

МОДИФИКАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И
МЕХАНИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПОВЕРХНОСТИ
ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК ГЛИОМЫ КРЫСЫ С6
ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ
В КОМПЛЕКСЕ С ДНК

*Голубева Е.Н.¹, Кулагова Т.А.¹, Шуба М.В.², Поддубская О.Г.¹,
Куницкая Ю.Н.¹, Челнокова И.А.³, Стародубцева М.Н.^{3,4}*

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск, Беларусь

³ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», Гомель, Беларусь

⁴УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
Гомель, Беларусь

Введение. Углеродные наноматериалы, среди которых особое место занимают углеродные нанотрубки (УНТ), обладают серьезным потенциалом применения в сфере медицины, что обусловлено их уникальными физико-химическими свойствами. К настоящему времени показано, что УНТ могут быть использованы в качестве каркасного материала в инженерии клеточных тканей, для визуализации клеточных и субклеточных структур [1, 2], для создания на их основе биосенсоров, для адресной доставки биологически-активных веществ [3, 4], в том числе при терапии онкологических заболеваний, могут быть использованы для термической абляции (фото-термолиза) злокачественных образований [5]. Знание распределения плотности УНТ внутри клетки, а также механизмов проникновения и накопления УНТ в цитоплазме клеток является принципиально важным для выяснения влияния УНТ на структурно-функциональные свойства клеток, оптимизации селективного фото-термолиза раковых клеток и расчета концентраций препаратов доставляемых с помощью УНТ внутрь клетки. Цель работы – установить механизм проникновения комплексов одностенных УНТ с ДНК (ОУНТ-ДНК) внутрь клеток линии С6, выявить закономерности модификации свойств плазматической мембраны клеток и актинового цитоскелета при взаимодействии ОУНТ с клетками в течение 1–24 ч.

Материалы и методы. В настоящем исследовании использованы короткие ОУНТ (длина 100–300 нм) полученные методом, разработанным и описанным ранее [6], и функционализированные карбоксильными группами согласно [7]. Появление карбоксильных групп на МУНТ контролировали методом ИК-спектроскопии. Нековалентную функционализацию МУНТ проводили в физиологическом растворе, содержащем ДНК в концентрации 300 мкг/мл, в ультразвуковом

диспергаторе УЗДН-2Т в течение 30 мин, после чего полученную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g, чтобы осадить крупные агломераты ОУНТ, не подвергшиеся ковалентной и нековалентной функционализации. Для работы использовали супернатант, представляющий стабильную суспензию комплексов ОУНТ-ДНК. Появление дефектов в структуре ОУНТ в результате ломки или функционализации карбоксильными группами, а также распределение комплексов ОУНТ-ДНК в живых клетках осуществляли методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР) на микро-раман спектрометре NanoFinder HE® (Lotis ТП – Tokyo Instruments) согласно методике, описанной в [8].

Клетки глиомы крысы линии С6 культивировали в питательной среде DMEM, содержащей телячью эмбриональную сыворотку (10%) и гентамицин-сульфат (80 мг/мл), в CO₂-инкубаторе (5%) при температуре 37°C на стеклах или кремниевых пластинках (для АСМ и микроскопии комбинационного рассеяния соответственно). Для АСМ-исследования клетки фиксировали в 0,5% солевом буферном растворе глутарового альдегида и высушивали при комнатной температуре. АСМ-исследования поверхности клеток проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («Микротестмашины», Беларусь) в режимах записи карт рельефа и карт латеральных сил при контактном методе сканирования иглой-зондом CSC38 («MikroMasch», Эстония): уровень В, коэффициент жесткости 0,03 Н/м (22 ± 5°C, влажность 55 ± 10%) на воздухе. Обработку АСМ-данных осуществляли с помощью программы «SurfaceExplore 1.3.11» («Микротестмашины», Беларусь). Оценивали силы трения (скольжения) и шероховатость карт сил трения, а также шероховатость рельефа на участках поверхности размером 2,5 мкм × 2,5 мкм. Силы трения рассчитывали как полуразность латеральных сил при прямом и обратном проходе иглы-зонда по исследуемой поверхности.

Исследования актинового цитоскелета клеток проводили методом конфокальной микроскопии на микроскоп NanoFinder HE® (Lotis ТП – Tokyo Instruments) с использованием флуоресцентной метки CytoPainter Phalloidin-iFluor 532.

