

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Алексеева Анна Сергеевна

**МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КЛЕТКАМИ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМ С ЛИПОФИЛЬНЫМИ
ПРОЛЕКАРСТВАМИ**

Специальность 02.00.10 — Биоорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории химии липидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научный руководитель:

Водовозова Елена Львовна,

доктор химических наук, заведующая лабораторией химии липидов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Ярославов Александр Анатольевич,

доктор химических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, заведующий кафедрой высокомолекулярных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Сурин Александр Михайлович,

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский технологический университет», Институт тонких химических технологий имени М.В.Ломоносова

Защита состоится «23» мая 2018 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В. А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Поиск методов создания лекарственных средств, способных селективно (или направленно) действовать на больные органы и ткани – фундаментальная проблема медицинской науки и физико-химической биологии. Использование наноразмерных систем доставки лекарств представляется одним из наиболее рациональных подходов к решению этой проблемы, особенно в области онкологии, где применяются химиотерапевтические средства с высоким уровнем системной токсичности. Среди известных наноносителей липосомы, построенные из природных фосфолипидов, отличаются наибольшей био- и гемосовместимостью. Именно поэтому на мировом рынке наномедицинских препаратов, предназначенных для системного введения, средства на основе липосом занимают лидирующую позицию.

При пассивном инкапсулировании раствора лекарства во внутренний объем липосом зачастую не удается добиться терапевтически значимой концентрации действующего вещества, а технология активной загрузки (remote loading, дистанционная загрузка), осуществима только для амфифильных слабых кислот или оснований. Альтернативным способом загрузки липосом водорастворимыми лекарствами является включение лекарств в липидный бислой в виде липидных производных — липофильных пролекарств. Такая конструкция липосомальных препаратов способствует улучшению их фармакологических свойств: позволяет получить наноразмерные липосомы с приемлемой емкостью загрузки, уменьшает вероятность потерь активного вещества при циркуляции в кровотоке и на стадии взаимодействия с клеткой-мишенью. Кроме того, включение пролекарств в состав бислоя значительно упрощает технологию получения липосомальных препаратов с эффективной концентрацией терапевтического агента. После интернализации клеткой липофильные пролекарства расщепляются эндогенными ферментами (неспецифическими эстеразами) с высвобождением активного агента.

В лаборатории химии липидов ИБХ РАН разработаны липосомы на основе природных фосфолипидов, содержащие липофильные пролекарства широко используемых в клинике противоопухолевых препаратов – алкилирующего агента мелфалана и антиметаболита фолиевой кислоты метотрексата [Водовозова и др., *Рос. Нанотехнологии 2008*]. Соответствующим образом сконструированные пролекарства эффективно встраиваются в жидкофазный липидный бислой липосом. Мелфалан — химиотерапевтический цитотоксический агент, действующий независимо от стадии клеточного цикла и обладающий широким спектром противоопухолевой активности. Из-за низкой стабильности при физиологических значениях pH и быстрого выведения из кровотока мелфалан вводится в

больших дозах, вызывая тяжелые побочные эффекты. В связи с этим актуальна разработка его липосомальной формы. Как таковой мелфалан не удается эффективно инкапсулировать в наноразмерные липосомы из-за малой растворимости в воде и относительно быстрого гидролиза в нейтральной среде, с одной стороны, и высокой вероятности утечки через липидный бислой, с другой. Введение мелфалана в мембрану липосом в виде пролекарства (Mlph-DG) позволяет преодолеть указанные ограничения.

Метотрексат (MTX) широко применяется в клинике для лечения опухолей и аутоиммунных патологий. MTX конкурентно ингибирует дигидрофолатредуктазу и лишает клетку тетрагидрофолата, необходимого кофактора биосинтеза тимидилата. Однако эффективность лечения MTX ограничивается системной токсичностью и частым развитием лекарственной устойчивости. Ранее показано, что липофильное пролекарство MTX (MTX-DG) в липосомальной форме преодолевает резистентность клеток лейкемии человека к метотрексату, обусловленную мутациями и недостаточной функцией белка-транспортера восстановленных фолатов (наиболее частая причина выработки резистентности к MTX) [Kuznetsova et al, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2009]. В том числе, оставалась невыясненной потенциальная роль остатков метотрексата на поверхности липосом в качестве нацеливающих лигандов на клетки с высоким уровнем экспрессии фолатных рецепторов.

Терапевтическая эффективность липосомальных препаратов липофильных пролекарств мелфалана (или сарколизина, D,L-мелфалана) и метотрексата подтверждена в экспериментах *in vivo* на моделях опухолей мышей. Показано значительное усиление противоопухолевого эффекта по сравнению с исходными лекарствами при лечении лейкоза P-388 [Козлов и др., *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 1997] и аденокарциномы молочной железы [Vodovozova et al, *Eur. J. Cancer* 2000]. При оснащении липосом углеводным лигандом селектинов сиалил-Льюис X (SiaLe^X) терапевтический эффект липосомальных препаратов возрастал еще более [ibid]. На модели карциномы легких Льюис показано, что ингибирование роста опухоли SiaLe^X-липосомами, нагруженными Mlph-DG, опосредовано их антивазкулярным действием [Kuznetsova et al, *J. Drug Target.* 2014]. Кроме того, включение в состав липосом SiaLe^X-конъюгата повлияло на внутриопухолевое распределение липосом [ibid]: в случае SiaLe^X-липосом наблюдалась их колокализация с маркером сосудистого эндотелия CD31, тогда как безадресные Mlph-DG-липосомы накапливались в межклеточном пространстве периваскулярной области опухоли и в опухолевых клетках. Логично было предположить, что именно взаимодействие SiaLe^X-липосом с E-селектином повлияло на их распределение в опухолевой ткани и внесло наибольший вклад в проявление антивазкулярного цитотоксического эффекта. Однако эта гипотеза требовала подтверждений.

Внутриклеточный транспорт липофильных пролекарств, доставленных в липосомальной форме, ранее не изучался. В то же время, он играет важнейшую роль в

реализации специфического действия лекарства на клеточном уровне. Решающее влияние на внутриклеточное распределение пролекарства оказывает механизм проникновения липосомы-носителя в клетку — эндоцитоз. В связи с этим актуальными являются исследования механизмов эндоцитоза наноразмерных липосом, нагруженных липофильными пролекарствами, и процессов их интернализации.

Цель работы: исследование механизмов взаимодействия с клетками и внутриклеточного транспорта липосом с липофильными пролекарствами мелфалана и метотрексата с помощью флуоресцентных методов.

Задачи:

Первая задача. Изучить влияние введения SiaLe^x-лиганда в липосомы с липофильным пролекарством мелфалана на взаимодействие с эндотелиальными клетками, в том числе: (1) сравнить накопление липосом интактными и активированными клетками и оценить специфичность взаимодействия липосом с E-селектином, представленным на поверхности клеток; (2) провести количественную оценку интернализированных и связанных с мембраной клеток липосом; (3) исследовать внутриклеточное распределение липосом и кинетику их внутриклеточной разгрузки.

Вторая задача. Изучить механизм взаимодействия липосом с липофильным пролекарством метотрексата с опухолевыми клетками, в том числе: (1) сравнить накопление липосом клетками различных линий и оценить вклад потенциальных рецепторов в этот процесс; (2) исследовать механизм интернализации липосом клеткой с помощью ингибиторов эндоцитоза и оценить кинетику внутриклеточной разгрузки липосом; (3) синтезировать флуоресцентный аналог липофильного пролекарства метотрексата; (4) исследовать внутриклеточное распределение липофильного пролекарства метотрексата;

Научная новизна и практическая значимость

В работе был использован целый ряд флуоресцентных методов. Экспериментальные данные были получены параллельно с помощью конфокальной микроскопии, проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии. При этом вся совокупность методов была адаптирована под работу с наноразмерными носителями — липосомами. Учитывая значительный интерес к разработке подобных систем в современной медицинской науке, описанные в работе экспериментальные подходы могут быть применены при создании перспективных средств доставки лекарств.

Методологические трудности и недостаток соответствующих изучаемому объекту молекулярных инструментов ограничивают возможности исследования механизмов взаимодействия липосом-носителей с клетками. В настоящей работе был синтезирован

новый зонд для изучения внутриклеточного распределения липосом — флуоресцентный аналог липофильного пролекарства метотрексата, несущий BODIPY-метку на концевом метиле алифатической цепи. С его помощью показано, как реализуется внутриклеточная разгрузка липосом.

Впервые исследовано на внутриклеточном уровне влияние SiaLe^x-лиганда в липосомах на их взаимодействие с эндотелиальными клетками. Показано, что включение липофильного конъюгата SiaLe^x в состав липосом с липофильным пролекарством мелфалана обеспечивает специфическое связывание с эндотелиальными клетками, активированными провоспалительным цитокином. Такая селективность SiaLe^x-липосом, нагруженных цитостатическим препаратом, в отношении активированных эндотелиальных клеток открывает перспективу разработки эффективных противоопухолевых средств, так как для микроокружения опухоли характерен хронический воспалительный процесс.

