
КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 544.77;577.164;577.19

РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННЫЙ ЭНДОЦИТОЗ – ВАЖНЫЙ ПУТЬ ПОСТУПЛЕНИЯ ЖЕЛАТИНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ В КЛЕТКИ

А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, Т. О. СУХАН¹⁾, Т. Г. ШУТОВА²⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾

¹⁾*Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*

²⁾*Институт химии новых материалов НАН Беларуси,
ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Беларусь*

Представлены экспериментальные данные, детализирующие возможности использования желатиновых наночастиц, полученных методом двухстадийной десольватации без использования поверхностно-активных веществ, в качестве средств доставки фармакологически активных субстанций в культивируемые нормальные и раковые

Образец цитирования:

Потапович АИ, Сухан ТО, Шутова ТГ, Костюк ВА. Рецептор-опосредованный эндоцитоз – важный путь поступления желатиновых наночастиц в клетки. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2020;1:3–10.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-3-10>

For citation:

Potapovich AI, Suhan TO, Shutava TG, Kostyuk VA. Receptor-mediated endocytosis is an important way for gelatin nanoparticles penetration into cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;1:3–10. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-3-10>

Авторы:

Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Татьяна Олеговна Сухан – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Татьяна Геннадьевна Шутова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории биополимерных капсулированных структур.

Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
pot-alla@rambler.ru

Tatyana O. Suhan, PhD (biology); senior researcher at the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
tanyasuhan@mail.ru

Tatsiana G. Shutava, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of biopolymer encapsulated structures.
shutova@ichnm.basnet.by

Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), docent; head of the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
kostyuk@bsu.by

клетки человека. Показано, что клатрин-зависимый эндоцитоз является основным путем поступления наночастиц в нормальные фибробласты человека и раковые клетки линии MDA-MB-231. Благодаря данному виду эндоцитоза в клетки попадает более 50 % желатиновых наночастиц. Установлено, что в процессе клатрин-зависимого эндоцитоза эти наночастицы специфически связываются с коллагеновыми рецепторами.

Ключевые слова: эндоцитоз; желатиновые наночастицы; фибробласты; клеточная линия MDA-MB-231; нильский красный; желатин; хлорпромазин.

RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS IS AN IMPORTANT WAY FOR GELATIN NANOPARTICLES PENETRATION INTO CELLS

A. I. POTAPOVICH^a, T. O. SUHAN^a, T. G. SHUTAVA^b, V. A. KOSTYUK^a

^a*Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*

^b*Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus,
36 F. Skaryny Street, Minsk 220141, Belarus*

Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

Experimental data detailing the possibilities of using gelatin nanoparticles obtained by the two-stage desolvation method without the use of surfactants for delivering pharmacologically active substances to cultured normal and human cancer cells are presented. It was shown that clathrin-dependent endocytosis is the main route of entry of such nanoparticles into normal human fibroblasts and cancer cells of the MDA-MB-231 line. Due to this type of endocytosis, more than 50 % of gelatin nanoparticles enter the cells. It was shown that in the process of clathrin-dependent endocytosis, gelatin nanoparticles specifically bind to collagen receptors.

Keywords: endocytosis; gelatin nanoparticles; fibroblasts; cell line MDA-MB-231; Nile red; gelatin; chlorpromazine.

