

**ВЛИЯНИЕ ТРИБЛОКСОПОЛИМЕРОВ
ПОЛИОКСИЭТИЛЕНА-ПОЛИОКСИПРОПИЛЕНА
НА СТЕПЕНЬ ЗАГРУЗКИ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ
КЛЕТКИ МИКРОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ
МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ,
СОДЕРЖАЩИХ ХЛОРИН e_6 И БРОМИСТЫЙ ЭТИДИЙ**

© 2019 г. А.А. Темнов* ** ***, А.Н. Склифас*, Н.И. Кукушкин*, С.П. Кречетов**,
Е.В. Горина**, Т.А. Астрелина ***, Д.Ю. Усупжанова***, Ю.Б. Сучкова***,
И.В. Кобзева***, А.С. Самойлов***

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
«Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

**Московский физико-технический институт (государственный университет),
141701, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

***Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России,
123098, Москва, ул. Маршала Новикова, 23

E-mail: nikukushkin@mail.ru

Поступила в редакцию 11.01.19 г.

После доработки 28.01.19 г.

Принята к публикации 04.02.19 г.

Изучено влияние различных триблоксополимеров полиоксиэтилена-полиоксипропилена, их концентрации и способа воздействия на загрузку в мезенхимальные стволовые клетки микрочастиц на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот, нагруженных лекарственными веществами – радахлорином (хлорин e_6) или бромистым этидием. Показано, что инкапсулированные внутри микрочастиц лекарственные вещества оказывают влияние на загрузку этих частиц в цитоплазму мезенхимальных стволовых клеток. Количество клеток, поглотивших частицы с хлорином e_6 , в контроле примерно в два раза меньше, чем в экспериментах с бромистым этидием. Показано, что предварительная обработка микрочастиц триблоксополимерами более эффективна для загрузки их в клетки по сравнению с одновременным введением в среду культивирования триблоксополимеров и частиц. Обработка триблоксополимерами микрочастиц, содержащих бромистый этидий, не эффективна при загрузке их в мезенхимальные стволовые клетки по сравнению с контролем. Исключением является Pluronic 123, при обработке им частиц в концентрациях 1 и 2% загрузка частиц в клетки увеличивается по сравнению с контролем примерно в 11 и 5 раз соответственно. Для частиц с хлорином e_6 предварительная обработка их триблоксополимерами в концентрации 4% является наиболее эффективной, при обработке частиц загрузка их в клетки увеличивается примерно от 3 до 11 раз.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, микрочастицы сополимеров гликолевой и молочной кислот, триблоксополимеры, адсорбция, хлорин e_6 , бромистый этидий.

DOI: 10.1134/S0006302919020108

Целенаправленная доставка лекарственных веществ с помощью мезенхимальных стволовых клеток (МСК), активно мигрирующих в пато-

логически измененную, быстро пролиферирующую ткань, является многообещающей областью исследования при терапии различных за-

Сокращения: МСК – мезенхимальные стволовые клетки; PLGA – poly-(lactic-co-glycolic acid) – сополимеры молочной и гликолевой кислот; EtBr – бромистый этидий; ТБС – триблоксополимеры; ПОЭ – полиэтиленоксид; ПОП – полипропиленоксид; GFP-клетки – мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга мышей линии В10 с геном зеленого белка.

болеванний [1]. Одной из проблем данной технологии является недостаточное количество лекарственных веществ, переносимых стволовыми клетками, и создание высокой концентрации препарата в патологической ткани для достижения терапевтического эффекта. Для решения этой проблемы используются различные наноконтейнеры с лекарством, загруженные в МСК [2,3].

Использование различных микрочастиц считается одним из наиболее эффективных способов доставки лекарственных веществ из-за их фармакокинетических свойств, возможности конъюгировать препарат на своей поверхности или заключать внутрь своей структуры с последующим введением в цитоплазму МСК [4].

Взаимодействие таких частиц с биологическими системами зависит от их химического состава, размера, поверхностного заряда и физико-химических свойств поверхности (гидрофильность/гидрофобность). Эти факторы определяют скорость биодеградации частиц, их способность проникать в цитоплазму клетки с сохранением ее жизнеспособности. Все это в конечном итоге будет определять терапевтическую эффективность доставки лекарственных веществ стволовыми клетками в патологический очаг [5].

Одними из наиболее эффективных для биомедицинских целей являются частицы на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA – poly(lactic-co-glycolic acid)). Они характеризуются низкой токсичностью и хорошей биологической совместимостью с тканями живых организмов, а свойства и скорость деструкции их можно регулировать содержанием кристаллической фазы и соотношением звеньев мономеров в PLGA [6,7].

Однако гидрофобные свойства микрочастиц PLGA препятствуют их взаимодействию с клеточной мембраной и, тем самым, снижают количество лекарственных веществ, проникающих в клетку [8–10]. Для изменения гидрофобных свойств материалов широко используются триблоксополимеры этиленоксида и пропиленоксида (плюроники), известные как агенты, которые способствуют проникновению лекарств через биологические барьеры. Благодаря удачному сочетанию своих физико-химических и физиологических характеристик плюроники находят широкое применение в медицине и фармакологии. В частности, они выполняют роль стабилизатора перфторуглеродных эмульсий [11], применяются в технологии низкотемпературного консервирования органов и тканей [12], а также в иммунотерапии в качестве адъювантов [13,14].

