

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

На правах рукописи

Третьякова Дарья Сергеевна

**Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих
липофильные пролекарства в бислое, с компонентами плазмы
крови**

специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2020

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

Научный руководитель:

Водовозова Елена Львовна, доктор химических наук, заведующий лабораторией химии липидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Официальные оппоненты:

Маслов Михаил Александрович, доктор химических наук, доцент, директор Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "МИРЭА - Российский технологический университет".

Остроумова Ольга Сергеевна, доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией моделирования мембран и ионных каналов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится 24 июня 2020г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 20__ г

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Проблема высокой системной токсичности химиотерапевтических средств занимает одно из центральных мест в клинической онкологии. Применение наноразмерных систем доставки лекарств представляется одним из наиболее рациональных подходов к решению этой проблемы. Включение в наноразмерный носитель позволяет не только защитить лекарство от нецелевых взаимодействий с биомолекулами и преждевременного разложения, но и обеспечить его усиленное поглощение в очаге патологии. Среди известных наночастиц наибольшей био- и гемосовместимостью отличаются липосомы. Средства на основе липосом, предназначенные для системного введения, лидируют на мировом рынке наномедицинских препаратов. Для лечения онкологических заболеваний разработаны и коммерчески доступны липосомальные формы таких цитостатических/цитотоксических агентов как доксорубицин, даунорубицин, citarabin, винкристин, иринотекан (Doxil[®], Myocet[®], Depocyt[®], Marqibo[®], Onivide[®]). За рубежом десятки препаратов на основе липосом проходят клинические исследования.

Взаимодействие липосом с компонентами крови — первый физиологический барьер на пути к целевым клеткам и тканям. При контакте с плазмой крови любой наночастицы покрывается белками и их комплексами с липидами, образуется так называемая белковая корона. Она модифицирует физико-химические свойства поверхности наночастицы, влияет на его поведение в кровотоке, на фармакокинетику и биораспределение инкапсулированного лекарства. Комплекс наночастицы с белками становится новой системой доставки [Monopoli et al. Nat. Nanotechn. 2012]. Картина взаимодействий белков плазмы с липосомами остается фрагментарной. Белки-опсоны, которые часто детектируют в коронах, способствуют узнаванию липосом рецепторами иммунокомпетентных клеток и потере стабильности. При введении липосомальных препаратов Doxil[®], Ambisome[®] и др. у значительной части пациентов отмечают реакции гиперчувствительности различной степени тяжести, связанные с активацией системы комплемента (СК) [Szebeni et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 2011]. Поэтому исследование поведения новых липосомальных препаратов в плазме крови актуально.

Липосомы, разработанные в лаборатории химии липидов ИБХ РАН, представляют собой 100-нм моноламеллярные везикулы, несущие в жидкофазном бислое диолеоилглицеридные сложноэфирные конъюгаты (липофильные пролекарства) химиотерапевтических препаратов: мелфалана (Mlph) — цитотоксического алкилирующего агента, и метотрексата (MTX) — цитостатика, антиметаболита фолиевой кислоты [Водовозова и др. Росс.

нанотехнол. 2008]. Матрица липосом составлена из яичного фосфатидилхолина и фосфатидилинозита из сои или из *S. cerevisiae*. Включение в липосомы мелфалана и метотрексата в виде липофильных производных в бислое позволяет получить терапевтически значимую загрузку. Метод внешней загрузки (remote loading) для этих лекарств не применим. Кроме того, липидный бислой способен стабилизировать гидролитически нестабильные 2-хлорэтильные группы мелфалана, как было показано для липофильного пролекарства хлорамбуцила в липосомах [Pedersen et al. *J. Med. Chem.* 2009].

Терапевтическая эффективность липосом с пролекарствами M1ph и МТХ подтверждена *in vivo* на моделях опухолей мышей с лейкозом Р-388 [Козлов и др. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 1997], аденокарциномой молочных желез [Vodovozova et al. *Eur. J. Cancer.* 2000], карциномой легких Льюис [Kuznetsova et al. *J. Drug Target.* 2014], острой Т-клеточной лимфомой [Alekseeva et al. *Int. J. Nanomedicine* 2017]. В тестах с кровью *in vitro* липосомы не влияли на эритроциты и тромбоциты, однако метотрексат-содержащие липосомы (МТХ-липосомы) активировали систему комплемента [Kuznetsova et al. *J. Control. Release* 2012].

Состояние разработанных липосомальных препаратов в плазме крови ранее не исследовалось. Кроме того, приведенные выше результаты получены только для липосом базового фосфолипидного состава, неоптимизированного с точки зрения фармакологических свойств. Введение в мембрану липосом компонентов, экранирующих от взаимодействия с белками, может повысить стабильность бислоя и уменьшить вероятность опсонизации. В связи с этим изучение влияния экранирующих молекул в бислое на взаимодействия липосом с белками плазмы актуально.

Цели и задачи

Цель настоящей работы — изучение влияния стабилизирующих молекул в бислое на взаимодействия наноразмерных липосом, несущих липофильные пролекарства метотрексата и мелфалана, с компонентами плазмы и крови. Задачи:

1. Проверить участие классического и альтернативного путей в активации системы комплемента (СК) МТХ-липосомами.

2. Исследовать взаимодействия МТХ-липосом с субпопуляциями лейкоцитов крови человека, как последствия опсонизации липосом белками СК. В задачу входит определение влияния на этот процесс защитных амфифильных молекул, отличных от конъюгатов PEG, в том числе фосфатидилинозита (PI), ганглиозида GM₁ и конъюгата N-карбоксиметилированного олигоглицина с фосфатидилэтаноламином (пептидолипида SMG-PE).

3. Исследовать стабильность липосом с пролекарством мелфалана (M₁ph-липосом), не активирующих СК, в сыворотке крови человека и влияние на этот параметр защитных амфифильных молекул в бислое.

4. Изучить взаимодействия M₁ph-липосом различного состава с сывороточным альбумином на субмолекулярном уровне.

Научная новизна и практическая значимость работы

Впервые установлено, что введение липофильного пролекарства метотрексата в мембрану липосом стимулирует их захват моноцитами крови человека. В связи с этим МТХ-липосомы представляют интерес не только для терапии злокачественных заболеваний крови, но и для лечения ряда воспалительных заболеваний, в патобиологии которых участвуют моноциты, таких как артрит, воспалительные заболевания кишечника, хроническая обструктивная болезнь легких и различные формы гломерулонефрита [*Shi et al. Nat. Rev. Immunol. 2011*]. Но так как МТХ-липосомы даже при наличии экранирующих молекул связывают и расщепляют белок С3, необходимо учитывать возможность возникновения инфузионных реакций и предпринимать меры по их профилактике [*Szebeni et al. Nat. Nanotechnol. 2018*].

Для липосом с пролекарством мелфалана впервые проведено сравнение способности фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁, пептидолипида SMG-PE и PEG-липида стабилизировать жидкофазную мембрану на основе яичного фосфатидилхолина (ePC) в сыворотке крови человека. Показано, что ганглиозид и пептидолипид лучше, чем PI защищают бислой. Установлено, что PEG-липид разрушает мембрану M₁ph-липосом за счет диссоциации в водную фазу. Пегилирование стабилизировало конденсированный липидный бислой в жидкокристаллической упорядоченной (LO, liquid ordered) фазе – из дистеароилфосфатидилхолина с достаточным количеством холестерина. Однако при получении таких липосом требуется нагрев (~60°C), что вызывает преждевременный гидролиз активных хлорэтильных групп остатка мелфалана. Кроме того, у пациентов все чаще обнаруживаются антитела к PEG-цепям, поэтому введение таких препаратов негативно скажется на состоянии больного и потребует изменения режима лечения.

Необходим поиск альтернативных защитных молекул для создания липосом с достаточным временем циркуляции в кровотоке и минимальным риском реакций гиперчувствительности. В связи с этим, полученные нами результаты изучения стабильности M₁ph-липосом в сыворотке крови человека имеют практическое значение. Препарат лиофилизированных M₁ph-липосом с фосфатидилинозитом уже показал значительное преимущество по сравнению с Алкераном® (мелфаланом) в исследованиях острой токсичности и переносимости на крысах, а также противоопухолевой эффективности на

модели рака молочных желез мышей [Tretiakova et al. *Curr. Drug. Deliv.* 2020]. Можно ожидать, что замена PI на ганглиозид GM₁ или пептидолипид будет способствовать дальнейшему улучшению фармакологических свойств липосом.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала этапы химического синтеза липофильного производного МТХ, конструирования липосом различного состава, их характеристики и анализа взаимодействий с компонентами плазмы крови. Пролекарство МТХ синтезировали в три стадии из фармакопейного препарата по опубликованной методике. Липосомы получали стандартным методом экструзии через фильтры с калиброванными наноразмерными порами. Размеры липосом определяли с помощью фотонной корреляционной спектроскопии (*sin* динамическое рассеяние света, DLS) или методом анализа траекторий движения наночастиц (NTA), ζ-потенциалы – с помощью DLS. Взаимодействия липосом с белками плазмы и стабильность исследовали с помощью биохимических и физико-химических методов анализа: гель-хроматографии, гель-электрофореза, иммуноблоттинга, флуоресцентной и ИК-спектроскопии. Для МТХ-липосом оценивали поглощение лейкоцитами крови методом проточной цитометрии.

