

УДК 544.7+576

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ АМФИФИЛЬНЫМ ПОЛИМЕРОМ, И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ ПОГЛОЩЕНИЯ КЛЕТКАМИ

А. В. РАДЧЕНКО¹⁾, Т. И. ТЕРПИНСКАЯ²⁾, Т. Л. ЯНЧЕНКО²⁾, Т. В. БАЛАШЕВИЧ²⁾, М. В. АРТЕМЬЕВ¹⁾

¹⁾Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ,
ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси,
ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Беларусь

Исследовано влияние ионов кальция на физико-химические свойства и взаимодействие с клетками квантовых точек CdSe/ZnS, инкапсулированных производными амфифильного полимера поли(малеиновый ангидрид-альт-1-тетрадецен), модифицированного четвертичными аммонийными группами. Квантовые точки, несущие

Образец цитирования:

Радченко АВ, Терпинская ТИ, Янченко ТЛ, Балашевич ТВ, Артемьев МВ. Влияние ионов кальция на физико-химические свойства полупроводниковых квантовых точек, инкапсулированных амфифильным полимером, и эффективность их поглощения клетками. *Журнал Белорусского государственного университета. Химия.* 2020;2:3–16.
<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2020-2-3-16>

For citation:

Radchanka AV, Terpinskaya TI, Yanchanka TL, Balashevich TV, Artemyev MV. Influence of calcium ions on physical chemical characteristics of semiconductor quantum dots encapsulated by amphiphilic polymer and their efficiency of cellular uptake. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry.* 2020;2: 3–16. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2020-2-3-16>

Авторы:

Александра Валерьевна Радченко – младший научный сотрудник лаборатории нанохимии.

Татьяна Ильинична Терпинская – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник многопрофильной диагностической лаборатории.

Татьяна Леонидовна Янченко – младший научный сотрудник многопрофильной диагностической лаборатории.

Татьяна Викторовна Балашевич – научный сотрудник многопрофильной диагностической лаборатории.

Михаил Валентинович Артемьев – доктор химических наук; заведующий лабораторией нанохимии.

Authors:

Aliaksandra V. Radchanka, junior researcher at the laboratory of nanochemistry.

aleksandraradchenko10@gmail.com

Tatiana I. Terpinskaya, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of multidisciplinary diagnostics.

terpinskayat@mail.ru

Tatsiana L. Yanchanka, junior researcher at the laboratory of multidisciplinary diagnostics.

tanyaya190@gmail.com

Tatjana V. Balashevich, researcher at the laboratory of multidisciplinary diagnostics.

tbalashevich@bk.ru

Mikhail V. Artemyev, doctor of science (chemistry); head of the laboratory of nanochemistry.

m_artemyev@yahoo.com

в полимерной оболочке отрицательно заряженные карбоксильные группы, изменяют свои физико-химические и оптические характеристики в присутствии ионов Ca^{2+} и Ba^{2+} . Эти эффекты становятся менее выраженными при частичной замене и совсем исчезают при полной замене отрицательно заряженных карбоксильных групп на положительно заряженные четвертичные аммонийные группы. Изменение физико-химических свойств квантовых точек приводит к изменению их взаимодействия с клетками в присутствии ионов кальция. Отрицательно заряженные квантовые точки, несущие в оболочке только карбоксильные группы, в присутствии Ca^{2+} агрегируют и образуют конгломераты из наночастиц и клеток. Положительно заряженные четвертичные аммонийные группы в полимерной оболочке наночастиц повышают их устойчивость к агрегации в присутствии Ca^{2+} и способствуют их поглощению клетками. Механизмы поглощения наночастиц зависят от их заряда. Наночастицы с положительным ζ -потенциалом поглощаются с участием кальцийзависимых механизмов, которые подавляются при ингибировании кальцийзависимого фермента динамина или в присутствии хелатора кальция ЭГТА. Поглощение наночастиц с отрицательным ζ -потенциалом, напротив, усиливается при хелатировании ионов кальция. Это свидетельствует о различной роли клеточных кальцийзависимых механизмов в поглощении положительно и отрицательно заряженных наночастиц.

Ключевые слова: квантовые точки; амфифильный полимер; ζ -потенциал; ионы кальция; поглощение клетками.

Благодарность. Частичная финансовая поддержка проекта осуществлялась за счет средств государственных программ научных исследований «Химреагенты» и «Конвергенция», а также Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № X20M-031).

INFLUENCE OF CALCIUM IONS ON PHYSICAL CHEMICAL CHARACTERISTICS OF SEMICONDUCTOR QUANTUM DOTS ENCAPSULATED BY AMPHIPHILIC POLYMER AND THEIR EFFICIENCY OF CELLULAR UPTAKE

A. V. RADCHANKA^a, T. I. TERPINSKAYA^b, T. L. YANCHANKA^b, T. V. BALASHEVICH^b, M. V. ARTEMYEV^a

^aResearch Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University,
14 Leninhradskaja Street, Minsk 220006, Belarus

^bInstitute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, 28 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus
Corresponding author: M. V. Artemyev (m_artemyev@yahoo.com)