Получены новые данные о взаимодействии с опухолевыми клетками липосом с липофильным производным метотрексата. Показано, что при переходе к супрамолекулярной липосомальной системе изменяется механизм проникновения в клетку пролекарства метотрексата, по сравнению с метотрексатом как таковым. Предполагается рецепторно-опосредованный механизм, но без участия фолатного рецептора и транспортера восстановленных фолатов.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты №№ 16-34-01237-мол_а, 16-04-01585-а, 13-04-00069-а).

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены автором в виде устных докладов на конференциях: Международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии (Москва, Россия, 2014), XXVI и XXVII зимних молодежных научных школах "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, Россия, 2014 и 2015). Результаты также были представлены на конференциях International Liposome Society Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, UCL School of Pharmacy (Лондон, Великобритания, 2013), конференции Liposome Research Days Living Innovation (Копенгаген, Дания, 2014), международной конференции Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases (Долгопрудный, Россия, 2016), V Съезде физиологов СНГ, V съезде биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), конференции International Liposome Society and Liposome Research Days Combined Conference "Liposome Advances: progress in drug and vaccine delivery" (Афины, Греция, 2017).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 105 страницах и состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 178 ссылок, и приложения. Диссертация содержит 22 рисунка и 3 таблицы.

Публикации

По материалам работы опубликовано 3 статьи в международных рецензируемых журналах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Липосомы с липофильными пролекарствами

Объектом исследования стали липосомы с липофильными пролекарствами мелфалана и метотрексата (**Рис. 1**). Основу бислоя липосом (до 90% мольн.) составляют природные фосфолипиды: фосфатидилхолин из яичного желтка (**PC**) и фосфатидилинозит (**PI**). Липосомы получали стандартным методом экструзии через поликарбонатные мембранные фильтры с размером пор 100 нм, размер готовых липосом контролировали с помощью динамического лазерного светорассеяния (средний диаметр около 100 нм, см. **Таблицу 1**).

Визуализацию липосом для методов конфокальной микроскопии и проточной цитометрии осуществляли за счет включения в липидный бислой BODIPY- или Rhod- меченого фосфатидилхолина (BODIPY-PC, от 0.5 до 2% мол., Rhod-PE 1% мол.) на стадии получения липидной пленки. Для отслеживания стабильности липосом, а также динамики дестабилизации бислоя во внутренний водный объем включали кальцеин.

В состав липосом с пролекарством мелфалана вводили от 2% до 10% углеводного вектора — липофильного конъюгата SiaLe^x-DG, уменьшая содержание PC (**X%-SiaLe^x-липосомы**, где X мол. содержание SiaLe^x-конъюгата).

Для отслеживания внутриклеточного распределения липофильного пролекарства метотрексата, в состав МТХ-липосом вводили 1% мол. синтезированного в ходе работы флуоресцентного аналога МТХ-DG (**BODIPY-МТХ-DG**).

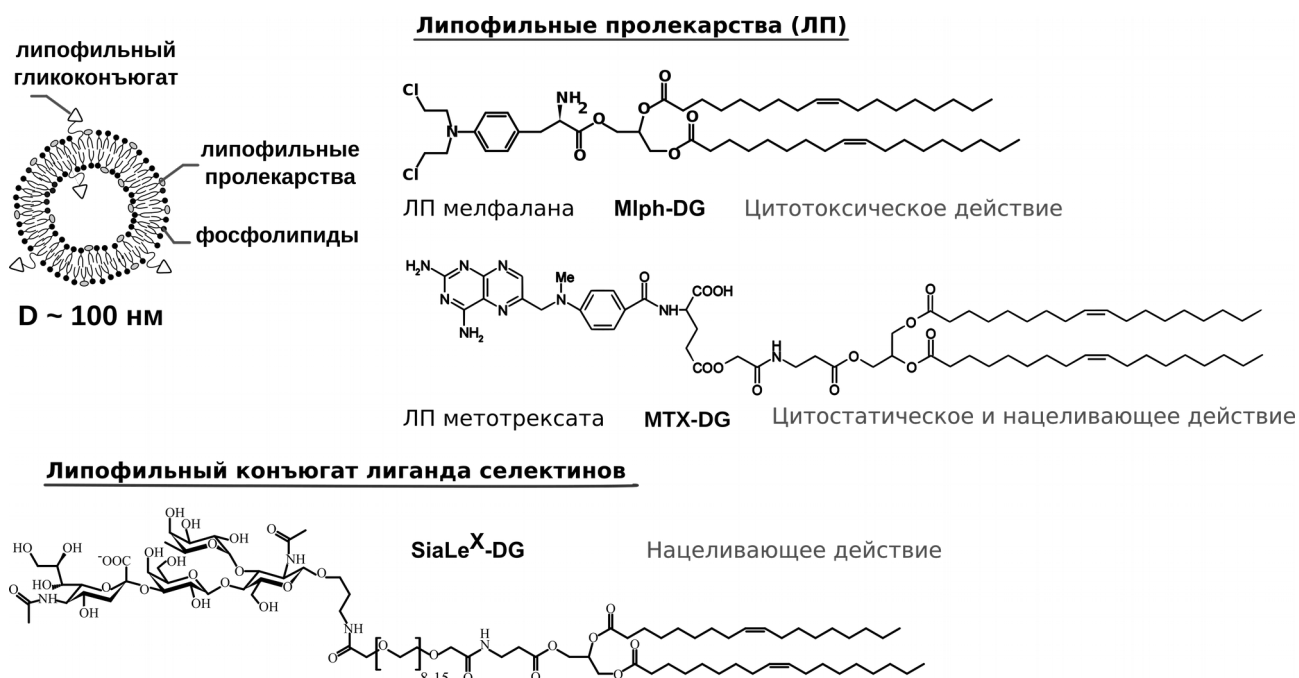


Рис. 1. Схематическое изображение липосом и молекулярные структуры липофильных пролекарств (ЛП) мелфалана (Mlph-DG) и метотрексата (MTX-DG), а также конъюгата SiaLe^X. Липосомы получали стандартным методом экструзии: смеси PC–PI–MTX-DG/Mlph-DG, 8 : 1 : 1 (мол. соотношение), соунаривали из растворов в смеси хлороформ–метанол, 1 : 1, на роторном испарителе. Флуоресцентные липидные зонды для визуализации липосом, а также липофильный конъюгат для направленной доставки SiaLe^X-DG (от 2 до 10 % мол.) добавляли на стадии формирования липидной пленки, уменьшая содержание PC. Липидные пленки высушивали 1 час при 5 Па, гидратировали 2 ч при комнатной температуре в PBS (суммарная концентрация липидов в суспензии обычно составляла от 1 до 5 мМ). Суспензию подвергали 5-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 (Avanti Polar Lipids, США).

Таблица 1. Физико-химические характеристики липосом^a

Наименование	Состав (мол.)	D (нм)	ζ- потенциал, mV
Пустые липосомы	PC/PI, 9 : 1	92 ± 1.0	-42 ± 1
Mlph-липосомы	PC/PI/Mlph-DG, 9 : 1 : 1	90.7 ± 0.4	-25 ± 3
MTX-липосомы	PC/PI/MTX-DG, 9 : 1 : 1	99 ± 1.0	-53 ± 4
Наименование	Состав (мол.)	D (нм)	
2% SiaLe ^X -липосомы	PC/PI/Mlph-DG/SiaLe ^X -DG, 8.8 : 1 : 1 : 0.2	109 ± 2.4	
5% SiaLe ^X -липосомы	PC/PI/Mlph-DG/SiaLe ^X -DG, 8.5 : 1 : 1 : 0.5	111 ± 3.0	
10% SiaLe ^X -липосомы	PC/PI/Mlph-DG/SiaLe ^X -DG, 8 : 1 : 1 : 1	108 ± 2.4	

^a D - средний диаметр; приведены средние значения ± SE измерений.

Взаимодействие противоопухолевых липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана и несущих углеводный лиганд селектинов, с эндотелиальными клетками сосудов крови

Изучение взаимодействия с эндотелиальными клетками проводили для липосом, нагруженных пролекарством мелфалана Mph-DG, и несущих углеводный лиганд селектинов SiaLe^x. Содержание флуоресцентных зондов и концентрация липосомальной композиции были подобраны таким образом, чтобы обеспечивать надежное детектирование сигнала в образцах, но не достигать цитотоксических доз пролекарства мелфалана.

В качестве модели эндотелия сосудов крови была выбрана первичная культура клеток от индивидуальных доноров HUVEC. Эксперименты проводились на четырехдневных культурах первого пассажа, что гарантирует сохранение всех характеристик нормального эндотелия сосудов крови человека. Для перехода к модели эндотелия в очагах воспаления и опухоли, клетки HUVEC активировали с помощью фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α). В норме, на контрольных клетках (без активации) E-селектины обнаружены не были, но появлялись в ответ на активацию ФНО- α , причем пропорционально увеличению концентрации цитокина (**Рис. 2**). В дальнейших экспериментах применяли концентрацию ФНО- α 50 нг/мл.

