

Л. В. Іванов¹, Н. Т. Картель¹, А. Н. Ляпунов², О. А. Нардід³,
Я. О. Черкашина³, Л. В. Деримедвідь⁴, І. А. Кирилюк⁵

Вивчення механізмів цитотоксичності низки гідрофільних поллоксамерів методом спінових зондів

¹Інститут хімії поверхні імені О. О. Чуйка Національної академії наук України, м. Київ

²Інститут монокристалів Національної академії наук України, м. Харків

³Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, м. Харків

⁴Національний фармацевтичний університет, м. Харків

⁵Новосибірський інститут органічної хімії СВ Російської академії наук, м. Новосибірськ

Ключові слова: поллоксамери,
поліпропіленгліколь, спінові зонди,
мікров'язкість мембран

Синтетичні амфифільні блок-сополімери привернули увагу біохіміків ще тоді, коли 25 років тому було виявлено, що триблочні сополімери зі структурою поліетиленгліколь (ПЕГ) – поліпропіленгліколь (ППГ) – поліетиленгліколь (поллоксамер, проксанол або плюронік) здатні знижувати стійкість ракових клітин до ліків (множинна лікарська стійкість, МЛС), пригнічуючи вихід ліків із клітини й тим самим підвищувати ефективність хіміотерапії [1]. Розроблено лікарську форму SP1049C, що становить суміш поллоксамерів з протипухлинним антибіотиком доксорубіцином, яка успішно пройшла другу фазу клінічних випробувань для лікування пацієнтів із раком стравоходу [2].

Цитотоксична концентрація неіоногенного амфифільного блок-сополімеру поллоксамеру визначається масовою часткою гідрофільного блоку – гідрофільно-ліпофільним балансом (ГЛБ); чим більше гідрофільний полімер, тим він менш токсичний. Виявлено, що загальна гідрофобність макромолекули блок-сополімеру поллоксамеру й обсяг його гідрофобного блоку (ППГ) зумовлюють здатність пригнічувати стійкість ракових клітин до протипухлинних препаратів доксорубіцину [3].

При дослідженні взаємодії поллоксамеру з модельною бішаровою мембраною встановлено, що ППГ блок вбудо-

вується в область залишків жирних кислот, а блок ПЕГ експонується у водну фазу [4]. Додавання поллоксамеру з довжиною гідрофобного блоку (ППГ), що відповідає товщині мембрани, викликало значне збільшення відстані між шарами у мультиламелярній фазі. Поллоксамери, які містять короткі ланцюги пропіленгліколю (15 ланок), що не вбудовувалися в бішар, не викликали ніяких змін у багатошаровій структурі [5].

Отримані результати переконливо свідчать на користь того, що гідрофобний ППГ блок поллоксамеру локалізується в гідрофобній області модельної ліпідної мембрани, а максимальна кількість полімеру, що здатна зв'язатися з ліпідним бішаром, становить близько 1 макромолекули на 10–20 молекул ліпіда [6–8].

У роботі з використанням поллоксамеру міченого тритієм і кон'югованого з фотоактивованою міткою – пара-1-трифторметилдіазириніл-бензойної кислоти, було показано, що при інкубації цього кон'югату з клітинами він зв'язується з ліпідами, тобто так само, як і у випадку штучних мембран [9]. Зв'язування поллоксамеру з ліпідами клітинної мембрани призводить до зниження мікров'язкості мембран клітин.

Показано, що зниження МЛС ракових клітин до протипухлинних препаратів під дією поллоксамеру пов'язано з інгібуванням ключового мембранного білка ракових клітин Р-gp – Р-глікопротеїну, активність якого дуже чутлива до стану найближчого ліпідно-

го оточення [10], а сам механізм інгібування білка Р-гр пов'язаний з взаємодією поллоксамеру з ліпідами мембран ракових клітин і зниженням мікрров'язкості мембран (розпушенням мембран), при якому порушується конформація макромолекули Р-гр [11]. Збільшення рухливості ліпідів уперше було показано на нормальних лімфоцитах і ракових клітинах у культурі в експериментах з вимірювання анізотропії флуоресценції зонда 2,4,6-дифенілгексатрієна (ДФГТ), що свідчило про зменшення мікрров'язкості клітинних мембран. Низка дослідників вважають, що було зафіксовано зміну мікрров'язкості саме зовнішньої мембрани клітин, оскільки за даними літератури ДФГТ вбудовується в основному в плазматичну мембрану [12].

Запропоновано два можливих механізми інгібування мембранного білка Р-гр ракових клітин під дією поллоксамеру: зниження активності АТФ-залежного мембранного білка Р-гр за рахунок порушення функціонування мітохондрій клітин і порушення активної конформації макромолекули Р-гр у ліпідах мембран внаслідок зниження мікрров'язкості мембран (розпушення мембран) ракових клітин під дією поллоксамеру [3].

Порівняння поллоксамерів різного складу показало, що ступінь викликаного ними пригнічення МЛС залежить від гідрофільно-ліпофільного балансу й довжини гідрофобного блоку ППГ [26]. Максимальний ефект чинили поллоксамери з середніми значеннями ГЛБ (15–16 ланок), які відповідають відносно короткому блоку ПЕГ (30–56 ланок) і середній довжині гідрофобних блоків ППГ (30–60 ланок). Гідрофільні поллоксамери, масова частка ПЕГ у яких становить 70–80 %, а ГЛБ = 20–29, практично не впливали на стійкість клітин [26]. Проте останнім часом у літературі стали з'являтися роботи, що демонструють вплив цих поллоксамерів на активність Р-гр. У суміші з іншими поллоксамерами вони здатні збільшувати поглинання ліків клітинами [27].

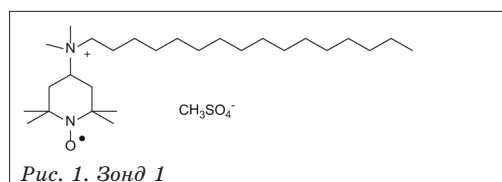
У зв'язку з цим стає актуальним вивчення механізмів цитотоксичності й пригнічення МЛС ракових клітин гід-

рофільними поллоксамерами з великими ПЕГ блоками, дослідження яких були явно недостатніми. Не зовсім ясна роль гідрофільного блоку (ПЕГ) поллоксамеру при його зв'язуванні з мембранами клітин і впливу гідрофільного блоку на структуру мембран як ракових, так і інших клітин. Гіпотеза про нейтральність і нетоксичність гідрофільного блоку поллоксамеру (ПЕГ) відносно мембран різних клітин не узгоджується з нашим власним тривалим досвідом робіт щодо впливу ПЕГ різної молекулярної маси на білки й мембрани клітин.

Мета дослідження – експериментальне визначення впливу гідрофільних поллоксамерів різної структури на мікрров'язкість мембран еритроцитів людини й щура методом спінових зондів, а також впливу високомолекулярних ПЕГ як гідрофільних блоків поллоксамеру на мембрани різних клітин і білки різної структури. Це дозволить виявити додаткові нові механізми цитотоксичності та пригнічення МЛС ракових клітин не тільки для гідрофільних поллоксамерів, а й поллоксамерів із середніми значеннями ГЛБ.

Матеріали та методи. У роботі використано метод спінових зондів, у якому за спектрами електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) стабільних нітроксильних радикалів на основі пальмітинової кислоти (що дозволяє їм вбудовуватися в ліпофільний шар мембран еритроцитів) оцінювали час кореляції броунівської обертальної дифузії зондів у мембранах клітин.