В литературе высказывалось предположение, что вызываемые плюрониками эффекты обусловлены, с одной стороны, их взаимодействием с мембранами клеток и возможным влиянием этих сополимеров на структурные характеристики мембраны [15].

С другой стороны, обработка плюрониками гидрофобных частиц приводит к изменению их физико-химических характеристик [16,17]. Так, известно, что смешивание полимера PLGA с небольшими количествами (0,5–2,0% мас./об.) Pluronic® F-108 (PF-108) позволяет значительно улучшить гидрофильность поверхности из микро- и нановолоконных сеток PLGA при сохранении объемных (тепловых и механических) свойств PLGA [18].

Целью данной работы было изучение влияния плюроников различной физико-химической структуры (гидрофобность/гидрофильность) на способность микрочастиц PLGA с инкапсулированными в них лекарственными веществами – радахлорином или бромистым этидием (EtBr) – проникать в цитоплазму МСК с сохранением их жизнеспособности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Триблоксополимеры. В работе использовали неионогенные поверхностно-активные вещества, представляющие собой триблоксополимеры (ТБС) полиэтиленоксида (ПОЭ) и полипропиленоксида (ПОП), проксанол 268 (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Россия), Pluronic 10R5 и Pluronic 123 (Fluka Chemistry, Германия), Pluronic F-68 (Fluka Analytical, Германия), Pluronic L-31 и Pluronic L-35 (Aldrich, США). Молекулы всех этих поверхностно-активных веществ (за исключением Pluronic 10R5) имеют структуру «ПОЭ-ПОП-ПОЭ», т.е. гидрофобный блок образует центральную часть молекулы. Pluronic 10R5 имеет «инвертированную» структуру «ПОП-ПОЭ-ПОП» с гидрофильным блоком в центре и концевые ПОП-блоки.

Получение микрочастиц. Микрочастицы на основе PLGA RESOMER PG 653H (Evonik, Германия) с соотношением блоков 65/35, содержащие радахлорин (хлорин e_6 , РАДА-ФАРМА, Россия) или бромистый этидий (Serva, Германия), были получены по методу множественной эмульсии ((вода в масле) в воде) с удалением растворителя [19].

В экспериментах использовались микрочастицы со средним диаметром 400–500 нм. Расчетное содержание радахлорина составляло 8 мкг/мг PLGA, а EtBr – 10 мкг/мг PLGA.

Получение мезенхимальных стволовых клеток. В работе были использованы МСК, полу-

ченные из костного мозга мышей линии B10 с геном зеленого белка (GFP-клетки) (питомник ЦМБТ, пос. Светлые Горы Красногорского района Московской области). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Способность клеток дифференцироваться в хондрогенном, адипогенном и остеогенном направлении проверяли по стандартной методике [20].

Обработка частиц плурониками. Перед добавлением к клеткам частицы инкубировали с поверхностно-активными веществами в течение 10 мин, а затем осаждали методом центрифугирования (10 мин, 4500 об/мин). Осадок двукратно отмывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и вносили в лунки до конечной концентрации $75 \cdot 10^6$ частиц/мл на лунку. Частицы инкубировали с клетками в течение 24 ч.

Инкубация клеток с частицами в присутствии плуроников. Перед внесением необработанных частиц в лунку с клетками в культуральную среду вносили ТБС до конечной концентрации 0,5, 1 и 4%. Далее в лунки вносили суспензию частиц до конечной концентрации $75 \cdot 10^6$ частиц/мл на лунку. Частицы инкубировали с клетками в течение 24 ч. Затем культуральную среду удаляли, лунку промывали пять раз фосфатным буферным раствором (1,5 мл), в лунку добавляли 0,5 мл раствора трипсина с 0,25% ЭДТА. Полученную суспензию клеток отбирали для исследования.

Метод проточной цитофлуориметрии. Благодаря флуоресценции клеток и частиц в двух различных световых диапазонах (зеленом и красном) оценка эффективности разрабатываемого метода осуществлялась с помощью проточной цитофлуориметрии по количеству жизнеспособных клеток, «поглотивших» частицы. После каждого измерения производили коррекцию расположения и границ регионов на точечных диаграммах: устанавливали регионы (гейты) клеток GFP и части PLGA на графике «показатель бокового светорассеяния (side scatter) против показателя прямого светорассеяния (forward side scatter)», регионы синглетных клеток GFP, регионы клеток и частиц, флуоресцирующих в необходимом диапазоне. В качестве примера на рис. 1 и 2 приведены результаты проточной цитофлуориметрии количества клеток, «поглотивших» частицы, соответственно с хлорином e_6 и EtBr, при 24-часовой инкубации в контрольных условиях (без обработки сурфактантом).