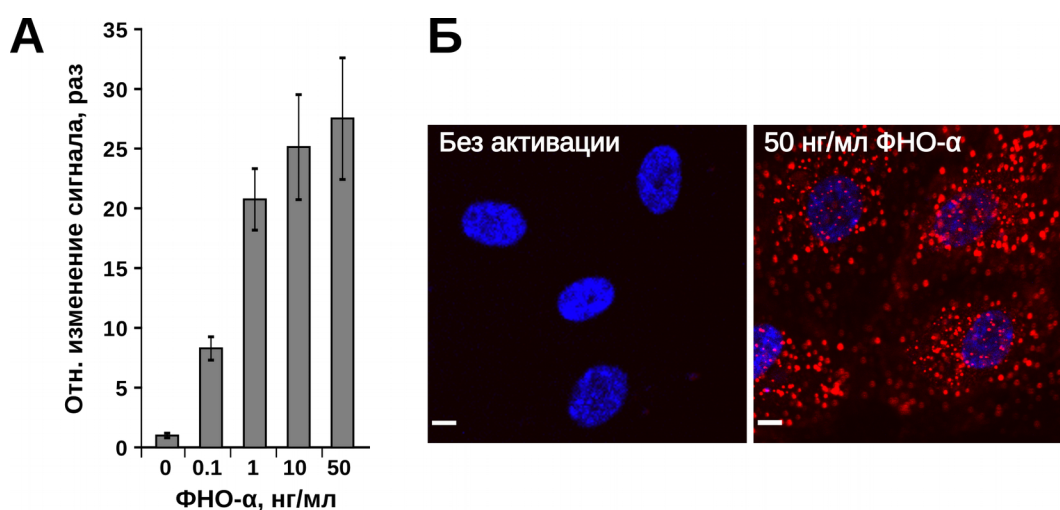


Рис. 2. Определение E-селектина на поверхности эндотелиальных клеток HUVEC. **А.** Клетки после активации различными концентрациями ФНО- α суспендировали с помощью EDTA, инкубировали с антителами к E-селектину человека 1 ч при 4°C, затем окрашивали вторичными FITC-антителами еще 1 ч при 4°C и анализировали на проточном цитометре; приведена средняя интенсивность флуоресценции по всей популяции клеток для трех независимых экспериментов, среднее \pm SD. **Б.** Конфокальная микроскопия монослоя клеток HUVEC с/без активации после окраски на E-селектин (1 ч при 37°C с первичными mAb), окрашивали ядра Hoechst (синий), фиксировали и окрашивали вторичными Ab Alexa-555 (красный) 1 ч при 37°C; масштабная линейка 5 мкм.

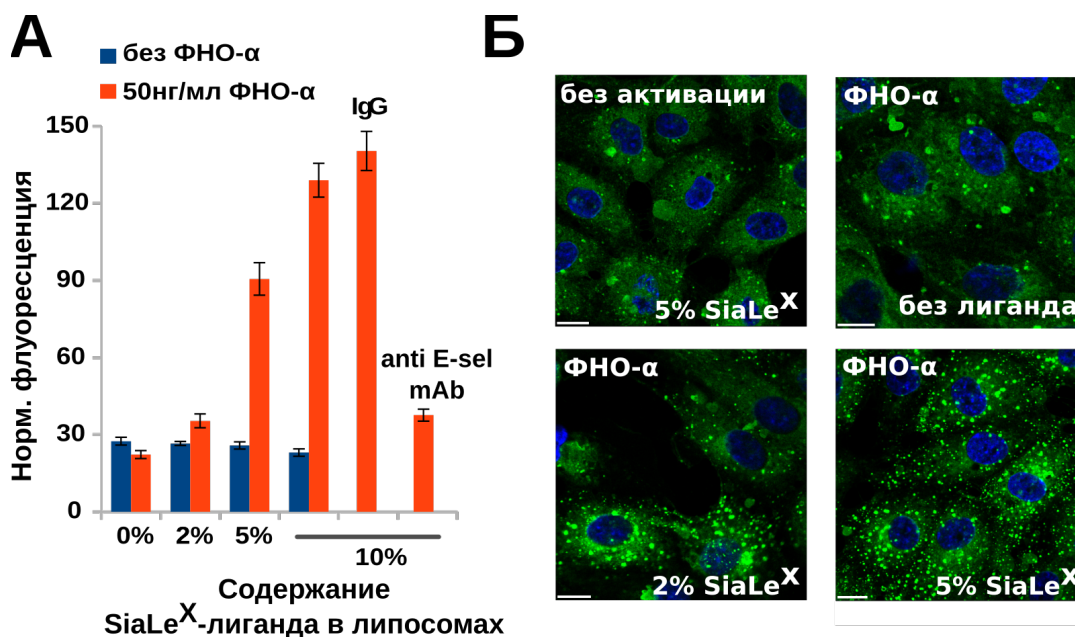


Рис. 3. Суммарное накопление липосом клетками HUVEC в зависимости от активации и содержания SiaLe^X в липосомах. Нормальные или активированные (50 нг/мл ФНО-α) HUVEC инкубировали с липосомами содержащими BODIPY-PC (зеленая флуоресценция (50 мкМ суммарных липидов), 1 ч, 37°C). Далее, (А) клетки суспендировали раствором EDTA и анализировали на проточном цитометре или (Б) ядра клеток окрашивали Hoechst (синий), фиксировали 1% PFA в течение ночи при 4°C и анализировали на конфокальном микроскопе; масштабная линейка 10 мкм. Для оценки специфичности связывания SiaLe^X-липосом с клетками HUVEC, активированные клетки прединкубировали с избытком антител к E-селектину (anti E-sel mAb, 10 мг/мл, 1 ч при 37°C) или неспецифическими IgG и обработаны суспензией липосом, затем клетки промывали, суспендировали раствором EDTA и анализировали на проточном цитометре. Среднее ± SE.

Накопление липосом клетками HUVEC. В качестве адресной системы доставки противоопухолевого средства (в данном случае — липофильного пролекарства мелфалана) к активированным эндотелиальным клеткам использовали липосомы, несущие SiaLe^X-лиганд (**SiaLe^X-липосомы**). Исследована зависимость связывания SiaLe^X-липосом с клетками от содержания этого лиганда в мембране липосом.

Вклад SiaLe^X-лиганда во взаимодействие липосом с активированными клетками оценивали по общему накоплению липосом различного состава методом проточной цитометрии (**Рис. 3А**). Неактивированные клетки связывали SiaLe^X-липосомы лишь незначительно, причем вне зависимости от содержания в них SiaLe^X-лиганда: липосомы, содержащие от 2 до 10 % мол. SiaLe^X имели практически одинаковый низкий уровень сигнала. После активации клеток накопление SiaLe^X-липосом существенно возросло (в 6 раз для 10%-SiaLe^X-липосом), а накопление липосом без лиганда осталось на прежнем низком уровне.

Для доказательства наличия специфических взаимодействий между SiaLe^X-липосомами и E-селектином на поверхности активированных клеток мы провели эксперименты по конкурентному ингибированию с моноклональными антителами (mAb) к E-селектину. Предварительная обработка активированных клеток избытком антител снижает накопление 10%-SiaLe^X-липосом на 70%, то есть практически до уровня накопления липосом без SiaLe^X (**Рис. 3А**). При обработке неспецифическим IgG в качестве контроля такого эффекта не наблюдалось.

По данным конфокальной микроскопии, клетки без активации для всех типов липосом показали диффузную окраску (**Рис. 3Б**). В случае активированных клеток, SiaLe^X-липосомы локализовались в цитоплазме как яркие отдельные точки и скопления, в то время как липосомы без лиганда сохранили диффузную окраску клетки. Эти результаты согласуются с данными проточной цитометрии, свидетельствуют о селективности действия SiaLe^X-липосом на активированные эндотелиальные клетки и подтверждают увеличение накопления липосом в зависимости от содержания в них SiaLe^X-лиганда.

Оценка количества интернализированных и связанных с клеточной мембраной липосом. Для оценки количества липосом, связанных с цитоплазматической мембраной и интернализированных клеткой, была использована флуоресцентная спектроскопия [Li et al, AAPS J 2011]. Фракция липосом, связанных с цитоплазматической мембраной, может быть выделена путем длительной обработки трипсином (30 мин при 37°C, вместо 1-3 мин, необходимых для открепления клеток от культурального пластика). Такая обработка приводит к сбрасыванию гликокаликса и диссоциации липосом с поверхностью клеток. После центрифугирования в супернатанте остается фракция липосом, связанных с мембраной, а в осадке — клетки с интернализированными липосомами. Полученные образцы обрабатываются детергентом, после чего детектируется флуоресцентный сигнал.

Показано, что оба процесса — связывание и интернализация липосом активированными клетками — осуществляются на 40-50% эффективнее в случае SiaLe^X-липосом, по сравнению с липосомами без вектора (**Рис. 4**). Исходя из измеренного спектрофотометрически количества Mph-DG в образцах клеточных лизатов ($4 \cdot 10^{-11}$ моль, **Рис. 4**, столбец «Общее»), теоретического числа молекул пролекарства на одну липосому (~ 8000 молекул для липосомы размером 100 нм) и числа клеток в лизате (около $2 \cdot 10^5$ клеток), можно вычислить количество липосом, связанных и поглощенных клеткой. Оказалось, что при избытке липосом в среде активированные клетки HUVEC накапливают около 15 000 SiaLe^X-липосом на одну клетку за 1 ч инкубации.

