

## ФАГОЦИТОЗ ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКАМИ

© 2023 г. Р. Г. Сахабеев<sup>1, 2, \*</sup>, Д. С. Поляков<sup>2</sup>, Н. А. Грудина<sup>2</sup>, О. И. Антимонина<sup>2</sup>, В. А. Коржиков-Влах<sup>3</sup>, Э. Р. Аликпарова<sup>3</sup>, Е. С. Синецкая<sup>3, 4</sup>, М. М. Шавловский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский технологический институт (Технический университет), Санкт-Петербург, 190013 Россия

<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197022 Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, Санкт-Петербург, 198504 Россия

<sup>4</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004 Россия

\*E-mail: helm505@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2023 г.

После доработки 13.04.2023 г.

Принята к публикации 15.04.2023 г.

В работе изучали способность трех модельных зеленых белков ковалентно связываться с микрочастицами (МЧ) на основе поли(D,L-молочной кислоты) (ПМК). Зеленый флуоресцентный белок (sfGFP), рекомбинантный белок слияния бета2-микроглобулина человека ( $\beta$ 2M) с sfGFP ( $\beta$ 2M-sfGFP), а также рекомбинантный белок слияния амилина человека (IAPP) с sfGFP (IAPP-sfGFP) выделяли методом аффинной хроматографии. Для формирования МЧ-ПМК использовали метод двойной эмульсии. Модификацию МЧ-ПМК белком подтверждали при помощи лазерной сканирующей микроскопии (ЛСМ). Кроме того, при помощи ЛСМ исследовали фагоцитоз МЧ-ПМК, модифицированных различными белками, и свободных модельных белков макрофагами. Было показано, что рекомбинантный sfGFP связывается с поверхностью частиц в меньших количествах по сравнению с  $\beta$ 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP. По-видимому, это обусловлено тем, что аминокислотные группы белка, которые потенциально могли бы вступить в реакцию с активированными карбоксильными группами на поверхности частиц, оказываются стерически недоступными для этой реакции из-за структуры sfGFP. Белки  $\beta$ 2M и IAPP в составе соответствующих рекомбинантных белков слияния являются спейсерными структурами между поверхностью сферических частиц и sfGFP. Установлено, что увеличение соотношения белок: частицы в три раза не приводило к повышению количества связанного белка на единицу массы частиц, что может свидетельствовать о том, что количество белка, которое может быть связано на единицу массы частиц, ограничивается емкостью самих частиц. Изучение фагоцитоза модифицированных белками МЧ-ПМК показало, что МЧ-ПМК, содержащие на поверхности модельные белки ( $\beta$ 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP), успешно фагоцитируются макрофагами и, таким образом, могут способствовать активации клеточного иммунного ответа, что важно при борьбе с различными инфекциями, в том числе вирусными. Кроме того, в работе был показан фагоцитоз модельных белков ( $\beta$ 2M-sfGFP, IAPP-sfGFP). Это может быть связано с тем, что как  $\beta$ 2M, так и IAPP являются амфигогенными и склонными к агрегации белками. По всей видимости, агрегаты этих белков тоже способны поглощаться макрофагами благодаря увеличению размера по сравнению с их мономерными формами.

**Ключевые слова:** микрочастицы, поли(молочная кислота), иммобилизация белка, зеленый флуоресцентный белок, фагоцитоз

**DOI:** 10.31857/S0041377123040119, **EDN:** ZLIPYJ

В настоящее время, микро- и наночастицы на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров активно изучаются в качестве носителей для получения вирусоподобных частиц с целью разработки

вакцин (Lin et al., 2015; Simón-Vázquez et al., 2020), а также привлекают внимание для создания ловушек вирусов, обладающих значительным потенциалом в комплексной терапии вирусных инфекции для снижения вирусной нагрузки, развивающейся в остром периоде заболевания (Chen et al., 2021). В последнем случае ключевым моментом применения микрочастиц (МЧ) в качестве ловушек является их способность подвергаться ускоренному фагоцитозу (Peres et al., 2017). Известно, что для ряда вирусных инфекций вирусемия является важной стадией течения заболевания. При

**Принятые сокращения:** ЛСМ – лазерная сканирующая микроскопия; МЧ – микрочастицы; ПМК – поли(D,L-молочная кислота);  $\beta$ 2M – рекомбинантный бета2-микроглобулин человека; IAPP – рекомбинантный амилин человека; sfGFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein superfolder);  $\beta$ 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP – белки слияния  $\beta$ 2M и IAPP с sfGFP соответственно.