Измерение дзета-потенциала. Для измерения дзета-потенциала использовали прибор Zetasizer

nano ZS (Malvern, Великобритания). Образец измеряли в кювете DTS 1060 при следующих условиях: температура 25,0°C; уравнивание температуры перед измерением – 120 с; число сканов, подлежащих усреднению, для одного измерения дзета-потенциала – 12; число повторов – не менее трех (в случае наличия явных выбросов проводились дополнительные измерения); напряжение на электродах кюветы – 70 В; мощность лазера – максимальная (2 мВт); длина волны 633 нм. Для функции Генри была выбрана модель Смолуховского (функция Генри приравнивалась к 1,5), для анализа дзета-потенциала (в штатном программном обеспечении) – модель Monomodal.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для обработки частиц при загрузке в стволовые клетки использовали триблоксополимеры, физико-химические характеристики которых представлены в табл. 1.

Все ТБС различаются по молекулярной массе, гидрофобности (весовой доле ПОП-блоков в молекуле), соотношению ПОЭ/ПОП, величине критической концентрации мицеллообразования, растворимости в воде и токсичности.

Частицы, содержащие хлорин e_6 или EtBr, инкубировали с клетками в течение 4 и 24 ч и определяли процент клеток, в цитоплазме которых фиксируются частицы (контроль). Данные представлены в табл. 2.

Необходимо отметить, что при инкубации в течение 24 ч клеток с частицами, содержащими хлорин e_6 или EtBr без ТБС (контроль), количество клеток, загруженных частицами, различается примерно в два раза, для радахлорина загрузка составляет около 2,6% от общего количества клеток, для EtBr – 4,6%. Поскольку основой всех микрочастиц является полимер молочной и гликолевой кислот, на различия в загрузке микрочастиц в клетки могут влиять лекарственные вещества, инкапсулированные в частицах, которые, возможно, изменяют физико-химические свойства частицы (заряд поверхности, уровень гидрофобности и т.д.).

Для увеличения загрузки стволовых клеток микрочастицами последние подвергали обработке указанными выше ТБС. В первой серии экспериментов исследовали загрузку частиц, содержащих хлорин e_6 или EtBr, в стволовые клетки в присутствии ТБС, добавленных в среду культивирования в различных концентрациях (0,5, 1 и 4%). Полученные данные представлены в табл. 3.

В течение 24 ч инкубации при концентрациях ТБС 0,5, 1 и 4% количество клеток, со-

