

УДК 541.64:539.199

## ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ ЭТИЛЕНОКСИДА И ПРОПИЛЕНОКСИДА НА ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ<sup>1</sup>

© 2006 г. А. Е. Жирнов, Д. Н. Павлов, Т. В. Демина, Г. А. Бадун,  
И. Д. Гроздова, Н. С. Мелик-Нубаров

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.

Химический факультет

119992 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 11.05.2006 г.

Принята в печать 05.06.2006 г.

Методом равновесного диализа определены коэффициенты распределения блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида между липидной фазой и водой. Для трехблочного сополимера (плюроника L61) он составил  $45 \pm 9$ , для двублочного (REP) –  $78 \pm 17$ . В соответствии с этим изменяется и влияние сополимеров на транспорт заряженного органического иона карбоксифлуоресцина через лецитиновую бислойную мембрану. В то же время при меньшей величине связывания трехблочный сополимер оказывает большее влияние на скорость трансбислойной миграции липидов и транспорта незаряженного вещества (доксорубицина). Введение в мембрану холестерина уменьшает ее чувствительность к действию сополимеров, однако сохраняется характер изменений, вызываемых обоими сополимерами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что трехблочное строение амфи菲尔ных макромолекул обуславливает их более высокую способность возмущать липидные бислойные мембранны.

### ВВЕДЕНИЕ

Блок-сополимеры этиленоксида (**ЭО**) и пропиленоксида (**ПО**) представляют собой семейство амфи菲尔ных полимеров, в которых гидрофобный блок представлен **ППО**, а гидрофильный – **ПЭО** [1]. Трехблочные сополимеры строения **ПЭО–ППО–ПЭО** (плюроники, полоксамеры, синпероники) нашли применение в медицине и фармакологии в качестве иммуноадьювантов, компонентов искусственной крови и криопротекторов, антикоагулянтов и модуляторов активности нейтрофилов [2]. Они увеличивают проницаемость гематоэнцефалического барьера [3], способствуют восстановлению целостности поврежденных клеточных мембран [4]. Обнаружено, что плюроники стимулируют накопление антрациклических антибиотиков, включая даунамицин и доксорубицин, в раковых клетках и снижают лекарственную устойчивость, возникающую

при терапии опухолей [5]. Все эти эффекты свидетельствуют о способности амфи菲尔ных блок-сополимеров взаимодействовать с биологическими мембранами.

Связывание плюроников с модельными липидными мембранами (липосомами) увеличивает скорость трансбислойной миграции липидов и проницаемость липидного бислоя по отношению к доксорубицину [6]. Сравнение блок-сополимеров, содержащих в качестве гидрофильной цепи **ПЭО** или разветвленный полиглицерин, а в качестве гидрофобной – **ППО** или остаток жирной кислоты, показало, что эффективность действия сополимера на липидную мембрану зависит от валовой гидрофобности макромолекулы и от вандер-ваальса объема гидрофобной части. Весьма эффективным оказался двублочный полимер с небольшим фрагментом разветвленного полиглицерина и объемным гидрофобным блоком статистического сополимера **ЭО** и **ПО**.

Результаты ДСК и малоуглового рентгеновского рассеяния показали, что двублочные сополимеры легче встраиваются в бислой, довольно

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 06-03-32403).

E-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru (Мелик-Нубаров Николай Сергеевич).

глубоко проникая внутрь гидрофобной сердцевины мембранны [7], в то время как проникновение гидрофобного блока плюроников носит более поверхностный характер и не приводит к заметным изменениям в структуре липидного бислоя [8]. Влияние архитектуры сополимеров на их способность изменять барьерные свойства мембран ранее не исследовалось.

В нашей работе мы сравнили способность двублочного и трехблочного сополимеров ЭО и ПО встраиваться в мембрану и изменять ее свойства.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трехблочный сополимер ЭО и ПО плюроник L61 ("Serva", Германия), который изучался ранее [9], и двублочный REP (Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей, Москва). Молекулярно-массовые характеристики образцов полимеров определяли методом ГПХ в ТГФ при 35°C на жидкостном хроматографе "Waters" с рефрактометрическим детектором и колонками, заполненными ультрастирагелем с размером пор  $10^3$  и  $10^5$  Å, а также линейной колонкой. В качестве стандартов использовали узкодисперсные ПЭГ фирмы "Waters" с  $M = 270\text{--}6000$  Да. Хроматограммы обрабатывали на интеграторе "Data Module-730".

Массовую долю звеньев этиленоксида вычисляли по данным ИК-спектроскопии, сравнивая полосы поглощения при  $1372\text{ см}^{-1}$  (симметричные деформационные колебания группы  $\text{CH}_3$ -пропиленоксида) и  $1464\text{ см}^{-1}$  (деформационные колебания группы  $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--O}$  в противофазе) [10] для экспериментального образца и контрольных смесей ПЭО и ППО в заданном соотношении. Образцами служили пленки, полученные упариванием раствора полимеров в хлороформе, нанесенного на кристалл КВг.

ККМ полимеров определяли по возгоранию в их мицеллах флуоресценции 1,6-дифенилгекса-триена-1,3,5 при 37°C ( $\lambda_{\text{возб}} = 366\text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{исп}} = 433\text{ нм}$ ) [11]. Его 1 mM раствор в ТГФ разбавляли водой до концентрации  $2 \times 10^{-5}$  моль/л и титровали растворами полимеров в ячейке флуориметра 650-10 S "Hitachi". ККМ находили по изложму зависимости

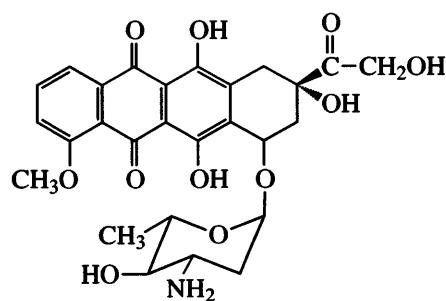
интенсивности флуоресценции от концентрации полимера.