этом повышение концентрации вирусных частиц в кровотоке сопровождается появлением вирионов с новыми антигенными детерминантами, вследствие этого использование экзогенных антител часто не обеспечивает достаточную терапевтическую эффективность (Taylor et al., 2021). В то же время применение полимерных ловушек, модифицированных рецепторными белками, позволит связать вирусы и за счет ускоренного фагоцитоза обеспечит их попадание в клетки ретикулоэндотелиальной системы, в частности в макрофаги (Fajardo-Moser et al., 2008). Это, в свою очередь, обеспечит более быстрый клеточный иммунный ответ и образование антител к генетическим вариантам вирусных белков, что должно способствовать дополнительному обезвреживанию циркулирующих вирусов (Сахабеев и др., 2020).

Кроме того, полимерные частицы нашли широкое применение в качестве систем доставки различных лекарственных субстанций, включая адресную доставку за счет модификации полимерных частиц векторными белками (Begines et al., 2020; Vilos, Velasquez, 2012; Vlachopoulos et al., 2022). В этом случае фагоцитоз также может играть положительную роль за счет присущей макрофагам способности миграции в организме. Поглощая системы доставки лекарств, макрофаги предположительно могут обеспечивать перенос лекарственных веществ в очаги инфекций и зоны воспаления, что, по сути, представляет собой биогибридный подход к доставке лекарств.

В настоящей работе сообщаются результаты получения МЧ на основе поли(молочной кислоты) (ПМК), данные по ковалентной модификации МЧ-ПМК модельными белками, а также результаты изучения поглощения модифицированных частиц макрофагами человека в культуре. Выбор МЧ-ПМК обусловлен биосовместимостью, способностью к биодеградации ПМК под действием эстераз, а также тем, что этот полимер одобрен для медицинского применения, в том числе в качестве носителя лекарственных веществ (Peres et al., 2017; Tyler et al., 2016). В качестве модельных белков использовали рекомбинантные белки слияния: зеленый флуоресцентный белок sfGFP (green fluorescent protein superfolder) и два белка человека, а именно бета2-микроглобулин человека ( $\beta$ 2M) и амилин человека (IAPP). Связывание белков слияния ( $\beta$ 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP), обладающих флуоресценцией, обеспечивает возможность легкой визуализации при определении эффективности модификации МЧ-ПМК и их фагоцитоза.

Представленные данные могут служить методологической основой для получения МЧ-ПМК, ковалентно модифицированных рекомбинантными рецепторами для связывания вирусных частиц или векторными белками для адресной доставки.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Получение модельных рекомбинантных белков.** Модельные белки sfGFP (26.8 кДа),  $\beta$ 2M-sfGFP (38.6 кДа) и IAPP-sfGFP (30.7 кДа) получали из клеток *Escherichia coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидами, содержащими гены соответствующих белков, по описанным ранее методикам (Антимонова и др., 2016; Сахабеев и др., 2020). Клетки *E. coli* разрушали обработкой ультразвуком, растворимую клеточную фракцию отделяли центрифугированием и целевые рекомбинантные белки очищали с использованием Ni-агарозы (Ni-NTA Agarose, QIAGEN, США) в соответствии с протоколом производителя.

**Получение МЧ на основе ПМК.** Получение МЧ осуществляли методом одинарной эмульсии. Органическая фаза представляла собой раствор ПМК ( $M_w = 11\,300$ ) в дихлорметане (50 мг/мл). Водная фаза состояла из 1%-ного раствора поливинилового спирта ( $M_w = 130\,000$ , степень гидролиза 99%). Для получения эмульсии использовали ультразвуковой гомогенизатор Sonopuls HD 2070, снабженный микрорезондом MS 73 диаметром 3 мм (Bandelin, Германия). Органическую фазу вводили в водную фазу с применением одноканального инфузионного насоса Инстилар 1438 (Диксион, Россия); скорость введения — 2 мл/мин, скорость перемешивания — 800 об./мин с помощью магнитной мешалки (MR Hei-Mix S, Heidolph, Schwabach, Германия). Одновременно с перемешиванием систему дополнительно обрабатывали ультразвуком с помощью зондового гомогенизатора при мощности 18% в течение 3 мин (время введения органической фазы), затем повышали мощность УЗ-гомогенизатора до 35% и обрабатывали систему еще в течение 90 с. Соотношение объемов органической и водной фаз составляло 1 : 20. Удаление дихлорметана осуществляли с использованием роторного испарителя (Hei-VAP Precision ML/G3B, Германия). После формирования суспензии частицы осаждали центрифугированием в течение 10 мин (10000 g, 4°C). Далее частицы редиспергировали под действием ультразвука в течение 7 с в дистиллированной воде и снова осаждали. Процедуру промывания частиц водой повторяли дважды с целью удаления избытков поли(винилового спирта). Для фракционирования по размерам частицы центрифугировали в течение 2 мин (1000 g, 4°C). Для экспериментов использовали фракцию крупных частиц. Выход МЧ составил 49%.