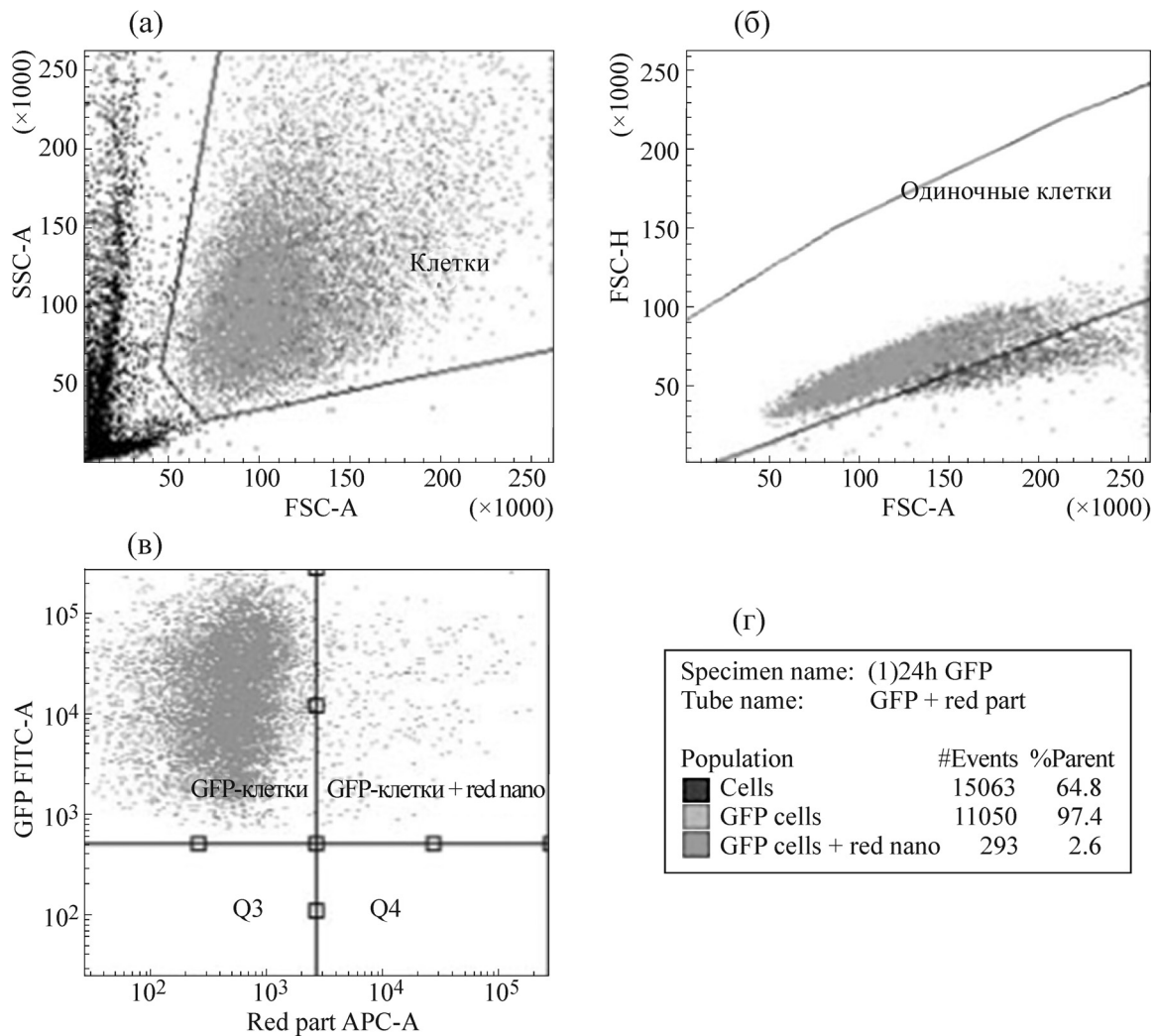


Рис. 1. Результаты проточной цитофлуориметрии в контрольной группе с частицами PLGA, содержащими препарат хлорина e_6 (без сурфактанта): (а) – популяции клеток GFP при прямом и боковом светорассеянии; (б) – гейт клеток GFP; (в) – гейт в каналах FITC и APC (верхний правый угол); (г) – количественные характеристики полученных данных.

держащих частицы с хлорином e_6 , увеличивается пропорционально концентрации. При концентрациях 0,5 и 1% для всех ТБС количество клеток, содержащих частицы, было ниже контроля. Блоксополимер L-31 при концентрациях 0,5 и 1% ингибировал поглощение частиц клетками, а при концентрации 4% был токсичен для клеток. При 4% концентрации ТБС количество клеток, содержащих частицы, было выше контроля, за исключением Pluronic 268 и Pluronic F-68. Так, для P-123 оно составило примерно 15%, что более чем в шесть раз выше контроля, для L-35 и 10R5 – 6,6 и 3,2% соответственно, что выше контрольных значений более чем в 2,8 и 1,4 раза.

Прослеживается корреляция между величиной гидрофобного полипропиленового блока

и количеством клеток, содержащих частицы. Так при 4%-й концентрации Pluronic P-123, L-35 и 10R5, при использовании которых загрузка клеток частицами увеличивается, гидрофобный блок в молекуле составляет примерно 70, 51 и 49% соответственно. При обработке частиц ТБС с гидрофобным блоком, составляющим примерно 20% (Pluronic F-68 и Проксанол 268), количество клеток, содержащих частицы, ниже контрольных значений. Таким образом, при данной схеме эксперимента наблюдается прямая зависимость от концентрации ТБС количества поглощенных клетками частиц. Наиболее оптимальной является концентрация в 4%. Однако при добавлении ТБС в среду культивирования загрузка микрочастиц в клетки в целом не эффективна.