Основные положения, выносимые на защиту

Новые данные о связывании белков плазмы липосомальными препаратами с пролекарством метотрексата позволили сделать вывод, что активация системы комплемента МТХ-липосомами осуществляется по механизмам как классического, так и альтернативного путей.

Установлено, что МТХ-липосомы вызывают фрагментацию центрального компонента системы комплемента белка C3 независимо от наличия в мембране экранирующих молекул: фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁ и пептидолипида SMG-PE. Пролекарство метотрексата в мембране липосом стимулирует их фагоцитоз моноцитами крови человека.

Установлено, что ганглиозид GM₁ и пептидолипид SMG-PE стабилизируют липосомы с пролекарством мелфалана (M₁ph-липосомы) в сыворотке крови человека не менее 24 ч, фосфатидилинозит – не менее 4 ч.

Обнаружено, что связывание сывороточного альбумина на поверхности M₁ph-липосом, содержащих фосфатидилинозит или ганглиозид GM₁, не влияет на структуру липидного бислоя. В отсутствие экранирующих молекул альбумин внедряется в гидрофобную часть бислоя, что сопровождается конформационными изменениями и агрегацией белка.

На примере липосом с пролекарством мелфалана обнаружено, что включение PEG-липида в жидкокристаллический или гелевый липидный бислой приводит к быстрому разрушению липосом в сыворотке. Достаточный

уровень пегилирования (10 мол %) стабилизирует липидный бислои, имеющий жидкокристаллическую упорядоченную фазу LO, т.е. содержащий не менее 30 % холестерина.

Апробация работы

Материалы работы представлены в виде устных и стендовых докладов на 13 конференциях и конгрессах: на XXVIII, XXIX, XXX и XXXII Зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016, 2017, 2018 и 2020), на двух международных конференциях «Liposome Research Days» (Афины, Греция, 2017 и Саппоро, Япония, 2019), на двух конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017 и 2019), на 11-м европейском саммите «Clinical Nanomedicine, targeted delivery and precision medicine» — CLINAM (Базель, Швейцария, 2018), на конференции «Биомембраны» (Долгопрудный, Россия, 2018), на XIV и XV Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2017 и 2018), на V съезде биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016).

По материалам работы опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 146 страницах, включает 31 рисунок и 4 таблицы. Рукопись состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 270 ссылок, а также содержит 2 приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты исследования

Исследовали взаимодействия с компонентами плазмы крови липосом, содержащих липофильные пролекарства метотрексата (MTXDG) и мелфалана (MlphDG). В матрицу бислоя из яичного фосфатидилхолина ePC вводили в качестве экранирующих молекул фосфатидилинозит PI, ганглиозид GM₁ или пептидолипид SMG-PE (**Рис. 1**).

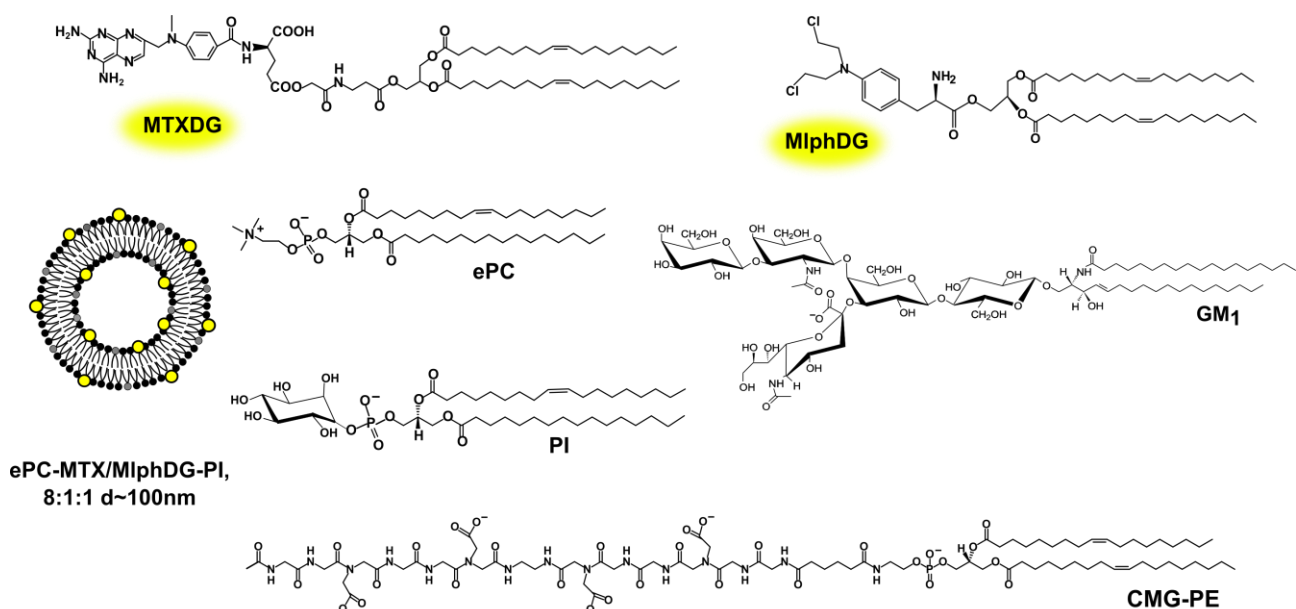


Рис. 1. Схематичное изображение липосомы базового состава и структур пролекарств метотрексата *MTXDG* и мелфалана *MlphDG*, фосфатидилхолина *ePC*, фосфатидилинозита из сои *PI*, ганглиозида из бычьего мозга *GM₁* (приведены репрезентативные структуры липидов из природных источников) и пептидолипида *CMG-PE*.

2. Липосомы с липофильным пролекарством метотрексата

2.1. Пути активации системы комплемента *MTX*-липосомами

Исследование проведено на липосомах базового состава *ePC*–*MTXDG*–*PI*, 8:1:1 (**Рис. 1**) (далее *ePC* в липосомах обозначен “L”), для которых была обнаружена активация СК в тестах на гемосовместимость. Липосомы инкубировали в свежесобранной 80%-ной плазме крови человека (использовали объединенную плазму 4-6 здоровых доноров) или в плазме, предварительно обработанной этиленгликольтетраацетатом (EGTA) с добавлением ионов Mg^{2+} . EGTA полностью блокирует классический и лектиновый пути активации СК за счет преимущественного связывания ионов Ca^{2+} , которые необходимы для функционирования белка C1. Ионы Mg^{2+} , от которых зависит альтернативный путь, EGTA хелатирует менее эффективно. При добавлении ионов Mg^{2+} к самому EGTA его влияние на альтернативный путь пренебрежимо мало.

Для отслеживания динамики связывания белков инкубацию проводили в течение 5 и 30 мин. Липосом-белковые комплексы выделяли с помощью гель-хроматографии на сефарозе, проводили их делипидизацию и анализировали белки с помощью электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга. После неспецифического окрашивания геля серебром (**Рис. 2А**) для всех образцов детектировали альбумин, а также, предположительно, фибриноген (~55 кДа), β -цепь компонента СК C3 (~79 кДа) и фрагменты его α' -цепи (~45 кДа и ~30 кДа). По данным иммуноблоттинга, со временем количество белка C3, IgG и IgM (см. диссертацию) в комплексе с липосомами увеличилось. C3 представлен

субъединицами α (~118 кДа) и β (~79 кДа) и фрагментами его инактивированного продукта iC3b ~52 и ~46 кДа (**Рис. 2Б**, дорожки “1” и “2”). Снижение интенсивности полос белка C3 и IgG при инкубации в плазме, обработанной EGTA/Mg²⁺, свидетельствует об ингибировании классического пути активации СК (**Рис. 2Б,В**, дорожки “3”). С другой стороны, сохранение остаточного связывания C3, указывает на развитие альтернативного пути СК. Кроме того, образование комплексов МТХ-липосом с IgM не зависело от ионов Ca²⁺ в среде. Наконец, фактор Н — естественный ингибитор альтернативного пути, который присутствует в плазме в значительных количествах, — концентрировался на липосомах очень слабо (**Рис. 2Г**). По мнению ряда авторов (например, [Wang et al. Front. Immunol. 2016]), альтернативный путь СК играет ключевую роль в распознавании наночастиц в плазме человека. Наши результаты показывают, что активация СК МТХ-липосомами затрагивает как классический, так и альтернативный пути.