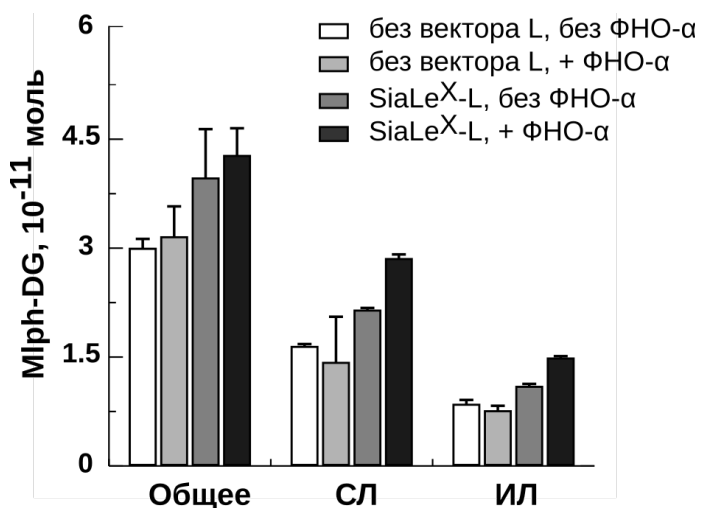


Рис. 4. Спектрофлуориметрия клеточных лизатов. Липосомы (L, 3 мМ суммарные липиды, 2% BODIPY-PC, 2% SiaLe^X-конъюгата) инкубировали с клетками HUVEC в течение 1 ч при 37°C. Далее клетки промывали PBS и обрабатывали раствором трипсин/EDTA в течение 1 или 30 мин при 37°C. Клетки после кратковременной обработки солюбилизовали 0.5% Triton X-100 и обрабатывали на УЗ-бане 30 мин; данная фракция представляет собой общее накопление липосом клетками (**Общее**). Клетки после длительной обработки трипсином разделяли

центрифугированием с последующей солюбилизацией осадка (**ИЛ**, интернализированные липосомы) и супернатанта (**СЛ**, связанные с мембраной клеток липосомы). Сигнал BODIPY-PC представлен как количество вещества пролекарства, определенное по калибровочной кривой. Среднее \pm SD для двух независимых экспериментов.

Внутриклеточное распределение липосом. Проследить за ранними стадиями внутриклеточного распределения липосом в активированных клетках HUVEC нам удалось с помощью конфокальной микроскопии и трекеров органелл. Липосомы с BODIPY-меткой в бислое детектировали в зеленом канале, а все трекеры были подобраны для красного канала микроскопа. Внешние границы клетки и гликокаликс визуализировали с помощью трекера WGA (агглютинин из ростков пшеницы), внутриклеточное пространство окрашивали трекерами ЭПР (конъюгат глибенкламида и BODIPY-TR) и ранних эндосом (трансферрин, интернализуемый путем клатрин-зависимого эндоцитоза посредством рецептора трансферрина). Уже через 15 мин инкубации липосомы обнаруживались внутри клетки — трекер WGA четко окрашивает внешнюю границу клетки и гликокаликса, оставляя зеленый сигнал липосом внутри клетки. Диффузная зеленая окраска липосом практически полностью лежит в области ЭПР, а яркие скопления липосом частично перекрываются с трекером ранних эндосом (**Рис. 5**). Таким образом, можно предполагать следующую картину ранних стадий интернализации SiaLe^X-липосом активированными эндотелиальными клетками: связывание липосомы с E-селектином, эндоцитоз, распределение и транспорт липосом в составе эндосом к аппарату Гольджи и затем к эндоплазматическому ретикулуму, где липосомы разгружаются, то есть липиды встраиваются в структуру ЭПР, а пролекарство становится доступно для внутриклеточных ферментов.

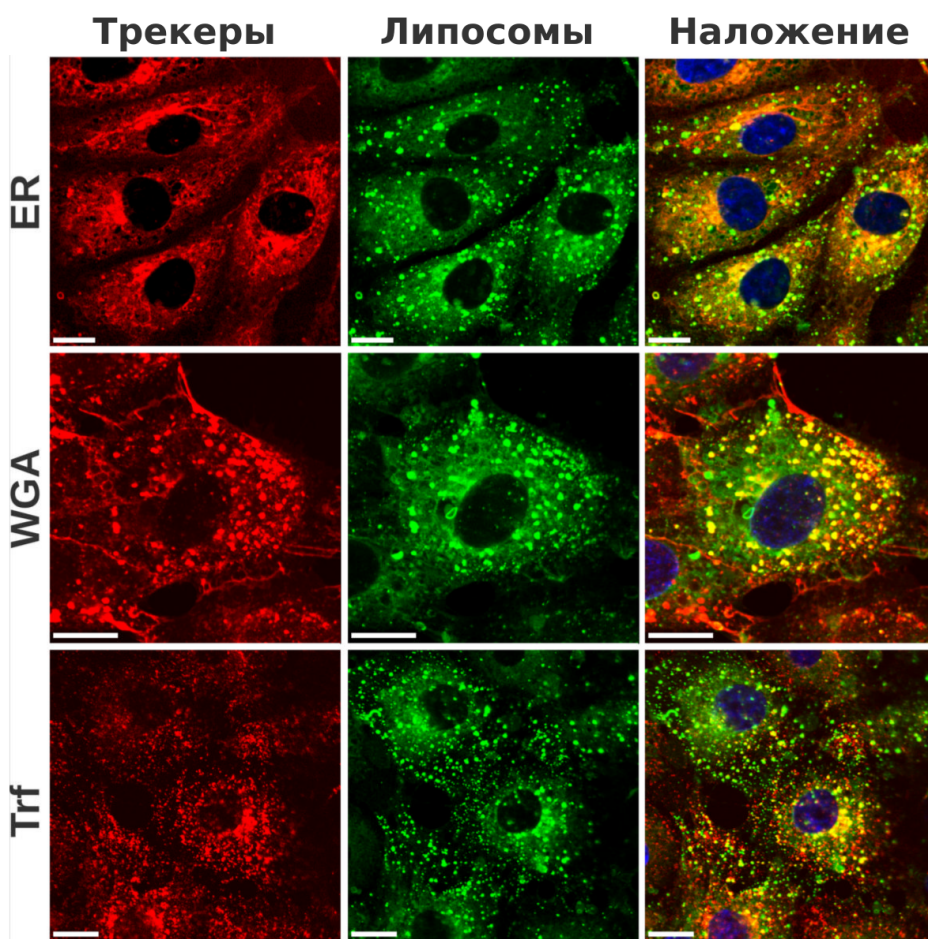


Рис. 5. Внутриклеточное распределение $SiaLe^X$ -липосом в активированных эндотелиальных клетках. Бислой липосом содержит BODIPY-PC (зеленый). Колокализация с трекерами эндоплазматического ретикулума (ER), гликокаликса и аппарата Гольджи (WGA, wheat germ agglutinin) (красный). Ядра активированных (50 нг/мл ФНО- α) клеток HUVEC предварительно были окрашены Hoechst (синий), затем клетки совместно инкубировали с 5% $SiaLe^X$ -липосомами (50 мкМ суммарные липиды) и трекерами в течение 15 мин при 37°C. Затем клетки фиксировали 1% PFA (15 мин, 37°C) и анализировали на конфокальном микроскопе.

Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки липосом. Для того чтобы отследить связывание и дестабилизацию бислоя $SiaLe^X$ -липосом в клетках HUVEC, была использована проточная цитометрия и липосомы с двумя флуоресцентными метками — родамин-меченый липид (Rhod-PE) в бислое, а во внутреннем водном объеме кальцеин в высокой концентрации (самозатушен). Сигнал флуоресценции родамина отражает общее накопление липосом клеткой, а сигнал кальцеина позволяет отследить процесс разрушения липосом, поскольку при нарушении целостности бислоя кальцеин вытекает во внешнюю среду, разбавляется и сигнал его флуоресценции растет.

Клетки без активации показали очень низкий уровень накопления липосом вне зависимости от наличия $SiaLe^X$ -лиганда за все время наблюдения; сигнал кальцеина также

был очень низкий и оставался на одном уровне в течение всего эксперимента (Рис. 6; А,Б). Совершенно другая картина наблюдалась для активированных клеток: интенсивное накопление липосом в первые 40 мин с последующим насыщением, причем накопление сопровождалось быстрым (минуты) разрушением липосом (без выхода на плато, Рис. 6; А,Б).

Данные конфокальной микроскопии согласуются с этими результатами (Рис. 6, В). На изображениях в начальный момент времени липосомы адсорбированы на поверхности клетки и выглядят как мелкие красные точки, которые затем, через 40 и 90 мин, перемещаются ближе к ядру, превращаясь в более крупные зеленые и желтые пятна (желтый цвет соответствует наложению красного и зеленого сигналов).