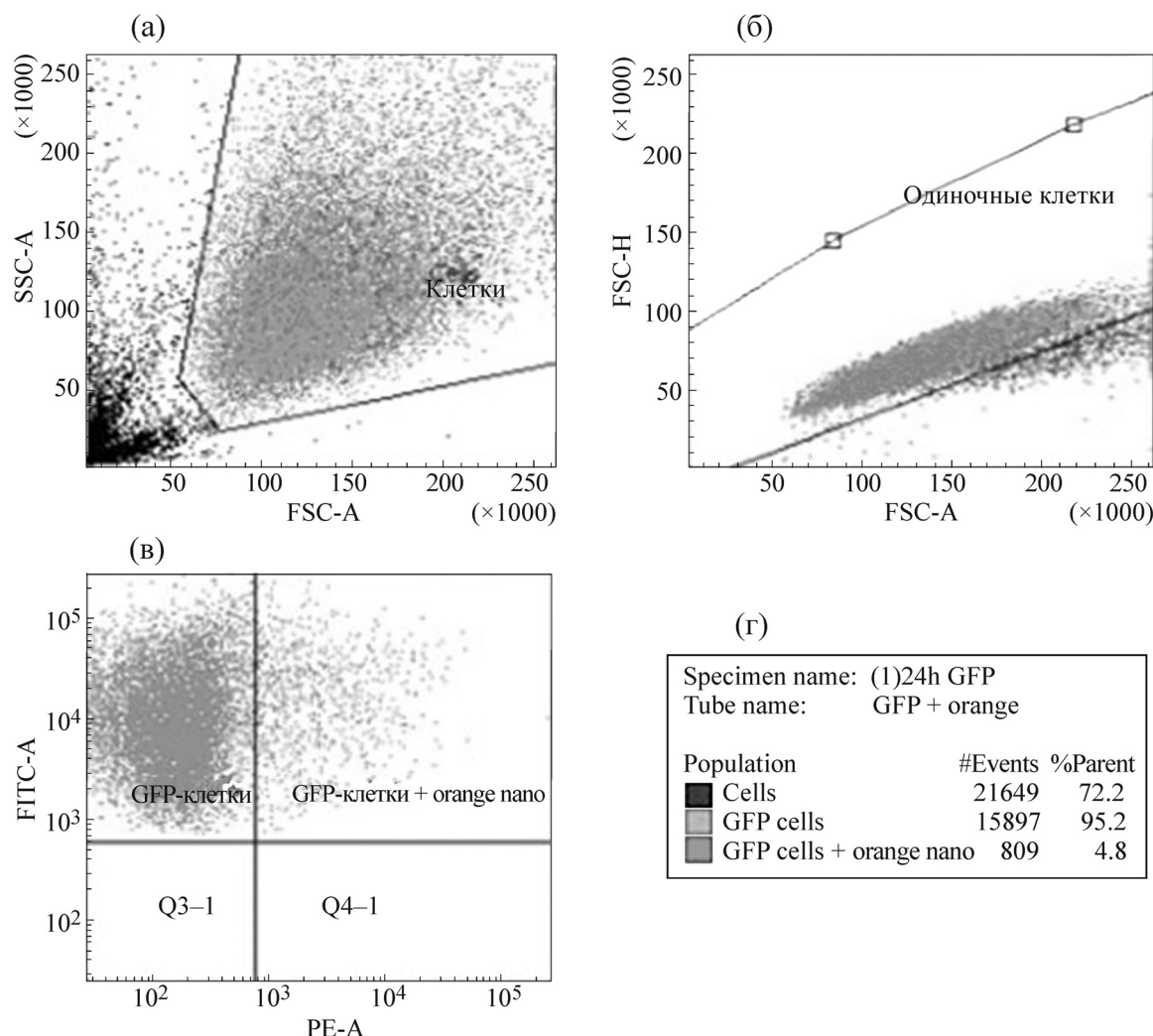


Рис. 2. Результаты проточной цитофлуориметрии в контрольной группе с частицами PLGA, содержащей препарат EtBr (без сурфактанта): (а) – популяции клеток GFP при прямом и боковом светорассеянии; (б) – гейт клеток GFP; (в) – гейт в каналах FITC и PE-A (верхний правый угол); (г) – количественные характеристики полученных данных.

По-видимому, при инкубации клеток с частицами в присутствии ТБС они оказывают влияние, с одной стороны, на поверхностную гидрофобность частиц, при этом их химическая природа играет существенную роль (соотношение гидрофобных/гидрофильных блоков в молекуле). Так, известно, что крайне гидрофильные либо гидрофобные поверхности нарушают процесс прикрепления клеток к твердой поверхности [4], и обработка микрочастиц PLGA ТБС может влиять на смачиваемость поверхности и прикрепление частиц к поверхности клетки, а тем самым, на проникновение их в цитоплазму [17].

С другой стороны, ТБС может оказывать влияние на состояние клеточной мембраны, меняя ее микровязкость. В проведенном экспери-

менте процесс загрузки является, по-видимому, итогом двух составляющих – изменения поверхностных характеристик частиц и изменения микровязкости клеточной мембраны [21].

При инкубации в присутствии ТБС в течение 24 ч клеток с частицами, содержащими EtBr, при использованных концентрациях ТБС, как правило, наблюдается снижение количества клеток, содержащих частицы, относительно контроля. Более того, наблюдается обратная зависимость количества клеток, содержащих частицы от концентрации ТБС, когда наименьшее количество клеток, содержащих частицы, наблюдается при концентрации 4%, как относительно контроля, так и относительно концентраций 0,5 и 1%. Таким образом, добавление различных ТБС в среду культивирования клеток

Таблица 1. Физико-химические характеристики триблоксополимеров

ТБС	Молекулярная масса	Количество мономерных блоков в структуре ПОЭ–ПОП–ПОЭ	Весовая доля мономерных блоков ПОП в молекуле, %	Критическая концентрация мицеллообразования при 25°C, % масс./об.	Отношение блоков ПОЭ/ПОП в молекуле	Растворимость в воде при 25° С	Цитотоксичность***
Pluronic L-31	1100	2–16–2	90	–	0,25	Ограниченная	Токсичный
Pluronic 123	5800	20–70–20	70	0,03**	0.57	Хорошая	Слаботоксичный
Pluronic F68	8400	78–30–78	20	0,03**	5,20	Хорошая	Нетоксичный
Pluronic L-35	1900	9–14–9	50	–	1,2	Ограниченная	Слаботоксичный
Pluronic 268	13000	130–38–130	20	0,02**	6,84	Хорошая	Нетоксичный
Pluronic 10R5*	2000	8–22–8	50	–	0,73	Хорошая	Нетоксичный

Примечание. * – Структурная формула: ПОП–ПОЭ–ПОП; ** – данные взяты из работы [24]; *** – измерения выполнены с использованием общепринятого метода, данные не опубликованы.

Таблица 2. Процент клеток, загруженных частицами PLGA с инкапсулированными лекарственными веществами

Показатели	Лекарственные вещества			
	Хлорин e_6		EtBr	
	4 ч	24 ч	4 ч	24 ч
Время инкубации				
% клеток, содержащих частицы	0,64 ± 0,18	2,34 ± 0,27	0,38 ± 0,16	4,62 ± 0,81

Примечание. Здесь и в последующих таблицах представлены средние значения ± стандартные отклонения.