**Ковалентная иммобилизация белков на поверхности частиц.** Процесс иммобилизации белков на поверхности МЧ-ПМК состоял из нескольких этапов. На первом этапе осуществляли получение свободных карбоксильных групп на поверхности МЧ путем частичного гидролиза 0.1 М раствором NaOH в течение 30 мин при комнатной температуре (25°C) согласно ранее опубликованному протоколу (Korzhikov-Vlakh et al., 2018). Далее частицы отделяли и промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием. На втором этапе проводили

активацию свободных карбоксильных групп. Образовавшиеся на поверхности частиц карбоксильные группы активировали смесью N-гидроксисукцинимиды и водорастворимого карбодиимида – гидрохлорида (N-3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида с целью получения активированного эфира (Korzhirov-Vlakh et al., 2018). Далее к обработанным таким образом частицам добавляли различные количества одного из трех модельных белков (sfGFP,  $\beta$ 2M-sfGFP или IAPP-sfGFP) и инкубировали в течение 2 ч в 0.01 М боратном буферном растворе (рН 9.0). Потом отмывали полученные конъюгаты 5 раз 0.01 М фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, рН 7.4). Измерение концентрации исследуемых белков осуществляли на спектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000 (США) по поглощению на длине волны 490 нм. После определения концентрации белка в надосадочной жидкости и промывочных растворах (после проведения связывания с частицами) рассчитывали количество белка, ковалентно связанного с частицами.

**Микроскопия модифицированных частиц.** Микроскопию модифицированных флуоресцентными белками МЧ-ПМК осуществляли, используя инвертированный конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 510 Meta с иммерсионным объективом C-Apochromat 40 $\times$ /1.2 W Corr UV-VIS-IR M27 (Zeiss, Германия). Флуоресценцию sfGFP детектировали с использованием оптического фильтра 505 нм при возбуждении флуоресценции лазером с длиной волны 488 нм. В проходящем свете изображения получали при помощи метода дифференциально-интерференционного контраста (DIC). Обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения LSM 510.

**Получение макрофагов и поглощение макрофагами модифицированных МЧ.** Первичную культуру макрофагов человека получали из моноцитов крови практически здоровых доноров (Davies, Gordon, 2005). Подтверждение дифференцировки моноцитов в макрофаги подтверждали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии по морфологическим признакам. После инкубации крови с 3.2%-ным цитратом натрия в течение 20 мин при комнатной температуре осаждали форменные элементы крови центрифугированием при 145 g в течение 15 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в PBS. Лейкоцитарную фракцию выделяли в градиенте плотности фикола (1.077 г/см<sup>3</sup>; (Биолот, Россия) центрифугированием при 400 g в течение 45 мин при 15 $^{\circ}$ C. Полученные клетки трижды отмывали PBS и осаждали центрифугированием при 580 g в течение 15 мин. Клетки ресуспендировали в питательной среде RPMI1640 (Биолот, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), антибиотики пенициллин G (5000 ед./мл) и стрептомицин (50 мкг/мл), 25 мкг/мл амфотерицина В и 300 мкг/мл L-глутамин (все от Биолот, Россия),

и рассеивали по  $1 \times 10^6$  клеток на 1 лунку 6-луночного планшета на стерильные покровные стекла. После культивирования в течение 24 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 100%-ой влажности воздуха не прикрепившиеся клетки удаляли и продолжали культивирование в указанной среде при 37 $^{\circ}$ C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 10–14 сут. Затем клетки трижды отмывали раствором Хенкса (Биолот, Россия), добавляли МЧ-ПМК, конъюгированные с модельным белком ( $\beta$ 2M-sfGFP или IAPP-sfGFP), в растворе Хенкса, содержащем 10 мМ HEPES в количестве 50 мкг на лунку, и культивировали в течение 90 мин при 37 $^{\circ}$ C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клетки дважды отмывали раствором Хенкса и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. Промывали PBS и покровные стекла с клетками монтировали на предметные с помощью полимеризующейся смолы для флуоресцентной микроскопии (Dako, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Модификация частиц белками. Влияние спейсеров на количество связанного белка.** МЧ-ПМК использовали для проведения связывания с модельными флуоресцентными белками: sfGFP,  $\beta$ 2M-sfGFP или IAPP-sfGFP. Преимуществом работы с такими белками является возможность их визуализации при помощи флуоресцентной микроскопии. Модельный белок sfGFP обладает сравнительно плотной упаковкой полипептидной цепи, которая представляет собой бета-бочонок (Pedelacq, Cabantous, 2019). Возможно, что аминокислоты sfGFP скрыты в бочкообразной структуре данного белка и пространственно недоступны для реакции с активированными карбоксильными группами на поверхности частиц. Для получения белков слияния, более эффективно связывающихся с МЧ-ПМК, был проведен поиск среди белков, имеющих менее жесткую упаковку полипептидной цепи. В качестве таких белков были выбраны микроглобулин  $\beta$ 2M и амилин IAPP, методики получения которых хорошо отработаны и изучены, в том числе, нами (Антимонова и др., 2016; Сахаев и др., 2020). Белок  $\beta$ 2M состоит из 99 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 11.8 кДа. IAPP представляет собой полипептид, состоящий из 37 аминокислотных остатков с молекулярной массой 3.91 кДа (Bhattacharya et al., 2007). Эти белки объединяет относительно небольшой размер, что, возможно, позволяет им быть спейсерными структурами между поверхностью сферических частиц и sfGFP.

