

УДК 57.021

Липофильное пролекарство метотрексата в мембране липосом усиливает их фагоцитоз в крови человека

Д. С. Третьякова¹, С. В. Хайдуков¹, А. А. Бабаянц², И. С. Фролова², О. Н. Щегловитова², Н. Р. Онищенко¹, Е. Л. Водовозова^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

*E-mail: elvod@lipids.ibch.ru

Поступила в редакцию 27.07.2019

Принята к печати 17.02.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10946

РЕФЕРАТ Ранее нами было показано, что включение метотрексата (MTX) в виде липофильного пролекарства (MTXDG) в липидный бислой 100-нм липосом, сформированных на основе яичного фосфатидилхолина, позволяет уменьшить токсичность и увеличить противоопухолевую эффективность MTX в модели лейкоемического варианта Т-клеточной лимфомы мышей. Однако в тестах на гемосовместимость *in vitro* MTX-липосомы активировали систему комплемента, очевидно, за счет связывания на поверхности и фрагментации компонента С3. В данной работе изучено взаимодействие MTX-липосом, несущих в бислой стабилизирующие молекулы – фосфатидилинозит (PI), ганглиозид GM₁ или липидный конъюгат N-карбоксиметилированного олигоглицина (CMG), – с субпопуляциями лейкоцитов крови человека. Меченные BODIPY-фосфатидилхолином липосомы инкубировали с цельной кровью (30 мин и 1 ч, 37°C), лизировали эритроциты гипотоническим буфером, тушили флуоресценцию связанных, но не поглощенных лейкоцитами липосом кристаллическим фиолетовым и анализировали суспензии клеток проточной цитометрией. Показано, что включение MTXDG резко усиливает фагоцитоз липосом любого состава моноцитами. Нейтрофилы поглощают гораздо меньше липосом. Лимфоциты не аккумулируют липосомы. Введение PI в MTX-липосомы практически не влияет на удельный уровень их поглощения моноцитами, а CMG скорее повышает его независимо от присутствия MTXDG. Ганглиозид GM₁ предположительно экранирует MTX-липосомы от фагоцитоза одной популяцией моноцитов, но увеличивает эффективность поглощения моноцитами другой популяции, вероятно, с повышенной экспрессией рецепторов к фрагментам С3b (последние обнаружены на липосомах после инкубации с плазмой крови). Показано, что MTX-липосомы по-разному влияют на продукцию TNF-α активированными лейкоцитами в зависимости от структуры стабилизирующих молекул.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА лейкоциты, липосомы, липофильное пролекарство, метотрексат, фагоцитоз, цитофлуориметрия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ MTX – метотрексат; MTXDG – сложноэфирный конъюгат MTX и 1,2-рас-диолеоилглицерина; СК – система комплемента; ePC – яичный фосфатидилхолин; PI – фосфатидилинозит; CMGPE – конъюгат фосфатидилэтаноламина с N-карбоксиметилированным олигоглицином; TMB-PC – 1,3,5,7-тетраметил-BODIPY-меченый фосфатидилхолин; PNA – фитогемагглютинин; L – липосомы из ePC; L-MTXDG – липосомы состава ePC-MTXDG, 9:1; L-MTXDG-PI – липосомы состава ePC-MTXDG-PI, 8:1:1; L-MTXDG-CMG – липосомы состава ePC-MTXDG-CMGPE, 8:1:1; L-MTXDG-GM₁ – липосомы состава ePC-MTXDG-GM₁, 8:1:1.

ВВЕДЕНИЕ

Цитостатический агент метотрексат (MTX) зарегистрирован Всемирной организацией здравоохранения в списке важнейших лекарственных средств (World Health Organization's List of Essential Medicines) [1]. MTX – антиметаболит фолиевой кислоты – широко применяется в терапии солидных опухолей, гемато-

логических злокачественных заболеваний и аутоиммунных патологий, таких, как ревматоидный артрит, где он остается «лекарством номер один» [2, 3]. Однако применение MTX ограничивается как его высокой общей токсичностью, так и развитием клеточной устойчивости, связанной, главным образом, с нарушением транспорта MTX в клетку за счет мутаций и пониже-

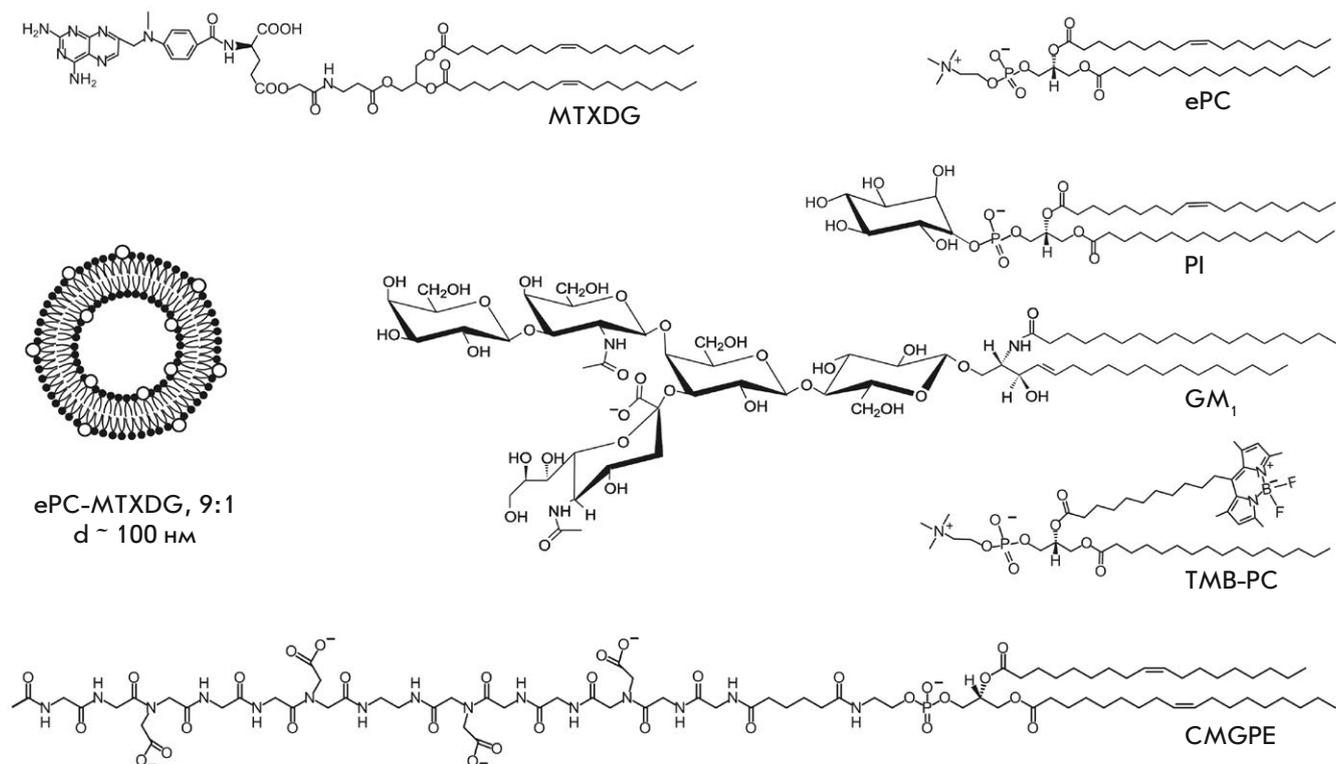


Рис. 1. Схематическое изображение липосомы, нагруженной липофильным пролекарством метотрексата (MTXDG), и химические структуры компонентов липосом: пептидолипида CMGPE, BODIPY-фосфатидилхолина TMB-PC. Приведены репрезентативные структуры яичного фосфатидилхолина ePC, соевого фосфатидилинозита PI и ганглиозида GM₁ из мозга быка