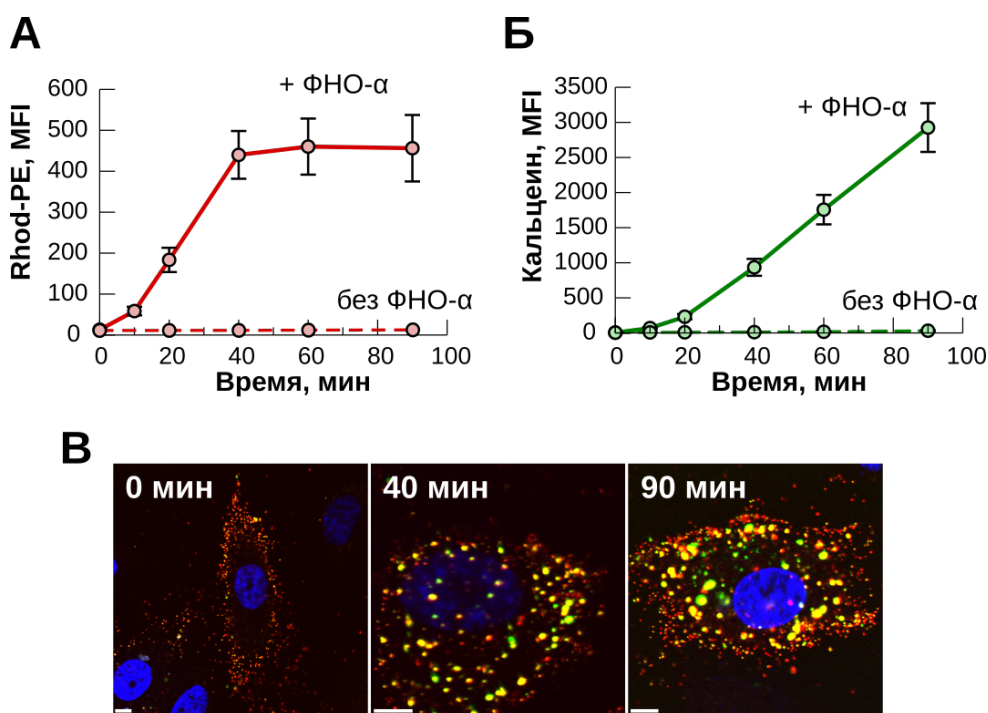


Рис. 6. Связывание и внутриклеточная разгрузка липосом с двумя флуоресцентными метками: мембрана содержит Rhod-PE (красный сигнал), а во внутренний водный объем заключен кальцеин (зеленый сигнал) в концентрации самотушения. **А, Б.** Динамика связывания (**А**) и внутриклеточной разгрузки (**Б**) липосом с 5% SiaLe^x (50 мкМ, суммарные липиды) при инкубации с неактивированными (пунктирная линия) или активированными (сплошная линия) эндотелиальными клетками HUVEC при 37°C. При 37°C активированные HUVEC активно связывают липосомы, причем через 40 мин наступает насыщение, связывание сопровождается быстрой (минуты) интернализацией с нарушением целостности липосом. Данные проточной цитометрии, репрезентативный эксперимент, приведены средние значения ± SE измерений. **В.** Конфокальная микроскопия интернализации SiaLe^x липосом активированными клетками HUVEC. Ядра клеток окрашены Hoechst (синий). Перед экспериментом клетки охлаждали до 4°C и инкубировали с липосомами (5% SiaLe^x 50 мкМ) в течение 30 мин на льду, затем клетки промывали и инкубировали указанное время при 37°C в полной ростовой среде. Масштабная линейка 5 мкм.

Таким образом, с помощью липосом с двумя флуоресцентными метками и проточной цитометрии, мы показали, что SiaLe^x-липосомы претерпевают быструю интернализацию активированными клетками HUVEC, и этот процесс сопровождается разрушением бислоя липосом, которое начинается сразу же после захвата клеткой и продолжается все 1.5 ч наблюдения. Этот процесс также визуализирован с помощью конфокальной микроскопии.

Изучение механизмов взаимодействия с опухолевыми клетками липосом, нагруженных липофильным пролекарством метотрексата

Изучение механизмов взаимодействия с опухолевыми клетками проводили для липосом, нагруженных пролекарством метотрексата MTX-DG (MTX-липосомы, **Рис. 1**).

Накопление липосом опухолевыми клетками. Для оценки вклада **MTX-DG** в накопление липосом различными опухолевыми клетками применяли проточную цитометрию. Липосомы содержали зонд BODIPY-PC. На всех линиях получили минимум в 4 раза лучшее накопление MTX-липосом, по сравнению с липосомами без пролекарства за 60 мин инкубации (**Рис. 7**), на примере клеток A549 (рак легкого человека) и CoLo 357 (клетки рака поджелудочной железы человека). Важно было также сравнить накопление MTX-липосом злокачественными клетками и условно нормальными. В качестве последних мы использовали линии ЗТЗ и НЕК293Т – мышинные фибробласты и эмбриональные клетки почки человека, соответственно. По данным цитометрии, липосомы с **MTX-DG** значительно эффективнее связываются с опухолевыми клетками линии A549 и CoLo 357, чем с нормальными (**Рис. 7**). В целом, липосомы без пролекарства гораздо меньше накапливаются клетками всех линий.

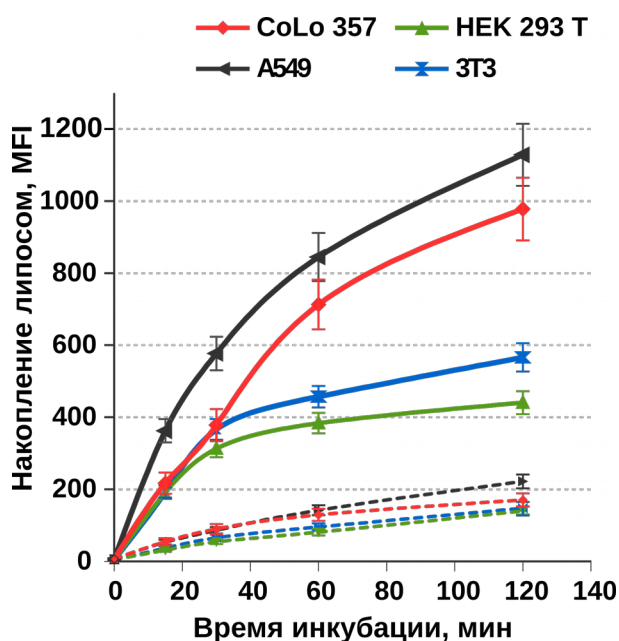


Рис. 7. Накопление липосом несущих метку BODIPY-PC в бислое опухолевыми (CoLo 357, A549) и условно нормальными (НЕК 293Т, ЗТЗ) клетками. Клетки инкубировали с липосомами (100 мкМ суммарные липиды) при 37°C указанные промежутки времени, промывали PBS, суспендировали раствором EDTA и анализировали на проточном цитометре. Данные репрезентативного эксперимента, среднее \pm SE.

Сплошная линия — липосомы нагруженные MTX-DG, пунктир — пустые липосомы (без пролекарства).

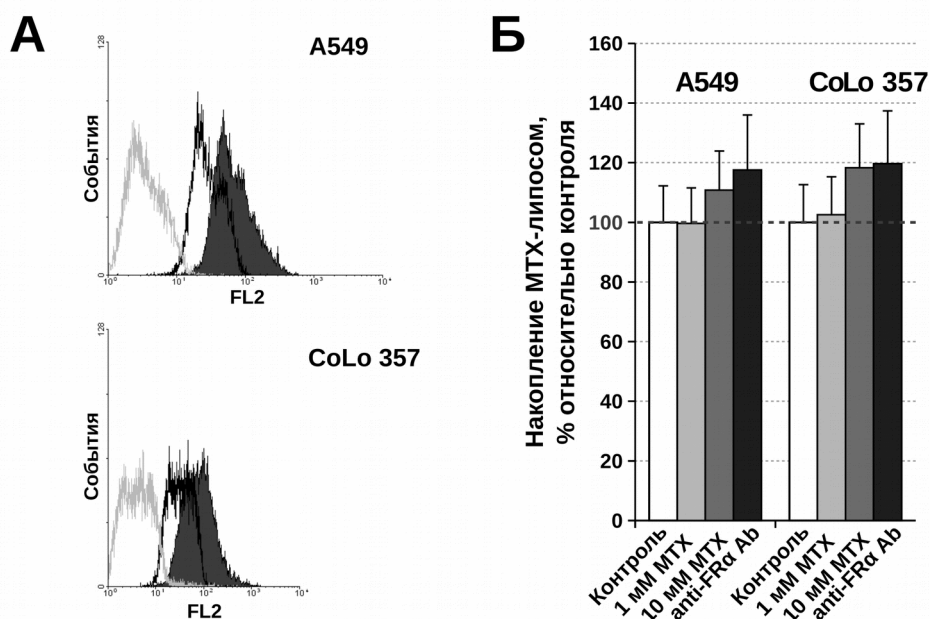


Рис. 8. А. Экспрессия ФР-α клетками A549 и CoLo 357, гистограммы цитофлуориметрии. Серый — аутофлуоресценция клеток, черный — неспецифическая окраска вторичными антителами, черная заливка — иммуноокрашивание антителами к ФР-α. Для проведения иммуноокрашивания клетки были зафиксированы PFA и пермеабелизованы 0.1% Triton X-100. Б. Конкурентное ингибирование накопления МТХ-липосом клетками A549 и CoLo 357 с помощью избытка свободного МТХ (100- и 1000-кратный избыток относительно остатка МТХ-DG в липосомах, 1 мМ и 10 мМ соответственно) и антителами к ФР-α человека (anti-FRα Ab, 10 мкг/мл). Монослой клеток на 24-луночных планшетах инкубировали со свободным МТХ или антителами 1 ч при 37°C, после чего добавляли МТХ-липосомы (100 мкМ суммарные липиды, 10 мкМ МТХ-DG), предварительно промывая клетки PBS или без промывки. Через 1 ч клетки промывали PBS, суспендировали 0.02% EDTA и анализировали на проточном цитометре, приведены средние значения ± SE измерений.