С целью введения радиоактивной метки полимеры обрабатывали атомами трития [12]. Для этого 0.6 мг препарата, лиофильно высущенного в тонком слое на стенках реакционного сосуда (площадь мишени около  $150\text{ см}^2$ ), бомбардировали горячими атомами трития ( $E = 0.16\text{ эВ}$ , 1900 K) в течение 10 с. Процедуру повторяли четырежды, каждый раз растворяя мишень в воде и лиофилизуя ее заново. Полимер отделяли от легко обменяемого трития рядом последовательных циклов растворения в этаноле и упаривания в вакуме, после чего очищали от продуктов радиолиза с помощью ГПХ на колонке сефадекса LH-20, уравновешенной этанолом. Удельная активность полученного препарата составляла 0.8 ТБк/ммоль, что соответствует в среднем одному атому трития на макромолекулу.

Малые моноламеллярные липосомы получали как описано ранее [13]. Гидродинамический диаметр липосом, определенный методом квазиупругого светорассеяния (Autosizer 2C, "Malvern", Англия), составлял 40–70 нм.

Связывание блок-сополимеров с липосомами изучали методом равновесного диализа по методике [9].

Влияние блок-сополимеров на транспорт доксорубицина



через мембранны исследовали на pH-градиентных липосомах [14, 15].

Скорость трансбислойной миграции (флип-флоп) липидов в липосомах измеряли согласно ранее описанной методике [9, 16].

Влияние блок-сополимеров на проникновение карбоксифлуоресцина (КФ) через липидную мембрану проводили на липосомах, предварительно заполненных КФ в концентрации, соот-

**Таблица 1.** Молекулярно-массовые характеристики и состав исследованных сополимеров

Сополимер	$M_n$	$M_w$	$M_w/M_n$	Массовая доля этиленоксида
L61	1655	1890	1.14	10%
REP	2094	2189	1.05	48%

**Таблица 2.** Сравнение свойств двублочного сополимера REP и трехблочного L61

Сополимер	ККМ, мкмоль/л	Коэффициент распределения между водным раствором и мембраной	Удельная эффективность связывания с лимфоцитами человека, мл/млн. клеток	Способность ускорять транспорт доксорубицина, л/ммоль	Способность ускорять флипп-флоп, л/ммоль	Способность вызывать образование пор в липидной мембране, л/с ммоль
REP	37	78 ± 17	(85 ± 4) × 10 <sup>-5</sup>	5.0 ± 0.2	16 ± 5	0.19
L61	110	45 ± 9	(40 ± 3) × 10 <sup>-5</sup>	55 ± 2	290 ± 50	0.13

ветствующей концентрационному тушению флуоресценции [17].

Лимфоциты выделяли из венозной крови человека как описано ранее [18] и суспендировали в среде для культивирования клеток (RPMI 1640) с добавкой 10 мМ 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновой кислоты (HEPES).

Для анализа связывания <sup>3</sup>Н-полимер (5–50 мкмоль/л) инкубировали с лимфоцитами (4 млн. клеток/мл) в среде RPMI 1640 в течение 2 ч при 37°C. Клетки отмывали от несвязавшегося полимера холодным фосфатно-солевым буфером (150 мкмоль/л NaCl, 10 мкмоль/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 4°C) с помощью центрифугирования (2 мин, 400 g, 5 раз). Осадок клеток растворяли в 1 M NaOH (18 ч, 20°C), из проб отбирали аликвоты, нейтрализовали их равным объемом 1 M HCl и использовали для анализа радиоактивности. В оставшихся образцах определяли белок по методу Лоури для уточнения количества клеток в каждой пробе. Количество полимера, приведенное на количество клеток и концентрацию добавленного полимера, служило мерой связывания полимера с клетками.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Характеристика полимеров*

Для исследования влияния блочного строения молекул сополимеров ПО и ЭО на их взаимодействие с липидными мембранами мы выбрали два полимера – двублочный REP и трехблочный плюроник L61. Методом ГПХ были определены их

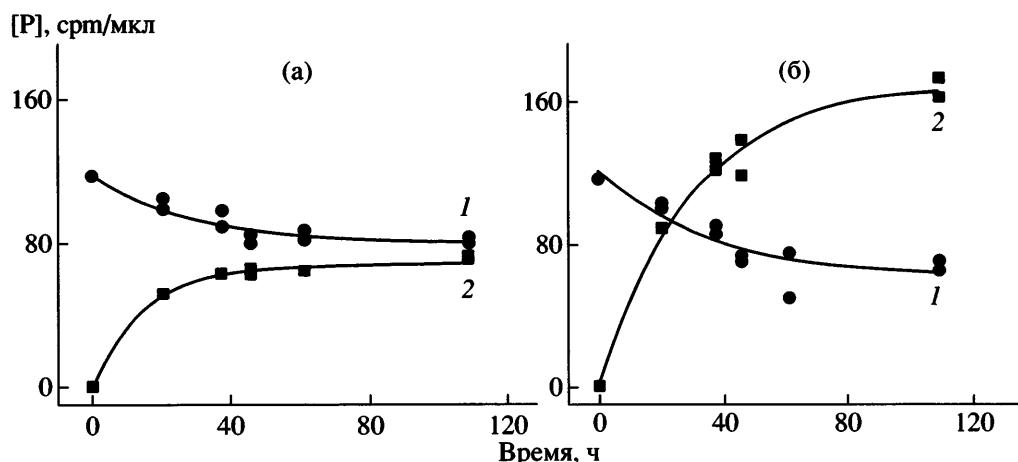
молекулярно-массовые характеристики и коэффициент полидисперсности  $M_w/M_n$ , принимающие близкие значения для обоих сополимеров (табл. 1). В то же время соотношение ПО и ЭО в сополимерах, по данным ИК-спектроскопии, сильно различалось, причем строение REP описывалось формулой  $\text{EO}_{24}\text{PO}_{19}$ , а плюроника L61 –  $\text{EO}_2\text{PO}_{30}\text{EO}_2$ . Таким образом, гидрофобный блок REP содержал на треть меньше звеньев ПО, чем трехблочный сополимер L61, тогда как гидрофильный блок REP был длиннее в 6 раз.