ния активности белка-транспортера восстановленного фолата и аналогов-антифолатов (reduced-folate carrier, RFC) [3, 4]. Пассивный трансмембранный перенос полярной молекулы МТХ затруднен. Преодолеть этот барьер и улучшить фармакологические свойства МТХ можно путем инкапсулирования его в наноразмерный носитель, который защитит лекарство от преждевременных взаимодействий с биомолекулами в кровотоке и доставит в клетку за счет пиноцитоза. В последнее десятилетие интенсивно исследуются наноразмерные системы доставки МТХ, в том числе полиамидные дендримеры, полимерные наногели, нанокapsулы из триглицеридов и сурфактантов и др. [5–8]. Наиболее перспективными для системного введения в организм признаны конъюгаты МТХ с сывороточным альбумином и липосомы [5]. Так, внутривенные инъекции пегилированных (т.е. покрытых полиэтиленгликолем, ПЭГ) и несущих адресный пептид липосом с инкапсулированным МТХ значительно улучшили состояние мышечной ткани с экспериментальным энцефаломиелиитом [8]. Однако уровень содержания лекарства (загрузка) в большинстве из приведенных наноразмерных систем весьма невысок. В то же время при онкологических заболеваниях требуются в несколько раз большие дозы МТХ (даже в режиме низкодозовой терапии), чем в случае противовоспалительной терапии.

Метотрексат невозможно инкапсулировать в наноразмерные липосомы с помощью активной загрузки (remote loading technique), эффективного метода, применяемого для слабых амфипатических кислот или оснований, например антибиотиков антрациклинового ряда типа доксорубина [9]. В случае пассивного инкапсулирования загрузка липосомы диаметром 100 нм водорастворимым лекарством не превышает 2–3 мол.% от общих липидов. Нами разработаны липосомы, несущие 10 мол.% МТХ в форме липофильного пролекарства – диолеилглицеридного сложноэфирного конъюгата по α-СООН глутаматного остатка (MTXDG, рис. 1) – в липидном бислое из природных фосфолипидов [10]. В культуре RFC-дефицитных Т-лимфобластоидных клеток такие МТХ-липосомы преодолевали резистентность к МТХ [11]. В мышечной модели острого лейкоемического варианта Т-клеточной лимфомы МТХ-липосомы ингибировали рост опухоли эффективнее, чем интактный МТХ, и были менее токсичными [12].

Благодаря исключительной био- и гемосовместимости, липосомы стали первыми системами доставки лекарств в клинической практике [13–15]. Однако введенные в кровоток липосомы, как и другие частицы, близкие по размеру к вирусам, контактируют, в первую очередь, с лейкоцитами и подвергаются

фагоцитозу [16, 17]. Преждевременное выведение лекарств из кровотока миелоидными клетками – главный барьер на пути их доставки наночастицами к целевым органам и тканям. Для стабилизации наноразмерных липосом в кровотоке разработан способ экранирования высокогидрофильными цепями ПЭГ [18]. Однако оказалось, что пегилирование, как и покрытие другими полимерами, не препятствует неспецифическому связыванию белков и может вызывать инфузионные реакции различной степени тяжести, вплоть до анафилактического шока, связанные с активацией системы комплемента (СК) [19–22]. Белковая корона – комплексный слой белков и липопротеинов – образуется в течение нескольких секунд при контакте наночастиц, в том числе липосом, с плазмой крови [23, 24]. Опсонизация наночастиц белками СК способствует его распознаванию рецепторами иммунокомпетентных клеток.

В функциональных тестах на гемосовместимость липосомы, нагруженные МТХДГ, не влияли на основные форменные элементы крови человека – эритроциты и тромбоциты, однако они вызывали умеренные нарушения в системе коагуляции крови и активировали СК [25]. Действительно, после инкубации МТХ-липосом в плазме наблюдалась фрагментация белка С3, центрального компонента СК, что свидетельствует об активации каскада СК [26, 27]. Липосомы аналогичного фосфолипидного состава, несущие в бислой диглицеридный конъюгат другого цитотоксического агента – мелфалана, такие эффекты не вызывали [25–27]. То есть свойства поверхности липосом влияют на состав (и количество) связываемых белков плазмы, что обуславливает инертность липосом в кровотоке либо их потенциальную способность вызывать инфузионные реакции. В данной работе с помощью проточной цитометрии мы исследовали влияние амфифильных экранирующих молекул (рис. 1), отличных от липидных конъюгатов ПЭГ, в мембране МТХ-липосом на взаимодействие с субпопуляциями лейкоцитов цельной крови человека. Поскольку это взаимодействие опосредовано, в первую очередь, компонентами СК и иммуноглобулинами класса G, мы сравнили уровни связывания белка С3 и IgG липосомами различного состава. Кроме того, на примере показателя продукции провоспалительного цитокина TNF- α изучено влияние состава липосом на проявления врожденного иммунитета.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Диглицеридный конъюгат метотрексата МТХДГ синтезировали как описано [28]. Использовали фосфатидилхолин из яичного желтка (ePC) производства

Lipoid GmbH (Heidelberg, Германия); фосфатидилинозит-сырец из сои (PI), предоставленный фирмой Lipoid, очищали колоночной хроматографией. 1,3,5,7-Тетраметил-ВODIPY-меченый фосфатидилхолин (ТМВ-РС) синтезирован [29] и любезно предоставлен И.А. Болдыревым (ИБХ РАН). Конъюгат фосфолипида с карбоксиметилированным олигоглицином (СМГРЕ) синтезирован и любезно предоставлен А.Б. Тузиковым (ИБХ РАН), ганглиозид GM₁ выделен из мозга крупного рогатого скота и любезно предоставлен И.И. Михалевым (ИБХ РАН). Использовали сефарозу CL-4В (Pharmacia, США), этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), остальные реагенты были производства фирм Sigma и Flow Laboratories (США). Растворители очищали стандартными методами; упаривание проводили в вакууме при температуре не выше 40°C. Готовили буферы на бидистиллированной воде (H₂O_{dd}): PBS – фосфатно-солевой буфер (KH₂PO₄, 0,2 г/л; NaH₂PO₄ × 2H₂O, 0,15 г/л; Na₂HPO₄, 1,0 г/л; KCl, 0,2 г/л; NaCl, 8,0 г/л) с 1 мМ EDTA, рН 7,4; лизирующий буфер (NH₄Cl, 155 мМ; NaHCO₃, 12 мМ; EDTA, 0,1 мМ).

Образцы крови здоровых доноров-волонтеров собирали в пробирки над гепарином лития в качестве антикоагулянта (Vacuette, Greiner Bio-One, Германия) и хранили в темноте при температуре 20–22°C не более 8 ч.