Ковалентную модификацию белком проводили, активируя предварительно сгенерированные карбоксильные группы на поверхности МЧ-ПМК, до сложноэфирных групп с последующей их реакцией с аминокислотными группами белка. Характеристики, а именно гидродинамический диаметр ( $D_H$ ) и дзета-потенциал поверхности исходных и модифицированных МЧ,

**Таблица 1.** Модификация МЧ-ПМК белком IAPP-sfGFP

Начальные количества компонентов, взятые для модификации МЧ белком			Количество иммобилизованного белка на 1 мг МЧ	
IAPP-sfGFP, мкг	МЧ, мг	IAPP-sfGFP/МЧ, мкг/мг МЧ	мкг	нмоль
1010	100	10	$6.1 \pm 0.3$	$0.199 \pm 0.009$
845	30	28	$5.7 \pm 0.2$	$0.185 \pm 0.006$

определяли методом динамического и электрофоретического рассеяния света. Полученные исходные наночастицы имели  $D_H = 2.23 \pm 0.38$  нм и дзета-потенциал поверхности равный  $-(34.6 \pm 4.7)$  мВ; в свою очередь данные характеристики для карбоксилированных наночастиц составляли  $2.04 \pm 0.34$  нм и  $-41.6 \pm 5.4$  мВ соответственно.

Первоначально были проведены эксперименты, позволяющие установить, влияет ли соотношение количеств белка и микрочастиц на количество белка, ковалентно связывающегося с поверхностью МЧ-ПМК (табл. 1). Для этого эксперимента был выбран белок IAPP-sfGFP, а реакцию модификации проводили при начальных соотношениях белка и МЧ 10 и 28. На основании полученных данных уставлено, что увеличение соотношения белок : МЧ в 2.8 раз не приводило к повышению количества связанного белка на единицу массы частиц. Вероятно, иммобилизованное количество белка, а именно,  $\sim 6$  мкг на 1 мг частиц, представляет собой предельную иммобилизационную емкость МЧ, ограниченную содержанием функциональных групп на поверхности и их стерической доступностью для макромолекул белка.

На следующем этапе работы, проводили иммобилизацию модельных белков sfGFP,  $\beta 2M$ -sfGFP и IAPP-sfGFP, отличающихся между собой по аминокислотному составу и пространственной структуре, на поверхности МЧ-ПМК. Показано, что не имеющих спейсерного фрагмента рекомбинантный sfGFP связывается с поверхностью частиц в меньших количествах по сравнению с  $\beta 2M$ -sfGFP и IAPP-sfGFP (табл. 2). Это может быть обусловлено тем, что sfGFP

**Таблица 2.** Модификация МЧ-ПМК белком sfGFP,  $\beta 2M$ -sfGFP или IAPP-sfGFP

Белок	Количество иммобилизованного белка на 1 мг МЧ	
	мкг	нмоль
sfGFP	$2.0 \pm 0.2$	$0.074 \pm 0.007$
IAPP-sfGFP	$6.1 \pm 0.3$	$0.199 \pm 0.009$
$\beta 2M$ -sfGFP	$6.2 \pm 0.2$	$0.161 \pm 0.005$