Несмотря на то, что гидрофобность сравниваемых сополимеров отличается достаточно сильно, их способность к мицеллобразованию, оцениваемая по величине ККМ, практически одинакова (табл. 2). Известно, что в ряду ПАВ аналогичного строения ККМ является однозначной функцией состава молекулы [19–21]. Мы использовали данные [11] для построения двухпараметрической корреляции между  $\lg \text{KKM}$  трехблочных плюроников и степенью полимеризации гидрофобного ( $m$ ) и гидрофильного ( $n$ ) блоков:

$$\lg \text{KKM} = -1.32 - 0.066m + 0.0006n$$

$$R = 0.96, \quad F = 112, \quad N = 22$$

В соответствии с этим уравнением трехблочный полимер того же состава, что и REP, должен был иметь ККМ, равную 2800 мкмоль/л. Однако в действительности ККМ сополимера REP составила 37 мкмоль/л, т. е. была меньше в 75 раз (табл. 2). Это сопоставление показывает, что переход от трехблочных сополимеров к двублоч-



**Рис. 1.** Связывание REP с липидными везикулами из яичного лецитина при равновесном диализе: Изменение концентрации полимера REP во внешнем растворе (1) и внутри диализного мешка (2) в отсутствие (а) и в присутствии липосом (б). Начальная концентрация полимера во внешнем растворе 10 мкмоль/л, концентрация липосом внутри диализного мешка 50 мг/мл. Буферный раствор: 10 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 ммоль/л  $\text{NaCl}$ , температура 37°C, pH 7.4. На оси ординат – концентрация полимера в единицах его радиоактивности.

ным сопровождается увеличением их склонности к мицеллообразованию, что согласуется с данными Altinok и соавторов [22].

#### Связывание полимеров с липосомами

Связывание полимера с липосомами оценивали по коэффициенту распределения полимера между водной фазой и липидным бислоем, который определяется как соотношение концентра-

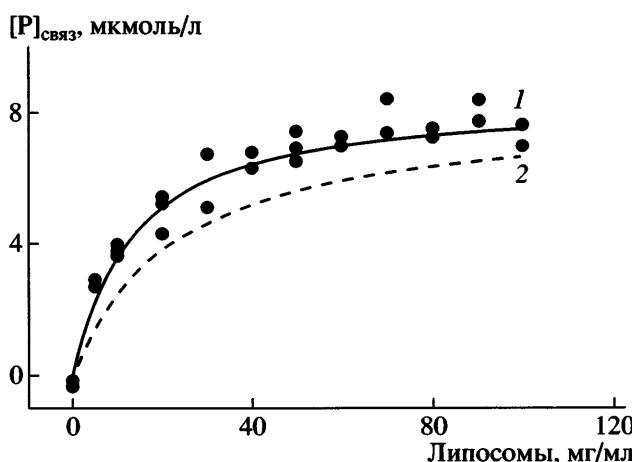
ций полимера в мембранный  $[P]_m$  и водной  $[P]_w$  фазах:

$$K_p = \frac{[P]_m}{[P]_w}$$

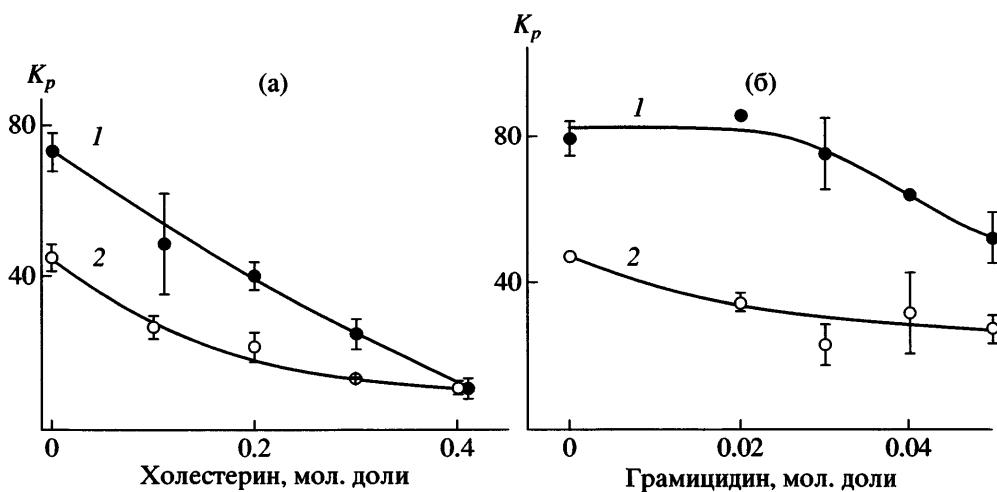
Поскольку оба исследуемых полимера способны проникать сквозь поры диализной мембранны, для измерения коэффициентов распределения мы использовали метод равновесного диализа [9].

Если внутрь диализного мешка поместить буферный раствор и диализовать его против раствора полимера, меченного тритием, то в течение 40–60 ч концентрация полимера по обе стороны диализной мембранны выравнивается (рис. 1а). Если же туда поместить суспензию липосом, то наблюдается избыточное накопление полимера внутри мешка вследствие его связывания с липосомами (рис. 1б). Содержание связанного с липосомами полимера  $[P]_{\text{связ}}$  рассчитывали как разность его концентраций во внутреннем резервуаре и внешнем растворе.