Получение липосом

Липосомы (моноламеллярные везикулы) получали методом экструзии как описано ранее [11, 12, 26, 27]. Смеси фосфолипидов, МТХДГ и других компонентов мембран в требуемых соотношениях упаривали в круглодонных пробирках из растворов в хлороформе-метаноле (2 : 1) на роторном испарителе и выдерживали в течение 40 мин при 7 Па (лиофильная сушилка «ИНЕЙ-4»; ИБП РАН, Россия). Составы липидных пленок (мол./мол.) были следующие: ePC–МТХДГ 9 : 1; ePC–МТХДГ–PI 8 : 1 : 1; ePC–МТХДГ–GM₁ 8 : 1 : 1, ePC–МТХДГ–СМГРЕ 8 : 1 : 1, а также «пустые» образцы ePC, ePC–PI 9 : 1; ePC–GM₁ 9 : 1, ePC–СМГРЕ 9 : 1. Все композиции содержали также 1 мол. % ТМВ-РС. Липидные пленки гидратировали в течение 2 ч при комнатной температуре в 0,3 мл PBS, встряхивали для получения суспензии, затем подвергали 10-кратной процедуре замораживания–оттаивания (жидкий азот – +40°C) и продавливали 10 раз через поликарбонатные мембранные фильтры (Nucleopore, США) с размером пор 100 нм с помощью установки Mini-extruder от Avanti Polar Lipids (США). Концентрацию МТХДГ в дисперсиях липосом определяли спектрофотометрически после разрушения липосом 20-кратным разбавлением в этаноле ($\lambda_{\text{max}} = 302 \text{ нм}$, $\epsilon \sim 25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Размеры липо-

сом контролировали на установке Brookhaven Particle Analyzer 90+ (Brookhaven Instruments Corp., США; гелий-неоновый лазер, $\lambda = 633$ нм, угол 90°), диаметр МТХ-липосом 100–110 нм.

Инкубации липосом с цельной кровью, подготовка образцов для цитометрии

К 100 мкл цельной крови добавляли аликвоту 5 мкл образца 10 мМ липосом, перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30 и 60 мин. В качестве контроля к 100 мкл цельной крови добавляли 5 мкл PBS. После инкубации образцы разбавляли 3 мл холодного PBS ($+4^\circ\text{C}$) для остановки фагоцитоза, интенсивно перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 250 g. Супернатант отбрасывали, добавляли 1 мл холодного лизирующего буфера ($+4^\circ\text{C}$), перемешивали и оставляли на 1 ч в темноте при $+4^\circ\text{C}$ и периодическом перемешивании. Непосредственно перед измерениями для тушения флуоресценции на клеточной поверхности добавляли аликвоту водного раствора кристаллического фиолетового до конечной концентрации 0.1 мг/мл и интенсивно перемешивали. Образцы готовили в двух повторах.

Цитометрия

Измерения окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). На основании предварительных экспериментов был стандартизирован протокол исследования, который включал стандартный выбор зоны анализа, чувствительность по флуоресценции (напряжение на ФЭУ) и напряжение по каналам светорассеяния. Данный протокол был использован в дальнейшем во всех экспериментах, проведенных на крови различных доноров. На основании контрольных экспериментов при инкубации 0 мин границы позитивных и негативных клеток выделялись на гистограмме распределения клеток по флуоресценции таким образом, чтобы основной пул негативных клеток оставался в первой декаде логарифмической шкалы. Целевые популяции лейкоцитов периферической крови (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) выявляли путем введения логических ограничений в гистограммы распределения клеток по малоугловому (forward scatter) и боковому (side scatter) светорассеянию с использованием стандартных критериев FACS-анализа [30], затем по отдельности анализировали на гистограммах по флуоресценции не менее 10^5 клеток. В контрольном эксперименте показано, что выявление субпопуляций клеток по морфологическим параметрам дает те же результаты, что и окрашивание маркером лейкоцитов CD45. Полученные данные обрабатывали с помощью программного пакета CXP analysis (Beckman Coulter, США).

Инкубации липосом с плазмой и выделение липосом-белковых комплексов

Плазму отделяли от цельной крови центрифугированием в течение 10 мин при 2000 g (Jouan BR4i, Thermo Fisher Scientific, США). Надосадочные жидкости переносили в свежие пробирки, остатки тромбоцитов и других клеток отделяли центрифугированием (30 мин при 2000 об/мин) при комнатной температуре (Sorvall RT 7 Plus, Thermo Fisher Scientific, США). Супернатанты объединяли, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Липосомы (90 мкл) инкубировали с 360 мкл плазмы, однократно размороженной непосредственно перед инкубацией, при 37°C и слабом перемешивании в пробирках Eppendorf (Германия) (1.5 мл, 15 мин), если не указано другого. В качестве отрицательного контроля готовили образец плазмы с PBS (4 : 1). Смесь наносили на колонку с сефарозой CL 4B ($\sim 1.1 \times 19$ см) и элюировали PBS, собирая фракции по ~ 400 мкл. К аликвотам фракций (80 мкл) добавляли 400 мкл EtOH, центрифугировали в течение 10 мин при 9000 g (11000 об/мин, центрифуга Eppendorf) и спектрофотометрически анализировали содержание МТХДГ в супернатантах. Параллельно 100 мкл каждой фракции отбирали для определения количества белка. Выделение липосом-белковых комплексов из каждого образца липосом проводили по меньшей мере дважды.

Белок определяли с помощью модифицированного метода Лоури [31]. Реагент С готовили непосредственно перед использованием: к реагенту А (2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 + 0.4\% \text{NaOH} + 0.26\% \text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 + 1\% \text{SDS}$ в $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$) добавляли реагент В (4% раствор CuSO_4 в $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$), 100 : 1 (v/v). К 100 мкл анализируемого раствора добавляли 300 мкл реагента С, перемешивали и через 10 мин добавляли 30 мкл реактива Фолина, разбавленного $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ 1 : 1. Через 60 мин измеряли оптическую плотность при 660 нм. Содержание белка в образцах определяли по калибровочному графику. Контрольный образец содержал 100 мкл PBS.

Делипидизация объединенных белковых фракций и электрофорез в ПААГ

Делипидизацию проводили как описано в работе [32]. К 100 мкл объединенных фракций липосом-белковых комплексов добавляли 400 мкл охлажденного MeOH, перемешивали, центрифугировали 3 мин при 9000 g. К раствору добавляли 200 мкл CHCl_3 , встряхивали на шейкере, центрифугировали в течение 3 мин при 9000 g. После добавления к смеси 300 мкл $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, встряхивания и центрифугирования (4 мин при 9000 g) наблюдалось расслоение фаз, белок концентрировался на интерфазе. Отбрасывали ~ 700 мкл верхней фазы. К остатку добавляли еще 300 мкл MeOH, перемешивали и центрифугировали

в течение 4 мин при 9000 *g*. Супернатант декантировали, оставляя ~30–50 мкл, которые упаривали до суха на роторном испарителе. К образцам добавляли по 36 мкл двукратного восстанавливающего буфера (0.075 М Tris-HCl, pH 6.8, 10% глицерин, 2% SDS, 5% β-меркаптоэтанола, 0.01% бромфенолового синего), перемешивали и выдерживали на водяной бане (90–95°C) 2 × 2 мин, активно перемешивая. Электрофорез по Лэммли [33] проводили в 6% концентрирующем и 12% разделяющем геле на установке Helicon VE-2M (Россия): предфорез – 6 мин, 10 мА; концентрирование – 20 мин, 18 мА; разделение – 40 мин, 28 мА. Белки визуализировали серебряным окрашиванием [34]. Электрофореграммы анализировали с помощью программы ImageJ. Для соотношения молекулярных масс белковых полос использовали набор Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, США).

