

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

МОСКВА - 2015

Работа выполнена в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова на химическом факультете (кафедра высокомолекулярных соединений, лаборатория Функциональных полимеров и полимерных материалов).

Научные руководители:

доктор биологических наук **Гроздова Ирина Дмитриевна**

доктор химических наук **Мелик-Нубаров Николай Сергеевич**

Официальные оппоненты:

Зубов Виталий Павлович, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова», профессор кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений

Посыпанова Галина Ароновна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", ведущий научный сотрудник лаборатории стволовых клеток Курчатовского комплекса нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных (НБИКС) наук и технологий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии наук (ИХФ РАН)

Защита состоится 17 июня 2015 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.60 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В.Ломоносова, д.1, стр.3, химический факультет, Лабораторный корпус «А», кафедра высокомолекулярных соединений, ауд. 501.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова и на сайте химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова <http://www.chem.msu.ru>.

Автореферат разослан « » апреля 2015 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.х.н.  Долгова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Многие синтетические амфифильные блок-сополимеры представляют интерес для химиков и биохимиков, так как обладают рядом биологических свойств. Одними из таких полимеров являются плюроники - трехблочные сополимеры полиэтиленоксида (ПЭО) и полипропиленоксида (ППО), различающиеся длиной гидрофильного (ПЭО) и гидрофобного (ППО) блоков. 25 лет назад было показано, что относительно гидрофобные плюроники с массовой долей ПЭО 10 - 50% снижают устойчивость раковых клеток к лекарствам (или множественную лекарственную устойчивость, МЛУ), подавляя выброс лекарства из клеток. В настоящее время такие плюроники предлагаются как компоненты противоопухолевых препаратов. Позднее было обнаружено, что некоторые наиболее гидрофильные плюроники с массовой долей ПЭО 70 - 80% защищают живые клетки от механических повреждений, увеличивая модуль упругости клеточной мембраны, и в случае таких повреждений способствуют восстановлению ее целостности. Помимо этого, при определенной (токсичной) концентрации плюроники вызывают прямо противоположный эффект - гибель клеток.

Однако, данные литературы о защитных свойствах и токсичности плюроников для клеток в культуре (цитотоксичности) носят весьма фрагментарный характер. До сих пор не проводилось систематического исследования связи между молекулярным строением, физико-химическими свойствами амфифильных блок-сополимеров и их влиянием на раковые клетки. В связи с этим данная работа представляется **актуальной**, так как посвящена изучению влияния структуры, химической природы и физико-химических свойств широкого круга амфифильных соединений блочного строения на их взаимодействие с раковыми клетками. Понимание взаимосвязи между молекулярным строением полимеров и вызываемыми ими биологическими эффектами необходимо для направленного синтеза блок-сополимеров с заданными свойствами.

Цель работы состояла в выявлении взаимосвязи между структурой, химической природой, способностью к мицеллообразованию амфифильных

блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ и особенностями их воздействия на раковые клетки. Для этого было изучено влияние полимеров на жизнеспособность раковых клеток и их устойчивость к действию лекарств.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**: (1) исследовать способность указанных выше амфифильных соединений к мицеллообразованию; (2) на одной линии раковых клеток изучить влияние рассматриваемых соединений на жизнеспособность клеток в культуре и их устойчивость к лекарствам; (3) определить локализацию тех же соединений при их взаимодействии с раковыми клетками.

Научная новизна работы. Впервые обнаружено, что макромолекулярная структура и химическая природа гидрофильного блока амфифильных блок-сополимеров определяют эффект поддержания жизнеспособности раковых клеток. Впервые проведено систематическое исследование цитотоксичности ряда амфифильных блок-сополимеров и показано, что их цитотоксические концентрации зависят от массовой доли гидрофильного блока, а само свойство – цитотоксичность – для большинства блок-сополимеров обусловлено их способностью образовывать мицеллы. Впервые определены минимальные концентрации полимеров, достаточные для подавления МЛУ, и показано, что способность амфифильных блок-сополимеров подавлять МЛУ определяется объемом гидрофобного блока и общей гидрофобностью полимера.

Практическая значимость работы. Предложена эмпирическая зависимость, описывающая корреляцию между гидрофильно-липофильным балансом незаряженного амфифильного блок-сополимера и его цитотоксичностью, которая может быть использована для прогнозирования области цитотоксических концентраций блок-сополимеров при их практическом применении. Предложена методика определения наименьших оптимальных концентраций полимеров для максимально возможного подавления МЛУ раковых клеток.

Положения, выносимые на защиту: (1) изучение связи молекулярной структуры и способности к мицеллообразованию широкого круга водорастворимых неионогенных амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ с их цитотоксичностью; (2) исследование связи молекулярного строения неионогенных амфифильных блок-сополимеров и эффекта повышения количества раковых клеток в присутствии указанных блок-сополимеров; (3) результаты систематического исследования способности водорастворимых неионогенных амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ подавлять устойчивость раковых клеток к противоопухолевому антибиотику доксорубину и связь данного эффекта с молекулярной структурой указанных соединений; (4) исследование локализации тритий-меченых амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащего ПАВ при их взаимодействии с раковыми клетками.

Личный вклад автора заключается в участии автора во всех этапах диссертационного исследования: в планировании и постановке задач; в сборе и анализе литературных данных; в непосредственном участии в научных экспериментах, в обработке, анализе и обсуждении полученных результатов; в подготовке публикаций по теме выполненного исследования и участии в тематических конференциях.

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.

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 4 печатных работах, из них 1 статья, опубликованная в научном журнале из перечня ВАК российских рецензируемых научных журналов, 1 статья, опубликованная в рецензируемом научном журнале, индексируемом по базе Web of Science, и 2 тезиса докладов на международных конференциях.

Объём и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их

обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (212 наименований). Работа изложена на 135 страницах, содержит 42 рисунка, 9 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** дано обоснование актуальности диссертационной работы, указаны ее цель и задачи.