Для вивчення мікрров'язкості мембран еритроцитів у присутності розчинників і полімерів був обраний спіновий зонд 1 на основі пальмітинової кислоти. Зонд 1 – нітроксильний радикал 4-(N, N-диметил-N-гексадециламонію) – ТЕМПОЛ містить у своєму складі четвертинний амонійний фрагмент, завдяки чому може розглядатися як іоногенна ПАР (рис. 1).



Уведення зонда 1, синтезованого за схемою [13, 14], у водну суспензію еритроцитів здійснювали додаванням концентрованого розчину зонда в ДМСО таким чином, щоб кінцева концентрація ДМСО у суспензії еритроцитів була в межах 0,5–1 %. Реєстрацію спектрів ЕПР здійснювали на радіоспектрометрі «ESR Spectrometer CMS8400». Оцінку мікрів'язкості мембран еритроцитів проводили на основі обробки інтенсивності й ширини ліній триплету ЕПР спектрів нітроксильних радикалів – спінового зонда 1, що знаходиться в ліпідному бішарі мембран еритроцитів [15, 16]. Для розрахунку часу кореляції броунівського обертальної дифузії зонда (τ) використовували такі параметри спектрів: ширину центральної компоненти (ΔH_0), інтенсивність компонентів спектра ЕПР (h_0, h_{+1}, h_{-1}) з магнітним квантовим числом ядра ^{14}N ($M = 0, +1, -1$), ізотропну константу розщеплення ($A_{\text{изо}}$). Базовим рівнянням для оцінки в'язкості будь-яких середовищ є рівняння Стокса-Ейнштейна:

$$\tau_c = 4\pi a^3 \cdot \eta / 3kT, \quad (1)$$

де: τ_c – час кореляції спінового зонда (час, за який спіновий зонд розгортається на 1 радіан, 57°), η – в'язкість середовища, a – ефективний радіус спінового зонда, який визначають за спектрами ЕПР [15, 16].

$$1/\tau_{c(+1)} = \frac{2 \cdot 10^8}{[(h_0/h_{+1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ c}^{-1}} \quad (2a)$$

$$1/\tau_{c(-1)} = \frac{3,6 \cdot 10^9}{[(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ c}^{-1}} \quad (2b)$$

$$\tau_{c(+1/-1)} = 6,65 \cdot 10^{-10} [(h_{+1}/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_{+1} \text{ c}^{-1} \quad (2b)$$

Враховуючи структуру спінового зонда 1, а також анізотропне обертання його навколо довгої осі молекули, при аналізі результатів впливу полксамеру на мікрів'язкість мембран еритроцитів слід, у першу чергу, спиратися на час кореляції $\tau_{c(+1/-1)}$, який враховує анізотропію спектрів ЕПР і анізотропне обертання зондів у ліпідному бішарі мембран клітин [15, 16].

Еритроцити щурів для досліджень отримували з крові щурів самців триразовим відмиванням фізіологічним розчином (0,89 % хлориду натрію), приготованим на натрій-фосфатному буфері (5 ммоль/л, pH 7,2–7,4), шляхом центрифугування при 3000 об/хв протягом 20 хв. Еритроцити людини отримували зі свіжоконсервованої донорської крові, заготовленої на глюціровому консерванті. Кров отримували на Харківській обласній станції переливання крові. З метою уніфікації об'єкта в роботі використовували кров II групи. Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали шляхом центрифугування при 1500 g протягом 3 хв у 10-разовому об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л хлориду натрію, 0,01 моль/л трис-буфер, pH 7,4).

Вивчали наступні гідрофільні полксамери – 188, 237, 268, 338 і 407 (табл. 1), а також ПЕГ-1500, ПЕГ-2000 і ПЕГ-4000, які можуть бути представлені наступною загальною формулою (European pharmacopoeia 7.0):



Номери полксамерів містять 3 цифри – перші дві цифри, помножені на 100, приблизно відповідають молекулярній масі гідрофобного ППГ блоку, а остання цифра, помножена на 10, показує процентний вміст гідрофільного ПЕГ блоку. 30 % або 15 % водні розчини полксамерів вводили до суспензії еритроцитів шляхом додавання в завязь еритроцитів по краплях у різних співвідношеннях.

Результати та їх обговорення. Спіновий зонд 1 вбудовується в мембрану подібно до основного фосфоліпиду мембран клітин фосфатидилхоліну, нітроксильний фрагмент зонда 1 з неспареним електроном знаходиться в ліпідному оточенні мембран [13, 14]. Конформаційна рухливість алкільних хвостів фосфоліпідів зростає при віддаленні від поверхні вглиб мембрани (в'язкість падає) [17]. Нітроксильний фрагмент зонда 1 «затиснутий» між фосфоліпідними головками в мембрані, тому обертальна рухливість зонда 1 може бути вельми чутлива до зміни щільності упаковки фосфоліпідів мембран клітин

Характеристики полоксамерів

Тип полоксамеру	Ланки етиленоксиду (а)	Ланки пропіленоксиду (б)	Вміст оксиетилену, %	Середня молекулярна маса
188	75–85 (мол. м 3500)	25–30	79,9–83,7	7680–9510
237	60–68 (мол. м. 2800)	35–40	70,5–74,3	6840–8830
338	137–146 (мол. м. 6200)	42–47	81,4–84,9	12 700–17 400
407	95–105 (мол. м. 4400)	54–60	71,5–74,9	9840–14 600

при зв'язуванні полоксамеру з поверхнею мембран еритроцитів. Вбудовування ланок етиленгліколю та пропіленгліколю полоксамеру між молекулами фосфоліпідів мембран може змінювати щільність упаковки фосфоліпідів у мембрані (мікров'язкість) і порушувати рідкокристалічну структуру мембран. Аналізуючи вплив досліджуваних полоксамерів на мікров'язкість мембран еритроцитів необхідно враховувати те, що осмотично активні полоксамери можуть одночасно викликати різноспрямовані ефекти в мембрані клітин: дегідратацію та ущільнення клітин, порушення рідкокристалічної структури мембран клітин, порушення білок-ліпідних взаємодій у мембрані клітин.

На рисунках 2 та 3 наведено спектри ЕПР спінового зонда 1 у мембранах еритроцитів людини та щура в присут-

ності деяких полоксамерів. Форма і параметри спектрів ЕПР (h_0/h_{-1}), які пов'язані з обертальною рухливістю зонда в мембрані, при введенні полоксамеру в еритроцити помітно відрізняються від таких у контролі. Досліджувані полоксамери мають по два великих гідрофільних ПЕГ блоки – молекулярною масою від 2800 до 6250. Вище було відзначено, що полоксамери взаємодіють з модельними мембранами клітин (ліпосоми) за допомогою гідрофобного ППГ блоку, а гідрофільні ПЕГ блоки спрямовані назовні у водне середовище і мало токсичні [4–8]. Для з'ясування цитотоксичності ПЕГ блоків гідрофільних полоксамерів, а також їхньої можливої ролі у пригніченні МЛС ракових клітин в таблицях 2 і 3 наведено дані щодо впливу високомолекулярного ПЕГ-1500 на параметри обертальної рухливості спінового зонда 1