Иммуноблотинг

Белки на поливинилиденфторидную мембрану Immobilon-P (Merck Millipore, Германия) переносили с помощью прибора для полусухого переноса (Semi-dry; Helicon, Россия) в течение 30–40 мин при напряжении 35 В. После окончания переноса ополаскивали мембрану H₂O_{dd}, промывали буфером TBS (NaCl, 4.39 г; Tris, 3.03 г; H₂O_{dd}, 500 мл), pH 8.0, и для предотвращения неспецифической сорбции мембрану инкубировали в 5% суспензии обезжиренного сухого молока в буфере TBS, содержащем 0.1% Tween 20 (TBS/T), в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембрану промывали буфером TBS/T (3 × 5 мин) и инкубировали с первичными антителами к компоненту C3 СК человека (козьи антитела, ComplementTech, США) или с антителами к иммуноглобулинам класса G человека, конъюгированными с пероксидазой хрена (козьи антитела, Santa Cruz Biotechnology, США) в 0.5% растворе бычьего сывороточного альбумина в течение ночи при 4°C. Мембрану промывали буфером TBS/T (15 мин и 3 × 5 мин), в случае блотинга с анти-C3-антителами инкубировали со вторичными IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (антитела кролика к козьим IgG, Jackson ImmunoResearch, США), затем снова промывали мембрану буфером TBS/T (15 мин, 2 × 5 мин) и 1 раз буфером TBS 5 мин. Иммунодетекцию осуществляли с помощью реагента Clarity™ ECL Western Blotting Substrate (Bio-Rad, США) и системы VersaDoc 4000 (Bio-Rad).

Тестирование продукции фактора некроза опухоли альфа (TNF-α) активированными лейкоцитами

Кровь доноров разводили средой RPMI-1640 (Gibco) до конечной концентрации лейкоцитов 1 × 10⁶ /мл

и вносили в 24-луночные планшеты по 0.9 мл суспензии. Лейкоциты активировали фитогемагглютинином (РНА) (Sigma), внося в лунки по 100 мкл раствора до конечной концентрации 10 мкг/мл. В контрольные лунки с клетками вносили 100 мкл среды RPMI-1640. После 4 ч экспозиции в клеточном инкубаторе при 36.8°C и 5% CO₂ в лунки вносили по 50 мкл растворов метотрексата до конечной концентрации 50 мкМ, МТХ-липосом до конечной концентрации МТХDG 50 мкМ и липосом без МТХDG до конечной концентрации липидов, как и в лунках с МТХ-липосомами, 500 мкМ. В лунки контроля РНА и в контрольные лунки с клетками вносили по 50 мкл PBS. После экспозиции в CO₂-инкубаторе в течение 4 ч отбирали пробы культуральной среды, которые хранили при –30°C для последующего тестирования. Содержание TNF-α в образцах определяли иммуноферментным анализом в тест-системе фирмы «ВекторБест» (Россия) в соответствии с инструкцией. Результаты двух независимых экспериментов, каждый в двух повторах, анализировали с помощью фотометра для микропланшетов Anthos 2020 (Biochrom Ltd, Cambridge, Великобритания) при длине волны 540 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве компонентов, обладающих способностью экранировать мембрану от опсонизации, в МТХ-липосомы встраивали фосфатидилинозит, ганглиозид GM₁ или конъюгат фосфолипида с карбоксиметилированным олигоглицерином (CMGPE) (рис. 1). Согласно [35], включение фосфатидилинозита (PI) в бислою уменьшало захват липосом клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Такой эффект можно объяснить отрицательным зарядом фосфолипида с относительно крупной головной группой, а также стерическими препятствиями, которые создают высокогидратированные остатки миоинозита на поверхности липосом [36]. Ганглиозид GM₁ в липосомах увеличивал время циркуляции в кровотоке еще больше, чем PI, благодаря объемистому и жесткому отрицательно заряженному остатку пентасахаридов [37]. В наших экспериментах липосомы с диглицеридным конъюгатом мелфалана, содержащие в мембране из яичного фосфатидилхолина указанные природные липиды или новое соединение CMGPE, оказались значительно более стабильными в плазме крови, чем аналогичные липосомы с ПЭГ-липидом [38].

Применение цитометрии для исследования взаимодействия липосом с субпопуляциями лейкоцитов крови описано лишь в нескольких публикациях [39–42], причем в работах [41] и [42] липосомы инкубировали с выделенными нейтрофилами или мононуклеарами соответственно, а не с цельной кровью.

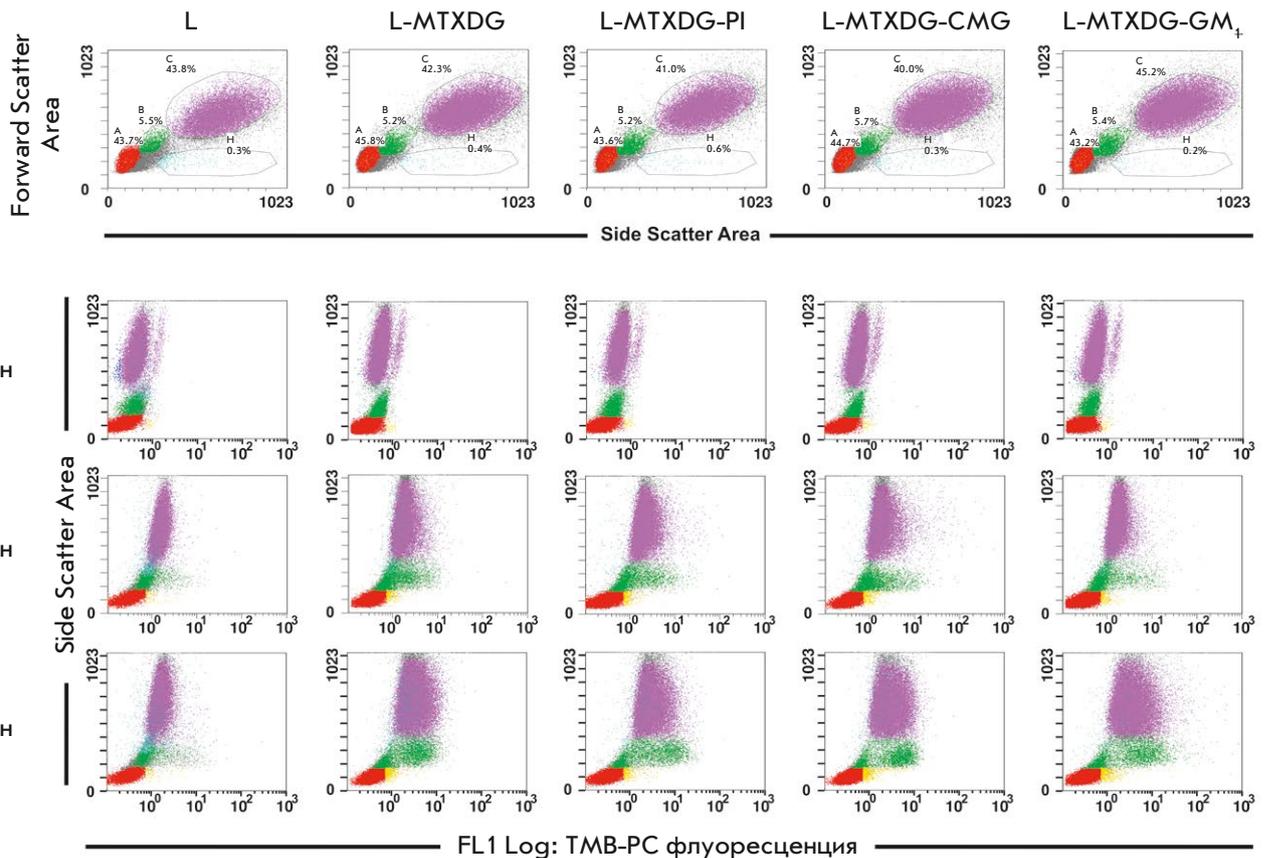


Рис. 2. Гистограммы FACS-анализа образцов крови после инкубации с липосомами и лизиса эритроцитов. Верхняя панель: распределение клеток периферической крови в образцах без липосом, А – лимфоциты, В – моноциты, С – нейтрофилы, внизу выделена область мертвых клеток. Панели 0, 30, 60 мин: флуоресценция фагоцитированных липосом, «гейтированная» по субпопуляциям лейкоцитов после инкубаций 0, 30, 60 мин (добавлен тушитель флуоресценции адсорбированных клетками липосом; желтые зоны – клетки с неполностью затухнувшей флуоресценцией липосом на поверхности). TMB-PC липосомы следующих составов: только из ePC (образец L) и MTX-липосомы ePC-MTXDG 9 : 1 (образец L-MTXDG), ePC-MTXDG-PI 8 : 1 : 1 (образец L-MTXDG-PI), ePC-MTXDG-CMGPE 8 : 1 : 1 (образец L-MTXDG-CMG), ePC-MTXDG-GM₁ 8 : 1 : 1 (образец L-MTXDG-GM₁).