Глава I является **обзором литературы**, где описаны структура и свойства исследованных соединений, их взаимодействие с модельными и природными клеточными липидными мембранами, влияние на жизнеспособность клеток и их устойчивость к лекарствам, а также рассмотрены предполагаемые механизмы биологического действия изученных соединений.

Глава 2 - **экспериментальная часть**, содержащая описание объектов и методов исследования. Блок-сополимеры ППО и глицерина (табл. 1) были синтезированы в группе профессора Фрая Х. (Институт органической химии, Университет Иоанна Гуттенберга, Майнц, Германия). Все остальные исследованные соединения – коммерческие препараты (табл. 1). Меченные тритием плюроники ^3H -P123, ^3H -L61 и углеводородсодержащий ПАВ ^3H -Brij-35 были получены доцентом кафедры радиохимии Химического факультета МГУ Бадунном Г.А. Эпителиоподобные клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF7/R, устойчивые к доxorубину (DOX) были предоставлены проф. Штилем А.А. (Российский онкологический научный центр РАМН им. Н.Н. Блохина, Москва).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Характеристика исследованных соединений

Работа была проведена на 14 водорастворимых амфифильных неионогенных блок-сополимерах и 2 углеводородсодержащих ПАВ с разной химической структурой гидрофильной и гидрофобной частей молекулы (табл. 1).

Таблица 1. Состав, структура, средневесовая молекулярная масса и гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) исследованных соединений.

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

* Значения ГЛБ двублочного сополимера REP и полиглицеринов рассчитаны по формуле Гриффина ГЛБ = 20 × (Мм гидрофильного блока / Мм макромолекулы) [Griffin W. C., 1954]. Для всех остальных соединений приведены значения ГЛБ по данным фирм-производителей.

Основная группа полимеров - плюроники (группа I), гидрофобный блок которых состоял из 30 – 70 звеньев пропиленоксида (ПО), а гидрофильный блок содержал от 2 до 100 звеньев этиленоксида (ЭО).

Для выяснения роли гидрофильного блока при воздействии полимера на клетки был исследован ряд сополимеров, гидрофильный блок которых – разветвленный полиглицерин (PG) разной степени полимеризации (группа II). Сополимеры PG2, P(G2)₂, PG30, PG76 содержали 2, 4, 30 и 76 остатков глицерина соответственно и одинаковый гидрофобный блок - статистический сополимер из 29 звеньев ПО и 6 звеньев ЭО.

Роль гидрофобного блока изучали на полимерах, содержащих или ППО (группы I, II), или предельный углеводород (группа III), или ПДМС (группа IV). Исследованные соединения различались также по молекулярному строению гидрофильного блока (в группах I, III, IV - линейный, а в группе II - разветвленный) и по степени блочности – двублочные (PEP, полиглицерины PG2, PG30, PG76, ПАВ, сополимер на основе ПДМС) и трехблочные (плюроники, полиглицерин P(G2)₂).

Такой набор химических структур был взят для того, чтобы выявить влияние химической природы и молекулярной структуры амфифильных соединений на их взаимодействие с клетками.

3. 2. Токсичность амфифильных блок-сополимеров для клеток в культуре

На первом этапе работы были определены диапазоны допустимых, то есть нетоксичных для клеток, концентраций исследуемых соединений и изучена связь между строением амфифильных полимеров и их токсичностью для клеток в культуре.

Количественная оценка цитотоксичности базировалась на определении: (1) концентрации полимера, которая приводит к гибели 50% клеток (IC₅₀) и (2) наибольшей нетоксичной концентрации (ННК), выше которой количество клеток начинает снижаться. На рис. 1 представлены типичные зависимости выживаемости клеток в присутствии сополимеров полиглицерина PG2, P(G2)₂, PG30 и PG76. При наличии одинакового гидрофобного блока увеличение количества остатков глицерина в

гидрофильном блоке приводило к гибели клеток при более высокой концентрации полимера (рис. 1). Следовательно, чем гидрофильнее блок-сополимер, тем он менее токсичен для раковых клеток, что выражается в увеличении его ННК.



Рисунок 1. Кривые цитотоксичности полиглициринов PG2 (O), P(G2)₂ (☆), PG30 (Δ) и PG76 (□). Клетки MCF7/R инкубировали с полимерами 1 ч в среде без сыворотки. Количество живых клеток определяли с помощью МТТ-теста после 3 суток культивирования клеток без полимера в среде с 10% эмбриональной сывороткой телят. Сплошные стрелки указывают ННК, штриховые – IC50.

Аналогичная зависимость характерна и для плюронинов (табл. 2).

При этом цитотоксичность полимеров I, II и IV групп слабо зависела от химической природы и архитектуры гидрофильных и гидрофобного блоков незаряженных полимеров, а в основном определялась их соотношением, которое выражается в числе гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) макромолекулы. ГЛБ может служить количественной оценкой степени гидрофильности блок-сополимера. В настоящей работе эта величина была рассчитана по формуле Гриффина (табл. 1).

Исследование широкого набора блок-сополимеров с разной массовой долей гидрофильного блока выявило корреляцию между ГЛБ сополимера и значением IC50. Чем выше ГЛБ блок-сополимера, то есть, чем он гидрофильнее, тем больше значение IC50 и тем большую концентрацию этого полимера выдерживают клетки (рис. 2). Полученная эмпирическая зависимость значений IC50 от ГЛБ выражается уравнением:

$$\lg IC50 = 2 \times \lg ГЛБ - 5,06.$$

Потенцирование этого уравнения приводит к выражению:

$$IC50 [мкМ] = 8,7 \times ГЛБ^2,$$

которое позволяет рассчитать значение IC50 водорастворимого неионогенного блок-сополимера, если известна его структура и вычисленное на ее основе значение ГЛБ.

