

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ИХ СПОСОБНОСТЬЮ К ПОГЛОЩЕНИЮ НАНОЧАСТИЦ

*Терпинская Т.И.¹, Янченко Т.Л.¹, Рубинская М.А.¹, Грибовская В.А.²,
Полукошко Е.Ф.¹, Артемьев М.В.²*

¹*Институт физиологии НАН Беларуси,*

²*Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ*

Актуальность. В настоящее время наночастицы рассматриваются как перспективные носители для противоопухолевых препаратов, позволяющие улучшить их целевую доставку, обеспечить комплексное действие нескольких соединений с синергическим эффектом, а также комбинированное применение терапевтических и диагностических средств [1]. Исходя из этого, представляет интерес исследование закономерностей поглощения наноструктур клетками и изучение взаимосвязи процессов поглощения с другими клеточными процессами. Пролиферация является одной из клеточных функций, играющих ключевую роль в опухолевом росте, и противоопухолевый эффект соединений зачастую во многом обуславливается их антипролиферативным действием. Вместе с тем взаимосвязь пролиферативной активности опухолевых клеток и интенсивности клеточного эндоцитоза не изучена.

Цель. Исследование эффекта ряда ингибиторов клеточных ферментов или ионных каналов на пролиферацию опухолевых клеток и их способность к поглощению наночастиц.

Методы исследования. Исследование проведено на клетках глиомы С6. Для опыта были синтезированы квантовые точки CdSe/ZnCdS, покрытые оболочкой из поли (малеинового ангидрида-альт-тетрадецена) (ПМАТ), модифицированного смесью четвертичных аммонийных и сульфонатных групп в таком соотношении, чтобы при рН 7.4 дзета-потенциал квантовых точек составлял порядка -5 мВ. Квантовые точки были модифицированы этиленгликольдиамином, а затем дитиодипропионовой кислотой в качестве расщепляемого по S-S связи линкера, к которому в одном батче был ковалентно пришит краситель аминобутил флуоресцеин (НЧ1), а в другом – аминопроизводное бетулиновой кислоты (НЧ2). Наночастицы обладали яркой стабильной флуоресценцией, характеризуясь широким спектром поглощения и узкой полосой испускания с максимумом 610 нм. До добавления к клеткам наночастицы инкубировали со средой культивирования в течение 2 ч для стабилизации размера и заряда.

При проведении экспериментов клетки высевали в лунки культуральных планшетов в среде ДМЕМ с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиками, вносили U73122 (ингибитор фосфолипазы C) в конечной концентрации 0,1 и 1 μM , хлорпромазин (ингибитор Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых киназ) в конечной концентрации 56 μM , нордигидрогуаретовую кислоту (неселективный ингибитор липоксигеназ) в конечной концентрации

50 μM ; YM-58483 (ингибитор каналов, активируемых истощением кальция – CRAC (Calcium release-activated channels)) в конечной концентрации 1 μM . Через 30 мин вносили НЧ в конечной концентрации 10 нМ, спустя 48 ч клетки снимали с подложки, готовили препараты и анализировали методом проточной цитометрии с помощью цитофлуориметра BD FACS Canto II, Becton Dickinson. Для теста на жизнеспособность использовали окраску 7-аминоактиномицином Д, Sigma, для определения скорости пролиферации – флуоросферы FLOW-COUNT™, Beckman Coulter.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что оба типа наночастиц поглощались клетками и через 48 ч культивирования обнаруживались в клетках методом проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии.

Жизнеспособность клеток при действии НЧ1 и НЧ2, ингибиторов ферментов и ионных каналов, а также сочетаний наночастиц с ингибиторами практически не изменялась (вариации жизнеспособности клеток в различных сериях не превышали 1%).

Исследование влияния соединений на клеточную пролиферацию показало, что наноструктуры не проявляли антипролиферативного действия. Выраженное подавление роста клеток выявлено при действии хлорпромазина (подавление более, чем на 90%), U73122 в концентрации 1 μM (на 29%), нордигидрогуаретовой кислоты и YM-58483 (на 56 – 61%).