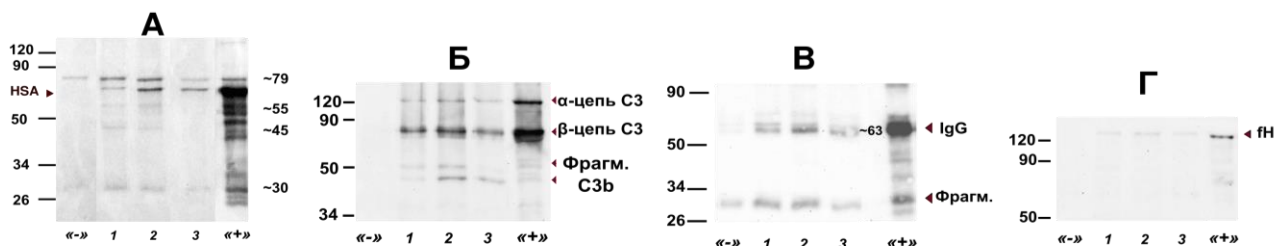


Рис. 2. Разделение белков, ассоциированных с липосомами L-MTXDG-PI, электрофорезом по Лэммли, окрашивание серебром (**А**): “-” – контроль, плазма после инкубации с PBS, гель-хроматографии и делипидизации; белки, связанные после инкубации липосом с плазмой 5 (1) и 30 мин (2); белки, связанные после 30-мин инкубации липосом с плазмой, обработанной смесью EGTA/Mg (3); “+” – контроль, плазма в разведении 1/500. Идентификация белков с помощью антител к компонентам СК C3 (**Б**) и фактору Н (**Г**) и к IgG (**В**, полоса ~29 кДа может быть отнесена к легкой цепи IgG, Fv-фрагментам или восстановленному Fab-фрагменту).

2.2. Влияние экранирующих компонентов в мембране МТХ-липосом на взаимодействие с лейкоцитами

Поскольку опсонизация наноносителя белками СК способствует его распознаванию иммунокомпетентными клетками, следующей задачей было изучение влияния экранирующих молекул (10 мольн. %) в мембране МТХ-липосом — фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁ и пептидолипида SMG-PE (**Рис. 1**) — на взаимодействие с лейкоцитами.

Взаимодействие липосом с лейкоцитами цельной крови человека исследовали методом проточной цитофлуориметрии. В бислой липосом встраивали 1 мольн. % липидного зонда ТМВ-РС (структуру см. **Рис. 7А**). Перед проведением FACS-анализа эритроциты лизировали гипотоническим буфером и к образцам добавляли тушитель флуоресценции кристаллический фиолетовый для исключения из анализа адсорбированных, но не

фагоцитированных липосом. Репрезентативные гистограммы FACS-анализа представлены на **Рис. 3**.

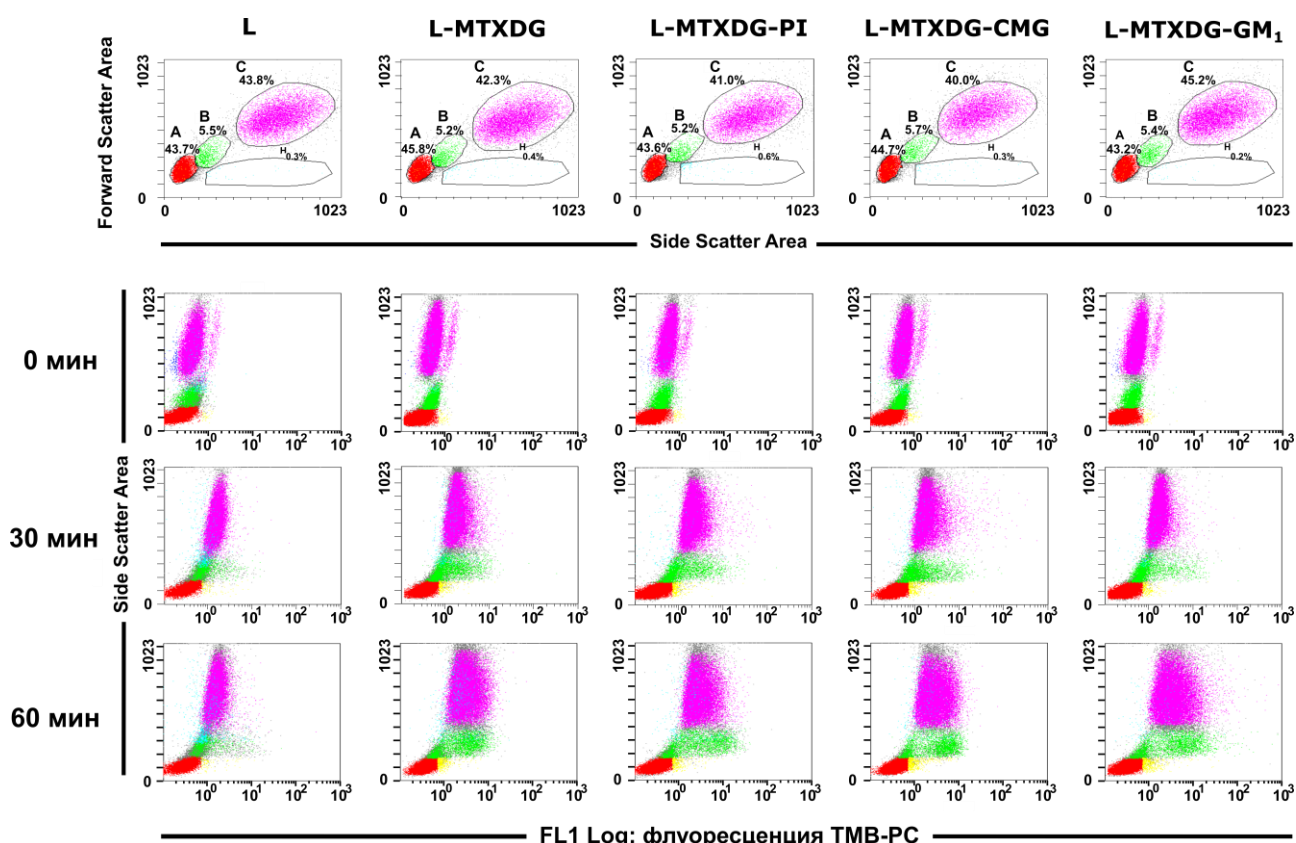


Рис. 3. Пример гистограмм FACS-анализа образцов крови после инкубации с МТХ-липосомами и лизиса эритроцитов. Верхняя панель: распределение клеток периферической крови в образцах без липосом, FS – малоугловое светорассеяние, SS – светорассеяние под углом 90°, А, красный – лимфоциты, В, зеленый – моноциты, С, фиолетовый – нейтрофилы. Панели 0, 30, 60 мин: флуоресценция фагоцитированных липосом, «гейтированная» по субпопуляциям лейкоцитов (желтые зоны – клетки с неполностью затушенной флуоресценцией липосом на поверхности).

Лимфоциты не поглощают липосомы. В захвате МТХ-липосом задействовано значительно больше моноцитов, чем в случае липосом без МТХDG, вне зависимости от наличия экранирующих молекул (Рис. 4А). Последние лишь замедляют фагоцитоз МТХ-липосом, но к 60 мин все различия между образцами нивелируются, в фагоцитозе участвуют примерно 60-70 % моноцитов и 98 % нейтрофилов (Рис. 4Б).

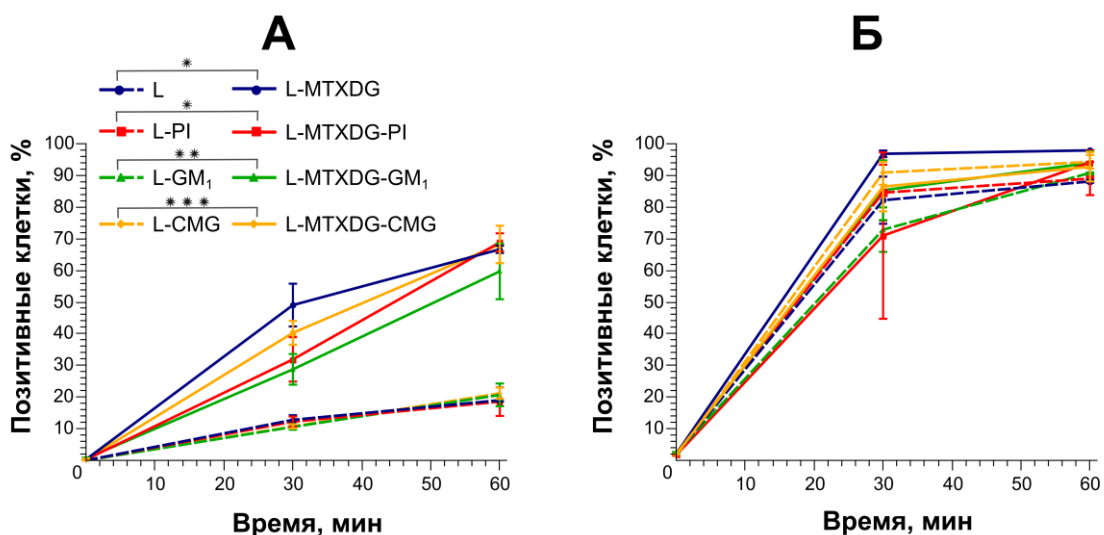


Рисунок 4. Кинетика поглощения липосом моноцитами (А) и нейтрофилами (Б) цельной крови человека *ex vivo*. Приведены средние значения $\pm SE$ двух независимых экспериментов, каждый в двух повторях; значения * $p < 0.04$, ** $p < 0.02$, *** $p = 0.002$ приведены для 30-мин инкубации.