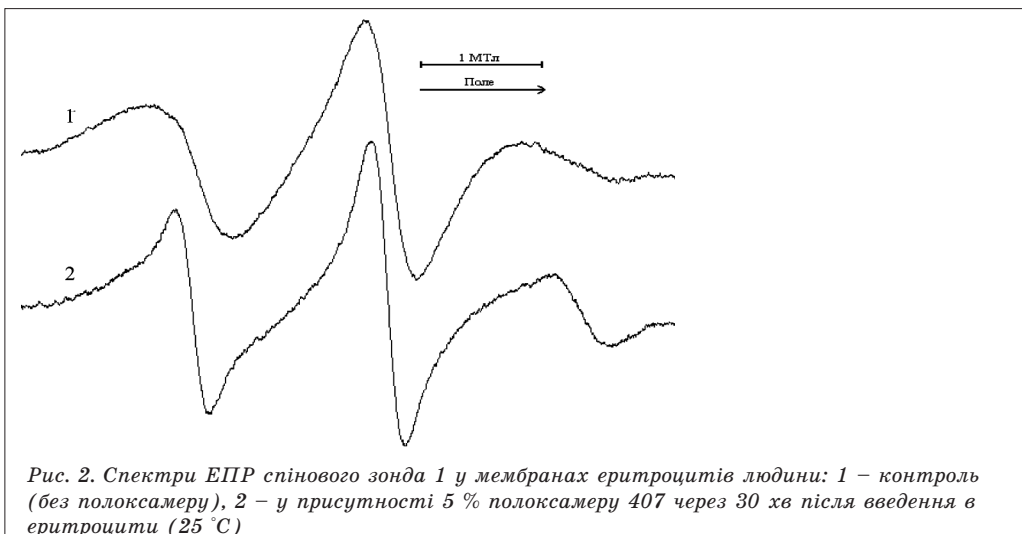
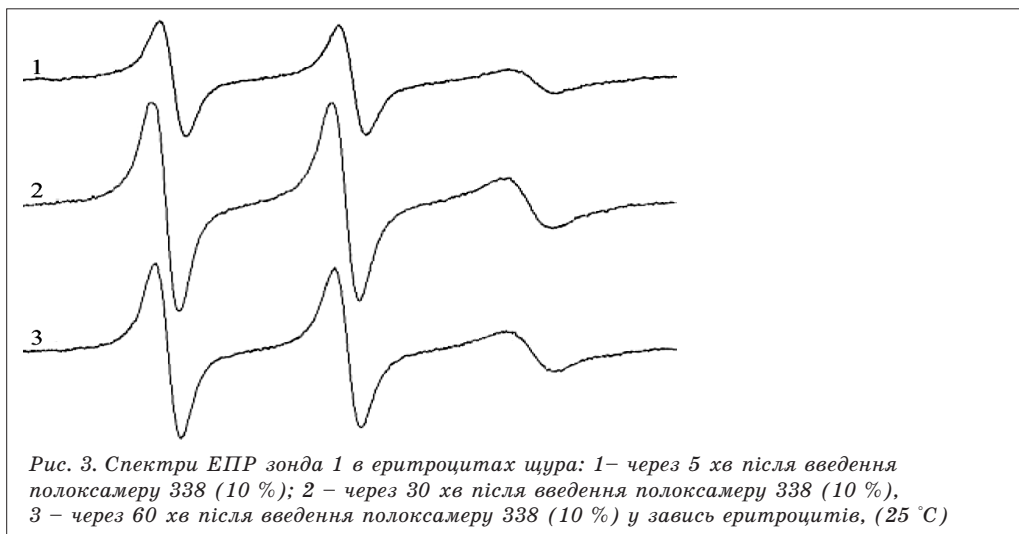


Рис. 2. Спектри ЕПР спінового зонда 1 у мембранах еритроцитів людини: 1 – контроль (без полоксамеру), 2 – у присутності 5 % полоксамеру 407 через 30 хв після введення в еритроцити (25 °С)



у мембранах еритроцитів, які пропорційні мікрров'язкості мембран клітин.

Результати впливу полімеру ПЕГ-1500 на мембрани еритроцитів людини наведено в таблицях 2 та 3. Аналіз даних таблиць 2 і 3 показав, що дія полімеру ПЕГ-1500 на мембрани еритроцитів людини полягає в невеликому, але стабільному зниженні мікрров'язкості мембран для всіх параметрів

часу кореляції зонда в мембрані протягом 1 год, незважаючи на велику в'язкість самого ПЕГ-1500.

У роботах кріобіологів, де ПЕГ-1500 використовують як кріопротектор, показано, що при додаванні ПЕГ-1500 до суспензії еритроцитів утворюється його міцний комплекс з мембраною, який при відмиванні ПЕГ-1500 викликає розрив клітин (гемоліз) [18, 19]. У

Таблиця 2

Значення величин часу кореляції, розрахованих за спектрами ЕПР зонда 1 у мембранах еритроцитів людини, у присутності ряду полуксамерів і ПЕГ за температури 25 °С

Умова досліджу	$\tau_{-1} \cdot 10^{10}$, с	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^{10}$, с
Контроль	17,9	70,3
ПЕГ 1500, 10 %, 10 хв	17,7	68,5
ПЕГ 1500, 10 %, 30 хв	15,6	67,2
ПЕГ 1500, 10 %, 60 хв	15,0	60,1
Полуксамер 407, 5 %, 10 хв	11,1	28,4
Полуксамер 407, 5 %, 30 хв	8,1	18,4
Полуксамер 407, 5 %, 60 хв	9,0	22,3
Полуксамер 338, 5 %, 10 хв	13,2	41,8
Полуксамер 338, 5 %, 30 хв	10,9	24,2
Полуксамер 308, 5 %, 60 хв	10,7	29,3
Полуксамер 237, 5 %, 10 хв	20,0	74,3
Полуксамер 237, 5 %, 30 хв	17,7	85,0
Полуксамер 237, 5 %, 60 хв	15,6	71,4
Полуксамер 188, 5 %, 10 хв	16,5	68,4
Полуксамер 188, 5 %, 30 хв	16,0	58,7
Полуксамер 188, 5 %, 60 хв	14,5	56,3

Значення величин часу кореляції, розрахованих за спектрами ЕПР зонда 1 у мембранах еритроцитів щурів, у присутності ряду полуксамерів і ПЕГ за температури 25 °С

Умова досліджу	$\tau_{-1} \cdot 10^9, \text{с}$	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^9, \text{с}$
Контроль	1,5	6,6
ПЕГ 150,0 10 %, 5 хв	1,6	5,5
ПЕГ 1500, 10 %, 30 хв	1,4	6,4
ПЕГ 1500, 10 %, 60 хв	1,6	6,7
Полоксамер 407, 5 %, 5 хв	1,0	2,7
Полоксамер 407, 5 %, 30 хв	0,9	2,4
Полоксамер 407, 5 %, 60 хв	1,1	2,5
Полоксамер 338, 5 %, 5 хв	1,2	3,3
Полоксамер 338, 5 %, 30 хв	1,2	4,3
Полоксамер 338, 5 %, 60 хв	1,3	3,7
Полоксамер 237, 5 %, 5 хв	1,7	5,7
Полоксамер 237, 5 %, 30 хв	1,6	5,8
Полоксамер 237, 5 %, 60 хв	1,6	6,7
Полоксамер 188, 5 %, 5 хв	1,7	6,2
Полоксамер 188, 5 %, 30 хв	1,7	5,3
Полоксамер 188, 5 %, 60 хв	1,6	6,8

той самий час введення полімеру ПЕГ-1500 в еритроцити щурів призводить до незначних коливань мікров'язкості мембран клітин в ту чи іншу сторону в межах помилки експерименту (табл. 3), що свідчить про більшу резистентність мембран еритроцитів щурів до високомолекулярних ПЕГ і це, мабуть, пов'язано з різним фосфоліпідним складом мембран еритроцитів людини та щурів [20]. Отримані результати показують, що гідрофільні ПЕГ блоки полуксамеру в деяких випадках можуть впливати на структуру мембран не модельних, а живих клітин.