Следующим шагом было проведение конкурентного ингибирования накопления МТХ-липосом опухолевыми клетками с целью выяснения роли специфического связывания во взаимодействии липосом с клетками. В качестве потенциальных рецепторов для МТХ-липосом мы предположили фолатный рецептор-α (ФР-α) и белок-транспортер восстановленных фолатов (RFC). Для оценки нативного уровня экспрессии ФР-α для выбранных клеточных линий было проведено не прямое иммуноокрашивание. По данным проточной цитометрии, все исследованные клеточные линии показали приблизительно одинаковый уровень экспрессии ФР-α: сигнал специфического окрашивания в 2-2.5 раза превышал сигнал контроля окрашивания неспецифическими вторичными антителами (**Рис. 8; А**, на примере A549 и CoLo 357). Избыток высокоаффинных антител к ФР-α (10 мкг/мл) не ингибировал процесс накопления МТХ-липосом клетками (**Рис. 8, Б**). Обработки клеток свободным МТХ в 100- и 1000-кратном избытке в режиме ко-инкубации и последовательной инкубации с МТХ-липосомами также не дали результата (**Рис. 8; Б**). Известно, что МТХ

транспортируется в клетку через RFC, и, в случае его участия в транспорте МТХ-липосом, избыток свободного МТХ должен был бы препятствовать накоплению МТХ-липосом клетками.

Изучение механизма эндоцитоза липосом клеткой. Для выяснения механизмов проникновения МТХ-липосом в клетку мы применили следующие вещества: *хлорпромазин* – ингибитор клатрин-опосредованного эндоцитоза, мембранотропный агент, действующий обратимо; *цитохалазин В* – ингибитор полимеризации актина, затрагивает практически все типы эндоцитоза; *колхицин* – ингибитор полимеризации тубулина; *нокодазол* – деполимеризует микротрубочки, предотвращает слияние транспортных везикул с поздними эндосомами и, следовательно, закисление содержимого транспортных везикул.

Составить однозначное представление о механизмах проникновения МТХ-липосом в клетку оказалось затруднительным, так как ингибирование практически во всех случаях было слишком слабым. Единственным однозначно проявившим себя ингибитором был *хлорпромазин*. Во всех экспериментах он вызывал концентрационно-зависимое снижение накопления липосом – до 40% и менее (**Рис. 9**; данные приведены для клеток А549, для других линий клеток эффекты были схожими). Интересно отметить, что для пустых липосом ингибирование было несколько более выраженным. В связи с этим, можно предположить, что для МТХ-липосом существует дополнительный путь проникновения в клетку (**Рис. 9**). Кроме того, ингибирование накопления МТХ-липосом на ~30% наблюдали под действием *цитохалазина В*, что может говорить о вовлеченности клатрин-независимых путей эндоцитоза в интернализацию липосом, поскольку полимеризация актина играет ключевую роль именно в клатрин-независимых путях эндоцитоза. По всей видимости, МТХ-липосомы проникают в клетку используя множественные механизмы, в том числе и клатрин-независимый эндоцитоз.

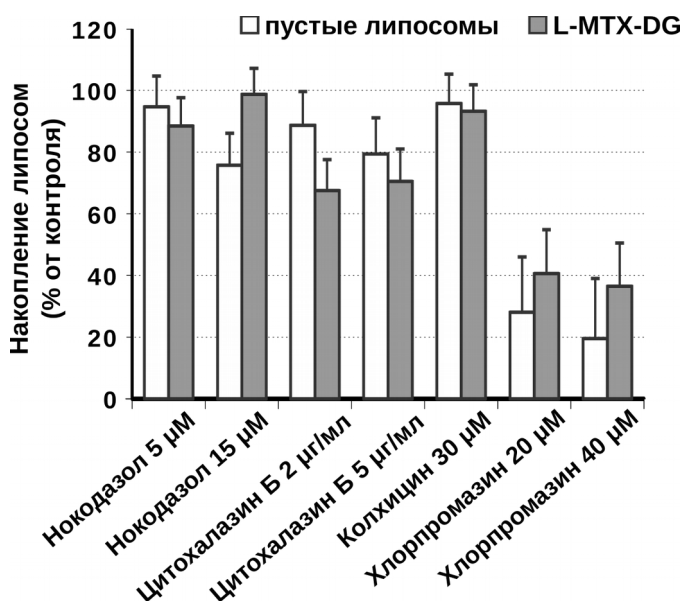


Рис. 9. Определение механизма проникновения липосом в клетку. Накопление липосом в присутствии ингибиторов эндоцитоза и везикулярного трафика на клетках А549. Перед добавлением липосом (100 мкМ, 1 ч, 37°C) клетки были обработаны ингибиторами. Данные представлены относительно накопления липосом контрольными клетками (без ингибиторов, 100%). Данные репрезентативного эксперимента, приведены средние значения \pm SE измерений.

Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки липосом. Как и в экспериментах с SiaLe^x-липосомами (см. выше), для отслеживания связывания и дестабилизации бислоя МТХ-липосом, мы использовали липосомы с двумя флуоресцентными метками и метод проточной цитометрии.

Клетки А549 непрерывно связывали МТХ-липосомы как при 4°C, так и при 37°C, причем связавшиеся липосомы начинали очень медленно дестабилизироваться только при 37°C, что можно интерпретировать как включение компонентов липосом в состав мембранных структур клетки. Важно, что при 4°C сигнал кальцеина не менялся — это позволяет заключить, что внеклеточного раскрытия липосом не происходит и, будучи ассоциированными с клеточной поверхностью, липосомы сохраняют свою целостность.