Введение

Традиционные способы доставки фармакологических препаратов при лечении сердечно-сосудистых, онкологических и других заболеваний сопряжены с рядом серьезных системных побочных эффектов, связанных с тем, что для обеспечения нужной концентрации в области потенциальной мишени приходится увеличивать дозу препарата. Поэтому в последние годы наблюдается растущий интерес к использованию наночастиц (НЧ) в качестве средств доставки фармакологических агентов. Применение НЧ, несущих на своей поверхности специфические лиганды, позволяет осуществлять адресную транспортировку лекарственного средства к органу-мишени, тем самым снизив терапевтическую дозу. Успех лечения с использованием НЧ в существенной степени определяется эффективностью их интернализации в клетки [1–3]. Традиционные фармакологические препараты поступают в клетку главным образом за счет пассивной диффузии или активного транспорта, в то время как нанолекарства – за счет эндоцитоза, который включает фагоцитоз и пиноцитоз. К фагоцитозу способны лишь некоторые типы клеток – моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные и тучные клетки, в незначительной степени – эпителиальные, эндотелиальные и паренхиматозные клетки [4]. Пиноцитоз, который осуществляют все типы клеток, включает клатрин-зависимый эндоцитоз (КлЗЭ), или рецептор-опосредованный эндоцитоз, кавеолин-зависимый эндоцитоз, макропиноцитоз, а также клатрин- и кавеолин-независимый эндоцитоз [5; 6]. Вид пиноцитоза, задействованный при интернализации нанолекарств в клетку, в значительной степени определяется размерами НЧ [7].

Ранее показана возможность использования желатиновых наночастиц (ЖН) в качестве средств доставки растительных полифенольных соединений в культивируемые нормальные и раковые клетки человека [8]. В настоящей работе изучено влияние специфического ингибитора КлЗЭ – хлорпромазина гидрохлорида – и конкурентного ингибитора коллагеновых рецепторов – желатина типа А – на поступление ЖН в нормальные фибробласты человека и клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231.

Материалы и методы исследования

Реактивы и среды. Желатин типа А (300 Блум), изотонический фосфатный буфер (ИФБ) (pH 7,4), диметилсульфоксид (ДМСО), нильский красный (НК), твин-80, Hoechst 33342 поставлялись компанией *Sigma-Aldrich* (Германия). Ростовая среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM), приобреталась у фирмы *Lonza* (Бельгия), эмбриональная сыворотка – у фирмы *Gibco* (США).

Клеточные культуры. В работе использовали нормальные фибробласты человека линии FL (*human lung fibroblasts*) и клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231. Клетки растили в полной среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамина и антибиотиков (100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂).

Оценка цитотоксичности желатина и хлорпромазина. Цитотоксичность ингибиторов КлЗЭ для раковых клеток линии MDA-MB-231 и нормальных фибробластов человека определяли через 24 ч после воздействия в 96-луночных планшетах, используя реактив PrestoBlue™ (*Invitrogen*, США), который разводили в культуральной среде (1 : 9) и добавляли к клеткам в количестве 100 мкл на лунку. Перед этим клетки отмывали один раз, помещая в каждую лунку по 200 мкл ИФБ. На всех планшетах оставляли лунки с культуральной средой без клеток для определения базового уровня флуоресценции. Последнюю измеряли после инкубации планшетов в CO₂-инкубаторе в течение 2 ч, используя значения Ex (560 ± 25) нм, Em (590 ± 10) нм.

Получение желатиновых наночастиц. ЖН получали методом двухстадийной десольватации без использования поверхностно-активных веществ по модифицированной методике [9]. Гидродинамические размеры, концентрацию и коэффициент полидисперсности, массовую долю желатина, а также дзета-потенциал (ζ-потенциал) частиц определяли, как описано в работе [8].

Получение желатиновых наночастиц, содержащих нильский красный (НК-ЖН). К 30 мл дисперсии ЖН в дистиллированной воде с концентрацией 5,25 мг/мл порциями (по 0,2 мл) добавляли 6 мл раствора НК (0,45 мг/мл) и обрабатывали образец ультразвуком в течение 1 мин после введения каждой порции красителя. Полученную дисперсию оставляли на 30 мин при комнатной температуре, после чего разделяли на алиquotы по 1 мл и отделяли НК-ЖН от супернатанта путем центрифугирования при 5500 об/мин в течение 10 мин. НК-ЖН диспергировали в 0,5 мл дистиллированной воды и объединяли алиquotы. Образец хранили при температуре 4 °C.