Возможность предварительного расчета области цитотоксичных концентраций блок-сополимера позволяет значительно сократить экспериментальную работу по определению цитотоксичности блок-сополимеров.

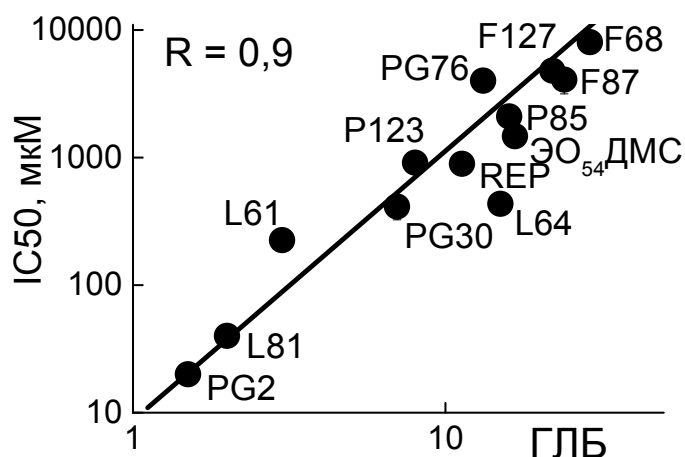


Рисунок 2. Зависимость концентраций полимеров, при которых наблюдается гибель 50% клеток (IC50), от значений ГЛБ, приведенных в табл. 1.

Предсказательная способность обнаруженной зависимости была проверена на синтезированных в нашей лаборатории блочных и привитых сополимерах ППО и декстрана различного состава. Экспериментально определенные значения IC50 этих сополимеров оказались величинами того же порядка, что и рассчитанные с помощью данной зависимости. Таким образом, обнаруженная связь между ГЛБ и цитотоксичностью справедлива не только для линейных амфифильных блок-сополимеров, но и для макромолекул, имеющих архитектуру молекулярных щеток.

3. 2. 1. Мицеллообразование амфифильных блок-сополимеров и их цитотоксичность

Сопоставление значений критических концентраций мицеллообразования (ККМ) полимеров (табл. 2), измеренных в физиологических условиях (37°C, pH 7,4, 0,15 M NaCl), со значениями их ННК показало, что для большинства исследованных соединений ННК > ККМ. То есть образование мицелл незаряженными амфифильными блок-сополимерами является необходимым условием проявления их цитотоксичности. Это свойство не зависело от молекулярной структуры

гидрофильного блока (линейный ПЭО или разветвленный полиглицерин), химической природы блоков и степени блочности сополимеров (трехблочные плюроники или двублочные сополимеры PEP, ЭО₅₄-ДМС₇, PG2 и PG30).

Исключение составили углеводородсодержащие ПАВ (Brij-35 и Triton-X-100) и трехблочный сополимер полиглицерина P(G2)₂, которые были токсичны в области концентраций до ККМ. Следовательно, цитотоксичность этих соединений обусловлена их отдельными молекулами. Чем же объяснить такие различия в цитотоксичности рассмотренных соединений?

Можно предположить, что *одновременное* присоединение к клеточной мембране *большого количества молекул* сополимера в виде мицеллы приводит к многоточечному взаимодействию полимера и липидов. Клеточная мембрана деформируется за счет образования обращенных мицелл полимера, ориентированных гидрофобными участками к липидам мембраны, а гидрофильными - в образующуюся пору, через которую могут вытекать из клетки водорастворимые белки, что и приводит к ее гибели (рис. 3). Данное предположение согласуется с результатами работы [Redhead M. et al, 2012], в которой было показано, что добавление к клеткам плюроники в токсичной концентрации, приводит к вытеканию белков из клеток в окружающую среду: гемоглобина из эритроцитов и фермента лактатдегидрогеназы из клеток линии Сасо-2.

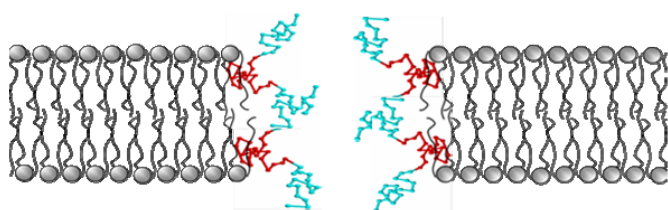


Рисунок 3. Пора в наружной липидной мембране клетки, образованная присоединением мицеллы блок-сополимера. Гидрофобный блок молекулы полимера окрашен красным цветом, а гидрофильные блоки – голубым.

В случае Brij-35 и Triton X-100 цитотоксичность уже отдельных молекул объясняется высокой термодинамической совместимостью углеводородной части молекулы с гидрофобной областью липидной мембраны. Высокое сродство полиглицерина P(G2)₂ к плазматической мембране клеток может быть следствием электростатического

взаимодействия третичных атомов азота в молекуле полимера, положительно заряженных при рН 7,4, с отрицательно заряженной наружной клеточной мембраной.

Таким образом, в настоящей работе было впервые проведено систематическое исследование цитотоксичности ряда амфифильных блок-сополимеров и показано, что их цитотоксические концентрации определяются степенью гидрофильности полимера, а само свойство – цитотоксичность – для большинства блок-сополимеров обусловлено их способностью образовывать мицеллы.

3. 3. Увеличение количества клеток под действием амфифильных блок-сополимеров

В процессе исследования цитотоксичности амфифильных блок-сополимеров было обнаружено, что в субтоксичной области концентраций (то есть меньше НК) ряд полимеров способствует увеличению конечного количества клеток по сравнению с контрольными образцами, которые не подвергались воздействию полимера. Ранее данное свойство было описано в литературе только для гидрофильных плуроников с массовой долей ПЭО = 70 – 80%. Наши исследования показали, что таким биологическим действием обладают и другие полимеры, гидрофильный блок которых представлен линейным ПЭО. Для многих из них данный эффект был обнаружен впервые, в том числе и для ряда достаточно гидрофобных плуроников, предлагаемых в качестве компонентов противоопухолевых препаратов. Это необходимо учитывать, предлагая такие полимеры для фармакологического использования.

