах ПАВ, имеющих углеводороды в качестве гидрофобной части, которые практически не гидратируются.

Таблица 2. Критическая концентрация мицеллообразования (мкМ) плюронигов в водной среде в зависимости от температуры раствора [18]

Температура, °С	L64	F68	P85	P123	F127
20	-	-	-	313	3174
25	-	-	8695	52	555
30	5172	-	1956	9	79
35	1379	-	434	2	19
40	344	8333	108	-	6
45	69	3571	30	-	-
50	-	1071	-	-	-
55	-	357	-	-	-

В литературе также неоднократно высказывалось предположение, что значение ККМ зависит от метода его определения [27, 31] вследствие разной чувствительности методик к размерам агрегатов и их концентрации в растворе [18].

Еще одной причиной вариабельности данных по значениям ККМ может быть композиционная неоднородность полимеров, в особенности полученных разными производителями. Теоретические расчеты Р. Linse привели его к выводу, что полидисперсность может быть причиной снижения ККМ полимера на несколько порядков. В то же время гетерогенность состава не оказывает существенного влияния на зависимость величины ККМ от температуры и на число агрегации [48].

Таким образом, в основе процессов агрегации плюронигов лежат гидрофобные взаимодействия, которые усиливаются при повышении температуры раствора, что приводит к снижению наблюдаемых значений ККМ. В литературе изучению мицеллообразования полимеров уделено достаточное внимание. Однако при этом наблюдается разброс данных о ККМ одного и того же полимера. Это может быть следствием ярко выраженной зависимости ККМ от температуры, метода ее определения и композиционной неоднородности состава полимера. Все это в совокупности указывает на целесообразность определения значений ККМ для конкретных полимерных образцов, используемых в данной работе.

1.1.2. Полиглицерины

В последние годы внимание исследователей привлекают высокомолекулярные соединения, имеющие разветвленную структуру. В литературе широко обсуждается возможность применения таких полимеров. Их низкая вязкость в сочетании с высокой плотностью функциональных групп на макромолекуле может быть полезна для использования их в качестве компонентов различных композиционных материалов, в нанотехнологии, а также в медицине – в качестве контейнеров для доставки лекарств [49, 50, 51, 52]. Самым

распространенным классом полимеров, имеющих строго определенный характер разветвлений, являются дендримеры. Однако сложный и многостадийный синтез таких соединений ограничивает их широкое применение. Напротив, синтез полимеров, разветвления в которых имеют случайный характер, достаточно прост, однако широкое молекулярно-массовое распределение (часто $M_w/M_n > 5$) и отсутствие возможности контролировать их структуру также создает трудности для практического использования этих полимеров в упомянутых выше областях.

Была разработана новая концепция получения разветвленных сополимеров, основанная на использовании латентных многофункциональных мономеров, что позволяет контролировать молекулярную массу продукта [51, 53.] В качестве мономера в этом методе часто используется гидроксиметилоксиран (глицидол). Этот коммерчески доступный мономер с высокой реакционной способностью вступает в реакцию полимеризации с раскрытием эпоксидного цикла и образованием простого полиэфира, имеющего разветвленную структуру и содержащего большое количество концевых гидроксильных групп [54, 55]. Гидрофобный блок в этих соединениях - линейный статистический сополимер $\text{PO}_{29}\text{EO}_6\text{NH}_2$, состоящий из 29 звеньев ПО и 6 звеньев ЭО и терминированный аминогруппой (Jeffamine M-2005). Его используют в качестве макроинициатора. При добавлении к нему глицидола образуется двублочный сополимер, содержащий 2 звена глицерина (PG2) (рис. 1). Его молекулярная масса, равная 2267 г/моль, сравнима с молекулярной массой плюроники L61 (табл. 1) [56, 55]. PG2 может быть использован как макроинициатор для получения разветвленных диблок-сополимеров с большим количеством остатков глицерина. Эту реакцию проводят при медленном добавлении избытка глицидола к PG2 в присутствии щелочи. В зависимости от количества глицидола таким путем были получены сополимеры PG30 (рис. 1) и PG76, содержащие 30 и 76 звеньев глицерина, соответственно [57, 58]. Таким образом, у всех синтезированных полимеров - PG2, PG30 и PG76 - одинаковый гидрофобный блок аналогичный таковому у плюроников, тогда как их гидрофильный блок имеет разветвленную структуру, образованную разным количеством звеньев глицерина (рис. 1).

Для получения трехблочного сополимера $(\text{P}(\text{G}2)_2)$ (рис. 1), содержащего два блока полиглицерина (по 2 звена глицерина в каждом), применяют тот же метод, но в качестве центрального гидрофобного блока используют статистический сополимер $\text{H}_2\text{N}-\text{PO}_{29}\text{EO}_6-\text{NH}_2$, терминированный аминогруппами по обоим концам.

Данный метод синтеза позволяет получать сополимеры с узким молекулярно-массовым распределением: параметры полидисперсности полученных препаратов варьировали от 1,2 до 1,4 по данным гель-хроматографии, а выход полимеров составлял 70 - 95% в зависимости от молекулярной массы того или иного сополимера [54, 55].

Структура полученных PG-сополимеров напоминает дендример (рис. 1).

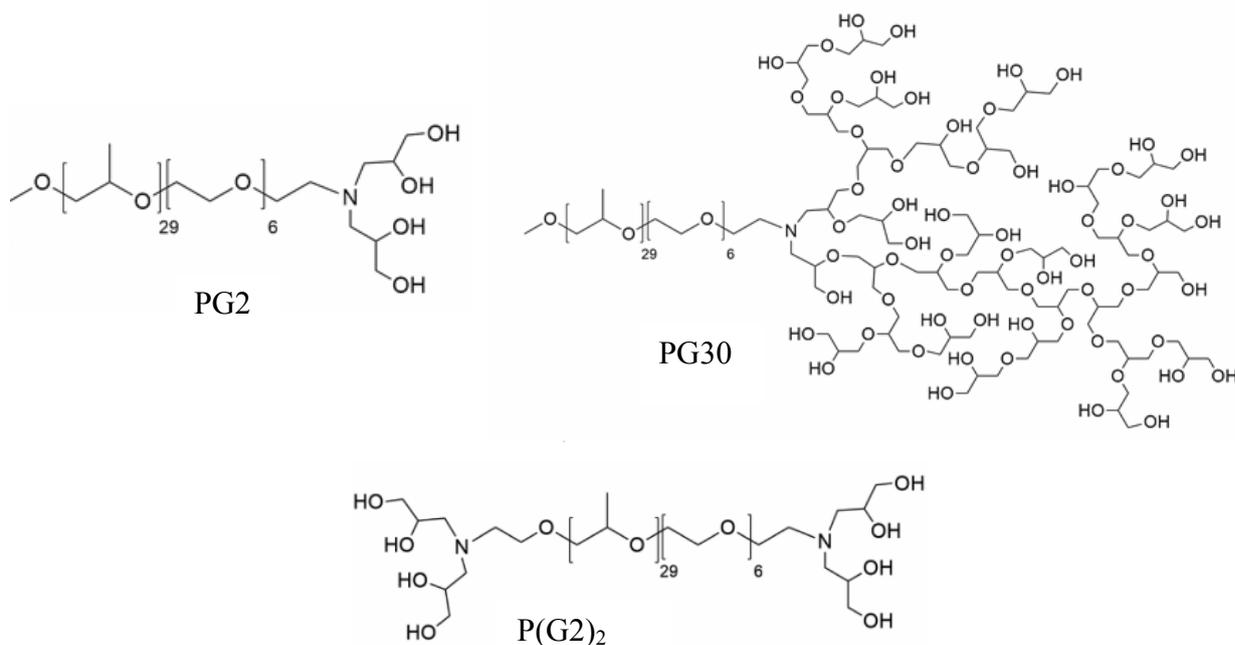


Рис. 1. Структура некоторых сополимеров полиглицерина и $\text{PO}_{29}\text{EO}_6$

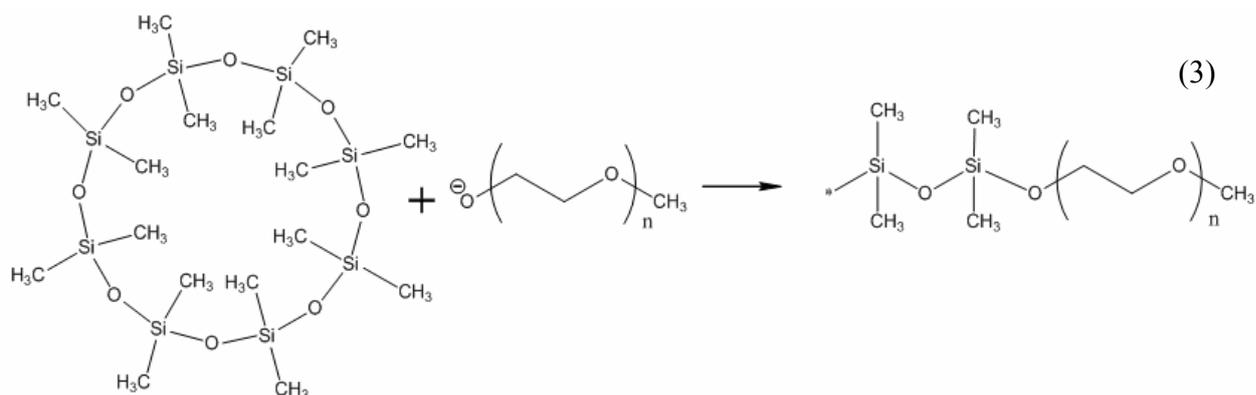
Присутствие гидроксильных групп в гидрофильном блоке - это дополнительная возможность для ее модификации и придания ей новых свойств. Так, гомополимеры глицерина являются полярными соединениями и не растворяются в органических растворителях. Частичная этерификация гидроксильных групп жирными кислотами приводит к тому, что полимер растворяется в толуоле, хлороформе, гексане и т.д. Это позволяет получать макромолекулы с необходимым градиентом гидрофобности. При этом ядро макромолекулы остается полярным. Такой амфифильный полимер можно рассматривать как мономолекулярный контейнер для различных гидрофильных соединений. В литературе обсуждается возможность использования подобных структур для доставки лекарственных препаратов, солюбилизации неорганических ионов в органической среде, а также для создания микрореакторов и катализаторов [59].

Таким образом, все вышеописанные сополимеры глицерина содержат одинаковый гидрофобный блок – статистический сополимер $\text{PO}_{29}\text{EO}_6$, в то время, как количество гидрофильных блоков и в особенности степень их разветвленности различны. Иными словами, сополимеры данной группы характеризуются разнообразной молекулярной архитектурой, главной особенностью которой является наличие разветвленного блока полиглицерина. Показано, что эти полимеры обладают поверхностной активностью, причем критическими параметрами мицеллообразования можно управлять, изменяя степень полимеризации

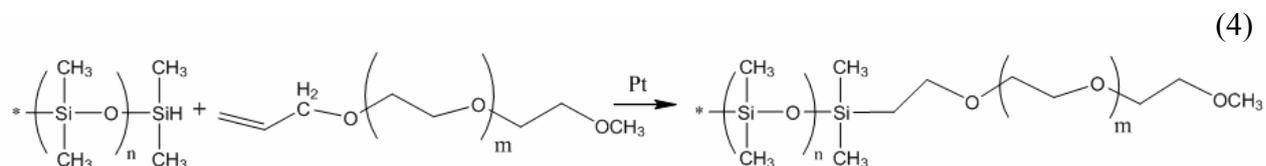
гидрофильного блока. Следует отметить, что ККМ была определена только для наиболее гидрофильного полимера данной группы, содержавшего 76 звеньев глицерина (PG76) [60].

1.1.3. Сополимеры на основе полидиметилсилоксана

Поверхностно-активные вещества на основе полидиметилсилоксана и полиэтиленоксида были впервые синтезированы в 50-х годах из циклического диметилсилоксана (ДМС) и ПЭО (реакция 3) [61]:



Вскоре выяснилось, что связи Si-O-C нестабильны в водной среде, поэтому был предложен иной путь синтеза. Блочные сополимеры стали получать полимеризацией полидиметилсилоксана и ПЭО путем трехстадийного синтеза. На первом этапе осуществляют полимеризацию диметилдихлорсилана в присутствии щелочи с образованием 6 – 8 - членных циклов полидиметилсилоксана (ПДМС). Обработка диметилхлорсиланом разрывает циклическую структуру молекул ПДМС и приводит к образованию полидиметилсилоксана, терминированного силановой группой. Конденсация полученного полимера с аллил-терминированным полиэтиленоксидом (со степенью полимеризации ЭО, равной m) в присутствии платинового катализатора позволяет получить блочный сополимер ПДМС-ПЭО (реакция 4) [62]:



Такие соединения обладают ярко выраженными поверхностно-активными свойствами. Наличие даже небольшого числа (2-3) диметилсилоксановых звеньев в молекуле сополимера придает ему способность адсорбироваться на поверхности раздела вода-воздух. Сополимеры на основе полидиметилсилоксана склонны к образованию мицелл. Однако достоверных данных о ККМ полимеров этого типа в литературе не обнаружено.

Таким образом, анализ литературы показывает, что сополимеры, содержащие в качестве гидрофобного блока полидиметилсилоксан, а в качестве гидрофильного –

полиэтиленоксид, представляют собой амфифильные неионогенные мицеллообразующие соединения, обладающие поверхностно-активными свойствами.

1.1.4. Взаимодействие амфифильных блок-сополимеров с модельными липидными мембранами и особенности структуры клеточных мембран

Поверхностно-активные свойства амфифильных блок-сополимеров обуславливают возможность их взаимодействия с липидной мембраной, образованной двумя слоями липидов, которые ориентированы остатками жирных кислот навстречу друг другу (рис. 2). Бислойная мембрана, построенная из фосфолипидов и стеролов, представляет собой жидкокристаллическую структуру с пространственно разделенными гидрофобной областью остатков жирных кислот (рис. 2, стрелка 1) и областью полярных головок фосфолипидов (рис. 2, стрелка 2).

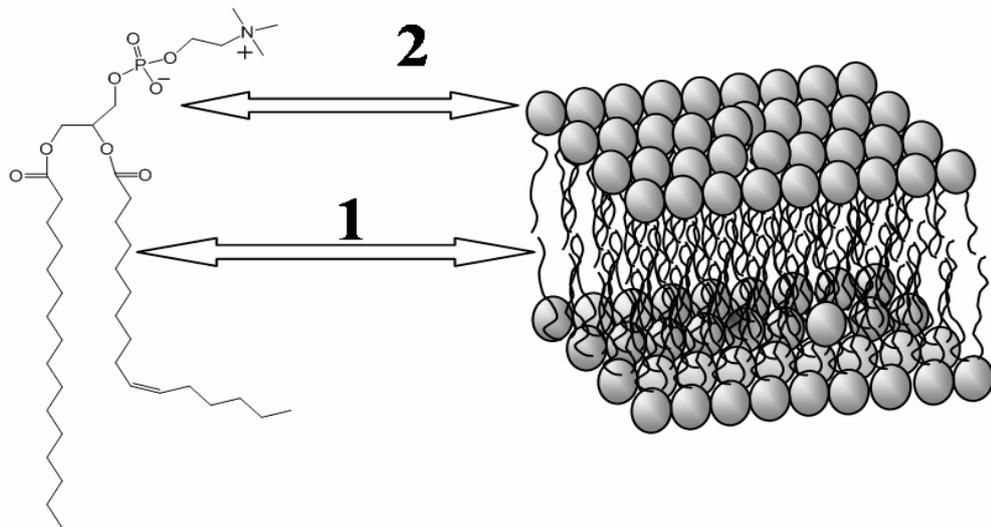


Рис. 2. Структура фосфотидилхолина и схематическое изображение липидного бислоя. Стрелками показаны две области липидного бислоя: 1 – область остатков жирных кислот; 2 – область полярных головок

Толщина такой мембраны составляет около 4 нм [63]. При исследовании взаимодействия плуроников с модельной бислойной мембраной методами дифференциальной сканирующей калориметрии и малоуглового рентгеновского рассеяния было установлено, что ППО блок внедряется в область остатков жирных кислот, а блок ПЭО экспонируется в водную фазу [64]. Дальнейшее уточнение локализации плуроников в липидном бислое было получено в работе Firestone с сотр. с помощью малоуглового рассеяния синхротронного рентгеновского излучения [65]. В этих экспериментах в качестве моделей липидной мембраны были использованы системы с низким содержанием воды. В этих условиях димиристоил-фосфатидилхолин формирует мультислойные структуры с размером гидрофобной области

около 2 нм и расстоянием между ламеллами 5,7 нм. Добавление плуроников с длиной гидрофобного блока, соответствующей толщине мембраны (F68, F88 и F98), вызывало значительное увеличение расстояния между слоями в мультислойной фазе. Плуроники, содержащие короткие цепи пропиленоксида (15 звеньев), не встраивались в бислои и не вызывали никаких изменений в мультислойной структуре. Интересно, что понижение температуры системы ниже температуры фазового перехода в димиристоил-фосфатидилхолине приводило к «выдавливанию» плуроников из бислоя, даже если они были до этого в него встроены. Полученные результаты убедительно свидетельствуют в пользу того, что гидрофобный ППО блок локализуется в гидрофобной области модельной липидной мембраны.

В своей более поздней работе те же авторы показали, что двублочные сополимеры этиленоксида и пропиленоксида более эффективно встраиваются в липидный бислой, чем трехблочные [66]. Этими исследователями было обнаружено, что адсорбция плуроников F127, F108, F87, массовая доля ПЭО в которых составляет 70 - 80%, на малых моноламеллярных липосомах приводит к превращению сферических везикул в бислойные диски. Более гидрофобные плуроники P105 и P85 вызывали уменьшение размеров липосом, не влияя на их форму. Таким образом, влияние плуроников на свойства липосом сильно зависит от структуры полимера. Состав мембраны также имеет существенное значение: добавление в липидную мембрану холестерина приводило к тому, что везикулы практически не изменялись в присутствии плуроников.

Измеряя размер липосом при добавлении плуроников, Jamshaid с соавт. [67] и Kostarelos и Tadros с соавт. [68, 69] рассчитали, что максимальное количество полимера, способное связаться с липидным бислоем, составляет около 1 макромолекулы плуроника на 10-20 молекул липида.

Теоретические исследования взаимодействия амфифильных полимеров с мембранами предсказывают, что встраивание полимера может приводить к изменениям в структуре бислоя. Используя скейлинговый подход, R. Lipowsky рассчитал, что при этом могут образовываться выпуклости на поверхности бислоя [70] (рис. 3). Характер этих изменений определяется свойствами полимерной цепи. Встраивание в липидную мембрану блок-сополимера, гидрофобный блок которого гораздо меньше гидрофильного, приводит к тому, что последний стремится «отдалиться» от поверхности мембраны, образуя выпуклость (положительная кривизна - рис. 3, А). Это объясняется тем, что для гидрофильного блока, закоренного вблизи плоской поверхности, недоступна часть пространства, ограниченного мембраной. Поэтому для минимизации энтропийных потерь система стремится к формированию выпячиваний на поверхности бислоя. По расчетам Kim и Sung, сополимер, состоящий из небольшого

гидрофильного и более протяженного гидрофобного блока, способного к многоточечным взаимодействиям с мембраной, может образовывать вогнутость (отрицательная кривизна - рис. 3, Б). Движущей силой этого процесса является стремление системы к повышению конформационной энтропии гидрофобного блока. Поэтому заглубленный в мембрану гидрофобный блок стремится приобрести наиболее развернутую конформацию, что приводит к формированию углублений в липидном бислое. Выраженность эффекта пропорциональна размерам молекулы полимера и его концентрации.

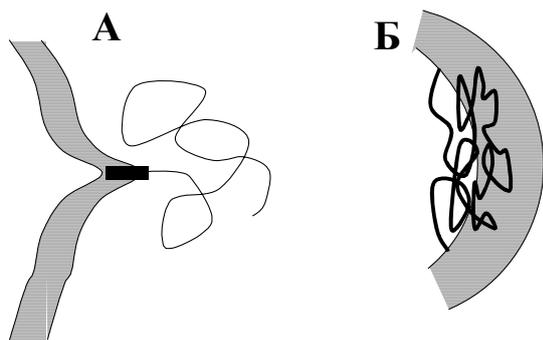


Рис. 3. Взаимодействие амфифильных полимеров с мембраной либо за счет одного гидрофобного радикала, присоединенного к длинному гидрофильному блоку (А), либо посредством образования множества гидрофобных контактов с бислоем (Б). В первом случае теория предсказывает образование области с положительной, а во втором – с отрицательной кривизной (по данным [70, 71])

Наличие областей с отрицательной кривизной показано экспериментально в природных мембранах. Обычно их образование обусловлено локальным повышением содержания холестерина. Он встраивается в свободное пространство в области остатков жирных кислот, локально увеличивая микровязкость бислоя и его устойчивость к действию детергентов. Такие домены (или «плоты», как их называют в англоязычной литературе) составляют основной липидный матрикс углублений в наружной клеточной мембране, известных под названием кавеол. В отличие от искусственно получаемых липидных бислоев, мембрана клеток содержит белки, встроенные в липидный каркас (рис. 4). При этом именно в кавеолах локализуется значительное количество важных в регуляторном отношении белков, таких как Т-клеточные рецепторы [72], некоторые онкобелки (например, *ras* [73] и *src* [74]) и белки-переносчики (такие как Р-гликопротеин [75]).

Еще одной особенностью строения природных мембран является неравномерное асимметричное распределение липидов по слоям. Так, например, в плазматической мембране большинства животных клеток на внутреннем цитоплазматическом монослое локализуются фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин, тогда как внешний монослой обогащен фосфатидилхолином и сфингомиелином [76, 77]. Перемещение липидов по градиенту концентрации из одного монослоя в другой (флип-флоп) затруднено высокими энергозатратами на перенос полярной головки липида через гидрофобную область мембраны. Поэтому скорость флип-флопа в клеточных мембранах в норме на 8-10 порядков меньше скорости латеральной диффузии липидов в пределах своего монослоя.

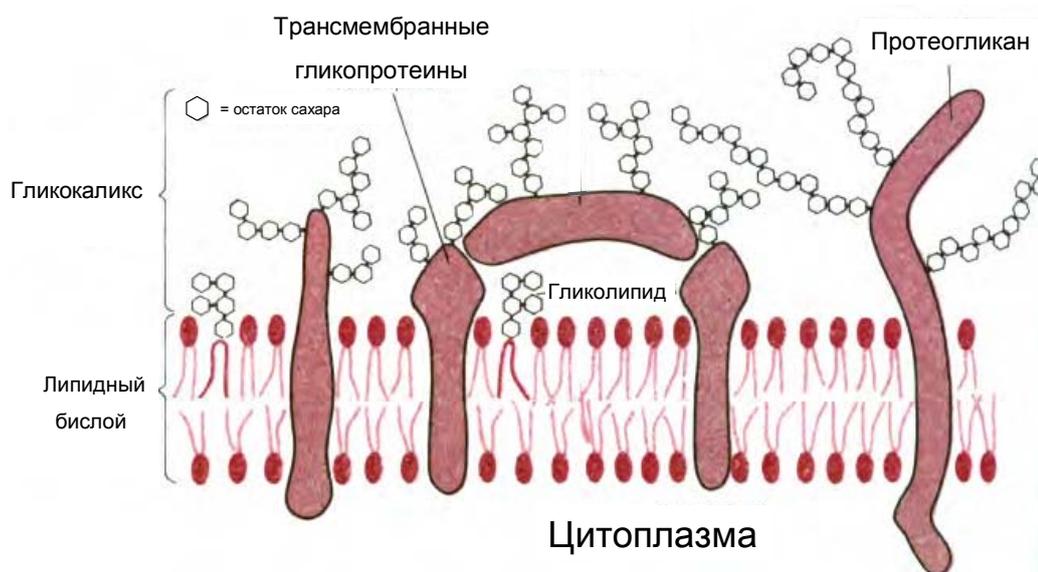


Рис. 4. Строение природной клеточной мембраны

Ускорение флип-флопа липидов в клеточной мембране часто приводит к нарушениям метаболизма. Так, например, перемещение фосфатидилсерина из цитоплазматического на внешний монослой мембраны предшествует понижению трансмембранного потенциала митохондрий - начальной стадии клеточной гибели (апоптоза) [78]. В эритроцитах такой сигнал приводит к изменению их сферической формы в дискообразную [79], а в тромбоцитах инициирует каскад свертывания крови и поглощение клетки макрофагами [80]. Поэтому поддержание трансмембранной асимметрии липидов имеет большое значение для нормального функционирования клеток. Асимметричное распределение липидов в клеточных мембранах поддерживается АТФ-зависимыми ферментами транслоказами, транспортирующими липиды из одного слоя мембраны в другой против градиента их концентрации. Этот перенос осуществляется за счет энергии гидролиза АТФ [81].

Характерной чертой природных мембран является также наличие углеводов на поверхности всех эукариотических клеток. Они представлены в виде боковых олигосахаридных цепей, ковалентно присоединенных к липидам мембраны (гликолипиды) и белкам (гликопротеины) (рис. 4). В частности, к таким белкам относится и Р-гликопротеин. Подавляющая часть белков наружной клеточной мембраны связана с олигосахаридами. В то же время только 10% липидов содержат углеводный блок. Кроме того, молекула белка может иметь несколько олигосахаридных цепей, а молекула липида только одну. Таким образом, большая часть углеводов на поверхности клеточной мембраны связана с белками. Обычно углеводные цепи состоят из 5 - 15 остатков сахара. Из 100 существующих в природе различных моносахаридов, в мембранных гликолипидах и гликопротеинах встречаются только девять, чаще всего глюкоза, манноза, фукоза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин и сиаловая кислота. Остатки сиаловой кислоты находятся обычно на свободном конце

углеводной цепи, и в основном именно они создают общий отрицательный заряд клеточной поверхности, характерный для эукариотических клеток. Все углеводные цепи в наружной клеточной мембране выступают на внешнюю поверхность клетки, где эти линейные и разветвленные полисахариды образуют сеть - гликокаликс (*glykys* = сладкая, *kalyx* = оболочка) (рис. 5) [82]. Как правило, толщина гликокаликса соизмерима с толщиной липидного бислоя (рис. 4). В целом содержание углеводов в гликокаликсе разных типов клеток составляет 2 - 10% от массы наружной мембраны.



Рис. 5. Электронная микрофотография лимфоцита с окрашенным гликокаликсом [83]

Вопрос о возможном взаимодействии амфифильных незаряженных блок-сополимеров с гликокаликсом в литературе не обсуждался. Но известно, что такие синтетические полимеры реагируют с живыми клетками, о чем свидетельствуют вызываемые ими биологические эффекты, описанные ниже.

1.2. Множественная лекарственная устойчивость раковых клеток и ее преодоление с помощью плуроников

Важнейшей проблемой химиотерапии рака является появление опухолей, устойчивых к терапевтическим дозам структурно и функционально несхожих лекарств, ранее успешно применявшихся для лечения больного [84]. Устойчивость ко многим противоопухолевым препаратам (множественная лекарственная устойчивость, МЛУ) возникает почти в 50% клинических случаев в течение 5 лет после лечения. Причина появления МЛУ-клеток не установлена, но некоторые факты указывают на возможность их возникновения вследствие интенсивной химиотерапии. Субпопуляции опухолевых клеток с МЛУ-фенотипом существенно отличаются от исходных, так называемых чувствительных, клеток по морфологическим и биохимическим признакам (строению клеточной мембраны, активности ферментативных систем, интенсивности эндо- и экзоцитоза и т.д.), пониженном уровне

накопления лекарственных соединений в клетке при химиотерапии опухоли [85, 86, 87, 88, 89]. Исследованиями последних лет было доказано, что этот эффект во многих случаях обусловлен гиперэкспрессией в клетках гена MDR1, кодирующего гликопротеин с молекулярной массой ~170 кДа, получивший название Р-гликопротеина (P-glycoprotein, P-gp) [90, 91, 92]. P-gp является интегральным белком клеточной мембраны и функционирует как трансмембранный АТФ-зависимый молекулярный «насос», осуществляя выброс из клетки различных чужеродных соединений, в том числе лекарств, еще до проявления ими фармакологического действия [93, 94]. Следует отметить, что экспрессия P-gp не является отличительной чертой только опухолевых клеток. Этот белок присутствует и в некоторых нормальных тканях (почечный и кишечный эпителий, гематоэнцефалический барьер), где он выполняет экскреторные функции, удаляя из организма ксенобиотики, в частности мутагены и токсины [95, 96].

Сразу же после открытия раковых клеток, устойчивых к лекарствам, начался поиск соединений, способных подавлять такую устойчивость. Оказалось, что наиболее эффективны в этом отношении вещества, сами являющиеся субстратами P-gp, но обладающие меньшей токсичностью, чем противоопухолевые препараты. Такими соединениями оказались верапамил и трифторпиразин. Ингибирующим действием обладают также хорошо известный иммунодепрессант циклоспорин А и антагонист эстрогена тамоксифен [97, 98, 99]. Большинство противоопухолевых препаратов, подавляющих МЛУ, либо непосредственно связывается с P-gp, ингибируя его активность, либо опосредованно действует на механизмы клеточной регуляции [87, 88, 89]. Однако, несмотря на определенные достижения в подавлении МЛУ с помощью вышеописанных ингибиторов P-gp, их использование в химиотерапевтической практике ограничено их сильной токсичностью. Поэтому поиск новых менее токсичных ингибиторов МЛУ остается актуальной задачей.

1.2.1. Влияние плуроников на устойчивость раковых клеток к лекарствам

В 1992 г. на конференции Американского Общества по изучению рака М. Page с соавт. сообщили, что устойчивость МЛУ-клеток в культуре к противоопухолевому антибиотику доксорубину (DOX) резко снижается, если лекарство добавлять в смеси с плуроником P85 [100]. Открытие М. Page подтвердилось во всех последующих работах других авторов, которые показали в экспериментах на различных линиях клеток, что токсичность противоопухолевых препаратов для МЛУ-клеток значительно возрастает в присутствии плуроников [101, 102, 103, 104, 105]. В результате МЛУ-клетки начинают гибнуть при

концентрациях доксорубина (DOX) на два-три порядка ниже, чем в отсутствие плуроников [101, 102, 105].

Как показано Рапорт с соавт., использование композиций на основе плуроника P105 и DOX в комбинации с воздействием на раковые клетки фокусированного ультразвука позволило значительно усилить противоопухолевую активность антибиотика [106, 107]. Показано, что плуроник способствует проникновению антибиотика в ядра опухолевых клеток [106]. При этом аккумулялированный в клеточном ядре DOX и ультразвук действуют симбатно, способствуя разрушению ДНК.

Способность плуроников подавлять устойчивость раковых опухолей к лекарствам подтвердилась в экспериментах *in vivo* [105, 108]. На мышах с привитой миеломой SP2/0 было обнаружено, что при введении антрациклиновых антибиотиков (доксорубина, эпирубина или дауномицина) в растворе плуроника их терапевтический эффект усиливается по сравнению с инъекциями препарата в физиологическом растворе. При лечении антибиотиками в растворе плуроника снижалась общая токсичность препаратов, уменьшался размер опухоли, и увеличивалась продолжительность жизни экспериментальных животных. При этом наблюдали накопление полимеров в опухоли и вызываемое ими перераспределение антибиотика из печени в опухоль [108]. Плуроники стимулируют накопление лекарства и в нормальных тканях, если в них есть P-gr. При внутривенном введении плуроника P85 мышам увеличивалась проницаемость гематоэнцефалического барьера до уровня сопоставимого с таковым у мутантных животных с удаленным геном MDR1 в отсутствие плуроника. Этим, очевидно, объясняется успешное использование плуроника P85 для доставки нейролептиков из кровотока в мозг через гематоэнцефалический барьер. При введении крысам галоперидола в 1% растворе полимера эффективность действия лекарства повышалась в несколько раз по сравнению с препаратом, не содержащим полимера [109].

Интересно, что некоторые полиоксиэтилен-содержащие ПАВ так же, как плуроники, способствуют аккумуляции лекарств внутри клеток. Так, накопление эпирубина в клетках колоректальной аденокарциномы человека увеличивалось после их предварительной инкубации с Span 80, Brij 30, Tween 20, Tween 80, Mucj 52, гидрофильная часть которых представлена ПЭО, а гидрофобная - остатком жирной кислоты или спирта [110].

Можно было предположить, что плуроники и ПАВ изменяют свойства клеточной мембраны, увеличивают ее проницаемость для лекарства и таким образом стимулируют его накопление в клетках. Однако этому предположению противоречили два факта. Во-первых, те же поверхностно-активные соединения практически не влияли на аккумуляцию антибиотиков в чувствительных клетках, лишенных P-gr [101]. Во-вторых, Ло установил, что исследованные им ПАВ увеличивали внутриклеточное накопление эпирубина, подавляя его выброс из

клеток. Это наблюдение позволило заключить, что такие соединения ингибируют P-гр [110]. Этот вывод подтвердили результаты исследования клеток, содержащих P-гр, а именно, клеток почечного эпителия свиньи, трансфицированных геном MDR1 (линия LLC-PK), и клеток гематоэнцефалического барьера [111]. В присутствии плуроника P85 в этих клетках наблюдали аккумуляцию модельных субстратов P-гр - дигоксина и родамина 123. В то же время полимер не влиял на внутриклеточное накопление родамина 110 и маннитола, которые не являются субстратами P-гр. Ингибирование активности P-гр наблюдали в присутствии некоторых других ПАВ, содержащих этиленоксид. В работе [112] авторы продемонстрировали подавление МЛУ опухолевых клеток полиэтиленгликолем, модифицированным по концам жирными кислотами. При этом происходило ингибирование взаимодействия P-гр с субстратом – азидопином. Аналогичные результаты были получены для другого неионного ПАВ – Triton X-100 [113].

Таким образом, к настоящему времени установлено, что действие плуроников на МЛУ не связано с их способностью увеличивать проницаемость плазматической мембраны и облегчать проникновение лекарства внутрь клетки, а обусловлено ингибированием активного выброса лекарства, регулируемого P-гликопротеином, и, как следствие, накоплением антибиотика внутри раковой клетки до концентрации достаточной для ее гибели.

Эффективность подавления МЛУ зависит от уровня устойчивости клеток к лекарству. Более устойчивые клетки более чувствительны к ингибиторам МЛУ. Сравнение влияния P85 на синтез АТФ в чувствительных и устойчивых клетках показало, что чем больше P-гр экспрессируется в клетках, тем меньше нужно полимера для снижения уровня АТФ на 50% [114]. Это наблюдение подтвердилось при исследовании относительного содержания P-гр в трех линиях резистентных клеток и влияния верапамила - ингибитора P-гр, плуроника L61 и полиглицеринов PG2 и PG30 на МЛУ. Чем больше P-гр содержалось в клетках, тем заметнее был эффект верапамила и полимеров. При увеличении содержания P-гр в 100 раз подавление устойчивости верапамилем возрастало с 20% до 95%, а полимерами - от 40 до 97% [115].

Для поиска блок-сополимеров, наиболее эффективно подавляющих МЛУ, большое значение имеет изучение взаимосвязи между структурой действующего соединения и их влиянием на устойчивые клетки.

Сравнение плуроников различного состава показало, что степень вызываемого ими подавления МЛУ зависит от гидрофильно-липофильного баланса и длины гидрофобного блока ППО [24, 116]. Максимальный эффект оказывали плуроники L64, P85 и P105 со средними значениями ГЛБ (15-16), соответствующими относительно короткому блоку ПЭО (30-56 звеньев) и средней длине гидрофобных блоков ППО (30-60 звеньев). Гидрофильные плуроники, массовая доля ПЭО в которых составляет 70 - 80%, а ГЛБ = 20-29, практически не

вливали на устойчивость клеток, как например, плуроник F68 в диапазоне концентраций от 0,001 до 20 мМ [116]. Интересно, что связь между ГЛБ и влиянием на МЛЮ свойственна и неионогенным ПАВ, содержащим углеводородную цепь в качестве гидрофобного блока. Эксперименты *in vitro* показали, что ПАВ со средними значениями ГЛБ = 10-17 (Tween 20, Tween 80, Murgj 52 и Brij 30) наиболее эффективно подавляли МЛЮ и стимулировали накопление лекарства в клетках [117]. Закономерность, обнаруженная на клетках в культуре, проявилась и в экспериментах на мышах. При тестировании серии плуроников с различной гидрофобностью – F108, P85, L61 - наиболее эффективными оказались композиции на основе более гидрофобных плуроников P85 и L61 [108].

На основании проведенных исследований разработана новая лекарственная форма SP1049C, в состав которой входят плуроники L61 (0,25%) и F127 (2%) и доксорубин в 0,9% NaCl. В 2011 г. она успешно прошла вторую фазу клинических испытаний по лечению пациентов с раком пищевода [2].

Известно, что гидрофильные блок-сополимеры F127 и F68 признаны Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) малоэффективными в подавлении МЛЮ [118]. Однако в последнее время в литературе стали появляться работы, демонстрирующие влияние этих плуроников на активность P-gr. В смеси с другими плурониками они способны увеличивать поглощение лекарств клетками [119]. Так, например, максимальное накопление таких цитостатиков, как доксорубин и паклитаксел, а также хорошо известных субстратов P-gr – родамина 123 и родамина 6G в резистентных клетках линии MCF7/R (resistant, R) наблюдалось в присутствии смеси плуроников F127 и P123. Наибольший эффект достигался при концентрации смеси 0,01%, что близко к ее ККМ (0,0059%) [120]. Однако при концентрации смеси выше ККМ (> 0,1%) аккумуляция тестируемых веществ в клетках резко снижалась. Представлялось маловероятным, чтобы уменьшение внутриклеточного накопления цитостатиков было связано с ослаблением ингибирующего воздействия юнимеров, концентрация которых при этом постоянна. Поэтому авторы предположили, что при концентрациях полимеров выше ККМ происходит солубилизация в полимерных мицеллах лекарств и субстратов P-gr, уменьшение их концентрации в растворе и вследствие этого снижение их аккумуляции в клетках [121].

Аналогичные результаты получены и в других недавних работах [122, 123, 124]. Так, о способности гидрофильных плуроников влиять на активность P-gr сообщают авторы работы [124]. Было обнаружено, что в присутствии 0,1% масс. плуроников F68, F87 и F127 повышалась аккумуляция доксорубина в клетках карциномы толстого кишечника человека линии Caco-2 до уровня, сопоставимого с действием хорошо известного ингибитора P-gr – верапамила. При дальнейшем повышении концентрации плуроников до 1% масс.

наблюдалось снижение накопления доксорубина, что авторы, как указывалось выше, связывают с уменьшением эффективной концентрации лекарства в силу его проникновения в мицеллы полимеров. На той же клеточной линии было продемонстрировано ингибирование выброса целипролола Р-гликопротеином в присутствии плуроника F68 [125]. Таким образом, показано, что даже гидрофильные плуроники, с величиной ГЛБ выше 20, способны ингибировать Р-гр. Помимо этого, в литературе есть сведения о том, что в зависимости от природы субстрата плуроники этой группы по-разному влияют на активность Р-гр. Так, например, плуроник F127 не влиял на связывание нелфинавира с Р-гр, но эффективно препятствовал взаимодействию белка с верапамилом [126]. Эти результаты указывают на то, что различные субстраты могут взаимодействовать с разными участками молекулы Р-гр, что подтверждается в работе [127]. Таким образом, действие гидрофильных плуроников на активность Р-гр неоднозначна и требует дополнительного изучения.

При исследовании зависимости эффекта полимера от его концентрации было обнаружено, что противоопухолевая активность лекарств в присутствии плуроников увеличивается пропорционально концентрации полимера вплоть до ККМ, после чего не меняется или даже несколько уменьшается [24, 101, 102, 128]. Следовательно, подавление устойчивости опухолевых клеток обусловлено действием отдельных молекул плуроников – юнимеров, а не образованных ими мицелл.

1.2.2. Предполагаемые механизмы подавления активности Р-гликопротеина плурониками

Первооткрыватели хемосенсибилизирующих свойств плуроников предположили, что плуроник P85 подавлял МЛУ путем непосредственного специфического взаимодействия с Р-гр [129]. Эту гипотезу поддерживали и другие исследователи [112, 113]. В пользу этого предположения выдвигается тот факт, что плуроники увеличивают внутриклеточную концентрацию лекарств в клетках, экспрессирующих Р-гр, но не влияют на чувствительные клетки, в которых Р-гр нет [101]. Ранее в нашей лаборатории была предпринята попытка выявить прямое взаимодействие амфифильного блок-сополимера с Р-гр. Для этого был использован сополимер ППО и ПЭО (PEP), меченный тритием и конъюгированный с фотоактивируемой меткой - пара-1-трифторметилдиазиририл-бензойной кислотой, содержащей высоко реактивную диазириновую группировку, способную при облучении генерировать карбен, реагирующий с любым веществом в ближайшем окружении. После инкубации конъюгата с МЛУ-клетками линии MCF7/R выделяли белковую фракцию и разделяли белки методом SDS-электрофореза. Анализ распределения радиоактивности вдоль дорожки геля не выявил преимущественного связывания полимера с каким-либо белком, в

частности, с Р-гр [130]. Этот результат подтверждают данные литературы о том, что при физиологических условиях плюроники не взаимодействуют с белками, во всяком случае, с водорастворимыми. Так, методами гель-проникающей хроматографии, ультрацентрифугирования и спектроскопии кругового дихроизма было показано, что при 20-40°C и нормальном атмосферном давлении такие белки, как бычий сывороточный альбумин, α -химотрипсин и фитогемаглютинин не образуют комплексов с плюрониками, и полимеры не оказывают влияния на структуру белков. Такие результаты были получены для целого ряда плюроников в большом диапазоне концентраций [131]. Таким образом, прямого экспериментального подтверждения взаимодействия амфифильных полимеров с Р-гликопротеином нет.

В настоящее время в литературе обсуждаются две основные гипотезы воздействия плюроников на активность Р-гр. (1) Согласно одной из них, плюроники проникают внутрь клеток, связываются с митохондриями и, разобщая окислительное фосфорилирование, снижают содержание АТФ в клетке, что и приводит к уменьшению активности Р-гр [132]. (2) Вторая гипотеза предполагает, что понижение активности Р-гр инициируется внедрением плюроников в наружную мембрану клеток и нарушением ее структуры: разжижением липидного бислоя, ускорением флип-флопа липидов и др. Ниже подробно рассмотрен каждый из этих предполагаемых механизмов действия плюроников на активность Р-гр.

1. Механизм действия плюроников на МЛЮ, предложенный А.В. Кабановым с соавт., основан на трех экспериментально установленных фактах: проникновении плюроников, меченных флуоресцеином, внутрь клетки, уменьшении мембранного потенциала митохондрий и снижении уровня АТФ в клетках.