Изучение поступления НК-ЖН в клетки. Для количественной оценки эффективности поглощения НК-ЖН клетки растили в 24-луночных планшетах до конfluenceности 60 %, затем заменяли полную среду на среду без сыворотки (1 мл на лунку), содержащую 2 мкмоль/л инкапсулированного красителя, инкубировали 2 или 4 ч, после чего удаляли среду инкубации, клеточный монослой дважды промывали ИФБ (pH 7,4) и замораживали прикрепленные клетки при температуре –70 °C. После оттаивания клеток при комнатной температуре в каждую лунку 24-луночного планшета добавляли по 300 мкл ДМСО и выдерживали планшет 1 ч в темноте при постоянном перемешивании на мини-шейкере PSU-2T (*BioSan*, Латвия). Затем алиquotы из каждой лунки в трех повторах переносили в лунки 96-луночного планшета (100 мкл на лунку) и измеряли интенсивность флуоресценции при Ex (550 ± 25) нм, Em (650 ± 10) нм. Количество НК определяли, используя соответствующий калибровочный график.

Внутриклеточное распределение НК-ЖН оценивали посредством флуоресцентной микроскопии. В этом случае после удаления среды из лунок добавляли НК-ЖН (2 мкмоль/л по НК) в среде без сыворотки (1 мл на лунку). Инкубировали клетки с НК-ЖН в течение 1, 2 или 4 ч, удаляли среду, промывали клетки ИФБ (pH 7,4) два раза и добавляли в каждую лунку по 1 мл ИФБ. Проводили анализ и делали микрофотографии клеток с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 25 (*Carl Zeiss*, Германия), оснащенного цифровой фотокамерой. В ряде экспериментов дополнительно окрашивали клеточные ядра: к клеткам добавляли Hoechst 33342 в концентрации 5 мкг/мл в ИФБ (1 мл на лунку), инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Удаляли буфер с красителем и делали микрофотографии флуоресценции клеток, обусловленной НК или Hoechst 33342, с помощью системы флуоресцентной визуализации клеток ZOE Fluorescent Cell Imager (*BioRad*, США), позволяющей совмещать оба изображения.

При исследовании влияния ингибиторов КлЗЭ (рецептор-опосредованного эндоцитоза) на поступление НК-ЖН в клетки последние преинкубировали 60 мин с хлорпромазином и 30 мин с желатином.

Статистический анализ. Обработку результатов проводили с использованием стандартной компьютерной программы *Excel*. Данные представлены как среднее значение и стандартная ошибка среднего (Mean ± SE). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Физико-химические свойства желатиновых наночастиц, использованных в эксперименте. Средний гидродинамический диаметр ЖН, полученных методом двухстадийной десольватации, по интенсивности светорассеяния равен (264 ± 5) нм. В дисперсии ЖН в наибольшей степени представлены фракции частиц, имеющих диаметр от 190 до 220 нм. Их содержание достигает 46,9 % от общего числа. Средний диаметр и диаметр частиц, составляющих наибольшую долю в образце, различаются незначительно, что указывает на узкое распределение ЖН по размерам. Коэффициент полидисперсности ЖН достигает $0,030 \pm 0,012$. Для них характерно высокое значение ζ -потенциала, равное $(20,50 \pm 0,23)$ мВ. Достаточно большой положительный заряд на поверхности частиц обуславливает высокую коллоидную устойчивость раствора. Хранение ЖН в течение 6 мес. при температуре 4 °С не приводит к их агрегации.

Цитотоксичность хлорпромазина и желатина для фибробластов человека и клеток линии MDA-MB-231. Цитотоксичность хлорпромазина оценивали в диапазоне 5–50 мкмоль/л. Установлено, что при концентрации 10 мкмоль/л цитотоксический эффект хлорпромазина для обоих типов клеток отсутствует: жизнеспособность клеток MDA-MB-231 и фибробластов относительно контроля составила (101 ± 5) и (103 ± 3) % соответственно. Цитотоксичность действия желатина в отношении обоих типов клеток не выявлено во всем исследованном диапазоне концентраций (100–1000 мкмоль/л). В последующих экспериментах были использованы нетоксичные концентрации ингибиторов.