Удельная интенсивность поглощения липосом нейтрофилами значительно ниже, чем моноцитами (см. диссертацию): популяция первых в ~ 7 раз больше, но нейтрофил поглощает почти в 15 раз меньше липосом, чем моноцит. Очевидно, что введение MTXDG в липосомы стимулирует их фагоцитоз моноцитами за счет экспонирования на поверхности липосом остатка MTX и его доступности для взаимодействия с белком С3: при инкубации в плазме все варианты MTX-липосом вызывали его значительную фрагментацию (Рис. 5). Особенно сильный эффект в случае GM1 и CMG-липосом будет предметом дальнейших исследований.

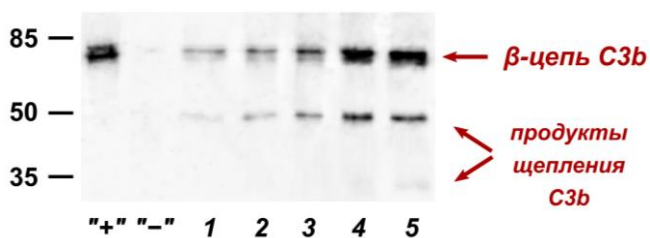


Рисунок 5. Идентификация ассоциированного с липосомами компонента СК С3 антителами: “+”, плазма в разведении 1/500; “-”, плазма после инкубации с PBS, гель-хроматографии и делипидизации; 1-5, образцы липосом L (1), L-MTXDG (2), L-MTXDG-PI (3), L-MTXDG-GM₁ (4), L-MTXDG-CMG-PE (5).

3. Липосомы с липофильным пролекарством мелфалана

3.1. Влияние экранирующих компонентов в мембране на стабильность Mph-липосом в сыворотке крови

Вытекание кальцеина из липосом

Образцы липосом (Таблица 1), содержащие 80-мМ раствор кальцеина в PBS во внутреннем объеме, инкубировали в буфере и в 80% сыворотке крови человека при 37°C. При нарушении целостности мембраны самозатухающий

раствор кальцеина высвобождается из липосом, и детектируется разгорание его флуоресценции.

Таблица 1. Состав и физико-химические характеристики липосом

Состав бислоя (мольн.)	Диаметр, нм*	Дзета-потенциал, мВ**
ePC–MlphDG, 9:1	90 ± 2	+18
ePC–MlphDG–PI, 8:1:1	90 ± 2	-25
ePC–MlphDG–GM ₁ , 9:1:0.2	88 ± 2	+5
ePC–MlphDG–GM ₁ , 8:1:1	89 ± 2	-30
ePC–MlphDG–CMG-PE, 9:1:0.2	86 ± 2	-31
ePC–MlphDG–CMG-PE, 8:1:1	87 ± 1	-66

*Данные получены методом NTA; приведены доверительные интервалы (p = 95%)

**Измерения DLS; данные для 200-нм липосом

Кривые изменения флуоресценции кальцеина приведены на **рисунке 6**. В жидкофазной мембране кальцеин может проходить через водные микроканалы без ее разрушения [Maherani et al. 2013].

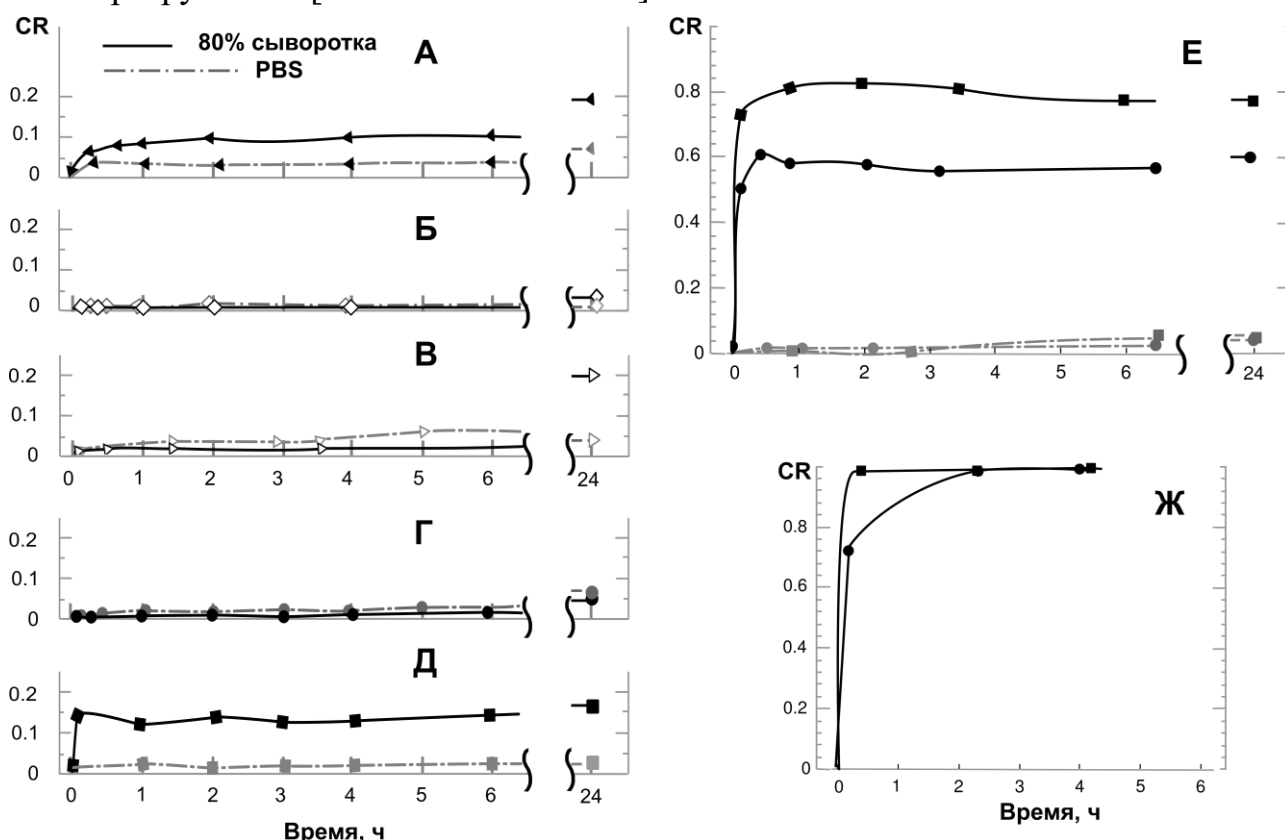


Рис. 6. Высвобождение кальцеина в сыворотке (сплошные кривые) и буфере (пунктир) из липосом ePC–MlphDG (А), DSPC–MlphDG (Б), ePC–MlphDG–PI (В), ePC–MlphDG–GM₁ (2%) (Г), ePC–MlphDG–CMG-PE (2%) (Д), ePC–MlphDG–GM₁ (10%), круглый маркер, и ePC–MlphDG–CMG-PE (10%), квадраты (Е), DSPC–MlphDG–GM₁ (10%), круглый маркер, и DSPC–MlphDG–CMG-PE (10%), квадраты (Ж). CR – доля свободного кальцеина в растворе.

При инкубации в сыворотке формируется белковая корона, и в первые минуты инкубации, когда система ещё не пришла в равновесие, сигнал флуоресценции кальцеина $CR=f(t)$ (calcein release) растёт наиболее резко. Белки могут внедряться в бислои, разрушая его, и проявлять ферментативную активность. Последнее, очевидно, обусловило медленный постепенный рост значения CR за счёт разрушения жидкофазных липосом ePC–MlphDG без стабилизирующих компонентов (**Рис. 6А**). В случае плотноупакованного гелевого бислоя из стеариоильных цепей в липосомах DSPC–MlphDG, 9:1 (фазовый переход DSPC $T_m=55^\circ\text{C}$), система оставалась стабильна 24 ч даже в сыворотке (**Рис. 6Б**).

Защиту жидкофазного бислоя в сыворотке не менее 4 ч обеспечивали 10% PI (**Рис. 6В**), а 2% ганглиозида GM_1 практически полностью блокировали вытекание кальцеина не менее 24 ч (**Рис. 6Г**). Повышение же содержания GM_1 до 10 % привело к резкому выбросу кальцеина из липосом при образовании белковой короны (**Рис. 6Е**). Предположительно, белки, взаимодействуя с жестким и отрицательно заряженным каркасом гликанов GM_1 , инициируют локальные колебания липидов, разрушение бислоя и уширение его водных каналов (water channels). Подобный эффект был еще более выражен для липосом с 10 % SMG-PE (**Рис. 6Е**), которые имеют наиболее высокий отрицательный ζ -потенциал (-66 мВ). Электростатическое отталкивание между карбоксилированными остатками SMG, экспонированными над бислоем, и белками сыворотки, которые стремятся взаимодействовать с поверхностью мембраны, вызывает перестройки в липидном бислое и образование «микротрещин» за счёт уширения водных каналов. Для образца с 2 % SMG-PE выброс кальцеина в начале инкубации был гораздо меньше (**Рис. 6Д**).