Так, после инкубации клеток с плуроником Р85 в концентрации от 10 мкМ и до 40 мкМ к концу опыта их количество на 60 - 80% превосходило контрольную величину (рис. 4). В качестве количественной характеристики данного эффекта была выбрана минимальная концентрация полимера, при которой прирост клеток достигал максимума (КМП, см. рис. 4, табл. 2).

Сопоставление значений ККМ полимеров и их КМП (табл. 2), а также диапазона концентраций полимера, в присутствии которых количество клеток возрастает (указан в скобках в колонке "КМП" табл. 2), показало, что

сополимер на основе ПДМС и плюроники P123 и L61 с массовой долей гидрофильного ПЭО-блока 30% и 10%, соответственно, только в мицеллярной форме способствовали увеличению конечного количества клеток.

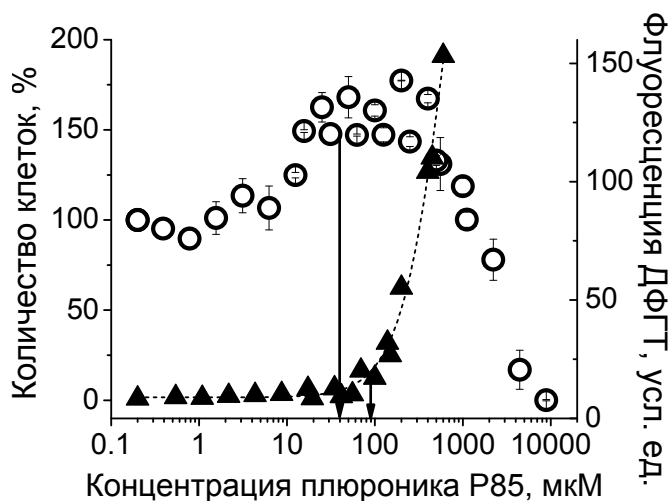


Рисунок 4. Влияние плюроника P85 на жизнеспособность клеток (○) и определение его ККМ (▲, правая ось ординат) по возрастанию интенсивности флуоресценции ДФГТ. Концентрация P85, вызывающая максимальный прирост клеток (КМП), и ККМ указаны стрелками.

Плюроники P85 (рис. 4), L64 и двублочный сополимер REP с массовой долей гидрофильного ПЭО-блока около 40 - 50% проявляли этот эффект в дезагрегированном состоянии, но при достаточно высокой концентрации юнимеров (вблизи ККМ).

А наиболее гидрофильные плюроники F68, F87 и F127, содержащие 70-80% масс. ПЭО, способствовали приросту количества клеток на всем диапазоне исследованных концентраций даже при концентрации юнимеров на порядок ниже ККМ.

Таким образом, с увеличением массовой доли ПЭО-блока в молекуле полимера снижались концентрации полимера, при которых количество клеток начинало возрастать и достигало максимума. Данную закономерность подтверждает обнаруженная обратная корреляция между количеством звеньев ЭО в молекуле блок-сополимера и его КМП (рис. 5).

Общее свойство всех соединений, в присутствии которых количество клеток возрастало, - наличие линейного гидрофильного ПЭО-блока. Сополимеры с гидрофильным блоком иной структуры и химической природы - разветвленным полиглицерином - независимо от количества остатков глицерина не способствовали приросту клеток (рис. 1). Следовательно, строение и структура именно гидрофильного блока

исследованных соединений определяет наблюдаемый эффект увеличения количества клеток. По-видимому, это обусловлено способностью блок-сополимера поддерживать жизнедеятельность клетки во время одночасовой инкубации в бессывороточной среде.

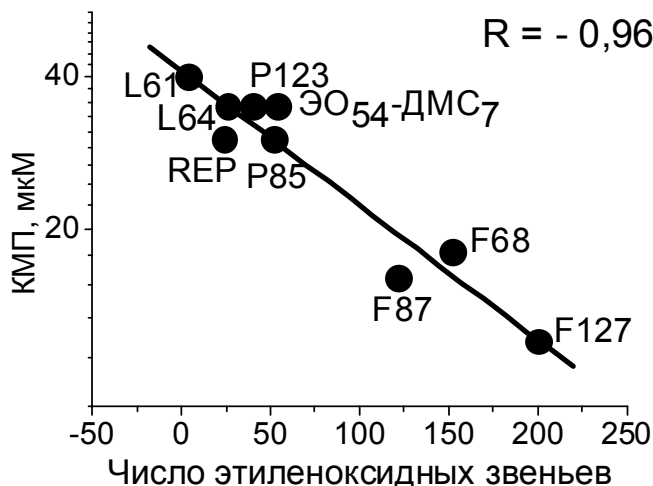


Рисунок 5. Обратная корреляция между количеством звеньев ЭО в молекуле блок-сополимера и его концентрацией, при которой наблюдается максимальное увеличение количества клеток (КМП).

Известно, что поверхность наружной клеточной мембраны покрыта гликокаликсом - сетью из олигосахаридных цепей, которые ковалентно присоединены к липидам и белкам мембраны. Возможно, поддерживающий эффект ПЭО-содержащих блок-сополимеров обусловлен образованием водородных связей между атомами кислорода этиленоксидных звеньев и гидроксильными группами олигосахаридных цепей (рис. 6, слева). Образование каждой водородной связи дает небольшой выигрыш в энергии, однако, если взаимодействие носит кооперативный характер, то это может приводить к формированию слоя из молекул сополимера на поверхности клетки (рис. 6, справа), который играет защитную роль, способствуя сохранению жизнедеятельности клетки. Чем больше звеньев ЭО в гидрофильном блоке, тем выше сродство полимера к гликокаликсу и тем ниже концентрация полимера, достаточная для их взаимодействия.