Поступление НК-ЖН в клетки. Для определения интернализации ЖН в них предварительно инкапсулировали НК. Количество НК-ЖН, поступившего в фибробласты и клетки линии MDA-MB-231, устанавливали через 2 и 4 ч инкубации. Полученные результаты представлены в табл. 1, из которой следует, что максимальный уровень НК в клетках MDA-MB-231 отмечался через 2 ч, и дальнейшая инкубация клеток с НК-ЖН не приводила к достоверному изменению внутриклеточного содержания красителя. Несколько другая кинетика накопления НК-ЖН в клетках наблюдалась в случае фибробластов: внутриклеточное содержание НК монотонно возрастало в течение всего периода инкубации (4 ч). Стоит отметить, что скорость поступления НК в фибробласты была достоверно ниже, чем в MDA-MB-231 ($p < 0,05$).

Таблица 1

Концентрация НК, экстрагируемого ДМСО
из клеток, инкубированных с НК-ЖН, нмоль/л

Table 1

The concentration of Nile red, extracted by DMSO
from cells incubated with Nile red – gelatin nanoparticles, nmol/L

Время инкубации, ч	Тип клеток	
	MDA-MB-231	Фибробласты
2	175 ± 22	$65 \pm 15^{**}$
4	161 ± 19	$102 \pm 24^{*#}$

^{*}, ^{**} Различия достоверны относительно концентрации НК в MDA-MB-231 при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно; [#] различия достоверны относительно концентрации НК в фибробластах через 2 ч инкубации при $p < 0,05$.

Анализ флуоресцентных микрофотографий клеток, инкубированных с НК-ЖН в течение 2 и 4 ч (рис. 1), подтверждает, что скорость поступления инкапсулированного НК в клетки MDA-MB-231 (см. рис. 1, в, г) выше, чем в фибробласты (см. рис. 1, а, б). Приведенные микрофотографии также показывают, что в обоих типах клеток НК равномерно распределяется в цитоплазме, за исключением центральной зоны, которая, как свидетельствует окрашивание специфичным флуоресцентным красителем хроматина Hoechst 33342 (рис. 2), является клеточным ядром.

Влияние ингибиторов клатрин-зависимого эндоцитоза на поступление НК-ЖН в клетки. Известно, что в функционировании КлЗЭ важную роль играют поверхностные рецепторы, способные избирательно связываться с различными лигандами – от растворимых макромолекул до крупных частиц. К ним относятся и коллагеновые рецепторы, лигандами которых выступают коллаген и его денатурированная форма – желатин. Эти рецепторы присутствуют на поверхности макрофагов, фибробластов, кератиноцитов, эндотелиальных и ряда других клеток, обеспечивая избирательность микровезикулярного транспорта и существенно увеличивая его скорость [10; 11]. Еще в 1992 г. было показано, что в качестве конкурентного ингибитора коллагеновых рецепторов может быть использован желатин [12].