Результаты. В результате исследований установлено, что при добавлении комплексов ОУНТ-ДНК к клеткам в культуре, происходит накопление ОУНТ в цитоплазме клеток. Методом сканирующей микроскопии комбинационного рассеяния установлено, что ОУНТ проникают внутрь клеток после 1 ч инкубирования в присутствии ОУНТ в культуральной среде, после чего происходит их постепенное накопление внутри цитоплазмы. Через 18–24 ч процесс накопления ОУНТ прекращается и величина концентрации ОУНТ достигает максимального значения.

Процесс накопления ОУНТ в цитоплазме клеток сопровождается реорганизацией актинового цитоскелета. Одновременное использование методов сканирующей микроскопии комбинационного рассеяния и конфокальной флуоресцентной микроскопии позволило установить, что в областях локализации агломератов ОУНТ в цитоплазме клеток происходит конденсация фибриллярного актина и формирование актиновых «оболочек» вокруг агломератов. Характерные изображения агломератов ОУНТ и области конденсации фибриллярного актина в клетках глиомы крысы представлены на рисунке 1А, характерные спектры комбинационного рассеяния ОУНТ в клетках, зарегистрированные в указанных областях приведены на рисунке 1Б.

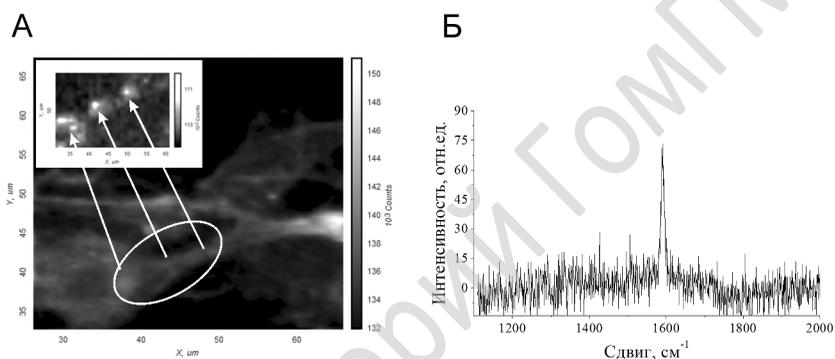


Рис. 1. Характерное изображение распределения фибриллярного актина в клетках линии С6 (А). Вставка на рисунке А – локализация ОУНТ, соответствующая областям конденсации фибриллярного актина в клетках, восстановленная по характерным спектрам комбинационного рассеяния света. Б – характерный спектр комбинационного рассеяния ОУНТ, локализованных в цитоплазме клеток.

С помощью атомно-силовой микроскопии поверхности глиальных клеток, инкубированных с ОУНТ в течение первых 2 ч, выявлено присутствие многочисленных инвагинаций поверхности по геометрическим параметрам схожих с размерами нанотрубок. Инкубация клеток с нанотрубками в течение 1 ч приводит к уменьшению значения шероховатости их поверхности (в сравнении с контрольным образцом $p = 0,005$, критерий Манн-Уитни) (рис. 2). С увеличением времени инкубирования клеток глиомы с ОУНТ значение шероховатости их клеточной поверхности статистически неотличимы от значений шероховатости, характерных для контрольных образцов клеток. При этом отмечены существенные изменения параметров карт распределения механических свойств поверхности глиальных клеток, обработанных

ОУНТ, свидетельствующие об индуцированных нанотрубками изменениях структуры кортикального актинового цитоскелета. Параметры (среднее значение и шероховатость) карт механических свойств (карт сил трения скольжения) для поверхности обработанных ОУНТ клеток в течение 1 ч были значительно меньше по сравнению с соответствующими параметрами для контрольных клеток ($p < 0,001$, критерий Манн-Уитни). С увеличением времени инкубации клеток с ОУНТ значения параметров сил трения увеличиваются и становятся больше значений параметров, характерных для контрольных клеток (для 24 ч инкубации $p = 0,004$, критерий Манн-Уитни).