Зависимость количества полимера в липидной фазе от концентрации липосом приведена на рис. 2. На основании полученных данных мы рассчитали коэффициенты распределения полимеров между водой и липидной мембраной с помощью нелинейной регрессии согласно уравнению



**Рис. 2.** Изотермы связывания полимера REP (1) и плюроника L61 (2, [9]) с липосомами. Начальная концентрация полимера во внешнем растворе 10 мкмоль/л, буферный раствор: 10 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 ммоль/л  $\text{NaCl}$ , температура 37°C, pH 7.4.



**Рис. 3.** Изменение коэффициентов распределения REP (1) и плюроника L61 (2) между водой и липидным бислой при введении в мембрану холестерина (а) и грамицидина (б).

$$[P]_{\text{связ}} = \frac{[P]_o c_n}{c_n + \frac{\rho_n}{K_p}},$$

где  $[P]_o$  – общая концентрация полимера в растворе,  $c_n$  и  $\rho_n$  – массовая концентрация липида (мг/мл) и его плотность в бислое (1.014 г/см<sup>3</sup>). Определенные таким образом коэффициенты распределения составляют для L61 –  $45 \pm 9$  [9], а для REP –  $78 \pm 17$ . Это означает, что при содержании липосом 1 мг/мл с одной липосомой гидродинамического диаметра 70 нм может связываться в среднем 47 молекул REP или 28 молекул плюроника L61. Таким образом, REP, несмотря на низкую валовую гидрофобность по сравнению с L61, обладает большим средством к липидному бислою. Это обусловлено тем, что в отличие от трехблочного L61, в котором оба конца макромолекулы имеют гидрофильные звенья ЭО, REP содержит гидрофильный блок лишь с одной стороны макромолекулы. Такое строение макромолекулы, по всей видимости, способствует ее взаимодействию с липидным бислом.

Известно, что клеточные мембранны содержат значительное количество стеролов (холестерина и его эфиров) и белков, причем состав липидной мембранны оказывает существенное влияние на ее взаимодействие с амфилилами [23]. Оказалось, что по мере увеличения содержания холестерина связывание полимеров с липосомами уменьшается (рис. 3а). Введение холестерина сопровождается увеличением микровязкости мембран [24], т.е.

уменьшением подвижности липидных молекул в бислом. По-видимому, это затрудняет встраивание полимера. Интересно, что увеличение жесткости мембран сильнее сказывается на внедрении в нее REP. Так, при введении 40% холестерина связывание REP понижается почти в 7 раз, тогда как у плюроника L61 – только в 4.5 раза (рис. 3а). Возможно, REP встраивается в бислой на большую глубину, и поэтому его связывание в основном зависит от плотности упаковки бислоя.

Введение в мембрану гидрофобного пептида грамицидина уменьшает связывание полимеров (рис. 3б). Так же, как и в случае с холестерином, увеличение содержания грамицидина сильнее отражалось на связывании REP по сравнению с L61. Следовательно, присутствие в мембране белков также уменьшает подвижность мембранных компонентов и препятствует встраиванию объемных амфильтальных макромолекул в бислой.

#### Связывание полимеров с клетками

При инкубации <sup>3</sup>Н-полимеров с лимфоцитами человека наблюдается пропорциональное возрастание количества связанного с клетками полимера по мере увеличения его содержания в растворе (рис. 4). Соотношение добавленного и связанного полимера и отсутствие плато указывает на низкую константу связывания полимеров с клетками и большое число связывающих центров на клеточной мембране. Доля связанного полимера, нормированная на концентрацию клеток



**Рис. 4.** Изотерма связывания REP (1) и L61 (2) с лимфоцитами человека в течение 2 ч при 37°C в бессывороточной среде.

[12], для плюроника L61 составляет  $(40 \pm 3) \times 10^{-5}$  мл/млн. клеток, а для REP она в 2 раза выше –  $(85 \pm 4) \times 10^{-5}$  мл/млн. клеток. Таким образом, как в случае модельных липидных мембран, так и при взаимодействии полимеров с природными мембранами двублочный сополимер REP имеет большее сродство к ним, чем трехблочный плюроник L61.

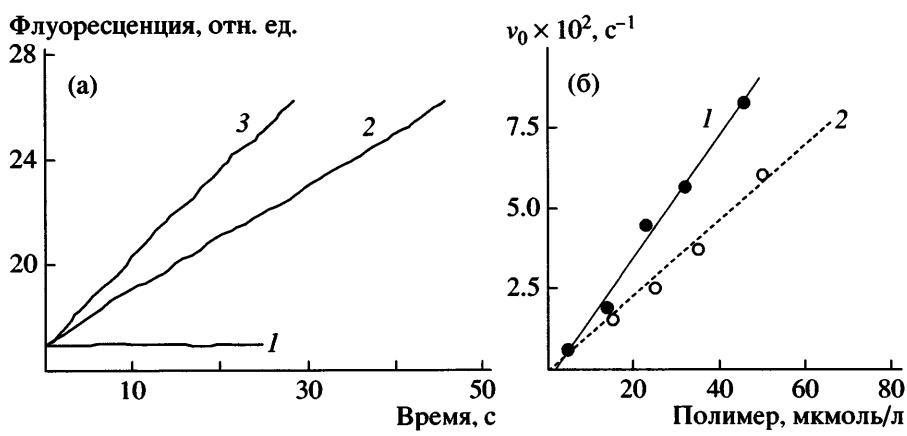
#### Влияние полимера на свойства липидного бислоя везикул

Взаимодействие полимера с биологическими и модельными липидными мембранами приводит к