с частицами, нагруженными EtBr, в большинстве случаев ингибирует проникновение частиц в цитоплазму.

Во второй серии экспериментов мы проинкубировали частицы, содержащие хлорин e_6 или EtBr, в течение 10 мин с указанными выше триблоксополимерами (концентрации 1, 2 и 4%). Затем после осаждения и двукратной отмывки частиц фосфатным буфером инкубировали их с клетками в течение 24 ч. Количество клеток, содержащих частицы, представлены в табл. 4.

При предварительной обработке триблоксополимерами частиц, содержащих хлорин e_6 , наблюдается увеличение числа клеток, содержащих частицы. Количество клеток, содержащих частицы, увеличивается пропорционально увеличению концентрации ТБС, используемых при обработке частиц. Однако при использо-

вании концентраций 1% число клеток, содержащих частицы, ниже контроля. Исключение составляют только частицы, обработанные Pluronic 123, загрузка их в клетки примерно в два раза превышает контроль. Наибольшее количество клеток, содержащих частицы, наблюдается при обработке частиц 4%-ми растворами ТБС. При этой концентрации все ТБС увеличивают загрузку частиц в клетки выше контроля примерно от 3,4 до 11 раз. Наиболее эффективными, как и в первой серии экспериментов, являются Pluronic 123, L-31, L-35 и 10R5, при использовании которых загрузка увеличивается в 10,7, 6,0, 4,7 и 4,2 раза соответственно. Необходимо отметить, что загрузка частиц при обработке Pluronic 268 и F68 также существенно увеличивается относительно контроля, в 4,1 и 3,4 раза соответственно

Таблица 3. Процент клеток, содержащих частицы с хлорином e_6 или EtBr, после 24-часовой инкубации их в присутствии различных концентраций ТБС

ТБС	Лекарственные вещества					
	Хлорин e_6			EtBr		
	Концентрация ТБС					
	0,5%	1%	4%	0,5%	1%	4%
Pluronic 268	0,20 ± 0,20	0,47 ± 0,12	1,03 ± 0,25	2,90 ± 0,36	2,03 ± 0,25	1,37 ± 0,32
Pluronic10R5	0,30 ± 0,20	0,07 ± 0,06	3,23 ± 0,25	2,87 ± 0,23	3,10 ± 0,20	0,50 ± 0,20
Pluronic L-31	0	0	Гибель клеток	0	0,17 ± 0,29	Гибель клеток
Pluronic L-35	0,53 ± 0,25	0,10 ± 0,10	6,57 ± 0,40	3,60 ± 1,31	2,73 ± 0,38	1,07 ± 0,21
Pluronic 123	0,93 ± 0,15	3,17 ± 0,46	15,4 ± 0,62	1,97 ± 0,35	1,73 ± 0,42	3,83 ± 0,23
Pluronic F-68	0,3 ± 0,2	0,07 ± 0,11	1,1 ± 0,2	2,43 ± 0,25	2,10 ± 0,17	1,47 ± 0,25

Таблица 4. Процент клеток, содержащих частицы с хлорином e_6 или EtBr, после предварительной обработки ТБС и последующей инкубации в течение 24 ч

ТБС	Лекарственные вещества					
	Хлорин e_6			EtBr		
	Концентрация ТБС					
	1%	2%	4%	1%	2%	4%
Pluronic 268	2,67 ± 0,83	3,67 ± 0,31	9,53 ± 0,60	5,07 ± 0,21	5,2 ± 0,3	6,8 ± 0,2
Pluronic10R5	1,60 ± 0,30	3,1 ± 0,17	9,87 ± 0,35	3,53 ± 0,23	5,8 ± 0,3	2,9 ± 0,2
Pluronic L-31	0,27 ± 0,25	4,37 ± 0,35	14,10 ± 4,39	6,33 ± 0,40	7,03 ± 0,25	3,37 ± 0,06
Pluronic L-35	1,87 ± 0,15	4,27 ± 0,38	11,0 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,33 ± 0,31	4,63 ± 0,25
Pluronic 123	4,97 ± 0,15	6,47 ± 0,45	25,07 ± 1,07	55,03 ± 4,53	23,2 ± 0,35	7,37 ± 0,31
Pluronic F-68	1,90 ± 0,10	2,9 ± 0,17	8,07 ± 0,21	7,03 ± 0,32	8,07 ± 0,35	5,87 ± 0,35

В работе [22] было доказано, что при изготовлении PLGA-микроволоконных сеток (чистых и смешанных с плуронином PF-108 в концентрации 0,5 и 2%) образцы с PF-108 были более гидрофильны, что было дополнительно подтверждено анализом поверхности волокон с помощью рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии. Было показано, что этиленоксидный компонент PF-108 находится на поверхности волокна, тогда как пропиленоксидный компонент PF-108 остается встроенным в микроволоконно PLGA. При более низких концентрациях PF-108 конформация этиленоксида на поверхности волокон имеет форму гриба, при более высоких концентрациях PF-108 – палочкообразную форму. Таким образом, в зависимости от концентрации ТБС структура поверхностного слоя на частице будет различна, что сказывается на гидрофобности/гидрофильности поверхности. Это может влиять на проникновение частиц в клетку.