В [39] кровь инкубировали с «твердофазными» пегилированными липосомами в течение 3 ч, тогда как в [40] – 5 ч, затем эритроциты лизировали в гипотоническом буфере и проводили FACS-анализ, детектируя суммарную флуоресценцию связанных и поглощенных клетками липосом. В нашем случае протокол инкубаций был изменен. Для исключения из регистрации адсорбированных, но не фагоцитированных клетками липосом использован тушитель флуоресценции – витальный краситель фиолетовый кристаллический [43]. Критическими стадиями дизайна эксперимента стали подбор времени инкубации и условий для лизиса эритроцитов при сохранении целостности нейтрофилов. С учетом времени, необходимого для подготовки пробы перед цитометрией (после инкубаций липосом с кровью), и времени хранения цельной крови не более 8 ч, в одном эксперименте можно было проанализировать не более трех вариантов липосом, каждый в двух повторах.

На рис. 2 представлены репрезентативные гистограммы FACS-анализа поглощения субпопуляциями лейкоцитов крови меченных TMB-PC липосом различного состава. Образцы донорской крови получены с интервалом в один день, количество клеток в субпопуляциях слегка варьирует.

Очевидно, что лимфоциты не аккумулируют липосомы, что соответствует отсутствию у этих клеток способности к фагоцитированию и согласуется с современными представлениями о том, что основное количество наночастиц в кровотоке фагоцитируется моноцитами и нейтрофилами [17, 39, 40]. Небольшая популяция клеток (0.6–1.3%), выделенная на гистограмме в зоне нейтрофилов (рис. 2, панель 0 мин) представлена эозинофилами, которые не являются профессиональными фагоцитами, хотя и способны поглощать мелкие частицы и клетки (микрофагоцитоз), а следовательно, и липосомы. Однако содержание эозинофилов в крови столь мало, что их вклад

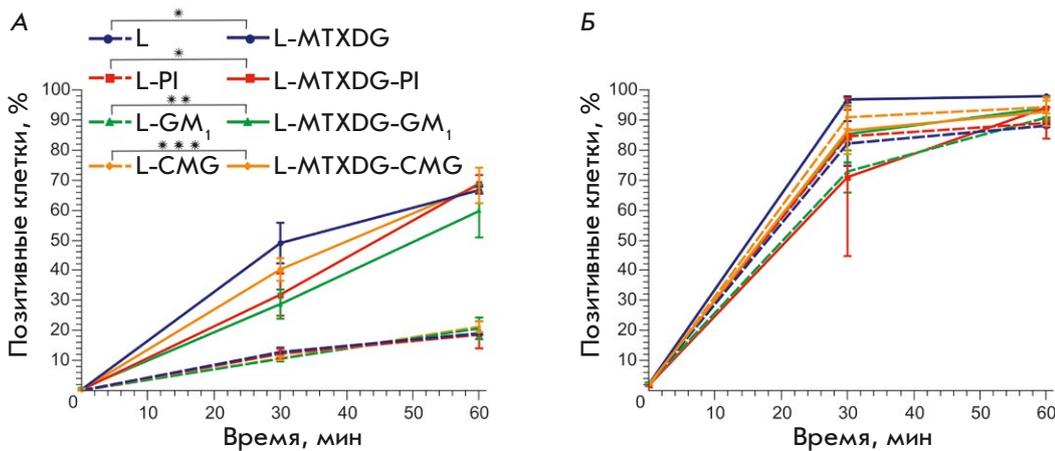


Рис. 3. Кинетика поглощения липосом моноцитами (А) и нейтрофилами (Б) цельной крови человека *ex vivo*. Приведены средние значения \pm SE двух независимых экспериментов, каждый в двух повторах; значения * $p < 0.04$, ** $p < 0.02$, *** $p = 0.002$ приведены для данных, полученных после 30 мин инкубации

в поглощение липосом на фоне основных популяций фагоцитов пренебрежимо мал. На рис. 3 результаты FACS-анализа представлены в виде кинетики роста процента клеток, поглотивших липосомы в течение 1 ч инкубации. С учетом разброса данных в повторях (примерно 10%) можно сделать вывод, что МТХ-липосомы быстрее накапливаются в моноцитах, чем липосомы без пролекарства, вне зависимости от наличия тех или иных защитных амфифильных молекул. То есть молекулы МТХДГ в мембране способствуют ускорению поглощения липосом популяцией моноцитов. При введении в мембрану пептидолипида, PI или ганглиозида GM₁ намечается тенденция к замедлению фагоцитоза МТХ-липосом моноцитами (рис. 3). Но к 60 мин все различия между образцами МТХ-липосом нивелируются, в их фагоцитозе участвуют примерно 60–70% моноцитов и около 98% нейтрофилов. При этом интенсивность поглощения липосом нейтрофилами (средняя интенсивность флуоресценции, X-mean) значительно ниже, чем моноцитами (рис. 4): с учетом примерно в 7 раз большей численности популяции нейтрофилов каждая клетка поглощает примерно в 15 раз меньше липосом, чем моноцит. Низкий уровень фагоцитоза и быстрый выход нейтрофилов на насыщение липосомами можно связать с тем, что ведущая роль этих клеток состоит в защите от бактериальных, но не вирусных инфекций [44] (липосомы по размерам сравнимы с вирусными частицами).

Эндоцитоз липосом фагоцитами крови опосредуют рецепторы белков плазмы, ассоциированных с липосомами. Основными рецепторами для захвата липосом считаются рецепторы к константным областям иммуноглобулинов класса G (FcγR I–III) и рецепторы компонентов системы комплемента C3b и iC3b (CR1 и CR3 соответственно) [24]. Нами установлено [26, 27], что компонент C3b на поверхности липосом без МТХДГ не детектируется при иммуноблоттинге, т.е. его количество ничтожно мало, в то время

как в случае МТХ-липосом (L-MTXDG-PI) наблюдались полосы его фрагментов. Эти данные и различный уровень поглощения клетками МТХ-липосом и липосом без пролекарства (при инкубации 60 мин, рис. 4, кроме CMG-липосом) согласуются с данными [24] о поглощении липосом моноцитами через узнавание опсонин на поверхности липидного бислоя.

Анализ средней интенсивности флуоресценции поглощенных липосом для позитивных популяций моноцитов и нейтрофилов (рис. 4) позволяет также сделать следующие выводы. Наличие CMG (независимо от присутствия пролекарства) способствовало интернализации моноцитами. Нейтрофилы, в целом, имеют тенденцию к более активному фагоцитозу липосом с пролекарством клетками независимо от присутствия амфифила в бислое.