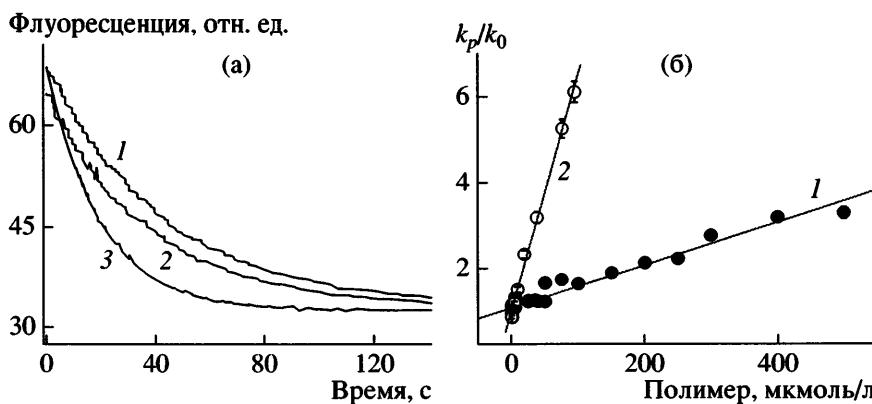
изменению их барьерных и динамических свойств [6, 9, 12, 15]. Мы сравнили влияние REP и плюроника L61 на вытекание гидрофильного красителя карбоксифлуоресцеина из липосом, на транспорт противоопухолевого антибиотика доксорубицина в pH-градиентные липосомы и на трансбислойную миграцию липидов.

**Влияние сopolимеров на вытекание карбоксифлуоресцеина из липосом.** Эксперименты проводили на липосомах, заполненных КФ с концентрацией 0.1 моль/л, при которой происходит самоутонение флуоресценции. Проникновение заряженных соединений через липидную мембрану маловероятно [25], поэтому КФ, содержащий две кислотные группы, отрицательно заряженные при pH 7, не способен проходить сквозь липидную мембрану по механизму распределение–диффузия. Только в случае образования пор краситель может выходить во внешнюю среду, где оказывается с концентрацией ниже предела самоутонения. Таким образом, увеличение интенсивности флуоресценции в системе может служить тестом на образование пор в мембране липосом [17].

Скорость спонтанного вытекания КФ из липосом ничтожно мала (рис. 5а, кривая 1), что свидетельствует о целостности липосом в отсутствие полимера. После добавления 20 мкмоль/л REP (кривая 2) или плюроника L61 (кривая 3) она резко увеличивается, т.е. оба полимера способствуют образованию гидрофильных пор в липидной



**Рис. 5.** Изменение во времени флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 490$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 520$  нм) липосом, заполненных 0.1 М раствором карбоксифлуоресцеина, в отсутствие добавок (1), в присутствии 20 мкмоль/л плюроника L61 (2) и двублочного сополимера REP (3) (а) и зависимость начальной скорости вытекания карбоксифлуоресцеина от концентрации сополимера, REP (1) и плюроника L61 (2) (б). Температура 30°C, 0.1 моль/л NaCl, 7.5 мкмоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.2.



**Рис. 6.** Кинетика транспорта доксорубицина в pH-градиентные липосомы из яичного лецитина в отсутствие полимеров (1) и в присутствии 0.005% REP (2) и 0.005% плюроника L61 (3) (а) и увеличение скорости транспорта доксорубицина при добавлении REP (1) и плюроника L61 (2) (б). Липосомы заполнены 0.3 М цитратным буферным раствором (pH 4.0), внешний буферный раствор содержал 20 ммоль/л HEPES (pH 7.0) и 0.45 М сахарозу для компенсации разности осмотического давления, температура 30°C.

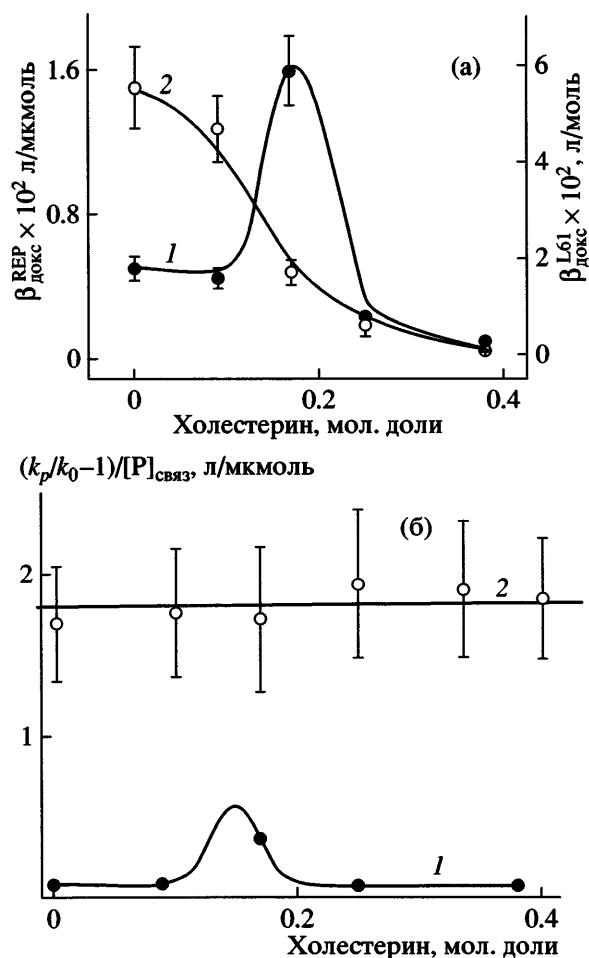
мемbrane. Начальная скорость вытекания красителя  $v_0$  возрастает пропорционально концентрации полимера (рис. 5б). Наклон зависимости  $v_0$  от концентрации полимера ( $\beta_{\text{КФ}}$ ) для REP равен  $1.9 \times 10^{-4}$  л/(с мкмоль), а для плюроника L61 –  $1.3 \times 10^{-4}$  л/с мкмоль. Таким образом, REP проявляет несколько большую способность к образованию пор в липидной мемbrane, чем плюроник L61. Это согласуется с тем, что его коэффициент распределения между водной и липидной фазами приблизительно в ~1.7 раза больше. Поэтому мы полагаем, что более сильное влияние REP на образование пор в мемbrane связано с его повышенной способностью встраиваться в липосомы.