Уведення 5 % полімеру полуксамеру 407 в еритроцити людини призводить до дуже сильного падіння мікров'язкості мембран еритроцитів вже протягом години – для параметра τ_{-1} максимально на 40–50 %, а для параметра $\tau_{+1/-1}$ – максимально на 60–75 %, що, мабуть є критичним для мембран еритроцитів (табл. 2). Дія полуксамеру 407 на мікров'язкість мембран клітин щурів також значна, але трохи нижча – максимальне падіння мікров'язкості для параметра τ_{-1} становить 37 %, а для

параметра $\tau_{+1/-1}$ – трохи більше 60 %. Значне падіння мікров'язкості мембран еритроцитів спостерігається й при введенні в еритроцити людини полуксамеру 338 – для параметра τ_{-1} максимально на 40 %, а для параметра $\tau_{+1/-1}$ – максимально на 65 % (табл. 2).

Проте присутність полуксамеру 338 в еритроцитах щурів, як і у випадку полуксамеру 407, призводить до помітно меншого падіння мікров'язкості мембран клітин – максимальне падіння мікров'язкості для параметра τ_{-1} становить 20 %, а для параметра $\tau_{+1/-1}$ – 50 %. І в цьому випадку еритроцити щурів більш стійкі (резистентні) до дії цитотоксичного проксанолу 338, ніж клітини людини (табл. 3).

Дія полуксамеру 237 на еритроцити людини характеризується невеликим збільшенням мікров'язкості мембран клітин (табл. 2), а дія полуксамеру 237 на еритроцити щурів не викликає помітних, достовірних змін параметрів τ_{-1} і $\tau_{+1/-1}$.

Уведення полуксамеру 188 в еритроцити людини призводить до невеликого поступового падіння мікров'язкості

мембран клітин протягом 1 год до – 20 %, чого не можна сказати про дію полоксамеру 188 на мембрани еритроцитів щурів, де спостерігаються незначні зміни мікрів'язкості мембран протягом 1 год в ту або іншу сторону.

На рисунку 4 представлені власні, раніше отримані дані про вплив різних фармацевтичних допоміжних речовин (ФДР) на броунівську обертальну рухливість спіні міченого амідру пальмітинової кислоти в ліпосомах з фосфатидилхоліну, яка пропорційна текучості мембран ліпосом [21]. По вісі ординат – логарифм частоти обертання ν зонда в мембрані ліпосом, пропорційний текучості мембран, а на вісі абсцис – концентрація розчинника. Графік показує, що додавання в ліпосоми полоксамеру 268 призводить до сильного збільшення текучості (зменшення в'язкості) мембран ліпосом, ефект зростає зі збільшенням концентрації полоксамеру. Ці дані підтверджують вищенаведені результати та дані зарубіжних дослідників, виконані на модельних мембранах з інших фосфоліпідів.

Взаємодію ПЕГ-1500 з мембраною ліпосом із фосфатидилхоліну вивчали за допомогою спіні міченого стероїду, спектр ЕПР якого в ліпосомах представляє суперпозицію широкого, загальмованого сигналу ЕПР, відповідного зонда в мембрані, і невеликої вузької компоненти у високопольній частині спектра, відповідно швидкому обертанню у воді міченого стероїду

(рис. 5). Уведення ПЕГ-1500 у ліпосоми супроводжується помітним збільшенням інтенсивності вузького сигналу від зонда у воді, що вказує на витиснення міченого стероїду з мембрани ліпосом у воду внаслідок зв'язування ПЕГ-1500 з мембраною ліпосом.

Аналогічний ефект був отриманий при вивченні зв'язування ПЕГ-1500 із мембраною мітохондрій – введення в мітохондрії ПЕГ-1500 супроводжувалося сильним зростанням вузької компоненти спектра ЕПР міченого стероїду, що вказувало на витиснення молекул міченого стероїду з мембрани в позаклітинну рідину при зв'язуванні ПЕГ-1500 із мембраною цих клітин (рис. 6).

Відомо, що ПЕГ різної молекулярної маси як гідрофільні блоки полоксамеру мають яскраво виражені осмотичні властивості [1], не враховувати це при аналізі впливу полоксамеру на мембрани клітин, у тому числі ракових, не можна.

На рисунку 7 надано власні дані щодо впливу ПЕГ на в'язкість внутрішньоклітинної води еритроцитів людини з використанням водорозчинного спінового зонда ТЕМПОЛІ, що знаходиться в цитозолі клітин еритроцитів [22].

По вісі ординат – параметр спектра ЕПР, пропорційний в'язкості внутрішньоклітинної рідини еритроцитів (цитозолу), по вісі абсцис – час експозиції розчинника з еритроцитами (хв). Додавання ПЕГ-2000 до еритроцитів призводить до повільного збільшення

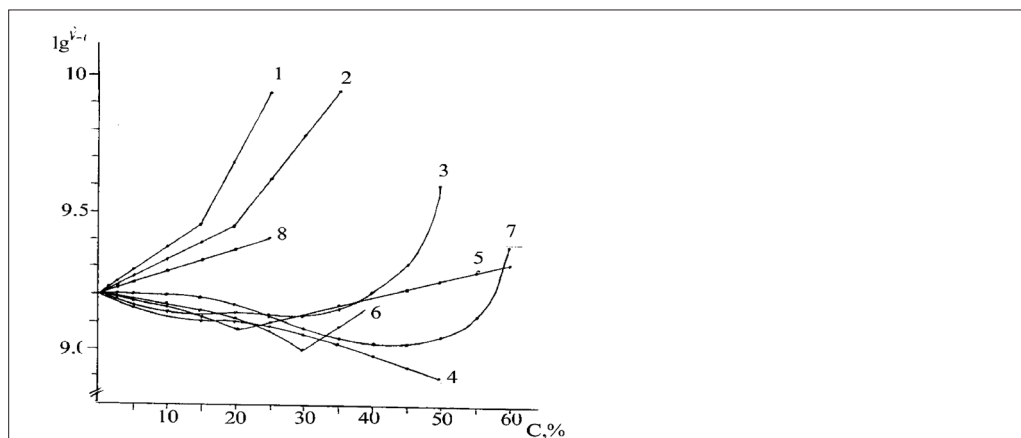


Рис. 4. Залежність параметра ν_1 спектра ЕПР спіні міченого амідру пальмітинової кислоти від концентрації розчинника: 1 – ізопропіловий спирт; 2 – етиловий спирт; 3 – пропіленгліколь; 4 – гліцерин; 5 – ПЕГ-400; 6 – ПЕГ-1500; 7 – димексид; 8 – полоксамер 268.