Проникновение полимеров внутрь клеток было показано для плюроников, обладающих средней гидрофобностью (ГЛБ < 20). На первичной культуре эндотелиальных клеток мозга быка, выполняющих роль гематоэнцефалического барьера, было обнаружено, что плюроники с массовой долей ПЭО-блока, равной 10-50% (Р85, L64, P105, L81, L35 и L43), меченные флуоресцеином, проникают в цитоплазму и накапливаются в клеточных органеллах и даже ядрах [116]. В этих экспериментах были получены убедительные фотографии полного совпадения флуоресценции меченого плюроника Р85 и маркера митохондрий, что не оставляет сомнений в связывании меченого полимера преимущественно с митохондриями [133, 134]. Также показано проникновение плюроников Р123 и F127, меченных родамином В, в клетки и их аккумуляция в митохондриях [120]. При температуре 37°C транслокация плюроника L64, меченого родамином, происходила довольно быстро – уже через пять минут после добавления полимера появлялась флуоресценция внутри клеток, которая с течением времени только возрастала. Однако при 4°C ни взаимодействия с клеточной мембраной, ни

попадания плуроника внутрь клетки не наблюдалось. Эти результаты свидетельствовали о том, что плуроник попадает внутрь клеток путем эндоцитоза [135]. Причем, юнимеры и мицеллы плуроников эндоцитируются различными путями. Юнимеры попадают в клетку в результате захвата в кавеолы. Так, на примере плуроника P85, меченного флюоресцеином, было показано, что эндоцитоз юнимеров происходит сравнительно быстро: флюоресценция в цитоплазме появляется уже через 15 минут после начала инкубации [134]. В то же время мицеллы проникают внутрь в результате более медленного процесса - путем захвата в мембранные везикулы, окаймленные сетью белка клатрина [136, 137].

Взаимодействие плуроников с клетками приводит к уменьшению мембранного потенциала митохондрий. Этот эффект наблюдали несколько разных групп исследователей [134, 138, 139, 140]. Например, плуроник L61 вызывал существенное понижение трансмембранного потенциала митохондрий в клетках аденокарциномы человека линий HeLa и A549 [140]. По данным М. Redhead с соавт., плуроники L62, L31, P85, F68, P105, добавленные к клеткам линии Сасо-2, снижали трансмембранный потенциал митохондрий в разной степени и независимо от состава полимера. Интересно, что по данным этих авторов гидрофобный плуроник L121 не влиял на этот параметр, а наиболее сильный эффект вызывал 0,3 мМ F68, который в этой концентрации не влияет на МЛУ. Авторы объясняют это тем, что гидрофобные полимеры с высоким сродством к липидам наружной плазматической мембраны остаются в ней и не оказывают существенного влияния на мембранный потенциал митохондрий [139].

На выделенных митохондриях показано, что плуроник P85 ингибирует белковые комплексы I и IV дыхательной цепи, что приводит к разобщению окислительного фосфорилирования [134]. Этот эффект аналогичен действию ПАВ, например, таких, как Triton X-100 [141].

Взаимодействие плуроника с митохондриями, сопровождаемое уменьшением их мембранного потенциала и ингибированием окислительного фосфорилирования, должно приводить к снижению количества АТФ в клетках. Действительно, на эпителиальных клетках мозга линии ВВМЕС было продемонстрировано, что в присутствии плуроников происходит значительное снижение уровня АТФ. Причем вытекания АТФ из клетки во внешнюю среду не наблюдалось [133]. Инкубация клеток с различными дозами плуроника P85 приводила к временному обеднению клетки энергией, уровень которой восстанавливался после удаления полимера из среды. Сравнение влияния плуроника P85 на уровень АТФ в клетках MCF7/R, содержащих Р-гр, и не экспрессирующих этот белок (клетки MCF7), показало, что MCF7/R клетки гораздо более чувствительны к действию плуроника. Для 50%-ного снижения уровня АТФ в этих клетках достаточной оказалась 0,009% концентрация плуроника P85. Тогда как

для достижения такого же эффекта в чувствительных клетках MCF7 было необходимо увеличить концентрацию плуроника в 250 раз до 2,25% [142, 143]. Снижение внутриклеточного содержания АТФ вызывают также и другие амфифильные неионогенные блочные соединения, такие как Cremophor EL, Solutol HS15, Tween 40, Triton X-100 [144].

Известно, что для функционирования Р-gp необходим высокий уровень АТФ в клетке, поскольку на выброс каждой молекулы ксенобиотика расходуется 2 молекулы АТФ. Поэтому уменьшение внутриклеточной концентрации АТФ, вызванное плурониками, может быть основной причиной снижения активности Р-gp и подавления МЛУ обусловленной гиперэкспрессией этого белка [133, 118].

Изложенный механизм действия плуроников оставляет некоторые вопросы. Дело в том, что исходное положение о проникновении плуроников внутрь клеток основано на исследовании полимеров, конъюгированных с флуоресцеином или родамином (рис. 6).

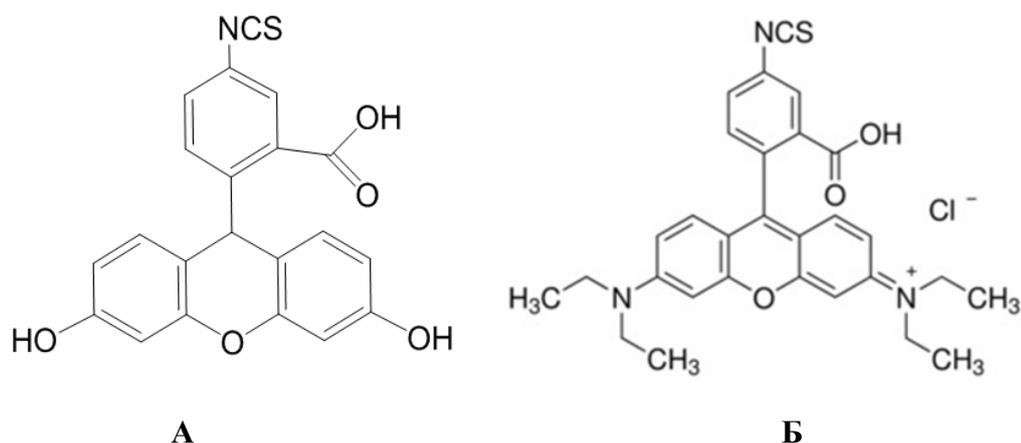


Рис. 6. Структурные формулы изотиоцианата флуоресцеина (А) и родамина В (Б)

Между тем в нашей лаборатории было показано, что присоединение флуоресцеина к плуронику L61 и двублочному сополимеру ПЭО и ППО (РЕР) существенным образом влияет на физико-химические свойства полимеров: изменяет растворимость в воде, коэффициент распределения в системе вода/гексан, увеличивает размер ассоциатов, образуемых полимерами [145]. Кроме того, флуоресцеин (рис. 6, А) содержит ионогенные группы – карбоксильную ($pK_a \approx 4$) и гидроксильные ($pK_a \approx 6,5$) [146]. Поэтому он способен связываться с митохондриальными белками - переносчиками отрицательно заряженных кислот, таких как, например, α -кетоглутарат, глутамат, аспартат [147] и транспортироваться в митохондрии по градиенту рН. При этом он не разобщает окислительное фосфорилирование, но аккумулируется в митохондриях [148, 149]. Эти свойства также характерны для родамина В (рис. 6, Б), который используется как сильный митохондриальный вектор, способный переносить в митохондрии ковалентно присоединенные к нему вещества [150]. Поэтому

нельзя исключить, что проникновение плуроников внутрь клеток и их транслокация в митохондрии была обусловлена влиянием ковалентно присоединенных флюорофоров.

2. Вторая гипотеза базируется прежде всего на огромном количестве исследований взаимодействия плуроников с искусственными липидными бислоями: плоскими мембранами и липосомами [151, 152, 153, 154]. Результаты этих работ демонстрируют способность плуроников связываться с липидами бислоевой мембраны. Об этом свидетельствуют вызываемые ими изменения в структуре бислоя [65, 155] и его свойствах: увеличение ионофорной активности [156], проницаемости липосом для доксорубина и ускорение флип-флопа липидов (перемешивание компонентов двух слоев мембраны) [56]. Эти эффекты зависят от природы гидрофобного блока и его размера. Ускорение флип-флопа липидов в липосомах (β_{f-f}) возрастает с увеличением гидрофобности полимера ($\text{Log}P_{\text{вода-гексан}}$) и объема его гидрофобного блока ($V_{\text{гидрофобный блок}}$) (рис. 7).

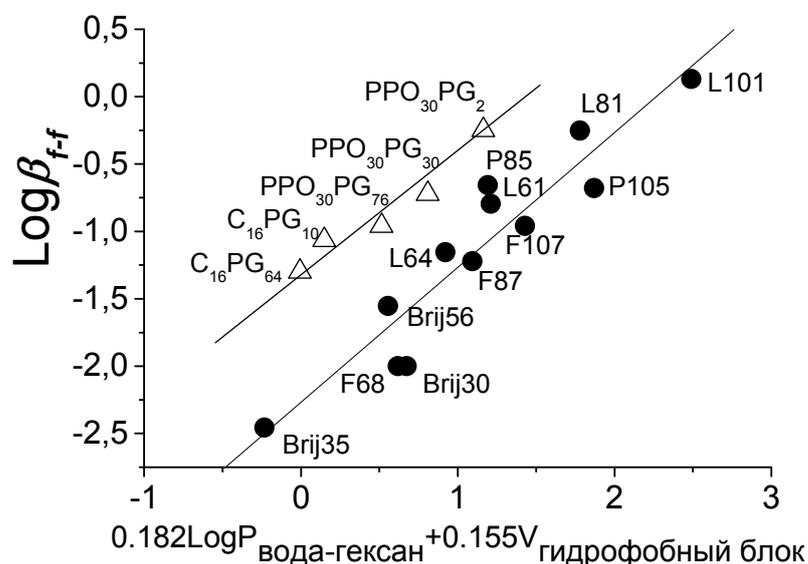


Рис. 7. Корреляция между влиянием плуроников (●) и полиглицеринов ($\text{PPO}_{30}\text{PG}_2$, $\text{PPO}_{30}\text{PG}_{30}$, $\text{PPO}_{30}\text{PG}_{76}$) (Δ) на скорость флип-флопа фосфатидилэтаноламина с флуоресцентной меткой ($\text{Log}\beta_{f-f}$) и линейной комбинацией гидрофобности полимеров ($\text{Log}P_{\text{вода-гексан}}$) и объема гидрофобного блока ($V_{\text{гидрофобный блок}}$) [56]

Сополимеры, содержащие блок ППО, в большей степени ускоряют флип-флоп липидов и способствуют проникновению DOX, чем полимеры с углеводородными алифатическими цепями (Brij 30, Brij 35, Brij 56, $\text{C}_{16}\text{PG}_{10}$, $\text{C}_{16}\text{PG}_{64}$). Тем не менее, как те, так и другие, характеризуются тем, что их гидрофобные блоки встраиваются в бислой и дестабилизируют его. При этом, блок ППО в составе плуроников в большей степени дестабилизирует липидный бислой, чем углеводородный блок ПАВ. Еще сильнее мембрану дестабилизируют сополимеры, содержащие разветвленный блок полиглицерина (рис. 7). Повидимому,

двублочная архитектура полиглицеринов облегчает их внедрение в мембрану клетки по сравнению с плурониками.

При переходе к рассмотрению взаимодействия полимеров с живыми клетками возник вопрос о том, к каким компонентам клеточной мембраны они присоединяются. В вышеупомянутой работе с использованием сополимера ППО и ПЭО, меченного тритием и конъюгированного с фотоактивируемой меткой - пара-1-трифторметилдiazиринил-бензойной кислотой, было показано, что при инкубации этого конъюгата с клетками он связывается с липидами, т.е. так же, как и в случае искусственных мембран [130].

Связывание плуроников с липидами клеточной мембраны приводит к изменению ее свойств. Основной эффект, вызываемый присоединением плуроников, заключается в изменении подвижности липидов. Ускорение флип-флопа должно приводить к увеличению количества фосфатидилсерина на наружном слое мембраны, что предшествует снижению мембранного потенциала митохондрий [78]. Увеличение подвижности липидов впервые было показано на нормальных лимфоцитах и раковых клетках в культуре в экспериментах по измерению анизотропии флуоресценции зонда 2,4,6-дифенилгексатриена (ДФГТ). Обнаружено, что подвижность зонда увеличивалась при добавлении плуроников L61 и P85, что свидетельствует об уменьшении микровязкости клеточных мембран. Авторы полагают, что было зафиксировано изменение микровязкости именно наружной мембраны клеток, поскольку по данным литературы ДФГТ внедряется в основном в плазматическую мембрану [157]. Оказалось, что способность разжижать мембрану характерна для плуроников, способных подавлять МЛЮ. На клетках гематоэнцефалического барьера показано, что относительно гидрофобные плуроники L121, L101, L64, P85, P106, L81 вызывали этот эффект, хотя и в разной степени [116]. Корреляцию между снижением устойчивости опухолевых клеток и уменьшением микровязкости мембраны наблюдали в присутствии других ПАВ, содержащих полиэтиленоксид, - Твина 20 и Triton X-100 [158]. Блокирование выброса даунорубицина под действием аналогичных ПАВ наблюдали и Woodcock с соавт, причем эффект детергентов также сопровождался значительными изменениями в микровязкости мембраны [159]. Эта закономерность нашла подтверждение в работе Dudeja с соавт., которые показали, что соединения, способные влиять на P-gp, одновременно вызывают и “разжижение” мембраны (Солютол HS-15, Твин 40, Кремофор Е), в то время как индифферентные по отношению к мембране вещества, например октилглюкозид, не влияли и на МЛЮ [160].

Интересно, что гидрофильные плуроники F38, F108, F127, F88, являющиеся слабыми хемосенситизаторами по сравнению с L61 или P85, оказывают на мембрану противоположный эффект - увеличивают микровязкость, тем самым уплотняя липидный бислой [116].

Известно, что активность Р-гр, интегрированного в структуру мембраны, очень чувствительна к состоянию ближайшего липидного окружения [161]. Для функционирования этого белка (связывание субстрата и его выброс) необходима определенная взаимная ориентация его трансмембранных и нуклеотидсвязывающих доменов [162]. Эта конформация Р-гр поддерживается окружающими его липидами, образующими область бислоя с повышенным содержанием холестерина («липидный плот») и вследствие этого более высокой микровязкостью [163]. Интересно, что после инкубации клеток с плуроником P85, меченным флюоресцеином, в концентрации ниже ККМ локализация конъюгата совпадает с расположением маркеров, специфичных к «липидным плотам» [136]. Присоединение юнимеров P85 в области липидных плотов может приводить к снижению их микровязкости и, как следствие, изменению конформации и ингибированию активности Р-гр. Указанную взаимосвязь продемонстрировала Батракова с соавт. [133]. Авторы исследовали влияние плуроника P85 на клетки эпителия микрососудов головного мозга телят ВВМЕС, которые содержат большое количество Р-гр и могут служить моделью гематоэнцефалического барьера. Активность Р-гр оценивали по количеству выброшенного из клеток субстрата этого белка – флуоресцентной метки родамина 123. Ингибирование этого процесса под действием плуроника P85 коррелировало со значительным уменьшением микровязкости клеточных мембран, которую определяли по анизотропии флюоресценции ДФГТ. В присутствии плуроника P85 происходило ингибирование АТФазной активности Р-гр: снижалась максимальная скорость гидролиза АТФ, и увеличивалась эффективная константа Михаэлиса-Ментен [164]. Авторы полагают, что наблюдаемое ингибирование может быть следствием конформационных изменений белка, происходящих в результате уменьшения микровязкости окружающей липидной мембраны.

Приведенные факты позволили предположить, что плуроники ингибируют активность Р-гр, присоединяясь к липидам наружной клеточной мембраны и уменьшая ее микровязкость в области липидных плотов, что приводит к изменению конформации белка и снижению его активности.

Таким образом, анализ проведенных за последние 30 лет работ, посвященных изучению устойчивости клеток к лекарствам, свидетельствует об актуальности этой проблемы и определенных успехах в ее решении. Разработаны разнообразные подходы для преодоления устойчивости опухолей к лекарственным препаратам. Накоплен большой экспериментальный и теоретический материал по структуре и механизму действия Р-гр. Найдено огромное количество соединений способных подавлять его активность. Среди них - синтетические амфифильные блок-сополимеры – плуроники, особый интерес к которым вызван их высокой эффективностью. Исследована взаимосвязь между структурой полимера и его эффектом на

МЛУ. Установлено, что полимеры, обладающие низким и средним значением ГЛБ = 2-20, полностью подавляют устойчивость раковых клеток к лекарствам.

На протяжении последних 15 лет появилось большое число работ, посвященных исследованию механизма подавления МЛУ под действием таких амфифильных ПАВ. Однако единого мнения по этому вопросу до сих пор нет. Так, например, непонятно, обусловлена ли вызываемая плурониками сенситизация устойчивых клеток нарушением работы дыхательной цепи митохондрий вследствие проникновения плуроников внутрь клеток или неспецифическим влиянием на структуру и микровязкость наружной мембраны клеток. Кроме того, в литературе практически нет систематических исследований, посвященных определению концентраций полимеров, достаточных для подавления устойчивости раковых клеток к лекарствам. Также остается до конца не решенным вопрос о влиянии гидрофильных плуроников на МЛУ.

1.3. Токсичность плуроников

Способность плуроников подавлять МЛУ привлекла внимание еще и потому, что они малотоксичны по сравнению с заряженными ПАВ [1]. Действительно, при тестировании гидрофильных плуроников F127 и F68 в диапазоне концентраций от 0,001 до 1% никакой токсичности у этих полимеров для клеток в культуре (цитотоксичность) обнаружено не было [165, 166, 167, 168, 119] даже при длительной инкубации с клетками в течение 72 ч [166].

Однако при тестировании на животных были выявлены побочные эффекты применения этих полимеров. Внутривенное введение F127 мышам вызывает гиперлипидемию – аномальное повышение уровня липидов и липопротеинов в крови, увеличивает содержание холестерина, что способствует формированию атеросклеротических повреждений аорты [169]. Поглощение плуроника F127 эпителиальными и купферовскими клетками печени приводит к их вакуолизации и набуханию [170].

Плуроник F68, входящий в состав препарата RheothRx для лечения инфаркта миокарда, при испытаниях на людях не вызывал осложнений даже в высоких дозах [171]. Однако позднее RheothRx был снят с третьей фазы клинических испытаний в связи с его токсичностью для почек [172].

Сильный токсический эффект *in vivo* был обнаружен у гидрофобного плуроника L101, который при попытках использовать его в качестве иммуноаdjуванта, т.е. усилителя иммунного ответа, вызывал ярко выраженную воспалительную реакцию [173]. Причина токсичности плуроников для организма не выяснена.

Связь между структурой плуроника и его токсичностью была впервые продемонстрирована на животных. Количественная оценка токсичности плуроников

основывалась на определении уровня креатинфосфокиназы в крови после инъекции сополимера. Увеличение концентрации данного фермента в крови пропорционально степени повреждения мышечных тканей. Тестирование ряда плуроников (F88, F127, P105 и P123) показало, что, чем гидрофобнее плуроник, тем сильнее было повреждение мышц и тем выше был уровень креатинфосфокиназы в крови. Так, плуроники P105 и P123, обладающие средними значениями ГЛБ, были признаны токсичными, тогда как гидрофильные плуроники (F127 и F88) по своей токсичности были сопоставимы с изотоническим раствором, Кремафором EL и арахисовым маслом. Изучение этого вопроса привело исследователей к важному выводу: чем гидрофильнее сополимер, тем ниже его токсичность [174].

Этот вывод подтвердился в трех работах при анализе токсичности плуроников для клеток в культуре (цитотоксичность), где на одних и тех же клеточных линиях в одинаковых условиях тестировали разные полимеры. Так, в работе [167] на трех линиях клеток была исследована цитотоксичность трех плуроников, различающихся по гидрофобности – F127 (ГЛБ=25), P85 (ГЛБ=16) и L61 (ГЛБ=2-3). Показано, что наиболее гидрофильный плуроник F127 не был токсичен ни для одной из клеточных линий вплоть до концентрации 1%. Цитотоксичность плуроника P85 была обнаружена при концентрации $\geq 0,05\%$, а гидрофобный L61 оказался наиболее токсичным из трех полимеров и уже при концентрации 0,005% приводил к снижению количества клеток. Таким образом, чем гидрофобнее полимер, тем он токсичнее, и тем меньше его концентрация, при которой становится заметной гибель клеток (наибольшая нетоксичная концентрация, ННК). Тенденция снижения ННК по мере уменьшения гидрофильности полимера была также показана при сравнительном исследовании влияния плуроников F127, L64 и L61 на выживаемость клеток линии Сасо-2. Плуроник F127 не вызывал гибели клеток во всем диапазоне концентраций от 0,0005% до 1%, плуроник L64 оказался нетоксичным вплоть до 0,05 – 0,1%, а плуроник L61 - до 0,01 – 0,05% [139].

Такое же закономерное изменение свойств характерно и для блок-сополимеров, содержащих в качестве гидрофобного блока не ППО, а полидиметилсилоксан [175]. Авторы синтезировали трехблочные сополимеры структуры ПЭО-ПДМС-ПЭО, содержавшие от 10 до 16 звеньев диметилсилоксана в гидрофобном блоке и от 4 до 44 звеньев этиленоксида в каждом гидрофильном блоке. Токсичность этих блок-сополимеров тестировали на первичной культуре фибробластов человеческой кожи. Наиболее токсичными оказались полимеры с короткими ПЭО блоками. Соплимеры на основе полидиметилсилоксана, содержавшие только 4 - 8 звеньев этиленоксида, в концентрации 0,1-1% подавляли рост клеток на 50-80%. В то же время гидрофильные блок-сополимеры с 44 звеньями ЭО были не токсичны во всем диапазоне тестируемых концентраций от 0,001% до 1%.

Следует отметить, что сведения о цитотоксичности плюроники носят фрагментарный характер. В одной работе была определена наибольшая нетоксичная концентрация плюроника P123, которая составила 0,6%, на двух линиях раковых клеток (инкубация 1 ч) [176]. Анализ цитотоксичности еще четырех плюроники проводился в нескольких лабораториях. При этом обращает на себя внимание существенный разброс результатов этого анализа для одного и того же плюроника.

Так, плюроник F127 нетоксичен для клеток аденокарциномы толстой кишки человека линии Сасо-2 вплоть до концентрации 5% [165]. Однако для клеток линии 3Т3 EWS-FLI1 он оказался токсичным при концентрации выше 0,05% [177].

По данным разных авторов плюроник P85 не токсичен для клеток различных линий вплоть до концентрации 0,001% [119], 0,05% [167], 0,1% [168], 0,5% [176] или 5% [101].

Аналогичная ситуация наблюдается и для плюроника L61. В одной работе он проявлял цитотоксичность при концентрациях выше 0,005% [167], в другой - при 0,01% [139], а в третьей - при 0,03% [168].

Как видно из приведенных примеров, максимальная нетоксичная концентрация одного и того же плюроника, определенная в разных работах, может варьировать в пределах нескольких порядков. Это обусловлено разными условиями постановки экспериментов по определению цитотоксичности полимеров. Значение имеет длительность инкубации клеток с полимером [121, 178]. Так, минимальная токсичная концентрация плюроника P85 равная 0,001% была определена при инкубации чувствительных и устойчивых клеток рака молочной железы человека линий MCF7 и MCF7/R в присутствии полимера в течение 72 ч [119]. На результат также может влиять наличие сыворотки в среде культивирования, если для проведения опыта полимеры растворяли в полной культуральной среде [176]. Высказано предположение, что белки сыворотки могут включаться в мицеллы плюроники и влиять на процесс мицеллообразования путем гидрофобных взаимодействий с ППО-блоком [179, 180]. Возможно эти факторы влияют на биологические эффекты сополимеров.

Механизм токсического эффекта плюроники

Ранее в литературе был предложен трехступенчатый механизм взаимодействия неионогенного ПАВ с клеточной мембраной [181]. В зависимости от сродства ПАВ к мембране процесс ее растворения может происходить в разной степени. На первом этапе, при малой концентрации ПАВ, его молекулы внедряются в мембрану, не разрушая ее. На втором этапе в мембране присутствуют смешанные мицеллы, состоящие из молекул белков, липидов и ПАВ, которые находятся в равновесии с мицеллами самого ПАВ и его неассоциированными молекулами. И, наконец, на третьем этапе, при добавлении достаточного количества ПАВ, возможно образование мицелл, состоящих из белка и ПАВ, находящихся в равновесии со

смешанными мицеллами из ПАВ и липида и, собственно, с мицеллами самого ПАВ. Предполагается, что формирование таких смешанных мицелл в клеточной мембране может приводить к ее деструкции.

В работе по исследованию токсичности плуроников было высказано предположение, что амфифильные неионогенные плуроники так же действуют на клеточную мембрану, как ПАВ, и именно нарушение целостности плазматической мембраны является причиной их токсического действия на клетки [174].

Это предположение нашло экспериментальное подтверждение в работе M. Redhead с соавт., которые исследовали взаимодействие плуроников различного состава с человеческими клетками карциномы кишечника линии Сасо-2, эпителиальными клетками линии НМЕС-1 и нормальными эритроцитами человека. Клетки инкубировали с полимерами, добавленными в различной концентрации, в течение 5 ч и затем определяли количество клеток, оставшихся живыми, а также регистрировали появление внутриклеточных белков в среде инкубации [139]. При исследовании скорости гемолиза эритроцитов человека под действием плуроника L61, обнаружено, что этот процесс развивается во времени и достигает 100% спустя 1 ч инкубации с полимером [178]. Следовательно, токсичность развивается быстро. Эти результаты свидетельствуют против триггерного механизма цитотоксичности, когда плуроники выступают в роли индукторов изменений внутриклеточного метаболизма, постепенное развитие которых приводит к гибели клетки. Примером таких изменений метаболизма может служить апоптоз, который развивается на протяжении приблизительно трех суток. Приведенные результаты скорее указывают на то, что цитотоксичность обусловлена непосредственным воздействием плуроников на наружную клеточную мембрану. Авторы интерпретируют появление внутриклеточных белков в среде инкубации как увеличение проницаемости наружной клеточной мембраны под действием плуроника.

Таким образом, все рассмотренные полимеры в той или иной степени проявляют токсичность, что продемонстрировано в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*. Не определена цитотоксичность плуроника F68. Он не токсичен для клеток в культуре вплоть до 1%. Сопоставление наибольших нетоксичных концентраций плуроников F127, P85, P123, L64 и L61 свидетельствует о связи между структурой полимера и его токсичностью: чем гидрофобнее полимер, тем он токсичнее для клеток и тем меньше его концентрация, к которой клетки толерантны. Эта закономерность проявляется независимо от типа исследованных полимеров (плуроники или сополимеры на основе полидиметилсилоксана) и методов анализа их токсичности. В случае плуроников наиболее токсичны гидрофобные полимеры с блоком ППО средней степени полимеризации (30 - 60 звеньев) и малой длиной блока ПЭО (10 - 50% массы всей молекулы). Такая длина гидрофобного ППО-блока сопоставима с толщиной

плазматической мембраны, что может способствовать встраиванию полимера в липидный бислой [182]. В то же время малая длина гидрофильного блока не препятствует взаимодействию плюроники с мембраной. Можно предположить, что эти особенности структуры и строения обуславливают высокую цитотоксичность таких полимеров.

Количественная корреляция между соотношением гидрофобного и гидрофильных блоков полимера и его цитотоксичностью пока не описана. Систематическому изучению токсического действия плюроников на клетки в культуре уделено немного внимания в литературе. Нам удалось найти такого рода сведения только для шести плюроников. В подавляющем большинстве работ цитотоксичные концентрации этих полимеров были установлены путем последовательного разведения тестируемого раствора полимера в 10 раз, что не позволяло получить достаточные точные значения ННК. Влияние мицеллообразования на цитотоксичность плюроников не исследовалось.

1.4. Защитная роль плюроников

Некоторые гидрофильные плюроники способны оказывать на клетки действие прямо противоположное токсичности, а именно, защищать их от различного рода повреждений и способствовать восстановлению целостности клеток.

Наиболее широкое применение в этой сфере нашел плюроник F68 (полоксамер-188). Он значительно (более чем в 2 раза) увеличивает модуль упругости мембран клеток гибридомы [183]. Его добавление в среду культивирования приводит к увеличению количества клеток в культуре, например, фибробластов линии NIH/3T3 [184]. В его присутствии значительно ускоряется восстановление целостности наружной мембраны фибробластов линии *Swiss 3T3* после ее механического повреждения. Авторы предполагают, что влияние плюроника объясняется понижением поверхностного натяжения на границе мембрана-раствор [185]. Аналогичный эффект плюроник F68 проявляет и по отношению к клеткам инфузории *Tetrahymena* [186] и к клеткам насекомых [187]. Он ускоряет восстановление клеточных мембран, поврежденных в результате ионизирующего облучения или электропорации, таким образом, предотвращая клеточный некроз [188, 189]. Плюроник F68 проявлял ряд защитных эффектов при добавлении к клеткам нескольких линий СНО. Он препятствовал разрушению клеток в условиях барботирования воздуха через культуральную среду и, как следствие, способствовал увеличению количества клеток. Он уменьшал адгезию клеток к подложке, восстанавливал целостность плазматической мембраны после обработки клеток трипсином [190] и амилоидными олигомерами [191].

В связи с ярко выраженными защитными свойствами плюроника F68 по отношению к клеткам предложено использовать его в качестве криопротекторного компонента сред для

замораживания клеточных культур как в качестве самостоятельного препарата [192], так и в составе эмульсий перфторанов в технологиях низкотемпературного консервирования органов и тканей [193]. По всей видимости, в данном случае используется способность плуроника понижать термодинамическую активность воды, усиливая тем самым гидрофобные взаимодействия [194]. Вследствие этого при замораживании предотвращается кристаллизация воды, приводящая к разрушению клеточных мембран при криоконсервации клеток и тканей. Кроме того, данный эффект плуроников может быть обусловлен их способностью увеличивать эластичность клеточной мембраны и облегчать процесс ее восстановления после повреждений, вызванных замораживанием - оттаиванием.

Способность гидрофильных плуроников увеличивать прочность и эластичность клеточных мембран объясняет их успешное использование при лечении ожогов. Исследования на крысах показали, что систематическое применение плуроника F68 на ранних стадиях глубоких ожогов второй степени уменьшает углубление ран. Возможным механизмом действия полимера является его способность к «запечатыванию» мембран поврежденных клеток и ингибированию воспалительной реакции [195].

Еще одним сополимером, применяющимся для защиты клеток и тканей, является гидрофильный плуроник F127. Его мицеллы оказывали защитный эффект при обработке клеток линий 3T3-MDE1, C2C12 и CHO ультразвуком [167]. Применение *in vivo* геля плуроника F127 на ранней стадии ожоговых поражений значительно ускоряет процесс заживления ран и стимулирует рост эпителиальной ткани [195, 196, 197]. Благодаря своим свойствам плуроник F127 был включен в состав кремов и заменителей кожи для лечения ожогов [198].

Так же, как F68, плуроник F127 повышает жизнеспособность клеток [168, 182, 184]. Например, инкубация клеток колоректальной карциномы линии DHD/K12/TRb с плуроником F127 приводила к повышению их количества до $131 \pm 22\%$ по сравнению с контролем [168]. Прирост клеточной массы в присутствии широкого диапазона (от 0,01% масс. до 10% масс.) концентраций F127 был показан и на клетках линии NIH/3T3 [184].

Таким образом, исследования, проведенные за последние полвека, ярко продемонстрировали способность плуроников F127 и F68 повышать жизнеспособность клеток и сформировали парадигму, согласно которой такой эффект характерен только для полимеров, гидрофильный блок которых составляет 70 – 80% массы макромолекулы.

Однако, в последние годы в ряде работ было обнаружено, что сходные эффекты наблюдаются и в присутствии достаточно гидрофобных плуроников (L61, L122, P105, P85), которые снижают микровязкость плазматических мембран клеток. Мицеллы плуроника P85 (ГЛБ = 16) проявляли защитный эффект в условиях повреждающего воздействия ультразвука

на клетки трех линий 3T3-MDE1, C2C12 и CHO. В присутствии этого плуроника количество клеток было близко к контрольным значениям, а при воздействии ультразвука даже высокой интенсивности клетки оставались прикрепленными к субстрату [167].

Плуроник P85 способен не только защищать клетки от повреждений, но также повышать их жизнеспособность, что проявляется в увеличении количества клеток в культуре. Так, например, добавление этого плуроника в среду культивирования увеличило количество клеток колоректальной карциномы линии DHD/K12/TRb до $172 \pm 23\%$ по сравнению с контролем [168]. Авторы отмечают, что повышение жизнеспособности наблюдалось при концентрации полимера, соответствующей его ККМ. По-видимому, влияние на жизнеспособность клеток была обусловлена юнимерами плуроника P85.

Таким же неожиданным, как и в случае плуроника P85, стал результат, полученный позднее теми же авторами для гидрофобного плуроника L61. Через сутки после инкубации с этим полимером в клетках DHD/K12/TRb наблюдалось повышение внутриклеточного уровня АТФ примерно на 25 – 30%, что говорило об увеличении жизнеспособности клеток. Следует отметить, что данный эффект проявлялся при концентрациях плуроника до 110 мкМ и достигал максимума вблизи этой концентрации [182]. Добавление 0,01% масс. плуроника L61 в культуральную среду увеличивало количество фибробластов линии NIH/3T3 [184]. Тот же эффект был обнаружен и для других плуроников в широком интервале концентраций – L122, P105. После инкубации с указанными полимерами наблюдалось увеличение количества клеток на несколько десятков процентов по сравнению с контролем [184].

Несмотря на то, что защитные свойства плуроников известны достаточно давно, предположения, касающиеся механизма их действия, стали появляться сравнительно недавно. Высказано предположение, что мицеллы плуроников, имеющие гидрофильную опушку из ПЭО-блоков, способны взаимодействовать с наружными мембранами клеток, формируя слои, которые и выполняют барьерную функцию [167, 190].

Таким образом, анализ литературы показывает, что гидрофильные плуроники проявляют ярко выраженные защитные свойства как *in vitro*, так и *in vivo*. Вероятной причиной такого эффекта может быть изменение микровязкости и модуля упругости плазматической мембраны клетки. Иных указаний в литературе на связь структуры и состава полимеров с их защитной ролью нам обнаружить не удалось. В частности, неизвестно, как влияет структура и химическая природа гидрофильного блока на протекторное свойство полимера.

Плуроники не только способны защищать клетки от вредных внешних воздействий, но также могут поддерживать их жизнеспособность, что следует принимать во внимание при использовании плуроников в медицинских целях, а особенно в противораковой терапии.

Увеличение количества клеток выше контрольных значений наблюдалось после инкубации как с гидрофильными плурониками, которые уплотняют клеточные мембраны, так и с гидрофобными полимерами этого класса, разжижающими мембраны. В связи с этим, остается открытым вопрос и о том, какие свойства и структурные особенности полимеров обуславливают увеличение количества клеток.

Итак, анализ литературы, посвященной взаимодействию амфифильных блок-сополимеров с клетками, показал, что эти полимеры оказывают разные биологические эффекты, порой противоположные друг другу: в одном случае наблюдается гибель клеток вследствие токсического воздействия полимера или его влияния на устойчивость клеток к лекарствам, в другом – увеличение жизнеспособности клеток, порой превышающее контрольный уровень. Настоящая работа посвящена выяснению вопроса, чем определяется тот или иной эффект полимера. Анализ этой проблемы может представлять интерес в случае применения изученных в настоящей работе соединений в медицинских целях.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

В работе были использованы следующие коммерческие реактивы:

- блок-сополимеры оксида этилена и оксида пропилена – плуроники: плуроники F68, P85, L61 («Serva», Германия), плуроники F87 и F127 («Carbomer Inc.», США), плуроники L64, L81, P123 («BASF», США);
- двублочный сополимер этиленоксида и пропиленоксида REP (НИОПИК, Москва), предоставленный профессором И.Н. Топчиевой;
- двублочный сополимер полиэтиленоксида и полидиметилсилоксана ЭО₅₄-ДМС₇ («Polysciencies, Inc.», США);
- Brij-35 («Serva», Германия);
- Triton X-100 («Ferak», Германия);
- блок-сополимеры пропиленоксида и глицерина были синтезированы в лаборатории профессора Н. Frey (Институт органической химии, Университет Иоанна Гуттенберга, Майнц, Германия);
- плуроники ³H-P123, ³H-L61 и ПАВ ³H-Brij-35, меченные тритием, были синтезированы доцентом кафедры радиохимии химического факультета МГУ Бадуном Г.А. Полимеры были очищены методом гель-проникающей хроматографии на носителе Sephadex LH-20 («Amersham» США);
- флуоресцентный краситель DAPI (4', 6-диамидин-2-фенилиндол дигидрохлорид), гидрохлорид доксорубицина, бромид 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия (МТТ), изотиоцианат флуоресцеина (FITC, изомер I), карбонилдиимидазол и этилендиамин («Sigma», США);
- компоненты среды для культивирования клеток: эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота («HyClone» США); среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), PBS (phosphate buffered saline tablets), pH 7,4, и антибиотики - пенициллин и стрептомицин («Sigma» США); глютамин («ICN», США); раствор Версена («ПанЭко», Россия), препарат от микоплазмы (micoplasma removing agent, MRA, «Biomedicals, Inc., Япония»);
- дифенилгексатриен («Reanal», Венгрия);
- диметилсульфоксид (хч, «Реахим», Россия);
- тимидин, меченный тритием («Chemapol», Чешская Республика);

- реактивы для радиоавтографии: фотоэмульсия (Autoradiography emulsion, Type NTB «Kodak», США), фотохимические реактивы («Riedel - de haen», Германия). Параформальдегид («MP Biomedicals», Германия);
- Остальные реактивы – неорганические соединения и органические растворители («Химмед», Россия).

Все коммерческие препараты использовали без дополнительной очистки.

Эпителиоподобные опухолевые клетки аденокарциномы молочной железы человека (MCF7 и MCF7/R) были любезно предоставлены Штилем А. А. (Российский онкологический научный центр РАМН им. Н.Н. Блохина, Москва).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Определение молекулярно-массовых характеристик полимеров

Плюроники L61, L64, F127, P123, двублочный сополимер ПЭО и ППО (PEP) и блочный сополимер ЭО₅₄-ДМС₇ были проанализированы старшим научным сотрудником кафедры ВМС Гариной Е. С. методом гель-проникающей хроматографии при 35°C в ТГФ на жидкостном хроматографе «Waters» (США) с рефрактометрическим детектором и колонками, заполненными ультрастирогелем с размером пор от 10³ до 10⁵ Å и линейной колонкой. Хроматограммы обрабатывали на интеграторе «Data Module-730» с использованием калибровки по стандартным препаратам полиэтиленгликоля (ПЭГ).

2.2.2. Определение ККМ с помощью флуоресцентного зонда

ККМ полимеров определяли по изменению интенсивности флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГТ), которая возрастает при солюбилизации ДФГТ в гидрофобном ядре образующихся мицелл полимеров [41]. 3-4 мг ДФГТ (Mw=232) растворяли в 1 мл ацетона, 50 мкл этого раствора вносили в 50 мл PBS и интенсивно перемешивали полученный раствор в течение ≈ 2 ч до исчезновения запаха ацетона. Исследуемый полимер за сутки до эксперимента растворяли в PBS и непосредственно перед опытом разводили до необходимых концентраций. К 600 мкл каждого образца добавляли равный объем 10 мкМ ДФГТ (конечная концентрация флуорофора в каждом образце составляла около 5 мкМ). В ряде опытов использовали и другие концентрации ДФГТ (0,25 мкМ и 8 мкМ). Образцы термостатировали в течение 1 ч при 37°C и измеряли интенсивность флуоресценции каждого образца на флуориметре Hitachi 650-10 S (Япония) при длине волны возбуждающего света (λ_{ex}) 366 нм и длине волны испускаемого излучения (λ_{em}) 433 нм. Так как на процесс мицеллообразования плюроники сильно влияет температура, измерение интенсивности флуоресценции каждого образца проводили при 37°C в термостатируемой ячейке, температуру в которой периодически проверяли в течение опыта. В процессе измерения одного из образцов

все остальные пробы находились в водяном термостате при 37°C. Для минимизации выгорания метки щель для прохождения возбуждающего света выставляли минимальную (1 - 2 нм). Для повышения чувствительности определения щель для прохождения испускаемого света увеличивали максимально до 18 - 20 нм. Измерения проводили в широком диапазоне достоверно определяемых значений интенсивности излучаемого света: от 10 до 100-120 усл.ед. Для этого подбирали такую чувствительность прибора, чтобы величина интенсивности в контрольных образцах без полимера составляла 5 – 10 усл. ед. В настоящей работе ККМ определяли, исходя из предположения, что единичные молекулы полимера, независимо от его концентрации, не связывают ДФГТ. Если это так, то интенсивность флуоресценции должна быть постоянна в отсутствие мицелл. Поэтому, если в области концентраций полимера до предполагаемой ККМ наблюдалось небольшое, но неуклонное увеличение флуоресценции, полимер разбавляли сильнее, так, чтобы в 3-5 первых пробах ее интенсивность колебалась около некоего постоянного значения, такого же, как в контрольном образце без полимера. Тогда на графике зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации полимера эти значения до ККМ лежат на прямой параллельной оси абсцисс. ККМ анализируемого полимера соответствовала той концентрации полимера, при которой наблюдалось резкое возрастание интенсивности флуоресценции ДФГТ.

2.2.3. Определение ККМ методом статического светорассеяния

ККМ полимеров определяли также методом статического светорассеяния, который основан на зависимости интенсивности рассеяния света (I) от размера частиц: $I \sim R^n$, где R – радиус частиц, а $n = 6$ для частиц с $R < 100$ нм [199]. Поэтому при ассоциации макромолекул полимера с образованием мицелл происходит скачкообразное изменение интенсивности рассеянного света. Перед измерениями готовили серию разведений полимеров в PBS и обеспыливали фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (Sartorius). Поскольку полимеры обладают НКТР, то во избежание потерь мицелл, перед фильтрованием образцы охлаждали в течение 30-60 минут при +5°C. Обеспыленные образцы термостатировали в течение часа при 37°C и измеряли интенсивность светорассеяния на фотометре рассеянного лазерного света «Photocor Complex» («Photocor Instruments», США) под углом 90°, с He-Ne лазером мощностью 10 мВт, $\lambda = 633$ нм, в качестве источника света. Показания снимали через 1 мин после помещения прогретого фильтрата в кювету, термостатируемую при 37°C. Каждый образец анализировали 5 раз. ККМ определяли как минимальную концентрацию полимера, при которой происходит резкое изменение интенсивности рассеянного света.

2.2.4. Культивирование клеток

Размораживание клеток

Клетки хранили в ампулах со средой, содержащей эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота и 10% диметилсульфоксида (ДМСО), в сосудах Дьюара с жидким азотом. Для размораживания клеток нагревали 5-7 мл 70% этанола до 37°C и помещали в него ампулу с клетками. Как только среда в ампуле начинала таять, содержимое ампулы переносили во флакон культивирования Nunc объемом 50 мл («Nunclon» Дания) с 5-7 мл культуральной среды DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4 мМ глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (полная культуральная среда). Флакон с клетками помещали в CO₂-инкубатор «NARCO» (США), где инкубировали 3-4 часа при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и влажности 95% (стандартные условия). После адгезии основной массы клеток на стенке лежащего флакона, в нем заменяли среду на свежую, чтобы удалить ДМСО, и продолжали инкубацию в стандартных условиях.