**Влияние полимеров на мембранный транспорт доксорубицина.** Скорость мембранных транспорта доксорубицина определяли по уменьшению его флуоресценции вследствие накопления во внутренней полости липосом, заполненных кислым буферным раствором. Процесс проникновения доксорубицина описывается экспоненциальным уменьшением интенсивности флуоресценции во времени и характеризуется константой скорости процесса первого порядка (рис. 6а, кривая 1).

Добавление полимеров приводит к ускорению транспорта доксорубицина (кривые 2 и 3), причем отношение наблюдаемых констант скорости транспорта в присутствии ( $k_p$ ) и в отсутствие ( $k_0$ ) полимера увеличивается пропорционально их концентрации (рис. 6б). Тангенс угла наклона этой зависимости  $\beta_{\text{докс}}$  является кон-

центрационно-независимой характеристикой способности полимера ускорять транспорт доксорубицина. Для REP эта величина составляет  $5.0 \pm 0.2$  ммоль<sup>-1</sup> л, а для плюроника L61 она на порядок больше –  $55 \pm 2$  ммоль<sup>-1</sup> л (табл. 2). Следует отметить, что это соотношение противоположно для влияния блок-сополимеров на образование пор в мемbrane.

Принципиально разный характер влияния REP и L61 на транспорт доксорубицина и вытекание КФ указывает на различный механизм процессов. Для проверки этого вывода мы рассчитали скорость потока доксорубицина через липосомальную мембрану и сопоставили полученные величины со скоростью вытекания КФ. Поток доксорубицина через мембрану pH-градиентных липосом в отсутствие полимеров составляет 11.4 пмоль/см<sup>2</sup> мин. При концентрации полимеров 20 мкмоль/л он возрастает до 14.3 пмоль/см<sup>2</sup> мин в случае REP и до 28.6 пмоль/см<sup>2</sup> мин при добавлении плюроника L61. Поток КФ в аналогичных условиях составляет 0.57 и 0.31 пмоль/см<sup>2</sup> мин соответственно, что в 30 и 90 раз меньше потока доксорубицина в присутствии полимеров. Таким образом, “канальная” проводимость мембраны в присутствии сополимеров оказывается почти на два порядка ниже, чем индуцированная полимерами проницаемость по отношению к доксорубицину. Этот расчет позволяет заключить, что в присутствии полимеров доксорубицин проникает в липосомы не через поры, а по механизму рас-

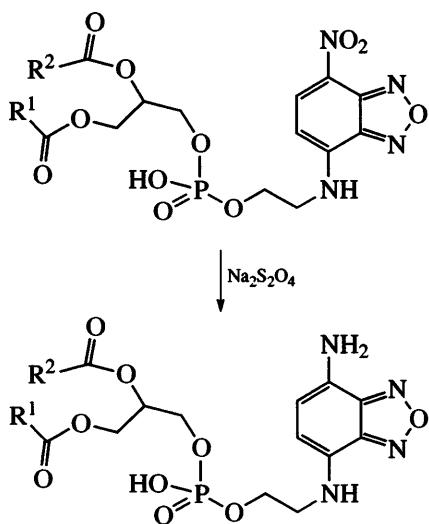


**Рис. 7.** Ускорение транспорта доксорубицина в липосомы при добавлении REP (1) и плюроника L61 (2) в зависимости от содержания холестерина в липосомальной мембране (а) и зависимость значений  $\beta_{\text{Dox}}$ , приведенных на количестве связанных с липосомами полимера, от содержания холестерина в мембране (б). Липосомы заполнены 0.3 М цитратным буферным раствором (pH 4.0), внешний буферный раствор содержал 20 мкмоль/л НЕРЕС (pH 7.0) и 0.45 М сахарозу для компенсации разности осмотического давления, температура 30°C.

пределение–диффузия, т.е. полимеры не меняют механизма транспорта доксорубицина.

В предыдущей части работы мы показали, что связывание плюроника L61 и двублочного сополимера REP в значительной мере определяется составом мембранны и в несколько раз уменьшается с введением в нее холестерина (рис. 3а). Можно было ожидать, что влияние полимеров на проницаемость мембранны по отношению к доксорубицину при этом также будет уменьшаться. Действительно, такая закономерность наблюдалась в случае трехблочного плюроника L61 (рис. 7а, кривая 2). В отличие от него способность двублочного сополимера REP ускорять транспорт доксорубицина достоверно возрастает в мембранны, содержащих 15% холестерина, по сравнению с мембранными, содержащими 10 или 25% холестерина (кривая 1). Нормирование эффектов, вызываемых сополимерами, на концентрацию связанных с мембранный макромолекул показало, что действие единичной макромолекулы связанный с мембранный плюроника L61 практически не зависит от содержания в ней холестерина (рис. 7б, кривая 2). В то же время действие двублочного сополимера REP проходит через максимум, соответствующий содержанию холестерина 0.15–0.20 мольных долей (кривая 1). Причина наблюдаемых различий в поведении полимеров остается пока непонятной.

**Влияние сополимеров на скорость трансбислойной миграции (флип-флопа) НБД-меченного фосфатидилэтаноламина (НБД-ФЭ).** Для изучения скорости миграции липидов в липосомальных мембранны использовали дитионитный метод, основанный на способности 7-нитробензоксида азольной группы (НБД), присоединенной к полярной головке липида фосфатидилэтаноламина, быстро и в мягких условиях восстанавливаться в нефлуоресцирующий продукт дитионитом натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ).