Сходные тенденции эти препараты проявляли при добавлении к культивируемым клеткам вместе с наноструктурами, хотя в этом случае антипролиферативный эффект нордигидрогуаретовой кислоты и YM-58483 несколько снижался. Подавление роста клеток составляло 13 – 19% в опытах с НЧ1 и 32 – 47% в опытах с НЧ2.

В присутствии хлорпромазина поглощение наночастиц усиливалось (в опытах с НЧ1) или имело выраженную тенденцию к усилению (в опытах с НЧ2). Это может свидетельствовать о поглощении НЧ1 и НЧ2 посредством клатрин-независимых механизмов, так как хлорпромазин известен как ингибитор клатрин-опосредованного эндоцитоза [2].

В присутствии нордигидрогуаретовой кислоты количество поглощенных клетками наночастиц снижалось (в опытах с НЧ2) или имело тенденцию к снижению (в опытах с НЧ1). У млекопитающих роль липоксигеназ в эндоцитозе плохо изучена; у насекомых липоксигеназы участвуют в контроле интернализации белка путем модуляции уровней цАМФ [3]. В присутствии остальных препаратов заметных изменений в поглощении наночастиц не отмечено.

В целом корреляция (коэффициент Спирмена) между количеством поглощенных QD (интенсивностью флуоресценции клеток) и концентрацией клеток в пробах составляла в опытах с НЧ1: -0,42 ($p < 0,05$), в опытах с НЧ2: -0,64 ($p < 0,05$). То есть в обоих случаях эти параметры проявляли статистически значимую умеренную отрицательную корреляцию – чем больше было поглощено наночастиц, тем меньше была концентрация клеток в пробах. Как показывают наши данные, это было обусловлено, прежде всего, очень сильным

эффектом хлорпромазина, который подавлял клеточный рост и усиливал поглощение НЧ1 и НЧ2 клетками в 1,8 и 2,2 раза соответственно. В то же время нордигидрогуаретовая кислота подавляла рост клеток и снижала поглощение НЧ1 в 1,4 раза, а НЧ2 – в 1,6 раза. Сходные тенденции наблюдались в сериях опытов с УМ-58483 – ингибирующее действие препарата на рост клеток было ассоциировано со снижением поглощения наночастиц.

Можно предположить, что торможение роста клеток нордигидрогуаретовой кислотой, ингибирующей липоксигеназы, или УМ-58483 (ингибитором CRAC каналов) сопровождалось подавлением эндоцитоза и снижением способности клеток поглощать наночастицы. С другой стороны, возможно, что первичным было подавление эндоцитоза, что способствовало замедлению пролиферации.

Подавление роста клеток хлорпромазином, напротив, было ассоциировано с интенсификацией накопления наночастиц. Это может быть следствием как усиления эндоцитоза, так и ослабления экзоцитоза наночастиц.

Возможно также, что нордигидрогуаретовая кислота, УМ-58483 и хлорпромазин регулируют пролиферативную активность и эндоцитоз посредством различных, независимых друг от друга механизмов.

Выводы. Установлено, что при действии хлорпромазина подавление роста клеток глиомы С6 ассоциировано с усилением, а при действии нордигидрогуаретовой кислоты или ингибитора CRAC каналов – со снижением способности клеток поглощать наночастицы. Это свидетельствует, что ингибиторы различных клеточных ферментов и каналов, проявляющие антипролиферативное действие в отношении опухолевых клеток, могут оказывать разнонаправленные эффекты на эндоцитоз наночастиц.

Работа выполнена при поддержке ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», задание 2.1.04 НИР 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy / S. Raj [et al.] // *Semin Cancer Biol.* – 2021. – Vol. 69. – P. 166–177.
2. Clathrin-mediated endocytosis of gold nanoparticles in vitro / C.T. Ng [et al.] // *Anat Rec (Hoboken).* – 2015. – Vol. 298, № 2. – P. 418–427.
3. Medeiros, M. N. The role of lipoxygenase products on the endocytosis of yolk proteins in insects: participation of cAMP / M. N. Medeiros [et al.] // *Arch Insect Biochem Physiol.* – 2004. – Vol. 55, № 4. – P. 178–187.