Неожиданные свойства обнаружены у МТХ-липосом с ганглиозидом GM₁. Несмотря на то что через 30 мин большее число моноцитов поглощает МТХ-липосомы без амфифилов, чем МТХ-липосомы с GM₁ (рис. 3), средняя интенсивность флуоресценции больше у моноцитов с липосомами L-MTXDG-GM₁, чем с липосомами без ганглиозида L-MTXDG как через 30, так и через 60 мин инкубации (рис. 4). При том, что само присутствие GM₁ не приводило к более интенсивному фагоцитозу липосом моноцитами, моноциты поглотили больше липосом с сочетанием пролекарства и ганглиозида в бислое, чем любых других. Можно предположить, что в данном случае рецепторы моноцитов распознают молекулы ганглиозида GM₁ либо белков плазмы, ассоциированных с данными липосомами.

Мы решили сравнить связывание МТХ-липосомами, содержащими различные экранирующие молекулы, компонента C3 и продуктов его расщепления в плазме. Для этого препараты липосом инкубировали в течение 15 мин в 80% плазме крови (как и при изучении гемосовместимости, когда было показано влияние МТХ-липосом на СК [25]). Затем с использованием

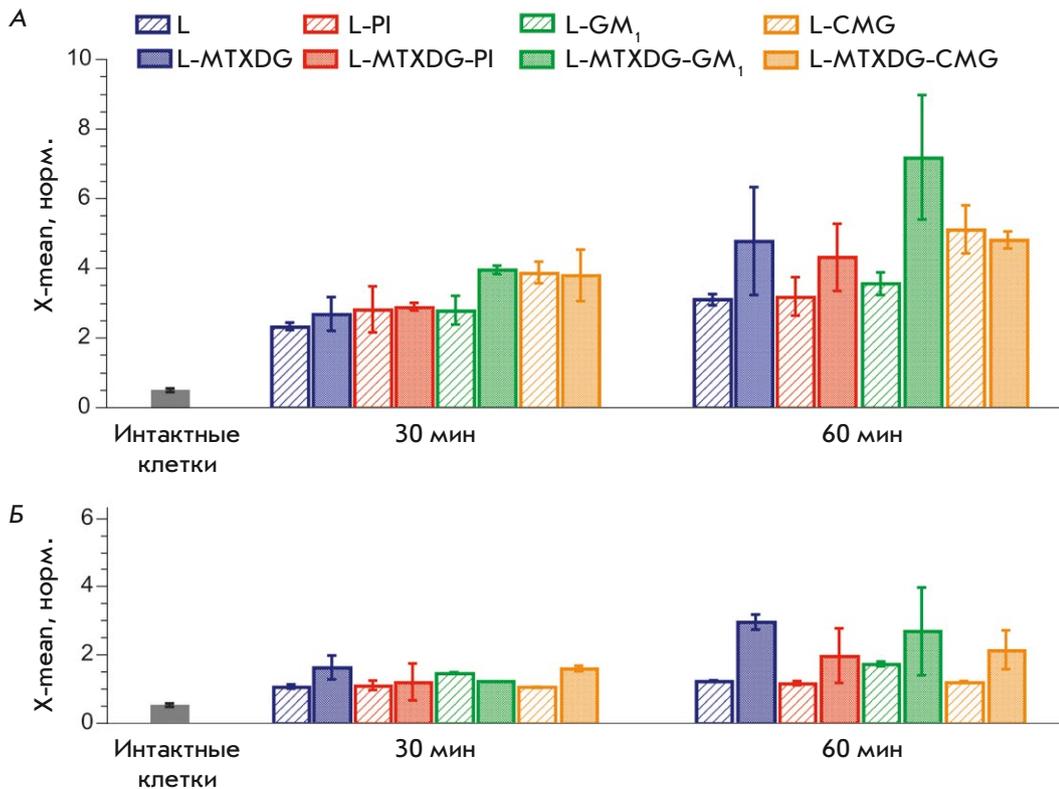


Рис. 4. Средняя интенсивность флуоресценции (X-mean) поглощенных липосом для позитивных популяций моноцитов (А) и нейтрофилов (Б). Приведены средние значения \pm SE двух независимых экспериментов, каждый в двух повторах

гель-хроматографии на сефарозе выделяли фракции, содержащие липосомы, и определяли в них суммарное количество белка. В качестве контроля эффективности отделения липосом-белковых комплексов от основного количества не связавшихся белков плазмы использовали образцы плазмы, проинкубированные с PBS. Методом иммуноблотинга с антителами к белку С3 (рис. 5А) установлено, что МТХ-липосомы с ганглиозидом GM_1 и пептидолипидом СМГ вызывают значительную фрагментацию этого компонента СК с образованием продуктов расщепления С3b. В случае липосом L-MTXDG-PI и L-MTXDG количество связанного С3 и продуктов его расщепления заметно меньше. Сопоставление с данными цитометрии на 30 мин (рис. 4А) показывает, что именно липосомы L-MTXDG- GM_1 и СМГ-липосомы с примерно одинаковой и наибольшей из всех липосом интенсивностью поглощаются моноцитами. Причем не наблюдается усиления фагоцитоза СМГ-липосом моноцитами за счет присутствия в мембране МТХДГ, в отличие от GM_1 -липосом (рис. 4А). Очевидно, именно остаток СМГ определяет взаимодействие с белками (и последующее взаимодействие с моноцитами), поскольку в силу своей структуры он экспонирован над поверхностью липосом в большей степени, чем остаток МТХ.

Иммуноблотинг с антителами к IgG (рис. 5Б) не выявил различий между вариантами липосом, причем уровень связывания иммуноглобулинов оказался значительно ниже, чем компонента С3.

Наши результаты показывают, что наличие в мембране липосом пролекарства метотрексата, в целом, усиливает их фагоцитоз как моноцитами, так и нейтрофилами (последние значительно менее активно поглощают липосомы). Введение фосфатидилинозита в МТХ-липосомы практически не влияет на их поглощение, а пептидолипид СМГ скорее способствует накоплению липосом моноцитами. Ганглиозид GM_1 оказывает двойственный эффект. Предполагается, что он экранирует МТХ-липосомы от фагоцитоза одной популяцией моноцитов (отсюда меньшая доля позитивных моноцитов после 30 мин инкубации), но увеличивает эффективность поглощения моноцитами другой популяции, вероятно, с повышенной экспрессией рецепторов к фрагментам С3b, что выражается в повышении средней интенсивности флуоресценции моноцитов. Картина поглощения различных липосом моноцитами и нейтрофилами суммирована в таблице.

Лимфоциты – главные клетки иммунной системы, обеспечивающие гуморальный и клеточный иммунитет – по нашим данным составили примерно 40% всей популяции лейкоцитов крови (рис. 2). Мы не наблюдали поглощения липосом лимфоцитами за 1 ч инкубации с кровью. Более того, согласно [39, 40], через 3–5 ч инкубации лимфоциты также не аккумулировали липосомы (другого состава), причем в цитируемых работах учитывались не только интернализованные липосомы, но и адсорбированные/связанные



Рис. 5. Идентификация белков, ассоциированных с липосомами, с помощью иммуноблотинга с использованием антител к компоненту системы комплемента С3 (А), к иммуноглобулинам класса G (Б): 1 – положительный контроль, плазма в разведении 1/500; 2 – отрицательный контроль, плазма после инкубации с PBS, гель-фильтрации и делипидизации; 3–7 – образцы липосом L (3), L-MTXDG (4), L-MTXDG-PI (5), L-MTXDG-GM₁ (6), L-MTXDG-CMG (7) после 15 мин инкубации с плазмой крови человека, выделения липосом-белковых комплексов и делипидизации

на поверхности клеток. Интересно было проверить, как наши липосомы могут влиять на функционирование лимфоцитов. С учетом того, что МТХ-липосомы предназначены для терапии заболеваний, в том числе онкологических, сопровождающихся воспалительными процессами, нами была выбрана модель активированных лейкоцитов. Влияние липосом на лимфоциты оценивали по изменению уровня выработки фактора некроза опухоли альфа (TNF-α). Лейкоциты крови активировали Т-клеточным митогеном фитогемагглютинином (РНА), который предпочтительно именно в этих клетках индуцирует продукцию цитокина TNF-α (например, [45]). Для активации лейкоцитов разбавленную кровь здоровых доноров инкубировали с РНА в течение 4 ч, а затем добавляли метотрексат либо образцы МТХ-липосом в эквимольных концентрациях (близких к концентрациям в экспериментах с цитометрией) и инкубировали еще 4 ч. Уровень TNF-α в культуральной жидкости определяли с помощью иммуноферментного анализа. Результаты представлены на рис. 6.