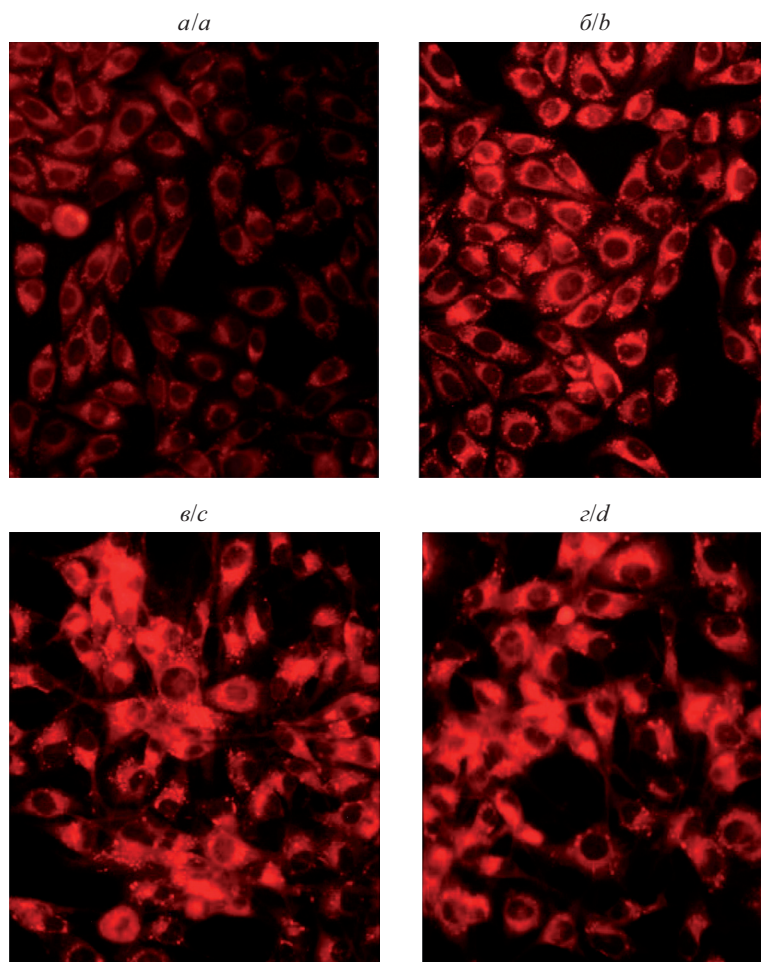


Рис. 1. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии фибробластов (*а, б*) и клеток линии MDA-MB-231 (*в, г*) через 2 ч (*а, в*) и 4 ч (*б, г*) инкубации с НК-ЖН в концентрации 2 мкмоль/л

Fig. 1. Representative fluorescent micrographs of fibroblasts (*a, b*) and MDA-MB-231 cells (*c, d*) after 2 h (*a, c*) and 4 h (*б, d*) incubation with Nile red – gelatin nanoparticles at the concentration of 2 $\mu\text{mol/L}$

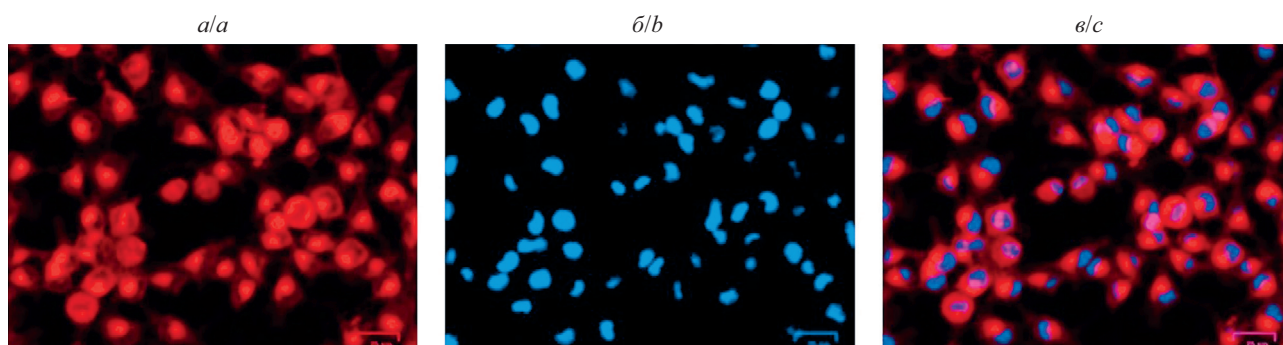


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток линии MDA-MB-231 через 1 ч инкубации с НК-ЖН в концентрации 2 мкмоль/л и дополнительно окрашенных Hoechst 33342: *а* – флуоресценция НК; *б* – флуоресценция Hoechst 33342; *в* – наложение флуоресценций НК и Hoechst 33342

