

## РЕГУЛИРОВАНИЕ ДИНАМИН-ЗАВИСИМОГО ЭНДОЦИТОЗА

**Терпинская Т.И.**

*к. б. н., ведущий научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
terpinskayat@mail.ru;*

**Янченко Т.Л.**

*младший научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
tanyaya190@gmail.com;*

**Радченко А.В.**

*научный сотрудник лаборатории нанохимии НИИ физико-химических проблем, г. Минск, Беларусь  
aleksandrardchenko10@gmail.com;*

**Кохановский А.И.**

*научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
akakhanouski@gmail.com;*

**Полукошко Е.Ф.**

*научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
efpoluko@list.ru;*

**Артемов М.В.**

*д. х. н., заведующий лабораторией нанохимии НИИ физико-химических проблем, г. Минск, Беларусь  
m\_artemyev@yahoo.com*

*Исследована регуляция динамин-зависимого поглощения наночастиц клетками. Показано, что препараты, модулирующие активность динамина, могут использоваться для регуляции интенсивности эндоцитоза. Ringo 1-23, стабилизирующий кольцевые структуры динамина и активирующий его ГТФ-азную его активность, значительно усиливает накопление наночастиц в клетках глиомы Сб.*

**Ключевые слова:** динамин; эндоцитоз; Dynasore; Ringo 1-23

## REGULATION OF DYNAMINE-DEPENDENT ENDOCYTOSIS

**Terpinskaya T.I.**

*Candidate of Biology, Leading Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
terpinskayat@mail.ru*

**Yanchanka T.L.**

*Junior Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
tanyaya190@gmail.com;*

**Radchanka A.V.**

*Researcher, Research Institute for Physical Chemical Problems, Minsk,  
Belarus*

*aleksandrardchenko10@gmail.com;*

***Kakhanouski A.I.***

*Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Belarus*

*akakhanouski@gmail.com;*

***Palukoshka A.F.***

*Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Belarus*

*efpoluko@list.ru;*

***Artemyev M.V.***

*Doctor of Chemistry, Head of the Laboratory of Nanochemistry, Research  
Institute for Physical Chemical Problems, Minsk, Belarus*

*m\_artemyev@yahoo.com*

*The regulation of dynamin-dependent uptake of nanoparticles by cells was investigated. It has been shown that drugs modulating the activity of dynamin can be used to regulate the intensity of endocytosis. Ringo 1-23, which stabilizes the ring structures of dynamin and activates its GTPase activity, significantly enhances the accumulation of nanoparticles in C6 glioma cells.*

***Key words: dynamine; endocytosis; Dynasore; Ringo 1-23***

Эндоцитоз является одним из важнейших физиологических процессов клетки. С участием эндоцитоза происходит поглощение питательных веществ, сигнальная трансдукция, нейротрансдукция. Кроме того, процессы эндоцитоза играют весьма значимую роль в поглощении клеткой лекарственных препаратов. Одним из подходов для усиления селективности действия лекарств является разработка наноносителей для таргетной доставки. Это обуславливает актуальность изучения механизмов регуляции эндоцитоза наночастиц.

ГТФ-аза динамин принимает участие в различных путях эндоцитоза - клатрин-опосредованном поглощении, фагоцитозе и, вероятно, в кавеолин-опосредованном эндоцитозе. Наиболее изученная функция динамина в эндоцитозе связана с отщеплением от плазматической мембраны образовавшегося эндоцитозного пузырька, которое протекает с образованием вокруг впячиваний плазматической мембраны спиралеподобной структуры динамина. За счет ГТФазной активности домена внутри динамина происходит фосфорилирование тирозиновых остатков динамина, при этом расстояние между витками увеличивается, а внутренний диаметр витков сокращается, что приводит к отрыву везикулы от клеточной мембраны.

Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие об участии динамина и в более ранних этапах эндоцитоза, в частности, в регулировании формирования и созревания клатрин-покрытых ямок.

Низкомолекулярные модуляторы динамина, такие как динасор или Ringo 1-23, широко используются для изучения эндоцитоза и других аспектов

мембранной динамики в различных клеточных системах. Эти небольшие молекулы способны проникать сквозь клеточные мембраны и влиять на олигомеризацию и ГТФ-азную активность динамина.

Цель нашего исследования является изучение регулирования эндоцитоза с помощью модуляторов активности динамина - динасора и Ringo 1-23.