Действие цитостатического агента МТХ, как и ожидалось (например, [46]), привело к выраженному подавлению продукции цитокина активированными лейкоцитами (рис. 6). Встраивание

МТХДГ в липосомы из ePC (образец L-MTXDG) привело к ослаблению эффекта метотрексата. Очевидно, МТХ-липосомам необходимо время, чтобы интернализироваться активированными лимфоцитами и претерпеть процессинг для высвобождения МТХ. Действительно, в культуре пролиферирующих Т-лимфобластных клеток цитотоксичность интактного МТХ на порядок превосходила цитотоксичность липосом L-MTXDG-PI через 48 ч инкубации [11]. После введения различных защитных молекул влияние МТХ-липосом на продукцию TNF-α уменьшилось еще больше, причем в разной степени (рис. 6). Так, МТХ-липосомы с фосфатидилинозитом практически не ингибировали продукцию TNF-α, а липосомы L-MTXDG-GM₁ подавляли выработку цитокина, но в меньшей степени, чем МТХ-липосомы без ганглиозида ($p < 0.05$, или примерно на 30% против 60% по сравнению с уровнем продукции TNF-α интактными клетками «контроль»). Средний уровень TNF-α в случае липосом L-MTXDG-CMG был таким же, как и у МТХ-липосом с ганглиозидом, хотя он и не отличался статистически значимо от продукции цитокина контрольными активированными клетками «РНА» (рис. 6). В соответствии с данными блотинга (рис. 5А), полученные результаты объяснимы: МТХ-

Разница в поглощении липосом различного состава субпопуляциями лейкоцитов через 60 мин инкубации с цельной кровью*

Липосомы	Моноциты				Нейтрофилы		
	позитивные клетки, %		X-mean		позитивные клетки, %	X-mean	
	16-20	55-65	3	4-5		≥90	1-2
L	+		+		+	+	
L-PI	+		+		+	+	
L-GM ₁	+		+		+	+	
L-CMG	+			+	+	+	
L-MTXDG		+		+	+		+
L-MTXDG-PI		+		+	+		+
L-MTXDG-GM ₁		+		++	+		+
L-MTXDG-CMG		+		+	+		+

*Суммированы данные рис. 3 и 4. **Среднее значение X-mean 7.

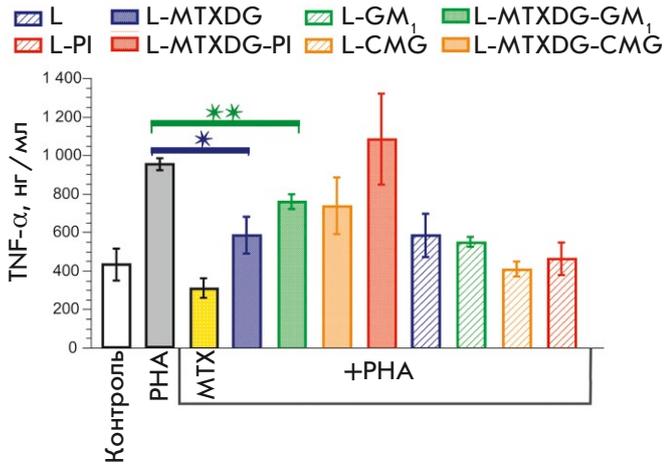


Рис. 6. Влияние метотрексата и липосом на продукцию TNF- α активированными лейкоцитами крови доноров. Приведены средние значения \pm SD двух независимых экспериментов, каждый в двух повторах; * $p < 0.005$, ** $p < 0.0005$

липосомы с GM₁ или CMG несут на поверхности больше белковых лигандов для связывания с рецепторами на лимфоцитах, чем липосомы с фосфатидилинозитом, поэтому они активнее интернализуются и подавляют выработку цитокина. Кроме того, ингибирующий эффект липосом L-MTXDG-GM₁ может быть обусловлен специфическими взаимодействиями ганглиозида GM₁. Можно предположить, что ганглиозид GM₁ представлен на поверхности МТХ-липосом таким образом, что способен связываться, например, с галектинами – гликопротеинами внеклеточного матрикса, которые секретируются активированными иммунокомпетентными клетками (так, галектин-1 – основной рецептор ганглиозида GM₁ [47]).

Интересно, что все образцы липосом, не содержащие пролекарство, также подавляли выработку TNF- α , но не столь сильно, как метотрексата (рис. 6). Липосомы как таковые, без цитостатика, по-видимому, связываются с рецепторными комплексами на поверхности клетки, что может приводить к ингибированию некоторых сигнальных путей выработки цитокинов активированными лимфоцитами либо, наоборот, вызывать продукцию цитокинов интактными клетками посредством активации других путей передачи сигналов. Например, показано, что фосфатидилхолин (наряду с α -галактозилцерамидом) способен связываться внутриклеточно с гликопротеином CD1d, презентироваться на поверхности клеток и активировать так называемые фосфолипид-реактивные Т-клетки, что является важным регуляторным механизмом поддержания иммунного гомеостаза между различными пулами липид-реактивных Т-клеток [48]. Действительно, мы наблюдали активацию выработки

TNF- α неактивированными лейкоцитами под действием простых липосом из яичного фосфатидилхолина в том числе (данные не приведены). Очевидно, действие МТХ-липосом различного состава на активированные лейкоциты опосредовано комплексом факторов – количеством связанных с липосомами белков, зарядами поверхностей липосом (дзета-потенциал липосом L-MTXDG-PI равен -53 мВ [25], для МТХ-липосом с GM₁ или CMG его отрицательное значение, безусловно, еще больше), эффектом фосфолипидов как таковых и другими молекулярными механизмами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с существующими представлениями результаты данной работы показывают, что в крови основными фагоцитами наноразмерных липосом различного состава являются моноциты. Покоящиеся лимфоциты не поглощают липосомы. Введение в мембрану липосом пролекарства метотрексата ускоряет их фагоцитоз и увеличивает уровень поглощения моноцитами, причем независимо от наличия в мембране защитных амфифильных молекул – фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁ или пептидолипида CMG. Все варианты МТХ-липосом вызывают фрагментацию центрального компонента системы комплемента C3 и несут на поверхности продукты расщепления C3b, что способствует их захвату моноцитами. Причиной активации СК могут быть искажения, которые вносят в структуру поверхности липосом объемистые остатки МТХ, а также представленные в этих остатках пары экзоциклических ароматических амино-функций и свободной α -COOH-группы (амино- (и гидроксид) группы, расположенные на поверхности особым образом относительно друг друга, могут вызывать активацию СК путем нуклеофильной атаки на внутреннюю тиоэфирную связь фрагмента C3b [49]). Неожиданным оказалось то, что молекулы, несущие объемистые отрицательно заряженные остатки пентасахарида или карбоксилированного олигоглицина, не оказали экранирующего эффекта, и соответствующие МТХ-липосомы показали самый высокий уровень связывания и фрагментации C3. Возможным следствием этого стало усиление их влияния на функцию активированных лимфоцитов по сравнению с МТХ-липосомами, содержащими фосфатидилинозит, хотя в целом результаты этих экспериментов затруднительно трактовать однозначно. В заключение следует сделать вывод, что поведение МТХ-липосом в отношении лейкоцитов крови определяется в большей степени самим остатком метотрексата, а не другими компонентами бислоя липосом; некоторую модуляцию влияния МТХ-липосом на активированные лей-