Культивирование клеток

Клетки MCF7 и MCF7/R культивировали в полной культуральной среде DMEM в стандартных условиях, пересевая их 2-3 раза в неделю в зависимости от плотности посева: при посеве 3×10^5 клеток на флакон клетки пересевали 2 раза в неделю, а при посеве $4-4,5 \times 10^5$ клеток на флакон – 3 раза в неделю. Для посева клетки смывали со стенки флакона 1 мл версена (0,02% ЭДТА), который хелатирует ионы кальция, необходимые для адгезии клеток, в результате чего происходит открепление клеток от подложки. Хелатную активность ЭДТА нейтрализовали добавлением 2 мл полной культуральной среды и осаждали клетки центрифугированием (5 мин, 100 g, центрифуга Sigma σ -15, “Sigma Laborzentrifugen”, Германия). Осадок клеток суспендировали в 3-4 мл среды и считали количество клеток в камере Горяева, используя микроскоп Axiovert 25 («Zeiss», Германия). В культуральный флакон вносили 3-4 мл среды и суспензию клеток до получения их плотности $1,2 \times 10^4$ клеток/см² (3×10^5 клеток на флакон с площадью рабочей поверхности 25 см²).

Для поддержания устойчивости клеток MCF7/R к действию противоопухолевых антибиотиков в среду культивирования 1 раз в месяц при посеве добавляли 5 мкг/мл DOX и инкубировали в течение трех суток в стандартных условиях. После этого среду с DOX удаляли. Для опытов использовали клетки не менее, чем после двух пассажей в среде без DOX.

Проверка чистоты клеточной культуры

Чистоту культуры клеток контролировали с помощью флуоресцентного красителя DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол). Метод основан на возрастании флуоресценции этого красителя при связывании с ДНК, причем не только клеток, но и микоплазмы, бактерий и

других ДНК-содержащих организмов. DAPI проходит сквозь клеточные мембраны и встраивается в кластеры ДНК, обогащенные парами аденин-тимин, на любой стадии клеточного цикла. При встраивании эмиссия флюоресценции DAPI возрастает в 20 раз и можно наблюдать голубое свечение при длине волны $\lambda_{em} = 460$ нм. DAPI может присоединяться и к РНК, однако при этом интенсивность флюоресценции красителя в 5 раз слабее, чем при образовании комплекса с ДНК, и регистрируется при другой длине волны $\lambda_{em} = 500$ нм, т.е. не перекрывается с λ_{em} комплекса DAPI и ДНК.

Для анализа на покровное стекло, лежащее в чашке Петри диаметром 3 см, высевали около 10^5 клеток, вносили 3-4 мл среды и инкубировали клетки в стандартных условиях в течение 2 суток. Затем среду культивирования удаляли, клетки промывали 2 раза 3 мл раствора PBS и фиксировали в 2 мл холодного метанола в течение 10-15 минут при -20°C . После фиксации метанол удаляли и промывали клетки 2 раза 3 мл раствора PBS. Для окрашивания ДНК в каждую чашку Петри вносили по 2 мл 0,3 мкМ раствора DAPI в PBS и инкубировали в течение 5 - 10 мин. Непрореагировавший краситель удаляли раствором PBS (промывка 3 раза по 3 мл). На предметное стекло наносили по 10-15 мкл смеси PBS и глицерина (1:1) и на нее помещали образцы на покровных стеклах клетками вниз. Покровные стекла закрепляли по краям с помощью лака и после его высыхания наносили нефлюоресцирующее иммерсионное масло 518С. Образцы анализировали на флюоресцентном микроскопе («ОПТОН», Германия) при облучении светом в диапазоне 390 - 420 нм и увеличении $\times 630$. Если заражения нет, то синее свечение наблюдается только в ядрах клеток. При заражении культуры микоплазмой синяя флюоресценция DAPI наблюдается также на наружной клеточной мембране и вне клеток. В этом случае к клеткам в культуральную среду добавляли 5 мкг/мл препарата, убивающего микоплазму (micoplasma removing agent, MRA), и выдерживали их в присутствии этого препарата в течение трех суток. Очищенную таким образом культуру клеток использовали для экспериментов только после 2 - 3 стандартных пересевов.

Замораживание клеток для хранения

Клетки собирали со стенки культурального флакона, как при пересеве, и суспендировали в 1-2 мл эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, содержащей 10% ДМСО в качестве криопротектора. После подсчета плотности клеток их переносили в ампулы для замораживания по 1,5 - 3 млн клеток/ампула. Ампулы помещали в толстостенные штативы из пенопласта и выдерживали сутки при температуре -40°C , после чего переносили в сосуд Дьюара с жидким азотом.

2.2.5. Определение цитотоксичности доксорубина и полимеров

Цитотоксичность DOX и полимеров оценивали по доли клеток, выживших после инкубации с указанными соединениями (антибиотик или полимер). Для анализа устойчивости клеток к DOX, его навеску массой 5 мг растворяли в 300 мкл дистиллированной воды, определяли концентрацию по оптической плотности раствора при 490 нм на спектрофотометре Ultrospec 500/1100 pro ("Amersham Biosciences" США), принимая значение коэффициента экстинкции равным $10500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [200]. Полученный раствор разводили средой DMEM без сыворотки до концентрации 100 мкг/мл, стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и последовательно разводили DOX средой DMEM без сыворотки для получения растворов в диапазоне концентраций 0,1-100 мкг/мл. При концентрации ≥ 300 мкг/мл DOX сорбируется на полистирольном планшете, что искажает результаты анализа его токсичности.

Для исследования токсичности полимеров их растворяли в среде DMEM без сыворотки в течение суток при 4°C , стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и непосредственно перед экспериментом готовили серию его разведений в 1,5-2 раза в среде DMEM без сыворотки.

Клетки MCF7/R засевали в лунки 96-луночного планшета (3500 - 4000 клеток на лунку) за сутки до эксперимента и культивировали в стандартных условиях в среде DMEM, содержащей сыворотку. В день опыта среду культивирования удаляли, в каждую лунку вносили 200 мкл исследуемого соединения (DOX или полимер) и инкубировали в течение 1 ч в CO_2 -инкубаторе при 37°C . Контрольные лунки содержали только 200 мкл среды DMEM без сыворотки. Каждый образец анализировали в трех параллелях. По окончании инкубации среду инкубации заменяли на DMEM с сывороткой и культивировали клетки в течение трех суток в стандартных условиях.

После этого определяли количество клеток в лунках планшета с помощью МТТ-теста, который основан на способности сукцинатдегидрогеназы живых клеток восстанавливать неокрашенный субстрат 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) в фиолетовый кристаллический формазан, растворимый в ДМСО. Интенсивность окраски полученных растворов пропорциональна концентрации живых клеток [201].

Раствор МТТ, 5 мг/мл в воде, хранили при 4°C . Перед анализом его разводили в 5 раз средой DMEM без сыворотки. Для определения количества живых клеток во все лунки вносили по 50 мкл раствора МТТ в среде (конечная концентрация МТТ в лунке – 0,2 мкг/мл). Через 3 - 4 ч инкубации в стандартных условиях среду удаляли, вносили во все лунки по 100 мкл ДМСО, перемешивали в течение 10-15 минут и измеряли оптическую плотность раствора в лунках при 550 нм (D550) на фотометре Multiscan («Titertek», США). Разброс значений D550

в параллельных лунках, рассчитанный как среднее квадратичное отклонение относительно среднего значения ($sd/mean$, %), составлял 5 - 7%. Подбирали такую плотность посева клеток, чтобы D550 в контроле было около 1. Долю выживших клеток рассчитывали как отношение D550 в лунке, содержавшей раствор DOX или исследуемого полимера, к среднему значению D550 в контрольных лунках. Цитотоксичность DOX и полимеров оценивали по максимальной концентрации соответствующего соединения, выше которой количество выживших клеток начинает снижаться (наибольшая нетоксичная концентрация, ННК). Также определяли концентрацию соединения, при которой гибло 50% клеток - IC_{50} . Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Origin 8.5.

2.2.6. Влияние полимеров на цитотоксичность доксорубина

Влияние полимеров на устойчивость клеток к доксорубину оценивали по доли клеток, выживших после их инкубации в смеси исследуемого полимера и антибиотика. Использовали два варианта постановки экспериментов.

В первом варианте варьировали концентрацию DOX от 0,1 до 100 мкг/мл, тогда как концентрация полимера во всех тестируемых образцах была одинаковой. Контрольный образец содержал только полимер в той же концентрации. Такая постановка эксперимента позволяла определить концентрацию DOX, необходимую для подавления пролиферации клеток на 50% (IC_{50}^{DOX}) в присутствии фиксированной концентрации полимера. Одновременно на том же планшете анализировали токсичность DOX для тех же клеток, но в отсутствие полимера, как указано в п. 2.2.5. Сопоставление полученных кривых цитотоксичности DOX демонстрирует изменение чувствительности клеток к лекарству под действием полимера.

При втором варианте варьировали концентрацию полимера, а концентрация DOX во всех образцах была одинаковой - 5 мкг/мл. Контролем служили образцы, содержавшие только 5 мкг/мл DOX. Такая постановка опытов позволяла определить концентрацию полимера, достаточную для подавления МЛУ.

Подготовка реактивов, клеток и проведение экспериментов при обоих вариантах аналогичны изложенным в п. 2.2.5.

2.2.7. Анализ накопления DOX в клетках

Клетки MCF7/R высаживали на стерильные покровные стекла, положенные в чашки Петри диаметром 3 см, по 50 - 100 тыс. на стекло. На следующий день монослой клеток инкубировали с раствором 5 мкг/мл DOX в бессывороточной среде при 37°C и через фиксированные промежутки времени клетки отмывали раствором PBS (3 раза по 2 мл) и фиксировали 4% раствором формальдегида в течение 10 – 15 мин. После удаления фиксатора клетки промывали PBS (3 раза по 2 мл) и герметизировали на предметном стекле с помощью

лака. Образцы анализировали на флюоресцентном микроскопе Opton, оснащенный видеокамерой M1400м (ДельтаТех, Россия). Флюоресценцию регистрировали при $\lambda_{ex} = 510$ нм и $\lambda_{em} = 580$ нм. Для измерения ее интенсивности получали фотографии клеток в формате .tif, причем, все образцы фотографировали при одинаковом времени экспозиции. Фотографии анализировали с помощью программы анализа изображений (ДельтаТех). Интенсивность окраски ядер в пикселях в области свободной от клеток (фон) измеряли минимум в 6 участках на каждой фотографии. Затем измеряли интенсивность окраски ядер в 50 – 70 клетках. В предварительных опытах была показана прямая пропорциональность между концентрацией добавленного DOX и интенсивностью флюоресценции ядер при фиксированном времени экспозиции при фотографировании. На этом основании мы полагали, что разность между интенсивностью окраски ядер и фона пропорциональна количеству DOX в ядрах. Ранее F. Frezard и A. Garnier-Suillerot это показали на клетках эритролейкемии K562 [202].

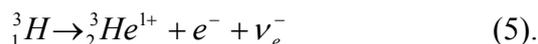
2.2.8. Получение меченных тритием полимеров

Введение трития в плюроники L61 и P123 и углеводородсодержащий ПАВ Brij-35 проводил доцент Г.А. Бадун на кафедре радиохимии МГУ. Полимеры обрабатывали атомами трития, которые образуются при 1900 К в результате термической диссоциации молекул трития. Для этого полимеры растворяли в воде и лиофильно высушивали в тонком слое на стенках реакционного сосуда (площадь мишени около 150 см²), вводили в сосуд тритий-противевую смесь (содержание трития 50%) до давления 3,7 мТор (0,5 Па) и нагревали вольфрамовую проволоку электрическим током до 1900 К. Полимеры бомбардировали горячими атомами трития ($E=0,16$ эВ, 1900 К) в течение 10 с. Процедуру повторяли 4 раза, каждый раз растворяя полимер в воде и лиофилизуя заново. Полимеры отделяли от обмениваемого трития рядом последовательных циклов растворения в этаноле и упаривания в вакууме и очищали от продуктов радиолиза методом ГПХ на колонке сефадекса LH-20 (1×18 см), уравновешенного этанолом. Фракции первого пика, содержащие радиоактивный полимер, собирали и испаряли этанол под вакуумом. Удельная радиоактивность ³H-L61 составила 13,9 Ки/ммоль, а ³H-P123 – 48,3 Ки/ммоль, что соответствует в среднем 0,5 и 1,7 атома трития на макромолекулу, учитывая, что удельная радиоактивность атома трития равна 29 Ки/ммоль. Удельная радиоактивность ³H-Brij-35 была несколько ниже – 6,5 Ки/ммоль.

2.2.9. Радиоавтография

Локализацию ³H-меченых полимеров в клетках анализировали методом радиоавтографии, основанном на получении изображения вследствие воздействия ионизирующих частиц, образующихся при распаде трития, на ядерную фотоэмульсию, содержащую кристаллы галоидного серебра - *AgBr*.

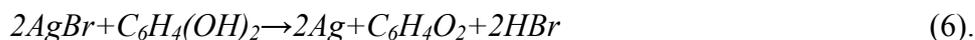
При распаде трития образуется изотоп гелия, электрон и антинейтрино (ν_e^-):



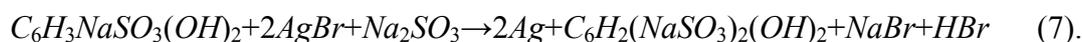
Под действием β -излучения из иона Br^- в микрокристалле бромида серебра выбивается электрон, который может свободно перемещаться внутри микрокристалла и попасть в область дефектов кристаллической решётки - так называемые центры светочувствительности. Дефекты образуются в процессе приготовления фотографической эмульсии, на стадии химического созревания. В кристаллической решётке присутствует также некоторое количество свободных положительно заряженных ионов Ag^+ , выбитых со своих мест тепловыми колебаниями. Они движутся по направлению к центрам светочувствительности, обладающих отрицательным зарядом благодаря скапливающимся в них электронам. Часть ионов Ag^+ рекомбинирует с фотоэлектронами и превращается в нейтральные атомы серебра. Таким образом, в центре светочувствительности образуется зародыш металлического серебра, растущий в процессе экспозиции. Такие локальные группы атомов серебра называются центрами скрытого изображения.

За сутки до эксперимента клетки высевали на покровные стекла в плотности 20 - 30 тыс. клеток на стекло и культивировали в стандартных условиях. В день эксперимента среду культивирования удаляли и добавляли к клеткам смесь ${}^3\text{H}$ -меченного и немеченного полимера в 1 мл DMEM без сыворотки. Конечные концентрации полимеров и радиоактивность образцов указаны в подписях к рис. 39 и рис. 40. Клетки инкубировали в присутствии полимера в течение 1 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе. После инкубации клетки отмывали от полимеров PBS 2-5 раз по 1 мл и фиксировали в течение 10-15 мин одним из трех способов: смесью 15 мл этанола с 5 мл ледяной уксусной кислоты или 4% формальдегидом при комнатной температуре или метанолом при -20°C . 4% формальдегид получали гидролизом параформальдегида в PBS в кипящей водяной бане в течение 10 - 15 мин непосредственно перед применением во избежание его закисления при хранении. После фиксации покровные стекла с клетками отмывали от фиксатора раствором PBS (4 раза по 1 мл) и приклеивали канадским бальзамом на предметное стекло клетками вверх и высушивали. При слабом красном свете в темноте наносили на клетки тонкий слой мелкозернистой ядерной фотоэмульсии. Для получения тонкого слоя эмульсии ее предварительно расплавляли в течение 30 - 45 мин в водном термостате при $42 - 44^\circ\text{C}$. Малое время прогрева и температура выше 50°C сильно снижают чувствительность эмульсии. 1 - 2 мл расплавленной гомогенной эмульсии наносили автоматической пипеткой на стекло с клетками и давали ей стечь. Образцы экспонировали в темноте в присутствии осушителя (силикагель) при $+4 - +5^\circ\text{C}$ в течение 5-8 дней и проявляли в течение 1-2 мин в темной комнате проявителем Д-19 [203], содержащем

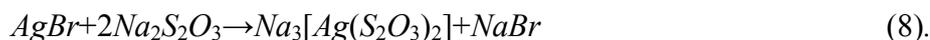
2,2 г/л метола, 96 г/л безводного сульфита натрия, 8,8 г/л гидрохинона, 48 г/л безводного карбоната натрия, 5 г/л бромистого калия, последовательно растворенных в воде при 35-40°C. При опускании образцов в проявитель гидрохинон адсорбируется на микрокристаллах $AgBr$ и восстанавливает ионы серебра в фотоэмульсии (реакция 6):



Такая реакция возможна только при наличии центров скрытого фотографического изображения, которые должны находиться на поверхности микрокристаллов для контакта с молекулами проявляющего вещества. В отсутствие таких центров реакция восстановления не протекает; следовательно, они играют в этой реакции роль катализаторов. Далее присутствующий в проявителе сульфит натрия реагирует с образовавшимся хиноном, образуя моносulfит гидрохинона, который восстанавливает ещё 2 иона серебра (реакция 7):



Образовавшийся при этом дисulfонат гидрохинона $C_6H_2(NaSO_3)_2(OH)_2$ проявляющей способностью практически не обладает. Таким образом, одна молекула гидрохинона в присутствии сульфита натрия восстанавливает четыре молекулы бромида серебра. До проявления центр скрытого фотографического изображения содержит обычно от нескольких атомов до нескольких десятков атомов Ag . После восстановления (проявления) микрокристалл серебра содержит 10^8 — 10^{10} атомов Ag . Таким образом, проявитель в огромной степени увеличивает количество продукта первичной фотохимической реакции. После проявления образцы промывали дистиллированной водой и помещали на 15-20 мин в кислый закрепитель, содержащий 300 г/л тиосульфата натрия и 15 г/л метабисульфита натрия, последовательно растворенных при 60-70°C. Закрепитель переводит непрореагировавший бромид серебра фотографической эмульсии в водорастворимую комплексную соль согласно реакции 8:



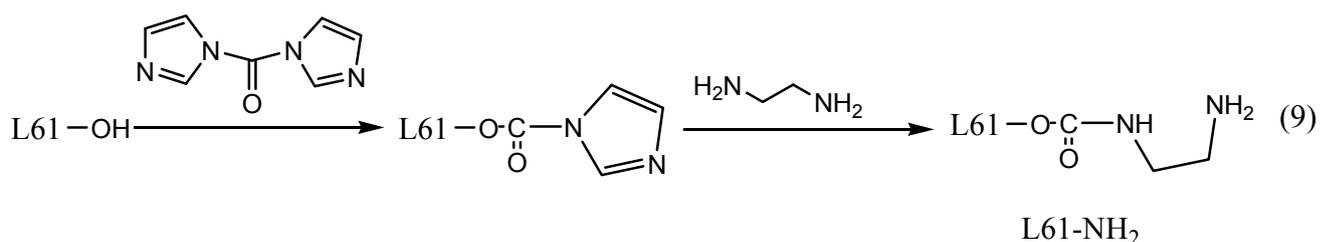
В кислом закрепителе действие проявляющих веществ, оставшихся в фотоэмульсии, быстро прекращается, так как в кислой среде нейтрализуются щелочные компоненты проявителя. Затем образцы промывали 30 мин под слабой струей водопроводной воды, высушивали, на сухой образец наносили 10-15 мкл смеси PBS с глицерином (1:1) и накрывали клетки покровным стеклом, закрепляя его по краям лаком. Клетки фотографировали в режиме фазового контраста на микроскопе (OPTON, Германия) при увеличении в 630 раз. Следует отметить, что для получения четких изображений рекомендуется использовать образцы полимеров, радиоактивность которых не превышает 70 мКи/мл.

2.2.10. Получение конъюгата плюроника L61 с флуоресцеинизотиоцианатом

В связи с тем, что плюроник L61 содержит на концах молекулы гидроксильные группы, а FITC эффективнее взаимодействует с аминогруппами, конъюгат получали в две стадии и на первой стадии вводили в молекулу полимера концевую аминогруппу.

а) Введение концевой аминогруппы в молекулу плюроника

Сначала плюроник обрабатывали карбонилдиимидазолом. Образовавшийся продукт отделяли и инкубировали с этилендиамином, который замещает имидазол в молекуле плюроника и образует 2-аминоэтилкарбаматную группу (реакция 9):



Первая реакция чрезвычайно чувствительна к присутствию следов воды, поэтому ее проводили в стеклянной посуде, прогретой при +200°C в течение 2 ч, в абсолютном диоксане. Для обезвоживания диоксана его кипятили с металлическим натрием в течение 8 ч с обратным холодильником и перегоняли при 99°C.

Плюроник L61, 0,5157 г (0,273 моль) осушили трёхкратной азеотропной отгонкой с 3-3,5 мл (всего 10 мл) бензола, абсолютного металлическим натрием. Безводный бензол нужен для удаления воды из L61 для того, чтобы карбонилдиимидазол реагировал с OH-группой L61, а не с водой. Использование бензола в данном случае обусловлено тем, что он, в отличие от металлического натрия, оксида фосфора (V) и других обезвоживающих реагентов, не взаимодействует с плюроником. К обезвоженному полимеру добавляли 0,7177 г (4,43 ммоль) карбонилдиимидазола, что составляло 8-кратный молярный избыток по отношению к количеству OH-групп полимера. К смеси прилили 2 мл абсолютного диоксана. При этом образовалась суспензия, которая быстро растворилась при 45°C. Образец инкубировали при 45°C в темноте в течение 12 ч.

Высокомолекулярный продукт отделили методом ГПХ на колонке сефадекса LH-20 (2×70 см), уравновешенного этанолом. Поскольку в диоксане сефадекс коагулирует, то перед нанесением на колонку образец упарили на роторном испарителе досуха, растворили в 2 мл этанола и нанесли на сефадекс. Элюировали этанолом со скоростью 8 мл/ч, объем фракции – 4 мл. Появление полимера в элюате регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора по поглощению при 230 нм, соответствующей поглощению карбонильных и имидазольных групп. Фракции, содержащие полимер, упаривали на роторном испарителе без

подогрева в предварительно взвешенном приемнике. Сухой остаток (0,2323 г) растворили в 2 мл этилендиамина и инкубировали 2 суток при комнатной температуре, в темноте, чтобы предотвратить окисление этилендиамина (при окислении он желтеет). Затем этилендиамин удалили на роторном испарителе, сухой остаток растворили в 2 мл этанола и выделили L61-NH₂ методом ГПХ, как написано выше. Появление L61-NH₂ в элюате регистрировали по реакции аминогрупп с тринитробензолсульфокислотой (ТНБС). Для этого к 2 мкл каждой фракции (3 параллельных пробы) добавляли 100 мкл 0,1 М бората натрия, pH 8,7, и 20 мкл свежеприготовленного раствора ТНБС, 3 мг/мл в воде. Реакцию проводили в 96-луночном планшете. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 405 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan Plus (Titertek, Финляндия). Основная часть аминогрупп находилась в свободном объеме колонки. Это означает, что обнаруженные аминогруппы были связаны с высокомолекулярным веществом в элюате, а именно, с плюронином L61. Выход продукта L61-NH₂ составил 74-82% от взятого количества L61.

б) Конъюгация L61-NH₂ с FITC

Конъюгат L61-FITC получали согласно реакции 10:



FITC, 8,7 мг (10-кратный молярный избыток по отношению к количеству L61-NH₂) растворили в 100 мкл ДМСО и прибавили к нему 100 мкл 0,1 М L61-NH₂, 100 мкл 0,2 М бората натрия, pH 9,5, и 150 мкл ДМСО для просветления раствора. Реакционную смесь инкубировали 23 ч при комнатной температуре. После этого отделяли высокомолекулярную фракцию методом ГПХ на колонке сефадекса LH-20 (1x30), уравновешенного этанолом, при скорости элюции 6 мл/ч и объеме фракции – 1 мл. Во фракциях определяли содержание FITC, измеряя на приборе Ultrospec 500/1100 pro, (Amersham Biosciences) поглощение при длине волны 494 нм в 10 мМ Трис-НСl, pH 8,0, и принимая его коэффициент молярной экстинкции ε равным 68000 см⁻¹М⁻¹. Конъюгат L61-FITC хорошо отделился от свободного FITC. Фракции, содержавшие L61-FITC, упарили на роторном испарителе и определили выход продукта по весу, который составил 97,4% от взятого количества L61-NH₂.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Целью настоящей работы явилось выявление структурных особенностей и физико-химических свойств амфифильных водорастворимых соединений, которые обуславливают их цитотоксичность и подавление устойчивости раковых клеток к лекарствам. В связи с этим для исследования были выбраны соединения, гидрофобные и гидрофильные блоки которых имели разную химическую природу, степень полимеризации и архитектуру.

3.1 Характеристика исследованных соединений

3.1.1. Структура

В работе использовали 16 амфифильных соединений: 14 блок-сополимеров и 2 углеводородсодержащих ПАВ. Все соединения условно разделили на 4 группы (табл. 3):

I группа - плюроники

Это основная группа полимеров, которая представлена 8 соединениями - трехблочными сополимерами полиэтилен – и полипропиленоксида, общей формулы АВА. Это коммерческие препараты различной молекулярной массы, различающиеся по степени полимеризации полипропиленоксида (ППО) (гидрофобный блок) и полиэтиленоксида (ПЭО) (гидрофильный блок). Среди них можно выделить три подгруппы (I а, I б, I в), которые различаются длиной гидрофобного блока. Подгруппа I а представлена плюрониками L61, L64, F68, содержащими 30 звеньев пропиленоксида (ПО). Во вторую подгруппу входят плюроники L81, P85, F87, гидрофобный блок которых состоит из 40 звеньев ПО. Третья подгруппа - плюроники F127, P123, у которых гидрофобный блок содержит около 70 звеньев ПО. Внутри каждой подгруппы плюроники различаются по длине гидрофильного блока при постоянном числе звеньев ПО. Так, плюроники с 30 звеньями ПО - L61, L64, F68 содержат 2, 13 и 76 звеньев этиленоксида (ЭО), соответственно. В подгруппе I б с 40 звеньями ПО у плюроников L81, P85 и F87 количество звеньев ЭО составляет 3, 26, 61 соответственно. А в подгруппе I в, полимеры F127 и P123 имеют почти равные по длине гидрофобные блоки – 69 и 70 звеньев ПО соответственно, в то время как блок ЭО содержит 100 (F127) и 20 (P123) звеньев (табл. 3).

Таким образом, выбранные плюроники представляли широкий спектр соотношений длин их гидрофильных и гидрофобного блоков. Это отражается в значениях гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ), которые варьировали в широком диапазоне от 2 до 29 (табл. 3).

Таблица 3. Состав, структура, средневесовая молекулярная масса и гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) исследованных полимеров

№	Состав (обозначение)	Общая формула	M _w	ГЛБ*	ГЛБ**	
I	ЭО ₂ ПО ₃₀ ЭО ₂ (L61)	<p style="text-align: center;">ПЛЮРОНИКИ</p> $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_{m/2}-\left(\text{CH}(\text{CH}_2\text{O})_{\text{CH}_3}\right)_n-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_{m/2}-\text{H}$	2000	3	2	
	ЭО ₁₃ ПО ₃₀ ЭО ₁₃ (L64)		2900	15	8	
	ЭО ₇₆ ПО ₃₀ ЭО ₇₆ (F68)		8400	29	16	
	ЭО ₃ ПО ₄₀ ЭО ₃ (L81)		2750	2	2	
	ЭО ₂₆ ПО ₄₀ ЭО ₂₆ (P85)		4600	16	10	
	ЭО ₆₁ ПО ₄₀ ЭО ₆₁ (F87)		7700	24	14	
	ЭО ₂₀ ПО ₇₀ ЭО ₂₀ (P123) ЭО ₁₀₀ ПО ₆₉ ЭО ₁₀₀ (F127)		5750 12600	8 22	6 14	
t-Bu-ЭО ₂₄ ПО ₁₉ (REP)	$\text{HO}-\left(\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}\right)_{19}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_{24}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_3$	2190		9,6		
II	ПО ₃₀ ЭО ₆ ГЛ ₂ (PG2) ПО ₃₀ ЭО ₆ ГЛ ₃₀ (PG30) ПО ₃₀ ЭО ₆ ГЛ ₇₆ (PG76)	<p style="text-align: center;">ПОЛИГЛИЦЕРИНЫ</p> $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CHO})_{29}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6\text{N}(\text{G})_{n/4}$	2267 3600 7760		1,4 12,4 14,5	
	ГЛ ₂ ПО ₃₀ ЭО ₆ ГЛ ₂ (P(G2) ₂)	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{O}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_{29}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$	2378		2,8	
	III	С ₁₂ Н ₂₅ ЭО ₂₄ (Brij 35) Трет-октил-Ph-ЭО ₁₀ (Triton X-100)	<p style="text-align: center;">ПАВ</p> $\text{C}_{12}\text{H}_{25}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{24}\text{H}$	1225 625	16,9 13,5	17,2 13,5
		IV	Сополимер ЭО и полидиметилсилоксана ЭО ₅₄ -ДМС ₇	$\text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_{54}-\left(\text{CH}_2-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}\right)_6-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$	3000	16,7

*Значения ГЛБ плюроники и сополимера на основе полидиметилсилоксана по данным фирм-производителей.

** Значения ГЛБ, рассчитанные по формуле Гриффина [4].

Чтобы выяснить, является ли строго необходимым трехблочное строение для обеспечения биологических эффектов, действие плуроников сравнили с двублочным сополимером ППО и ПЭО, содержащим трет-бутильный радикал и реакционноспособную ОН-группу на свободном конце гидрофобного блока – REP (Radical, Ethylene oxide, Propylene oxide). Молекулярно-массовые характеристики REP были определены методом ГПХ. Молекулярная масса полимера составила $M_w = 2189$, а коэффициент полидисперсности $M_w/M_n = 1,05$. Массовая доля звеньев ЭО в REP, определённая по ИК-спектру полимера с использованием смесей ПЭО и ППО заданного состава, оказалась равной 48%. На основании этих данных был рассчитан состав полимера – $(CH_3)_3C-(OCH_2CH_2)_{24}(OCH_2CH(CH_3))_{19}-OH$ [130].

II группа - полиглицерины

Для выяснения роли гидрофильного блока при воздействии полимера на клетки был взят ряд соединений, отличающихся от плуроников природой и молекулярной структурой гидрофильного блока. Это сополимеры, у которых гидрофильный блок – разветвленный полиглицерин разной степени полимеризации. В эту группу вошли четыре полимера, синтезированные в Германии в лаборатории проф. Н. Frey. У всех этих сополимеров одинаковый гидрофобный блок - статистический сополимер, содержащий 29 звеньев ПО и 6 звеньев ЭО. Три полимера (PG2, PG30, PG76) – двублочные. Они различаются размером гидрофильного блока, количество остатков глицерина в котором отражено в названиях этих сополимеров и составляет 2, 30 и 76 звеньев глицерина соответственно. По мере увеличения количества таких звеньев возрастают значения ГЛБ этих соединений от 1,4 до 14,5 (табл. 3).

Для исследования влияния количества гидрофильных блоков подобной структуры был взят трехблочный сополимер $P(G2)_2$, отличающийся от двублочного PG2 наличием на противоположном конце цепи еще одного блока полиглицерина, также состоящего из 2 звеньев.

Таким образом, сополимеры этой группы имеют гидрофобный блок сходный по структуре с таковым у плуроников подгруппы I а (табл. 3), но отличаются от них наличием гидрофильного блока иной химической природы и молекулярной структуры - разветвленного полиглицерина.

Необходимо отметить еще одно отличие полимеров II группы от плуроников. Все полиглицерины были получены методом анионной полимеризации глицидола на макроинициаторе - статистическом сополимере ПО и ЭО, содержащим одну или две (в случае $P(G2)_2$) аминогруппы. Поэтому молекулы всех полиглицеринов содержат третичный амин, а в $P(G2)_2$ - два третичных амина.

III группа - ПАВ

В качестве представителей незаряженных ПАВ были взяты Brij-35 и Triton X-100. Их основное отличие от соединений вышеназванных групп состоит в том, что гидрофобная часть этих ПАВ представлена насыщенной углеводородной цепью.

В молекуле Brij-35 - линейный додецильный радикал, а в Triton X-100 - разветвленный п-трет-октилфенильный. Гидрофильная часть у Brij-35 и Triton X-100 образована полиэтиленоксидом разной степени полимеризации – 24 звена (Brij-35) и 10 звеньев (Triton X-100). Молекулярная масса и ГЛБ этих ПАВ указаны в таблице 3.

IV группа - Сополимер на основе полидиметилсилоксана

В отдельную группу был выделен блочный сополимер ЭО и диметилсилоксана, потому что он отличается от всех вышеперечисленных соединений химической структурой гидрофобного блока. В молекуле этого сополимера гидрофильный блок представлен 54 звеньями ЭО, а гидрофобный – семью звеньями диметилсилоксана. У этого полимера небольшая молекулярная масса (3000) и среднее значение ГЛБ (16,7) (табл. 3).

Таким образом, выбранные для исследования соединения различались:

- 1) по химической природе гидрофобного блока – пропиленоксид (PEP, плюроники и полиглицерины), диметилсилоксан (ПДМС) и углеводород (Brij-35 и Triton X-100);
- 2) по химической природе гидрофильного блока – этиленоксид (PEP, плюроники, сополимер на основе полидиметилсилоксана, Brij-35 и Triton X-100) и глицерин (полиглицерины);
- 3) по архитектуре гидрофильного блока – линейные (PEP, плюроники, сополимер на основе полидиметилсилоксана, Brij-35 и Triton X-100) и разветвленные (полиглицерины);
- 4) по степени блочности – двублочные (PEP, ПДМС, полиглицерины PG2, PG30, PG76, ПАВ Brij-35 и Triton X-100) и трехблочные (плюроники, полиглицерин P(G2)₂).

Столь разнообразный набор химических структур был взят для того, чтобы выявить влияние длины, структуры и химической природы гидрофобного и гидрофильного блоков амфифильных соединений на их взаимодействие с клетками.

3.1.2. Расчет гидрофильно-липофильного баланса

В табл. 3 приведены значения ГЛБ исследованных нами соединений. Поскольку данных производителя и литературы о ГЛБ полиглицеринов нет, мы рассчитали его по формуле Гриффина [4]. Для сравнения полученных значений ГЛБ полиглицеринов с ГЛБ полимеров других групп, по этой же формуле были рассчитаны значения ГЛБ для всех остальных полимеров. При сопоставлении результатов обсчета двумя методами, оказалось, что для относительно гидрофобных соединений значения ГЛБ, рассчитанные по формуле Гриффина,

практически совпали с данными производителя. Чего нельзя сказать о гидрофильных полимерах, например, рассчитанные значения ГЛБ плуроников L64, F68, F87 оказались практически вдвое ниже данных производителя (табл. 3). Таким образом, значение ГЛБ того или иного соединения может быть весьма различным в зависимости от способа расчета или определения этого параметра. В то же время было обнаружено, что значение ГЛБ может не зависеть от химической природы блоков, как, например, в случае плуроника L81 и блок-сополимера PG2, имеющих близкие значения ГЛБ, равные 2 и 1,4 соответственно, но разные гидрофильные блоки - ПЭО (L81) и полиглицерин (PG2) (табл. 3).

3.1.3. Критическая концентрация мицеллообразования

Одним из основных свойств исследованных соединений, которое характеризует их поведение в растворе, является способность агрегировать с образованием мицелл. Количественная оценка этого свойства основана на определении концентрации полимера, выше которой он начинает агрегировать – критической концентрации мицеллообразования (ККМ).

Как указывалось выше (см. п. 1.1.1), данные литературы о значениях ККМ рассматриваемых нами соединений весьма разнятся (табл. 1). В связи с этим в настоящей работе для всех исследуемых соединений, за исключением полиглицерина PG76, было определено значение ККМ. Эту величину оценивали по флуоресценции дифенилгексатриена (ДФГТ). Метод основан на резком возрастании флуоресценции этого зонда при его солюбилизации в гидрофобных ядрах мицелл полимера [41].

Перед измерением флуоресценции растворы полимеров инкубировали с ДФГТ в PBS при 37°C в течение 1 ч и затем измеряли интенсивность флуоресценции образцов. Типичная зависимость интенсивности флуоресценции ДФГТ от концентрации полимера показана на примере плуроника L61 (рис. 8). В области концентраций L61 от 10 до 12 мкМ начинается возрастание интенсивности флуоресценции ДФГТ. Причем, этот эффект одинаков при использовании 0,25 мкМ или 5 мкМ ДФГТ, что подтверждает вывод Chattopadhyay и London о том, что значение ККМ слабо зависит от концентрации ДФГТ [41]. ККМ анализируемого полимера определяли по пересечению прямых, как показано на рисунке 8.

Аналогичным образом были определены значения ККМ для всех полимеров (табл. 4). Впервые определена ККМ для полиглицеринов PG2, P(G2)₂ и PG30. Сравнение значений ККМ двублочных полиглицеринов PG2, PG30 и PG76 показывает, что с увеличением гидрофильности возрастает и значение ККМ от 8 ± 1 мкМ до 45 ± 15 мкМ и 1000 мкМ, соответственно (табл. 4). Ранее эта закономерность была обнаружена на плурониках [34]. Наши результаты показывают, что полиглицерины подчиняются той же закономерности.

Исключение составил трехблочный полиглицерин P(G2)₂. Несмотря на низкое значение ГЛБ (3,3), его ККМ = 40 ± 15 мкМ оказалась сходной с таковой у PG30 (ККМ = 45 ± 15 мкМ). Вероятно, это объясняется наличием двух третичных аминов в молекуле P(G2)₂, ионизация которых при pH 7,3 препятствует агрегации одноименно заряженных молекул и тормозит образование мицелл.

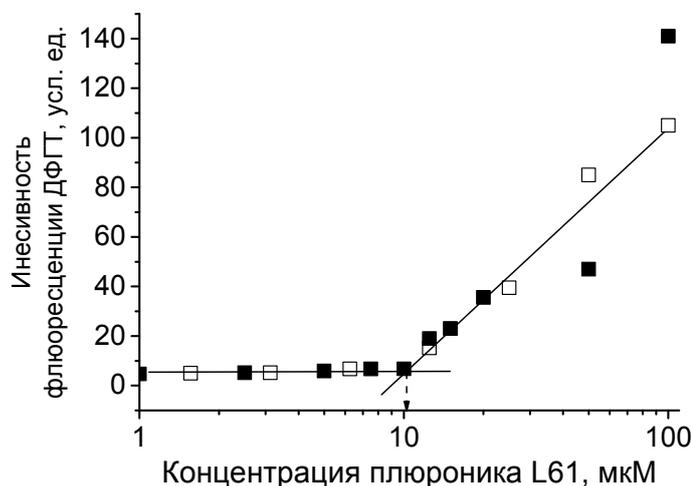


Рис. 8. Зависимость интенсивности флуоресценции ДФГТ от концентрации плуроника L61. Концентрация ДФГТ 0,25 мкМ (□) и 5 мкМ (■). Стрелкой указано значение ККМ

Определенные в настоящей работе значения ККМ плуроников и ПАВ (табл. 4, колонка 1) согласуются с результатами большинства исследователей (табл. 4, колонка 2). Отличия наблюдаются только от данных, полученных в двух лабораториях - P. Alexandridis [18] и А.В. Кабанова [24, 26, 28] (табл. 4, колонки 3 и 4). Так, значения ККМ плуроников L64, F68, P85 и F127, определенные Alexandridis с соавт., в среднем на порядок превышают значения, описанные в литературе другими авторами (колонка 2) и полученные в настоящей работе (колонка 1). Сотрудники А.В. Кабанова также получили существенно завышенные значения ККМ для плуроников L61, L81, F87 и P123. ККМ плуроника F68 в их работах варьировала от 12000 мкМ [28] до 1140 [26] и 480 мкМ [24]. Среднее последних двух значений совпадает с ККМ, определенной нами (табл. 4).

Таблица 4. Критическая концентрация мицеллообразования исследованных соединений

Соединение	1. Значения ККМ, определенные в настоящей работе, мкМ	Данные литературы		
		2. Близкие к полученным в настоящей работе, мкМ	3. Данные Alexandridis с соавт., мкМ [18]	4. Данные Кабановым А. В. с соавт., мкМ
L61	11 ± 1	-	-	110 [24]
L64	100 ± 25	-	1379 (35°) и 344 (40°)	480 [24]
F68	800 ± 200	1400 [27]	8333	12000 [28] 1140 [26] 480 [24]
L81	3 ± 1	-	-	23 [24]
P85	90 ± 30	65 - 66 [29, 30] 100 [31]	434 (35°)	8,7 [28]
F87	40 ± 10	-	-	91 [24]
P123	0,5 ± 0,1	0,57 (43°) и 1,7 (35°) [33] 2,5 (25°C) [34]	-	4,4 (37°) [24]
F127	1,5 ± 0,5 610 ± 140	0,8 [38], 2,8 [39] 4 (42°) [33] 0,08 и 500 [37] 635 [35], 800 [27] 555 - 794 [19, 36]	19 (35°) и 6 (40°)	-
PG2	8 ± 1	-	-	-
PG30	45 ± 15	-	-	-
PG76	-	1000 [60]	-	-
P(G2) ₂	40 ± 10	-	-	-
REP	20 ± 5	37 [40]	-	-
Triton X-100	240 ± 40	279 [41]	-	-
Brij-35	40 ± 5	45 (30°) [42], 41 [43], 85 [44]	-	-
ЭО ₅₄ -ДМС ₇	15 ± 5	-	-	-

Одной из причин столь сильных различий в значениях ККМ полимеров, определенных разными авторами, может быть гетерогенность самого полимера [48]. Это подтвердили результаты анализа препарата плуроника F127. При его взаимодействии с ДФГТ зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации полимера имела двуступенчатый вид (рис. 9).

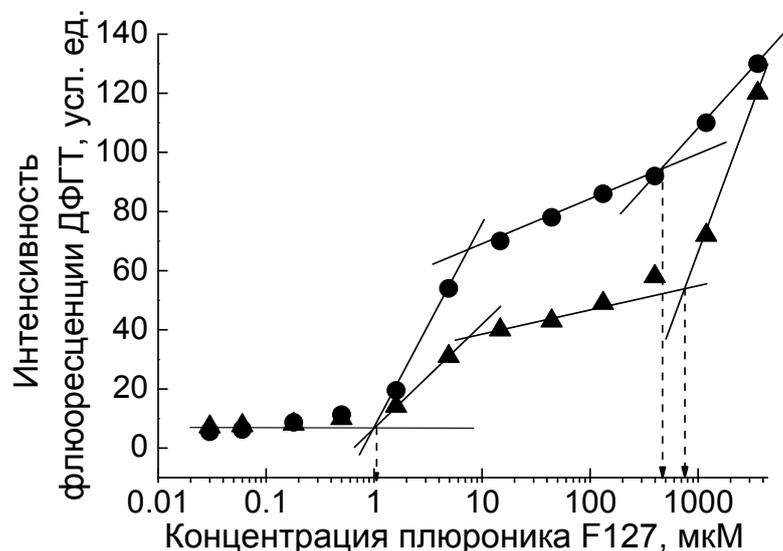


Рис. 9. Зависимость интенсивности флуоресценции ДФГТ от концентрации плуроника F127. Концентрация ДФГТ – 0,25 мкМ. Приведены данные двух опытов, обозначенных ▲ и ●. Стрелками указаны два значения ККМ

Значения ККМ, рассчитанные как показано на рис. 9, соответствовали $1,5 \pm 0,5$ мкМ и 610 ± 140 мкМ. Два значения ККМ у плуроника F127 (0,08 мкМ и 500 мкМ) были обнаружены также и другими авторами [37]. В ряде работ описаны только высокие (600 - 800 мкМ) значения ККМ [27, 35, 19, 36] или только низкие (0,8 - 4 мкМ) [33, 38, 39]. Таким образом, полученные нами значения ККМ плуроника F127 полностью совпали с данными литературы.