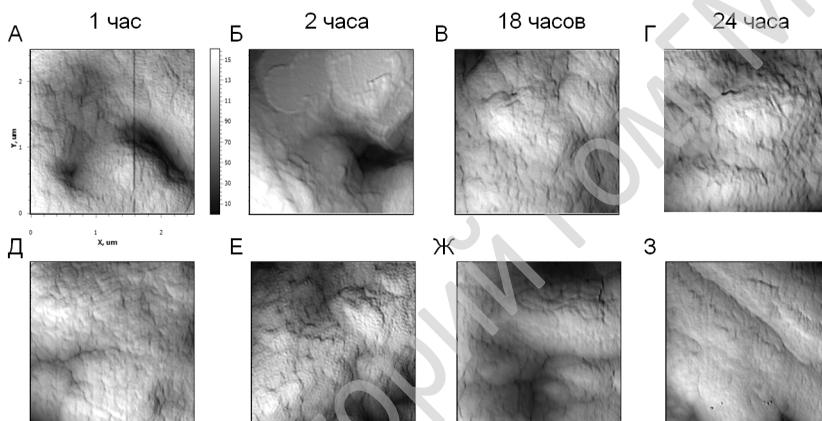


Рис. 2. АСМ-изображения (топография) поверхности глиальных клеток после их обработки ОУНТ (А-Г) в течение 1–24 ч и без какой-либо обработки (Д-З). Область сканирования 2,5 мкм × 2,5 мкм, разрешение 256 × 256 пикселей.

Накопление ОУНТ в течение 1–2 ч сопровождается изменением величины равновесного трансмембранного потенциала. Эндцитоз ОУНТ клетками глиомы крысы сопровождается снижением величины равновесного трансмембранного потенциала на 15 ± 6 мВ по сравнению с контролем в первые два часа инкубирования, однако после 24 ч инкубирования наблюдается восстановление величины потенциала до значений, зарегистрированных в контрольных образцах. Зависимость величины равновесного трансмембранного потенциала плазматической мембраны клеток глиомы крысы от времени культивирования клеток в присутствии комплексов ОУНТ-ДНК представлена на рисунке 3.

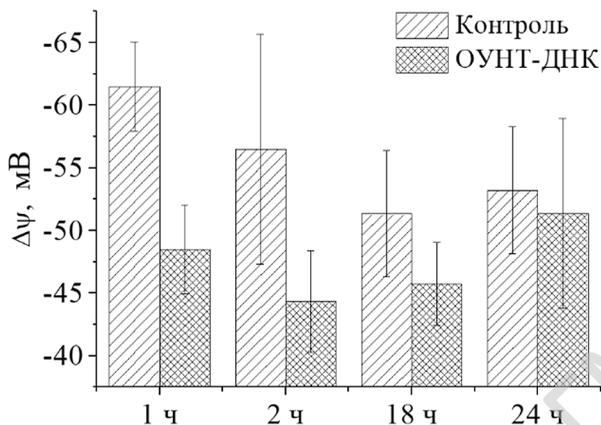


Рис. 3. Зависимость величины равновесного трансмембранного потенциала клеток линии С6 от времени культивирования в присутствии комплексов ОУНТ-ДНК и без них

Обсуждение. Методами микроскопии комбинационного рассеяния и одновременной флуоресцентной конфокальной микроскопии установлена динамика накопления комплексов ОУНТ-ДНК и сопутствующая ей модификация актинового цитоскелета. Накопление ОУНТ в клетках происходит за счет изменения жесткости мембраны, формирования инвагинаций при контакте с комплексами ОУНТ с последующим формированием оболочек из фибриллярного актина вокруг агрегатов ОУНТ и транспортом в цитоплазму клеток. Данный процесс в активной фазе сопровождается снижением величины равновесного трансмембранного потенциала, что может также свидетельствовать об изменении в распределении механических свойств плазматической мембраны в процессе инкубации клеток глиомы с комплексами ОУНТ-ДНК, увеличении плотности актиновой филаментной сети и жесткости поверхности клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kostarelos K, Bianco A, Prato M* // Nat Nanotechnol. 2009. 4(10): 627-34.
2. *Liu Z, Yanga K, Lee ST* // J Mater Chem. 2011. 21: 586-93.
3. *Elhissi AM, Ahmed W, Hassan IU et al.* // J Drug Deliv. 2012. 2012: 837327.
4. *Madani SY, Naderi N, Dissanayake O et al.* // Int J Nanomedicine. 2011. 6: 2963-79.
5. *Moon HK, Lee SH, Choi HC* // ACS Nano. 2009. 3(11): 3707-13.
6. *Shuba MV, Paddubskaya AG, Kuzhir PP et al.* // Nanotechnology. 2012. 23(49): 495714.
7. *Глебова НВ, Нечитайлов АА* // Письма в ЖТФ. 2010. 36(19): 45-50.
8. *Golubewa EN, Shuba MV, Vasiliev MV, Kulahava TA* // J Appl Spectroscopy. 2019. 85(6): 1121-7.