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 (табл. 1). В результате значительная доля глицериновых звеньев недоступна для углеводов клеточной поверхности. Мы полагаем, что именно по этой

причине полиглицерина не способны образовать на поверхности клеток слой, стабилизированный множеством водородных связей и, как следствие, не повышают жизнеспособность клеток.

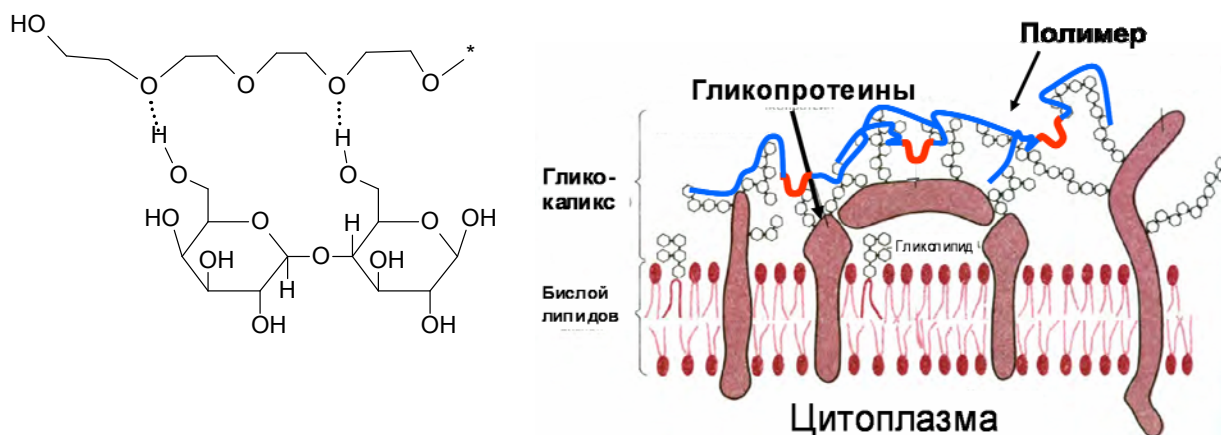


Рисунок 6. Возможный механизм защитного действия полимеров на клетки.

Таким образом, способность амфифильных блок-сополимеров увеличивать выживаемость клеток обусловлена структурой и размерами гидрофильного блока.

3. 4. Влияние амфифильных блок-сополимеров на устойчивость клеток к доксорубину

Какие параметры полимеров определяют их третий биологический эффект – подавление устойчивости клеток к лекарствам?

Изначально данное свойство исследовали с помощью общепринятой методики, а именно, клетки инкубировали в присутствии различных концентраций противоопухолевого антибиотика доксорубина (DOX) в смеси с фиксированной концентрацией полимера, как показано на примере плуроника L61 (рис. 7). При добавлении плуроника гибель клеток наблюдалась при концентрации DOX в 30 раз ниже, чем в отсутствие полимера. Таким образом, данная постановка эксперимента наглядно демонстрировала действие полимера как ингибитора МЛУ. Интересно, что разные концентрации плуроника в диапазоне от 22 до 97 мкМ подавляли МЛУ в одинаковой степени (рис. 7). Это указывало на существование некой минимальной концентрации полимера, достаточной для максимально возможного подавления МЛУ.

Для ее определения была разработана новая постановка метода, при которой варьировали концентрацию полимера, а концентрацию DOX в

смеси оставляли постоянной (5 мкг/мл). Остальные условия эксперимента были теми же. В отсутствие полимера указанная концентрация DOX не вызывала гибели клеток (рис. 7). Но при определенной концентрации полимера их количество начинало снижаться, достигало минимума и при дальнейшем увеличении концентрации полимера оставалось постоянным (рис. 8). Концентрация полимера, при которой количество клеток снижалось до минимума, и являлась искомой. Ее обозначили как ЭК^{МЛУ} и выбрали в качестве количественного критерия для оценки эффективности различных полимеров в подавлении МЛУ.

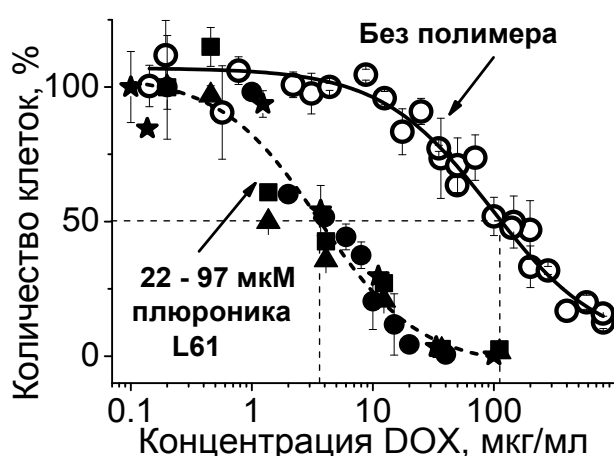


Рисунок 7. Влияние плуроника L61 на МЛУ. Клетки инкубировали 1 ч с доксорубицином в концентрациях, указанных на оси абсцисс, в присутствии 0 мкМ (○), 22 мкМ (■), 27 мкМ (●), 53 мкМ (▲) и 97 мкМ (★) плуроника L61.

Таким методом были протестированы все рассматриваемые соединения. Оказалось, что все они снижали МЛУ раковых клеток. Для многих из них данный биологический эффект был обнаружен впервые. Для всех соединений были определены значения ЭК^{МЛУ} (табл. 2, колонка «ЭК^{МЛУ}», в скобках указан весь диапазон концентраций полимера, в котором снижалось количество клеток).

Сопоставление значений ЭК^{МЛУ} и ККМ каждого полимера показало, что подавляющее большинство блок-сополимеров подавляли МЛУ в дезагрегированном состоянии (табл. 2). Исключение - наиболее гидрофильные плуроники F127, F87 и F68 с массовой долей ПЭО-блока 70-80%, которые действовали только в виде мицелл.