Дитионит-анионы не способны проникать через бислой, что дает возможность получать асимметрично меченные липосомы, несущие флуорес-

центную метку только на внутреннем монослое мембранны. В процессе инкубации таких липосом часть молекул НБД-ФЭ переходит с внутреннего монослоя мембранны на внешний и становится доступной для восстановления дитионитом. Наблюдаемое при этом уменьшение флуоресценции позволяет рассчитать долю НБД-ФЭ, перешедшего на внешний монослой [9]. При фиксированном малом времени инкубации она пропорциональна скорости флип-флопа. Соотношение скоростей флип-флопа в присутствии ( $k_p$ ) и в отсутствие ( $k_0$ ) полимера служит мерой его влияния на этот процесс.

На рис. 8 показано изменение величины  $k_p/k_0$  при варьировании концентрации REP (кривая 1) и плюроника L61 (кривая 2). Видно, что оба сополимера вызывают значительное ускорение флип-флопа, причем, как и в случае транспорта доксорубицина, влияние полимеров на скорость флип-флопа линейно возрастает с увеличением концентрации полимеров. Угловые коэффициенты  $\beta_{\text{ф}}$  этих прямых, характеризующие независящую от концентрации способность полимера ускорять флип-флоп, равны 16 л/ммоль для REP и 290 л/ммоль – для плюроника L61 (табл. 2). Таким образом, влияние двублочного REP на трансбислойную миграцию липидов на порядок слабее, чем плюроника L61. Аналогичная ситуация отмечалась выше при сравнении влияния этих полимеров на транспорт доксорубицина. Эти результаты указывают на тесную взаимосвязь исследованных процессов [6].

Известно, что взаимодействие блок-сополимеров ЭО и ПО с липидными мембранными приводит к встраиванию гидрофобного блока ППО в липидный бислой, тогда как звенья ЭО остаются в водном окружении [7, 8, 26]. Можно полагать, что равновесный размер блока ППО в липидной мембране сильно отличается для двублочных и трехблочных сополимеров. Действительно, поскольку два гидрофильных блока, присоединенные по концам макромолекулы, локализуются на внешней поверхности мембранны, гидрофобный блок должен обладать меньшей конформационной подвижностью, а дезорганизация бислоя вокруг та-

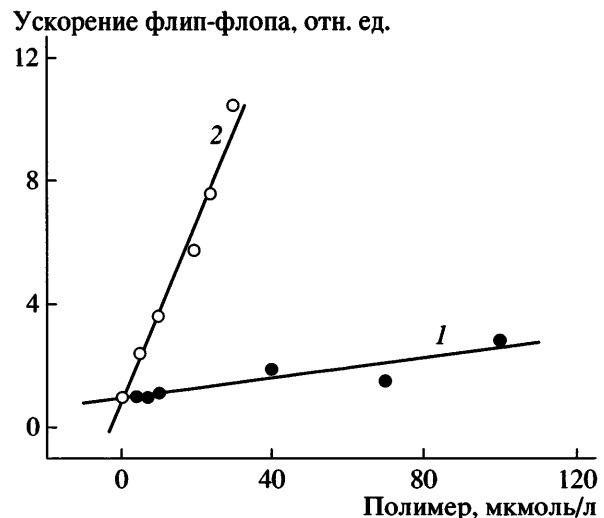
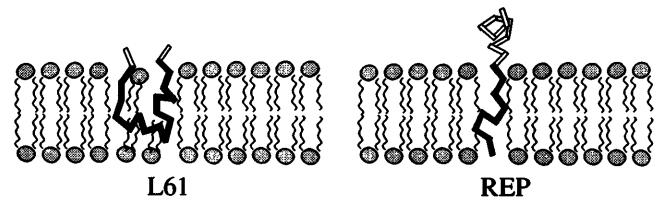


Рис. 8. Ускорение трансмембранных переноса НБД-меченного фосфатидилэтаноламина в липосомах из яичного лецитина в присутствии REP (1) и плюроника L61 (2) в зависимости от концентрации полимера. Содержание липосом 0.16 мг/мл, буферный раствор: 10 ммоль/л три(оксиметил)аминометана, 150 ммоль/л холин хлорида, 1 ммоль/л этилендиаминтетраацетата натрия (рН 7.0); 25°C. Количество перенесенного липида регистрировали через 15 мин после добавления полимера.

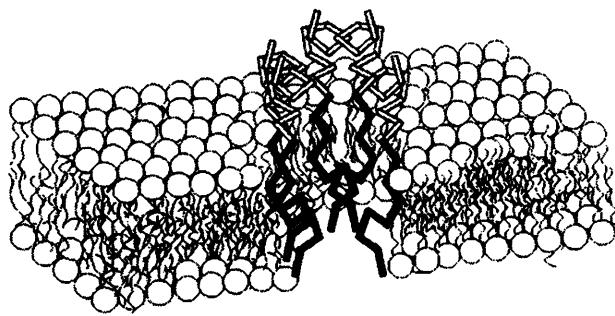
кой молекулы – служить источником компенсаторного повышения энтропии всей системы:



В том случае, если цепочка ППО закрепляется на поверхности мембранны лишь в одной точке, проигрыш в конформационной энтропии полимера, а значит и компенсаторное возмущение бислоя, оказываются существенно меньше. Вследствие этого воздействие сополимера REP на скорость транспорта доксорубицина и флип-флоп слабее, чем действие плюроника L61.

Иная картина наблюдается при сравнении способности полимеров вызывать вытекание карбоксифлуоресцина. Выход из липосом заряженных молекул невозможен без образования крупных гидрофильных пор диаметром не менее 8–9 Å. Термодинамическая несовместимость ППО с липидным бислойем [27] должна способ-

ствовать латеральной сегрегации системы с минимизацией контакта между полимером и липидным окружением. В результате могут возникать островки, обогащенные полимером, которые и служат основой для образования гидрофильных пор, вносящих существенный вклад в проницаемость мембран по отношению к заряженным соединениям, но менее существенны для транспорта соединений, способных проникать через мембранны по механизму растворение–диффузия:



Таким образом, несмотря на то что REP и плюроник L61 имеют практически одинаковую способность к образованию мицелл, характер их взаимодействия с липидными и биологическими мембранами существенно различается. Двублочный сополимер REP обладает большим сродством к модельным и биологическим мембранам, его способность к образованию пор в липидной мембране несколько выше, чем у плюроника L61. В то же время REP проявляет значительно меньшую способность ускорять проникновение доксорубицина и трансмембранный перенос липидов.

