

УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ В ПОГЛОЩЕНИИ НАНОЧАСТИЦ КЛЕТКАМИ

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;

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

Исследовали роль кальций-зависимых механизмов во взаимодействии наночастиц с клетками. Показано, что поглощение наночастиц зависит от кальциевого баланса клетки. Изменение активности кальциевых каналов, проницаемости плазматической мембраны для ионов кальция и концентрации ионов кальция в среде культивирования ведёт к изменению интенсивности эндоцитоза. Химический состав функциональных групп полимерной оболочки является одним из факторов, определяющих роль кальций-зависимых механизмов в поглощении наночастиц.

Ключевые слова: кальций; наночастицы; эндоцитоз; кальциевые каналы

CALCIUM-DEPENDENT MECHANISMS ARE INVOLVED IN THE UPTAKE OF NANOPARTICLES BY CELLS

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*

aleksandraradchenko10@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 role of calcium-dependent mechanisms in the interaction of nanoparticles with cells was investigated. It was shown that the uptake of nanoparticles depends on the calcium balance of the cell. Changes in the activity of calcium channels, the permeability of the plasma membrane for calcium ions and the concentration of calcium ions in the culture medium leads to the change in the intensity of endocytosis. The chemical composition of the functional groups of the polymer shell is one of the factors that determine the role of calcium-dependent mechanisms of the capture of nanoparticles.

Key words: *calcium; nanoparticles; endocytosis; calcium channels*

Наночастицы рассматриваются как перспективные инструменты в качестве клеточных маркеров, а также платформ для введения в клетку лекарственных веществ или нуклеиновых кислот. Это обуславливает актуальность исследования закономерностей взаимодействия наночастиц с клетками и разработки способов управления процессами эндоцитоза.

Ионы кальция являются одним из наиболее важных вторичных мессенджеров, участвуя в передаче биохимических сигналов и влияя на физиологические функции клетки и организма в целом. При изучении экзо- и эндоцитоза синаптических везикул показано, что ионы кальция участвуют в регуляции этих процессов [1]. В то же время роль кальций-зависимых механизмов в поглощении наночастиц практически не исследована.

Цель данной работы - исследовать участие ионов кальция в регуляции поглощения наночастиц клетками.

Клеточный обмен кальция осуществляется при участии ряда кальциевых каналов и насосов, обеспечивающих регулируемое поступление ионов кальция из внеклеточной среды в кальциевые депо клетки (расположенные главным образом в эндоплазматическом ретикулуме) и в цитоплазму, а также выброс кальция.

Среди кальциевых каналов, экспрессирующихся на плазматической мембране, значительную роль играют каналы, управляемые кальциевыми депо. Эти каналы активируются при опустошении кальциевых депо и служат для пополнения запасов кальция. Использование в экспериментах блокаторов или активаторов кальциевых каналов позволяет оценить влияние этих препаратов на

изучаемые параметры и судить о роли кальциевого баланса в физиологических процессах. Инструментами для исследования роли ионного баланса в регуляции клеточной активности являются также ионофоры, позволяющие ионам проникать через мембраны по градиенту концентрации, и хелаторы, обладающие способностью быстро связывать свободные ионы.

В качестве препаратов, влияющих на кальциевый баланс клетки, мы использовали блокатор каналов временного рецепторного потенциала (TRP-каналов) SKF-96365, кальциевый ионофор A23187, хелатор ионов кальция этиленгликоль-бис (β -аминоэтиловый эфир)-N, N, N', N'-тетрауксусную кислоту (ЭГТА).

Материалы и методы.

Клетки. Опыты проведены на клетках глиомы C6 из «Белорусской коллекции культур клеток человека и животных» РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ. Клетки выращивали в питательной среде DMEM (Sigma-Aldrich), дополненной 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone), и антибиотиком (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин (Sigma-Aldrich)).

Наночастицы. Использованы синтезированные согласно [2] флуоресцентные полупроводниковые наночастицы (квантовые точки – QD) типа «ядро-оболочка» CdSe/ZnS, инкапсулированные амфифильным полимером. Устойчивость к фотодеградаци и яркая флуоресценция в узком диапазоне позволяют эффективно исследовать количественные показатели связывания таких наночастиц с клетками методами проточной цитометрии. Полимерная оболочка наночастиц QD1 включала положительно заряженные четвертичные аммонийные группы и отрицательно заряженные карбоксильные группы, наночастиц QD2 - положительно заряженные четвертичные аммонийные группы и отрицательно заряженные сульфонатные группы. В фосфатном буфере QD1 и QD2 характеризовались умеренным положительным дзета-потенциалом - +7,8 и + 10,8 мВ соответственно.