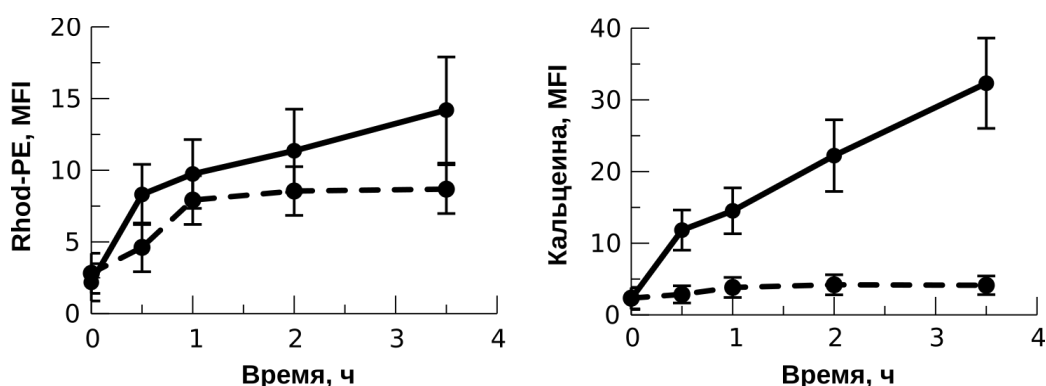


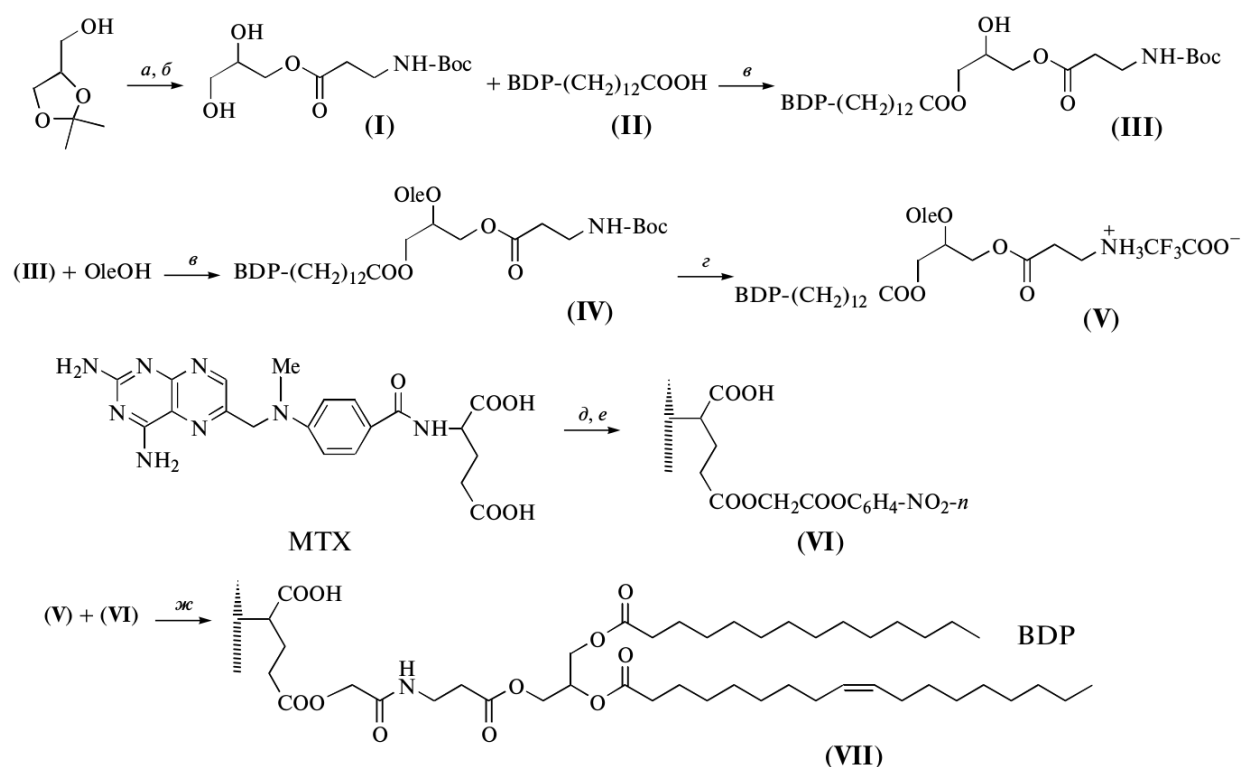
Рис. 10. Кинетика накопления и внутриклеточной разгрузки МТХ-липосом, несущих Rhod-PE в бислое и кальцеин во внутреннем водном объеме. Клетки промывали от ростовой среды, охлаждали на льду, добавляли липосомы в среде без сыворотки (100 мкМ) и инкубировали указанные промежутки времени при 4°C (пунктир) или 37°C (сплошная линия). После чего клетки промывали PBS, суспендировали раствором 0.02% EDTA и анализировали на проточном цитометре. Результаты приведены для клеток линии А549, средние значения \pm SE измерений.

Синтез флуоресцентного аналога липофильного пролекарства метотрексата. С целью изучения внутриклеточного транспорта МТХ-DG нами был разработан синтез его флуоресцентного аналога, несущего BODIPY-метку при концевом метиле алифатической цепи (**BODIPY-MTX-DG**). Стратегия синтеза BODIPY-MTX-DG была выбрана по аналогии с ранее отработанной схемой получения самого пролекарства МТХ-DG [Водовозова и др., Хим.-Фарм. Журн. 2007, Биоорг. химия 2004] с изменениями на стадии ацилирования моноглицерида остатками жирных кислот.

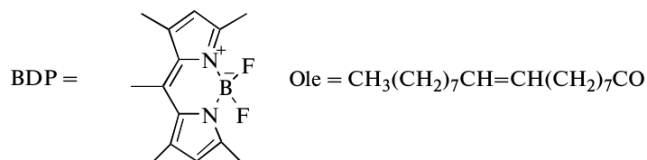
В качестве исходного вещества использовали изопропилиденглицерин, который последовательно ацилировали β -Вос-аланином, жирной кислотой с BODIPY-меткой и

олеиновой кислотой. Для проведения заключительной стадии, получали активированный моноэфир МТХ (VI) и вводили его в реакцию с триглицеридом (V). Целевой продукт (VII) выделяли гель-фильтрацией на липофильном сефадексе с последующей хроматографией на силикагеле; все предшествующие продукты ацилирования выделяли хроматографией на силикагеле. Продукт охарактеризован ¹H-ЯМР, спектрофотометрически и спектрофлуориметрически. Квантовый выход (Q) для нового зонда ($\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}} 498 \text{ нм}/506 \text{ нм}$) был рассчитан относительно стандарта родамина-6G и составил 0.636.

Схема 1.



(a) Вос-β-аланин, DCC, 4-диметиламинопиридин, хлороформ; (б) 1 М HCl–MeOH, 1 : 4, 2 ч;
 (e) DCC, 4-аминопиридин, 4-диметиламинопиридин, хлороформ; (z) TFA; (d) Cs₂CO₃/DMSO;
 (e) (*n*-нитрофенил)йодацетат; (ж) триэтиламин, DMSO.



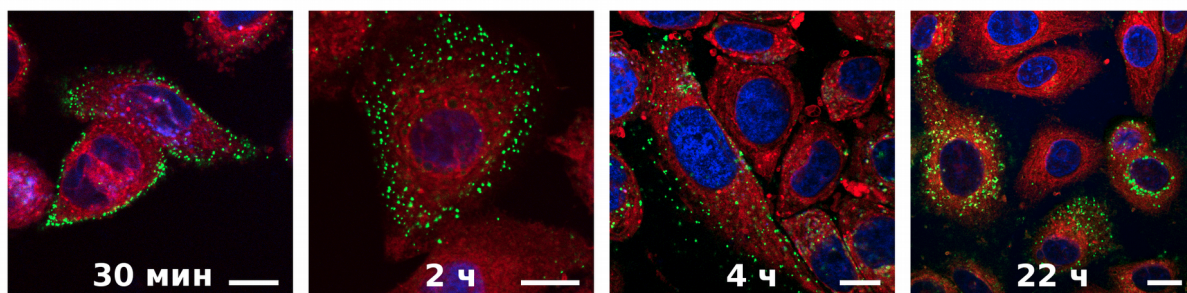


Рис. 11. Конфокальная микроскопия доставки пролекарства метотрексата МТХ-липосомами в клетки А549. Локализация пролекарства показана относительно эндоплазматического ретикулума. Мембрана липосом содержит BODIPY-MTX-DG (зеленый); ЭПР визуализован с помощью ER-трекера (красный); ядра клеток окрашены Hoechst (синий). Перед началом эксперимента клетки охлаждали до 4°C и инкубировали с липосомами (9% мол. МТХ-DG, 1% мол. BODIPY-MTX-DG, 100 мкМ суммарные липиды) 60 мин на льду, промывали и затем инкубировали указанные промежутки времени при 37°C в полной ростовой среде. Масштабная линейка 10 мкм.

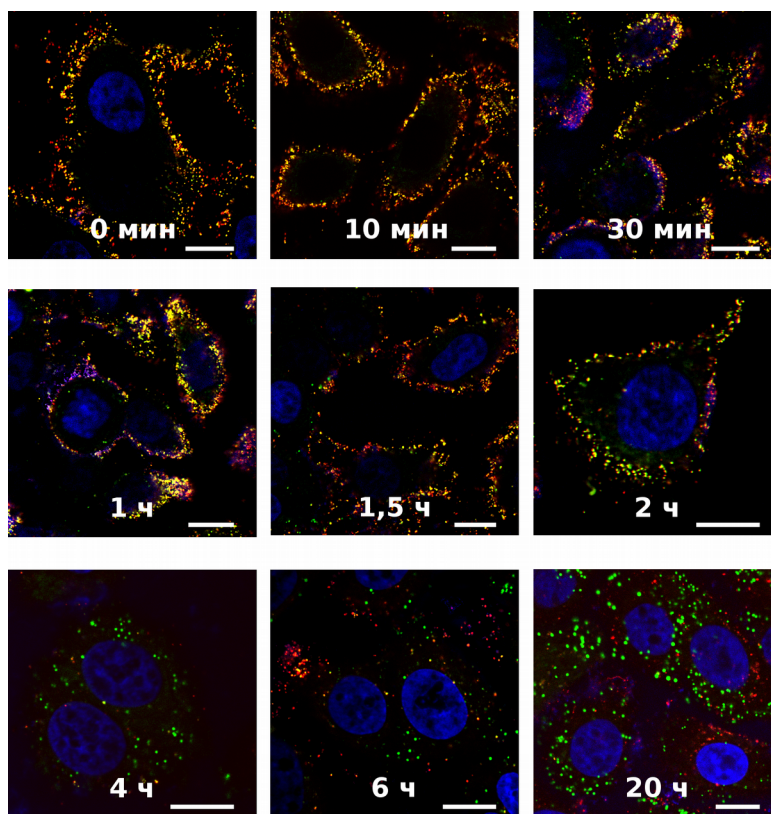


Рис. 12. Конфокальная микроскопия динамики разделение компонентов МТХ-липосом в клетках А549. Мембрана липосом содержит фосфолипидный зонд Rhod-PE (красный) и BODIPY-MTX-DG (зеленый); ядра клеток окрашены Hoechst (синий). Перед началом эксперимента клетки охлаждали до 4°C и инкубировали с липосомами (9% мол. МТХ-DG, 1% мол. BODIPY-MTX-DG, 1% мол. Rhod-PE, 100 мкМ суммарные липиды) 30 мин на льду, промывали и затем инкубировали указанные промежутки времени при 37°C в полной ростовой среде. Масштабная линейка 10 мкм.