Анализ этого полимерного препарата методом ГПХ выявил основной компонент с $M_w = 12600$, отвечающий полноразмерному плуронику F127, и низкомолекулярную примесь ($M_w = 5500$). Поскольку плуроники получают полимеризацией ЭО на блоке ППО, длина ППО в примеси должна быть такой же, как в плуронике F127, т.е. содержать 69 звеньев ПО. Принимая молекулярную массу ПО-звена равной 58, а ЭО-звена – 44, был рассчитан состав примеси $PO_{69}EO_{33}$. Массовое соотношение звеньев ПО и ЭО в ней почти такое же, как у плуроника P123 – $PO_{70}EO_{40}$. Поэтому мы полагаем, что значение $KCM = 1,5 \pm 0,5$ мкМ, близкое к ККМ плуроника P123, принадлежит примеси. Тогда значение $KCM = 610 \pm 140$ мкМ – это ККМ полноразмерного плуроника F127. При анализе того же препарата F127 методом статического светорассеяния мицеллы появлялись только при его концентрации более 550 мкМ. Этим методом не удалось зарегистрировать образование мицелл при концентрации

плюроники 1 – 10 мкМ. Повидимому содержание примеси в препарате F127 невелико.

Таким образом, результаты исследования плюроники F127 подтвердили выводы Р. Linse о влиянии состава полимерного препарата на его ККМ [48].

В литературе обсуждался вопрос о том, что значение ККМ полимера также может зависеть от выбранного метода его определения [27, 31]. Поэтому на примере двух блок-сополимеров ПЭО и ППО – плюроники F127 и REP мы проверили результаты, полученные с помощью ДФГТ, методом статического светорассеяния. При определении указанным методом ККМ плюроники F127 составила 550 мкМ, а для REP – 22 мкМ, что согласуется с результатами определения ККМ по флуоресценции ДФГТ (табл. 4). Таким образом, значения ККМ не зависели от метода их определения. К такому же выводу пришли авторы статей при сравнении результатов определения ККМ методом поверхностного натяжения и с использованием флуоресцентных зондов [27, 31].

В процессе работы по определению ККМ мы обнаружили фактор, который может изменять кажущееся значение ККМ на порядок. По нашим наблюдениям на это влияет диапазон концентраций полимера, исследованных в области до ККМ. Дело в том, что флуоресцентный метод определения ККМ с помощью ДФГТ основан на эффекте резкого возрастания флуоресценции при его внедрении в гидрофобное ядро мицелл [41]. Следовательно, в отсутствие мицелл интенсивность флуоресценции должна быть постоянна независимо от концентрации полимера. Если в эксперименте увеличение концентрации полимера сопровождается пусть небольшим, но неуклонным ростом измеряемой флуоресценции, то определение ККМ по этим данным приведет к искажению результатов и получению завышенных значений ККМ. Сказанное можно проиллюстрировать результатами эксперимента с плюронилом F68 (рис. 10).

По мере увеличения концентрации плюронила от 0,1 до 1 мМ наблюдалось постепенное увеличение флуоресценции (рис. 10, кривая 1); в данном случае значение ККМ = 6 мМ. В диапазоне концентраций 0,002 – 0,1 мМ интенсивность флуоресценции колебалась около некоего постоянного значения; в результате значение ККМ было определено более точно, и оно понизилось до 0,8 мМ (рис. 10, кривая 2). Таким образом, выбор анализируемых концентраций полимера действительно может изменить кажущееся значение ККМ в несколько раз. Поскольку последний вариант постановки эксперимента соответствует принципу использования ДФГТ в качестве теста мицеллообразования, мы полагаем, что значение ККМ 0,8 мМ определено корректно.

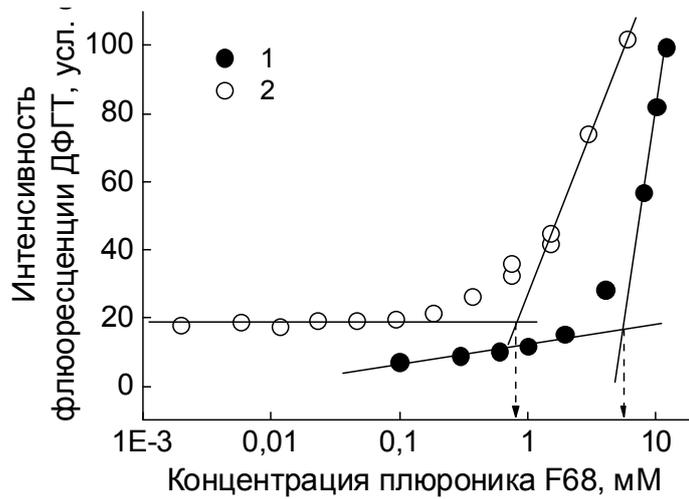


Рис. 10. Зависимость интенсивности флуоресценции ДФГТ от концентрации плюроника F68. Диапазон концентраций плюроника F68 - $0,1 \div 12$ мМ (1) и $0,002 \div 6$ мМ (2). Стрелками указаны значения ККМ. Концентрация ДФГТ в обоих опытах – 8 мкМ

Сдвиг ККМ также может быть следствием изменения свойств полимерного препарата в процессе его хранения. Так, при анализе блочного сополимера на основе полидиметилсилоксана ЭО₅₄-ДМС₇, хранившегося при +4°C, было обнаружено, что на следующий день после приготовления раствора полимера, мицеллообразование начиналось при концентрации 15 ± 5 мкМ, а спустя трое суток значение ККМ увеличилось до 65 мкМ (рис. 11).

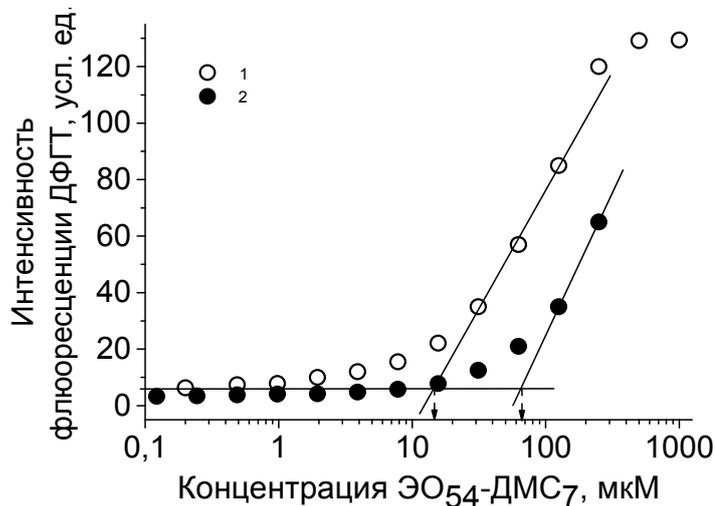


Рис. 11. Зависимость интенсивности флуоресценции ДФГТ от концентрации сополимера на основе полидиметилсилоксана. ККМ определяли после 20 ч (кривая 1) и 3 суток (кривая 2) хранения при 4°C раствора 10% сополимера в воде. Стрелками указаны значения ККМ. Концентрация ДФГТ – 5 мкМ

Возможно ранее определенное в нашей лаборатории высокое значение ККМ = 167 мкМ [154] было получено на длительно хранившемся препарате ЭО₅₄-ДМС₇.

Такое повышение ККМ может быть вызвано изменениями в структуре мицелл полимера при его хранении. Действительно, в ходе анализа полимеров методом динамического светорассеяния было обнаружено, что в процессе хранения раствора плуроника P123 в PBS увеличивался размер мицелл (рис. 12).

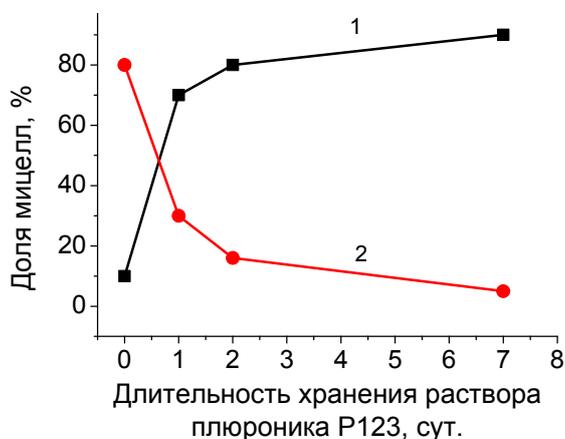


Рис. 12. Изменение размеров мицелл плуроника P123 в процессе хранения. Кривая 1 – доля мицелл радиусом 35-45 нм; кривая 2 – доля мицелл радиусом 7,3 нм. Раствор 10 мг/мл P123 в PBS хранился при 4⁰С. Размеры мицелл определяли методом динамического светорассеяния с помощью гониометра лазерного света

Сразу после растворения полимера при концентрации 10 мг/мл подавляющая доля мицелл (80%) была небольшого радиуса (7,3 нм), а на следующий день их количество уменьшилось до 30% и продолжало снижаться в процессе хранения (рис. 12, кривая 2). В то же время в этих образцах наблюдалось образование мицелл радиусом 35-45 нм, доля которых постепенно увеличивалась (рис. 12, кривая 1). Таким образом, при растворении плуроника P123 в PBS сначала образуются мелкие мицеллы, которые при хранении при 4⁰С сливаются.

Таким образом, для всех 14 выбранных соединений были определены значения ККМ. При этом для полиглицеринатов этот параметр был измерен впервые. Для полимеров F127 и PEP значения ККМ были получены двумя независимыми методами – по флуоресценции ДФГТ и методом статического светорассеяния. Значения ККМ плуроников F68, P85, F87, P123, F127 и поверхностно-активных соединений Triton X-100 и Brij-35 согласуются с большинством данных литературы. Существенные расхождения значений ККМ были обнаружены для плуроников L61, L81 и блочного сополимера на основе полидиметилсилоксана. Проведенный нами анализ возможных причин таких противоречий позволяет заключить, что основными факторами являются гетерогенность препаратов полимеров, их изменение в процессе хранения и некорректное использование метода определения ККМ с помощью ДФГТ.

3.2. Цитотоксичность исследованных соединений

На первом этапе исследования биологических эффектов полимеров была определена их собственная токсичность для клеток (цитотоксичность), так как к началу работы систематических исследований в этой области не проводилось. Для этого была налажена методика определения токсичности полимеров для клеток в культуре, которая применялась также для определения токсичности доксорубина и влияния полимеров на устойчивость клеток к нему.

3.2.1. Определение цитотоксичности: обоснование метода

Клетки инкубировали в течение 1 ч с раствором ксенобиотика (полимер, DOX или их смесь) разной концентрации, в среде без сыворотки. Контролем служили образцы клеток, которые инкубировали в бессывороточной среде без ксенобиотика. Затем среду инкубации заменяли на полную культуральную и культивировали клетки без ксенобиотика в течение 3 суток в стандартных условиях. По истечении этого периода определяли долю выживших клеток относительно их количества в контроле.

Такая схема анализа цитотоксичности была выбрана по следующим причинам. Длительность инкубации с ксенобиотиком (1 ч) основана на результатах наших предварительных исследований по скорости накопления доксорубина в клетках. Интенсивность его флуоресценции возрастает в течение первых 30 - 35 мин инкубации, после чего его количество в клетках остается постоянной (рис. 13 А). Этот результат согласуется с данными литературы о скорости накопления даунорубина в линии устойчивых клеток карциномы яичника человека SKVLB, где было показано, что накопление антибиотика в клетках достигает постоянного уровня через 1 ч инкубации с лекарством [101]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что для тестирования влияния ксенобиотиков на клетки достаточно их взаимодействия в течение 1 ч.

Длительность культивирования клеток после удаления препарата была выбрана на основании результатов предварительных экспериментов, которые показали, что гибель клеток наиболее ярко выражена на третьи сутки после инкубации с антибиотиком (рис. 13 Б). Поэтому цитотоксичность ксенобиотика оценивали по истечении 3 суток после его удаления из среды культивирования.

Поскольку полимеры разной структуры могут различаться по способности взаимодействовать с компонентами сыворотки с образованием комплексов, не токсичных для клеток, то во избежание ее возможного влияния цитотоксичность полимеров и DOX анализировали в бессывороточной среде. Описанная схема анализа применялась во всех экспериментах, выполненных в ходе настоящей работы: для определения цитотоксичности

DOX и полимеров, а также влияния полимеров на устойчивость клеток к DOX.

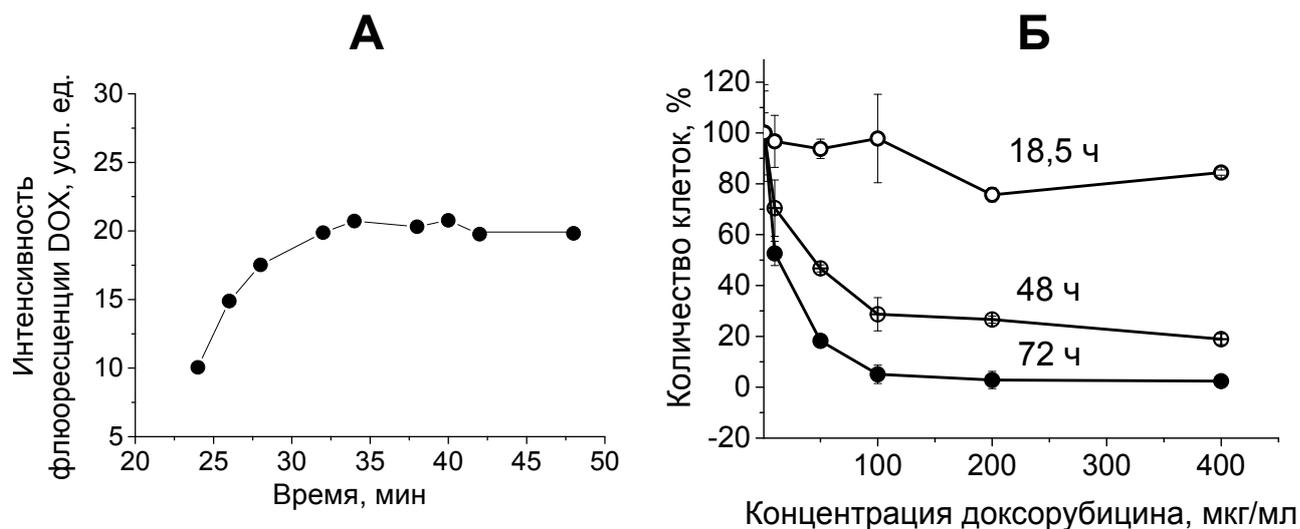


Рис. 13. Внутриклеточное накопление и цитотоксичность доксорубина (DOX): **А** – кинетика накопления DOX в клетках MCF7/R, определенная по интенсивности флюоресценции DOX в ядрах; **Б** – количество клеток MCF7/R, выживших после инкубации с DOX и последующего культивирования в стандартных условиях в течение 18,5 ч, 24 ч и 72 ч

3.2.2. Токсичность доксорубина для клеток MCF7/R

Эксперименты проводили на раковых клетках человека линии MCF/R устойчивых к действию противоопухолевых антибиотиков, в частности, доксорубину, который используется в химиотерапии. Уровень устойчивости клеток определяли по концентрации DOX, при которой наблюдается гибель 50% клеток (IC_{50}^{DOX}). Во всех опытах использовали клетки, у которых $IC_{50}^{DOX} = 90-100$ мкг/мл (рис. 14, ■). Для сравнения, IC_{50}^{DOX} клеток MCF7, не обладающих устойчивостью к лекарствам, составляет менее 1 мкг/мл (рис. 14, ○). В процессе культивирования клеток MCF7/R их устойчивость к DOX постепенно снижается до $IC_{50}^{DOX} = 10 - 20$ мкг/мл (рис. 14, ☒). Чтобы ее поддерживать на уровне $IC_{50}^{DOX} = 90-100$ мкг/мл, требовалось периодически (не менее чем раз в месяц) культивировать клетки в присутствии 5 мкг/мл DOX в течение 3 суток. Снижение устойчивости в процессе культивирования свойственно не только клеткам MCF7/R, но также, например, и эритромиелобластоидным клеткам линии K562/R. Для поддержания устойчивости к лекарствам авторы культивировали эти клетки постоянно в присутствии 1 мкг/мл DOX [138]. Для опытов по оценке биологических эффектов полимеров использовали стимулированные клетки после двух - трех пересевов и культивирования в среде без DOX.

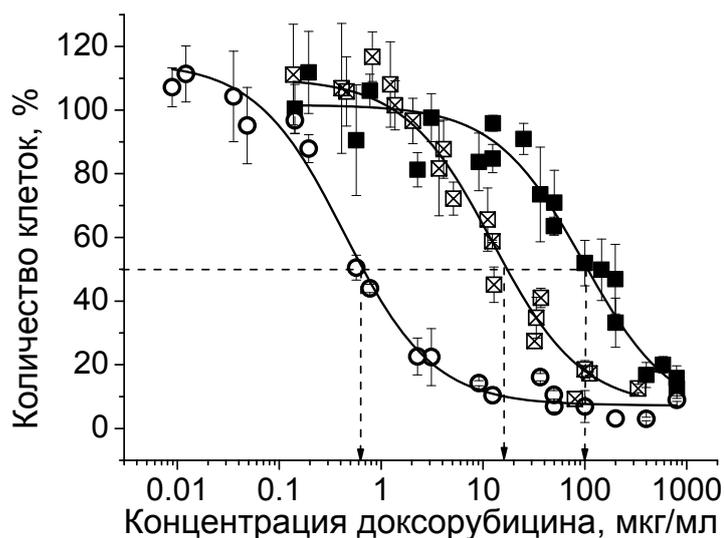


Рис. 14. Зависимость количества выживших клеток от концентрации доксорубицина: для исходной линии клеток MCF7, не обладающей устойчивостью к лекарствам (O), устойчивых клеток MCF7/R (■) и клеток MCF7/R с пониженной устойчивостью (⊠). Стрелками указаны концентрации лекарства, при которых количество клеток снижается до 50% (IC_{50}^{DOX})

3.2.3. Цитотоксичность исследованных соединений

Токсичность полимеров и ПАВ для клеток MCF7/R исследовали тем же методом, что и токсичность DOX, а именно, определяя долю клеток, выживших после одночасовой инкубации в бессывороточной среде DMEM в присутствии различных концентраций полимера и последующего культивирования без полимера в полной среде в течение трех суток. Зависимость количества выживших клеток от концентрации полимера описывается сигмоидальной кривой, как показано на примере определения цитотоксичности плуроника L81 (рис. 15). Цитотоксичность соединений принято характеризовать их концентрацией, вызывающей гибель 50% клеток (IC_{50}), поскольку это наиболее точно определяемая величина на сигмоидальной кривой. Однако для наших последующих экспериментов по исследованию влияния полимеров на токсичность DOX, в которых клетки инкубируют в смеси полимера и антибиотика, необходимо было добавлять полимеры в заведомо не токсичной концентрации, чтобы исключить их вклад в измеряемую цитотоксичность смеси. Поэтому при анализе полимеров нужно было выявить ту область их концентраций, в которой они не проявляют собственную цитотоксичность. В качестве такой характеристики была выбрана максимальная концентрация полимера, не вызывающая гибели клеток - наибольшая нетоксичная концентрация (ННК). Ее определяли по графику как концентрацию, выше которой начиналось снижение количества клеток (рис. 15). Так, ННК плуроника L81 варьировала в разных опытах от 10 до 20 мкМ, а IC_{50} составляла 40 ± 3 мкМ.

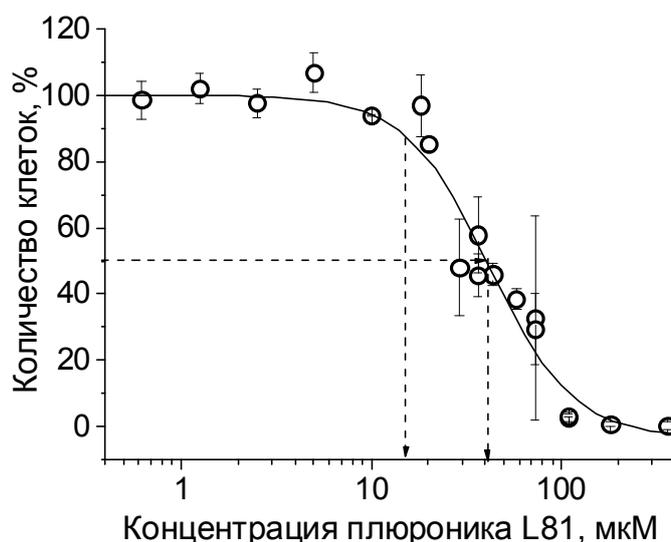


Рис. 15. Зависимость количества выживших клеток от концентрации плюроника L81. Стрелками указаны ННК = 15 мкМ и IC_{50} = 40 мкМ. Приведены усредненные данные трех опытов

Используя такой подход, были определены значения ННК и IC_{50} для всех полимеров (табл. 5). В ранее опубликованных работах была обнаружена цитотоксичность у четырех плюроников L61, L64, P85 и P123, и определена их ННК, выраженная в процентной концентрации (п. 1.3). Для сравнения с результатами, полученными в настоящей работе, эти данные литературы приведены в табл. 5 в молярной концентрации. Видно, что значения ННК каждого из этих плюроников, определенные нами и большинством других исследователей, лежат в одной области концентраций. Так, например, по данным литературы ННК плюроника L61 варьирует от 26 до 158 мкМ, а значение ННК, определенное нами, составило 100 ± 20 мкМ. Полученное нами значение ННК плюроника L64 (200 ± 50 мкМ) соответствует результатам Redhead с соавт. [139]. Мы полагаем, что полученные нами значения ННК полимеров более точные, т.к. для их определения мы подробно анализировали концентрационную зависимость, разбавляя полимеры в 2 раза, тогда как во всех опубликованных работах полимеры титровали с шагом в 10 раз.

Существенные различия в значениях ННК для плюроников P85 и P123 обнаружены при сравнении с данными работы [119]. Цитотоксичность полимеров, полученная этими авторами на устойчивых раковых клетках линии MCF7/R, оказалась очень высокой: ННК P85 составила 2,2 мкМ, а для P123 этот параметр находился в диапазоне от 1,7 мкМ до 17,2 мкМ. Вероятно, столь низкие значения ННК обусловлены тем, что авторы инкубировали клетки в присутствии полимеров довольно долгое время – 72 ч, что намного превышает время инкубации, выбранное нами (1 ч) и другими авторами.

Наши результаты не согласуются с данными Кабанова с соавт. о цитотоксичности P85,

полученными на перевиваемых клетках линий SKOV3 и SKVLB [101] и первичной культуре эпителиальных клеток сосудов мозга быка [133]. Согласно данным этих авторов данный плуроник не токсичен вплоть до 5% концентрации (10870 мкМ), что на один - два порядка превосходит наши результаты (550 ± 150 мкМ) и результаты других авторов (табл. 5).

Следует особо отметить, что наши данные по ННК для плуроников L61 и L64 совпали с результатами работы Redhead с соавт. [139], которые анализировали цитотоксичность плуроников, инкубируя клетки с полимерами в течение 5 ч в среде, содержащей 10% сыворотки. Близость значений ННК, полученных в работе [139] и нами свидетельствует о том, что наличие 10% сыворотки в среде или ее отсутствие не оказывает существенного влияния на цитотоксичность плуроников.

В целом ряде работ принято мнение, что гидрофильные плуроники F68 и F127 не токсичны для клеток в культуре [119, 166, 167, 168]. Это мнение основано на результатах экспериментов, в которых указанные полимеры тестировали в концентрациях, не превышающих 1%. Однако по нашим данным эти полимеры обладают цитотоксичностью, но она проявляется при более высокой концентрации: выше 3,8% (4500 мкМ F68) и 4,4% (3500 мкМ F127). Таким образом, нам удалось впервые выявить токсичность гидрофильных плуроников по отношению к клеткам в культуре и определить значения ННК этих полимеров (табл. 5). Также впервые были определены наибольшие нетоксичные концентрации плуроников L81, F87, полиглицеринов и сополимера на основе полидиметилсилоксана (табл. 5).

Значения ННК исследованных полимеров варьируют в поразительно широком диапазоне концентраций, в пределах трех порядков: от 9 ± 1 мкМ (PG2) до 4500 ± 500 мкМ (F68). Чем гидрофильнее блок-сополимер, тем он менее токсичен для клеток, т.е. клетки выдерживают более высокую концентрацию полимера, что выражается в увеличении его ННК.

Зависимость ННК от массы гидрофильного блока особенно демонстративна при сравнении полимеров одной группы. Так, для полимеров, гидрофильность которых определяется количеством остатков глицерина в их молекуле, с увеличением их количества с 2 до 30 и 76 гибель клеток становится заметной при более высокой концентрации полимера (рис. 16). Если блок-сополимер, содержащий 2 звена глицерина, становится токсичным для клеток при концентрациях выше 10 мкМ (PG2), то при наличии 30 звеньев глицерина - при концентрации более 170 мкМ (PG30), а с 76 глицериновыми звеньями - при концентрации выше 2800 мкМ (PG76).

Аналогичная зависимость была обнаружена и у плуроников. С увеличением массовой доли гидрофильного блока ПЭО от 40% (L64) до 50% (P85) и 70% (F127) увеличивались и значения ННК с 200 ± 50 мкМ до 550 ± 150 мкМ и 3500 ± 500 мкМ, соответственно (табл. 5).

Прямо противоположное влияние на цитотоксичность оказывает гидрофобный блок. Увеличение количества звеньев ПО в плурониках с 30 (L61) до 40 (L81) при почти одинаковом содержании гидрофильных звеньев ЭО (4 и 6, соответственно) снижало ННК в 6 раз (табл. 5).

Таблица 5. Наибольшие нетоксичные концентрации (ННК) полимеров и концентрации, при которых наблюдается гибель 50% клеток (IC_{50})

Полимер	ННК, мкМ	IC_{50} , мкМ	Данные литературы по ННК, мкМ
L61	100 ± 20	230 ± 40	26 [167] 53 [139] 158 [168]
L64	200 ± 50	430 ± 20	200 - 345 [139]
F68	4500 ± 500	8000 ± 1200	> 1191 [119, 165, 166, 167, 168]
L81	15 ± 5	40 ± 3	-
P85	550 ± 150	2100 ± 300	2,2 [119] 109 [167] 217 [168] 1087 [176] > 10870 [101, 133]
F87	1200 ± 200	4080 ± 920	-
P123	450 ± 100	910 ± 150	1,7 – 17, 2 [119] 1035 [167] 1724 [165]
F127	3500 ± 500	4800 ± 650	> 800 [119, 166, 167, 168] > 4000 [165]
REP	450 ± 100	900 ± 40	-
PG2	9 ± 1	$20 \pm 0,4$	-
PG30	170 ± 30	340 ± 10	-
PG76	2800 ± 300	4000 ± 100	-
(PG2) ₂	14 ± 2	24 ± 2	-
Brij-35	25 ± 1	$30 \pm 0,8$	-
Тритон X-100	50 ± 8	60 ± 3	-
ЭО ₅₄ -ДМС ₇	600 ± 150	1500 ± 200 [154]	-

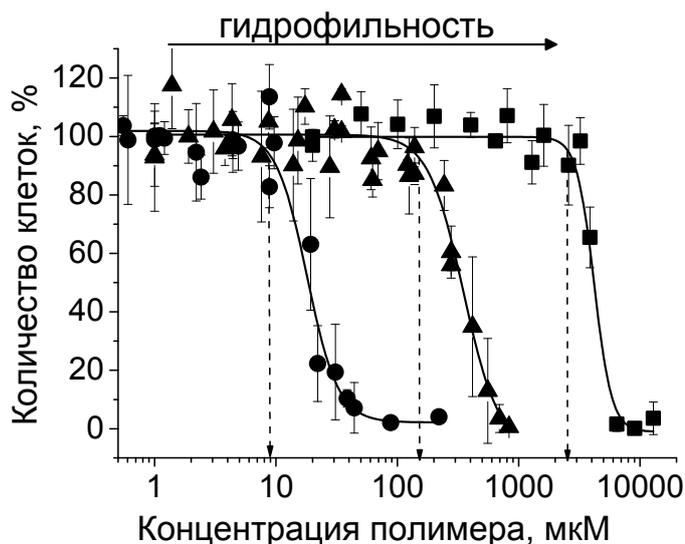


Рис. 16. Зависимость количества выживших клеток от концентрации сополимеров полиглицерина и ППО: PG2 (●), PG30 (▲) и PG76 (■). Усредненные значения получены на основе 2-3 экспериментов. Значения ННК полимеров показаны стрелками

Интересно отметить, что токсичность полимеров слабо зависела от особенностей химической структуры гидрофильных и гидрофобного блоков, а в основном определялась их соотношением, т.е. ГЛБ сополимера. Так, плуроник L81 и блок-сополимер PG2, имеющие близкие значения ГЛБ около 1,5-2, проявляли сходную цитотоксичность (ННК равна 15 ± 5 мкМ и 9 ± 1 мкМ, соответственно), несмотря на различную химическую природу гидрофильных блоков этих полимеров. Сопоставление значений ГЛБ и ННК полимеров показало, что полимерам с ГЛБ = $1 \div 3$ свойственна ННК в диапазоне $10 \div 100$ мкМ. В эту группу входят гидрофобные сополимеры, у которых гидрофильный блок составляет около 10 % масс.: плуроники L61, L81 и полиглицерины PG2 и P(G2)₂. У более гидрофильных полимеров с ГЛБ = $7 \div 17$ значения ННК находятся в диапазоне $200 \div 600$ мкМ. К ним относятся плуроники P123, L64, P85 и двублочный REP, гидрофильный блок ПЭО которых составляет 30 – 50 % масс., полиглицерин PG30 и сополимер на основе полидиметилсилоксана. Наконец, наиболее гидрофильные полимеры с ГЛБ = $25 \div 29$ характеризуются ННК = $900 \div 4500$ мкМ. Таковы плуроники F68, F87, F127 и полиглицерин PG76, в которых гидрофильный блок составляет 70-80 % масс.

О прямой связи между гидрофильно-липофильным балансом полимера и его цитотоксичностью свидетельствует удовлетворительная корреляция между значениями IC_{50} и ГЛБ полимеров в двойных логарифмических координатах ($r^2 = 0,88$) (рис. 17).

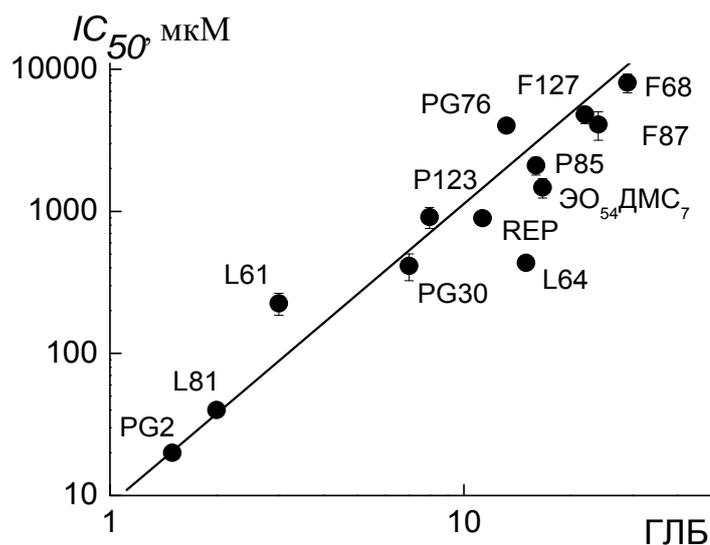


Рис. 17. Зависимость концентраций полимеров, при которых наблюдается гибель 50% клеток (IC_{50}), от ГЛБ

Данная зависимость описывается уравнением $\lg IC_{50} = 2,1 \times \lg ГЛБ - 5,06$. Потенцирование этого уравнения приводит к выражению $IC_{50} (\mu\text{M}) = 8,71 \times ГЛБ^{2,1}$, по которому можно рассчитать IC_{50} блок-сополимера, зная его ГЛБ. Предсказательная способность обнаруженной эмпирической зависимости была проверена на синтезированных в нашей лаборатории блочных и привитых сополимерах ППО и декстрана различного состава (табл. 6). По формуле Гриффина были рассчитаны значения ГЛБ этих полимеров и, подставив их в вышеуказанное уравнение, мы получили значения IC_{50} . Экспериментально определенные значения IC_{50} оказались величинами того же порядка (табл. 6). Таким образом, обнаруженная нами связь между ГЛБ и цитотоксичностью справедлива не только для линейных амфифильных блок-сополимеров, но и для макромолекул, имеющих архитектуру молекулярных щеток.

Таблица 6. Состав и свойства сополимеров ППО и декстрана

Полимер	M_w	M_w/M_n	ГЛБ	ККМ, мкМ	Значение IC_{50} , мкМ	
					Рассчитанное	Экспериментальное
Дех ₃₅ - ПО ₃₅	11500	1,5	15	$0,4 \pm 0,1$	722	435 ± 174
Дех ₁₂ - ПО ₃₅	11400	2,76	9,4	$0,9 \pm 0,1$	246	666 ± 30
Дех ₃₀₀ - (ПО ₃₅) ₃	105600	1,7	18	$0,3 \pm 0,04$	121	81 ± 11
Дех ₃₀₀ - (ПО ₃₅) ₅	89700	1,6	17	$0,2 \pm 0,06$	125	167 ± 11

Возможность предварительного расчета области токсичных концентраций позволяет существенно ускорить экспериментальное определение ННК нового полимера. Обычно эта процедура занимает около месяца, поскольку в силу вариабельности этого параметра у разных

полимеров ее определение требует проведения 3 - 4 опытов. Однако после предварительного расчета ННК достаточно одного опыта для проверки и уточнения рассчитанной величины.

Таким образом, проведенный анализ цитотоксичности блок-сополимеров различного строения показал, что независимо от химической природы гидрофобного и гидрофильного блоков, их соотношение определяет токсичность полимера для клеток в культуре: чем больше значение ГЛБ, тем выше концентрация полимера нетоксичная для клеток. Эта закономерность хорошо согласуется с классическими работами К. Ганша, показавшего на примере нескольких тысяч органических веществ, что токсичность соединения коррелирует с его гидрофобностью, определяемой по коэффициенту распределения в системе октанол/вода. Однако, насколько нам известно, аналогичные данные по высокомолекулярным соединениям в литературе отсутствуют.

3.2.4. Сопоставление цитотоксичности и мицеллообразования исследованных соединений

При рассмотрении взаимосвязи между структурой полимера, его физико-химическими свойствами и цитотоксичностью возник вопрос, в какой форме полимер становится токсичным для клеток – в виде юнимеров или мицелл? Для ответа на этот вопрос мы сопоставили значения КKM полимеров и их концентрации, выше которых они становятся токсичными для клеток (ННК). Оказалось, что у Brij-35, Triton X-100 и полиглицерина P(G2)₂ ННК < КKM (рис. 18 А). Это значит, что данные соединения проявляют цитотоксичность, когда они присутствуют в растворе в виде отдельных молекул (юнимеров). В случае Brij-35 и Triton X-100 это объясняется хорошей термодинамической совместимостью углеводородного фрагмента молекулы ПАВ с областью остатков жирных кислот липидной мембраны. Высокое сродство полиглицерина P(G2)₂ к плазматической мембране клеток может быть объяснено электростатическим взаимодействием третичных атомов азота его молекулы, положительно заряженных при физиологическом значении pH, и отрицательно заряженной наружной клеточной мембраной. Это предположение подтверждается ранее опубликованными данными о том, что третичные аминогруппы в составе Тетронигов (этилендиамин алкилированный блоками ПЭО и ППО по каждой аминогруппе) увеличивают их цитотоксичность по отношению к клеткам линии Сасо-2 [124].

Все остальные исследованные в настоящей работе блок-сополимеры становились токсичными при концентрациях выше КKM (рис. 18 Б). Этот результат свидетельствует о том, что они проявляют цитотоксичность только в виде мицелл. При концентрациях ниже КKM они нетоксичны для клеток в культуре.

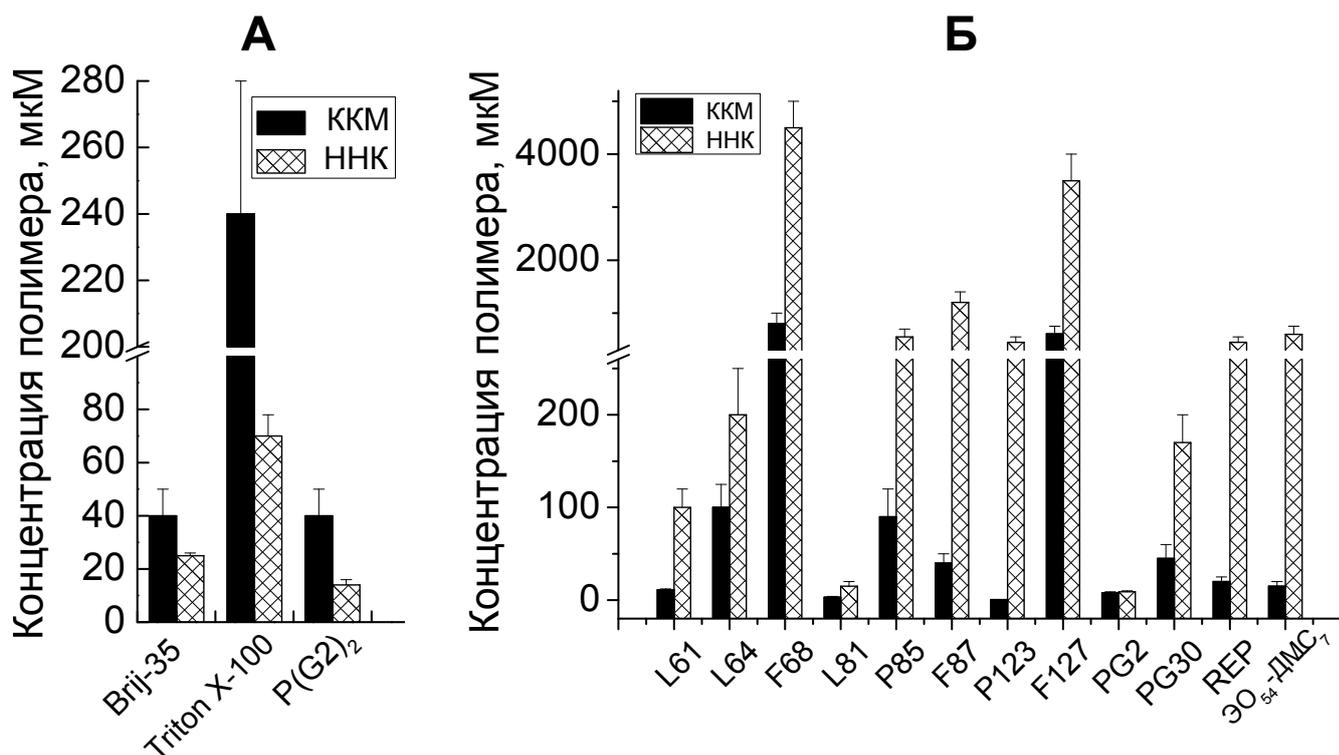


Рис. 18. Сопоставление критической концентрации мицеллообразования (ККМ) и наибольшей нетоксичной концентрации (ННК) исследованных соединений. **А** – Brij-35, Triton X-100; P(G2)₂ с ННК < ККМ, **Б** – блок-сополимеры с ННК > ККМ. Гистограммы построены по данным, приведенным в табл. 4 (ККМ) и табл. 5 (ННК)

Таким образом, образование мицелл - необходимое условие проявления цитотоксичности незаряженных блок-сополимеров, гидрофобный блок которых представлен ППО или ПДМС, а гидрофильный состоит из звеньев этиленоксида или глицерина. Это свойство присуще как трехблочным (плюроники), так и двухблочным (REP, ЭО₅₄-ДМС₇, PG2, PG30) сополимерам (рис. 18 Б). Оно не зависит от соотношения масс гидрофильного и гидрофобного блоков и от строения гидрофильного блока: ННК > ККМ и у плюроники, содержащих в качестве гидрофильного блока линейный ПЭО, и у полиглицеринов с разветвленным гидрофильным блоком из остатков глицерина.

Возникает вопрос, почему же именно мицеллы блочных полимеров ответственны за проявление цитотоксичности? Можно предположить, что *одновременное* присоединение к клеточной мембране *большого количества молекул* сополимера в виде мицеллы приводит к многоточечному взаимодействию полимера и липидов, как показано на рис. 3 Б. Увеличение количества контактов может приводить к изгибанию клеточной мембраны и формированию обращенных мицелл полимера, ориентированных гидрофобными участками к липидам мембраны, а гидрофильными - в образующееся сквозное отверстие, через которое вытекает водорастворимое содержимое клетки, что и приводит к ее гибели (рис. 19).

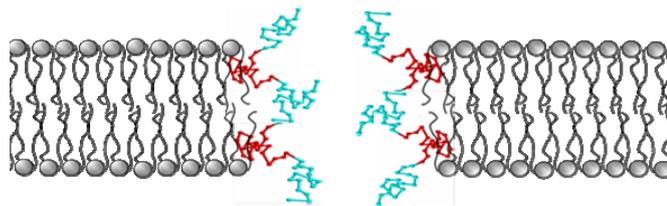


Рис. 19. Образование сквозного отверстия в наружной липидной мембране клетки под действием мицеллы блок-сополимера. Гидрофобный блок молекулы полимера окрашен красным цветом, а гидрофильные блоки – голубым

Данное предположение согласуется с результатами работы Redhead с соавт., которые показали двумя методами, что инкубация клеток с плурониками в токсичной концентрации приводит к вытеканию белков из клеток в окружающую среду: гемоглобина из эритроцитов и фермента гликолиза лактатдегидрогеназы из эпителиальных клеток Caco-2 [139]. Этот результат указывает на образование отверстий в наружной клеточной мембране достаточно больших для прохождения таких крупных молекул как гемоглобин Mw 68000 и лактатдегидрогеназа Mw 140000. Мы полагаем, что образование таких сквозных отверстий возможно только при определенной концентрации молекул полимера на поверхности клетки, которая достигается присоединением мицелл.

Итак, для исследования цитотоксичности полимеров была налажена методика анализа токсичности амфифильных блок-сополимеров по отношению к МЛУ клеткам линии MCF7/R. Для всех рассматриваемых в настоящей работе полимеров определена наибольшая нетоксичная концентрация (ННК) и концентрация, вызывающая гибель половины клеток (IC_{50}). Для 10 из 14 полимеров эти параметры определены впервые (табл. 5). Показано, что с увеличением гидрофильности полимера уменьшается его цитотоксичность и поэтому увеличивается ННК (рис. 16). О прямой связи между гидрофильно-липофильным балансом полимера и его цитотоксичностью свидетельствует корреляция между значениями IC_{50} и ГЛБ полимеров (рис. 17). Рассчитанные по этому графику значения IC_{50} новых амфифильных незаряженных блок-сополимеров удовлетворительно совпали с экспериментально определенными величинами (табл. 6). Сопоставление ННК и ККМ исследованных соединений показало, что углеводородсодержащие ПАВ (Triton X-100 и Brij-35) токсичны в виде отдельных молекул (рис. 18 А). Впервые установлено, что амфифильные незаряженные блок-сополимеры, гидрофобный блок которых представлен ППО или ПДМС, а гидрофильный образован звеньями этиленоксида или глицерина, цитотоксичны только в виде мицелл. Это свойство присуще линейным сополимерам трехблочного и двухблочного строения, а также полиглицеринам с разветвленным гидрофильным блоком.