Проведение экспериментов. Клетки суспензировали в среде DMEM с добавлением 10% ЭТС или в фосфатном буфере. В клеточные пробы вносили SKF-96365 в конечной дозе 3 мкМ; A23187 в конечной дозе 10 мкМ, ЭГТА в конечной дозе 10 мМ, в контрольных сериях – изотонический раствор. Инкубировали 30 мин при 37°C и 5% CO₂ 30 мин, затем добавляли наночастицы в конечной концентрации 0,02 мкМ. Культивировали клетки 24 ч в среде DMEM или 30 мин в фосфатном буфере, затем готовили клеточные пробы и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II (Becton Dickinson), оценивая интенсивность флуоресцентной маркировки клеток.

Результаты

Блокада TRP-каналов способствовала повышению на 15% поглощения клетками наночастиц с четвертичными аммонийными и карбоксильными группами и снижению на 32% поглощения наночастиц с четвертичными аммонийными и сульфонатными группами, рис. 1.

Поглощение наночастиц обоих типов снижал ионофор A23187, который формирует комплексы с двухвалентными катионами, перенося их через мембраны и таким образом нарушая потоки кальция между внеклеточным пространством, цитозолем и кальциевыми депо клетки. При культивировании в полной среде концентрация кальция вне клетки на порядки выше, чем в цитоплазме, и ионофор A23187 способствует повышению концентрации ионов кальция в цитоплазме. Кроме того, ионы кальция могут переходить в цитоплазму из кальциевых депо. Следовательно, процессы поглощения зависят от кальциевого баланса клетки и повышение цитоплазматического уровня кальция, вероятно, снижает интенсивность поглощения.

При блокаде TRP-каналов ингибирующий эффект Ca^{2+} -ионофора A23187 на поглощение наночастиц снижался. Одно из возможных объяснений состоит в том, что блокада каналов препятствует заполнению кальциевых депо, поэтому ионофор способствует переносу ионов кальция в цитоплазму только из внеклеточной среды.

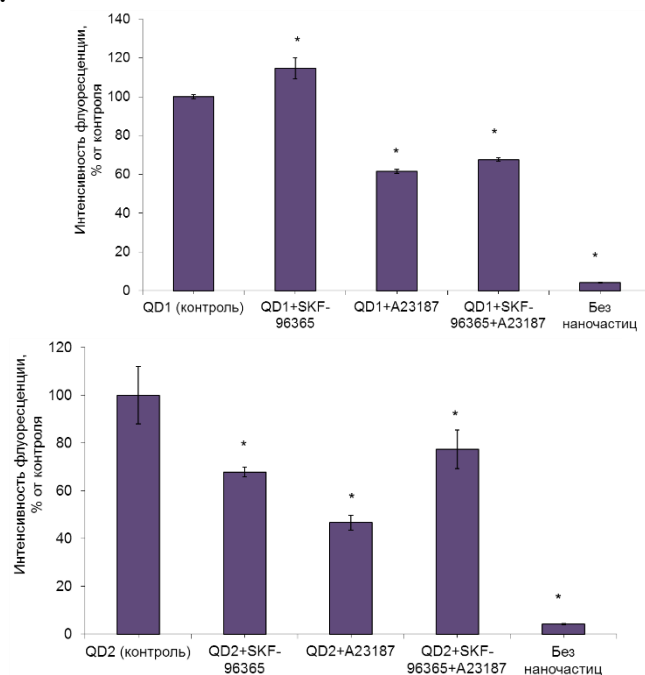


Рисунок 1. – Интенсивность флуоресценции клеток, обработанных SKF-96365 (3 мкМ) и ионофором A23187 (10 мкМ) и инкубированных 24 ч с наночастицами QD1 (слева) и QD2 (справа) (среда инкубации – ДМЕМ с 10% ЭТС), проточная цитометрия; * $P < 0,05$ при сравнении с контролем

Дополнительные эксперименты были проведены при культивировании клеток в фосфатном буфере, где ионы кальция отсутствовали. Эксперименты были краткосрочными, чтобы избежать клеточной гибели из-за бедной среды.