При оценке эффективности действия фармакологических препаратов большое значение имеет терапевтический индекс, который показывает, на сколько различаются предельно допустимая концентрация соединения (ННК) и концентрация, вызывающая нужный терапевтический эффект (в

нашем случае $ЭК^{МЛУ}$). Если эти значения близки, то велик риск передозировки препарата. Для оценки исследованных нами полимеров с этой точки зрения было рассчитано соотношение $ННК / ЭК^{МЛУ}$. У большинства полимеров оно варьирует от 1 до 3. У плюроника L61, который предложен как компонент лекарственной формы SP1049C для лечения рака [Alakhov V.Y. et al, 1999], это соотношение равно 10.

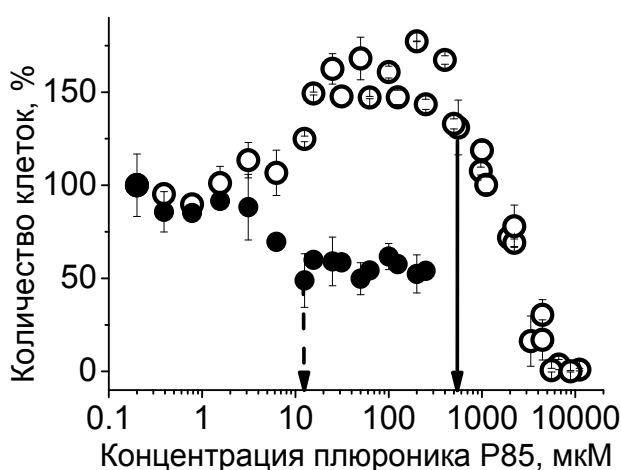


Рисунок 8. Влияние плюроника Р85 на МЛУ. Клетки инкубировали 1ч в смеси 5 мкг/мл DOX и Р85 в концентрации, указанной на оси абсцисс. Остальные условия эксперимента указаны в подписи к рис. 1. Штриховая стрелка указывает $ЭК^{МЛУ}$, сплошная стрелка – $ННК$.

Оказалось, что среди всех исследованных соединений самое высокое соотношение $ННК / ЭК^{МЛУ}$ у плюроника Р123 ($ННК / ЭК^{МЛУ} = 375$). Таким образом, нами был выявлен более перспективный для практического использования плюроник.

Чем же обусловлена способность полимеров подавлять устойчивость раковых клеток к лекарствам? Ранее в нашей лаборатории в экспериментах на липосомах было показано, что те же полимеры нарушают упорядоченную структуру липидного бислоя [Demina T. V. et al, 2005].

Авторы установили, что способность полимера разупорядочивать структуру липидной мембраны, β , пропорциональна объему гидрофобного блока V и общей гидрофобности полимера K_p :

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

K_p – коэффициент распределения полимера в системе вода-гексан.

В настоящей работе при сопоставлении значений $ЭК^{МЛУ}$ и β для ряда блок-сополимеров была найдена следующая зависимость: чем выше способность полимера возмущать липидный бислой (β), тем меньше концентрация полимера необходимая для подавления устойчивости раковых клеток ($ЭК^{МЛУ}$) (рис. 9).

Таблица 2. Результаты анализа мицеллообразования полимеров, их влияния на жизнеспособность клеток и устойчивость к доксорубину (расшифровка сокращений и пояснения к таблице даны в тексте).

Полимер	ККМ, мкМ	ННК, мкМ	IC50, мкМ	КМП, мкМ	ЭК ^{МЛУ} , мкМ
I. Плуроники					
L61	11 ± 1	100 ± 20	230 ± 40	60 (15 - 30)	10 (2 - 10)
L64	100 ± 25	200 ± 50	430 ± 20	35 (12 - 35)	100 (4 - 100)
F68	800 ± 200	4500 ± 500	8000 ± 1200	< 80	2400 (300 - 2400)
L81	3 ± 1	15 ± 5	40 ± 3	нет	4 (1 - 4)
P85	90 ± 30	550 ± 150	2100 ± 300	40 (10 - 40)	13 (3 - 13)
F87	40 ± 10	1200 ± 200	4080 ± 920	< 16	1000 (250 - 1000)
P123	0,5 ± 0,1	450 ± 100	910 ± 150	70 (12 - 60)	1,2 (0,08 - 1,2)
F127	610 ± 140	3500 ± 500	4800 ± 650	12 (0,3 - 12)	1600 (40 - 1600)
REP	20 ± 5	450 ± 100	900 ± 40	30 (5 - 30)	20 (3 - 20)
II Полиглицерины					
PG2	8 ± 1	9 ± 1	20 ± 0,4	нет	3 (0,6 - 3)
PG30	45 ± 15	170 ± 30	340 ± 10	нет	70 (20 - 70)
PG76	1000*	2800 ± 300	4000 ± 100	нет	2400 (200 - 2400)
P(G2) ₂	40 ± 10	14 ± 2	24 ± 2	нет	11 (2 - 11)
III. Углеводородсодержащие ПАВ					
Brij-35	40 ± 10	25 ± 1	30 ± 0,8	нет	16 (3 - 16)
Triton X-100	240 ± 40	50 ± 8	60 ± 3	нет	-
IV. ЭО₅₄-ДМС₇					
ЭО ₅₄ -ДМС ₇	15 ± 5	600 ± 150	1500 ± 200	50 (15 ÷ 50)	12 (2 - 12)

* по данным [Hofmann, A. M. et al, 2010].