Таким образом, в настоящей работе было впервые проведено систематическое

исследование цитотоксичности ряда амфифильных блок-сополимеров и показано, что их цитотоксические концентрации определяются соотношением масс гидрофильных и гидрофобного блоков, а само свойство – цитотоксичность – для большинства блок-сополимеров обусловлено их способностью образовывать мицеллы.

3.3. Увеличение жизнеспособности клеток под действием ПЭО-содержащих блок-сополимеров

При исследовании цитотоксичности плуроников мы обнаружили, что в концентрации предшествующей НК возникает увеличение конечного количества клеток по сравнению с контрольными образцами, которые не подвергались воздействию полимера. Этот эффект многократно описан в литературе как характерный для наиболее гидрофильных плуроников, содержащих 70 - 80% масс. ПЭО [190, 191, 184]. Неожиданным оказался тот факт, что мы наблюдали этот эффект также и с плурониками, у которых массовая доля ПЭО составляла 10 - 50%. Так, после инкубации клеток с плуроником L61 в концентрации от 15 мкМ и до 40 мкМ к концу опыта их количество на 70% превосходило контрольную величину (рис. 20).

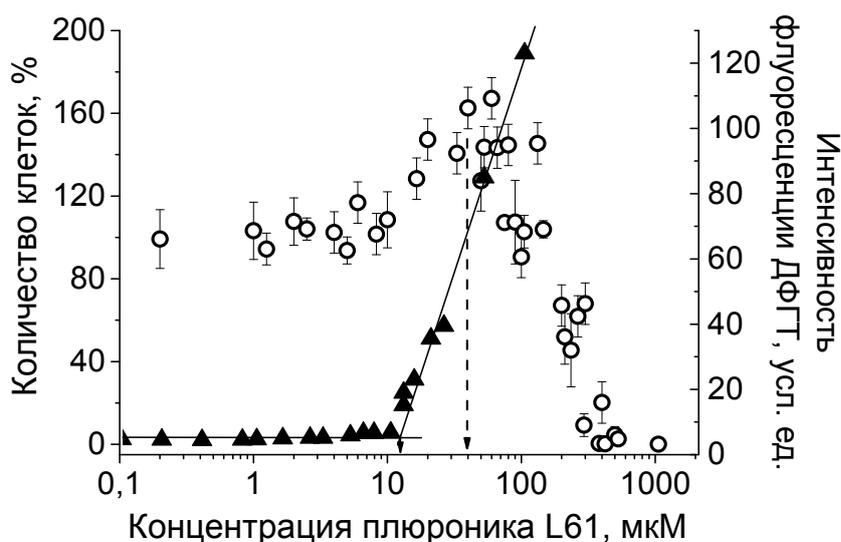


Рис. 20. Кривая цитотоксичности плуроника L61(○) (приведены усредненные данные двенадцати экспериментов) и увеличение флуоресценции зонда ДФГТ при образовании мицелл плуроника L61(▲, правая ось ординат). Стрелки указывают ККМ и концентрацию плуроника, при которой прирост клеток достигал максимума

При варьировании плотности посева клеток от 2000 до 4000 клеток на лунку количество клеток после инкубации с 80 мкМ плуроника L61 стабильно увеличивалось на 60 – 70% по сравнению с контролем. Таким образом, влияние полимера на жизнеспособность клеток не зависит от количества клеток в лунке во время их взаимодействия с полимером.

Сопоставление цитотоксичности и мицеллообразования плуроника L61 показало, что

он способствует увеличению жизнеспособности клеток при концентрациях выше ККМ (рис. 20, ККМ указана стрелкой). Этот результат свидетельствует о том, что плуроник L61 только в мицеллярной форме способствовал повышению количества клеток.

Таким же свойством обладает плуроник P123. Он способствовал увеличению количества клеток в диапазоне концентраций 10 – 35 мкМ, что значительно выше его ККМ ($0,5 \pm 0,1$ мкМ) (рис. 21). Следовательно, только мицеллы плуроника P123 повышали жизнеспособность клеток.

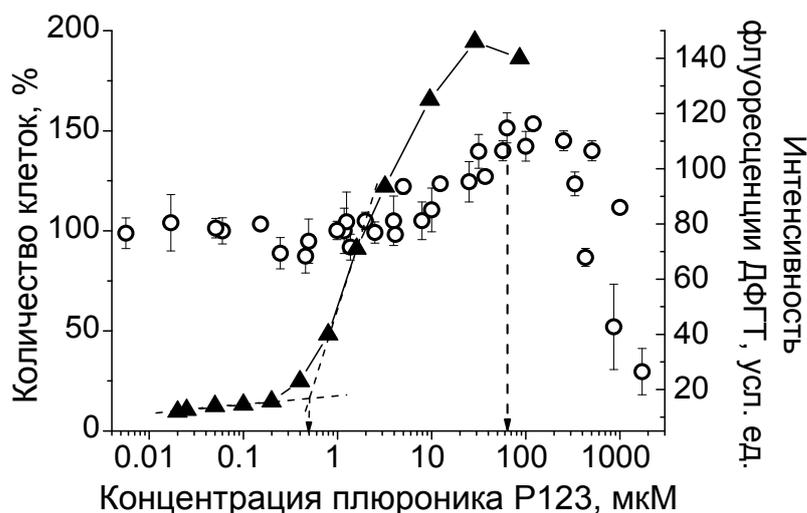


Рис. 21. Кривая цитотоксичности плуроника P123 (○) (приведены усредненные данные шести экспериментов) и увеличение флуоресценции зонда ДФГТ при образовании мицелл плуроника P123 (▲, правая ось ординат). Стрелки указывают ККМ и концентрацию плуроника, при которой прирост клеток достигал максимума

Таким образом, гидрофобные плуроники, массовая доля гидрофильного блока которых составляет 10 - 30%, только в мицеллярной форме способствуют увеличению количества клеток.

Интересно, что двублочный сополимер полидиметилсилоксана и ПЭО ($\text{ЭО}_{54}\text{-ДМС}_7$) увеличивал жизнеспособность клеток тоже только в мицеллярной форме, несмотря на то, что массовая доля гидрофильного блока в его молекуле составляет около 82%. Возможно, это объясняется тем, что благодаря большому размеру атома кремния и наличию двух метильных остатков, каждое звено диметилсилоксана гораздо гидрофобнее звена пропиленоксида, что проявляется и в сравнительно низком значении ККМ (15 ± 5 мкМ). По этой причине он повышал жизнеспособность клеток подобно гидрофобным плуроникам.

В отличие от гидрофобных плуроников и сополимера на основе полидиметилсилоксана, плуроники L64 и P85, имеющие промежуточные значения ГЛБ (15 и 16 соответственно, табл. 1), способствовали приросту количества клеток при концентрациях ниже ККМ. Причем эффект рос с увеличением концентрации юнимеров и достигал максимума

вблизи ККМ (рис. 22). Эти данные свидетельствуют о том, что плуроники с массовой долей гидрофильного блока около 40 - 50% действуют в виде отдельных макромолекул. Однако эффект проявляется только при их высокой концентрации. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о том, что после инкубации клеток колоректальной карциномы линии DHD/K12/TRb в бессывороточной среде в присутствии 100 мкМ P85 количество выживших клеток повышалось по сравнению с контролем до $172 \pm 23\%$ [168].

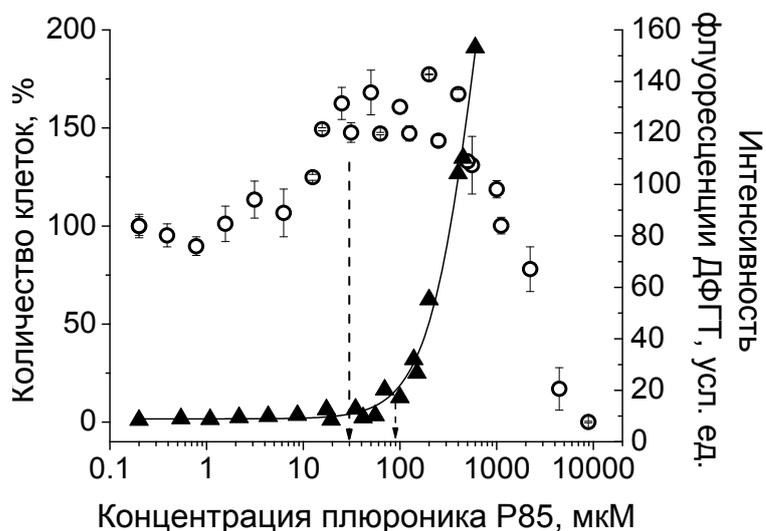


Рис. 22. Кривая цитотоксичности плуроника P85 (○) (приведены усредненные данные шести экспериментов) и увеличение флуоресценции зонда ДФГТ при образовании мицелл плуроника P85 (▲, правая ось ординат). Стрелки указывают ККМ и концентрацию плуроника, при которой прирост клеток достигал максимума

Такое же свойство проявлял и двублочный сополимер REP, эффект которого начинал проявляться при концентрациях 5 мкМ, т.е. меньше ККМ, и достигал максимума при концентрации 30 мкМ, т. е. вблизи ККМ (рис. 23) так же, как и в случае трехблочного сополимера - плуроника P85. Эти результаты указывают на то, что степень блочности не влияет на способность полимера увеличивать конечное количество клеток.

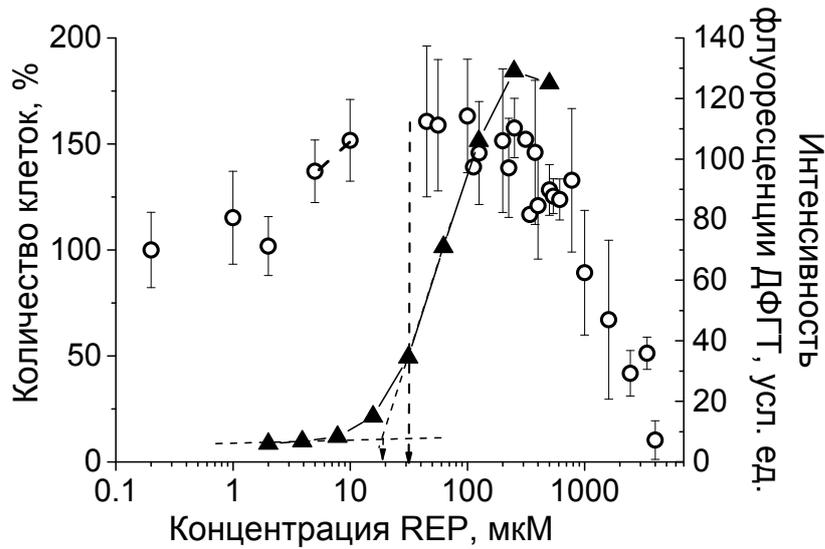


Рис. 23. Кривая цитотоксичности сополимера REP (○) (приведены усредненные данные семи экспериментов). и увеличение флуоресценции зонда ДФГТ при образовании мицелл сополимера REP (▲, правая ось ординат). Стрелки указывают ККМ и концентрацию сополимера, при которой прирост клеток достигал максимума

Таким образом, блок-сополимеры ЭО и ПО с массовой долей гидрофильного ПЭО блока около 40 - 50%, как трехблочные, так и двублочный, проявляли поддерживающий эффект в дезагрегированном состоянии, но при достаточно высокой концентрации юнимеров вблизи ККМ.

В отличие от вышеперечисленных полимеров, наиболее гидрофильные плуроники, F68, F87 и F127, содержащие 70-80% масс. ПЭО, вызывали максимальный прирост количества клеток на всем диапазоне исследованных нетоксичных концентраций (рис. 24).

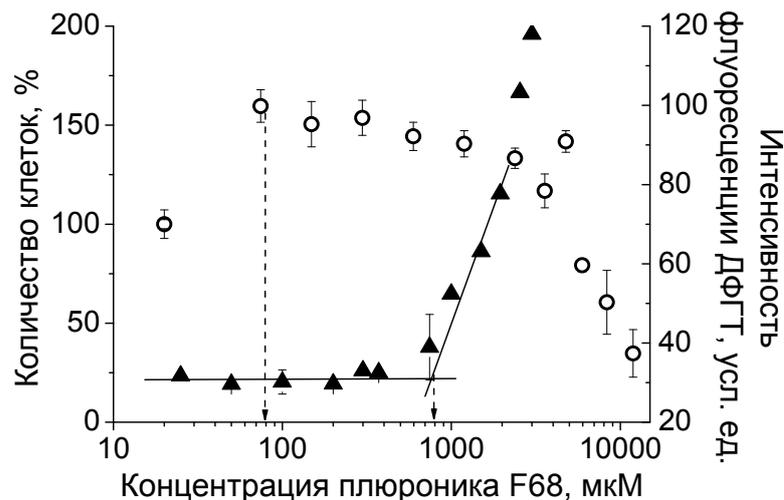


Рис. 24. Кривая цитотоксичности плуроника F68 (○) (приведены усредненные данные четырех экспериментов) и увеличение флуоресценции зонда ДФГТ при образовании мицелл плуроника F68 (▲, правая ось ординат). Стрелки указывают ККМ и концентрацию плуроника, при которой прирост клеток достигал максимума

Плюроник F68 увеличивал количество клеток до 160% даже при концентрации юнимеров на порядок ниже ККМ (рис. 24). Полученные нами результаты полностью согласуются с данными литературы о повышении количества клеток по сравнению с контролем под действием таких гидрофильных плюроников, как F127 и F68 [190, 191].

Таким образом было исследовано влияние всех соединений, выбранных для данной работы, на жизнеспособность клеток. Для тех полимеров, которые способствовали повышению количества живых клеток по сравнению с контролем, был определен (1) диапазон концентраций, в котором количество клеток постепенно увеличивается, и (2) та концентрация полимера, при которой прирост клеток максимален (КМП) (табл. 7).

Таблица 7. ККМ полимеров и их концентрация, при которой достигался максимальный прирост клеток (КМП). В скобках указан диапазон концентраций полимера, в котором наблюдалось увеличение количества клеток

Полимер	КМП, мкМ	ККМ, мкМ	ННК, мкМ
Плюроники			
L61	40 (15 - 40)	11 ± 1	100 ± 20
L64	35 (12 - 35)	100 ± 25	200 ± 50
F68	< 80	800 ± 200	4500 ± 500
L81	нет	3 ± 1	15 ± 5
P85	30 (10 - 30)	90 ± 30	550 ± 150
F87	< 16	40 ± 10	1200 ± 200
P123	60 (12 - 60)	0,5 ± 0,1	450 ± 100
F127	12 (0,3 - 12)	610 ± 140	3500 ± 500
REP	30 (5 - 30)	20 ± 5	450 ± 100
Полиглицерины			
PG2	нет	8 ± 1	9 ± 1
PG30	нет	45 ± 15	170 ± 30
PG76	нет	1000 [60]	2800 ± 300
(PG2)2	нет	40 ± 10	14 ± 2
Углеводородсодержащие ПАВ			
Brij-35	нет	40 ± 5	25 ± 1
Triton X-100	нет	240 ± 40	70 ± 8
Сополимер на основе полидиметилсилоксана			
ЭО ₅₄ -ДМС ₇	35 (15 ÷ 35)	15 ± 5	600 ± 150

В таблице 7 повторно приведены значения ККМ полимеров для удобства их сопоставления со значениями КМП, которое показывает, в какой форме полимер проявляет данный биологический эффект. Если $КМП > ККМ$, то полимер способствует увеличению количества клеток только в мицеллярной форме, как, например, в случае плуроников L61 и P123. Если $КМП < ККМ$, то полимер действует в форме отдельных макромолекул.

Результаты анализа показали, что увеличение количества клеток происходит после их инкубации с полимерами, содержащими линейный ПЭО в качестве гидрофильного блока (за исключением плуроника L81 и углеводородсодержащих ПАВ). Эффект может возникать как в присутствии мицелл, так и юнимеров. Во всех опытах одночасовая инкубация клеток в бессывороточной среде в присутствии таких полимеров приводила к увеличению количества клеток в конце опыта до 160 - 180% по сравнению с контрольными образцами, которые выдерживали в среде без сыворотки и полимера. Интересно, что увеличение количества клеток до такого же уровня наблюдалось и в том случае, когда клетки культивировали на протяжении всего опыта в среде с 10% сыворотки, что было показано в нескольких экспериментах. Сопоставление влияния сыворотки и полимеров на жизнеспособность клеток позволяет заключить, что во время одночасовой инкубации в бессывороточной среде плуроники "стабилизируют" клеточный метаболизм, давая возможность клеткам продолжать размножение так же, как в присутствии 10% сыворотки. Причем, они способствуют увеличению количества клеток приблизительно до одного и того же уровня (160 - 180%) независимо от структуры полимера (рис. 20, 21, 22, 23, 24). Однако от структуры полимера зависит его концентрация, необходимая для повышения жизнеспособности клеток. С увеличением количества звеньев ЭО в молекуле снижается концентрация полимера, при которой количество клеток достигает максимума (рис. 25).

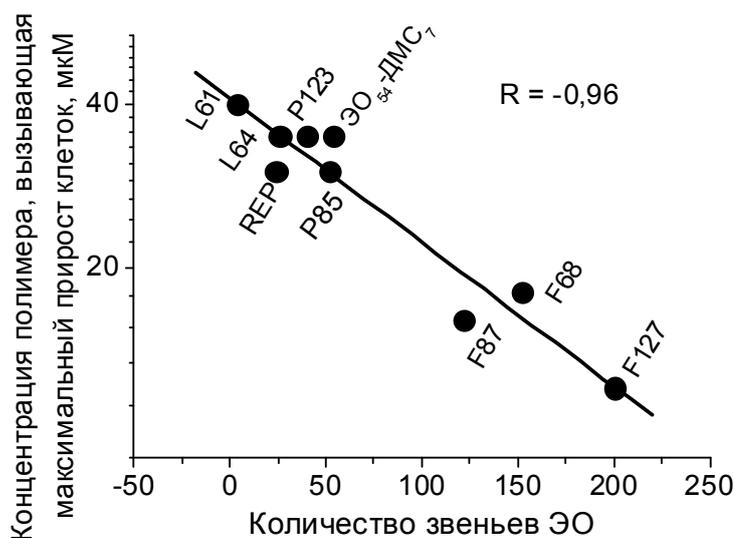


Рис. 25. Корреляция между количеством звеньев ЭО в молекуле блок-сополимера и концентрацией максимального прироста (КМП) клеток MCF7/R

Общим свойством всех соединений, которые повышали жизнеспособность клеток, является наличие линейного гидрофильного ПЭО блока. При наличии гидрофильного блока иной архитектуры и химической природы - разветвленного полиглицерина - ни один из полимеров не вызывал увеличения количества клеток (рис. 16). На это не влияло количество блоков в молекуле полиглицерина: после инкубации клеток, как с трехблочным $P(G2)_2$, так и с двублочными сополимерами в нетоксичных концентрациях, количество клеток варьировало в пределах ошибки эксперимента и составляло 80-110%. Отсутствие влияния на пролиферацию клеток наблюдалось как с относительно гидрофобными полимерами, содержание полиглицерина в которых составляло около 14% (PG2), так и с более гидрофильными, содержащими 46% (PG30) и 75% (PG76) полиглицерина.

Таким образом, в отличие от блок-сополимеров, содержащих в качестве гидрофильного блока ПЭО, амфифилы на основе разветвленного полиглицерина не способны повышать жизнеспособность клеток в культуре. Следовательно, строение и структура именно гидрофильного блока исследованных нами соединений, является основным фактором, определяющим поддерживающий эффект полимера.

Какие же межмолекулярные взаимодействия лежат в основе этих явлений?

Полиэтиленоксид и полиглицерин оба относятся к группе простых полиэфигов, и поэтому должны быть склонны к образованию водородных связей. Действительно, гомополимер ПЭО, например, образует в слабощелочной среде прочные не растворимые в воде комплексы с полиакриловой и полиметакриловой кислотами, стабилизированные водородными связями [204]. Мы предполагаем, что стабилизирующий эффект блок-сополимеров, обусловлен линейным ПЭО блоком, в котором атомы кислорода этиленоксидных звеньев склонны к образованию водородных связей, причем, выступая в качестве акцептора протонов. При взаимодействии этих полимеров с клетками в качестве доноров протонов могут выступать многочисленные гидроксильные группы углеводов, формирующих гликокаликс - слой полисахаридных цепей гликолипидов, протеогликанов и гликопротеинов (рис. 4). Гидрофильные головки липидов, экспонированные на поверхности мембраны, протонодонорными свойствами не обладают. Например, в фосфатидилхолине ни его фосфатная группа, ни остаток холина, в нейтральной среде не могут быть донорами протонов.

Мы полагаем, что взаимодействие сополимера, содержащего линейные блоки ПЭО, с клеточной поверхностью происходит посредством образования множественных водородных связей атомами кислорода этиленоксидных звеньев полимера и гидроксильными группами углеводов гликокаликса (рис. 26 А). Такое взаимодействие может реализоваться благодаря выигрышу в энтропии молекул воды при дегидратации эфирных групп полимера. Образование

каждой водородной связи дает небольшой выигрыш в энтропии, однако если взаимодействие носит кооперативный характер, то оно может приводить к формированию слоя из молекул сополимера на поверхности клетки (рис. 26 Б). Такой слой стабилизирует клеточную мембрану, способствуя сохранению жизнедеятельности клетки, особенно в отсутствие сыворотки.

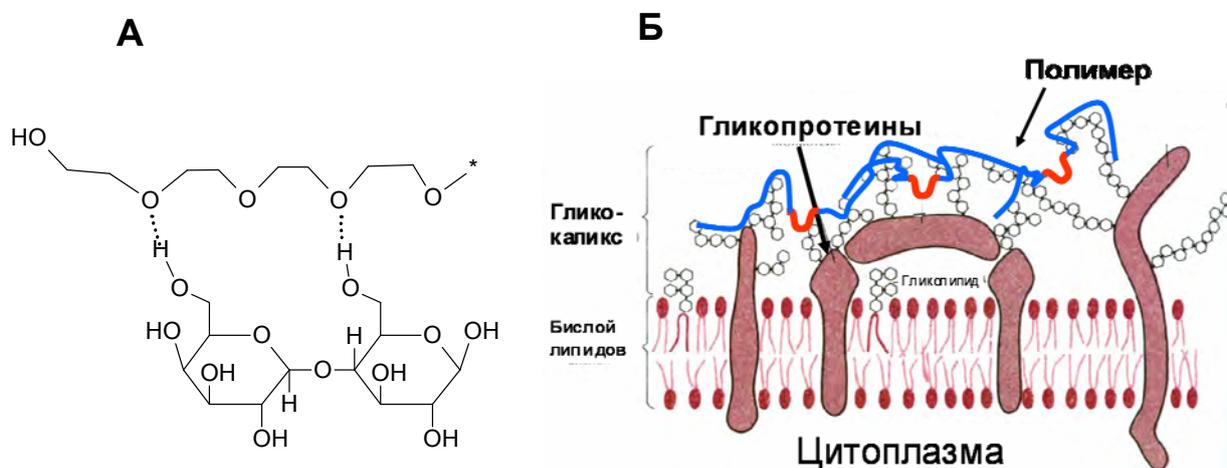


Рис. 26. Схема взаимодействия ЭО-содержащих полимеров с углеводами на поверхности наружной мембраны: **А** – формирование водородных связей; **Б** – образование слоя из молекул полимера

Чем больше звеньев ЭО в гидрофильном блоке, тем выше сродство полимера к гликокаликсу и, следовательно, тем ниже концентрация полимера, необходимая для их взаимодействия. Этот вывод подтверждается экспериментально полученной зависимостью между количеством гидрофильных звеньев ЭО и концентрацией полимера, при которой наблюдалось максимальное увеличение количества клеток (рис. 25).

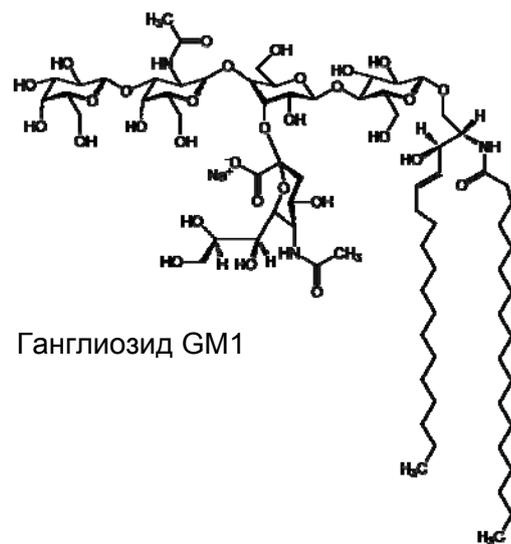
Предлагаемая гипотеза объясняет тот факт, что плуроники L61 и P123 с короткими ПЭО блоками приводят к приросту количества клеток только в мицеллярной форме (рис. 20 и 21). Вероятно, дело в том, что при появлении мицелл формируется поверхность, состоящая из многочисленных ПЭО цепочек, и только тогда становится возможным кооперативное образование множества водородных связей с гликокаликсом (рис. 26 А). Интересно, что наиболее гидрофобный плуроник - L81 – не увеличивал количество клеток. Мы полагаем, что это обусловлено его высокой токсичностью. Действительно, для увеличения количества клеток под действием гидрофобных плуроников L61 и P123 необходимо добавлять их в концентрации 15 - 40 мкМ (табл. 7, КМП), а плуроник L81 в этом диапазоне концентраций вызывает гибель клеток: его ННК = 15 ± 5 мкМ (табл. 7). Эти различия вероятно обусловлены увеличением длины гидрофобного блока плуроника L81 на 10 звеньев по сравнению с блоком ППО плуроника L61.

В отличие от ПЭО-содержащих полимеров, простые эфирные кислороды полиглицеринов находятся в точках ветвления плотно упакованной гидрофильной «короны» блок-сополимера и потому склонны к образованию меж- и внутрицепных водородных связей, разрыв которых невыгоден вследствие сближенности взаимодействующих групп [50, 55] и, как это ни парадоксально, менее склонны к формированию водородных связей с другими молекулами. «Букетная» архитектура макромолекул полиглицеринов (рис. 1) приводит к тому, что значительная доля глицериновых звеньев недоступна для растворителя и, тем более, не может взаимодействовать с полисахаридами на поверхности клеток. Мы полагаем, что именно по этой причине полиглицерины не способны, подобно плуроникам, образовать на поверхности клеток сеть стабилизированную множеством водородных связей и, как следствие, не повышают жизнеспособность клеток.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что при взаимодействии с липосомами, сформированными из фосфатидилхолина, плуроники увеличивают проницаемость липосомальной мембраны для DOX [56]. Однако при введении в состав липосомальных мембран ганглиозида GM1, гидрофильная головка которого состоит из 4 гексоз и остатка сиаловой кислоты, влияние плуроника L61 на аккумуляцию DOX снижалось до 50% при массовой доле ганглиозида равной 0,23 [205]. С точки зрения излагаемой гипотезы этот факт можно объяснить тем, что при появлении в мембране ганглиозида GM1 гидрофильный блок плуроника L61 начал взаимодействовать с гидроксильными группами сахаров ганглиозида. Тот факт, что при этом ослаблялось влияние полимера на проницаемость бислоя для DOX, позволяет заключить, что биологические эффекты незаряженных амфифильных блок-сополимеров определяются соотношением сродства их гидрофобного блока к области остатков жирных кислот бислоя и сродства их гидрофильных блоков к протонодонорным группам на поверхности мембраны.

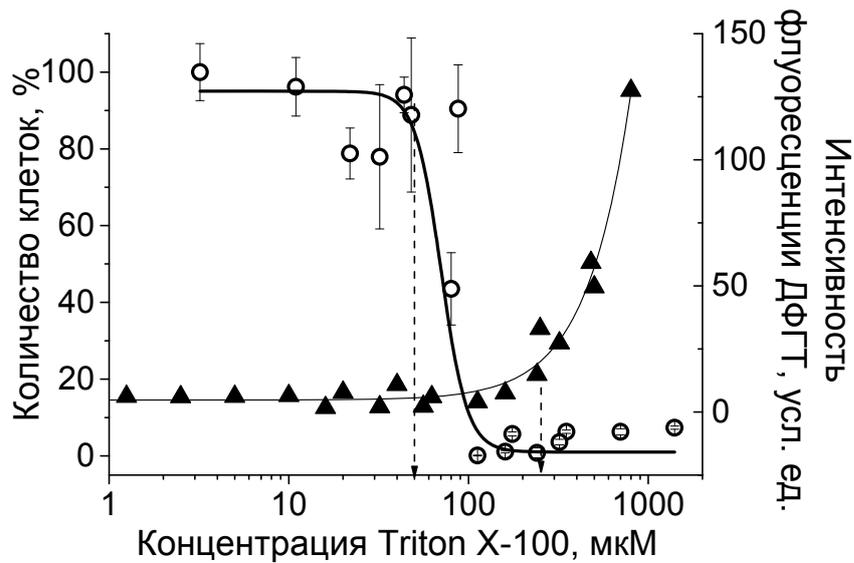
Это подтверждают результаты анализа поверхностно-активных соединений - Triton X-100 и Brij-35 (рис. 27). Они не увеличивали жизнеспособность клеток несмотря на то, что содержат гидрофильный блок, состоящий из 10 и 24 звеньев ЭО, соответственно.

Отсутствие эффекта объясняется тем, что их гидрофобные блоки представляют собой предельные углеводороды, которые обладают значительно большим сродством к липидам клеточной мембраны ($K_p = 3000$ для Triton X-100 [206]), нежели ППО в составе плуроников



($K_p = 45$ для плуроника L61 [207] и $K_p = 75$ для двублочного сополимера REP [40]). Сильное взаимодействие гидрофобных блоков этих ПАВ с липидами в области остатков жирных кислот препятствует образованию множественных водородных связей между атомами кислорода ПЭО с гидроксильными группами углеводов гликокаликса. Мы полагаем, что именно это лишает Brij-35 и Triton X-100 возможности поддерживать жизнеспособность клеток.

А



Б

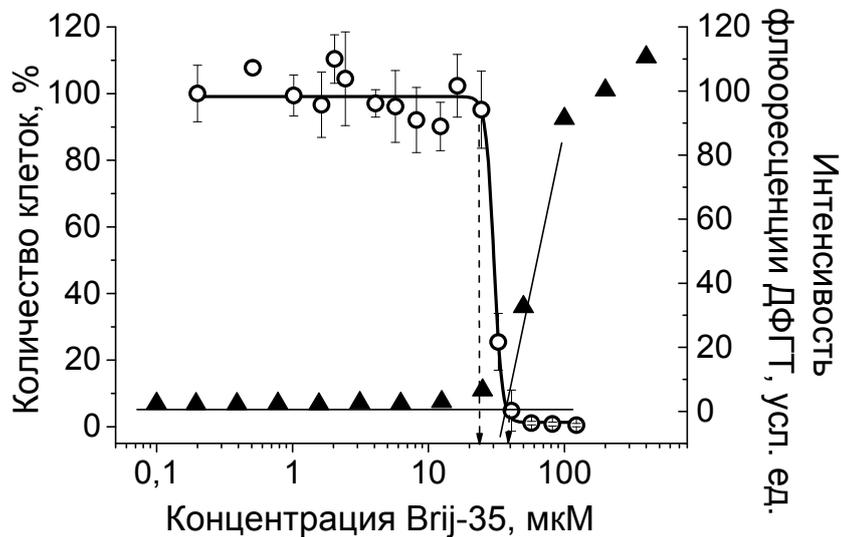


Рис. 27. Кривые цитотоксичности (○, левая ось ординат) Triton X-100 (**А**) и Brij-35 (**Б**) (приведены усредненные данные двух экспериментов с каждым ПАВ) и увеличение флуоресценции зонда ДФГТ при образовании мицелл (▲, правая ось ординат). Значения НКК и НКМ указаны стрелками

Таким образом, мы предположили, что в основе защитных свойств ПЭО-содержащих амфифильных незаряженных блок-сополимеров лежит кооперативное взаимодействие

этиленоксидных звеньев с гидроксильными группами углеводных цепочек на поверхности клеток с образованием сетки водородных связей, стабилизирующих клеточную мембрану. Эта гипотеза требует экспериментального подтверждения, но такое исследование выходит за рамки настоящей работы.

3.4. Влияние исследованных соединений на устойчивость раковых клеток к доксорубину

Известно, что некоторые плуроники, в том числе L61 и P85, подавляют устойчивость раковых клеток ко многим лекарствам (МЛУ), в частности к доксорубину. При этом максимальное подавление МЛУ наблюдается в присутствии концентраций полимеров, близких к ККМ [24]. Например, максимальное снижение устойчивости клеток к DOX зафиксировано при концентрации плуроника L61 около 100-110 мкМ, которая совпадает со значением ККМ (110 мкМ), определенным сотрудниками той же лаборатории [28]. Следовательно, способностью влиять на резистентность клеток обладают именно отдельные макромолекулы плуроников. Однако по нашим данным ККМ плуроника L61 составляет 11 ± 1 мкМ, то есть на порядок меньше. В связи с этим возник вопрос, будет ли наш препарат плуроника L61 подавлять МЛУ в виде юнимеров при концентрациях меньше 11 мкМ или при концентрации около 100 мкМ в мицеллярной форме.

3.4.1. Влияние плуроника L61 на чувствительность раковых клеток к доксорубину

Сначала для определения концентрации L61, оптимальной для подавления МЛУ, мы использовали общепринятую методику, которая позволяет наглядно показать и количественно оценить эффективность хемосенситизатора. А именно, клетки линии MCF7/R инкубировали в бессывороточной среде в присутствии различных концентраций DOX от 0,1 до 1000 мкг/мл в отсутствие плуроника L61 (контроль) и в смеси с фиксированной концентрацией полимера. В разных сериях разведений DOX концентрация плуроника варьировала в диапазоне от 5 мкМ до максимальной нетоксичной - 97 мкМ.

Добавление плуроника сдвигало кривую цитотоксичности DOX в сторону меньших концентраций (рис. 28).

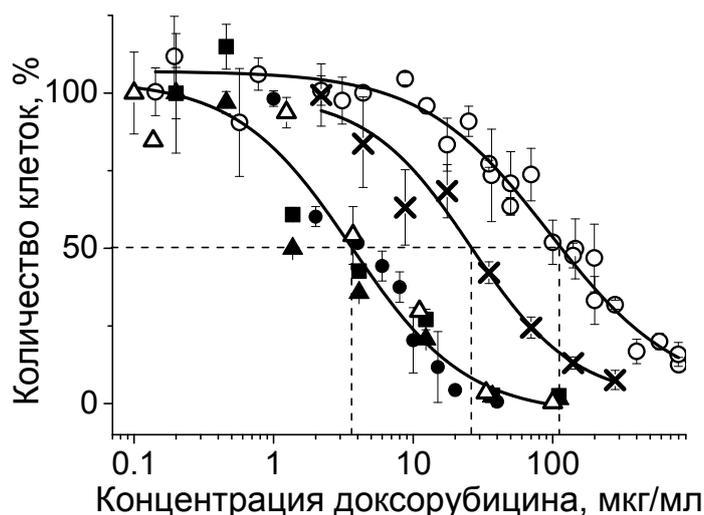


Рис. 28. Кривые цитотоксичности DOX в отсутствие и в присутствии плуроника L61. Клетки линии MCF7/R инкубировали в течение 1 ч в бессывороточной среде, содержащей DOX в концентрациях, указанных на оси абсцисс, и в присутствии 0 мкМ (○), 5,3 мкМ (×) 22 мкМ (■), 27 мкМ (●), 53 мкМ (▲) and 97 мкМ (△) плуроника L61. Количество выживших клеток определяли спустя 3 дня после культивирования в стандартных условиях без DOX и плуроника. Каждый образец анализировали в трех параллельных пробах

В отсутствие плуроника концентрация DOX, при которой погибает 50% клеток, IC_{50}^{DOX} , составляет 113 мкг/мл. Внесение 5,3 мкМ плуроника L61 в инкубационную смесь снижало IC_{50}^{DOX} почти в 4 раза до 28 мкг/мл. В то же время мы обнаружили, что максимальное подавление МЛУ проявляется не только в концентрации около 100 мкМ, согласно данным литературы [24, 26], но и при концентрациях в 2-4 раза ниже - 22, 27, 53 мкМ. Причем, в диапазоне 22 - 97 мкМ плуроника эффект был практически одинаков (рис. 28). Поэтому эти данные были объединены для построения кривой цитотоксичности. При концентрациях 22 - 97 мкМ плуроника L61 значение IC_{50}^{DOX} снижалось со 113 мкг/мл до 3,6 мкг/мл, т.е. в 31 раз.

Эффективность действия полимера оценивали по доли устойчивых клеток, которые приобрели чувствительность к DOX в присутствии полимера, в общем количестве устойчивых клеток. Мерой количества устойчивых клеток может служить концентрация доксорубицина, при которой гибнет 50% клеток - IC_{50}^{DOX} . Тогда эффективность полимера как ингибитора резистентности клеток (R) можно рассчитать по формуле II:

$$R = \frac{IC_{50}^{DOX}(\text{устойчивые}) - IC_{50}^{DOX}(\text{устойчивые+полимер})}{IC_{50}^{DOX}(\text{устойчивые}) - IC_{50}^{DOX}(\text{чувствительные})} \times 100\% \quad (\text{II}),$$

где

$IC_{50}^{DOX}(\text{чувств.})$ – значение IC_{50}^{DOX} клеток линии MCF7, чувствительных к DOX;

IC_{50}^{DOX} (*устойчивые*) – значение IC_{50}^{DOX} клеток линии MCF7/R, устойчивых к DOX;

IC_{50}^{DOX} (*устойчивые + полимер*) – значение IC_{50}^{DOX} клеток MCF7/R в присутствии полимера.

По нашим данным IC_{50}^{DOX} чувствительных клеток MCF7 составляет 0,6 мкг/мл (рис. 14), IC_{50}^{DOX} устойчивых клеток MCF7/R в отсутствие полимера равно 113 мкг/мл, а в присутствии 22 - 97 мкМ плуроника L61 IC_{50}^{DOX} снижается до 3,6 мкг/мл (рис. 28). Подставив эти значения IC_{50}^{DOX} в указанную формулу, мы рассчитали значение R для плуроника L61 равное 97%. Полученные результаты показывают, что плуроник L61 способен эффективно подавлять МЛУ не только в концентрации около 100 мкМ, но и значительно ниже, указывая на существование минимальной эффективной концентрации полимера, достаточной для максимально возможного подавления МЛУ (ЭК^{МЛУ}). Определение этой величины позволило бы подавлять МЛУ, избегая высоких концентраций плуроников.

Для точного определения ЭК^{МЛУ} необходимо провести анализ на одних и тех же клетках, подробно варьируя концентрацию полимера в широком концентрационном интервале. Используя вышеописанный подход, основанный на измерении цитотоксичности доксорубина при фиксированной концентрации полимера, решение этой задачи представляется затруднительным. Поэтому нами была разработана иная постановка экспериментов для определения ЭК^{МЛУ}.

3.4.2. Определение минимальной концентрации полимера, достаточной для подавления лекарственной устойчивости

Новая постановка опытов основана на общепринятом подходе, согласно которому для нахождения какой-либо величины нужно варьировать именно ее значение при проведении эксперимента. Поэтому с целью определения наименьшей концентрации полимера, достаточной для подавления МЛУ, мы решили варьировать концентрацию полимера, а концентрацию DOX в смеси оставить постоянной. В качестве такой фиксированной концентрации было выбрано 5 мкг/мл DOX по следующим причинам. Первая заключается в том, что в отсутствие полимера 5 мкг/мл DOX - заведомо нетоксичная концентрация антибиотика для клеток MCF7/R. В такой концентрации DOX не снижает количества клеток в отсутствие полимера (рис. 14, 28). Поэтому если при добавлении полимера произойдет снижение количества клеток, то это будет указывать на подавление МЛУ.

Вторая причина состоит в том, что при этой концентрации DOX в присутствии 22 -97 мкМ плуроника L61 количество клеток снижалось приблизительно на 50% (рис. 28), а это наиболее точно определяемая точка на сигмоидальной кривой цитотоксичности.

Как показано на рис. 28, с ростом концентрации DOX количество клеток может быть снижено практически до нуля, если концентрация полимера достаточна для максимально возможного подавления МЛУ. Это означает, что в такой концентрации полимер подавляет устойчивость у всей популяции клеток, тем самым давая возможность препарату воздействовать на все клетки. Но количество погибших клеток определяется концентрацией DOX. При выбранной нами концентрации, 5 мкг/мл DOX, количество выживших клеток должно снизиться вдвое, при условии, если полимер был добавлен в искомой концентрации, т.е. достаточной для максимально возможного подавления МЛУ.

Для определения этой концентрации, готовили серию разведений полимера в бессывороточной среде, содержащей 5 мкг/мл DOX, и полученные образцы тестировали на клетках, как описано в п. 2.2.6. Таким образом, концентрация DOX во всех образцах была постоянна - 5 мкг/мл, а концентрация полимера была разной.

Как правило, для каждого опыта готовили две серии одинаковых разведений полимера: в среде с 5 мкг/мл DOX и без него. Вторая серия предназначалась для определения цитотоксичности полимера. Все образцы анализировали одновременно на одном и том же планшете. Такая постановка эксперимента давала возможность в одном опыте на одной и той же популяции клеток определять три разных биологических эффекта полимеров: цитотоксичность, влияние на жизнеспособность клеток и минимальную концентрацию достаточную для подавления МЛУ.

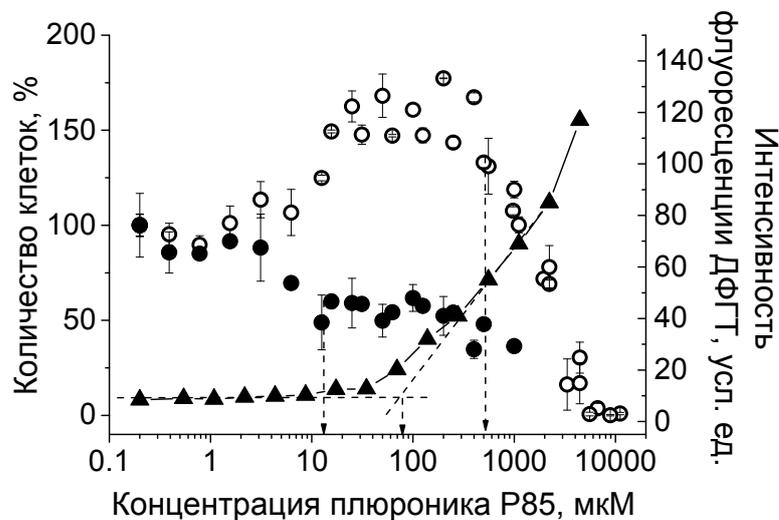
В связи с этим в каждом опыте ставили два контроля. Для анализа смеси полимера и DOX, контролем служили образцы, содержавшие 5 мкг/мл DOX в бессывороточной среде. При тестировании полимера без DOX, в контрольных лунках клетки инкубировали в среде без добавок. Помимо использования этих образцов в качестве контроля, их сравнение позволяло проверять в каждом опыте устойчивость клеток к лекарству. Одинаковое количество клеток в обеих сериях контрольных лунок свидетельствовало о том, что 5 мкг/мл DOX не были токсичны для клеток, использованных в данном опыте. Все ниже приведенные результаты были получены при выполнении этого условия.