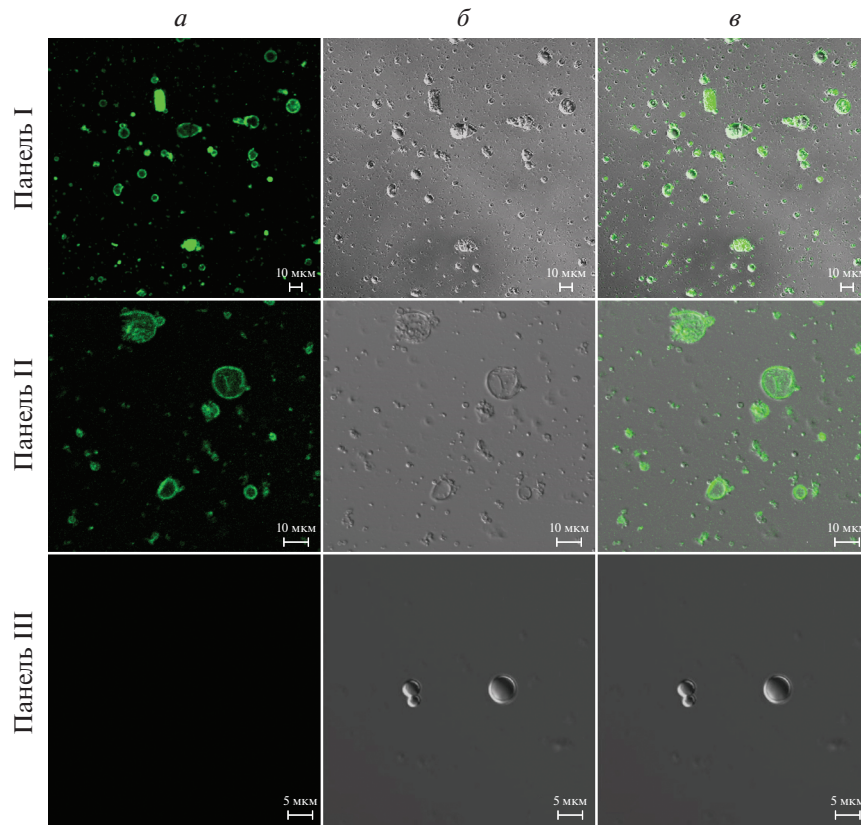
обладает меньшей способностью связываться с МЧ, чем  $\beta 2M$  и IAPP. Аминогруппы, которые потенциально могли бы вступить в реакцию с активированными карбоксильными группами на поверхности частиц, оказываются стерически недоступными для этой реакции из-за структуры sfGFP.

Преимущество белков  $\beta 2M$ -sfGFP и IAPP-sfGFP перед sfGFP состоит в том, что они, с одной стороны, обладают флуоресценцией, свойственной зеленому флуоресцентному белку sfGFP, а, с другой стороны, содержат последовательности  $\beta 2M$  или IAPP, существенно облегчающие иммобилизацию комплексного белка на поверхности частиц. При этом важно отметить, что конъюгирование  $\beta 2M$  или IAPP с sfGFP не нарушает способность последнего к флуоресценции.

Исследование при помощи лазерной сканирующей микроскопии МЧ-ПМК (рис. 1), модифицированных белками слияния IAPP-sfGFP (панель I) и  $\beta 2M$ -sfGFP (панель II), показало наличие флуоресцирующих структур. Также было установлено, что частицы, не модифицированные белком, флуоресценцией не обладают (панель III). Полученные данные подтверждают связывание МЧ-ПМК с модельными белками и демонстрирует способность модельных зеленых белков слияния сохранять флуоресценцию при ковалентном связывании с частицами.

Как и предполагалось, частицы имеют сферическую форму, демонстрируют флуоресценцию на поверхности, а их центральная часть не флуоресцирует. Таким образом, белки иммобилизуются на поверхности частиц, не проникая внутрь. Это может говорить об отсутствии пор в полученных частицах, либо о слишком маленьких порах, не позволяющих белку диффундировать во внутреннее пространство частиц.

**Фагоцитоз частиц и свободных модельных белков макрофагами.** В предыдущих работах мы предполагали, что ковалентное связывание модельного белка с МЧ-ПМК повысит эффективность гуморального ответа у животных. Однако результаты экспериментов показали (Сахабеев et al., 2020), что более выраженный ответ в плане количественного содержания антител в сыворотке крови имеет место в случае иммунизации смесью белка и немодифицированных



**Рис. 1.** Визуализация sfGFP по флуоресценции при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм (a) и с помощью дифференциально-интерференционный контраста (b). c – Совмещенное изображение. МЧ-ПМК модифицированы IAPP-sfGFP (панель I) и β2M-sfGFP (панель II); панель III – немодифицированные МЧ-ПМК. Масштабная линейка: 10 мкм (панели I и II) и 5 мкм (панель III).

частиц. Этот результат можно объяснить следующим образом. Предположительно, частицы элиминируются из брюшной полости в результате их захвата макрофагами. Макрофаги обеспечивают деградацию связанных с частицами белков. Захват частиц макрофагами может ослаблять поступление антигена в лимфоузлы и, таким образом, снижать эффективность гуморального ответа. Однако наша работа в глобальном плане имеет целью воздействие на противовирусный иммунитет. Эффективность последнего напрямую не связана с количеством специфических антител к антигенам вируса. Мы предполагаем, что несмотря на менее эффективный гуморальный иммунный ответ на белки, иммобилизованные на частицах ПМК, их быстрая элиминация из брюшной полости макрофагами может способствовать усилению Т-клеточному ответу, что наиболее важно при борьбе с вирусными инфекциями (Сахабеев и др., 2020).