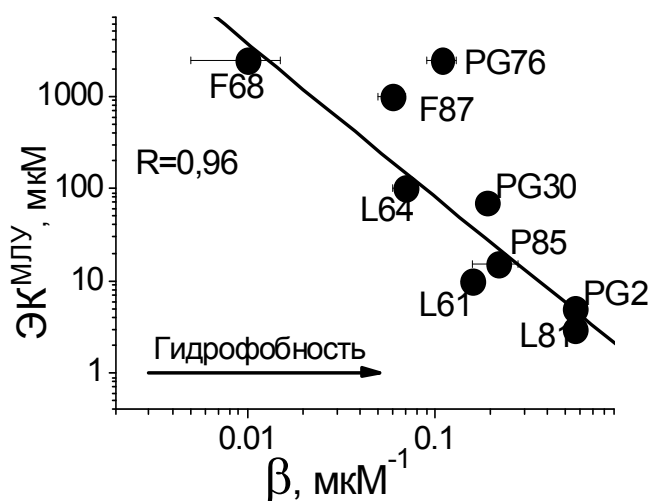


Рисунок 9. Корреляция между наименьшей концентрацией полимера, достаточной для максимального возможного подавления МЛУ ($\text{ЭК}^{\text{МЛУ}}$) и способностью полимеров разупорядочивать липидный бислой (β).

Поскольку параметр β пропорционален объему гидрофобного блока и общей гидрофобности полимера, то можно заключить, что основную роль в подавлении устойчивости клеток к лекарствам играет гидрофобный блок амфифильных сополимеров.

Чем же объясняется подавление МЛУ под действием амфифильных блок-сополимеров? Известно, что МЛУ клеток MCF7/R обусловлена в основном наличием в их наружной мембране белка Р-гликопротеина, выбрасывающего из клеток лекарства. Активность этого белка сильно зависит от его липидного микроокружения. Можно предположить, что при взаимодействии амфифильного блок-сополимера с наружной липидной мембраной раковой клетки происходит внедрение гидрофобного блока полимера в область остатков жирных кислот липидов, что вызывает изменение липидного микроокружения Р-гликопротеина и, как следствие, ингибирование его способности удалять лекарства из клетки (рис. 10).

Таким образом, систематическое исследование амфифильных блок-сополимеров разнообразного состава и структуры позволило найти связь между молекулярным строением полимера и его воздействием на раковые клетки.

Способность плюроники 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.

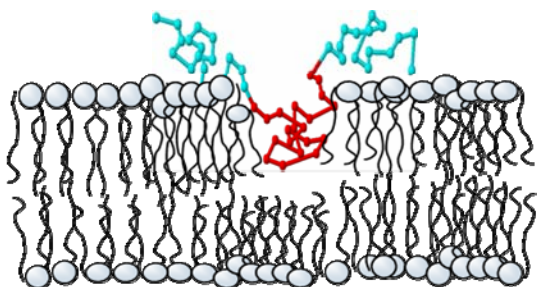


Рисунок 10. Нарушение структуры липидного бислоя при внедрении гидрофобного блока молекулы полимера в липидную мембрану. Гидрофобный блок окрашен красным цветом, гидрофильные блоки – голубым.

Исследования, проведенные на широком круге соединений, показали, что один и тот же амфифильный блок-сополимер может вызывать три разных концентрационно-зависимых эффекта (рис. 11).

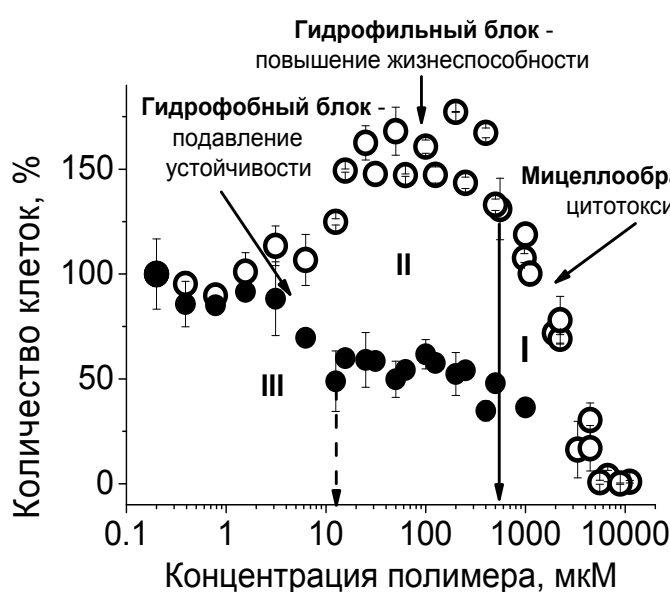


Рисунок 11. Способы воздействия полимеров на раковые клетки в отсутствие (○) или в присутствии 5 мкг/мл DOX (●). Штриховая стрелка указывает значение ЭК^{МЛУ}, сплошная стрелка – НКК.

Первая концентрационная область (I) – цитотоксичность полимера – обусловлена действием мицелл полимеров. Вторая (II) – увеличение количества клеток после их взаимодействия с полимером – строением и размерами гидрофильного блока. А в области низких концентраций (III, ниже ККМ) данные полимеры подавляют МЛУ раковых клеток, и это определяется взаимодействием гидрофобного блока с липидами клеточной мембраны.

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

3. 5. Исследование локализации полимеров при их взаимодействии с раковыми клетками

При изучении биологических эффектов полимеров мы интерпретировали полученные результаты, предполагая, что полимеры взаимодействуют с наружной клеточной мембраной. Для проверки правомочности такой интерпретации была исследована локализация на клетках плюронинов L61, P123 и ПАВ Brij-35. Эти соединения метили тритием (^3H), инкубировали с клетками и затем исследовали методом радиоавтографии, проникают ли они внутрь клеток или остаются на ее поверхности. Удельная радиоактивность меченых соединений составила 13,9, 48,3 и 6,5 Ки/ммоль для ^3H -L61, ^3H -P123 и ^3H -Brij-35, соответственно, что означает присоединение в среднем от 0,5 до 1,7 атома трития на макромолекулу.