3.4.3. Зависимость степени подавления лекарственной устойчивости от концентрации исследованного соединения

Результаты, которые можно получить при использовании такой постановки опыта, представлены на рис. 29. На нем показана зависимость количества выживших клеток относительно соответствующего контроля (левая ось ординат) от концентрации плюрониона P85, добавленного к клеткам в смеси с 5 мкг/мл DOX (●) или без него (○) (рис. 29 А). Инкубация клеток с DOX в присутствии полимера приводила к снижению их количества до

50% по мере увеличения концентрации P85 от 3 мкМ до 13 мкМ (●), что указывает на подавление МЛУ.

А



Б

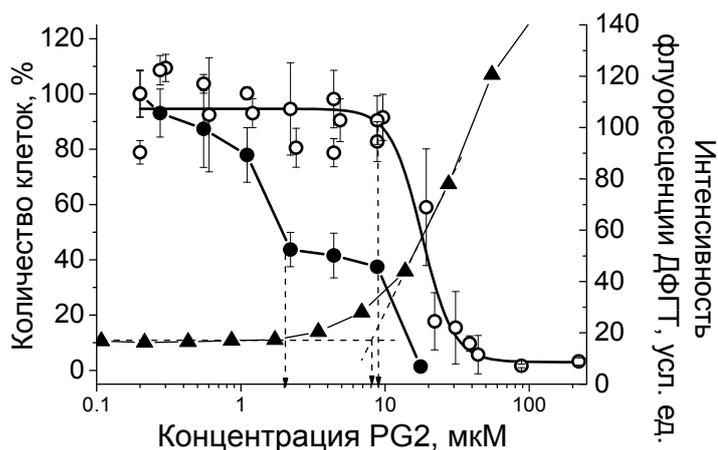


Рис. 29. Количество клеток, выживших после инкубации с плюронином P85 (**А**) и полиглицерином PG2 (**Б**), добавленными в концентрациях, указанных на оси абсцисс, в смеси с 5 мкг/мл DOX (●) и в отсутствие DOX (○). Для каждого полимера приведены усредненные данные трех экспериментов. Процесс мицеллообразования полимеров был исследован в том же диапазоне концентраций в отдельном эксперименте и показан на рисунках как увеличение интенсивности флюоресценции ДФГТ (▲, правая ось ординат). Значения $ЭК^{МЛУ}$, ККМ и ННК указаны стрелками в порядке перечисления

При дальнейшем увеличении концентрации плюроника от 13 мкМ до 250 мкМ количество выживших клеток оставалось более или менее постоянным, образуя плато. Этот результат позволяет заключить, что 13 мкМ - это $ЭК^{МЛУ}$ - минимальная концентрация плюроника P85, достаточная для максимально возможного подавления устойчивости раковых клеток MCF7/R.

На том же графике приведены результаты определения ККМ плюроники P85 (\blacktriangle , правая ось ординат). Диапазон концентраций 3 - 13 мкМ плюроники P85 меньше ККМ = 90 ± 30 мкМ. Следовательно, способностью подавлять МЛУ обладают юнимеры P85. Снижение количества клеток при концентрации плюроники более 300 мкМ обусловлено цитотоксичностью самого полимера (ННК = 550 ± 150 мкМ).

Те же закономерности оказались справедливы и для полимера с иной природой и молекулярной структурой гидрофильного блока – разветвленного полиглицерина PG2 (рис. 29 Б). Снижение количества клеток наблюдалось уже при 0,6 мкМ юнимеров PG2, а при 2 мкМ PG2 оно снижалось до 44% - минимума при 5 мкг/мл DOX.

Таким образом, предложенная постановка опытов позволяла определять ЭК^{МЛУ}. Поэтому она была использована для анализа всех остальных полимеров (табл. 8). Оказалось, что наименьшее количество клеток, которое могло быть достигнуто в присутствии полимера и 5 мкг/мл DOX, было примерно одинаковым для всех исследованных соединений и составило 40-60%. Этот результат подтверждает, что определенные нами концентрации ЭК^{МЛУ} полимеров вызывали максимально возможное подавление МЛУ.

Сопоставление значений ЭК^{МЛУ} и ККМ каждого полимера показало, что все сополимеры, гидрофильный блок которых составлял 10 - 50% от общей массы макромолекулы, подавляли МЛУ в виде юнимеров. Таким образом, полученные нами результаты полностью подтвердили открытие Батраковой с соавт. о подавлении МЛУ отдельными молекулами плюроников [24]. Более того, исследование широкого круга блок-сополимеров, различающихся по структуре гидрофильного и гидрофобного блоков, позволило показать, что это свойство присуще также сополимеру на основе полидиметилсилоксана, полиглицеринам P(G2)₂, PG2, PG30 и Brij-35 (табл. 8).

При оценке эффективности действия фармакологических препаратов большое внимание уделяется такому параметру, как терапевтический индекс, который показывает, на сколько различаются предельно допустимая концентрация соединения (в нашем случае ННК) и концентрация, достаточная для получения терапевтического эффекта (в нашем случае ЭК^{МЛУ}). Если эти значения близки, то велик риск передозировки.

Таблица 8. Минимальная концентрация полимеров, достаточная для подавления МЛУ ($ЭК^{МЛУ}$, в скобках указан диапазон концентраций полимера, в котором наблюдалось подавление МЛУ), ККМ, ННК и соотношение ННК/ $ЭК^{МЛУ}$

Полимер	ККМ, мкМ	ННК, мкМ	$ЭК^{МЛУ}$, мкМ	ННК/ $ЭК^{МЛУ}$
I. Плюроники				
L61	11 ± 1	100 ± 20	10 (2 - 10)	10
L64	100 ± 25	200 ± 50	100 (4 - 100)	2
F68	800 ± 200	4500 ± 500	2400 (300 - 2400)	1,9
L81	3 ± 1	15 ± 5	5 (1 - 5)	3
P85	90 ± 30	550 ± 150	13 (3 - 13)	42,3
F87	40 ± 10	1200 ± 200	1000 (250 - 1000)	1,2
P123	0,5 ± 0,1	450 ± 100	1,2 (0,08 - 1,2)	375
F127	610 ± 140	3500 ± 500	1600 (40 - 1600)	2,2
REP	20 ± 5	450 ± 100	20 (3 - 20)	22,5
II Полиглицерины				
PG2	8 ± 1	9 ± 1	2 (0,6 - 2)	3
PG30	45 ± 15	170 ± 30	70 (20 - 70)	2,4
PG76	-	2800 ± 300	2400 (200 - 2400)	1,2
P(G2) ₂	40 ± 10	14 ± 2	11 (2-11)	1,3
III. Углеводородсодержащий ПАВ и сополимер ПЭО и ПДМС				
Brij-35	40 ± 10	25 ± 1	16 (3 - 16)	1,6
ЭО ₅₄ -ДМС ₇	15 ± 5	600 ± 150	5 (3 - 5)	50

Для оценки исследуемых в настоящей работе полимеров с этой точки зрения мы рассчитали для каждого соединения соотношение ННК / $ЭК^{МЛУ}$ (табл. 8, рис. 30). Оказалось, что это соотношение для большинства полимеров варьирует от 1 до 3. У плюроника L61, который предложен как компонент лекарственной формы SP1049C [2, 105], это соотношение равно 10. Тогда как наибольшим соотношением этих параметров обладает плюроник P123, у которого $ННК / ЭК^{МЛУ} = 375$.

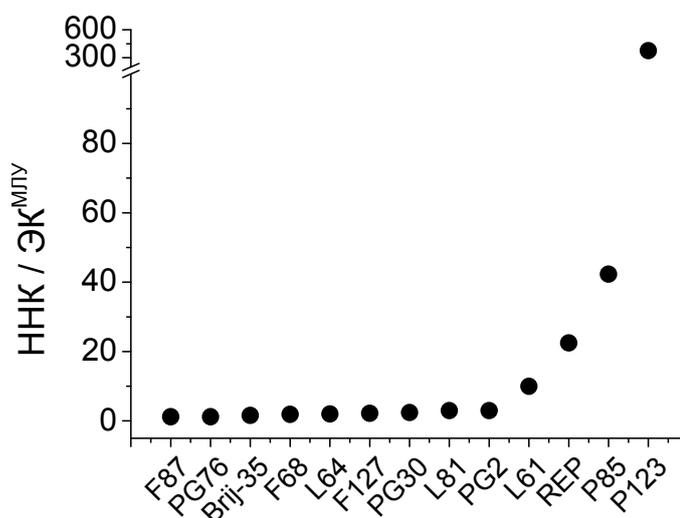


Рис. 30. Соотношение наибольших нетоксичных концентраций полимеров (HNC) и их наименьших концентраций, достаточных для максимального подавления устойчивости клеток к DOX (ЭК^{МЛУ})

Таким образом, среди всех исследованных нами соединений плуроник P123 представляется наиболее подходящим для практического использования, если в этом возникнет необходимость. Минимальная концентрация P123, достаточная для подавления МЛУ у клеток в культуре, составляет 0,007 мг/мл, тогда как его цитотоксичность начинает проявляться при концентрации более 2,5 мг/мл.

3.4.4. Особенности действия некоторых блок-сополимеров на лекарственную устойчивость раковых клеток

1 Блок-сополимеры L61, P123, REP и ЭО₅₄-ДМС₇ в мицеллярной форме увеличивают жизнеспособность клеток не только в отсутствие, но и в присутствии доксорубина. Так, например, в случае плуроника P123 снижение количества клеток начиналось при его концентрациях выше 0,08 мкМ, когда он присутствует в растворе в виде юнимеров, и достигало минимума 46 - 52% при 1,2 - 1,3 мкМ полимера. Однако дальнейшее увеличение концентрации P123 приводило к возрастанию количества клеток (рис. 31 А), даже несмотря на присутствие DOX. В интервале концентраций 2,5 - 60 мкМ P123 количество клеток увеличивалось до 70%.

Аналогичная зависимость наблюдалась в случае двублочного сополимера ЭО₅₄-ДМС₇. Его юнимеры способствовали снижению количества клеток в диапазоне концентраций от 3 мкМ до 5 мкМ (рис. 31 Б), что втрое ниже ККМ (15 ± 5 мкМ). Но в диапазоне концентраций выше ККМ (40 - 300 мкМ) этот полимер увеличивал количество клеток до 75%. Такой же эффект наблюдали после инкубации клеток в присутствии плуроника L61 и двублочного сополимера REP (данные не показаны). При этом блок-сополимеры L61, P123 и ЭО₅₄-ДМС₇

вызывали увеличение количества клеток в отсутствие DOX и в присутствии 5 мкг/мл DOX практически в одном и том же диапазоне концентраций (рис. 31).

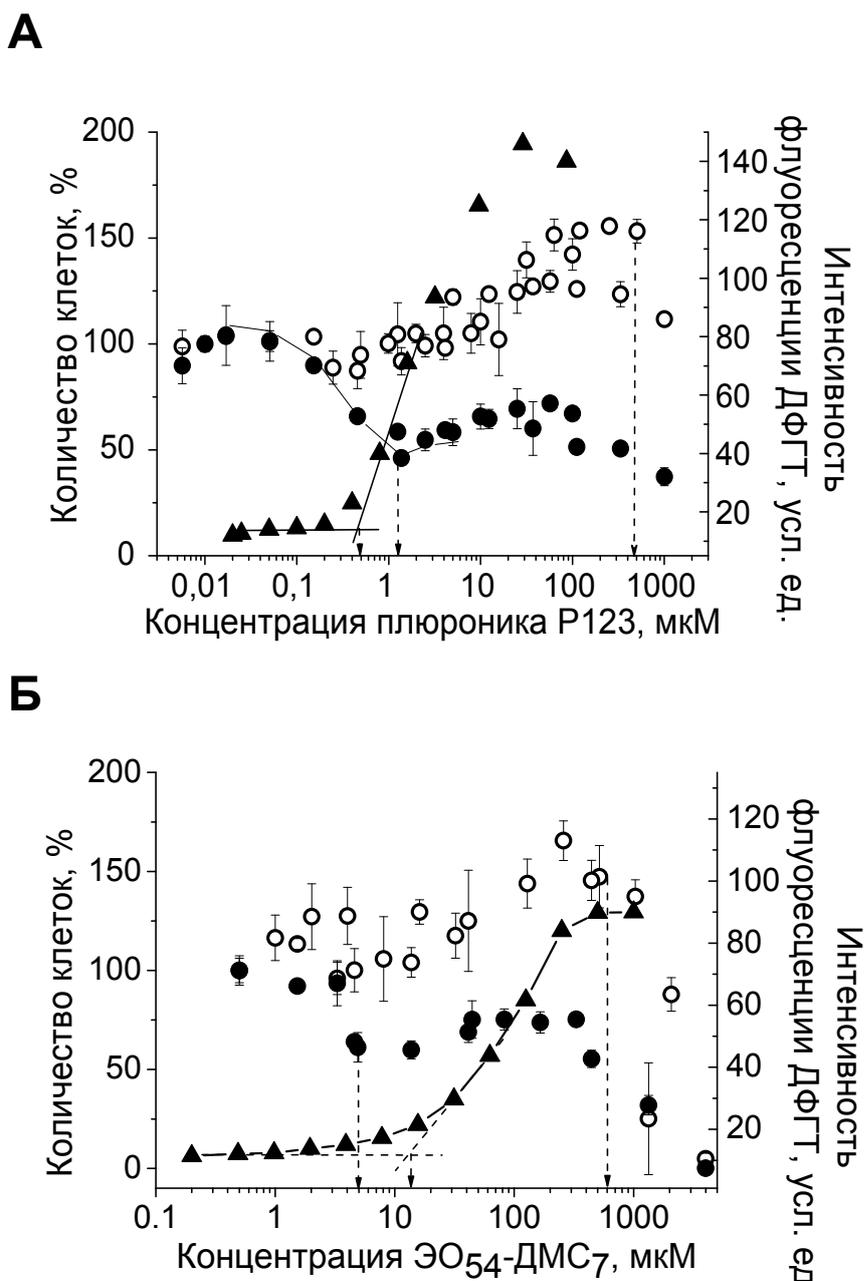


Рис. 31. Зависимость количества клеток, выживших после инкубации с плюронином P123 (**А**) и сополимером на основе полидиметилсилоксана ЭО₅₄-ДМС₇ (**Б**), добавленными в концентрациях, указанных на оси абсцисс, в смеси с 5 мкг/мл DOX (●) и в отсутствие DOX (○). Приведены усредненные данные трех экспериментов с плюронином P123 и двух – с сополимером ЭО₅₄-ДМС₇. Процесс мицеллообразования полимеров был исследован в том же диапазоне концентраций в отдельном эксперименте и показан на рисунках как увеличение интенсивности флуоресценции ДФГТ (▲, правая ось ординат). Значения ЭК^{МЛУ}, ККМ и ННК указаны стрелками в порядке перечисления

Этот результат свидетельствует о том, что эффект поддержания жизнеспособности клеток мицеллами полимера сохраняется вне зависимости от присутствия антибиотика. Отсюда следует, что эти амфифильные незаряженные блок-сополимеры, поддерживающие жизнеспособность клеток, не только можно использовать в минимальной концентрации, достаточной для подавления МЛУ, но и нецелесообразно применять в более высокой концентрации для воздействия на злокачественные клетки.

2. Плуроники P85 и L64, несмотря на способность поддерживать клетки в отсутствие DOX, не оказывали подобного воздействия в смеси с антибиотиком (рис. 29 А). Возможным объяснением такого поведения этих полимеров может быть тот факт, что P85 и L64 имеют относительно высокие значения ККМ - 90 ± 30 мкМ и 100 ± 25 мкМ, и, следовательно, более широкий диапазон концентраций, при котором в растворе находятся только юнимеры.

3. Для полимеров L81, PG2 и PG30 эффект поддержания клеток ни в отсутствие, ни в присутствии DOX вообще не характерен. По всей видимости, первые два сополимера чрезвычайно гидрофобны и поэтому погружаются в гидрофобную сердцевину мембраны в большей степени, чем гидрофильные полимеры. В случае PG30 отсутствие эффекта повышения жизнеспособности клеток можно объяснить разветвленной структурой гидрофильного блока, который, в отличие от линейных плуроники со сходным ГЛБ (P85 и L64), не может распластываться по поверхности клеточной мембраны.

4. Наиболее гидрофильные плуроники F87, F127 и F68 подавляли МЛУ, находясь в растворе в виде мицелл. Так, например, юнимеры F87 в диапазоне концентраций 15 до 40 мкМ (ККМ) не только не снижали устойчивость клеток к препарату, но даже приводили к увеличению их количества до 120%. Это согласуется с эффектом поддержания жизнеспособности клеток отдельными макромолекулами этих полимеров в отсутствие DOX (рис. 24). Подавление устойчивости под действием плуроника F87 начинает проявляться при концентрациях больше ККМ, когда появляются мицеллы. Резкое снижение количества клеток происходит при концентрациях плуроника выше 250 мкМ и достигает 55% при субтоксической концентрации 1000 мкМ, близкой к значению НК (табл. 8). Таким образом, полимеры с высокой долей гидрофильных звеньев (70-80%) в виде отдельных макромолекул и в определенном диапазоне концентраций вызывали повышение количества клеток, не только в отсутствие, но и в присутствии DOX, а снижали устойчивость клеток к DOX только в виде мицелл.

5. Brij-35 и трехблочный полиглицерин P(G2)₂ вызвали монотонное снижение количества клеток (рис. 32), вероятно вследствие высокого сродства их юнимеров к плазматической мембране клеток, как указывалось выше (п. 3.2.4).

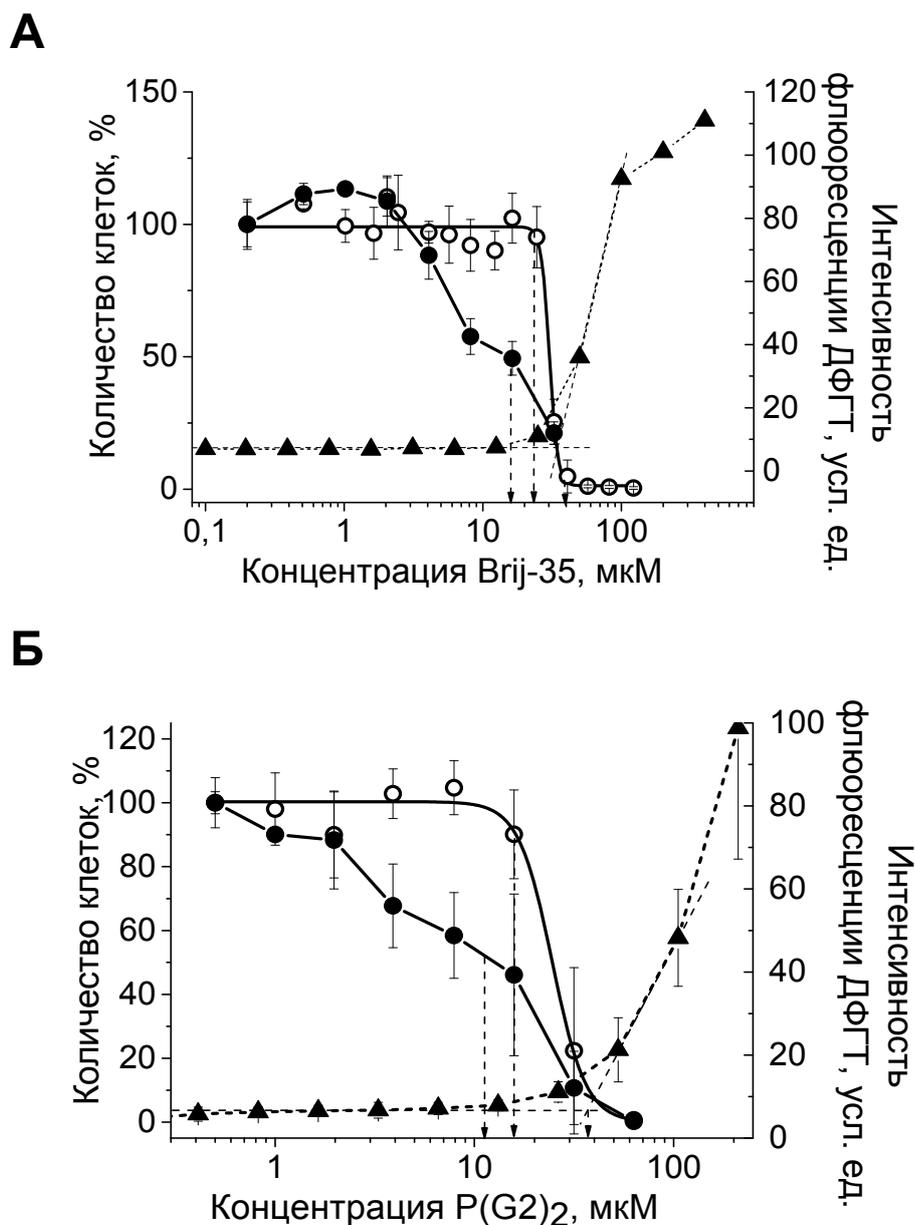


Рис. 32. Зависимость количества клеток, выживших после инкубации с Brij-35 (А) и полиглицерином P(G2)₂ (Б), добавленными в концентрациях, указанных на оси абсцисс, в смеси с 5 $\mu\text{г/мл}$ DOX (●) и в отсутствие DOX (○). Приведены усредненные данные двух экспериментов. Процесс мицеллообразования полимеров был исследован в том же диапазоне концентраций в отдельном эксперименте и показан на рисунках как увеличение интенсивности флюоресценции ДФГТ (▲, правая ось ординат). Значения $\text{ЭК}^{\text{МЛУ}}$, ККМ и ННК указаны стрелками в порядке перечисления

Таким образом, наиболее гидрофильные плуроники с 70-80% масс. ПЭО, которые по нашему предположению взаимодействуют с гликокаликсом, ингибируют МЛУ в высокой

концентрации, близкой к значениям ННК. А наиболее эффективно, в низкой концентрации, подавляют МЛУ те соединения, которые имеют повышенное сродство к сердцевине липидного бислоя – углеводородсодержащий ПАВ Вгij-35 и полиглицерин P(G2)₂. Эти результаты указывают на то, что подавление МЛУ может быть обусловлено взаимодействием гидрофобного блока амфифильных блок-сополимеров с областью остатков жирных кислот в липидной мембране клеток.

Ранее в нашей лаборатории было исследовано влияние ряда рассматриваемых в настоящей работе соединений на липосомы и показано, что плуроники, полиглицерины и в меньшей степени ЭО-содержащие ПАВ способны ускорять флип-флоп липидов в липосомах [56]. Количественно этот эффект был описан параметром β_{f-f} (флипазная активность полимера), который рассчитывали согласно формуле III

$$\beta_{f-f} = \frac{1}{C_p} \left(\frac{v_p}{v_0} - 1 \right) \quad (\text{III}),$$

где

v_p и v_0 - скорость флип-флопа липидов в присутствии и в отсутствие полимера;

C_p – концентрация полимера, мкМ.

Нормирование на концентрацию полимера делает параметр β_{f-f} безразмерным и поэтому удобным для того, чтобы охарактеризовать способность полимера возмущать липидный бислой мембран. Как было показано ранее, флипазная активность полимера пропорциональна объему гидрофобного блока V и общей гидрофобности полимера K_p (рис. 7). Данная корреляция выражается уравнением:

$$Lg\beta = -1.4 + 0.122 \cdot Lg K_p + 0.079 \cdot V, \text{ где}$$

K_p – коэффициент распределения в системе вода-гексан [56].

Иными словами, β_{f-f} – количественная характеристика способности полимера разупорядочивать структуру липидной мембраны.

Сопоставление концентраций полимеров, при которых они подавляют МЛУ ($\text{ЭК}^{\text{МЛУ}}$), и их способности разупорядочивать структуру липидного бислоя (β_{f-f}) выявило корреляцию между этими параметрами (рис. 33). Чем больше значение β_{f-f} , т.е. чем больше способность полимера нарушать липидный бислой, тем ниже концентрация полимера $\text{ЭК}^{\text{МЛУ}}$, необходимая для подавления устойчивости клеток к DOX. С ростом гидрофобности полимера его способность возмущать липидный бислой (β_{f-f}) увеличивается, а минимальная концентрация достаточная для подавления МЛУ ($\text{ЭК}^{\text{МЛУ}}$) снижается. Так, полимеры PG2, L61, L81 и P85, обладающие наибольшей флипазной активностью, подавляли МЛУ в значительно меньших концентрациях, чем плуроники F68 и F87, характеризующиеся невысокими значениями β_{f-f}

(рис. 33). Данной корреляции отвечали не только гидрофобные плуроники P85, L64, L81 и L61 и полиглицерины PG30 и PG2, но также и гидрофильные плуроники F68 и F87 (рис. 33).

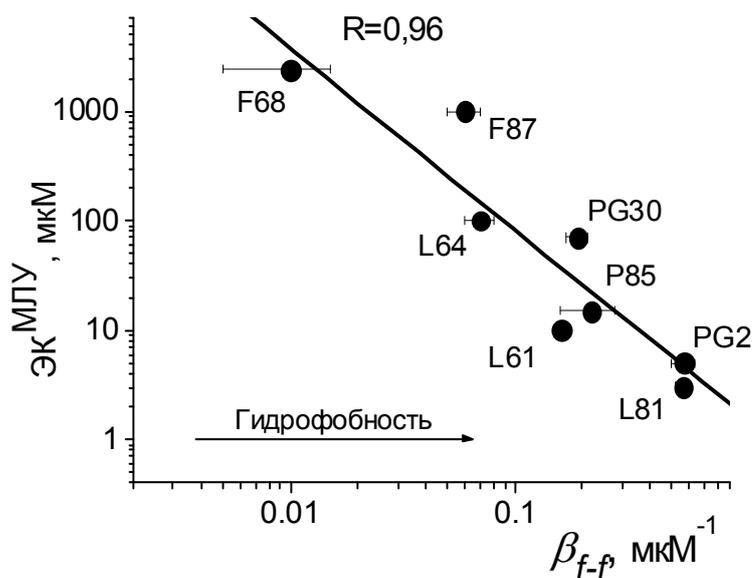


Рис. 33. Корреляция между наименьшей концентрацией полимера ЭК^{МЛУ}, достаточной для подавления устойчивости клеток MCF7/R к DOX и способностью полимеров разупорядочивать структуру липидного бислоя в липосомах (β_{f-f}), определенной ранее [56]

Эти результаты подтверждают, что подавление устойчивости раковых клеток вызвано взаимодействием гидрофобного блока амфифильных сополимеров с областью остатков жирных кислот липидной мембраны клеток, и именно гидрофобный блок амфифилов играет основную роль в снижении резистентности раковых клеток.

3.4.5. Предполагаемый механизм подавления лекарственной устойчивости

На основе полученных результатов можно предположить вероятный механизм подавления МЛУ полимерами. Взаимодействие исследованных соединений с наружной мембраной резистентных клеток вызывает дестабилизацию, изменения в структуре липидного бислоя (рис. 34). Это в свою очередь может оказывать влияние на работу трансмембранного белка Р-гликопротеина, гиперэкспрессия которого обуславливает МЛУ клеток MCF7/R. Известно, что основная часть молекул Р-гр находится в цитоплазматической мембране. Поэтому указанные эффекты полимеров могут иметь место, если полимер взаимодействует именно с наружной мембраной клетки.

Мы полагаем, что при взаимодействии амфифильного блочного полимера с наружной плазматической мембраной клетки гидрофобный блок стремится к заякориванию в области остатков жирных кислот липидов (рис. 34), а гидрофильный ПЭО-блок(и) – к формированию водородных связей с углеводными цепочками на поверхности мембраны (рис. 26).

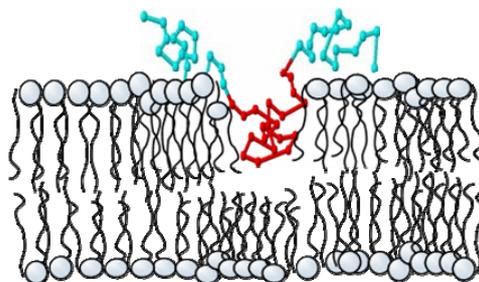


Рис. 34. Нарушение структуры липидного бислоя при внедрении гидрофобного блока амфифильного полимера в наружную мембрану клеток. Гидрофобный блок окрашен красным цветом, гидрофильные блоки – голубым

В связи с этим, амфифильная природа исследованных в настоящей работе соединений играет наиболее важную роль в этом вопросе, так как степень возмущения липидной мембраны при присоединении полимера к ней зависит от общей гидрофобности полимера и объема его гидрофобного блока. При наличии гидрофильного ЭО-блока(ов) большой степени полимеризации, что характерно, например, для плюронигов F68, F87 и F127, взаимодействие полимера будет происходить преимущественно с гликокаликсом, препятствуя проникновению гидрофобного блока в ядро бислоя, что снижает возмущающее действие полимера на клеточную мембрану. Вероятно, именно поэтому для подавления МЛЮ гидрофильными полимерами необходимо добавлять их в высокой концентрации, превышающей ККМ. В противоположность им, полимеры с массивным гидрофобным блоком преимущественно взаимодействуют с сердцевинной бислоя, изменяя его структуру, и потому уже в небольших концентрациях (до ККМ) подавляют МЛЮ.

В свете такого представления о механизме подавления МЛЮ становится понятным, почему блок-сополимеры из группы полиглицеринов также подавляют устойчивость клеток именно в виде юнимеров. Разветвленный гидрофильный блок в составе полиглицеринов, как обсуждалось выше (п. 3.3), не может формировать водородные связи с углеводными цепочками на поверхности клеточной мембраны. Поэтому гликокаликс не является препятствием для закоривания гидрофобного блока этих полимеров в бислой.

Иная химическая природа гидрофобного блока и двублочная структура углеводородсодержащего ПАВ Brij-35 обуславливают его повышенное по сравнению с полимерами других групп сродство к липидной мембране. В связи с чем, Brij-35 легко проникает в область остатков жирных кислот.

Высокое сродство трехблочного полиглицерина $P(G2)_2$ к липидной мембране может быть объяснено их электростатическим взаимодействием, что, вероятно, должно усиливать дестабилизацию липидного бислоя и объясняет нахождение ЭК^{МЛЮ} полимера в области до ККМ.

В главе 3.3. мы предположили, что полимеры увеличивают жизнеспособность раковых клеток благодаря взаимодействию с углеводными цепочками, расположенными на наружной поверхности клеток. Наши исследования влияния полимеров на устойчивость клеток к DOX показали, что те же соединения подавляют МЛУ, причем, судя по корреляции с их флипазной активностью, внедряясь в липидный бислой. Таким образом, при изучении биологических эффектов полимеров на клетках в культуре (п. 3.2, 3.3, 3.4) мы интерпретировали полученные результаты, предполагая, что полимеры взаимодействуют с наружной клеточной мембраной. Для проверки правомочности такой интерпретации мы исследовали на заключительном этапе работы локализацию полимеров при их взаимодействии с клетками.

3.5. Исследование локализации рассматриваемых соединений при их взаимодействии с клетками

Как известно, для анализа локализации различных соединений в клетках и тканях широко используются разнообразного рода метки, введенные в молекулу исследуемого вещества. В настоящей работе были использованы в качестве меток флуоресцеинизотиоцианат (FITC) и радиоактивный тритий.

3.5.1. Получение FITC-меченых блок-сополимеров

Плюроник L61 и двублочный сополимер REP конъюгировали с FITC путем двустадийного синтеза (п. 2.2.10). На первой стадии вводили в молекулу полимера концевую аминогруппу. Для этого концевые гидроксильные группы L61 или REP активировали карбонилдиимидазолом и конденсировали с этилендиамином. Образовавшееся аминокпроизводное полимера выделяли из реакционной смеси методом ГПХ. На второй стадии L61-NH₂ и REP-NH₂ конъюгировали с FITC. Для этого аминокпроизводные полимеров инкубировали в течение 23 ч при комнатной температуре в присутствии избытка FITC. Высокомолекулярную фракцию выделяли методом ГПХ на сефадексе LH-20, элюируя L61-FITC и REP-FITC этанолом. Наличие флуоресцентной метки в полученных препаратах было доказано спектральным анализом аминокпроизводных полимеров, свободного FITC и их конъюгатов, а также методом тонкослойной хроматографии. Поглощение FITC-меченых полимеров при длине волны 494 нм позволило рассчитать среднее количество флуоресцентных групп, приходящееся на одну молекулу полимера. Согласно этим расчетам в препарате L61-FITC на каждую молекулу полимера приходилось в среднем по одной молекуле флуоресцентного красителя. В препарате REP-FITC соотношение метка/полимер составляло около 0,74 моль/моль. С учетом этих данных были рассчитаны среднечисловые молекулярные массы конъюгатов, которые составили 2280 для L61-FITC и 2460 для REP-FITC.

3.5.2. Влияние присоединенного FITC на свойства блок-сополимеров

Введение FITC в молекулу полимеров прежде всего отразилось на их физическом состоянии. Если свободный плюроник L61 – жидкий, а REP – пастообразный, то их конъюгаты с FITC – твердые вещества [145]. Введение флуоресцентной метки уменьшило растворимость плюроника L61 в воде почти в 2 раза (табл. 9). Для двублочного сополимера REP подобного эффекта не наблюдалось, его растворимость не изменилась (табл. 9) [145].

Таблица 9. Сравнение свойств полимеров L61 и REP и их FITC-меченых аналогов

Образцы	Растворимость в воде, мг/мл	IC_{50} , мкМ	$ЭК^{МЛЮ}$, мкМ
REP	$\geq 12,9$	900 ± 40	20 (3 - 20)
REP-FITC	$\geq 13,53$	> 3000	40 (2,5 – 40)
L61	≥ 7	230 ± 40	10 (2 - 10)
L61-FITC	3,44	320 ± 40	30 (10 – 30)

Присоединение FITC повлияло и на биологические эффекты L61 и REP. Во-первых, оба полимера стали менее токсичными для клеток. Значения IC_{50} конъюгатов оказались выше для обоих полимеров (табл. 9), причем, для REP-FITC оно увеличилось более, чем в 3 раза. Во-вторых, введение FITC в молекулу REP или L61 ухудшило способность полимеров подавлять МЛЮ: минимальная концентрация, достаточная для подавления МЛЮ (табл. 9, $ЭК^{МЛЮ}$), у REP-FITC и L61-FITC повысилась в 2 и 3 раза по сравнению с соответствующим немодифицированным полимером.

Таким образом, присоединение флуоресцентной метки FITC к плюронику L61 и двублочному сополимеру REP оказывает заметное влияние на их физическое состояние, растворимость в воде, цитотоксичность и способность подавлять МЛЮ.

3.5.3. Исследование локализации блок-сополимеров флуоресцентным методом

Клетки MCF7/R инкубировали с FITC-мечеными полимерами в тех же условиях, что и при исследовании их биологических эффектов, а именно, в бессывороточной среде, в течение 1 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. L61-FITC и REP-FITC тестировали в высокой концентрации \leq НК, и в минимальной концентрации, достаточной для подавления МЛЮ. После удаления несвязавшегося FITC-меченого полимера клетки фиксировали 4% формальдегидом в PBS и анализировали препараты на флуоресцентном микроскопе Opton при $\lambda_{ex} = 470-490$ нм и $\lambda_{em} = 520-550$ нм.

На рис. 35 представлены микрофотографии клеток после их инкубации с 80 мкМ полимера L61-FITC, то есть при концентрации близкой к значению НК (табл. 5). На этих фотографиях заметна яркая флуоресценция L61-FITC внутри клеток. Следует отметить, аутофлуоресценция клеток MCF7/R в наших условиях опыта не регистрировалась, то есть что контрольные образцы клеток, которые инкубировали в среде без FITC-меченых полимеров, не флуоресцировали (данные не приведены).

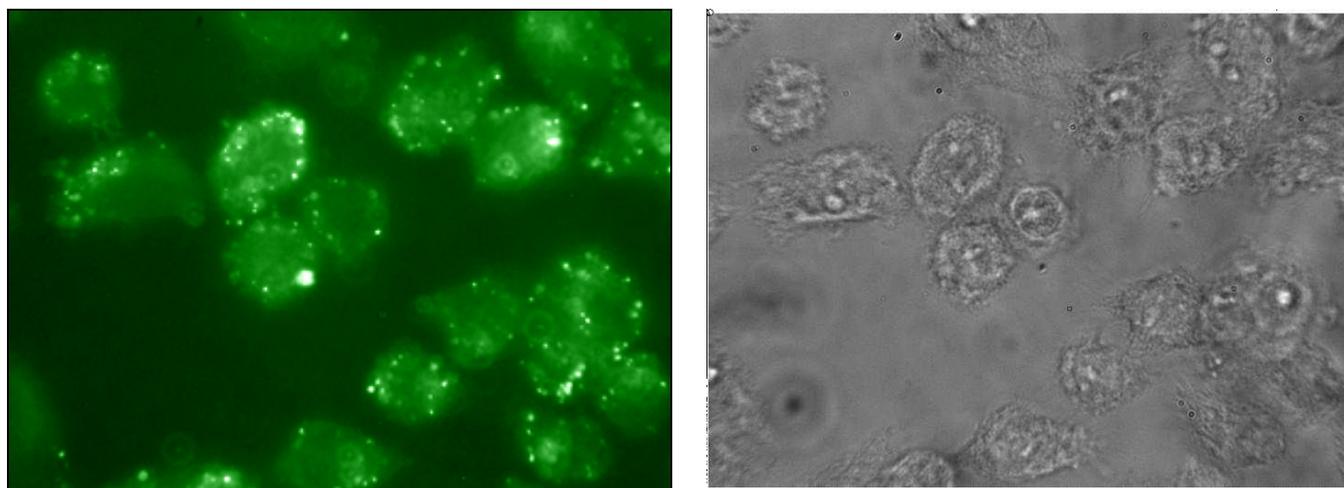


Рис. 35. Микрофотографии клеток MCF7/R после инкубации с 80 мкМ L61-FITC. Слева – флуоресцентный режим, справа – режим фазового контраста. Фиксация 4% формальдегидом. Снимки получены на флуоресцентном микроскопе Opton

При инкубации клеток с L61-FITC в концентрации ниже НК (8 мкМ) флуоресценция была гораздо слабее (данные не приведены), но оно достоверно отличалось от контроля. Это показало, что в клетку могут проникать юнимеры.

Аналогичные результаты были получены при взаимодействии клеток с 400 мкМ и 40 мкМ REP-FITC – и в той, и в другой концентрации полимер проникал внутрь клеток (данные не показаны).

Эти данные были подтверждены при анализе образцов на конфокальном микроскопе (рис. 36). На этих фотографиях флуоресцентная метка отчетливо видна в цитоплазме особенно в области около ядра, где обычно наблюдается скопление митохондрий. Таким образом, эти результаты подтвердили внутриклеточную локализацию FITC-меченых полимеров.

Таким образом, результаты всех этих опытов выявили аккумуляцию L61-FITC и REP-FITC внутри клеток. Эти данные полностью подтверждают результаты Батраковой с соавт., полученные с использованием FITC-меченых плуроников L35 и P85. Авторы показали, что эти полимеры также проникали в клетки и локализовались в цитоплазме и клеточных органеллах [116].

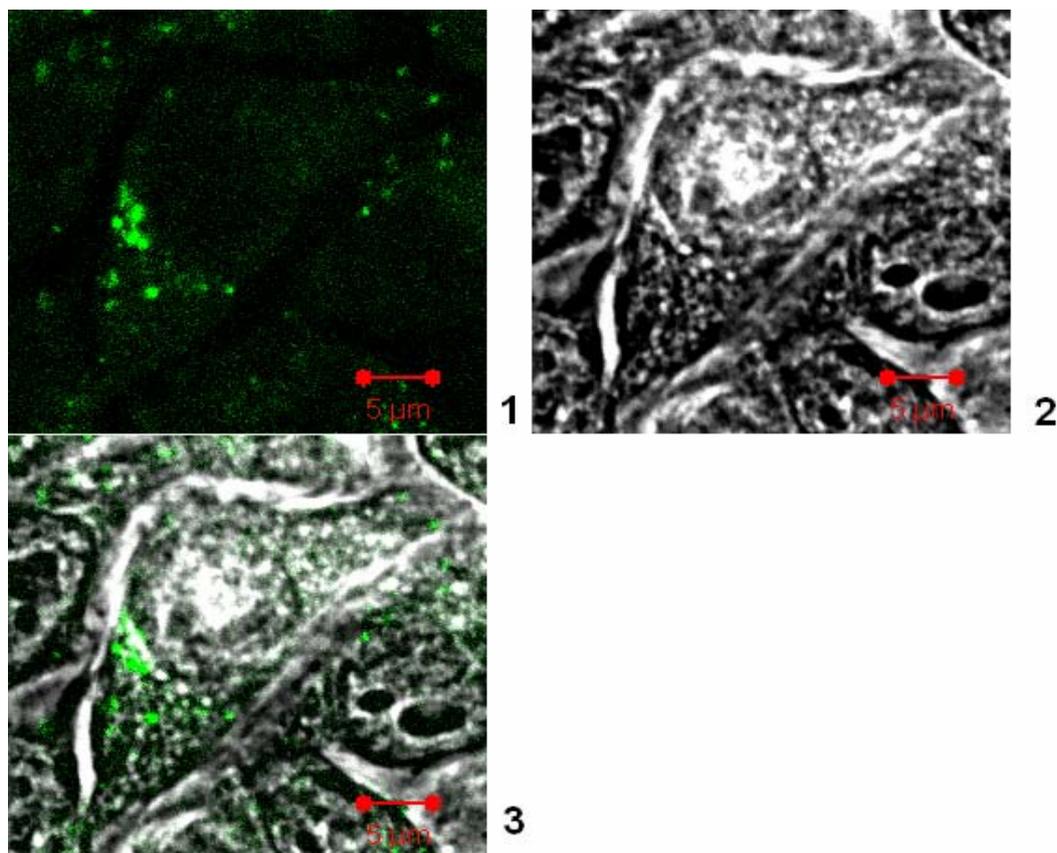


Рис. 36. Микрофотографии клетки MCF7/R, полученные с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии, в флуоресцентном режиме (1), в режиме фазового контраста (2), при наложении вышеприведенных двух фотографий (3). Клетки инкубировали с 80 мкМ L61-FITC и фиксировали 4% формальдегидом. Анализ образцов на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM510 (Carl Zeiss, Германия) был проведен проф. Д. Б. Зоровым

В вышеописанных экспериментах с L61-FITC и REP-FITC часть клеточных образцов после инкубации с полимерами фиксировали в течение 10 - 15 мин. смесью этанола и уксусной кислоты (3 : 1) при комнатной температуре или метанолом при -24°C . Использование спиртовой фиксации было вызвано тем, что согласно ранее полученным данным [130], ^3H -REP, конъюгированный с фотоактивируемой меткой (трифторметилдiazиринил), присоединяется к липидам при инкубации с клетками MCF7/R. Поскольку липиды растворяются в спиртах, то можно было ожидать, что фиксация клеток спиртом приведет к удалению липидов и связанного с ними FITC-меченного полимера.

Однако вопреки нашим ожиданиям яркая флуоресценция в цитоплазме клеток сохранялась и после их фиксации спиртовым раствором (рис. 37). FITC-меченые полимеры, способные проникать внутрь клетки и накапливаться в цитоплазме, не вымывались этанолом, несмотря на то, что полимеры L61 и REP, а также их FITC-меченые конъюгаты хорошо растворяются в спирте.