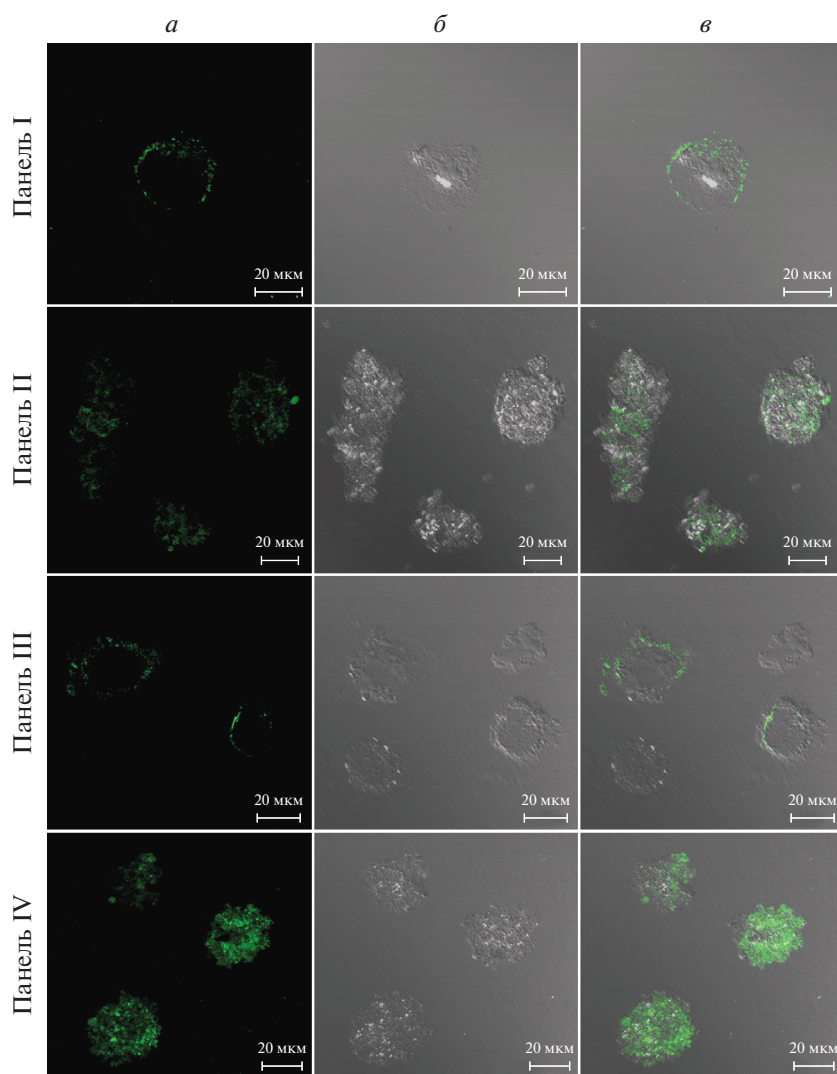
В настоящей работе необходимо было экспериментально подтвердить способность макрофагов поглощать модифицированные белками МЧ-ПМК. С этой целью макрофаги, полученные по вышеприведенной методике из крови человека, инкубировали с суспензией исходных МЧ-ПМК, модифицирован-

ных белками слияния β2M-sfGFP или IAPP-sfGFP, а также с растворами соответствующих белков слияния в качестве контроля.

Фагоцитоз исследовали при помощи лазерной сканирующей микроскопии. По интенсивности флуоресценции на рис. 2 можно предположить, что частицы с ковалентно присоединенными β2M-sfGFP или IAPP-sfGFP (панели II и IV соответственно) поглощаются макрофагами более эффективно, чем свободные белки (панели I и III соответственно). Это отражает известную зависимость: более эффективное макрофагами поглощаются частицы с размерами более 500 нм (Gamvrellis et al., 2004; Сахабеев и др., 2020). Однако видно, что на панелях I и III (рис. 2) модельные белки также способны фагоцитироваться макрофагами. Это может быть связано с тем, что белки β2M и IAPP являются амилоидогенными и склонны к агрегации (Антимонова и др., 2016). По всей видимости, агрегаты этих белков тоже способны поглощаться фагоцитами благодаря увеличению размера по сравнению с их мономерными формами.