Гипотеза о «микротрещинах» в липосомах, которые могут открываться и закрываться в жидкофазном бислое, была проверена на липосомах DSPC–MlphDG– GM_1 и DSPC–MlphDG–SMG-PE. Жесткий бислой не мог сохранить целостность, не успевал перестроиться и закрыть каналы и микротрещины, образуемые воздействием белков на SMG и GM_1 (**Рис. 6Ж**). Однако остался открытым вопрос, продолжают ли жидкофазные липосомы сохранять исходную везикулярную структуру благодаря эластичности своих мембран, или они разбиваются на мицеллярные комплексы с белками, которые удерживают часть самозатухающего кальцеина?

Исследование целостности бислоя с помощью FRET-пары фосфолипидных зондов

Донорно-акцепторная пара флуоресцентных аналогов фосфатидилхолина с близкими структурами флуорофоров (**Рис. 7А**) тетраметил-BODIPY- (ТМВ-PC, донор) и бициклогексил-BODIPY-производное (ВСНВ-PC, акцептор) – позволяет отслеживать изменения в бислое липосом при взаимодействии с белками [Алексеева и др. *Биоорганическая химия* 2016].

Зонды включали в жидкофазные Mlph-липосомы с 10 % PI, GM₁ или SMG-PE. Через 24 ч инкубации в PBS во всех образцах наблюдалось лишь небольшое нарушение FRET (Фёрстеровский резонансный перенос энергии): возрастание сигнала донора (F_B) не превышало 0.1 доли от максимального значения при полном прекращении переноса энергии после разрушения липосом Тритоном X-100 (Рис. 7Б).

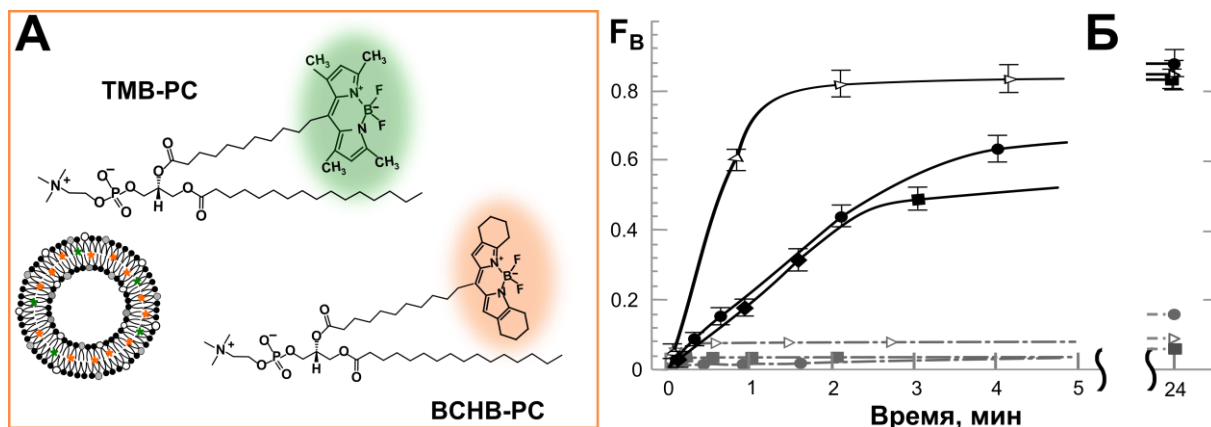


Рис. 7. Структуры FRET-пары зондов и схематичный вид липосомы с метками (А). Разгорание флуоресценции донора при инкубации липосом в сыворотке (сплошная кривая) и буфере (пунктир), где $F_B=1$ – максимальное значение интенсивности флуоресценции TMB-PC при нарушении переноса энергии. Липосомы ePC–MlphDG–GM₁ (10%) - круглый маркер, ePC–MlphDG–SMGPE (10%) - квадраты, ePC–MlphDG–PI (10%) - треугольники (Б).

В сыворотке все образцы показали нарушение FRET, причем наибольшее ($F_B \sim 0.8$) уже через 2 ч – липосомы с PI. В этих условиях кальцеин практически полностью удерживается в липосомах (Рис. 6В). Следовательно, перенос энергии нарушается не из-за разрушения бислоя, а за счет образования плотной короны и погружения белков в полярную область мембраны. При этом белки либо раздвигают зонды, либо экранируют акцептор. В случае GM₁- и SMG-липосом собственная флуоресценция донора увеличивалась медленнее (Рис. 7Б), что свидетельствует о большей удаленности белков от FRET-пары в бислое. Полученные результаты косвенно подтверждают наши предположения о динамическом образовании «микротрещин» в мембране и позволяют заключить, что на поверхности SMG-липосом формируется наиболее рыхлая белковая корона (судя по величине F_B). За 24 ч инкубации, как мы полагаем, зонды образуют комплексы с белками, что и выравнивает уровень флуоресценции всех образцов.

Исследование удерживания пролекарства в бислое липосом

Липосомы с флуоресцентномеченым аналогом MlphDG (Per-MlphDG, 1 мольн. %, **Рис. 8А**) инкубировали в буфере или сыворотке 0, 1.5 и 4 ч при 37°C, затем проводили гель-хроматографию на колонке с сефарозой. За 4 ч инкубации в PBS уровень флуоресценции Per-MlphDG во фракции липосом ePC-MlphDG-PI не изменялся, а сигналы следующих фракций соответствовали фону (Рис. 18, диссертация).

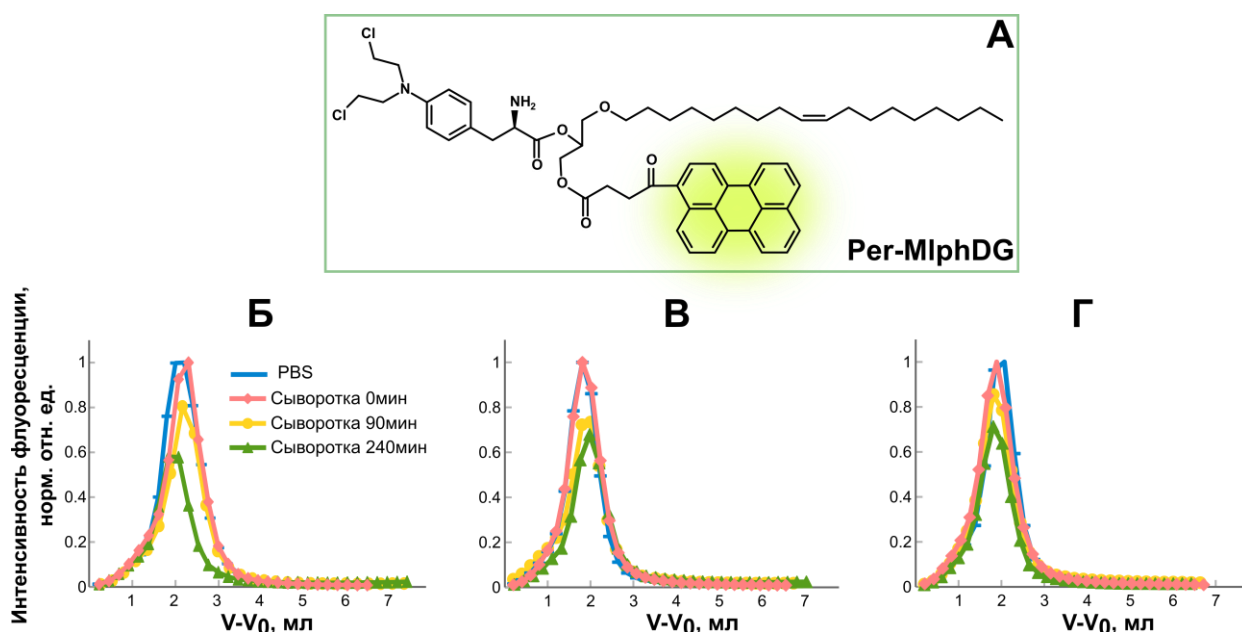


Рис. 8. Структура периленоильного производного пролекарства мелфалана (А). Нижняя панель: Профили элюции липосом с Per-MlphDG после инкубации: ePC-MlphDG-PI (10%) (Б), ePC-MlphDG-GM₁ (2%) (В), ePC-MlphDG-CMG-PE (10%) (Г).

В сыворотке к 4-му часу инкубации липосомы с наименьшим (2% GM₁), средним (10% PI) и наибольшим (10% CMG-PE) уровнями вытекания кальцеина (**Рис. 6В,Г,Е**) показали схожее падение сигнала Per-MlphDG (**Рис. 8**, Таблица 2) при отсутствии флуоресценции в следующих фракциях (белков и мицелл).