#### **Материалы и методы.**

*Клетки.* Использовали клетки глиомы C6 из «Белорусской коллекции культур клеток человека и животных» РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ. Клетки выращивали в питательной среде DMEM, дополненной 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone) и антибиотиком (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин) (Sigma-Aldrich) при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Shellab, USA) с 5%-ным уровнем CO<sub>2</sub>.

*Наночастицы.* Полупроводниковые квантовые точки CdSe/ZnS типа ядро-оболочка с максимумом испускания от 570 до 580 нм для разных образцов были синтезированы согласно [5]. Наночастицы были инкапсулированы оболочками на основе поли(малеинового ангидрид-альт-тетрадецена) (ПМАТ) согласно [1]. Дзета потенциал инкапсулированных коллоидных наночастиц определяли с использованием *Malvern Zetasizer Nano ZS90*. Наночастицы в фосфатном буфере характеризовались слабым положительным дзета-потенциалом - +4,5 и + 5,2 мВ для наночастиц с карбоксильными и сульфонатными группами соответственно.

*Исследование механизмов эндоцитоза.* К клеткам, культивируемым в среде DMEM с 10% ЭТС, добавляли динасор или Ringo 1-23 в конечной концентрации 80 μM; SML1046 (также известный как CHIR99021, ингибитор гликоген синтазы киназы-3 (GSK-3)) в конечной концентрации 3 μM.

Клетки инкубировали 30 мин, затем вносили наночастицы в конечной концентрации 0,02 мкМ, инкубировали 24 ч при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, получали клеточные пробы и анализировали связывание наночастиц с клетками методом проточной цитометрии. Интенсивность связывания наночастиц с клетками оценивали по интенсивности флуоресценции (ИФ) клеток с учетом КВЛ наночастиц, используя формулу:

$$\text{ИФ} = (\text{значение флуоресценции, у.е.} * 100) / \text{КВЛ},$$

где КВЛ – квантовый выход люминесценции.

КВЛ для контроля (клетки без обработки наночастицами) принимали за 100%.

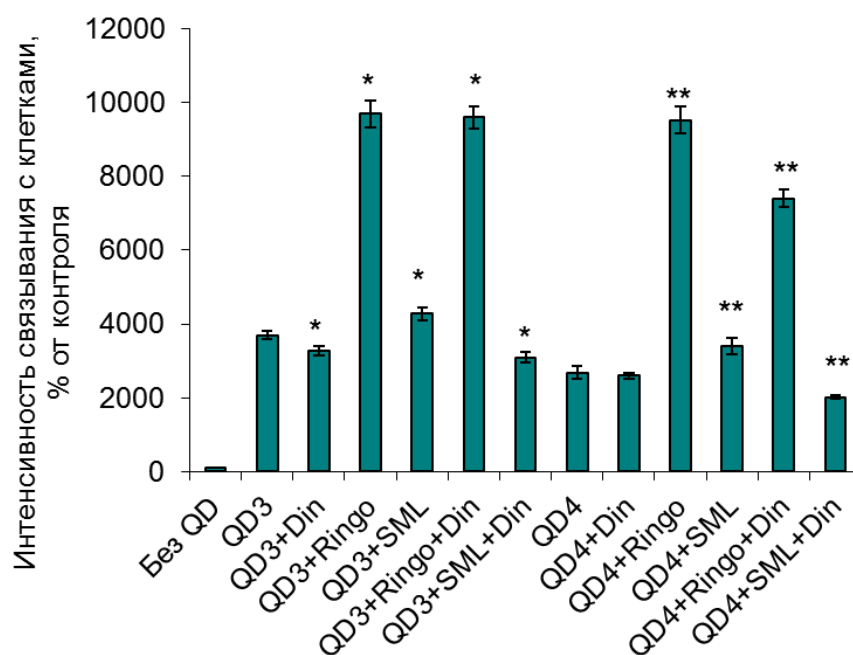
**Результаты.** Исследование физико-химических свойств наночастиц показало, что в среде DMEM с 10% ЭТС дзета-потенциал квантовых точек снижается, и они приобретают отрицательный заряд, составляющий -9,43 и -9,32 мВ соответственно. Вероятно, это изменение обусловлено взаимодействием с компонентами среды и формированием из них «короны», окружающей наночастицу. Агрегации наночастиц в среде культивирования не наблюдали. Используемые препараты также не вызывали агрегации.