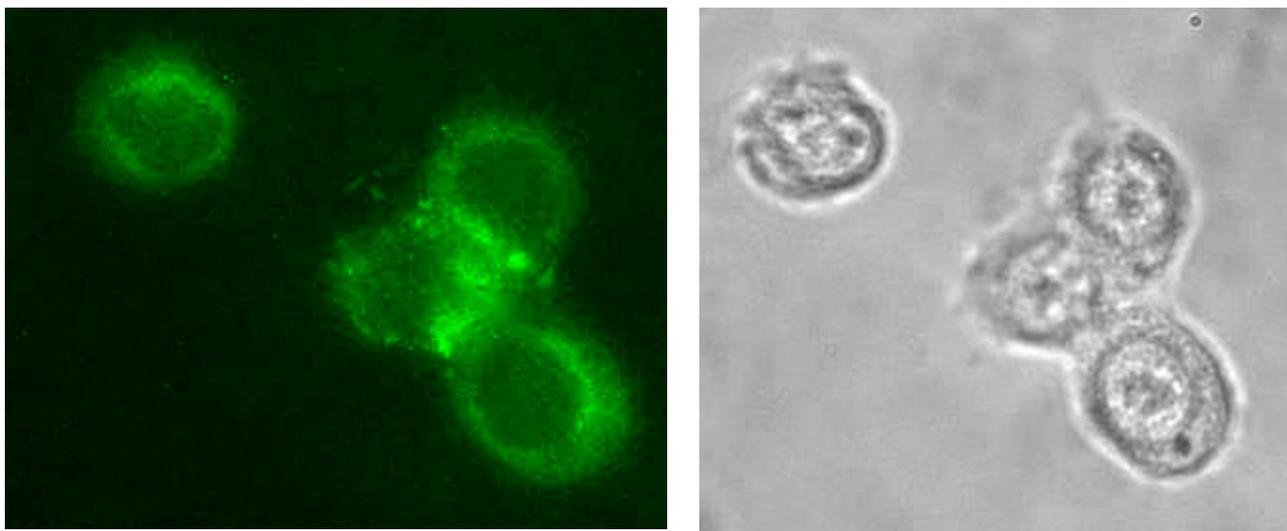


Рис. 37. Микрофотографии клеток MCF7/R после инкубации с 80 мкМ L61-FITC. Слева – флуоресцентный режим, справа – режим фазового контраста. Фиксация смесью этанола и уксусной кислоты (3:1). Снимки получены на флуоресцентном микроскопе Opton

При оценке результатов опыта с использованием фиксации смесью этанола и уксусной кислоты возник вопрос о том, в полной ли степени происходит экстракция липидов из мембран клеток или остаточная флуоресценция обусловлена наличием FITC-меченных полимеров на неэкстрагированных липидах.

Для проверки полноты экстракции липидов был использован флуоресцентный краситель октадецил-родамин-В-хлорид (родамин В, R18), имеющий высокое сродство к липидам наружной клеточной мембраны [208]. Накануне опыта клетки высевали в чашки Петри, на следующий день отмывали от культуральной среды с помощью PBS и добавляли родамин В в концентрации от 2 до 20 мкМ в PBS. После одночасовой инкубации при комнатной температуре клетки снова промывали PBS и фиксировали двумя способами: 4% раствором формальдегида в PBS или метанолом. Было обнаружено, что при фиксации клеток формальдегидом в образцах наблюдалось яркое свечение родамина (рис. 38 А), а после фиксации метанолом – окраски практически не было видно (рис. 38 Б). Расчет интенсивности флуоресценции родамина при анализе образцов на конфокальном микроскопе «Olimpus» (анализ проводил ст. н. сотр. Физического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова А. А. Ежов) показал, что остаточная флуоресценция составила 5%.

Резкое снижение флуоресценции родамина В после фиксации клеток метанолом свидетельствует о том, что спирт экстрагировал липиды из клеточных мембран практически полностью. Отсюда следует, что FITC-меченые полимеры, которые оставались в клетках после спиртовой фиксации, были связаны не с липидами.

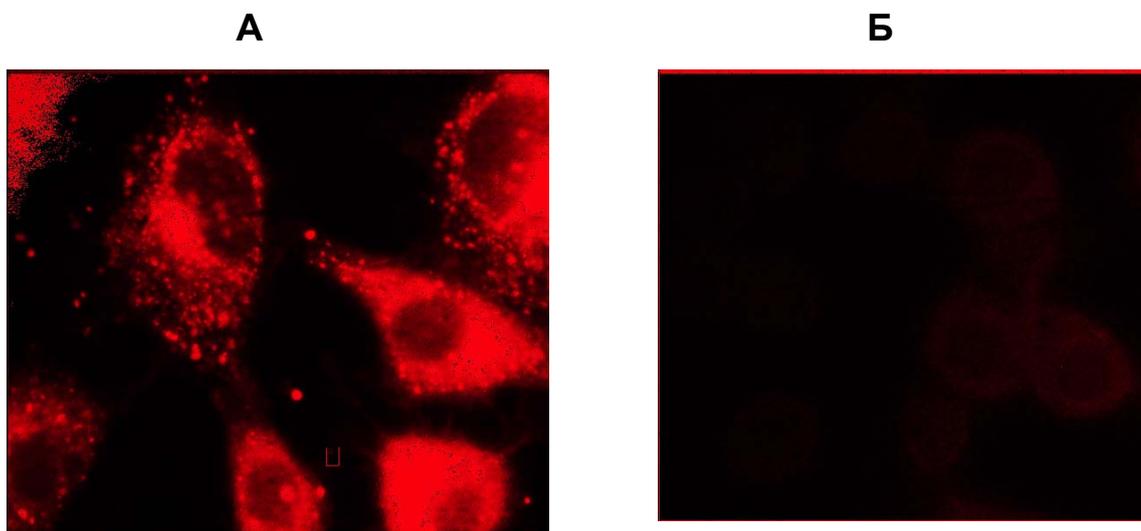


Рис. 38. Микрофотографии клеток MCF7/R после инкубации с 7 мкМ родамина В: **А** – фиксация 4% формальдегидом; экспозиция при фотографировании - 0,066 сек. **Б** – фиксация метанолом; экспозиция при фотографировании - 1,27 сек. Снимки получены на флуоресцентном микроскопе Opton

Известно, что FITC оказывает существенное влияние на взаимодействие конъюгата с теми или иными компонентами клетки. Так, например, присоединение более трех молекул FITC к молекуле столь крупного белка как антитело (М. м. = 150 000-180 000 Да) приводит к возрастанию неспецифического связывания конъюгата с клеточными структурами [209]. Поскольку плуроник L61 гораздо меньше (М.м. 2000 Да), то его конъюгация даже с одной молекулой FITC может повлиять на локализацию L61-FITC в клетках. Известно, что благодаря наличию ионогенных групп (карбоксильной и гидроксильных) FITC способен связываться с митохондриальными белками - переносчиками отрицательно заряженных кислот и проникать в митохондрии [147, 149]. По-видимому, именно взаимодействие FITC с белками митохондрий обуславливает локализацию FITC-меченых полимеров внутри клеток.

Все эти соображения указывали на необходимость проверки результатов, полученных с использованием FITC-меченых полимеров.

3.5.4. Исследование локализации методом радиоавтографии

Для анализа локализации полимеров в клетках методом радиоавтографии были получены полимеры меченные тритием. Этот изотоп используется при радиоавтографии клеток, поскольку пробег бета-частицы трития в биологических тканях значительно меньше геометрических размеров клеток и согласно расчетным данным составляет 6 мкм, а по экспериментальным данным – около 1 мкм [210]. Это увеличивает точность локализации объекта в клетке.

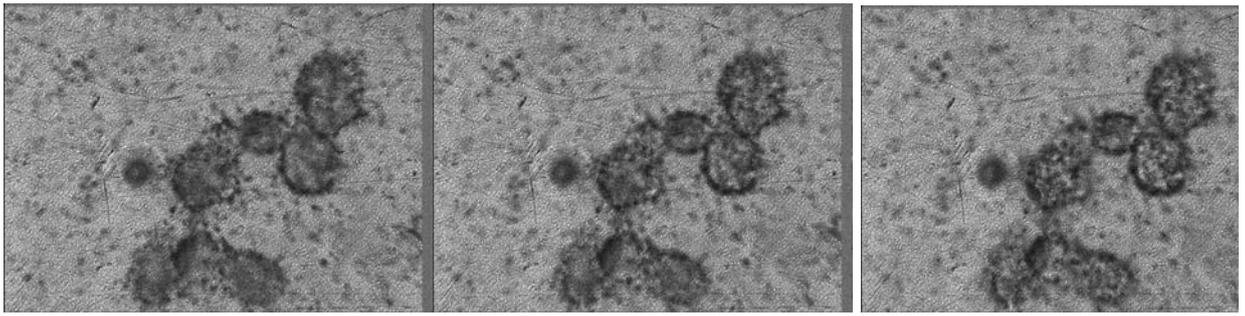
В качестве объектов исследования мы выбрали Brij-35 и плуроники L61 и P123. На кафедре радиохимии Химического факультета МГУ в эти соединения вводили радиоактивную метку методом термической активации трития. Полимеры отделяли от легко обмениваемого трития рядом последовательных циклов растворения в этаноле и упаривания в вакууме, после чего очищали от продуктов радиолитического распада с помощью ГПХ. Удельная радиоактивность полученных меченых соединений составила 13,9 Ки/ммоль, 48,3 Ки/ммоль и 6,5 Ки/ммоль для $^3\text{H-L61}$, $^3\text{H-P123}$ и $^3\text{H-Brij-35}$ соответственно, что означает присоединение в среднем от 0,5 до 1,7 атома трития на макромолекулу.

Ранее методами масспектрометрии и ЯМР было показано, что мечение плуроника L81 радиоактивным изотопом углерод-14 не приводило к изменению структуры исходного полимера [211]. Согласно исследованиям Г.А. Бадуна с соотр. введение трития практически не влияет на свойства облученных соединений [212]. В связи с этим, мы полагаем, что замена одного водорода на тритий в молекуле полимера массой около 2000 Да, не могла оказывать существенного влияния на свойства полимера. Это является важным преимуществом данного метода по сравнению с использованием флюоресцеина в качестве метки.

Полученные образцы в различных концентрациях добавляли к клеткам. После инкубации клетки отмывали от полимеров 2-8 раз. В ходе экспериментов мы обнаружили, что количество отмывок от полимера не оказывает существенного воздействия на результаты опыта. Далее образцы фиксировали двумя способами так же, как в экспериментах с FITC-мечеными полимерами, а именно - 4% формальдегидом в PBS или метанолом. После фиксации покровные стекла с клетками отмывали от фиксатора, высушивали и наносили на клетки тонкий слой мелкозернистой ядерной фотоэмульсии фирмы Kodak. Затем образцы экспонировали в течение 5-8 дней, и после проявления анализировали методом световой микроскопии.

На рис. 39 А приведены фотографии клеток после инкубации с 9 мкМ $^3\text{H-L61}$ и последующей фиксации 4% формальдегидом. На снимках по периметру клеток отчетливо видны образовавшиеся гранулы серебра, формирующие четкий черный контур.

Если бы плуроник проникал внутрь клеток, то следовало бы ожидать относительно равномерного распределения гранул серебра по всей поверхности клеток. Для проверки этого предположения мы провели съемку образцов, изменяя фокусное расстояние, и обнаружили, что при его уменьшении четкий контур по периметру клеток сохраняется, что можно расценить как указание на локализацию полимера на наружной мембране клеток (рис. 39 А). Важно отметить, что при использованной в данном опыте концентрации, плуроник L61 вызывал максимальное подавление МЛУ (табл. 8). Четкая кайма сохранялась и в присутствии более высоких, но не превышающих НК, концентраций $^3\text{H-L61}$ (данные не показаны).

А

уменьшение фокусного расстояния

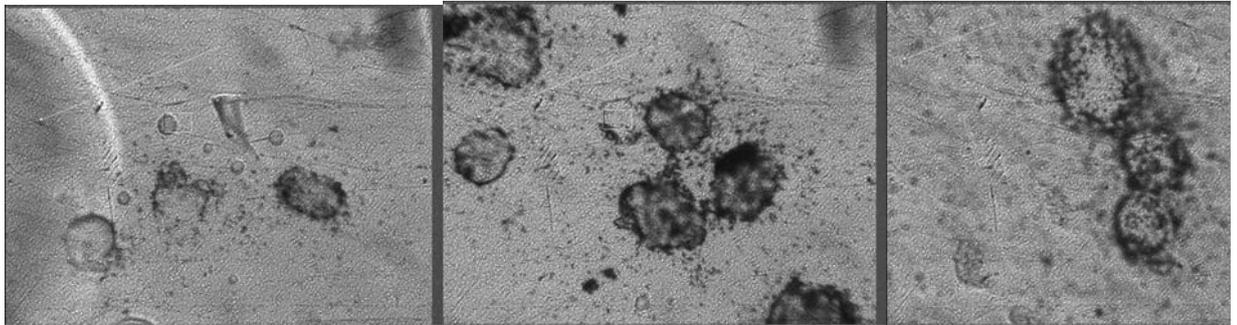
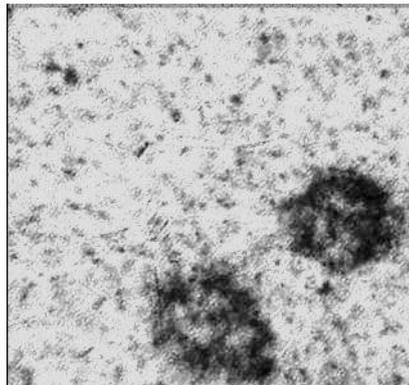
Б0,5 мкМ ^3H -P1231 мкМ ^3H -P1235 мкМ ^3H -P123**В**

Рис. 39. Микрофотографии клеток MCF7/R после инкубации с ^3H -мечеными полимерами и фиксации 4% формальдегидом. **А** – 9 мкМ ^3H -L61, 70 мкКи/мл, разное фокусное расстояние; **Б** – 0,5 мкМ (25 мкКи/мл), 1 мкМ (50 мкКи/мл) и 5 мкМ (50 мкКи/мл) ^3H -P123; **В** – 7,4 мкМ (47 мкКи/мл) Vrij-35. Снимки получены на флуоресцентном микроскопе Opton

Сходная картина наблюдалась и после инкубации клеток с плуроником ^3H -P123. При фиксации клеток 4% формальдегидом четкая кайма по периметру клеток обнаруживается уже

при 0,5 мкМ плуроника (рис. 39 Б), то есть при концентрации, которая достаточна для подавления МЛУ и образования мицелл полимера (рис. 31 А), а при 1 и 5 мкМ ^3H -P123 этот эффект еще более заметен (рис. 39 Б). Крупные размеры черных точек в местах образования гранул серебра предположительно связаны с возможной агрегацией полимера на поверхности клеток.

Инкубация клеток с 7,4 мкМ Brij-35 с последующей фиксацией 4% формальдегидом привела к образованию гранул серебра практически над всей поверхностью клеток, что подтвердило высокое сродство Brij-35 к липидной мембране (рис. 39 В).

В то же время на клетках, обработанных 8 мкМ ^3H -L61, но фиксированных смесью этанол-уксусная кислота, подобных гранул ни по контуру, ни в центре клеток обнаружено не было (рис. 40 Б). Вид клеток в опытных образцах не отличался от контроля (рис. 40 А). Данные результаты свидетельствуют о том, что при растворении липидов этанолом происходит удаление и ^3H -меченого плуроника, что подтверждает ранее полученные данные о том, что тритий-меченый блок-сополимер ^3H -REP, содержащий фотоактивируемую метку трифторметилдиазиринил на конце гидрофобного блока, присоединялся к клеточным липидам [130].

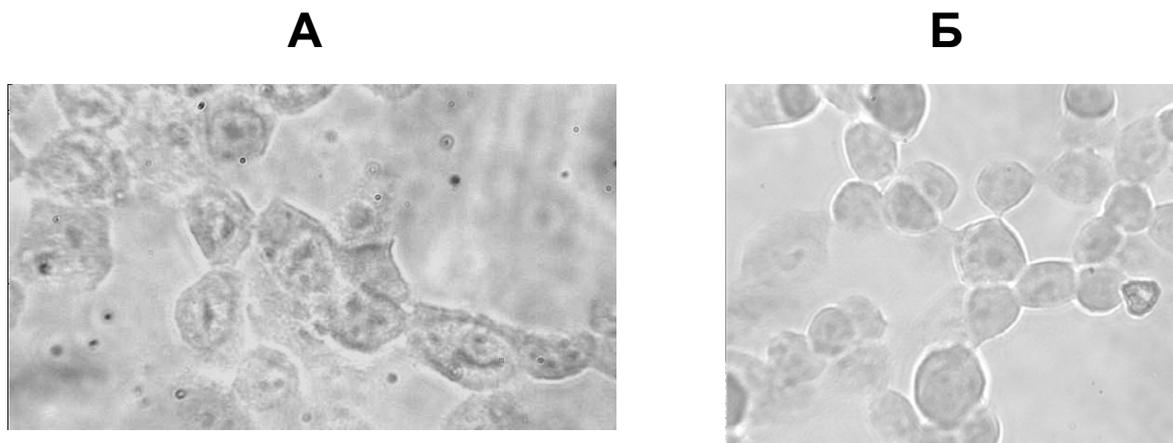


Рис. 40. Микрофотографии клеток MCF7/R. Фиксация смесью этанол-уксусная кислота (3:1): **А** – контрольный образец без полимера; **Б** - после инкубации клеток с 9 мкМ ^3H - L61, 70 мкКи/мл. Снимки получены на флуоресцентном микроскопе Opton

Таким образом, наличие гранул серебра на поверхности клеток после их инкубации с ^3H -мечеными полимерами и фиксации формальдегидом, позволяло предположить, что полимеры локализуются преимущественно на наружной клеточной мембране. Однако, учитывая тот факт, что фотоэмульсия лежит на клетках и поэтому гранулы серебра не могут выпадать нигде, кроме, как на поверхности клеток, мы решили проверить, могут ли ^3H -меченые соединения, попавшие внутрь клеток, после фиксации формальдегидом вызывать выпадение гранул серебра.

В качестве вещества, заведомо попадающего только внутрь клеток, был использован ^3H -тимидин. Клетки MCF7/R инкубировали с ^3H -тимидином в тех же условиях, что и в опытах с ^3H -мечеными полимерами. Известно, что тимидин включается в ДНК и, следовательно, может локализоваться только внутри клеток. Если обработка клеток ^3H -тимидином приведет к выпадению гранул серебра после фиксации формальдегидом, то это будет означать, что вышеприведенные результаты экспериментов с ^3H -мечеными полимерами могли быть обусловлены их проникновением внутрь клеток.

Однако оказалось, что после инкубации клеток с ^3H -тимидином и последующей фиксации формальдегидом выпадение гранул серебра не наблюдается вообще (рис. 41 А). Это значит, что излучение трития, оказавшегося внутри клеток, не достигает фотоэмульсии, если использован наиболее щадящий способ фиксации, в максимальной степени сохраняющий клеточные структуры – 4% формальдегид.

В то же время после инкубации клеток с ^3H -тимидином и фиксации смесью этанола и уксусной кислоты на снимках видны четкие гранулы серебра над ядрами клеток (рис. 41 Б). Это значит, что растворение этанолом липидов клеточных мембран облегчает прохождение излучения трития, проникшего внутрь клеток вместе с тимидином.

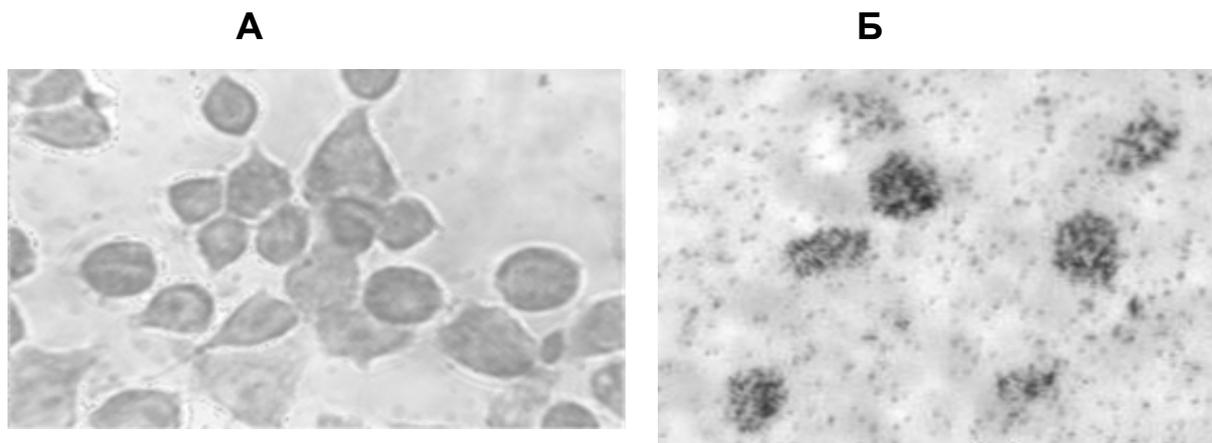


Рис. 41. Микрофотографии клеток MCF7/R после инкубации с 2 мКи ^3H -тимидина. **А** – фиксация 4% формальдегидом. **Б** - фиксация смесью этанола и уксусной кислоты (3 : 1). Снимки получены на флуоресцентном микроскопе Opton при увеличении в 400 (нижние фотографии А и Б)

Анализ результатов, полученных методом радиоавтографии, показал, что мы не можем отрицать возможность проникновения некоторого количества исследованных полимеров внутрь клеток, поскольку использованные нами методы не дают возможности зарегистрировать излучение тритиевой метки, локализованной внутри клетки. Тогда образование гранул серебра в фотоэмульсии над клетками, связавшими ^3H -полимеры, свидетельствует о локализации полимеров на наружной клеточной мембране.

Таким образом, локализация полимеров при их взаимодействии с клетками была изучена с использованием двух методик: флуоресцентной микроскопии и радиоавтографии. Использование двух разных подходов, а также варьирование способов фиксации показало, что FITC- и ^3H -меченые полимеры локализуются в различных областях клеток: FITC-меченые проникают внутрь клеток, тогда, как меченные тритием соединения в основном детектировались на поверхности клеток.

Сопоставление данных по цитотоксичности, влиянию полимеров на жизнеспособность и лекарственную устойчивость клеток - и результатов радиоавтографии свидетельствует о том, что взаимодействия полимера с наружной клеточной мембраной достаточно для проявления его биологических эффектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цель настоящей работы состояла в выявлении взаимосвязи между структурой, химической природой, способностью к мицеллообразованию водорастворимых неионогенных амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ и их биологическими эффектами: влиянием на жизнеспособность опухолевых клеток и на их устойчивость к действию лекарств.

Основной группой проанализированных соединений были плуроники – трехблочные сополимеры пропиленоксида и этиленоксида. К моменту написания данной работы в литературе имелись сведения о том, что плуроники в зависимости от степени полимеризации и соотношения гидрофильных и гидрофобного блоков в их составе характеризуются преимущественно тем или иным биологическим действием. Было принято считать, что наиболее гидрофильные представители этой группы соединений, с большой длиной гидрофильного блока, обладают защитными свойствами по отношению к клеткам и тканям организма. Также было известно, что более гидрофобные плуроники проявляют свойства хемосенситизаторов, снижая резистентность раковых клеток к лекарствам. Указанные эффекты объясняют тот факт, что плуроники активно предлагаются для фармакологии и медицины. При этом механизмы биологического действия плуроников до конца не выяснены, их токсичность по отношению к клеткам в культуре (цитотоксичность) была изучена довольно скудно, а для некоторых наиболее гидрофильных плуроников она и вовсе не определена. Все это говорило о необходимости проведения систематического исследования данных соединений с целью ответа на вопрос, какие особенности структуры и физико-химических свойств плуроников лежат в основе их различных биологических эффектов, а также как влияет химическая природа и архитектура блоков простых полиэфиров на их биологические свойства.

Такого рода исследований в литературе не обнаружено. В настоящей работе впервые проведено систематическое изучение взаимосвязи химической природы, структуры, способности к мицеллообразованию и биологических эффектов *in vitro* широкого круга водорастворимых амфифильных блок-сополимеров. Было проанализировано 8 плуроников, различающихся по степени полимеризации гидрофильных и гидрофобного блоков, и 6 других амфифильных простых полиэфиров, отличающихся от плуроников по структуре, а также по химической природе и архитектуре входящих в их состав блоков. Их эффекты сравнили с действием двух ПАВ – Triton X-100 и Brij-35, гидрофобная часть которых представлена предельными углеводородами.

На начальном этапе работы был исследован процесс мицеллообразования рассматриваемых соединений, а также их собственная токсичность по отношению к клеткам в

культуре. Обнаружено, что образование мицелл незаряженными амфифильными блок-сополимерами является необходимым условием проявления их цитотоксичности. Исключением стали углеводородсодержащие ПАВ и полиглицерин $P(G2)_2$, цитотоксичность которых наблюдалась в присутствии их отдельных молекул. Анализ широкого набора соединений, обладающих различным соотношением гидрофильного и гидрофобного блоков, выявил корреляцию между цитотоксичностью амфифильного блок-сополимера и значением его гидрофильно-липофильного баланса. Полученная в результате эмпирическая зависимость представляет практическую ценность, так как может служить для расчета примерного диапазона цитотоксических концентраций амфифильного блок-сополимера, что позволяет значительно сократить экспериментальную работу.

Таким образом, в настоящей работе было впервые проведено систематическое исследование цитотоксичности ряда амфифильных блок-сополимеров и показано, что соотношение масс гидрофильных и гидрофобного блоков в сополимерах определяет их цитотоксические концентрации, а само свойство – цитотоксичность – для большинства блок-сополимеров обусловлено их способностью образовывать мицеллы.

Подробное исследование цитотоксичности позволило обнаружить эффект поддержания жизнеспособности клеток в присутствии большинства рассмотренных в настоящей работе блок-сополимеров, содержащих в качестве гидрофильного блока линейный полиэтиленоксид. Для многих из них данный эффект был обнаружен впервые, в том числе и для ряда достаточно гидрофобных плуроников, предлагаемых в качестве компонентов противоопухолевых препаратов. В то же время ни один из сополимеров, гидрофильный блок которых был представлен разветвленным полиглицерином, таким биологическим эффектом не обладал. В связи с этим был сделан вывод, что архитектура и химическая природа именно гидрофильного блока определяет поддерживающий эффект амфифильных блок-сополимеров на клетки.

На следующем этапе работы стояла задача исследовать влияние изучаемых соединений на резистентность опухолевых клеток к доксорубину. Для этого была разработана новая постановка эксперимента, позволяющая определять наименьшую концентрацию хемосенситизатора, достаточную для максимально возможного снижения лекарственной устойчивости. Эта величина была определена для всех исследуемых соединений. Ее сопоставление со способностью полимеров разупорядочивать липидный бислой, которая в свою очередь зависит от объема гидрофобного блока и общей гидрофобности полимера, позволило заключить, что основную роль в подавлении устойчивости раковых клеток к лекарствам играет гидрофобный блок амфифильных сополимеров.

Таким образом, систематическое исследование 14 амфифильных блок-сополимеров разнообразного состава и структуры позволило найти связь между молекулярным строением

сополимера и его воздействием на раковые клетки. Способность указанных соединений вызывать различные биологические эффекты обусловлена амфифильным строением этих полимеров, пространственной разобщённостью гидрофобной и гидрофильных областей в их молекуле, а также способностью этих полимеров к мицеллообразованию. Исследования, проведенные на широком круге соединений, показали, что один и тот же амфифильный блок-сополимер может вызывать три разных концентрационно-зависимых эффекта (рис. 42). Первая концентрационная область (I) соответствует цитотоксичности полимера, которая обусловлена действием мицелл полимеров. Вторая область (II) – увеличение количества клеток после их взаимодействия с полимером определяется строением и размерами гидрофильного блока. А в области низких концентраций (III, ниже ККМ) данные полимеры подавляют устойчивость раковых клеток к лекарствам, и это определяется взаимодействием гидрофобного блока с липидами клеточной мембраны.

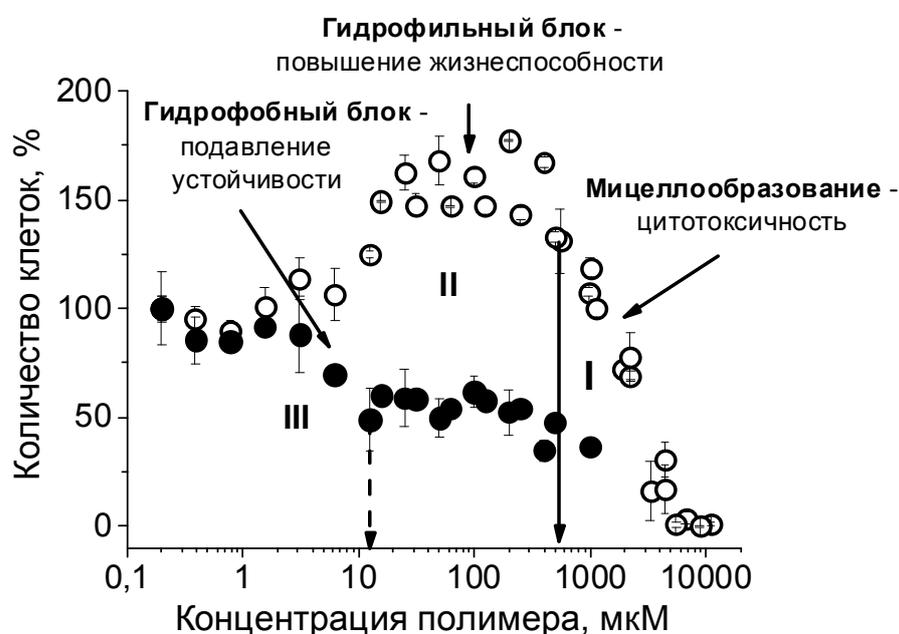


Рис. 42. Способы воздействия амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки в отсутствие (○) или в присутствии 5 мкг/мл DOX (●). Стрелки указывают значения ЭК^{МЛУ} (штриховая стрелка) и ННК (сплошная стрелка)

Поэтому с точки зрения возможного практического применения данных соединений крайне важно обращать внимание на диапазон используемых концентраций полимера в целях достижения желаемого биологического действия.

Для ответа на вопрос, чем же обусловлены подобные разнообразные и порой разнонаправленные влияния амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки, необходимо было понять, с какими компонентами клетки взаимодействуют эти соединения и где они локализуются. В поисках ответа была изучена локализация FITC-меченых и тритий-меченых

соединений на клетках. Использование двух различных типов меток, варьирование способов фиксации клеток, а также проведение дополнительных исследований с клетками, окрашенными родамином или тритий-меченым тимидином, позволили заключить, что взаимодействия рассмотренных соединений с наружной клеточной мембраной достаточно для проявления их биологических эффектов.

Исходя из полученных результатов, мы предположили вероятный механизм взаимодействия с клетками амфифильных блок-сополимеров. Указанный механизм носит различный характер и главным образом зависит от структуры сополимера, а также от химической природы и архитектуры входящих в его состав блоков. Мы полагаем, что взаимодействие амфифильного блочного полимера с наружной плазматической мембраной клетки сопровождается внедрением гидрофобного блока в область остатков жирных кислот липидов, в то время, как гидрофильный ПЭО-блок стремится к формированию водородных связей с углеводными цепочками гликокаликса на поверхности мембраны. Чем выше массовая доля гидрофобного блока, тем сильнее возмущение липидного бислоя при встраивании сополимера в клеточную мембрану. При добавлении амфифильного блок-сополимера в концентрациях ниже ККМ возможно происходит дестабилизация липидного бислоя, окружающего трансмембранный белок Р-гликопротеин, и ингибирование его активности по выбросу доксорубина из клетки. Поэтому мы полагаем, что подавление резистентности опухолевых клеток к препаратам может быть обусловлено взаимодействием гидрофобного блока амфифильных блок-сополимеров с областью остатков жирных кислот липидов клеточной мембраны. В связи с этим полимеры с массивным гидрофобным блоком уже в небольших концентрациях (до ККМ) подавляли МЛУ.

Напротив, при увеличении степени полимеризации гидрофильного ПЭО-блока/блоков, взаимодействие сополимера происходит главным образом с гликокаликсом. Это, с одной стороны, создает препятствие для проникновения гидрофобного блока вглубь бислоя и объясняет, почему наиболее гидрофильные соединения в меньшей степени влияли на лекарственную устойчивость клеток. А с другой стороны, это может приводить к формированию сети из молекул блок-сополимеров на поверхности клетки, что обуславливает защитную роль многих рассмотренных соединений.

В отличие от ПЭО-содержащих полимеров, разветвленный гидрофильный блок полиглицеринов содержит простые эфирные кислороды, образующие водородные связи главным образом внутри самого блока, что значительно снижает возможность взаимодействия этих сополимеров с углеводами гликокаликса. Вероятно, поэтому полиглицерины не способны формировать защитный слой на поверхности клеток и не повышают их жизнеспособность. По этой же причине гликокаликс не создает препятствия для взаимодействия гидрофобного блока

полиглицеринов с ядром липидного бислоя, благодаря чему эта группа сополимеров подавляет лекарственную устойчивость раковых клеток в сравнительно малых концентрациях, не превышающих ККМ.

В рамках данной гипотезы можно предположить механизм цитотоксичности исследованных незаряженных блок-сополимеров, согласно которому одновременное присоединение к клеточной мембране большого количества молекул полимера в виде мицеллы приводит к многоточечному взаимодействию полимера и липидов. Это может вызывать деформацию клеточной мембраны и формирование обращенных мицелл полимера, ориентированных гидрофобными участками к липидам мембраны, а гидрофильными - в образующийся канал, через который могут вытекать водорастворимые белки, что и приводит к гибели клетки.

Таким образом, проведя систематическое исследование 14 амфифильных блок-сополимеров и 2 углеводородсодержащих ПАВ *in vitro*, мы попытались объяснить влияние химической природы, особенностей структуры и свойств данных соединений на жизнеспособность клеток в культуре и на их устойчивость к лекарствам.

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертации.

Дальнейшее развитие представлений о локализации амфифильных блок-сополимеров при их взаимодействии с клетками, а также о взаимосвязи между структурой полимеров и вызываемыми ими биологическими эффектами позволит прояснить механизмы воздействия полимеров на клетки, что может быть использовано для направленного синтеза блок-сополимеров с заданными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено систематическое исследование влияния строения амфифильных блок-сополимеров на их биологическую активность при взаимодействии с раковыми клетками. Обнаружено, что водорастворимые амфифильные неионогенные блок-сополимеры только в мицеллярной форме являются токсичными для клеток в культуре. Таким свойством обладают сополимеры трехблочного и двублочного строения, гидрофильный блок которых представлен линейным полиэтиленоксидом или разветвленным полиглицерином, а гидрофобный блок образован полипропиленоксидом или полидиметилсилоксаном.

2. Найдена эмпирическая зависимость между гидрофильно-липофильным балансом (ГЛБ) неионогенного амфифильного блок-сополимера и его цитотоксичностью: чем выше значение ГЛБ, тем он менее токсичен. Подобная зависимость справедлива не только для линейных блок-сополимеров, но и для макромолекул, имеющих архитектуру молекулярных щеток. Показана возможность использования этой зависимости для прогнозирования области цитотоксических концентраций блок-сополимеров при их практическом применении.

3. Впервые обнаружено, что увеличение количества раковых клеток в образце в присутствии неионогенных блок-сополимеров определяется молекулярной структурой гидрофильного блока и химической природой его звеньев. Сополимеры, гидрофильный блок которых - линейный полиэтиленоксид, способствуют увеличению количества раковых клеток, причем с ростом степени его полимеризации уменьшается концентрация полимера, способствующая увеличению количества раковых клеток. Блок-сополимеры, гидрофильный блок которых представлен разветвленным полиглицерином, подобным эффектом не обладают.

4. Способность блок-сополимеров подавлять устойчивость раковых клеток к противоопухолевому препарату доксорубину определяется общей гидрофобностью макромолекулы и объемом гидрофобного блока. Чем больше эти величины, тем меньшая концентрация полимера требуется для подавления множественной лекарственной устойчивости раковых клеток (МЛУ). Разработан новый методический прием определения концентрации полимера, оптимальной для подавления МЛУ.

5. Показано, что все исследованные тритий-меченые соединения локализуются на поверхности раковых клеток в тех же условиях эксперимента, при которых они вызывают наблюдаемые биологические эффекты. Способность блок-сополимеров оказывать разное влияние на клетки согласуется с возможностью взаимодействия гидрофильных и гидрофобных блоков с разными областями наружной клеточной мембраны – гликокаликсом и липидным бислоем, соответственно.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moghimi S. M., Hunter A. C. / Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. // Trends Biotechnol. — 2000. — V.18. — № 10. — P. 412 - 420
2. Valle J. W., Armstrong A, Newman C, Alakhov V, Pietrzynski G, Brewer J, Campbell S, Corrie P, Rowinsky E. K, Ranson M. / A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting Pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction // Invest. New Drugs. — 2011. — V. 29. — P. 1029 – 1037
3. Schmolka I. R. / A review of block polymer surfactants // J. American Oil Society. — 1977. — V. 54. — № 3. — P. 110 - 116
4. Griffin W. C. / Calculation of HLB values of non-ionic surfactants // J Soc Cosmet Chem. — 1954. — № 5. — P. 249 - 256
5. Mortensen K. / Structural studies of aqueous solutions of PEO - PPO - PEO triblock copolymers, their micellar aggregates and mesophases; a small-angle neutron scattering study. // J. Physics: Condensed Matter. — 1996. — V.8. — P. A103-A124
6. Liu Y., Chen S.-H., Huang J. S./ Light-Scattering Studies of Concentrated Copolymer Micellar Solutions. // Macromolecules. — 1998. — V.31. — № 18. — P. 6226 - 6233
7. Wu G., Chu B., Schneider D. K. / SANS Study of the Micellar Structure of PEO/PPO/PEO Aqueous Solution. // J Phys Chem. — 1995. — V.99. — № 14. — P. 5094 - 5101
8. Bryskhe K., Schillén K., Löfroth J.-E., Olsson U. / Lipid-block copolymer immiscibility // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2001. — V.3. — P. 1303 - 1309
9. Zipfel J., Lindner P., Tsianou M., Alexandridis P., Richtering W. / Shear-induced formation of multilamellar vesicles (“onions”) in block copolymers // Langmuir. — 1999. — V.15. — № 8. — P. 2599 - 2602
10. Melnikova Y. S. /Vesicles formed from a poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in dilute aqueous solution.// Macromolecules. — 1999. — V. 32. — № 20. — P. 6885 - 6888
11. Bryskhe K., Jansson J., Topgaard D., Schillén K., Olsson U. / Spontaneous Vesicle Formation in a Block Copolymer System // J. Phys. Chem. B. — 2004. — V.108. — № 28. — P. 9710 - 9719
12. Nolan S. L., Phillips R. J., Cotts P. M., Dungan S. R. / Light Scattering Study on the Effect of Polymer Composition on the Structural Properties of PEO-PPO-PEO Micelles // J. Colloid. Interface Sci. — 1997. — V.191. — № 2. — P. 291 - 302
13. Zana R., Marques C., Johner A. / Dynamics of micelles of the triblock copolymers poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) in aqueous solution // Adv. Colloid. Interface Sci. — 2006. — V. 123-126. — P. 345 - 351

-
14. Beezer A. E., Mitchell J. C., Rees N. H., Armstrong J. K., Chowdhry B. Z., Leharne S., Buckton G. / NMR evidence for a novel phase-transition in aqueous solutions of Pluronic F87 (Poloxamer 237) // *J. Chem. Res. Synop.* — 1991. — № 9. — P. 254 – 255
 15. Bahadur P. / Block copolymers – Their microdomain formation (in solid state) and surfactant behaviour (in solution) // *Current science.* — 2001. — V. 80. — № 8. — P. 1002 - 1007
 16. Kabanov A. V., Batrakova E.V., Miller D. W. / Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier. // *Adv Drug Deliv Rev.* — 2003. — V. 55. — № 1. — P. 151 - 164
 17. Alexandridis P, Andersson K. / Effect of Solvent Quality on Reverse Micelle Formation and Water Solubilization by Poly(ethylene oxide)/Poly(propylene oxide) and Poly(ethylene oxide)/Poly(butylene oxide) Block Copolymers in Xylene.// *J Colloid Interface Sci.* — 1997. — V.194. — № 1. — P. 166 - 173
 18. Alexandridis P, Holzwarth J. F., Hatton T. A. / Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association // *Macromolecules.* — 1994. — V. 27. — № 9. — P. 2414 -2425
 19. Alexandridis P, Athanassiou V, Fukuda S, Hatton T. A. / Surface Activity of Poly(ethylene oxide)-block-Poly(propylene oxide)-block-Poly(ethylene oxide) Copolymers. // *Langmuir.* — 1994. — V. 10. — № 8. — P. 2604 - 2612
 20. Altinok H., Yu G.-E., Nixon S. K., Gorry P. A., Attwood D., Booth C. / Effect of Block Architecture on the Self-Assembly of Copolymers of Ethylene Oxide and Propylene Oxide in Aqueous Solution. // *Langmuir.* — 1997. — V. 13. — № 22. — P. 5837 - 5848
 21. Irwin J. J., Beezer A. E., Mitchell J. C., Bucktoqt C., Chowdhry B. Z., Ehglan D., Crowthed N. J. / Isothermal stability of dilute aqueous solutions of block copolymers of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene). A microcalorimetric study of Pluronic F87 and Pluronic F88 // *J. Phys. Chem.* — 1993. — V. 97. — № 9. — P. 2034 - 2036
 22. Liu T., Liu L. Z., Chu B, Alexandridis P., Lindman B./ *Amphiphilic Block Copolymers.* (Eds.) // Elsevier Science, Amsterdam. — 2000. — P. 115
 23. Loh W. / Block copolymer micelles // *Encyclopedia of Surface and Colloid Science* by Marcel Dekker, Inc. — 2002. — P. 802 - 813
 24. Batrakova E., Shengmin Lee, Shu Li, Venne An., Alakhov V., Kabanov A. // Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells/ *Pharm. Res.* — 1999. — V.16. — № 9. — P. 1373 - 1379

-
25. Schmolka I., Raymond A. J. / Micelle formation of polyoxyethylenepolyoxypropylene surfactants // *Am. Oil Chem. Soc.* — 1965. — V. 42. — P. 1088 - 1091
 26. Batrakova E. V., Huai-Yun H., Alakhov V. Yu., Miller D. W., Kabanov A. V. / Effects of pluronic block copolymers on drug absorption in Caco-2 cell monolayers // *Pharmaceutical Res.* — 1998. — V. 15. — № 6. — P. 850 - 855
 27. Lopes J. R., Loh W. / Investigation of Self-Assembly and Micelle Polarity for a Wide Range of Ethylene Oxide-Propylene Oxide-Ethylene Oxide Block Copolymers in Water // *Langmuir.* — 1998. — V.14. — № 4. — P. 750 - 756
 28. Kabanov A. V., Nazarova I. R., Astafieva I. V., Batrakova E. V., Alakhov V. Yu., Yaroslavov A. V., Kabanov V. A. / Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions // *Macromolecules.* — 1995. — V. 28. — № 7. — P. 2303 - 2314
 29. Schild H, Tirrel D. / Sodium 2-(N-Dodecylamino)naphthalene-6-sulfonate as a Probe of Polymer-Surfactant Interaction // *Langmuir.* — 1990. — V. 6. — № 11. — P. 1676 – 1679
 30. Miller D. W., Batrakova E. V., Waltner T. O., Alakhov V. Yu, Kabanov A. V. // *Bioconjugate Chemistry.* — 1997. — V. 8. — № 5. — P. 649 - 657
 31. Holland R. J., Parker E. J., Guiney K, Zeld F. R. / Fluorescence Probe Studies of Ethylene Oxide/Propylene Oxide Block Copolymers in Aqueous Solution // *J. Phys. Chem.* — 1995. — V. 99. — № 31. — P. 11981 – 11988
 32. Slepnev V. I., Kuznetsova L. E., Gubin A. N., Batrakova E. V., Alakhov V. Yu., Kabanov A. V. / Micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymer (pluronic) as a tool for low-molecular compound delivery into a cell. Phosphorylation of intracellular proteins with micelle incorporated [³²P] ATP // *Biochem. International.* — 1992. — V. 26. — № 4. — P. 587- 595
 33. Wanka G., Hoffmann H., Ulbricht W. / Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions // *Macromolecules.* — 1994. — V. 27. — № 15. — P. 4145 – 4159
 34. Wanka G., Hoffmann H., Ulbricht W. The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution // *Colloid Polym Sci.* — 1990. — V. 268. — № 2. — P. 101 - 117
 35. Zhang Y., Lam Y. M. / Controlled synthesis and association behavior of graft Pluronic in aqueous solutions // *Journal of Colloid and Interface Science.* — 2007. — V. 306. — № 2. — P. 398 – 404
 36. Linse P., Malmsten M. / Temperature dependent micellization in aqueous block copolymer solutions // *Macromolecules.* — 1992. — V. 25. — № 20. — P. 5434 – 5439