Аналогичным образом были изучены макрофаги, проинкубированные с немодифицированными





**Рис. 2.** Микрофотографии макрофагов после культивирования в среде RPMI, содержащей 10% сыворотки и L-глутамин, с различными объектами. *a* – Флуоресценция при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм; *b* – дифференциально-интерференционный контраст; *v* – совмещенное изображение. Панели показывают фагоциты после их культивирования с  $\beta$ 2M-sfGFP (I), с МЧ-ПМК, модифицированными  $\beta$ 2M-sfGFP (II), с IAPP-sfGFP (III) и с МЧ-ПМК, модифицированными IAPP-sfGFP (панель IV). Масштабная линейка: 20 мкм.

МЧ-ПМК. Значимой флуоресценции не наблюдали (данные не представлены).

Таким образом, в ходе работы продемонстрировано, что МЧ-ПМК способны к связыванию с белками на своей поверхности. Однако пространственная структура белка имеет большое значение для связывания белка на поверхности частиц. При этом лучше связываются те белки, которые характеризуются менее компактной структурой. Очевидно, что для более эффективного связывания белков с МЧ-ПМК могут быть использованы спейсеры, например, пептидной природы.

Кроме того, было показано, что конъюгаты МЧ-ПМК с модельными белками фагоцитируются макрофагами. По всей видимости, это может способствовать активации клеточного иммунного ответа,

которая была обнаружена в наших предыдущих исследованиях (Сахабеев и др., 2020).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы по получению МЧ на основе ПМК, их карбоксилированию, ковалентной иммобилизации белков на поверхности частиц, а также характеристики полученных полимерных систем выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-20104). Работы по получению модельных рекомбинантных белков, выделению макрофагов, поглощению макрофагами модифицированных МЧ, а также проведению конфокальной микроскопии выполнены в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования РФ: НИР № FGWG-2022-0009 (рег. № НИОКТР 122020300191-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Локального этического комитета Института экспериментальной медицины (выписка из протокола № 3/19 от 25.04.2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Антимонова О.И., Грудинина Н.А., Поляков Д.С., Шавловский М.М. 2016. Белок слияния амилина человека с зеленым флуоресцентным белком “Superfolder.” Естественные и мат. науки в совр. мире. Т. 4. № 39. С. 15. (Antimonova O.I., Grudinina N.A., Polyakov D.S., Shavlovskij M.M. 2016. Belok sliyaniya amilina cheloveka s zelenym fluorescentnym belkom “Superfolder. Estestvennye i mat. nauki v sovremennom. mire. V. 4. № 39. P. 15.)

Сахабеев Р.Г., Поляков Д.С., Гошина А.Д., Вишня А.А., Кудрявцев И.В., Сеницына Е.С., Коржиков-Влах В.А., Теникова Т.Б., Шавловский М.М. 2021. Усиление специфического Т-клеточного иммунного ответа при иммобилизации антигена на микро- и наночастицах. Инфекция и иммунитет. Т. 11. № 4. С. 777. (Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Goshina A.D., Vishnya A.A., Kudryavtsev I.V., Sinitcina E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tenukova T.B., Shavlovskiy M.M. 2021. Enhancing the specific T cell immune response against micro- and nanoparticle immobilized antigen. Russ. J. Infection Immunity. V. 11. № 4. P. 777.) <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ETS-1374>

Begines B., Ortiz T., Pérez-Aranda M., Martínez G., Merinero M., Argüelles-Arias F., Alcludia A. 2020. Polymeric nanoparticles for drug delivery: recent developments and future prospects. Nanomaterials. V. 10. P. 1403.

Bhattacharya S., Naveena Lavanya Latha J., Kumresan R., Singh S. 2007. Cloning and expression of human islet amyloid polypeptide in cultured cells. Biochem. and Biophys. Res. Commun. V. 356. P. 622.

Chen M., Rosenberg J., Cai X., Lee A.C.H., Shi J., Nguyen M., Wignakumar T., Mirle V., Edobor A.J., Fung J., Donington J.S., Shanmugarajah K., Lin Y., Chang E. et al. 2021. Nanotraps

for the containment and clearance of SARS-CoV-2. Matter. V. 4. P. 2059.

Davies J.Q., Gordon S. Isolation and culture of human macrophages. Basic Cell Culture Protocols. V. 290. P. 105.

Fajardo-Moser M., Berzel S., Moll H. 2008. Mechanisms of dendritic cell-based vaccination against infection. Internat. J. Med. Microbiol. V. 298. P. 11.

Gamvrellis A., Leong D., Hanley J.C., Xiang S.D., Mottram P., Plebanski M. 2004. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. Imm. Cell Biol. V. 82. P. 506.