При 24-часовой инкубации в полной среде DMEM наблюдалось связывание QD3 и QD4 с клетками глиомы C6, рис.1. С частицами QD3 клетки связывались в 1,4 раза интенсивнее, чем с QD4.

Динасор снижал связывание QD3 с клетками на 11%, связывание QD4 с клетками снижалось на 3%.

Препарат SML1046 (ингибитор GSK-3, понижающего регулятора динамина) повышал связывание QD3 и QD4 с клетками на 16 и 26% соответственно, но не снижал эффект динасора, а напротив, даже усиливал. При совместном действии динасора и SML1046 снижение связывания QD3 и QD4 с клетками составило 16 и 25%.

Ringo 1-23 значительно повышал связывание с клетками наночастиц обоих типов. QD3 в присутствии Ringo 1-23 связывались с клетками в 2,6 раза, QD4 – в 3,5 раза интенсивнее, чем в среде без препаратов. Динамин не изменил эффект Ringo 1-23 в отношении QD3 и несколько снизил – в отношении QD4.



**Рисунок 1.** Связывание наночастиц с клетками глиомы С6 в присутствии динасора (Din), Ringo 1-23 (Ringo), SML1046 (SML) и брефельдина А (Br); \*  $P < 0,05$  при сравнении с серией «qd3»; \*\*  $P < 0,05$  при сравнении с серией «qd4»

Флуоресцентная микроскопия показала, что наночастицы не образовывали агрегатов снаружи клеток, проникали внутрь и распределялись в виде гранул.

Таким образом, наши данные показывают, что препараты динасор и Ringo 1-23, являющиеся модуляторами активности динамина, оказали различный эффект на поглощение наночастиц.

Данные литературы свидетельствуют, что динасор и Ringo 1-23 могут оказывать различное влияние на функции динамина. Хорошо установлено, что динасор в клетках ингибирует ГТФ-азную активность динамина и эндоцитоз [3]. Ringo 1-23 стабилизирует кольцевые структуры динамина и активирует ГТФ-азную его активность [4] и актин-зависимую полимеризацию динамина [2].

Возможно, что в усилении маркировки клеток при действии Ringo 1-23 основную роль играет способность этого агента стабилизировать кольцевые структуры динамина и усиливать его актин-зависимую полимеризацию. Так как динасор, ингибирующий ГТФ-азную активность динамина, не отменял накопление наночастиц в клетках, можно предполагать, что ГТФ-азная активность динамина не играет решающей роли или что в присутствии Ringo 1-23 динасор не проявляет своего ингибирующего действия.

В качестве объяснения полученных нами результатов может выступать предположение о том, что Ringo 1-23 блокирует экзоцитоз наночастиц, благодаря чему происходит их постепенное накопление в клетках.

#### **Заключение.**

В поглощении клетками наночастиц, инкапсулированных амфифильным полимером, участвуют динамин-зависимые механизмы. Препараты, модулирующие активность динамина, могут использоваться для регуляции интенсивности эндоцитоза. Ringo 1-23, стабилизирующий кольцевые структуры динамина и активирующий его ГТФ-азную его активность, значительно усиливает накопление наночастиц в клетках глиомы С6.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта БРФФИ №X20КИ-009 и ГПНИ ««Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», задание 2.1.04 НИР 1.

#### **Список литературы**

1. Fedosyuk, A. Determination of Concentration of Amphiphilic Polymer Molecules on the Surface of Encapsulated Semiconductor Nanocrystals/ A. Fedosyuk, A. Radchanka, A. Antanovich et al.// *Langmuir*. – 2016. – V. 32, N8. - P. 1955–1961.
2. Gu C. Regulation of dynamin oligomerization in cells: the role of dynamin-actin interactions and its GTPase activity/ C. Gu, J. Chang, V.A. Shchedrina et al.// *Traffic*. - 2014. - V. 15, N8. – P. 819–38.
3. Hill, T.A. Inhibition of dynamin mediated endocytosis by the dynoles–synthesis and functional activity of a family of indoles / T.A. Hill, C.P. Gordon, A.B. McGeachie et al. // *J Med Chem*. - 2009. - V. 52. – P. 3762–73.
4. Robinson P. J., Sever S. USE OF DYNAMIN RING STABILIZERS. Patent Application Publication May 17, 2012 Sheet 1 of 13 US 2012/O122968 A1
5. Sukhanova, A. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells / A. Sukhanova, J. Devy, L. Venteo et al. // *Anal. Biochem*. – 2004. – V. 324. – P. 60–67.