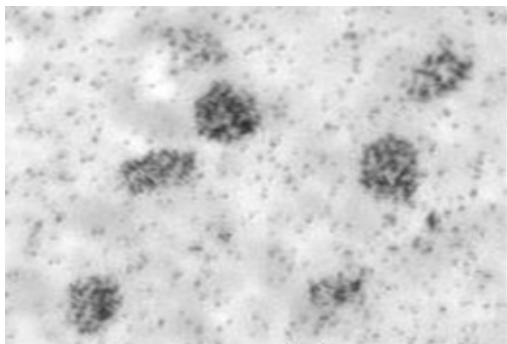
Для сравнения была исследована локализация тимидина, который, как известно, включается в ДНК и, следовательно, может локализоваться только внутри клеток - в ядре. После инкубации с ^3H -тимидином клетки фиксировали двумя способами: смесью этанола и уксусной кислоты (3:1) или 4% формальдегидом в PBS. После фиксации смесью этанола и уксусной кислоты на снимке видны четкие следы образовавшихся гранул серебра в области ядер (рис. 12 А).

Однако при фиксации клеток формальдегидом образования гранул серебра не наблюдается (рис. 12 Б). Этот результат показал, что излучение трития не достигает фотоэмульсии, если тритий находится внутри клеток и использован способ фиксации, сохраняющий целостность липидных мембран – формальдегид. Однако при таком же способе фиксации, но после инкубации с плюронином ^3H -L61 на клетках отчетливо видны гранулы серебра, образующие четкий черный контур (рис. 12 В).

Аналогичные результаты были получены после инкубации клеток с плюронином ^3H -P123 и ^3H -Brij-35. Появление гранул серебра в опытах с ^3H -полимерами после фиксации формальдегидом указывает на локализацию полимеров в области наружной клеточной мембраны.

Фиксация смесью этанола и уксусной
кислоты (3:1)

А



Фиксация
4% формальдегидом в PBS

Б

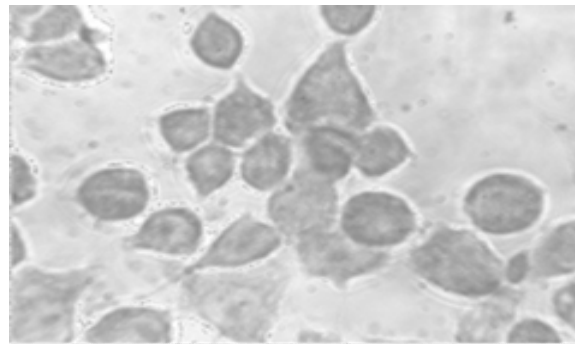
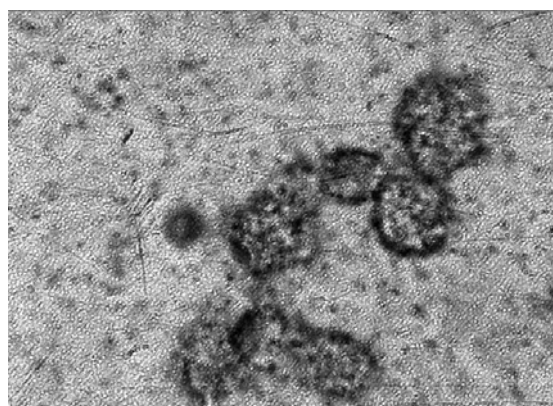


Рисунок 12. Микрофотографии клеток MCF7/R после инкубации с ^3H -тимидином (А, Б) и $9\ \mu\text{M}$ ^3H -L61 (В) в течение 1 ч при 37°C . Клетки фиксированы этанол-уксусной смесью (А) или формальдегидом (Б и В) в течение 10-15 мин. После удаления фиксатора клетки высушивали, покрывали ядерной мелкозернистой фотоэмульсией при слабом красном свете, экспонировали в течение 5 дней и проявляли.

В



Сопоставление данных по влиянию полимеров на жизнеспособность и МЛУ раковых клеток с результатами радиоавтографии свидетельствует о том, что взаимодействия амфифильного блок-сополимера с наружной клеточной мембраной достаточно для проявления трех исследованных биологических эффектов.

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 доксорубицину 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.

**Основные результаты диссертации изложены в
следующих работах:**

Статьи из перечня ВАК российских рецензируемых научных журналов и индексируемых Web of Science:

1. Будкина О.А., Демина Т.В., Дородных Т.Ю., Мелик-Нубаров Н.С., Гроздова И.Д. Цитотоксичность незаряженных амфифильных полимеров // Высокомолекулярные соединения. Сер. А. – 2012. – Т. 54. – № 9. – с.: 1385–1395.

(Английский вариант статьи: Polymer Science. Ser. A. – 2012. – V. 54. – № 9. – pp.: 707–717. DOI: 10.1134/S0965545X12080020).

2. Demina T.V., Budkina O.A., Badun G.A., Melik-Nubarov N.S., Frey H., Muller S.S., Nieberle J., Grozdova I.D. Cytotoxicity and Chemosensitizing Activity of Amphiphilic Poly(glycerol)–Poly(alkylene oxide) Block Copolymers // Biomacromolecules. – 2014. – V. 15. – pp.: 2672–2681.

DOI: 10.1021/bm500521j.

Материалы конференций:

1. Будкина О.А. Влияние амфифильных полиалкиленоксидов на жизнеспособность раковых клеток // Материалы Международного молодёжного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2011» [Электронный ресурс]. – М.: МАКС Пресс. – 2011. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

2. Budkina O.A., Demina T.V., Zhivkova I.R., Dorodnyh T.J., Melik-Nubarov N.S., Grozdova I. D. Relationship between the structure of amphiphilic copolymers and their influence on cell viability and multi-drug resistance // 76th Prague meeting on macromolecules «Polymers in medicine». – Book of abstracts. – Prague, Czech republic. – 2012. – p. 95.