Авторы благодарны Е.С. Гариной за проведение анализа сополимеров методом ГПХ и Л.А. Казарину – за помощь в исследовании полимеров методом ИК-спектроскопии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmolka I.R. // Polymers for Controlled Drug Delivery / Ed. by Tarcha P.J. Boca Raton; Ann Arbor; Boston: CRC Press, 1991. P. 189.
2. Moghimi S.M., Hunter A.C. // Trends Biotechnol. 2000. V. 18. № 10. P. 412.
3. Kabanov A.V., Chekhonin V.P., Alakhov V.Yu., Batrakova E.V., Lebedev A.S., Melik-Nubarov N.S., Arzhakov S.A., Levashov A.V., Morozov G.V., Severin E.S. // FEBS Lett. 1989. V. 258. № 2. P. 343.
4. Anthony P., Lowe K.C., Davey M.R., Power J.B. // Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 1998. V. 26. № 1. P. 27.
5. Kabanov A.V., Okano T. // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 519. P. 1.
6. Demina T., Grozdova I., Krylova O., Zhirnov A., Istratov V., Frey H., Kautz H., Melik-Nubarov N. // Biochemistry. 2005. V. 44. № 10. P. 4042.
7. Firestone M.A., Seifert S. // Biomacromolecules. 2005. V. 6. № 5. P. 2678.
8. Firestone M.A., Wolf A.C., Seifert S. // Biomacromolecules. 2003. V. 4. № 6. P. 1539.
9. Krylova O.O., Melik-Nubarov N.S., Badun G.A., Ksenofontov A.L., Menger F.M., Yaroslavov A.A. // Chem. Eur. J. V. 9. № 16. P. 3930.
10. Дехант И., Данц Р., Киммер В., Шмольке Р. // Инфракрасная спектроскопия полимеров. М.: Химия, 1976.
11. Kozlov M.Yu., Melik-Nubarov N.S., Batrakova E.V., Kabanov A.V. // Macromolecules. 2000. V. 33. № 9. P. 3305.
12. Melik-Nubarov N.S., Pomaz O.O., Dorodnych T.Yu., Badun G.A., Ksenofontov A.L., Schemchukova O.B., Arzhakov S.A. // FEBS Lett. 1999. V. 446. № 1. P. 194.
13. New R.R.C. // Liposomes: a Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1990.
14. Harrigan P.R., Wong K.F., Redelmeier T.E., Wheeler J.J., Cullis P.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1149. № 2. P. 329.
15. Erulkova V.Yu., Krylova O.O., Antonenko Yu.N., Melik-Nubarov N.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1468. № 1–2. P. 73.
16. McIntyre J.C., Sleight R.G. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 51. P. 11819.
17. Düzgünes N., Wilschut J. // Methods Enzymol. 1993. V. 220. P. 3.
18. Лимфоциты. Методы. / Под ред. Клауса Дж. М.: Мир, 1990.
19. Alexandridis P., Holzwarth J.F., Hatton T.A. // Macromolecules. 1994. V. 27. № 9. P. 2414.
20. Heerklotz H., Seelig J. // Biophys. J. 2000. V. 78. № 5. P. 2435.

21. *De la Maza A., Lopez O., Coderch L., Parra J.L.* // *Colloids and Surfaces. A.* 1998. V. 145. № 1–3. P. 83.
22. *Altinok H., Yu G.-E., Nixon S.K., Gorry P.A., Attwood D., Booth C.* // *Langmuir.* 1997. V. 13. № 22. P. 5837.
23. *Zhirnov A.E., Demina T.V., Krylova O.O., Grozdova I.D., Melik-Nubarov N.S.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1720. № 1–2. P. 73.
24. *Plasek J., Jarolim P.* // *Gen. Physiol. Biophys.* 1987. V. 6. № 5. P. 425.
25. *Parsegian A.* // *Nature.* 1969. V. 221. № 183. P. 844.
26. *Топчиева И.Н., Осипова С.В., Банацкая М.И., Валькова Л.А.* // *Докл. АН СССР.* 1989. Т. 308. № 4. С. 910.
27. *Bryskhe K., Schillén K., Löfroth J.-E., Olsson U.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2001. V. 3. P. 1303.

## **Effect of the Structure of Ethylene Oxide–Propylene Oxide Block Copolymers on Their Interaction with Biological Membranes**

**A. E. Zhirnov, D. N. Pavlov, T. V. Demina, G. A. Badun,  
I. D. Grozdova, and N. S. Melik-Nubarov**

*Faculty of Chemistry, Moscow State University,  
Leniskie gory, Moscow, 119992 Russia  
e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru*

**Abstract**—Partition coefficients of ethylene oxide–propylene oxide block copolymers between the lipid phase and water have been estimated via equilibrium dialysis. It has been shown that for the triblock copolymer (pluronic L61), the partition coefficient is  $45 \pm 9$ , while for the diblock copolymer (REP), this parameter is as high as  $78 \pm 17$ . The effect of the copolymers on the permeation of the charged organic ion carboxyfluorescein across the lecithin bilayer membrane changes in the same direction. Even though the triblock copolymer binding is weaker, it shows a stronger effect on the rate of transbilayer migration of lipids and on the permeation of the uncharged substance (doxorubicin). The incorporation of cholesterol into the membrane decreases its sensitivity to the action of copolymers; however, the character of changes induced by both copolymers remains invariable. The experimental data of this study indicate that the triblock structure of amphiphilic macromolecules is responsible for their higher ability to disturb lipid bilayer membranes.