Для частиц, содержащих EtBr и обработанных предварительно указанными ТБС (табл. 4), загрузка в клетки либо незначительно увеличивается относительно контроля, либо остается ниже контрольных значений (за исключением Pluronic L-123). Не наблюдается корреляции между концентрацией ТБС и количеством клеток, содержащих частицы. Так, для Pluronic L-31, Pluronic L-123 и Pluronic F-68 количество клеток, содержащих частицы, с увеличением концентрации ТБС снижается. Даже в случае с Pluronic L-123 наибольшая загрузка наблюдается при концентрации 1%, примерно в 12 раз выше относительно контроля, при 2%-й концентрации – примерно в пять раз, а при концентрации 4% загрузка относительно контроля увеличивается лишь в 1,7 раза.

Кроме гидрофобных/гидрофильных свойств поверхности, очень важной характеристикой является поверхностный заряд частицы. Известны данные экспериментов с микрочастицами, стабилизированными ТБС, заключающиеся в том,

Таблица 5. Дзета-потенциал частиц после обработки ТБС, мВ.

ТБС	Хлорин e_6			EtBr		
	Контроль	1% ТБС	4% ТБС	Контроль	1% ТБС	4% ТБС
Pluronic 268		$-38,7 \pm 1,7$	$-22,9 \pm 6,1$		$-19,0 \pm 0,6$	$-16,7 \pm 0,7$
Pluronic10R5		$-24,7 \pm 2,4$	$-13,0 \pm 4,2$		–	–
Pluronic L-31	$-23,2 \pm 1,0$	$-19,0 \pm 2,5$	$-18,6 \pm 3,0$	$-15,7 \pm 3,2$	$-10,8 \pm 1,0$	$-16,4 \pm 1,0$
Pluronic L-35		$-28,0 \pm 1,2$	$-18,8 \pm 4,1$		$-17,3 \pm 1,5$	$-16,1 \pm 1,1$
Pluronic 123		$-32,7 \pm 1,5$	$-33,3 \pm 1,2$		$-18,8 \pm 0,8$	$-16,1 \pm 1,1$

что чем большее абсолютное отрицательное значение имеет ζ -потенциал микрочастиц, тем тоньше поверхностный слой ТБС на микрочастице [23].

При измерении заряда (дзета-потенциал) контрольных частиц абсолютная величина отрицательного заряда частиц, содержащих хлорин e_6 , значительно превышает такую же величину у частиц, содержащих EtBr (см. данные табл. 5) Следует отметить, что при обработке ТБС частиц, содержащих хлорин e_6 , поверхностный отрицательный заряд по абсолютным значениям либо превышает заряд необработанных частиц, либо остается на уровне контроля. При увеличении концентрации ТБС до 4% абсолютные значения дзета-потенциала падают при обработке всех ТБС за исключением Pluronic 123, что косвенно указывает на увеличение толщины адсорбционного слоя на поверхности частиц. При этом количество клеток, содержащих частицы, при концентрации ТБС 4% возрастает.

Поверхностный заряд частиц, содержащих EtBr, после обработки ТБС в концентрациях 1 и 4% не меняется и остается практически на уровне контроля, как и количество клеток, поглотивших частицы. По-видимому, инкапсулированный EtBr препятствует адсорбции ТБС на поверхности частиц, в результате чего не изменяются поверхностные свойства частиц и не наблюдаются существенные изменения в поглощении их клетками.

ВЫВОДЫ

1. Лекарственные вещества, инкапсулированные внутри частицы PLGA, оказывают влияние на загрузку их в цитоплазму клетки в контроле. При загрузке частиц на основе PLGA с инкапсулированным внутри хлорином e_6 количество клеток примерно в два раза меньше, чем при загрузке частицы с EtBr.

2. Более эффективной для поглощения клетками является предварительная обработка мик-

рочастиц ТБС и введение их в среду культивирования по сравнению с добавлением поверхностно-активного вещества и частиц одновременно в среду культивирования.

3. Обработка ТБС частиц, содержащих EtBr, в концентрации 1, 2 и 4%, не увеличивает загрузку частиц в клетки, либо это увеличение незначительно относительно контроля. Исключением является Pluronic 123, при предварительной обработке частиц которым в концентрации 1% загрузка в клетки увеличивается примерно в 11 раз.

4. Обработка частиц ТБС, содержащих хлорин e_6 , в концентрации 2 и 4% увеличивает количество клеток, содержащих частицы. Как и в случае с EtBr, более эффективным является Pluronic 123, при предварительной обработке частиц которым в концентрации 4% загрузка в клетки также увеличивается примерно в 11 раз относительно контроля.