Fig. 2. Representative fluorescent micrographs of MDA-MB-231 cells after 1 h incubation with Nile red – gelatin nanoparticles at the concentration of 2 $\mu\text{mol/L}$. Cells were additionally stained with Hoechst 33342:

a – Nile red fluorescence; *b* – Hoechst 33342 fluorescence; *c* – merge

В настоящей работе при исследовании его влияния на транспорт НК-ЖН в клетки установлено, что преинкубация фибробластов и клеток MDA-MB-231 в течение 30 мин с желатином уже в концентрации 100 мкмоль/л приводит к значительному снижению попадания наноструктур в клетки. В случае фибробластов максимальный эффект желатина наблюдался через 4 ч инкубации, для клеток MDA-MB-231 процент ингибирования был одинаковым через 2 и 4 ч инкубации (табл. 2). Дозозависимое ингибирование поступления НК-ЖН желатином в исследованном диапазоне концентраций отмечалось только для фибробластов при 2-часовой инкубации с НК-ЖН. В остальных экспериментах ингибирование эндоцитоза желатином при 100 мкмоль/л было на уровне 50–60 % и при дальнейшем увеличении концентрации не повышалось.

Таблица 2

**Ингибирование желатином поступления НК-ЖН
в культивируемые клетки через 2 и 4 ч инкубации, %**

Table 2

**Inhibition of Nile red – gelatin nanoparticles entry
into cultivated cells by gelatin after 2 and 4 h incubation, %**

Концентрация желатина, мкмоль/л	Фибробласты		MDA-MB-231	
	2 ч	4 ч	2 ч	4 ч
100	23,3 ± 13,7*	57,8 ± 13,7**	49,4 ± 9,4**	56,9 ± 9,4**
500	30,6 ± 26,3*	51,5 ± 9,1**	56,2 ± 6,7**	55,5 ± 11,0**
1000	42,5 ± 10,9**	52,6 ± 9,2**	64,2 ± 13,9**	62,7 ± 5,7**

*, ** Различия достоверны относительно результатов в отсутствие желатина при $p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно.

Влияние специфического ингибитора КлЗЭ хлорпромазина в концентрации 10 мкмоль/л на поступление НК-ЖН в фибробласты человека и клетки линии MDA-MB-231 было исследовано через 4 ч инкубации без желатина и совместно с ним (100 мкмоль/л). Как видно из данных, приведенных в табл. 3, хлорпромазин снижает поступление НК-ЖН в клетки почти на 40 %. Относительно совместного действия хлорпромазина и желатина установлено, что ингибирующий эффект этих соединений не суммируется и только незначительно ($p > 0,05$) превышает ингибирующий эффект желатина, что вполне объяснимо, поскольку оба агента воздействуют на КлЗЭ. Таким образом, более 50 % НК-ЖН поступают в клетки путем КлЗЭ, специфически связываясь с коллагеновыми рецепторами.

Таблица 3

**Ингибирование хлорпромазином (без желатина и совместно с ним)
поступления НК-ЖН в культивируемые клетки через 4 ч, %**

Table 3

**Inhibition of Nile red – gelatin nanoparticles entry into cultivated cells
by chlorpromazine alone and with gelatin after 4 h, %**

Условия эксперимента	Тип клеток	
	Фибробласты	MDA-MB-231
Хлорпромазин (10 мкмоль/л)	39,5 ± 6,7	38,2 ± 3,1
Желатин (100 мкмоль/л)	49,0 ± 9,1	45,4 ± 6,3
Хлорпромазин совместно с желатином	57,3 ± 11,9	49,9 ± 5,7