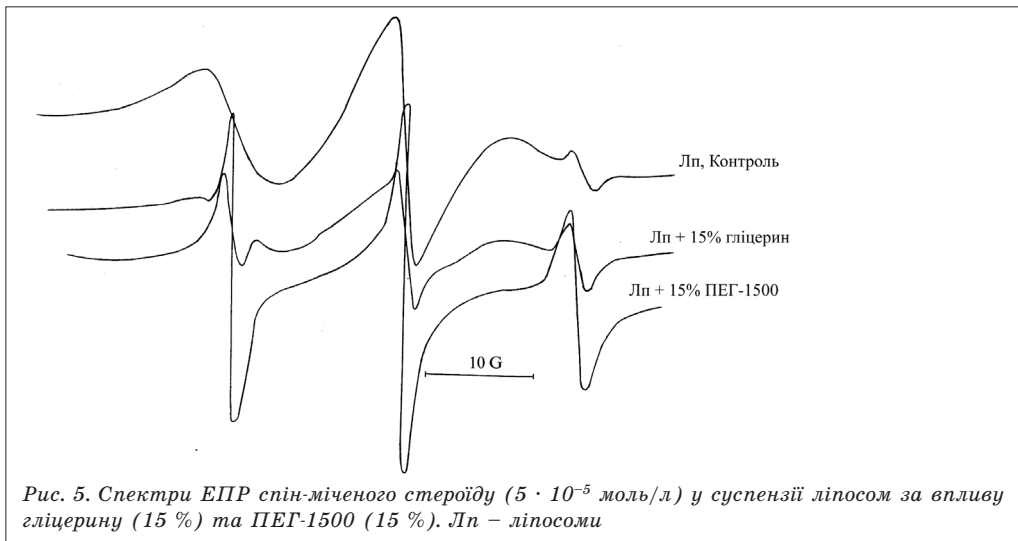


Рис. 5. Спектри ЕПР спин-міченого стероїду ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) у суспензії ліпосом за впливу гліцерину (15 %) та ПЕГ-1500 (15 %). Лп – ліпосоми

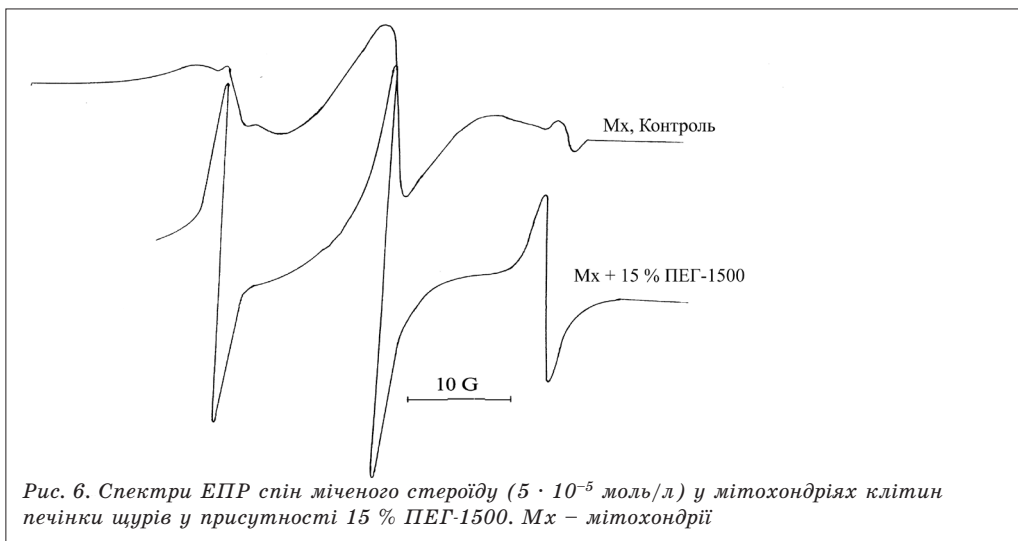


Рис. 6. Спектри ЕПР спин міченого стероїду ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) у мітохондріях клітин печінки щурів у присутності 15 % ПЕГ-1500. Мх – мітохондрії

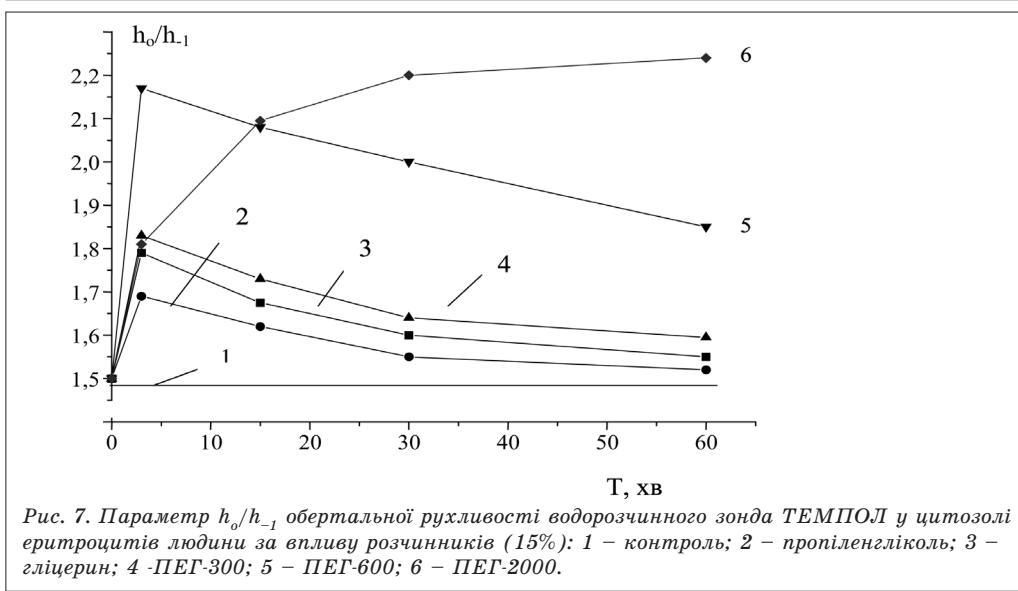


Рис. 7. Параметр h_0/h_{-1} обертальної рухливості водорозчинного зонда ТЕМПОЛ у цитозолі еритроцитів людини за впливу розчинників (15%): 1 – контроль; 2 – пропіленгліколь; 3 – гліцерин; 4 – ПЕГ-300; 5 – ПЕГ-600; 6 – ПЕГ-2000.

в'язкості цитозолу протягом 1 год і виходить на плато внаслідок стійкої в часі дегідратації клітини. Дегідратація клітин може призводити до зменшення внутрішньоклітинного об'єму і зміни форми клітин. Для низькомолекулярних ПЕГ початковий стрибок в'язкості цитозолу через 1 год знижується до норми внаслідок дифузії цих ПЕГ крізь мембрани всередину клітин і вирівнюванні осмотичного тиску зсередини та ззовні [22].

Приведені дані показують, що ПЕГ ефективно взаємодіють з мембранами різних клітин, викликаючи серйозні зміни в структурі ліпідного бішару мембран, проникності мембран, дегідратацію клітин, зміни внутрішнього об'єму клітин, аж до порушення цілісності мембран. Гідрофільні ПЕГ блоки поллоксамерів, мабуть, можуть крім ліпідів зв'язуватися та впливати на мембранні поверхневі білки ракових та інших клітин, а також впливати на білково-ліпідні взаємодії в мембрані.

На рисунку 8 наведено спектр ЕПР спіні міченого прогестерону в розчині сироваткового альбуміну бика (САБ), який зв'язується з однією з трьох гідрофобних порожнин (кишених), розташованих на поверхні макромолекули САБ і призначених для перенесення в крові гідрофобних ендogenous субстратів.

