

*Терпинская Т.И.¹, Балашевич Т.В.¹, Янченко Т.Л.¹, Радченко А.В.²,
Артемьев М.В.²*

Роль кальций-зависимых механизмов в поглощении наночастиц клетками глиомы С6

¹ ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь

² НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь

В последние годы разрабатывается все больше наноплатформ для целевой доставки лекарств, ранней диагностики, тераностики (одновременной терапии и диагностики), а также для исследовательских целей. Это обуславливает актуальность исследования механизмов взаимодействия клеток с наночастицами. Связывание и поглощение наночастиц клетками являются важными факторами, которые определяют биологические эффекты наночастиц и область их применения.

Ионы кальция регулируют многие биологические процессы, в том числе механизмы клеточного эндоцитоза.

Целью данной работы было исследование влияния внутриклеточного кальция на интенсивность маркировки клеток флуоресцентными полупроводниковыми наночастицами с различным зарядом оболочки.

Материалы и методы. Опыты проведены на клетках глиомы С6. Исследовали связывание с клетками люминесцентных наночастиц CdSe/ZnS с гидродинамическим диаметром 15–17 нм и максимумом испускания 580 нм. Наночастицы были инкапсулированы химически модифицированным амфифильным полимером на основе полималеинового ангидрида. Присутствие карбоксильных и четвертичных аммонийных групп в различных соотношениях в оболочке наночастиц обеспечивало варьирование их дзета-потенциала от -33 mV до +22 mV. При проведении экспериментов клетки суспензировали в фосфатном буфере, не содержащем ионов кальция. Вносили в клеточную суспензию один из препаратов: хелатирующий агент этиленгликоль-бис-аминоэтиловый эфир тетрауксусной кислоты (ЭГТА) для связывания внутриклеточных ионов кальция, ингибитор клеточной ГТФ-азы динамина - динасор, ингибитор кавеолин-зависимого эндоцитоза - генестеин, ингибиторы клатрин-зависимого эндоцитоза - хлорпромазин или сахарозу, ингибитор макропиноцитоза - этилизопропил амилорид. Затем добавляли наночастицы в конечной концентрации 0,1 мкМ. Клеточные пробы анализировали методом проточной цитометрии с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II, оценивая интенсивность маркировки клеток флуоресцентными наночастицами.

Результаты. Внесение в клеточную суспензию ЭГТА на 68 % усиливало маркировку клеток наночастицами с дзета-потенциалом -33 mV,

в оболочке которых присутствовали только карбоксильные группы. В то же время ЭГТА на 43, 79 и 92% снижал интенсивность маркировки клеток наночастицами с дзета-потенциалом -26 mV; +13 mV; +22 mV, в оболочке которых присутствовало 30, 50 или 100 % четвертичных аммонийных групп. Это свидетельствует о значительной роли кальций-зависимых процессов в поглощении наночастиц, имеющих в оболочке положительно-заряженные группы.

Зависимость поглощения наночастиц от внутриклеточных ионов кальция коррелировала с таковой от клеточной ГТФ-азы динамина. Этот фермент участвует в процессах эндоцитоза и обеспечивает отделение сформировавшейся везикулы от мембранных структур. Ингибитор динамина - динасор усиливал поглощение клетками наночастиц, несущих в оболочке только отрицательно заряженные карбоксильные группы, и дозозависимо снижал поглощение наночастиц, имеющих положительно-заряженные группы. Так, ингибирование динамина на 25, 71 и 80 % снижало поглощение наночастиц, несущих в оболочке 30, 50 или 100 % четвертичных аммонийных групп. Аналогичные, но менее выраженные тенденции отмечены для ингибитора кавеолин-зависимого эндоцитоза - генистеина, который на 25 или 50 % снижал поглощение наночастиц, несущих в оболочке 50 или 100 % четвертичных аммонийных групп.

Заключение. Роль кальций-зависимых механизмов в поглощении наночастиц зависит от заряда присутствующих в их оболочке химических групп и, соответственно, дзета-потенциала наночастиц. Кальций снижает поглощение клетками наночастиц, имеющих в оболочке только отрицательно-заряженные карбоксильные группы, и усиливает поглощение наночастиц, в оболочке которых присутствуют положительно-заряженные четвертичные аммонийные группы. Роль ионов кальция, а также динамин и кавеолин-зависимого эндоцитоза повышается с увеличением доли положительно-заряженных групп в оболочке и дзета-потенциала наночастиц.