Как свидетельствуют полученные данные, исследованные ингибиторы не полностью блокировали транспорт ЖН, поэтому можно допустить, что наряду с КлЗЭ существуют и другие пути поступления НК-ЖН в клетки. Считается, что размер НЧ в значительной степени предопределяет путь их попадания в клетку [7]. Исследуемые ЖН имеют средний гидродинамический диаметр (264 ± 5) нм, при этом примерно у половины диаметр меньше 200 нм. Есть экспериментальные данные, подтверждающие, что именно для таких НЧ характерен КлЗЭ [10]. Частицы размером более 200 нм могут поступать в клетку посредством макропиноцитоза или кавеолин- и клатрин-независимого эндоцитоза [3].

Другой важный параметр НЧ, который влияет на интернализацию, – их поверхностный заряд. Поскольку внешняя сторона клетки несет отрицательный заряд, в нее легче проникают НЧ с положительным поверхностным зарядом. Вопрос о том, влияет ли заряд НЧ на то, какой вид эндоцитоза будет задействован для их переноса в клетку, остается открытым. Согласно одним данным, положительно заряженные НЧ поступают в клетку через КлЗЭ [13; 14], согласно другим – через макропиноцитоз [15] или кавеолин- и клатрин-независимый эндоцитоз [16]. Отрицательно заряженные НЧ в основном проникают в клетку за счет кавеолин-зависимого эндоцитоза [15], а для нейтральных НЧ не выявлен предпочтительный путь интернализации. Полученные нами результаты с ингибиторами КлЗЭ подтверждают, что последний играет существенную роль в интернализации положительно заряженных НК-ЖН. Принимая во внимание размеры и положительный заряд ЖН, можно допустить, что их трансмембранный перенос также осуществляется через макропиноцитоз или кавеолин- и клатрин-независимый эндоцитоз.

Заключение

Установлено, что КлЗЭ является основным путем поступления ЖН, полученных методом двухстадийной десольватации без использования поверхностно-активных веществ, в нормальные фибробласты и раковые клетки линии MDA-MB-231. Показано, что в процессе указанного эндоцитоза ЖН специфически связываются с коллагеновыми рецепторами.

Библиографические ссылки

1. Sahoo SK, Labhassetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*. 2003;8(24):1112–1120. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02903-9.
2. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(8):748–758. DOI: 10.1016/j.addr.2007.06.008.
3. Akinc A, Battaglia G. Exploiting endocytosis for nanomedicines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [Internet]. 2013 [cited 2019 July 1];5(11):a016980. Available from: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/5/11/a016980.full>. DOI: 10.1101/cshperspect.a016980.
4. Birge RB, Ucker DS. Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15(7):1096–1102.
5. Wang J, Byrne JD, Napier ME, DeSimone JM. More effective nanomedicines through particle design. *Small*. 2011;7(14):1919–1931. DOI: 10.1002/sml.201100442.
6. Rappoport JZ. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*. 2008;412(3):415–423. DOI: 10.1042/BJ20080474.
7. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Advanced Materials*. 2009;21(4):419–424. DOI: 10.1002/adma.200801393.
8. Сухан ТО, Шутова ТГ, Ушенкина АМ, Потапович АИ, Костюк ВА. Получение желатиновых наночастиц и исследование их взаимодействия с культивируемыми клетками. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018; 1:13–19.
9. Coester CJ, Langer K, Von Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation*. 2000;17(2):187–193. DOI: 10.1080/026520400288427.
10. Sorensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrod B. Liver sinusoidal endothelial cells. *Comprehensive Physiology*. 2015;5(4):1751–1774. DOI: 10.1002/cphy.c140078.
11. Smedsrod B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochemical Journal*. 1990;271(2):345–350. DOI: 10.1042/bj2710345.
12. Lu ML, McCarron RJ, Jacobson BS. Initiation of HeLa cell adhesion to collagen is dependent upon collagen receptor upregulation, segregation to the basal plasma membrane, clustering and binding to the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*. 1992;101(4):873–883.
13. Vina-Vilaseca A, Bender-Sigel J, Sorkina T, Closs EI, Sorkin A. Protein kinase C-dependent ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis of the cationic amino acid transporter CAT-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(10):8697–8706. DOI: 10.1074/jbc.M110.186858.
14. Kovács T, Kárász A, Szöllösi J, Nagy P. The density of GM1-enriched lipid rafts correlates inversely with the efficiency of transfection mediated by cationic liposomes. *Cytometry. Part A*. 2009;75A(8):650–657. DOI: 10.1002/cyto.a.20756.
15. Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules*. 2008;9(2):435–443. DOI: 10.1021/bm700535p.
16. Vighi E, Leo E. Studying the *in vitro* behavior of cationic solid lipid nanoparticles as a nonviral vector. *Nanomedicine*. 2012; 7(1):9–12. DOI: 10.2217/nnm.11.168.