Внутриклеточное распределение липофильного пролекарства метотрексата. С помощью синтезированного флуоресцентного аналога МТХ-DG были получены данные о его внутриклеточном распределении в клетках А549, дополнительно окрашенных трекером эндоплазматического ретикулула (**Рис. 11**). Сначала клетки инкубировали с липосомами на льду, чтобы исключить эндоцитоз, затем отмывали от несвязавшихся липосом и переносили в физиологические условия. Судя по динамике внутриклеточной доставки, процесс идет достаточно медленно, 2 ч и более, что согласуется с данными проточной цитометрии о медленной дестабилизации МТХ-липосом (**Рис. 10**). Причем зонд обнаруживается в клетке в составе везикулярных структур, в то время как ЭПР окрашивается диффузно, что свидетельствует об отсутствии встраивания пролекарства метотрексата в его структуру. Через 20 ч BODIPY-МТХ-DG локализуется в околядерной области.

Локализацию пролекарства МТХ в клетке проверяли также относительно белковых маркеров: EEA1 (early endosome antigen-1, маркер ранних эндосом) и Golgin-97 (специфический белок аппарата Гольджи). Показано, что метчик Golgin-97 и **BODIPY-МТХ-DG** локализуются в разных участках клетки как через 1 ч, так и через 3 ч инкубации, то есть накопления пролекарства в аппарате Гольджи, скорее всего, не происходит (данные не приведены). При использовании EEA1 в некоторых случаях после 3-ч инкубации детектировали редкие совпадения локализации.

Внутриклеточный транспорт отдельных компонентов МТХ-липосом. Для отслеживания внутриклеточного транспорта отдельных компонентов МТХ-липосом — пролекарства и матричных липидов — бислой метили как **BODIPY-МТХ-DG**, так и **Rhod-PE** (референсный матричный липид). Клетки А549 выдерживали с липосомами на льду, отмывали от несвязавшихся липосом и затем инкубировали при 37°C в полной ростовой среде. Результаты мониторинга, представленные на **Рис. 12**, подтверждают медленное проникновение МТХ-DG в клетки. В начальный момент инкубации связанные с клетками липосомы выглядят как желтые и желто-красные яркие точки (наложение зеленого и красного сигналов флуоресценции) по контуру мембран клеток. Принципиально картина начинает меняться через 2 ч, когда наряду с желтыми и желто-красными пятнами появляются участки с зеленым окрашиванием. Процесс разделения красного и зеленого флуорофоров максимально отчетливо виден через 4 ч инкубации и позже.

Таким образом, связанные с поверхностью клетки МТХ-липосомы интернализируются через 1.5-2 ч. При этом начинается разделение компонентов липосом, то есть осуществляется внутриклеточная разгрузка. В цитоплазме везикулярное распределение пролекарства сохраняется вплоть до 20 часов, однако эти везикулы не относятся к какой-либо органелле клетки.

Выводы

- 1) Показано, что механизмы взаимодействия с клетками-мишенями наноразмерных липосом, сформированных на основе природных фосфолипидов и липофильных пролекарств, зависят от структуры лекарства, наличия на поверхности липосом специфического лиганда и типа клеток.
- 2) Установлено, что включение липофильного конъюгата лиганда селективных тетрасахарида SiaLe^x в состав липосом с липофильным пролекарством мелфалана (Mlph-DG), обеспечивает специфическое связывание липосом с эндотелиальными клетками, активированными провоспалительным цитокином.
- 3) Показано, что активированные клетки быстро (в течение минут) интернализуют связанные SiaLe^x-липосомы, при этом липосомы дестабилизируются, что свидетельствует о внутриклеточном высвобождении пролекарства.
- 4) Показано, что сродство SiaLe^x-липосом к активированным эндотелиальным клеткам увеличивается пропорционально количеству SiaLe^x-конъюгата в составе липосом. Неактивированные клетки связывают липосомы лишь незначительно, вне зависимости от наличия SiaLe^x-конъюгата. Таким образом реализуется потенциал направленного действия липосом на эндотелиальные клетки в очагах воспаления и опухоли.
- 5) Установлено, что включение липофильного пролекарства метотрексата (MTX-DG) в липосомы способствует их взаимодействию с опухолевыми клетками. Показано, что эндоцитоз липосом опухолевыми клетками осуществляется посредством нескольких механизмов, в том числе с помощью клатрин-независимого пути. Предполагается рецепторно-опосредованный механизм, но без участия фолатного рецептора и транспортера восстановленных фолатов.
- 6) С помощью синтезированного флуоресцентного аналога MTX-DG установлено, что липосомы после связывания с клеткой остаются на ее поверхности 1.5-2 ч и затем медленно интернализуются. Через 20 ч флуоресцентный аналог локализуется в околоядерной области. Пролекарство и матричные липиды липосом поступают в клетку отдельно, то есть осуществляется внутриклеточная разгрузка липосом.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Alekseeva A.S.**, Moiseeva E.V., Onishchenko N.R., Boldyrev I.A., Singin A.S., Budko A.P., Shprakh Z.S., Molotkovsky J.G., Vodovozova E.L. (2017). Liposomal formulation of a methotrexate lipophilic prodrug: assessment in tumor cells and mouse T-cell leukemic lymphoma. *Int J Nanomedicine*, 12, 3735–3749.
2. **Alekseeva A.S.**, Капкаева М.Р., Шчегловитова О.Н., Болдырев И.А., Пазынина Г.В., Бовин Н.В., Vodovozova E.L. (2015). Interactions of antitumour Sialyl Lewis X liposomes with vascular endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA — Biomembranes.)*, 1848 (5), 1099–1110.
3. Власенко Ю.В., **Алексеева А.С.**, Водовозова Е.Л. (2014). Синтез флуоресцентного аналога липофильного пролекарства метотрексата. *Биоорг. Хим.*, 40 (1), 114–117

Тезисы конференций и симпозиумов:

1. **Alekseeva A.S.**, Капкаева М.Р., Scheglovitova O.N., Svirshchevskaya E.V., Vodovozova E.L. «Specific Binding and Accumulation of SiaLe^x-targeted Liposomes in HUVECs», ILS Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, UCL School of Pharmacy, London, UK, 14-17 December 2013, p. 66
2. **Алексеева А.С.**, Кузнецова Н.Р., Капкаева М.Р., Шчегловитова О.Н., Болдырев И.А., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г., Водовозова Е.Л. «Взаимодействие противоопухолевых липосом, несущих углеводный лиганд селектинов, с эндотелиальными клетками сосудов крови», Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, Москва, 15-19 сентября 2014, Acta naturae, спецвыпуск, стр. 54
3. **Alekseeva A.S.**, Капкаева М.Р., Scheglovitova O.N., Svirshchevskaya E.V., Pazyнина G.V., Vodovozova E.L. «Binding and accumulation of SiaLe^x-targeted liposomes by endothelial cells», Liposome Research Days Living Innovation, Copenhagen, Denmark, 4-7 August 2014, p. 8
4. **Алексеева А.С.**, Капкаева М.Р., Шчегловитова О.Н., Свирщевская Е.В., Пазынина Г.В., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г., Водовозова Е.Л. «Специфическое связывание и накопление цитотоксических липосом с вектором направленной доставки в эндотелиальных клетках», XXVI зимняя молодежная научная школа Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии, Москва, 10-14 февраля 2014, стр. 121

5. **Алексеева А.С.**, Кузнецова Н.Р., Капкаева М.Р., Щегловитова О.Н., Степанова Е.В., Бовин Н.В., Водовозова Е.Л. «Взаимодействие противоопухолевых липосом, несущих углеводный лиганд селектинов, с эндотелиальными клетками сосудов крови», XXVII зимняя молодежная научная школа Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии, 9-12 февраля 2015, стр. 7
6. **Alekseeva A.S.**, Vodovozova E.L. «Liposomal formulation of a methotrexate lipophilic prodrug: interactions with cells in vitro», Biomembranes 2016: mechanisms of aging and age-related diseases, Dolgoprudny, 26-30 September 2016, p. 73
7. **Алексеева А.С.**, Водовозова Е.Л. «Липосомальная форма пролекарства метотрексата: взаимодействие с опухолевыми клетками человека», V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Сочи, 4-8 октября 2016, ActaNaturae, спецвыпуск, Т. 2, стр. 151.
8. **Alekseeva A.S.**, Tretiakova D.S., Vodovozova E.L. “Liposomal formulation of a methotrexate lipophilic prodrug: assessment in tumor cells”, International Liposome Society and Liposome Research Days Combined Conference “Liposome Advances: progress in drug and vaccine delivery”, Athens, Greece, 16-18 September 2017, p. 52

Автор благодарит д.м.н. проф. О.Н. Щегловитову (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Минздрав РФ) за любезное предоставление первичной культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Сердечную благодарность автор выражает научному руководителю д.х.н. Е.Л. Водовозовой и всему коллективу лаборатории химии липидов ИБХ РАН, в особенности к.х.н. И.А. Болдыреву, к.х.н. Н.Р. Онищенко (Кузнецовой) и аспиранту Д.С. Третьяковой за поддержку и помощь в работе. Автор благодарит д.х.н. проф. Ю.Г. Молотковского за помощь в работе над текстом диссертации. Автор также благодарит к.б.н. Е.В. Свирщевскую и всю лабораторию клеточных взаимодействий ИБХ РАН за консультативную и деятельную помощь при проведении экспериментов и любезно предоставленный доступ к оборудованию.