При цьому спектр ЕПР має вузьку компоненту в низькопольовій частині спектра, відповідну зонду у воді, широ-

кий сигнал ЕПР відповідає міченому прогестерону, який дуже повільно обертається в гідрофобній кишени САБ. Додавання високомолекулярних ПЕГ-1500, ПЕГ-2000 і ПЕГ-4000 до САБ призводить до збільшення інтенсивності вузької компоненти спектра ЕПР, тобто до витіснення міченого прогестерону у воду внаслідок зв'язування молекул ПЕГ із гідрофобною порожниною білка [22]. Ці дані свідчать, що молекули ПЕГ можуть конкурувати з ліпідами за гідрофобні порожнини мембранних білків і послаблювати білково-ліпідні взаємодії у мембранах клітин.

У більш ранніх роботах нами були отримані зразки спіні-міченого гемоглобіну, імуноглобуліну-G і САБ, у яких спінова йодацетамідна мітка ковалентно приєднувалася до β -93 SH групи гемоглобіну, SH групи цистеїну САБ і залишку гістидину імуноглобуліну-G [23, 24]. Показано, що введення ПЕГ-400 і ПЕГ-1500 у розчини білків призводить до помітного зменшення параметра обертальної рухливості $1/t_c$ спінової мітки, ковалентно пов'язаної з SH групою цистеїну або залишку гістидину на поверхні білкової глобули.

Зменшення рухливості спінової мітки на макромолекулах білків пов'язано з безпосередньою взаємодією молекул ПЕГ з поверхнею макромолекул. Це призводить до зменшення конформаційної рухливості (імобілізації) залишків амінокислот у районі

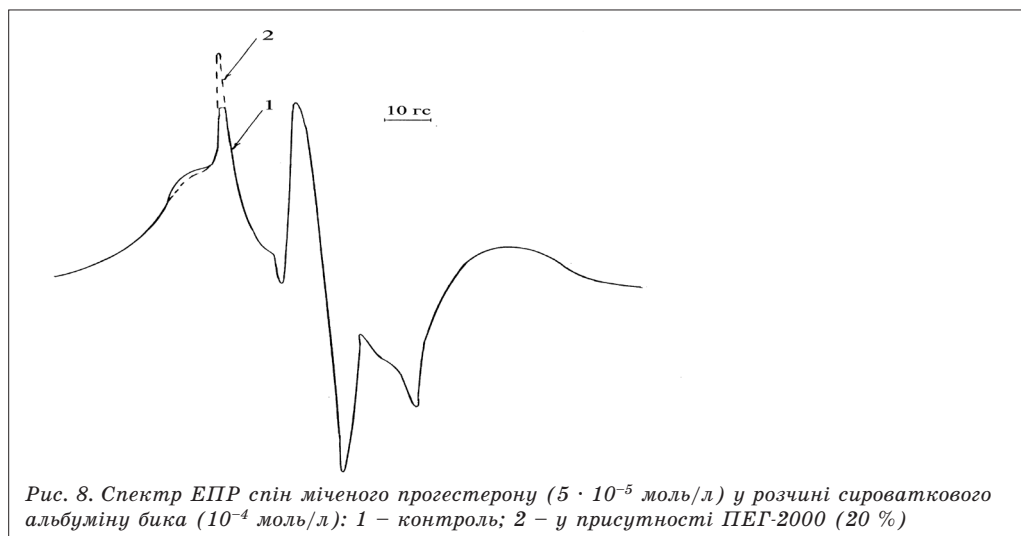


Рис. 8. Спектр ЕПР спіні міченого прогестерону ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) у розчині сироваткового альбуміну бика (10^{-4} моль/л): 1 – контроль; 2 – у присутності ПЕГ-2000 (20 %)

зв'язування ПЕГ з білковою глобулою [23, 24]. ПЕГ ефективно взаємодіють з поверхнею макромолекул білків, що призводить до іммобілізації конформаційної рухливості поверхневих фрагментів макромолекул білків. Суттєва роль при цьому належить частковій дегідратації поверхні білкової глобули та зміні кількості зв'язаної води на поверхні білка [25].

Висновки

За допомогою методу спінових зондів отримані нові дані про додаткові можливі механізми цитотоксичної дії гідрофільних поллоксамерів та гідрофільних ПЕГ блоків поллоксамерів, які можуть пояснити антиракову дію поллоксамерів. Показано, що дія полімеру ПЕГ-1500 на мембрани еритроцитів людини полягає в зниженні мікров'язкості мембран (15 %) протягом 1 год, незважаючи на велику в'язкість самого ПЕГ-1500. Вплив ПЕГ-1500 на мікров'язкість мембран еритроцитів щурів значно менший – кілька відсотків. Уведення 5 % поллоксамеру 407 в еритроцити людини призводить до сильного падіння мікров'язкості мембран еритроцитів протягом 1 год – для параметра τ_{-1} максимально на 40–50 %, а для параметра $\tau_{+1/-1}$ – максимально на 60–75 %, що мабуть є критичним для мембран еритроцитів. Падіння мікров'язкості мембран при введенні поллоксамеру 407 в еритроцити щура трохи нижче – для параметра τ_{-1} становить 37 %, а для параметра $\tau_{+1/-1}$ трохи більше 60 %. Значне падіння мікров'язкості мембран еритроцитів спостерігається і при введенні в еритроцити людини поллоксамеру 338 – для параметра τ_{-1} максимально на 40 %, а для параметра $\tau_{+1/-1}$ – максимально на 65 %. Присутність поллоксамеру 338 в еритроцитах щурів, як і у випадку поллоксамеру 407, призводить до меншого падіння мікров'язкості мембран клітин – для параметра τ_{-1} становить 20 %, а для параметра $\tau_{+1/-1}$ – 50 %. І в цьому випадку еритроцити

щурів більш стійкі (резистентні) до дії цитотоксичного проксанолу 338, ніж клітини людини. Полоксамер 237 значно не впливає на еритроцити людини і щурів, а поллоксамер 188 знижує мікров'язкість мембран клітин протягом 1 год на 20 %.

Додавання в ліпосоми поллоксамеру 268 призводить до сильного збільшення плинності (зменшення в'язкості) мембран ліпосом, ефект зростає зі збільшенням концентрації поллоксамеру. За допомогою спінових зондів показано взаємодію ПЕГ-1500 з ліпідним бішаром ліпосом і клітин мітохондрій, а також стійку в часі дегідратацію еритроцитів людини під впливом осмотично активного ПЕГ-2000. Отримані нові дані про взаємодію високомолекулярних ПЕГ-1500, ПЕГ-2000 і ПЕГ-4000 із гідрофобною порожниною (кишенею) поверхні глобули сироваткового альбуміну за допомогою гідрофобних метиленових груп. Ці дані свідчать про можливість послаблення білок-ліпідної взаємодії між мембранним глікопротеїном Р-гр і ліпідами мембран ракових клітин гідрофільними поллоксамерами, що суттєво знижуватиме активність цього ключового білка ракових клітин.

Підсумовуючи отримані результати, можна сказати, що механізми цитотоксичної дії поллоксамерів різної будови універсальні для багатьох клітин, не тільки ракових, і полягають у сильному зниженні мікров'язкості мембран клітин, яке знижує активність багатьох мембранних білків і ферментів. У гідрофільних поллоксамерів є додаткові механізми цитотоксичності і пригнічення МЛС ракових клітин, пов'язані з дією великих ПЕГ блоків на мембрани – додаткове розпушення мембран, ослаблення білок-ліпідної взаємодії між глікопротеїном Р-гр і ліпідами мембран ракових клітин, дегідратація мембран клітин, можлива взаємодія ПЕГ блоку з макромолекулою Р-гр з подальшою зміною активної конформації макромолекули білка.