-
37. Hecht E., Hoffmann H. / Interaction of ABA block copolymers with ionic surfactants in aqueous Solution // *Langmuir*. — 1994. — V.10. — № 1. — P. 86 – 91
38. Croy S. R., Kwon G. S. / The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin // *J. Controlled Release*. — 2004. — V. 95. — № 2. — P. 161 – 171
39. Kozlov M. Y., Melik-Nubarov N. S., Batrakova E. V., Kabanov A. V. / Relationship between Pluronic block copolymer structure, critical micellization concentration and partitioning coefficients of low molecular mass solute // *Macromolecules*. — 2000. — V. 33. — № 9. — P. 3305 – 3313
40. Жирнов А. Е., Павлов Д. Н., Демина Т. В., Бадун Г.А., Гроздова И. Д., Мелик-Нубаров Н. С. / Влияние строения блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида на их взаимодействие с биологическими мембранами // *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*. — 2006. — Т. 48. — № 11. — С. 2023 – 2033
41. Chattopadhyay A., London E. / Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge // *Anal Biochem*. — 1984. — V. 139. — № 2. — P. 408 - 412
42. Rodrigues M., Alonso E., Yihwa C., Farah J., Quina F. / A linear solvation free energy relationship analysis of solubilization in mixed cationic-nonionic micelles // *Langmuir*. — 1999. — V. 15. — № 20. — P. 6770 – 6774
43. Wen X. // PhD Thesis. Department of Chemistry, University of Saskatchewan. Saskatoon, Saskatchewan, Canada. — 1999
44. Glenn K, van Bommel A, Bhattacharya S, Palepu R. / Self aggregation of binary mixtures of sodium dodecyl sulfate and polyoxyethylene alkyl ethers in aqueous solution // *Colloid Polym Sci*. — 2005. — V. 283. — № 8. — P. 845 – 853
45. Zhou A, Chu B. / Anomalous micellization behavior and composition heterogeneity of a triblock ABA copolymer of (A) ethylene oxide and (B) propylene oxide in aqueous solution // *Macromolecules*. — 1988. — V. 21. — № 8. — P. 2548 - 2554
46. Linse P. / Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide) Block Copolymer in Aqueous Solution: Effect of Polymer Impurities // *Macromolecules*. — 1994. — V. 27. — № 10. — P. 2685–2693
47. Meguro K; Ueno M, Esumi K. / *Micelle formation in Aqueous Media // Nonionic Surfactants Physical Chemistry*, (ed. Schick M.J.) Surfactant Science Series Marcel Dekker, Inc.: New York. — 1987. — V. 23. — P. 125 - 126

-
48. Linse P. / Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide) Block Copolymers in Aqueous Solution: Effect of Polymer Polydispersity // *Macromolecules*. — 1994. — V. 27. — № 22. — P. 6404 - 6417
 49. Stiriba S. E, Kautz H, Frey H. / Hyperbranched Molecular Nanocapsules: Comparison of the Hyperbranched Architecture with the Perfect Linear Analogue // *J Am Chem Soc*. — 2002. — V. 124. — № 33. — P. 9698 - 9699
 50. Garamus V. M., Maksimova T.V., Kautz H., Barriau E., Frey H., Schlotterbeck U. et al. /Hyperbranched Polymers: Structure of Hyperbranched Polyglycerol and Amphiphilic Poly(glycerol ester)s in Dilute Aqueous and Nonaqueous Solution // *Macromolecules*. — 2004. — V. 37. — № 22. — P. 8394 - 8399
 51. Sunder A., Mulhaupt R., Frey H. / Hyperbranched Polyether-Polyols Based on Polyglycerol: Polarity Design by Block Copolymerization with Propylene Oxide // *Macromolecules*. — 2000. — V. 33. — № 2. — P. 309 - 314
 52. Knischka R., Lutz P. J., Sunder A., Mulhaupt R., Frey H. / Functional Poly(ethylene oxide) Multiarm Star Polymers: Core-First Synthesis Using Hyperbranched Polyglycerol Initiators // *Macromolecules*. — 2000. — V. 33. — № 2. — P. 315 - 320
 53. Hanselmann R., Holter D., Frey H. / Hyperbranched Polymers Prepared via the Core-Dilution/Slow Addition Technique: Computer Simulation of Molecular Weight Distribution and Degree of Branching // *Macromolecules*. — 1998. — V. 31. — № 12. — P. 3790 - 3801
 54. Sunder A., Hanselmann R., Frey H., Mulhaupt R. / Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization // *Macromolecules*. — 1999. — V. 32. — № 13. — P. 4240 - 4246
 55. Istratov V., Kautz H., Kim Y-K., Schubert R., Frey H. / Linear-dendritic nonionic poly(propylene oxide)-polyglycerol surfactants // *Tetrahedron*. — 2003. — V. 59. — P. 4017 - 4024
 56. Demina T., Grozdova I., Krylova O., Zhirnov A., Istratov V., Frey H., Kautz H., Melik-Nubarov N. / Relationship between the Structure of Amphiphilic Copolymers and Their Ability To Disturb Lipid Bilayers // *Biochemistry*. — 2005. — V 44. — № 10. — P. 4042 - 4054
 57. Schüll C., Rabbel H., Schmid F., Frey H. / Polydispersity and Molecular Weight Distribution of Hyperbranched Graft-Copolymers via “Hypergrafting” of AB_m Monomers from Polydisperse Macroinitiator Cores: Theory Meets Synthesis // *Macromolecules*. — 2013. — V. 46. — № 15. — P. 5823 – 5830
 58. Wurm F., Frey H. / Linear-Dendritic Block Copolymers: The State of the Art and Exciting Perspectives // *Prog. Polym. Sci*. — 2011. — V. 36. — № 1. — P. 1 - 52

-
59. Mecking S., Thomann R., Frey H., Sunder A. / Preparation of Catalytically Active Palladium Nanoclusters in Compartments of Amphiphilic Hyperbranched Polyglycerols // *Macromolecules*. — 2000. — V. 33. — № 11. — P. 3958 - 3960
60. Hofmann A. M., Wurm F., Hühn E., Nawroth T., Langguth P., Frey H. / Hyperbranched Polyglycerol-Based Lipids via Oxyanionic Polymerization: Toward Multifunctional Stealth Liposomes // *Biomacromolecules*. — 2010. — V. 11. — № 3. — P. 568 – 574
61. Bailey D. L., O'Connor F. M., / Siloxane-oxyalkylene block copolymers // U.S. Pat. — 1958. — № 2.834.748
62. Kanner B., Reid W. G., Petersen I. H. / Synthesis and properties of siloxane polyether copolymer surfactants // *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.* — 1967. — V. 6. — № 2. — P. 88 - 92
63. Kucerka N., Kiselev M. A., Balgavy P. / Determination of bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine vesicles from small-angle neutron scattering curves: a comparison of evaluation methods // *Eur. Biophys. J.* — 2004. — V. 33. — P. 328 – 334
64. Топчиева И. Н., Осипова С. В., Банацкая М. И., Валькова Л. А. / Мембранотропные свойства блок-сополимеров окиси этилена и окиси пропилена // *ДАН СССР*. — 1989. — Т. 308. — С. 910 - 913
65. Firestone M. A., Wolf A. C., Seifert S. / Small-angle X-ray scattering study of the interaction of poly(ethyleneoxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) triblock copolymers with lipid bilayers // *Biomacromolecules*. — 2003. — V. 4. — № 6. — P. 1539 - 1549
66. Firestone M. A., Seifert S. / Interaction of nonionic PEO-PPO diblock copolymers with lipid bilayers // *Biomacromolecules*. — 2005. — V. 6. — № 5. — P. 2678 - 2687
67. Jamshaid M., Farr S. J., Kearney P. Kellaway I.W. / Poloxamer sorption on liposomes: comparison with polystyrene latex and influence on solute efflux. // *Int. J. Pharm.* — 1988. — V. 48. — P. 125 - 131
68. Kostarelos K., Tadros Th. F., Luskham P. F. / Physical conjugation of (tri-)block copolymers to liposomes toward the constration of sterically stabilized vesicle systems. // *Langmuir*. — 1999. — V. 15. — № 2. — P. 369 - 376
69. Kostarelos K., Luckham P. F., Tadros Th. F. / Addition of block copolymers to liposomes prepared using soybean lecithin. Effects of formation, stability and the specific localization of the incorporated surfactants investigated // *J. Liposome Research*. — 1995. — V. 5. — № 1. — P. 117 - 130
70. Lipowsky R. / Bending of Membranes by Anchored Polymers // *Europhys. Lett.* — 1995. — V. 30. — № 4. — P. 197 - 202

-
71. Kim Y. W., Sung W. / Membrane curvature induced by polymer adsorption // *Phys. Rev. E.* — 2001. — V. 63. — P. 041910-1-041910-5
72. Horejsi V. / The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation// *Immunol. Rev.* — 2003. — V. 191. — № 1. — P. 148 - 164
73. Prior I. A., Muncke C., Parton R. G., Hancock J. F. / Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains // *J. Cell Biol.* — 2003. — V. 160. — № 2. — P. 165 - 170
74. Hur E. M., Park Y. S., Lee B. D., Jang I. H., Kim H. S., Kim T. D., Suh P. G., Ryu S. H., Kim K. T. / Sensitization of epidermal growth factor-induced signaling by bradykinin is mediated by c-Src. Implications for a role of lipid microdomains // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279. — № 7. — P. 5852 - 5860
75. Garrigues A., Escargueil A. E., Orlowski S. / The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — V. 99. — № 16. — P. 10347 - 10352
76. Zachowski A., Devaux P. F. / Transmembrane movements of lipids // *Experientia.* — 1990. — V. 46. — № 6. — P. 644 - 656
77. Schroit A. J., Zwaal R. F. / Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes // *Biochim Biophys Acta.* — 1991. — V. 1071. — № 3. — P. 313 - 329
78. Denecker G., Doms H., Van Loo G., Vercaemmen D., Grooten J., Fiers W., Declercq W., Vandenameele P. / Phosphatidyl serine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome c and decrease in mitochondrial transmembrane potential // *FEBS Lett.* — 2000. — V. 465. — № 1. — P. 47 - 52
79. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. / Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2002. — V. 99. — № 4. — P. 1943 - 1948
80. Wolfs J. L., Comfurius P., Rasmussen J.T., Keuren J.F., Lindhout T., Zwaal R. F. et al. / Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction // *Cell Mol. Life Sci.* — 2005. — V. 62. — № 13. — P. 1514 - 1525
81. Bishop W. R., Bell R. M. / Assembly of the endoplasmic reticulum phospholipid bilayer: the phosphatidylcholine transporter. // *Cell.* — 1985. — V. 42. — № 1. — P. 51 - 60
82. Van de Berg B. M., Nieuwdorp M., Stroes E. S., Vink H. / Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men // *Pharmacological Reports.* — 2006. — V. 58. — P. 75 - 80

-
83. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. / Молекулярная биология клетки // Москва, «Мир». — 1994
84. Kaye S., Merry S. / Tumor cell resistance to anthracyclines: A review // *Pharmacol.* — 1985. — V. 14. — № 2. — P. 96 - 103
85. Шестова О. Л., Оглоблина Т. А., Литинская Л. Л. / Роль внутриклеточного pH в возникновении устойчивости лейкозных клеток к противоопухолевым препаратам // *Эксперим. онкология.* — 1990. — Т.12. — № 3. — С. 61 - 62
86. Coley H. M., Amos W. B., Twentymen T. M., Workman P. / Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of the subcellular localisation of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines // *Br. J. Cancer.* — 1993. — V. 67. — № 6. — P. 1316 - 1323
87. De Isabella P., Capranico G., Binaschi M., Tinelli S., and Zunino F. / Evidence of DNA-topoisomerase II-dependent mechanisms of multidrug resistance of P338 leukemia cells // *Mol. Pharmacol.* — 1990. — V. 37. — № 1. — P. 11 - 16
88. Gollapudi S., Patel K., Jain V., and Gupta S. / Protein kinase C isoforms in multidrug resistant P338/ADR cells: a possible role in daunorubicin transport // *Cancer Lett.* — 1992. — V. 62. — № 1. — P. 69 - 75
89. Versantvoort C. H. M., Broxterman H. J., Feller N., Dekker H., Kuiper C. M., Lankelma J. / Probing daunorubicin accumulation defects in non-P-glycoprotein expressing multidrug resistant cell lines using digitonin // *Int. J. Cancer.* — 1992. — V. 50. — P. 906 - 911
90. Hamada H., Tsuruo T. / Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance // *J. Biol. Chem.* — 1988. — V. 263. — № 3. — P. 1454 - 1458.
91. Deuchars K. L., Ling V. / P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer // *Chemotherapy.* — 1989. — V. 16. — № 2. — P. 156 - 165
92. Chen C. J., Clark B., Ueda K. / Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins // *J. Biol. Chem.* — 1990. — V. 265. — № 1. — P. 506 - 514
93. Cornwell M. M., Tsuruo T., Gottesman M. M. / ATP-binding properties of P-glycoprotein from multidrug-resistant KB cell // *FASEB J.* — 1987. — V. 1. — № 1. — P. 51 - 54
94. Lum B. L., Gosland M. P., Kaubisch S., Sikic B. I. / Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene // *Pharmacotherapy.* — 1993. — V. 13. — № 2. — P. 88 - 109
95. Hsing S., Gatmaintan Z., Arias I.M. / The function of gP-170, the multidrug resistance gene product, in the brush border in the rat intestinal mucosa // *Gastroenterology.* — 1992. — V. 102. — № 3. — P. 879 - 885

-
96. Damiani D., Michieli M., Michelutti A., Geromin A., Raspadori D., Fanin R., Savignano C., Giacca M., Pileri S., Mallardi F. / Expression of multidrug resistance gene (MDR1) in human normal leucocytes // *Hematologica*. — 1993. — V. 78. — № 1. — P. 12 - 17
97. Akiama S. / Molecular basis for resistance to anticancer agents and reversal of the resistance // *Human Cell*. — 1993. — V. 6. — № 1. — P. 1 - 6
98. Damiani D., Michieli M., Michelutti A., Melli C., Cerno M., Baccarani M. / D-verapamil downmodulates P-170 associated resistance to doxorubicin, daunorubicin and idarubicin // *Anti-cancer Drug*. — 1993. — V. 4. — № 2. — P. 173 - 180
99. Hinderburg A. A., Baker M. A., Gleyzer E., Stevart V. J., Case N., Taub R. N. / Effects of verapamil and other agents on the distribution on antracyclines and of reversal of drug resistance // *Cancer Research*. — 1987. — V. 47. — № 5. — P. 1421 - 1425
100. Page M., Alakhov V. Y. / Elimination of P-gp-mediated multi-drug resistance by solubilization in Pluronic micelles // *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*. — 1992. — V. 33. — P. 552
101. Alakhov V. Y., Moskaleva E. Y., Batrakova E. V., Kabanov A. V. / Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 block copolymer // *Bioconjugate Chem*. — 1996. — V. 7. — № 2. — P. 209 - 216
102. Venne A., Li S., Mandeville R., Kabanov A. V., Alakhov V. Y. / Hypersensitizing effect of Pluronic® L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells // *Cancer Reseach*. — 1996. — V. 56. — № 16. — P. 3626 - 3629
103. Batrakova E. V., Han H. Y., Miller D. W., Kabanov A. V. / Effects of Pluronic® P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells // *Pharmaceutical Research*. — 1998. — V. 15. — № 10. — P. 1525 - 1532
104. Batrakova E. V., Han H. Y., Alakhov V. Y., Miller D. W., Kabanov A. V. / Effects of Pluronic® block copolymers on drug absorption in Caco-2 cell monolayers // *Pharmaceutical Research*. — 1998. — V. 15. — № 6. — P. 850 - 855
105. Alakhov V. Y., Klinsky E. Y., Li S., Pietrzynski G., Venne A., Batrakova E. V., Bronich T., Kabanov A. V. / Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials // *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. — 1999. — V. 16. — № 1-4. — P. 113 - 134
106. Marin A., Muniruzzaman M., Rapoport N. Y. / Mechanism of the ultrasonic activation of micellar drug delivery // *J. Control. Release*. — 2001. — V. 75. — № 1-2. — P. 69 - 81
107. Rapoport N. / Combined cancer therapy by micellar-encapsulated drug and ultrasound // *International Journal of Pharmaceutics*. — 2004. — V. 277. — № 1 - 2. — P. 155 - 162

-
108. Batrakova E. V., Dorodnych T. Y., Klinskii E. Y., Kliushnenkova E. N., Shemchukova O. V., Goncharova O. Y., Arjakov S. A., Alakhov V. Y., Kabanov A. V. / Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: *in vivo* evaluation of anti-cancer activity // *Br. J. Cancer*. — 1996. — V. 74. — № 10. — P. 1545 - 1552
109. Kabanov A. V., Chekhonin V. P., Alakhov V. Y., Batrakova E. V., Lebedev A. S., Melik-Nubarov N. S. et al. / The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. Micelles as microcontainers for drug targeting // *FEBS Lett*. — 1989. — V. 258. — № 2. — P. 343 - 345
110. Y.L. Lo. / Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines // *J. Control. Release*. — 2003. — V. 90. — № 1. — P. 37 – 48
111. Batrakova E. V., Miller D. W., Li S., Alakhov V. Y., Kabanov A. V., Elmquist W. F. / Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: *in vitro* and *in vivo* studies // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. — 2001. — V. 296. — № 2. — P. 551 - 557
112. Buckingham L. E., Balasubramanian M., Safa A. R., Shah H., Komarov P., Emanuele R. M. et al. / Reversal of multi-drug resistance *in vitro* by fatty acid-PEG-fatty acid diesters // *Int. J. Cancer*. — 1996. — V. 65. — № 1. — P. 74 - 79
113. Loe D. W., Sharom F. J. / Interaction of multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells with amphiphiles. // *Br J Cancer*. — 1993. — V. 68. — № 2. — P. 342 - 351
114. Kabanov A. V., Batrakova E. V., Sriadibhatla S., Yang Z., Kelly D. L., Alakov V. Yu. / Polymer genomics: shifting the gene and drug delivery paradigms // *J. Control. Release*. — 2005. — V. 101. — № 1-3. — P. 259 – 271
115. Демина Т. В. / Взаимодействие амфифильных полимеров с природными и модельными липидными мембранами // Дисс. канд. хим. наук. 02.00.06, 03.00.04. — М. — 2007. — 123 с.
116. 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 // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. — 2003. — V. 304. — № 2. — P. 845 - 854
117. Park E. S., Chang S. Y., Hahn M., Chi S. C. / Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen // *Int. J. Pharm*. — 2000. — V. 209. — № 1 - 2. — P. 109 – 119
118. Kabanov A. V., Batrakova E. V., Alakhov V. Y. / Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer // *Adv. Drug Del. Rev*. — 2002. — V. 54. — № 5. — P. 759 – 779

-
119. Wei Z., Yuan S., Hao J., Fang X. / Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by Pluronic P123/F127 block copolymers: Relationship between copolymer concentration and inhibitory activity // *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. — 2013. — V. 83. — № 2. — P. 266–274
120. Wei Z., Hao J., Yuan S., Li Y., Juan W., Sha X., Fang X. / Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization and in vitro characterization // *International journal of pharmaceutics*. — 2009. — V. 376. — № 1. — P. 176 - 185
121. Zhang W., Shi Y., Chen Y., Yu S., Hao J., Luo J., Sha X., Fang X. / Enhanced antitumor efficacy by Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed micelles against non-small cell lung cancer based on passive tumor targeting and modulation of drug resistance // *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. — 2010. — V. 75. — № 3. — P. 341 – 353
122. Zastre J. A., Jackson J. K., Wong W., Burt H. M. / P-glycoprotein efflux inhibition by amphiphilic diblock copolymers: relationship between copolymer concentration and substrate hydrophobicity // *Mol. Pharm.* — 2008. — V. 5. — № 4. — P. 643 - 653
123. Shaik N., Giri N., Elmquist W. F. / Investigation of the micellar effect of pluronic P85 on P-glycoprotein inhibition: cell accumulation and equilibrium dialysis studies. // *J Pharm Sci.* — 2009. — V. 98. — № 11. — P. 4170 - 4190
124. Alvarez-Lorenzo C., Rey-Rico A., Brea J., Loza M. I., Concheiro A., Sosnik A. / Inhibition of P-glycoprotein pumps by PEO–PPO amphiphiles: branched versus linear derivatives // *Nanomedicine*. — 2010. — V. 5. — № 9. — P. 1371 - 1383
125. Huang J., Si L., Jiang L., Fan Z., Qiu J., Li G. / Effect of Pluronic F68 block copolymer on P-gp transport and CYP3A4 metabolism. // *Int. J. Pharm.* — 2008. — V. 356. — № 1 - 2. — P. 351 – 353
126. Shaik N., Pan G., Elmquist W. F. / Interactions of Pluronic block copolymers on P-gp efflux activity: experience with HIV-1 protease inhibitors // *J. Pharm. Sci.* — 2008. — V. 97. — № 12. — P. 5421 – 5433
127. Garrigos M., Mir L. M., Orlowski S. / Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase. Further experimental evidence for a multisite model. // *Eur. J. Biochem.* — 1997. — V. 244. — № 2. — P. 664 – 673
128. Evers R., Kool M., Smith A. J., van Deemter L., de Haas M., Borst P. / Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport // *Br. J. Cancer*. — 2000. — V. 83. — № 3. — P. 366 - 374
129. Paradis R., Noel C., Page M. / Use of pluronic micelles to overcome multidrug-resistance. // *Int J Oncol.* — 1994. — V. 5. — № 6. — P. 1305 - 1308

-
130. Жирнов А. Е. / Дисс. канд. хим. наук. 02.00.06, 03.00.04. — М. — 2008. — 153 с.
131. Осипова С. В. / Ассоциативные свойства блок-сополимеров окиси этилена и окиси пропилена в водных растворах. // Дисс. канд. хим. наук. 02.00.06. — М. — 1990. —
132. Alakhova D. Y., Kabanov A. V. / Pluronic and MDR Reversal: An Update. // *Mol Pharm.* — 2014. — V. 11. — № 8. — P. 2566 – 2578
133. Batrakova E. V., Shu Li, Vinogradov S. V., Alakhov V. Y., Miller D. W., Kabanov A. V. / Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. // *J Pharmacol Exp Ther.* — 2001. — V. 299. — № 2. — P. 483 - 493
134. 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.* — 2011. — V. 142. — № 1. — P. 89 – 100
135. Wasungu L., Marty A. L., Bureau M. F., Kichler A., Bessodes M., Teissie J., Scherman D., Rols M.P., Mignet N. / Pre-treatment of cells with pluronic L64 increases DNA transfection mediated by electrotransfer. // *J Control Release.* — 2011. — V. 149. — № 2. — P. 117 - 125
136. Sahay G., Batrakova E. V., Kabanov A. V. / Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effect on vesicular transport. // *Bioconjugate Chem.* — 2008. — V. 19. — № 10. — P. 2023 - 2029
137. Sahay G., Gautam V., Luxenhofer R., Kabanov A. V. / The utilization of pathogen-like cellular trafficking by single chain block copolymer // *Biomaterials.* — 2010. — V. 31. — № 7. — P. 1757 – 1764
138. Han M., Diao Y. Y., Jiang H. L., Ying X. Y., Chen D. W., Liang W. Q., Gao J. Q. / Molecular mechanism study of chemosensitization of doxorubicin-resistant human myelogenous leukemia cells induced by a composite polymer micelle // *Int. J. Pharm.* — 2011. — V. 420. — № 2. — P. 404 – 411
139. Redhead M., Mantovani G., Nawaz S., Carbone P., Gorecki D. C., Alexander C., Bosquillon C. / Relationship between the Affinity of PEO-PPO-PEO Block Copolymers for Biological Membranes and Their Cellular Effects // *Pharm. Res.* — 2012. — V. 29. — № 7. — P. 1908 – 1918
140. Бондарь О. В., Сагитова А. В., Бадеев Ю. В., Штырлин Ю. Г., Абдуллин Т.И. / Мембранотропные свойства конъюгатов блок-сополимеров этилен-и пропиленоксида с янтарной кислотой // *Биологические мембраны.* — 2013. — Т. 30. — № 2. — С. 147 - 156

-
141. Брустовецкий Н. Н., Дедухова В. Н., Егорова М. В., Мохова Е. Н., Скулачев В. П. / Разобщение окислительного фосфорилирования жирными кислотами и детергентами, подавляемое ингибиторами АТФ/АДФ антипортера // Биохимия. — 1991. — Т. 56. — № 6. — С. 1042 - 1048
142. Batrakova E. V., Li S., Elmquist W. F., Miller D. W., Alakhov V. Y., Kabanov A. V. / Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion // Br. J. Cancer. — 2001. — V. 85. — № 12. — P. 1987 - 1997
143. Kabanov A. V., Batrakova E. V., Alakhov V. Y. / An essential relationship between ATP depletion and chemosensitizing activity of Pluronic block copolymers // J. Control Release. — 2003. — V. 91. — № 1-2. — P. 75 - 83
144. Woodcock D. M., Jefferson S., Linsenmeyer M.E., Growther P. J., Chojnowski G.M., Williams B., Bertocello I. / Reversal of the multidrug resistance phenotype with cremophor EL, a common vehicle for water-insoluble vitamins and drugs // Cancer Res. — 1990. — V. 50. — P. 4199 – 4203
145. Нам Е. В., Жирнов А. Е., Литманович Е. А., Мелик-Нубаров Н. С., Гроздова И. Д. . Влияние модификации флуоресцентными группами на физико-химические свойства полиалкиленоксидов // Высокомолекул. соедин. Сер. А — 2010. — Т. 52. — № 9. — С. 1578 - 1584
146. Shchepinova M. M., Denisov S. S., Kotova E. A., Khailova L. S., Knorre D. A., Korshunova G. A., Tashlitsky V. N., Severin F. F., Antonenko Y. N. / Dodecyl and octyl esters of fluorescein as protonophores // Biochim. Biophys. Acta. — 2014. — V. 1837. — № 1. — P. 149 - 158
147. Terlouw O., Tanriseven O., Russel F. G., Masereeuw R. / Metabolite anion carriers mediate the uptake of the anionic drug fluorescein in renal cortical mitochondria // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2000. — V. 292. — № 3. — P. 968 – 973
148. Thomas P.J., Gaspers L.D., Pharr C., Thomas J.A. / Continuous measurement of mitochondrial pH gradients in isolated hepatocytes by difference ratio spectroscopy // Arch. Biochem. Biophys. — 1991. — V. 288. — № 1. — P. 250 – 260
149. Masereeuw R., van den Bergh E.J., Bindels R.J., Russel F.G. / Characterization of fluorescein transport in isolated proximal tubular cells of the rat: evidence for mitochondrial accumulation // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1994. — V. 269. — № 3. — P. 1261 – 1267
150. Eytan G. D., Regev R., Oren G., Hurwitz C. D., Assaraf Y. G. / Efficiency of P-glycoprotein-mediated exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate // Eur. J. Biochem. — 1997. — V. 248. — № 1. — P. 104 - 112

-
151. Melik-Nubarov N. S., Krylova O. O. / The control of membrane properties by synthetic polymers. In: *Advances in Planar Bilayers and Liposomes* (A. Ottova-Leitmannova and Tien H.T. Eds) // Elsevier. — 2005. — V. 2. — № 5. — P. 122 - 166
152. Chang L. C., Lin C. Y., Kuo M. W., Gau C. S. / Interactions of Pluronics with phospholipid monolayers at the air-water interface // *J. Colloid. Interface Sci.* 2005. V. 285. № 2. P. 640 – 652
153. Chang L. C., Chang Y. Y., Gau C. S. / Interfacial properties of Pluronic and the interactions between Pluronics and cholesterol/DPPC mixed monolayers // *J. Colloid. Interface Sci.* — 2008. — V. 322. — № 1. — P. 263 – 273
154. Павлов Д. Н., Дородных Т. Ю., Заборова О. В., Мелик-Нубаров Н. С. / Взаимодействие сополимеров диметилсилоксана и окиси этилена с модельными мембранами и раковыми клетками. // *Высокомолекул. соедин. Сер. А.* — 2009. — Т. 51. — № 3. — P. 428 – 435
155. Lee B., Firestone M. A. / Electron density mapping of triblock copolymers associated with model biomembranes: Insights into conformational states and effect on bilayer structure // *Biomacromolecules.* — 2008. — V. 9. — № 6. — P. 1541 – 1550
156. Krylova O. O., Pohl P. / Ionophoric activity of pluronic block copolymers // *Biochemistry.* — 2004. — V. 43. — № 12. — P. 3696 - 3703
157. Melik-Nubarov N. S., Pomaz O. O., Dorodnych T. Yu., Badun G. A., Ksenofontov A. L., Schemchukova O. B., Arzhakov S. A. / Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers // *FEBS Lett.* — 1999. — V. 446. — № 1. — P. 194 - 198
158. Regev R., Assaraf Y. G., Eytan G.D. / Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells // *Eur. J. Biochem.* — 1999. — V. 259. — № 1-2. — P. 18 - 24
159. Woodcock D. M., Linsenmeyer M. E., Chojnowski G., Kriegler A. B., Nink V., Webster L. K. et al. / Reversal of multidrug resistance by surfactants // *Br. J. Cancer.* — 1992. — V. 66. — № 1. — P. 62 - 68
160. Dudeja P. K., Anderson K. M., Harris J. S., Buckingham L., Coon J. S. / Reversal of multidrug resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1995. — V. 319. — № 1. — P. 309 - 315
161. Ferte J. / Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. // *Eur J Biochem.* — 2000. — V. 267. — № 2. — P. 277 - 294

-
162. Rosenberg M. F., Callaghan R., Modok S., Higgins C. F., Ford R. C. / Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280. — № 4. — P. 2857 - 2862
163. Jodoin J., Demeule M., Fenart L., Cecchelli R., Farmer S., Linton K. J., Higgins C. F., Béliveau R. / P-glycoprotein in blood brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins // *J. Neurochem.* — 2003. — V. 87. — № 4. — P. 1010 - 1023
164. 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. — V. 21. — № 12. — P. 2226 - 2233
165. Guan Y., Huang J., Zuo L., Xu J., Si L., Qiu J., Li G. / Effect of Pluronic P123 and F127 Block Copolymer on P-glycoprotein Transport and CYP3A Metabolism // *Arch. Pharm. Res.* — 2011. — V. 34. — № 10. — P. 1719 - 1728
166. Guo D. D., Moon H. - S., Arote R., Seo J. - H., Quan J.- S., Choi Y. - J., Cho C. - S. / Enhanced anticancer effect of conjugated linoleic acid by conjugation with Pluronic F127 on MCF-7 breast cancer cells // *Cancer Letters.* — 2007. — V. 254. — № 2. — P. 244 – 254
167. Chen Y. - C., Liang H. - D., Zhang Q. - P., Blomley M. K., Lu Q. L. / Pluronic block copolymers: novel functions in ultrasound-mediated gene transfer and against cell damage // *Ultrasound in Medicine and Biology.* — 2006. — V. 32. — № 1. — P. 131 – 137
168. Exner A. A., Krupka T. M., Scherrer K., Teets J. M. / Enhancement of carboplatin toxicity by Pluronic block copolymers // *Journal of Controlled Release.* — 2005. — V. 106. — № 1-2. — P. 188 – 197
169. Palmer W. K., Emeson E. E., Johnston T. P. / Poloxamer 407-induced atherogenesis in the C57BL/6 mouse // *Atherosclerosis.* — 1998. — V. 136. — № 1. — P. 115 – 123
170. Warren A., Benseler V., Cogger V.C., Bertolino P., Le Couteur D.G. / The impact of poloxamer 407 on the ultrastructure of the liver and evidence for clearance by extensive endothelial and kupffer cell endocytosis // *Toxicol Pathol.* — 2011. — V. 39. — № 2. — P. 390 - 397
171. Schaer G.L., Spaccavento L. J., Browne K. F., Krueger K. A., Krichbaum D., Phelan J. M., Fletcher W. O., Grines C. L., Edwards S., Jolly M. K., Gibbons R. J. / Beneficial effects of RheothRx injection in patients receiving thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Circulation.* — 1996. — V. 94. — № 3. — P. 298 – 307
172. Toth K., Bogar L., Juricskay I., Keltai M., Yusuf S., Haywood L. J., Meiselman H. J. / The effect of RheothRx injection on the hemorheological parameters in patients with acute myocardial infarction – (CORE trial substudy) // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* — 1997. — V. 17. — № 2. — P. 117 – 125

-
173. Hunter R., Strickland F., Kézdy F. / The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. I. The role of hydrophile-lipophile balance // *J. Immunol.* — 1981. — V. 127. — № 3. — P. 1244 - 1250
174. Johnston T. P., Miller S.C. / Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use // *J. Parenter. Sci. Technol.* — 1985. — V. 39. — № 2. — P. 83 – 89
175. Farrugia BL, Keddie DJ, George GA, Lynam EC, Brook MA, Upton Z, Dargaville TR. An investigation into the effect of amphiphilic siloxane oligomers on dermal fibroblasts, *J Biomed Mater Res. Part A.* — 2012. — V. 100A. — P. 1919–1927
176. Singh R., Kristensen S., Tonnesen H. H., Berg K. / The influence of Pluronics on dark cytotoxicity, photocytotoxicity, localization and uptake of curcumin in cancer cells. Studies on curcumin and curcuminoids XLIX // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2013. — V. 12. — № 3. — P. 559 - 575
177. Zhiyentayev T. M., Boltaev U. T., Solov'eva A. B., Aksenova N. A., Glagolev N. N., Chernjak A. V., Melik-Nubarov N. S. / Complexes of Chlorin e6 with Pluronics and Polyvinylpyrrolidone: Structure and Photodynamic Activity in Cell Culture. // *Photochem. Photobiol.* — 2014. — V. 90. — № 1. — P. 171 – 182
178. Nawaz S., Redhead M., Mantovani G., Alexander C., Bosquillon C., Carbone P. / Interactions of PEO–PPO–PEO block copolymers with lipid membranes: a computational and experimental study linking membrane lysis with polymer structure // *Soft Matter.* — 2012. — V. 8. — № 25. — P. 6744 - 6754
179. Guo C., Wang J., Liang X., Zheng L., Liu H. / Effect of bovine serum albumin on the micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers in aqueous solutions by fluorescence spectroscopy // *Sci. China. Ser. B: Chem.* — 2006. — V. 49. — № 6. — P. 541 – 549
180. Svensson M., Berggren K., Veide A., Tjerneld F. / Aqueous two-phase systems containing self-associating block copolymers – partitioning of hydrophilic and hydrophobic biomolecules // *J. Chromatogr. A.* — 1999. — V. 839. — № 1-2. — P. 71 – 83
181. Gulik-Krzywicki T. / Structural Studies of the Associations Between Biological Membrane Components. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1975. — V. 415. — № 1. — P. 1 – 28
182. Krupka T. M., Dremann D., Exner A. A. / Time and Dose Dependence of Pluronic Bioactivity in Hyperthermia-Induced Tumor Cell Death // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* — 2009. — V. 234. — № 1. — P. 95 - 104
183. Zhang Z., al Rubeai M., Thomas C. R. / Effect of Pluronic F-68 on the mechanical properties of mammalian cells // *Enzyme Microb Technol.* — 1992. — V. 14. — № 12. — P. 980 - 983

-
184. Kuo J. -H. S. / Effect of Pluronic-block copolymers on the reduction of serum-mediated inhibition of gene transfer of polyethyleneimine–DNA complexes // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2003. — V. 37. — № Pt 3. — P. 267 – 271
185. Togo T., Alderton J.M., Bi G.Q., Steinhardt R.A. / The mechanism of facilitated cell membrane resealing // *J. Cell Sci.* — 1999. — V. 112. — № Pt 5. — P. 719 - 731
186. Hellung-Larsen P., Assaad F., Pankratova S., Siefert B.L., Skovgaard L.T. / Effects of Pluronic F-68 on Tetrahymena cells: protection against chemical and physical stress and prolongation of survival under toxic conditions // *J. Biotechnol.* — 2000. — V. 76. — № 2. — P. 3185-3195
187. Murhammer D. W., Goochee C. F. / Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection // *Biotechnol. Prog.* — 1990. — V. 6. — № 5. — P. 391 - 397
188. Hannig J., Yu J., Beckett M., Weichselbaum R., Lee R. C. / Poloxamine 1107 sealing of radiopermeabilized erythrocyte membranes // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1999. — V. 75. — № 3. — P. 379 – 385
189. Lee R. C., Hannig J., Matthews K. L., Myerov A., Chen C. T. / Pharmaceutical therapies for sealing of permeabilized cell membranes in electrical injuries // *Ann NY Acad. Sci.* — 1999. — V. 888. — P. 266 – 273
190. Tharmalingam T., Ghebeh H., Wuerz T., Butler M. / Pluronic Enhances the Robustness and Reduces the Cell Attachment of Mammalian Cells // *Mol. Biotechnol.* — 2008. — V. 39. — № 2. — P. 167 – 177
191. Lasagna-Reeves C., Glabe C. G., Kaye R. / Poloxamer 188 copolymer membrane sealant rescues toxicity of amyloid oligomers in vitro // *J. Mol. Biol.* — 2009. — V. 391. — № 3. — P. 577 - 585
192. Kerleta V., Andriik I., Braunmuller S., Franke T., Wirth M., Gab F. / Poloxamer 188 Supplemented Culture Medium Increases the Vitality of Caco-2 Cells after Subcultivation and Freeze // *ALTEX.* — 2010. — V. 27. — № 3. — P. 191 - 197
193. Segel L.D., Minten J.M., Schweighardt F.K. / Fluorochemical emulsion APE-LM substantially improves cardiac preservation // *American J. Physiology.* — 1992. — V. 263. — № 3 Pt 2. — P. 730 - 739
194. Arakawa T., Timasheff S. N. / Mechanism of polyethylene glycol interaction with proteins // *Biochemistry.* — 1985. — V. 24. — № 24. — P. 6756 – 6762
195. Yuhua S., Ligen L., Jiake C., Tongzhu S. / Effect of Poloxamer 188 on deepening of deep second-degree burn wounds in the early stage // *Burns.* — 2012. — V. 38. — № 1. — P. 95 - 101

-
196. Paustian P. W., McPherson J. C., Haase R. R., Runner R. R., Plaoman K. M., Ward D. F., Nguyen F. H. / Intravenous Pluronic F127 in early burn wound treatment in rat // *Burns*. — 1993. — V. 19. — № 3. — P. 187 - 191
197. Schmolka I. R. / Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns // *J. Biomed. Mater. Res.* — 1972. — V. 6. — № 6. — P. 571 - 582
198. Nalbandian R. M., Henry R.L., Balko K. W., Adams D. V., Neuman N. R. / Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. // *J. Biomed. Mater. Res.* — 1987. — V. 21. — № 9. — P. 1135 - 1148
199. Khlebtsov N. G. / On the Dependence of the Light Scattering Intensity on the Averaged Size of Polydisperse Particles: Comments on the Paper by M.S. Dyuzheva et al. // *Colloid J.* — 2002. — V. 64. — № 1. — P. 39
200. Harrigan P. R., Wong K. F., Redelmeier T. E., Wheeler J. J., Cullis P. R. / Accumulation of doxorubicin and other lipophilic amines into large unilamellar vesicles in response to transmembrane pH gradients // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1993. — V. 1149. — № 2. — P. 329 - 338
201. Mosmann T. / Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.// *Journal of Immunological methods.* — 1983. — V. 65. — № 1. — P. 55 - 63
202. Frezard F., Garnier-Suillerot A. / Comparison of the membrane transport of anthracycline derivatives in drug-resistant and drug-sensitive K562 cells. // *Eur J Biochem.* — 1991. — V. 196. — № 2. — P. 483 - 491
203. Микулин В.П. //Фоторецептурный справочник для фотолюбителей// Москва 1960, С.77
204. Антипина А. Д., Барановский В. Ю., Паписов И. М., Кабанов В. А. / Особенности равновесий при образовании комплексов поликислот и полиэтиленгликолей. // *Высокомолекулярное соединение. Сер. А.* — 1972. — Т. 14. — №4. — С. 941 - 949
205. Zhirnov A. E., Demina T. V., Krylova O. O., Grozdova I. D., Melik-Nubarov N. S. / Lipid composition determines interaction of liposome membrane with Pluronic L61. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2005. — V. 1720. — № 1 – 2. — P. 73 - 83
206. Heerklotz H., Seelig J. / Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration // *Biophys. J.* — 2000. — V. 78. — № 5. — P. 2435 – 2440
207. Krylova O. O., Melik-Nubarov N. S., Badun G. A., Ksenofontov A. L., Menger F. M., Yaroslavov A. A. / Pluronic L61 accelerates flip-flop and transbilayer doxorubicin permeation // *Chemistry. A European Journal.* — 2003. — V. 9. — № 16. — P. 3930 - 3936

-
208. Heyden G., Magnusson B. C., Arwill T. / Histochemical study of rhodamine B affinity in oral tissues of the mouse. // *Scand J Dent Res.* — 1972. — V. 80. — № 1. — P. 40 - 46
209. Takai H. I., Kato A., Nakamura T., Tachibana T., Sakurai T., Nanami M., Suzuki M. / The importance of characterization of FITC-labeled antibodies used in tissue cross-reactivity studies. // *Acta Histochem.* — 2011. — V. 113. — № 4. — P. 472 - 476
210. L'Annunziata M. F. // *Handbook of Radioactivity Analysis*, Academic Press. — 2012. — P. 121
211. Fatma S. I., Yakubov R., Anwar K., Hussain M. M. / Pluronic L81 enhances triacylglycerol accumulation in the cytosol and inhibits chylomicron secretion. // *J Lipid Res.* — 2006. — V. 47. — № 11. — P. 2422 - 2432
212. Shchepina N. E., Avrorin V. V., Badun G. A., Alexandrova G. A., Ukhanov S. E., Fedoseev V. M., Lewis S. B., Boiko I. I. / Preparation of n-phenyl-substituted quinolinium derivatives labeled with tritium by chemonuclear synthesis. // *Chem. Heterocycl. Comp.* — 2009. — V. 45. — № 7. — P. 796 - 801