5. Величина заряда (дзета-потенциал) частиц с хлорином e_6 при обработке ТБС зависит от концентрации ТБС, при концентрации 2% абсолютное отрицательное значение выше контрольных значений, при концентрации 4% абсолютная величина заряда снижается до контрольных значений и ниже, что косвенно указывает на изменение толщины адсорбционного слоя ТБС на частицах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Z. Gao, L. Zhang, J. Hu, et al., *Nanomedicine* **9** (2), 174 (2013 Feb).
2. D. Y. Kim, J. S. Kwon, et al., *J. Biomed. Nanotechnol.* **11** (3), 522 (2015 Mar).
3. L. Li, Y. Guan, H. Liu, et al., *ACS Nano* **5** (9), 7462 (2011 Sep27).
4. B. Li, Q. Li, J. Mo, et al., *Front Pharmacol.* **8**, 51 (2017).
5. H. Cai, Z. Liang, W. Huang, et al., *Int. J. Pharmaceutics* **532** (1), 55 (2017 30 October).
6. D. N. Kapoor, R. Kaur, A. Bhatia, et al., *Therapeutic Delivery* **6** (1), 41 (2015).
7. Разработка и регистрация лекарств **3** (2013).

8. J. H. Lee, G. Khang, J. W. Lee and H. B. Lee, *J. Colloid Interface Sci.* **205**, 323 (1998).
9. Y. Arima and H. J. Iwata, *J. Materials Chem.* **17**, 4079 (2007).
10. Y. Wan, W. Chen, J. Yang, et al., *Biomaterials* **24**, 2195 (2003).
11. L. D. Segel, J. M. Minten, and F. K. Schweighardt, *Am. J. Physiol.* **263**, 730 (1992).
12. A. C. Allison and N. E. Byars, *J. Immunol. Methods* **95**, 157 (1986).
13. R. Hunter, F. Strickland, and F. Kezdy, *J. Immunol.* **127**, 1244 (1981).
14. D. A. Howerton, R. L. Hunter, H. K. Ziegler, et al., *J. Immunol.* **144**, 1578 (1990).
15. P. Alexandridis, V. Athanassiou, S. Fukuda, et al., *Langmuir* **10**, 2604 (1994).
16. G. Wanka, H. Hoffman, and W. Ulbricht, *Macromolecules* **27**, 4145 (1994).
17. R. Vasita, G. Mani, C. Agrawal, et al., *Polymer* **51** (16), 3706 (2010).
18. I. R. Schmolka, in *Polymers for Controlled Drug Delivery*, Ed. by P. J. Tarcha (CRC Press, Boca Raton, 1991), pp. 189–214.
19. H. Jeffery, S. S. Davis, and D. T. O'Hagan, *Pharmaceut. Res.* **10** (3), 362 (1993).
20. H. Yagi, A. Soto-Gutierrez, N. Navarro-Alvarez, et al., *Molec. Therapy* **18** (10), 1857 (2010).
21. A. E. Zhirnov, T. V. Demina, O. O. Krylova, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1720** (1–2), 73 (2005).
22. R. Vasita and D. S. Katti, *J. Nanomedicine* **7**, 61 (2012).
23. T. J. Barnes and C. A. Prestidge, *Langmuir* **16**, 4116 (2000).
24. V. Zhalimov, A. Sklifas, V. Kaptsov, et al., *Colloid Polymer Sci.* **296** (2), 251 (2018).

The Effect of Polyoxyethylene–Polyoxypropylene Triblock Copolymers on the Loading Amount of Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Copolymer-based Microparticles Coupled with Chlorine e_6 or Ethidium Bromide into Mesenchymal Stem Cells

A.A. Temnov* ** ***, A.N. Sklifas*, N.I. Kukushkin*, S.P. Krechetov**, E.V. Gorina**, T.A. Astrelina***, D.Yu. Usupzhanova***, Yu.B. Suchkova***, I.V. Kobzeva***, and A.S. Samoilov***

**Institute of Cell Biophysics – Division of Federal Research Center
“Pushchino Scientific Center of Biological Investigations” of the Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology (State University),
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

****Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia,
ul. Marshala Novikova 23, Moscow, 123098 Russia*

In this study we investigated the effect of different polyoxyethylene–polyoxypropylene triblock copolymers, their concentrations and the way of influence on the loading of poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer-based microparticles coupled with drugs, radachlorine (chlorine e_6) or ethidium bromide, into mesenchymal stem cells. It is shown that drugs encapsulated in microparticles affect the loading of these particles into the cytoplasm of mesenchymal stem cells. The number of cells that have entrapped particles loaded with chlorine e_6 in the control is approximately twice as low as that in the experiments with ethidium bromide. Pretreatment of microparticles with triblock copolymers makes their loading into cells more efficient as compared to the situation when triblock copolymers and particles are simultaneously added into the growth medium. Treatment of ethidium bromide-coupled microparticles with triblock copolymers has no effect on their entrapment by mesenchymal stem cells as compared to the control. Pluronic 123 is an exception: treatment of particles with this compound at concentrations of 1 or 2%, the loading of particles into the cells increases by a factor of 11 and 5, respectively, as compared to the control. Pretreatment of particles coupled with chlorine e_6 with 4% of triblock copolymers is the most efficient procedure; the loading of the pretreated particles into cells increases by a factor of approximately 3 to 11.

Keywords: mesenchymal stem cells, microparticles of poly(lactic-co glycolic acid) copolymers, triblock copolymers, adsorption, chlorine e_6 , ethidium bromide