1. Moghimi S. M. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine / Moghimi S. M., Hunter A. C. // Trends Biotechnol. – 2000. – V. 18. – № 10. – P. 412–420.
2. A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting Pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction / Valle J. W., Armstrong A., Newman C. [et al.] // Invest. New Drugs. – 2011. – V. 29. – P. 1029–1037.

3. Будкина О. А. Структурно-функциональные закономерности воздействия амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки: дисс. на соискание ученой степени канд. хим. наук / Будкина О. А. – Москва : МГУ- химфак. – 2015. – 135 с.
4. Мембранотропные свойства блок-сополимеров окиси этилена и окиси пропилена / Топчиева И. Н., Осипова С. В., Банацкая М. И., Валькова Л. А. // ДАН СССР. – 1989. – Т. 308. – С. 910–913.
5. Firestone M. A. 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 / Firestone M. A., Wolf A. C., Seifert S. // Biomacromolecules. – 2003. – V. 4, № 6. – P. 1539–1549.
6. Poloxamer sorption on liposomes: comparison with polystyrene latex and influence on solute efflux / Jamshaid M., Farr S. J., Kearney P. Kellaway I.W. // Int. J. Pharm. – 1988. – V. 48. – P. 125–131.
7. Kostarelos K. Physical conjugation of (tri-)block copolymers to liposomes toward the constoration of sterically stabilized vesicle systems / Kostarelos K., Tadros Th. F., Lusckham P. F. // Langmuir. – 1999. – V. 15, № 2. – P. 369–376.
8. Kostarelos K. Addition of block copolymers to liposomes prepared using soybean lecithin. Effects of formation, stability and the specific localization of the incorporated surfactants investigated / Kostarelos K., Luckham P. F., Tadros Th. F. // J. Liposome Research. – 1995. – V. 5, № 1. – P. 117–130.
9. Жирнов А. Е. / Взаимодействие полиалкиленоксидов с компонентами клеточных мембран: дисс. канд. хим. наук : специальность 02.00.06, 03.00.04. // Жирнов А. Е. – Москва, 2007. – 153 с.
10. Ferte J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane / Ferte J. // Eur J. Biochem. – 2000. – V. 267, № 2. – P. 277–294.
11. Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state / Rosenberg M. F., Callaghan R., Modok S. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, № 4. – P. 2857–2862.
12. Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers / Melik-Nubarov N. S., Pomaz O. O., Dorodnych T. Yu. [et al.] // FEBS Lett. – 1999. – V. 446, № 1. – P. 194–198.
13. Доставка липофильных спиновых зондов углеродными нанотрубками в эритроциты и плазму крови / Л. В. Иванов, А. Н. Ляпунов, Н. Т. Картель [и др.] // Поверхность. – 2014. – Вып. 6 (21). – С. 292–304.
14. Оценка влияния углеродных нанотрубок на микровязкость мембран эритроцитов / Н. Т. Картель, Л. В. Иванов, А. Н. Ляпунов [и др.] // Доповіді Нац. акад. наук України. – 2015. – № 3. – С. 114–121.
15. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г. И. Лихтенштейн. – Москва : Наука, 1974. – С. 12–24.
16. Метод спиновых меток. Теория и применения / Под ред. Л. Берлинера. – Москва : Мир, 1979. – 639 с.
17. Мак-Коннелл Г. М. Спиновые метки. Теория и применение / Г. М. Мак-Коннелл. – Москва : Мир, 1979.
18. Межидов С. Х. Дегидратация эритроцитов компонентами криоконсервирующих сред / С. Х. Межидов, В. А. Моисеев, О. А. Нардид // Криобиология. – 1989. – № 2. – С. 13–16.
19. Нардид О. А. Влияние криопротекторов на белок-липидные взаимодействия в мембранах эритроцитов // Физико-химические процессы в криобиологических системах: статьи / О. А. Нардид, Л. В. Цымбал, А. К. Гулевский. – Харьков, 1991. – С. 102–106.
20. Wessels J. M. C. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species / J. M. C. Wessels, J. H. Veerkam'p // Biochimica et Biophysica Acta. – 1973. – V. 291. – P. 190–196.
21. Влияние состава двухкомпонентных растворителей на биологические мембраны / Иванов Л. В., Ляпунов Н. А., Цымбал Л. В. [и др.] // Хим.-фармац. ж. – 1986. – № 12. – С. 1437–1443.
22. Иванов Л. В. / Характеризация реологических свойств поверхности нанообъектов методом спиновых зондов / Л. В. Иванов, Н. Т. Картель // Поверхность. – 2012. – Вып. 4 (19). – С. 334–348.
23. The mechanism of action of low temperature and crioprotective agent on immunoprotein / Tsutsaeva U. F., Pushkar N. S., Matnova V. M. [et. al.] // Criobiology. – 1976. – V. 15, № 4. – P. 94–97.
24. Ivanov L. V. The effect of low temperatures and cryoprotectans on the state of globular protein / Ivanov L. V., Gavrilova I. I., Moiseev V. A. // Abstr. Second Intern. Conference on Water and ions in Biol. syst. – Buchurest, 1982. – P. 43.
25. Моисеев В. А. Молекулярные механизмы криоповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: дисс. на соиск. ученой степени докт. биол. наук / Моисеев В. А.; ИПКиК АН СССР. – Харьков, 1984. – 331 с.
26. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells / Batrakova E. V., Li S., Alakhov V. Y. [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2003. – V. 304, № 2. – P. 845–854.
27. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by Pluronic P123/F127 block copolymers: Relationship between copolymer concentration and inhibitory activity / Wei Z., Yuan S., Hao J., Fang X. // Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2013. – V. 83, № 2. – P. 266–274.

**Л. В. Иванов, Н. Т. Картель, А. Н. Ляпунов, О. А. Нардід, Я. О. Черкашина,
Деримедвідь Л. В., І. А. Кирилюк**

**Вивчення механізмів цитотоксичності низки гідрофільних поллоксамерів
методом спінових зондів**

За допомогою методу спінових зондів отримано нові дані щодо можливих механізмів цитотоксичної дії низки гідрофільних поллоксамерів із великими гідрофільними (ПЕГ) блоками, що може призводити до зниження множинної лікарської стійкості (МЛС) ракових клітин. Для цього досліджено взаємодію ряду гідрофільних поллоксамерів і окремо високомолекулярних ПЕГ як гідрофільних блоків поллоксамерів, з модельними мембранами, живими клітинами і білками різної структури, а також їхній вплив на конформаційну рухливість ліпідів мембран клітин і макромолекул різних білків. Показано, що введення в еритроцити людини та щурів 5 % поллоксамерів 188, 237, 338 і 407, які мають у структурі великі гідрофільні ПЕГ блоки, як правило, супроводжувалося сильним зниженням мікров'язкості мембран клітин, іноді в 1,5 і більше разу (поллоксамер 338 і 407). ПЕГ-1500 також ефективно зв'язувався з ліпідами мембран ліпосом, мітохондрій і еритроцитів, у результаті чого мікров'язкість мембран еритроцитів знижувалася протягом 1 год. Уведення осмотично активного ПЕГ-2000 в еритроцити людини призводить до стійкої в часі дегідратації клітин. За допомогою спінових зондів отримані нові дані щодо взаємодії високомолекулярних ПЕГ-1500, ПЕГ-2000 і ПЕГ-4000 з гідрофобною порожниною (кишенню) поверхні глобули альбуміну за допомогою гідрофобних метиленових груп.