При блокаде TRP-каналов наблюдалось повышение интенсивности маркировки клеток наночастицами QD1 в 1,5 раза. Для QD2, несущих в оболочке четвертичные аммонийные и сульфатные группы, наблюдалась аналогичная,

но менее выраженная тенденция, не достигшая статистической значимости - увеличение интенсивности маркировки в 1,2 раза, рис. 2.

При обработке клеток ионофором A23187 наблюдалась тенденция к усилению или статистически значимое усиление маркировки клеток всеми исследованными наночастицами. При культивировании в бескальциевой среде ионофор способствует выходу ионов кальция из клетки по градиенту концентрации, следовательно, снижение концентрации кальция благоприятствует поглощению наночастиц. Но хелатирование кальция с помощью ЭГТА привело к очень значительному, до 13 раз, снижению поглощения обоих типов наночастиц, рис. 2. Это позволяет заключить, что ионы кальция все же необходимы для поглощения.

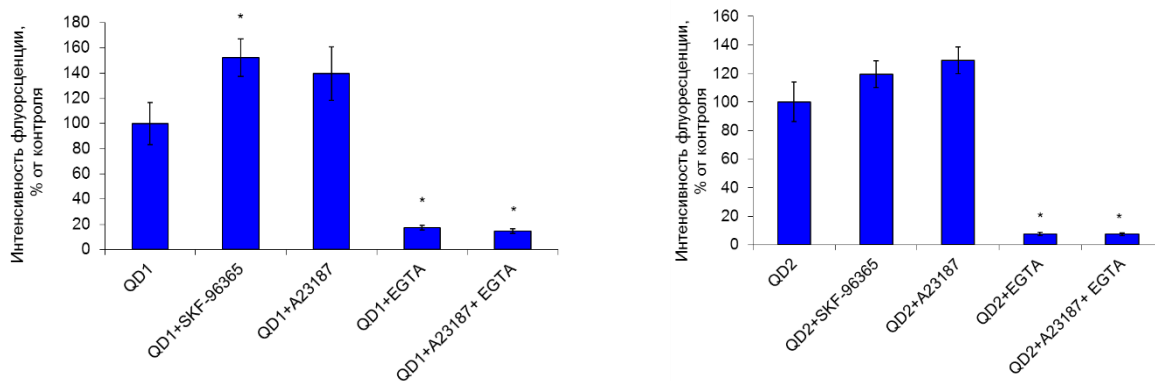


Рисунок 2 – интенсивность флуоресценции клеток, обработанных SKF-96365 (3 мкМ), ионофором A23187 (10 мкМ) и/или EGTA (10мМ), и инкубированных 30 мин с наночастицами QD1 (слева) или QD2 (справа) (среда инкубации - фосфатный буфер), проточная цитометрия; * P < 0,05 при сравнении с контролем

В целом, полученные данные свидетельствуют, что в полной среде ДМЕМ Ca²⁺-ионофор снижает маркировку клеток обоими исследованными типами наночастиц, а в фосфатном буфере без ионов кальция наблюдается тенденция к повышению маркировки клеток. Следовательно, снижение концентрации ионов кальция в цитоплазме способствует поглощению наночастиц.

Блокатор TRP-каналов SKF-96365 в полной среде и фосфатном буфере способствует связыванию с клетками наночастиц, несущих четвертичные аммонийные и карбоксильные группы в оболочке. Наличие в оболочке сульфонатных групп вместо карбоксильных приводит к изменению эффекта SKF-96365, который снижает или не влияет на связывание наночастиц с клетками. Это свидетельствует о различиях в механизмах поглощения наночастиц, несущих в оболочке химические группы сходного заряда, но различного химического состава.

Заключение.

Поглощение наночастиц зависит от кальциевого баланса клетки. Изменение активности кальциевых каналов, проницаемости плазматической мембраны для ионов кальция и концентрации кальция в среде культивирования ведёт к изменению интенсивности и регуляции эндоцитоза. Химический состав

функциональных групп полимерной оболочки является одним из факторов, определяющих роль кальций-зависимых механизмов в поглощении наночастиц.

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

6. Yao, C.K., Liu, Y.T., et al. A Ca²⁺ channel differentially regulates clathrin-mediated and activity-dependent bulk endocytosis / C.K. Yao, Y.T. Liu et al. PLoS Biol. - 2020. - V. 15, issue 4: e2000931.

7. 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.