Таблица 2. Изменение сигнала Per-MlphDG в липосомах при инкубации в сыворотке

Время, ч	Снижение уровня флуоресценции в образцах липосом, %		
	ePC-MlphDG-PI	ePC-MlphDG-GM ₁	ePC-MlphDG-CMG-PE
1.5	30.6	13.7	11.3
4	40.7	31.9	30.2

При потере равного количества пролекарства динамика вытекания кальцеина, очевидно, была бы одинаковая. Однако значения CR для образцов с 2% GM₁ и 10% SMG-PE отличаются на порядок, а уровень флуоресценции Per-MlphDG одинаков. Снижение уровня флуоресценции обусловлено белками, ассоциированными с мембраной, и относится к свойствам периленоильной группы: ее квантовый выход в молекуле Per-MlphDG уменьшается в 1.7 раза под влиянием остатка мелфалана, который является производным фенилаланина [Болдырев и др. 2004]. Интересно, что тушение коррелирует с экранирующей способностью амфифилов: более медленное снижение сигнала характерно для образцов с объемистыми и/или протяженными структурами GM₁ и SMG на поверхности, где белкам труднее заглубиться. А для относительно маленького остатка мио-инозита то же снижение сигнала Per-MlphDG достигается в 2.5 раза быстрее. Следовательно, при образовании белковой короны все исследованные формуляции сохраняют пролекарство мелфалана в бислое.

Изучение взаимодействий альбумина с липосомами с помощью ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье

Возможность внедрения белков в мембраны Mlph-липосом исследовали методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье на примере альбумина. Он составляет до 55% суммарного белка плазмы и представлен в коронах липосом. Мы использовали высокомолекулярный альбумин человека бычий сывороточный альбумин (BSA). ИК-спектры липосом получали отдельно в PBS и в ходе 20-мин инкубации с BSA при 37°C в ячейке прибора. Анализировали изменения в положениях и площадях пиков, относящихся к сигналам групп липидного бислоя (валентные колебания групп CH₂ и C=O) и белка (амид I).

Изменение вторичной структуры BSA при контакте с бислоем вызывает перераспределение интенсивностей сигналов α-спирали, β-листа, β-поворота и неупорядоченной цепи в пике амид I (1628-1685 см⁻¹). При взаимодействии с липосомами в структуре BSA уменьшалось содержание α-спиралей и увеличивался вклад β-компонентов (Рис. 9). Сильнее всего конформация BSA изменялась при связывании с положительно заряженными липосомами ePC-MlphDG, менее всего — с нейтральными контрольными ePC (Рис. 9А) и отрицательно заряженными ePC-MlphDG-GM₁ (Рис. 9Г). За исключением липосом с SMG-PE (Рис. 9В), на изменение структуры белка влияло наличие MlphDG в мембране.

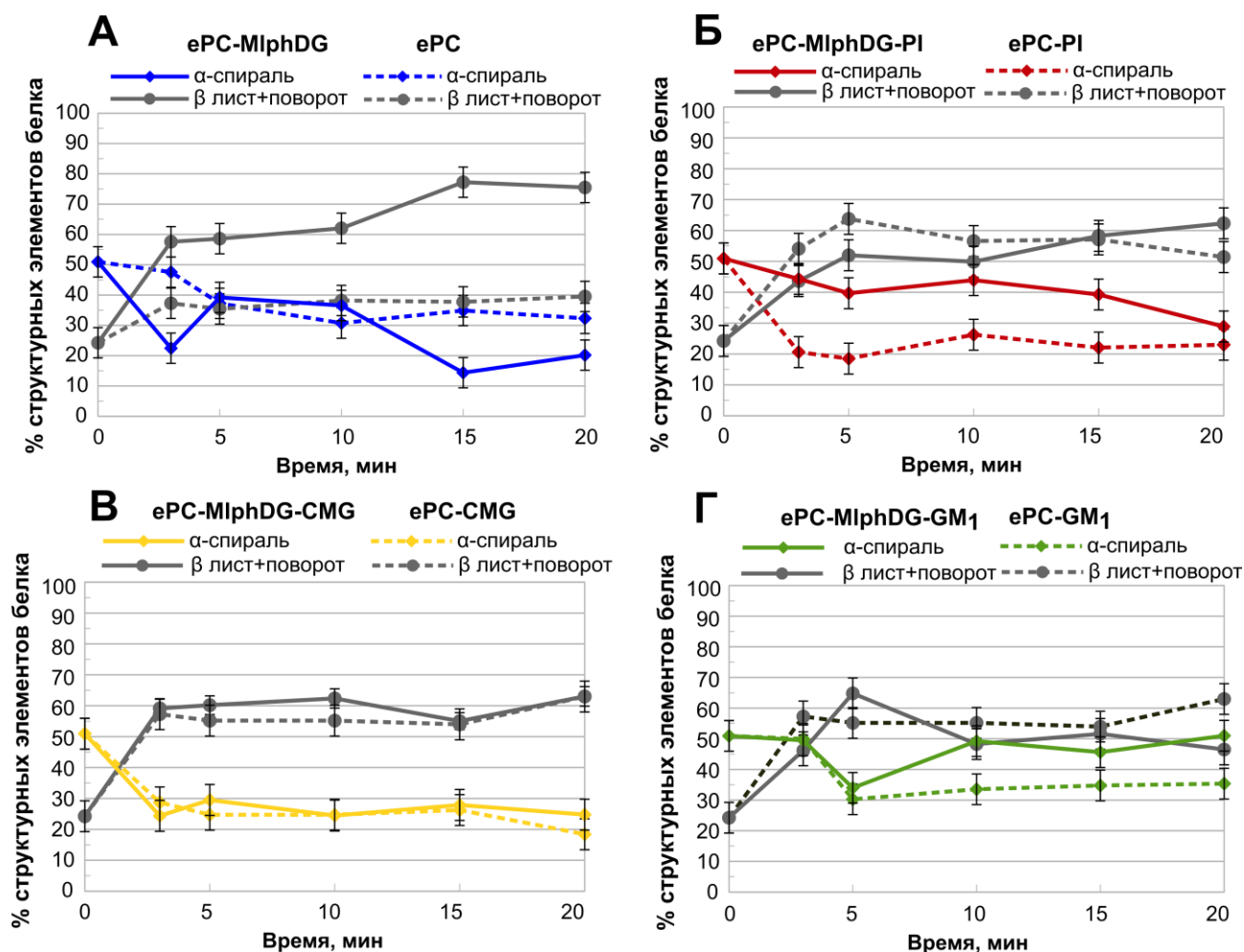


Рис. 9. Изменение вторичной структуры альбумина в ходе инкубации с липосомами ePC и ePC-MlphDG (A), ePC-PI и ePC-MlphDG-PI (Б), ePC-CMG и ePC-MlphDG-CMG (B), ePC-GM₁ и ePC-MlphDG-GM₁ (Г).

В полярной части бислоя изменение сигнала поглощения карбонильных групп липидов в интервале 1715-1745 см⁻¹ отражает изменение степени их гидратации. При взаимодействии с BSA для всех липосом наблюдалось расщепление максимума пика групп C=O (сохраняющееся в ходе инкубации), что свидетельствует о появлении различий в степени их гидратации. То есть альбумин нарушал существующие в приполярной зоне бислоя водородные связи с водой и замещал их своими.

Асимметричные (~2920 см⁻¹) и симметричные (~2850 см⁻¹) валентные колебания СН₂-групп чувствительны к изменениям в гидрофобной области и отражают характер упаковки бислоя. Рост неупорядоченности в бислое приводит к сдвигу пика в область больших волновых чисел. Сорбция белка на липосомах ePC не повлияла на гидрофобную область бислоя (Таблица 3). Введение в него MlphDG создает локальные дефекты поверхности, увеличивая подвижность СН₂-цепей (Таблица 3, «до инкубации»). При инкубации с BSA неупорядоченность бислоя липосом ePC-MlphDG возрастает уже из-за

внедрения белка (Таблица 3), структура которого при этом значительно меняется (Рис. 9А).