Так як інтегральний мембранний глікопротеїн ракових клітин Р-гр, вбудований у мембранний ліпідний бішар, у тому числі й за допомогою поверхневих гідрофобних ділянок макромолекули Р-гр, зроблено припущення, що механізм інгібування Р-гр гідрофільними поллоксамерами може бути пов'язаний з порушенням або з ослабленням білково-ліпідної взаємодії макромолекули Р-гр з ліпідами мембран ракових клітин під дією ПЕГ блоків. Встановлено, що механізми цитотоксичної дії поллоксамерів різної будови універсальні для багатьох клітин, не тільки ракових, і полягають в сильному зниженні мікров'язкості мембран клітин, яке призводить до зниження активності багатьох мембранних білків і ферментів. У гідрофільних поллоксамерів є додаткові механізми цитотоксичності і пригнічення МЛС ракових клітин, пов'язані з дією великих ПЕГ блоків на мембрани – додаткове розпушення мембран, ослаблення білок-ліпідної взаємодії між глікопротеїном Р-гр і ліпідами мембран ракових клітин, дегідратація мембран клітин, можлива взаємодія ПЕГ блоку з макромолекулою Р-гр з подальшою зміною активної конформації макромолекули білка.

Ключові слова: поллоксамери, поліпропіленгліколь, спінові зонди, мікров'язкість мембран

**Л. В. Иванов, Н. Т. Картель, А. Н. Ляпунов, О. А. Нардид, Я. О. Черкашина,
Л. В. Деримедведь, И. А. Кирилюк**

**Изучение механизмов цитотоксичности ряда гидрофильных поллоксамеров
методом спиновых зондов**

С помощью метода спиновых зондов получены новые данные о возможных механизмах цитотоксического действия ряда гидрофильных поллоксамеров с большими гидрофильными (ПЭГ) блоками, которое снижает множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) раковых клеток. Для этого изучили взаимодействие ряда гидрофильных поллоксамеров и отдельно высокомолекулярных ПЭГ, как гидрофильных блоков поллоксамеров, с модельными мембранами, живыми клетками и белками различной структуры, а также их влияние на конформационную подвижность липидов мембран клеток и макромолекул различных белков. Показано, что введение в эритроциты человека и крысы 5 % поллоксамеров 188, 237, 338 и 407, которые имеют в структуре большие гидрофильные ПЭГ блоки, как правило, сопровождалось сильным снижением микровязкости мембран клеток, иногда в 1,5 и больше раза (поллоксамеры 338 и 407). ПЭГ-1500 также эффективно связывался с липидами мембран липосом, митохондрий и эритроцитов, в результате чего микровязкость мембран эритроцитов снижалась на протяжении часа. Введение осмотически активного ПЭГ-2000 в эритроциты человека приводит к стойкой во времени дегидратации клеток. С помощью спиновых зондов получены новые данные о взаимодействии высокомолекулярных ПЭГ-1500, ПЭГ-2000 и ПЭГ-4000 с гидрофобной полостью (карманом) поверхности глобулы сывороточного альбумина с помощью гидрофобных метиленовых групп. Так как интегральный мембранный гликопротеин раковых клеток Р-гр встроен в мембранный липидный бислой, в том числе и с помощью поверхностных гидрофобных участков макромолекулы Р-гр, нами было сделано предположение, что механизм ингибирования Р-гр гидрофильными поллоксамерами может быть связан с нарушением или ослаблением белково-липидного взаимодействия макромолекулы Р-гр с липидами мембран раковых клеток под действием ПЭГ блоков. Механизмы цитотоксического действия поллоксамеров различной структуры универсальны для многих клеток, не только раковых, и заключаются в сильном снижении микровязкости мембран клеток, которое снижает активность многих мембранных белков и ферментов. У гидрофильных поллоксамеров есть дополнительные механизмы цитотоксичности и снижения МЛУ раковых клеток, связанных с действием больших ПЭГ блоков на мембраны – дополнительное раз-

рыхление мембран, ослабление белок-липидного взаимодействия между гликопротеином P-gp и липидами мембран раковых клеток, дегидратация мембран клеток, вероятное взаимодействие ПЭГ блоков с макромолекулой P-gp с последующим изменением активной конформации макромолекулы белка.

Ключевые слова: полоксамеры, полипропиленгликоль, спиновые зонды, микровязкость мембран

**L. V. Ivanov, M. T. Kartel, A. N. Lyapunov, O. A. Nardid, Ya. O. Cherkashina,
L. V. Derimedvid, I. A. Kirilyuk**

**Study of cytotoxic mechanisms of a number of hydrophilic poloxamers
by spin probe**

Using the method of spin probes were obtained new data on the possible mechanisms of cytotoxicity of a number of hydrophilic poloxamers with large hydrophilic (PEG) blocks, which can reduce the multidrug resistance (MDR) of cancer cells. For this study the interaction of a number of hydrophilic poloxamers and high molecular weight PEG separately, as hydrophilic blocks poloxamers, with model membranes and living cells and proteins of different structures, as well as their influence on the conformational flexibility of lipid membranes of cells and macromolecules of different proteins. It is shown that the introduction in human and rat erythrocytes 5 % poloxamer 188, 237, 338 and 407, which are in the structure of large hydrophilic PEG blocks usually accompanied by a strong decrease in microviscosity cell membranes, sometimes by 1.5 times and more (poloxamers 338 and 407). PEG-1500 effectively contacted with lipid membrane of liposomes, mitochondria, and erythrocytes, whereby the erythrocyte membrane microviscosity dropping over one hour. Introduction osmotically active PEG-2000 in human erythrocytes leads to stable time of dehydration in cells. By spin probe method were obtained new data on the interaction of high-molecular PEG-1500, PEG-2000 and PEG-4000 with the hydrophobic cavity (pocket) of serum albumin globule surface via hydrophobic methylene groups. As integral membrane glycoprotein in cancer cells P-gp, embedded in the membrane lipid bilayer, including the surface via hydrophobic regions macromolecule P-gp, we have made the assumption that the mechanism of inhibition of P-gp hydrophilic poloxamers may be associated with the violation or attenuation of protein-lipid interactions macromolecule P-gp with lipid membranes of cancer cells by PEG blocks. Mechanisms of the cytotoxic effect of different poloxamers structure are universal for many cells, not only cancer – strong decrease of microviscosity of cell membranes, which reduces the activity of many membrane proteins and enzymes. The hydrophilic poloxamers have additional mechanisms of cytotoxicity and reducing MDR cancer cells associated with the action of larger PEG blocks on the membrane – the membrane additional loosening, weakening the protein-lipid interactions between the glycoprotein P-gp and a lipid membrane of cancer cells, the dehydration of the cell membranes, the probability of interaction of PEG block with macromolecule P-gp and then change the active conformation of the protein macromolecule.

Key word: poloxamers, PEG, spin probe, microviscosity

Надійшла: 25.05.2015 р.

Контактна особа: Іванов Леонід Вікторович, провідний науковий співробітник, Інститут хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України, буд. 17, вул. Генерала Наумова, М. Київ, 03164.
Тел.: + 38 0 66 865 57 52. Електронна пошта: ivleon@ ukr.net