Korzhikov-Vlakh V., Averianov I., Sinityna E., Nashchekina Y., Polyakov D., Guryanov I., Lavrentieva A., Raddatz L., Korzhikova-Vlakh E., Scheper T., Tennikova T. 2018. Novel pathway for efficient covalent modification of polyester materials of different design to prepare biomimetic surfaces. Polymers. V. 10. P. 1299.

Lin C.-Y., Lin S.-J., Yang Y.-C., Wang D.-Y., Cheng H.-F., Yeh M.-K. 2015. Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases. Human Vaccines Immunother. V. 11. P. 650.

Pedelaq J.-D., Cabantous S. 2019. Development and applications of superfolder and split fluorescent protein detection systems in biology. Internat. J. Mol. Sci. V. 20. P. 3479.

Peres C., Matos A.I., Connot J., Sainz V., Zupančič E., Silva J.M., Graca L., Gaspar R.S., Preat V., Florindo H.F. 2017. Poly(lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation. Acta Biomaterialia. V. 48. P. 41.

Simón-Vázquez R., Peleteiro M., González-Fernández Á. 2020. Polymeric nanostructure vaccines: applications and challenges. Expert Opinion Drug Delivery. V. 17. P. 1007.

Taylor P.C., Adams A.C., Hufford M.M., de la Torre I., Winthrop K., Gottlieb R.L. 2021. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. Nature Rev. Immunol. V. 21. P. 382.

Tyler B., Gullotti D., Mangraviti A., Utsuki T., Brem H. 2016. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Rev. V. 107. P. 163.

Vilos C., Velasquez L.A. 2012. Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. J. Biomed. Biotech. V. 2012. P. 1.

Vlachopoulos A., Karlioti G., Balla E., Daniilidis V., Kalamas T., Stefanidou M., Bikiaris N.D., Christodoulou E., Koumentakou I., Karavas E., Bikiaris D.N. 2022. Poly(lactic acid)-based microparticles for drug delivery applications: an overview of recent advances. Pharmaceutics. V. 14. P. 359.

Phagocytosis of Protein-Modified Polymer Microparticles by Immune Cells

R. G. Sakhabeev<sup>a, b, \*</sup>, D. S. Polyakov<sup>b</sup>, N. A. Grudinina<sup>b</sup>, O. I. Antimonova<sup>b</sup>, V. A. Korzhikov-Vlakh<sup>c</sup>, E. R. Alikparova<sup>c</sup>, E. S. Sinityna<sup>c, d</sup>, and M. M. Shavlovsky<sup>b</sup>

<sup>a</sup>St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, 190013 Russia

<sup>b</sup>Institute of Experimental Medicine, St.-Petersburg, 197022 Russia

<sup>c</sup>Institute of Chemistry, St.-Petersburg State University, St. Petersburg, 198504 Russia

<sup>d</sup>Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

\*e-mail: helm505@mail.ru

The ability of three model green proteins to covalently bind to microparticles (MP) based on poly(D,L-lactic acid) (PLA). Green fluorescent protein (sfGFP), recombinant human beta2-microglobulin-sfGFP fusion protein (β2M-sfGFP), and recombinant human amylin-sfGFP fusion protein (IAPP-sfGFP) were isolated by affinity chromatog-

raphy. The double emulsion method was used to form PLA-MPs. The modification of PLA MPs by proteins was testified using laser scanning microscopy (LSM). Phagocytosis of PLA-MPs modified with different proteins and free model proteins by macrophages was also studied using LSM. Recombinant sfGFP has been shown to bind to particle surfaces at lower levels compared to  $\beta$ 2M-sfGFP and IAPP-sfGFP. Presumably, this is due to the fact that amino groups that could potentially react with activated carboxyl groups on particle surfaces, are spatially unavailable for this reaction due to the structure of sfGFP.  $\beta$ 2M and IAPP within the corresponding recombinant proteins are spacer structures between the surface of spherical particles and sfGFP. It was also found that increasing the protein/particle ratio by a factor of three did not lead to an increase in the amount of bound protein per unit mass of particles, which may indicate that the amount of protein that can be bound per unit mass of particles is limited by the capacity of the particles themselves. The study of phagocytosis of PLA-MPs modified with model proteins revealed that MPs bearing  $\beta$ 2M-sfGFP and IAPP-sfGFP were captured by macrophages and, therefore, contribute to the activation of the cellular immune response, which is important in the fight against various viral infections. In addition, model proteins ( $\beta$ 2M-sfGFP, IAPP-sfGFP) appeared to be also capable of phagocytosis. This may be due to the fact that both  $\beta$ 2M and IAPP are amyloidogenic and aggregation prone proteins. Apparently, the aggregates of these proteins are also able to be absorbed by macrophages due to the increase in size compared to their monomeric forms.

**Keywords:** microparticles, poly(lactic acid), protein immobilization, green fluorescent protein, virus “traps”, phagocytosis