Таблица 3. Частоты колебаний CH_2 -групп липосом в ходе инкубации с BSA*

Состав бислоя	До инкубации		5-мин инкубация		20-мин инкубация	
	Васим	Всим	Васим	Всим	Васим	Всим
ePC	2924	2853	2924	2853	2924	2853
ePC-MlphDG, 9:1	2925	2852	2926	2853	2927	2853
ePC-PI, 9:1	2923	2853	2924	2853	2926	2853
ePC-MlphDG-PI, 8:1:1	2924	2853	2924	2853	2924	2853
ePC-GM ₁ , 9:1	2923	2853	2923	2853	2923	2853
ePC-MlphDG-GM ₁ , 8:1:1	2924	2853	2924	2853	2924	2853
ePC-CMG, 9:1	2922	2853	2924	2853	2924	2853
ePC-MlphDG-CMG, 8:1:1	2924	2852	2924	2854	2924	2854

*Сдвиг частот валентных колебаний на 1 см^{-1} – значимая величина в ИК-спектроскопии Фурье

Хотя по отдельности MlphDG и PI (липосомы ePC–PI) создают дефекты в бислое, в липосомах ePC–MlphDG–PI их влияние скомпенсировано, и белок не проникает в CH_2 -область (Таблица 3). Введение 10% ганглиозида GM₁ также защищает бислой (Таблица 3), причем лучше, чем фосфатидилинозит, судя по минимальным изменениям структуры белка (Рис. 9Г). В случае липосом с 10% CMG-PE подвижность CH_2 -цепей липидов (Таблица 3), как и структура BSA при сорбции изменяются независимо от наличия MlphDG (Рис. 9В). Белок мало затрагивает поверхность бислоя и, видимо, концентрируется рядом с остатками олигоглицина. Это влияет на подвижность алифатических цепей CMG-конъюгата и всего бислоя (Таблица 3) и вызывает уширение каналов воды для интенсивного вытекания кальцеина из этих липосом в сыворотке (Рис. 6Е). Результаты исследований с помощью ИК-спектроскопии согласуются с данными флуоресцентных методов.

Влияние липидного конъюгата полиэтиленгликоля на стабильность жидкофазных липосом

Поскольку липидный конъюгат PEG₂₀₀₀ (PEG-PE, Рис. 10) активно используется для стабилизации липосом в кровотоке, мы исследовали его защитные свойства в липосомах с MlphDG. Характеристики липосом приведены в Таблице 4. (Для экспериментов с PEG-PE, PI, GM₁ и CMG-PE использовали одни и те же партии сыворотки)

PEG₂₀₀₀-PE, n~42-45

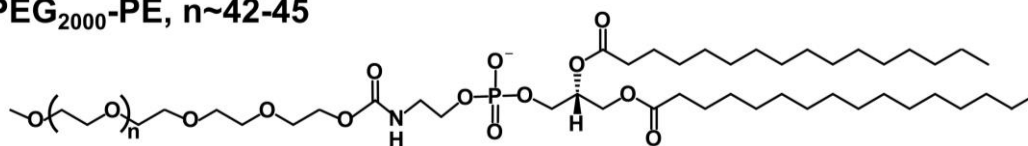


Рис. 10. Структура конъюгата PEG-PE

Таблица 4. Состав и характеристики липосом

Состав бислоя	Диаметр, нм*	Дзета-потенциал, мВ**
ePC–MlphDG–PEG-PE, 9:1:0.2 (2%)	88 ± 2	+9
ePC–MlphDG–PEG-PE, 8:1:1 (10%)	88 ± 1	-10

*Данные получены методом NTA, доверительные интервалы (p = 95%)

**Измерения DLS; данные для 200-нм липосом

Использовали метод вытекания кальцеина. Введение PEG-PE в жидкофазный бислой не улучшало его стабильность. Для липосом с 2% PEG-PE сигнал CR начинал расти через 1 ч даже в буфере, а в сыворотке от опыта к опыту он воспроизводил синусоидального типа флуктуации в ходе всей инкубации (Рис. 11А). Видимо, при воздействии белков короны молекулы PEG-PE диссоциируют из бислоя в виде мицелл и захватывают другие компоненты, что сопровождается вытеканием кальцеина. Мицеллы и агрегаты с белками могут сорбировать кальцеин, увеличивая его локальные концентрации до самотушения. При росте содержания PEG-PE в мембране полимер принимает более вытянутую конформацию и увеличивает отрицательный заряд липосом (за счет фосфата), что затрудняет взаимодействия с белками и выход из бислоя в мицеллы.

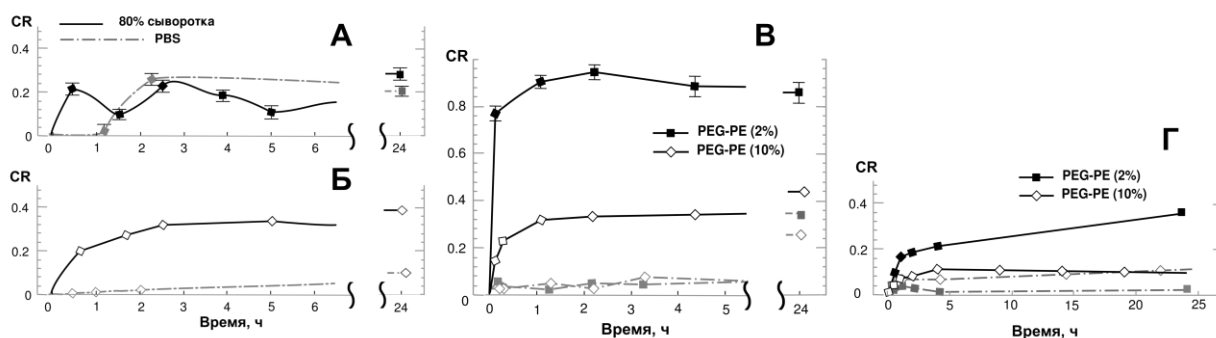


Рис. 11. Уровень высвобождения кальцеина в сыворотке (сплошные кривые) и буфере (пунктир) из липосом ePC–MlphDG–PEG-PE (2%) (А), ePC–MlphDG–PEG-PE (10%) (Б), DSPC–MlphDG–PEG-PE с 2 и 10% PEG-PE (В), DSPC–Chol–MlphDG–PEG-PE с 2 и 10% PEG-PE (Г). CR – доля свободного кальцеина в растворе.

Однако, хотя динамика вытекания кальцеина меняется для липосом с 10% PEG-PE (Рис. 11Б), оно не предотвращается, и есть вероятность потери компонентов бислоя, в том числе пролекарства.

Действительно, меченные Per-MlphDG липосомы с 10% PEG-PE, через 1.5 ч инкубации в сыворотке высвобождали пролекарство в мицеллярную фазу (Рис. 12Б), хотя в PBS сохраняли стабильность не менее 4 ч (Рис. 12А). В экспериментах с PI, GM₁ и SMG-PE такого влияния белков плазмы не наблюдалось (Рис. 8).

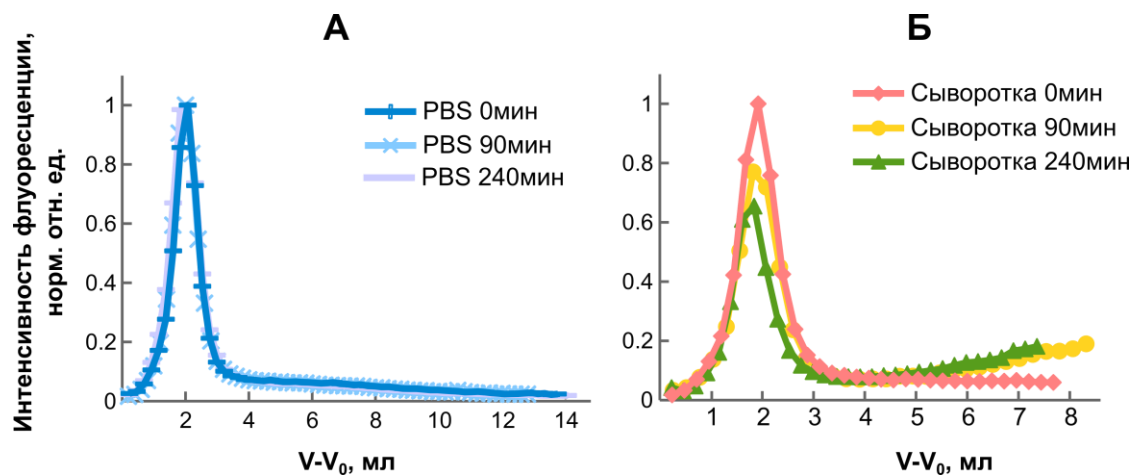


Рис. 12. Гель-хроматография липосом ePC–MlphDG–PEG-PE (10%), меченных Per-MlphDG, после инкубации в буфере (А) и сыворотке (Б)

Замена ePC на DSPC стабилизировала липосомы только в буфере: в сыворотке липосомы с 2% PEG-PE полностью разрушались за 1 ч (Рис. 11В), а динамика вытекания кальцеина из липосом с 10% PEG-PE почти не изменилась (Рис. 11Б,В). Эффект практически полной защиты бислоя DSPC-липосом с 10% PEG-PE был получен при добавлении 30 мольн. % холестерина (Рис. 11Г). Наши результаты согласуются с данными фундаментального исследования [Garbuzenko et al. *J. Control. Release* 2005], где показано, что наибольшей стабильностью обладают липосомы с жидкокристаллической упорядоченной (LO) фазой бислоя (которая требует не менее 30% холестерина), содержащие достаточное количество PEG₂₀₀₀-липидов. Напротив, пегилированные липосомы с твердой мембраной в фазе геля наименее стабильны.