References

1. Sahoo SK, Labhassetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*. 2003;8(24):1112–1120. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02903-9.
2. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(8):748–758. DOI: 10.1016/j.addr.2007.06.008.

3. Akinc A, Battaglia G. Exploiting endocytosis for nanomedicines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [Internet]. 2013 [cited 2019 July 1];5(11):a016980. Available from: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/5/11/a016980.full>. DOI: 10.1101/cshperspect.a016980.
4. Birge RB, Ucker DS. Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15(7):1096–1102.
5. Wang J, Byrne JD, Napier ME, DeSimone JM. More effective nanomedicines through particle design. *Small*. 2011;7(14):1919–1931. DOI: 10.1002/sml.201100442.
6. Rappoport JZ. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*. 2008;412(3):415–423. DOI: 10.1042/BJ20080474.
7. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Advanced Materials*. 2009;21(4):419–424. DOI: 10.1002/adma.200801393.
8. Suhan TO, Shutova TG, Ushenkina AM, Potapovich AI, Kostyuk VA. Obtaining gelatin nanoparticles and study their interaction with cultured cells. *Journal of Belarusian State University. Biology*. 2018;1:13–19. Russian.
9. Coester CJ, Langer K, Von Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation*. 2000;17(2):187–193. DOI: 10.1080/026520400288427.
10. Sorensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrod B. Liver sinusoidal endothelial cells. *Comprehensive Physiology*. 2015;5(4):1751–1774. DOI: 10.1002/cphy.c140078.
11. Smedsrod B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochemical Journal*. 1990;271(2):345–350. DOI: 10.1042/bj2710345.
12. Lu ML, McCarron RJ, Jacobson BS. Initiation of HeLa cell adhesion to collagen is dependent upon collagen receptor upregulation, segregation to the basal plasma membrane, clustering and binding to the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*. 1992;101(4):873–883.
13. Vina-Vilaseca A, Bender-Sigel J, Sorkina T, Closs EI, Sorkin A. Protein kinase C-dependent ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis of the cationic amino acid transporter CAT-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(10):8697–8706. DOI: 10.1074/jbc.M110.186858.
14. Kovács T, Kárász A, Szöllösi J, Nagy P. The density of GM1-enriched lipid rafts correlates inversely with the efficiency of transfection mediated by cationic liposomes. *Cytometry. Part A*. 2009;75A(8):650–657. DOI: 10.1002/cyto.a.20756.
15. Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules*. 2008;9(2):435–443. DOI: 10.1021/bm700535p.
16. Vighi E, Leo E. Studying the *in vitro* behavior of cationic solid lipid nanoparticles as a nonviral vector. *Nanomedicine*. 2012;7(1):9–12. DOI: 10.2217/nmm.11.168.

Статья поступила в редакцию 05.11.2019.
Received by editorial board 05.11.2019.