коциты можно получить за счет введения в бислой различных экранирующих молекул. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 16-04-01585 и 19-015-00499).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. 20th WHO Model List of Essential Medicines (March 2017, amended August 2017). <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>. Accessed July 09, 2019
2. Weinblatt M.E. // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2013. V. 124. P. 16–25.
3. McGuire J. // *Curr. Pharm. Des.* 2003. V. 9. № 31. P. 2593–2613.
4. Pui C.-H. // *N. Engl. J. Med.* 1995. V. 332. P. 1618–1630.
5. Abolmaali S.S., Tamaddon A.M., Dinarvand R. // *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 2013. V. 71. № 5. P. 1115–1130.
6. Rajitha P., Biswas R., Sabitha M., Jayakumar R. // *Curr. Pharm. Des.* 2017. V. 23. № 24. P. 3550–3566.
7. Liu L., Hu F., Wang H., Wu X., Eltahan A.S., Stanford S., Bottini N., Xiao H., Bottini M., Guo W., et al. // *ACS Nano.* 2019. V. 13. № 5. P. 5036–5048.
8. Ding Q., Si X., Liu D., Peng J., Tang H., Sun W., Rui M., Chen Q., Wu L., Xu Y. // *J. Control. Release.* 2015. V. 207. № 1. P. 86–92.
9. Zucker D., Marcus D., Barenholz Y., Goldblum A. // *J. Control. Release.* 2009. V. 139. № 1. P. 73–80.
10. Vodovozova E.L., Kuznetsova N.R., Kadykov V.A., Khutsyan S.S., Gaenko G.P., Molotkovskiy Y.G. // *Nanotechnol. Russia.* 2008. V. 3. P. 228–239.
11. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I., Kadykov V., Gaenko G., Molotkovskiy J., Vodovozova E. // *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 2009. V. 19. № 1. P. 51–59.
12. Alekseeva A.S., Moiseeva E.V., Onishchenko N.R., Boldyrev I.A., Singin A.S., Budko A.P., Shprakh Z.S., Molotkovskiy J.G., Vodovozova E.L. // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 3735–3749.
13. Barenholz Y. // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. P. 117–134.
14. Allen T.M., Cullis P.R. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. V. 65. P. 36–48.
15. Bulbake U., Doppalapudi S., Kommineni N., Khan W. // *Pharmaceutics.* 2017. V. 9. № 2. P. E12.
16. Gustafson H.H., Holt-Casper D., Grainger D.W., Ghandehari H. // *Nano Today.* 2015. V. 10. P. 487–510.
17. Betker J.L., Jones D., Childs C.R., Helm K.M., Terrell K., Nagel M.A., Anchordoquy T.J. // *J. Control. Release.* 2018. V. 286. P. 85–93.
18. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. // *Science.* 1995. V. 267. P. 1275–1276.
19. Ilinskaya A.N., Dobrovolskaia M.A. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016. V. 299. P. 70–77.
20. Palchetti S., Colapicchioni V., Digiacomo L., Caracciolo G., Pozzi D., Capriotti A.L., La Barbera G., Laganà A. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2016. V. 1858. P. 189–196.
21. Szebeni J., Muggia F., Gabizon A., Barenholz Y. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. V. 63. P. 1020–1030.
22. Yang Q., Lai S.K. // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2015. V. 7. P. 655–677.
23. Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2013. V. 8. P. 772–781.
24. Bros M., Nuhn L., Simon J., Moll L., Mailänder V., Landfester K., Grabbe S. // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 1760.
25. Kuznetsova N.R., Sevrin C., Lespineux D., Bovin N.V., Vodovozova E.L., Mészáros T., Szebeni J., Grandfils C. // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. № 2. P. 394–400.
26. Tretiakova D.S., Onishchenko N.R., Vostrova A.G., Vodovozova E.L. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. № 6. P. 678–689.
27. Kuznetsova N.R., Vodovozova E.L. // *Biochemistry (Mosc.).* 2014. V. 79. P. 797–804.
28. Vodovozova E.L., Gaenko G.P., Bobrikova E.S., Pazynina G.V., Molotkovskii Y.G. // *Pharm. Chem. J.* 2007. V. 41. P. 297–301.
29. Boldyrev I.A., Zhai X., Momsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E., Molotkovskiy J.G. // *J. Lipid Res.* 2007. V. 48. P. 1518–1532.
30. Jaye D.L., Geigerman C.M., Fuller R.E., Akyildiz A., Parkos C.A. // *J. Immunol. Methods.* 2004. V. 295. P. 119–127.
31. Markwell M., Haas S., Bieber L. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 210. P. 206–210.
32. Dos Santos N., Allen C., Doppen A.-M., Anantha M., Cox K., Gallagher R.C., Karlsson G., Edwards K., Kenner G., Samuels L., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1768. P. 1367–1377.
33. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
34. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 850–858.
35. Gabizon A., Papahadjopoulos D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 6949–6953.
36. Muller M., Zschornig O., Ohki S., Arnold K. // *J. Membrane Biol.* 2003. V. 192. P. 33–43.
37. Allen T.M., Hansen C., Rutledge J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1989. V. 981. P. 27–35.
38. Tretiakova D., Onishchenko N., Boldyrev I., Mikhalyov I., Tuzikov A., Bovin N., Evtushenko E., Vodovozova E. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2018. V. 166. P. 45–53.
39. Karathanasis E., Geigerman C.M., Parkos C.A., Chan L., Bellamkonda R.V., Jaye D.L. // *Ann. Biomed. Eng.* 2009. V. 37. № 10. P. 1984–1992.
40. Münter R., Kristensen K., Pedersbæk D., Larsen J.B., Simonsen J.B., Andresen T.L. // *Nanoscale.* 2018. V. 10. P. 22720–22724.
41. Francian A., Mann K., Kullberg M. // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 5149–5161.
42. Bisso P.W., Gaglione S., Guimarães P.P.G., Mitchell M.J., Langer R. // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018. V. 4. № 12. P. 4255–4265.
43. Hed J. // *FEMS Lett.* 1977. V. 1. P. 357–361.
44. *Immunology*. 5th ed. / Ed. Roitt I., Brostoff J., Male D. London etc.: Mosby, 1998. 423 p.
45. Ferrante A., Staugas R.E., Rowan-Kelly B., Bresatz S., Kumaratilake L.M., Rzepczyk C.M., Adolf G.R. // *Infect. Immun.* 1990. V. 58. № 12. P. 3996–4003.
46. Hildner K., Finotto S., Becker C., Schlaak J., Schirmacher P., Galle P.R., Marker-Hermann E., Neurath M.F. // *Clin. Exp. Immunol.* 1999. V. 118. P. 137–146.
47. Kopitz J., von Reitzenstein C., Burchert M., Cantz M., Gabius H.J. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 18. P. 11205–11211.
48. Halder R.C., Tran C., Prasad P., Wang J., Nallapothula D., Ishikawa T., Wang M., Zajonc D.M., Singh R.R. // *Eur. J. Immunol.* 2019. V. 49. № 2. P. 242–254.
49. Janssen B.J.C., Christodoulidou A., McCarthy A., Lambris J.D., Gros P. // *Nature.* 2006. V. 444. P. 213–216.