ВЫВОДЫ

1. Липосомы с липофильным пролекарством метотрексата в бислое активируют СК по механизмам классического и альтернативного путей, что сопровождается фрагментацией центрального компонента СК СЗ.

2. МТХ-липосомы связывают и расщепляют опсонин С3b независимо от включения в липидный бислой экранирующих молекул – фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁ или пептидолипида SMG-PE. Опсонизация стимулирует захват МТХ-липосом моноцитами. Очевидная причина иммунореактивности – экспонирование остатка метотрексата на поверхности липосом.
3. Экранирующие компоненты по-разному влияют на стабильность липосом с липофильным пролекарством мелфалана в сыворотке крови: фосфатидилинозит защищает липидный бислой от дегградации не менее 4 ч, а ганглиозид GM₁ или пептидолипид SMG-PE – не менее суток, в зависимости от концентрации в мембране.
4. Взаимодействие сывороточного альбумина с поверхностью Mph-липосом, содержащих фосфатидилинозит или ганглиозид GM₁, не влияет на структуру липидного бислоя. В отсутствие экранирующих молекул альбумин внедряется в гидрофобную часть бислоя, конформация белка при этом значительно изменяется.
5. Включение PEG-липида в жидкофазный или гелевый липидный бислой способствует диссоциации компонентов мембраны и ее разрушению. Пегилирование стабилизирует липосомы при выполнении двух условий: достаточном количестве полимера и состоянию бислоя в жидкокристаллической упорядоченной фазе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. *Третьякова Д.С.*, Онищенко Н.Р., Вострова А.Г., Водовозова Е.Л. Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с белками плазмы крови // Биорг. Хим. **2017**. Т. 43. N. 6. С. 661-673.
2. *Tretiakova D.*, Onishchenko N., Boldyrev I., Mikhalyov I., Tuzikov A., Bovin N., Evtushenko E., Vodovozova E. Influence of stabilizing components on the integrity of antitumor liposomes loaded with lipophilic prodrug in the bilayer // Colloids Surf. B. **2018**. V. 166. P. 45–53.
3. *Tretiakova D.S.*, Alekseeva A.S., Galimzyanov T.R., Boldyrev A.M., Chernyadyev A.Yu., Ermakov Yu.A., Batishchev O.V., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. Lateral stress profile and fluorescent lipid probes. FRET pair of probes that introduces minimal distortions into lipid packing // BBA Biomembranes. **2018**. V. 1860. P. 2337-2347.

4. *Tretiakova D.*, Svirshchevskaya E., Onishchenko N., Alekseeva A., Boldyrev I., Kamyshinsky R., Natykan A., Lokhmotov A., Arantseva D., Shobolov D., Vodovozova E. Liposomal Formulation of a Melphalan Lipophilic Prodrug: Studies of Acute Toxicity, Tolerability, and Antitumor Efficacy // *Curr. Drug. Deliv.* **2020**. 10.2174/1567201817666200214105357

5. *Tretiakova D.S.*, Khaidukov S.V., Babayants A.A., Frolova I.S., Shcheglovitova O.N., Onishchenko N.R., Vodovozova E.L. Lipophilic prodrug of methotrexate in the membrane of liposomes promotes their uptake by human blood phagocytes // *Acta Naturae.* **2020**. V. 12. № 1 (44). P. 99-109.

Тезисы докладов на конференциях:

1. Третьякова Д.С., Онищенко Н.Р., Водовозова Е.Л. (2016) Изучение взаимодействия липосом, несущих липофильные пролекарства метотрексата и мелфалана, с компонентами системы комплемента, XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 7-11 февраля, Москва, Россия. Материалы конференции. С. 28.

2. Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л. (2016) Изучение устойчивости противоопухолевых липосом, несущих в бислое липофильное пролекарство мелфалана, в сыворотке крови в зависимости от структуры стабилизирующего компонента. «V Съезд биохимиков России», 4-9 октября, Сочи-Дагомыс, Россия, Материалы конференции *Acta Naturae.* 2016. Т. 2(спецвыпуск). С. 146-147.

3. Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л. (2017) Влияние структуры стабилизирующих компонентов на устойчивость в сыворотке крови противоопухолевых липосом, несущих в бислое липофильное пролекарство мелфалана, XXIX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 7-10 февраля, Москва, Россия. Материалы конференции. С. 33.

4. Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л. (2017) Состояние противоопухолевых липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана, в плазме крови человека (Fate of antitumor liposomes loaded with lipophilic prodrug of melphalan in human blood plasma), Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 20-22 февраля, Москва, Россия. Материалы конференции. С. 564-566.

5. Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л. (2017) Влияние структуры стабилизирующих компонентов на устойчивость в сыворотке крови

противоопухолевых липосом, несущих в бислое липофильное пролекарство мелфалана. XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты», 16-17 марта, Москва, Россия. Рос. Биотерапевт. Жур. 2017. Т. 16(S1). С. 75-76.

6. Tretiakova D., Boldyrev I., Vodovozova E. (2017) Integrity in human serum of liposomes loaded with lipophilic prodrug of melphalan depending on stabilizing components in the bilayer, ILS Liposome Advances and Liposome Research Days Combined Conference, 16-18 сентября Athens, Greece. Book of Abstracts, P. 97.

7. Третьякова Д.С., Е.В. Свирцевская, И.А. Болдырев, А.Ю. Лохмотов, Д.А. Аранцева, Е.Л. Водовозова (2018) Липосомы с липофильным пролекарством мелфалана: получение лиофилизированной формы и первые доклинические исследования, XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 12-15 февраля, Москва, Россия. Материалы конференции. С. 30.

8. Tretiakova D.S., Vodovozova E.L. (2018) Influence of stabilizing components on the integrity of antitumor liposomes loaded with lipophilic prodrug in the bilayer, «Clinical Nanomedicine, targeted delivery and precision medicine» — CLINAM, 2-5 сентября, Базель, Швейцария, Материалы конференции. С. 226-227.

9. Tretiakova D.S., Vodovozova E.L. (2018) Influence of stabilizing amphiphiles on the integrity of fluid, gel, and liquid-ordered phase antitumor liposomes loaded with lipophilic prodrug in the bilayer. Биомембраны, 1-5 октября, Долгопрудный, Россия. J. Bioenerg. Biomembr. 2018. V. 50. P. 591–591.

10. Третьякова Д.С., Хайдуков С.В. Водовозова Е.Л. (2018) Влияние липофильного пролекарства метотрексата в мембране липосом на взаимодействия с субпопуляциями лейкоцитов крови человека. XV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты», 29-30 марта, Москва, Россия. Рос. Биотерапевт. Жур. 2018. Т. 17(S1). С. 73-74.

11. Д.С. Третьякова, И.М. Ле-Дейген, Е.В. Кудряшова, Е.Л. Водовозова (2019) Взаимодействия липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана, с сывороточным альбумином: Исследование методом ИК-спектроскопии, Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 25-27 февраля, Москва, Россия. Материалы конференции. С. 204-205.

12. Daria Tretiakova, Sergei Khaidukov, Natalia Onishchenko, Elena Vodovozova (2019) Lipophilic Prodrug of Methotrexate in the Membrane of Liposomes Enhances Their Capture by Human Blood Phagocytes, Liposome Research Days 2019, September 15-18, Sapporo, Japan. Book of Abstracts, P. 130.

13. Д.С. Третьякова, И.М. Ле-Дейген, Е.В. Кудряшова, Е.Л. Водовозова (2020) Взаимодействие сывороточного альбумина с липидным бислоем противоопухолевых липосом, несущих липофильное пролекарство мелфалана: исследование методом ИК-спектроскопии, XXXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 10-13 февраля, Москва, Россия. Материалы конференции. С. 145.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность всему коллективу лаборатории химии липидов ИБХ РАН за обучение, помощь и поддержку со студенческих времен, в особенности научному руководителю д.х.н. Водовозовой Е.Л., к.х.н. Онищенко Н.Р. к.х.н. Алексеевой А.С. и к.х.н. Болдыреву И.А.

Автор благодарит Телицына Д.П. (Механико-математический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) за вывод формулы для расчета высвобождения кальцеина с поправкой на экспериментальные условия, к.х.н. Евтушенко Е.Г. (Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) за проведение измерений размеров липосом методом NTA, к.х.н. Ле-Дейген И.М. и д.х.н. Кудряшова Е.В. (Химический факультет МГУ) за возможность работы на ИК-спектрометре и помощь с анализом данных, д.б.н. Хайдукова С.В. (ИБХ РАН) за помощь в проведении исследований методом проточной цитометрии, к.б.н. Копанцева Е.П. и д.б.н. Ажикину Т.Л. (ИБХ РАН) за предоставление возможности работы на приборе при проведении иммуноблоттинга, к.б.н. Свирщевскую Е.В. (ИБХ РАН) за ценные советы и объяснения, а также д.х.н. Безуглова В.В. за рекомендации по представлению материала.

Также автор выражает благодарность донорам крови, среди которых были сотрудники лаборатории, знакомые выпускники химического и механико-математического факультетов МГУ.