Here, we studied the effect of calcium ions on the physicochemical properties and cellular uptake of CdSe/ZnS quantum dots encapsulated with poly(maleic anhydride-*alt*-1-tetradecene), modified to a varying extent by quaternary ammonium groups. It was shown that quantum dots carrying negatively charged carboxyl groups in the polymer shell change their physicochemical and optical characteristics in the presence of Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. As the negatively charged carboxyl groups in the shell are completely replaced by positively charged quaternary ammonium groups, these effects gradually decrease. A change in the physicochemical properties of nanoparticles leads to a change in their cellular uptake in the presence of calcium ions. Nanoparticles carrying only negatively charged groups in the shell in the presence of Ca^{2+} agglomerate and form conglomerates of nanoparticles and cells. The positively charged quaternary ammonium groups in the polymer shell of the nanoparticles increase their aggregative stability in the presence of Ca^{2+} and contribute to their uptake by cells. The mechanisms of uptake depend on nanoparticle's charge. Nanoparticles with a positive ζ potential are absorbed by calcium-dependent mechanisms, which are suppressed by inhibition of the calcium-dependent enzyme dynamin or in the presence of calcium chelator EGTA. The uptake of nanoparticles with a negative ζ potential, in contrast, is enhanced by the chelation of calcium ions. This indicates the different role of cellular calcium-dependent mechanisms in the uptake of positively and negatively charged nanoparticles.

Keywords: quantum dots; amphiphilic polymer; zeta-potential; calcium ions; cellular uptake.

Acknowledgements. Authors acknowledge partial financial support from the state program «Chemreagents» and «Convergence» and Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. X20M-031).

Введение

Неорганические наночастицы (НЧ) рассматриваются как перспективные инструменты в качестве клеточных маркеров, таргетных носителей для лекарственных веществ или платформ для введения в клетку нуклеиновых кислот (например, малых интерферирующих РНК). В исследованиях *in vivo*

и *in vitro* НЧ контактируют и взаимодействуют с компонентами среды, что может решающим образом изменять свойства НЧ. В последние годы основное внимание исследователей было сосредоточено на изучении взаимодействия НЧ с белками. Было показано, что последние, образуя «белковую корону» вокруг НЧ, существенно влияют на их гидродинамический размер, поверхностный заряд и эффективность их поглощения клетками [1; 2].

В то же время практически не исследовано взаимодействие НЧ с неорганическими ионами, входящими в состав биологических жидкостей и физиологических сред, а также влияние неорганических ионов на поглощение НЧ клетками. В частности, огромную роль в жизни клетки играют ионы кальция, которые присутствуют в организме как в клетках, так и во внеклеточном пространстве и являются одними из наиболее распространенных вторичных мессенджеров. Эти ионы участвуют в передаче биохимических сигналов, развитии сигнальных каскадов клетки и влияют на физиологические функции клетки и организма в целом [3–5].

На поверхности гидрофильных НЧ, используемых в биомедицинских приложениях, как правило, присутствуют функциональные группы и таргетирующие молекулы, которые могут потенциально взаимодействовать с ионами кальция и изменять физико-химические и биологические свойства НЧ. Влияние ионов Ca^{2+} на механизмы клеточного поглощения изучалось главным образом на моделях экзо- и эндоцитоза синаптических везикул [6–8], в то время как влияние ионов кальция на поглощение НЧ практически не изучено.

В данной работе исследовано влияние ионов Ca^{2+} на физико-химические, оптические свойства, а также взаимодействие с клетками флуоресцентных полупроводниковых квантовых точек (КТ) типа «ядро – оболочка» CdSe/ZnS , инкапсулированных производными амфифильного полимера поли(малеиновый ангидрид-*альт*-1-тетрадецен) (ПМАТ). Изучено влияние на указанные параметры ионов Ca^{2+} , находящихся в среде культивирования, а также роль кальцийзависимых внутриклеточных механизмов в поглощении КТ с различным поверхностным зарядом. Устойчивость к фотодеградации, высокий квантовый выход фотолюминесценции (КВЛ) и большой молярный коэффициент поглощения позволяют эффективно исследовать поглощение КТ клетками методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии [9]. Полимерная оболочка предохраняет КТ от взаимодействия с окружающей средой и в то же время защищает клетки от контакта с токсичными элементами неорганического ядра. Полимер, используемый для инкапсуляции КТ, может быть функционализирован различными группами для контроля ξ -потенциала, гидродинамического размера, коллоидной стабильности и последующего взаимодействия с биологическими молекулами или неорганическими ионами [10].

Материалы и методы

Материалы. Реактивы. Поли(малеиновый ангидрид-*альт*-1-тетрадецен) (ПМАТ, $M = 9000$ Да), реагент Жирара Т (Girard's T) (карбоксиметилтриметиламмоний хлорид гидразид), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид (ЭДК), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид гидрохлорид (ЭДК · HCl), октантиол-1, хлороформ, тетрагидрофуран, ацетатцеллюлозная мембрана (граница проницаемости 12 кДа), NaCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , краситель Hoechst 33342, трипановый синий (*Sigma-Aldrich* (Германия)).

Клетки и клеточные среды. Культивируемые клеточные линии глиомы C6, U937, среда DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В (*Sigma*).

Синтез квантовых точек CdSe/ZnS. КТ типа «ядро – оболочка» CdSe/ZnS с диаметром ядра 4 нм были синтезированы по стандартной высокотемпературной методике [11]. После синтеза КТ очищали от избытка органических стабилизаторов путем осаждения метанолом, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин и повторно растворяли в свежей порции хлороформа. Средний диаметр полученных КТ определялся с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

Модификация ПМАТ реагентом Жирара Т и инкапсуляция КТ. Для модификации ПМАТ четвертичными аммонийными группами в колбе на 10 мл, снабженной мешалкой, растворяли 30 мг (0,1 ммоль) ПМАТ в 2 мл тетрагидрофурана (ТГФ), добавляли 200 мкл воды, соответствующее количество реагента Жирара Т в зависимости от конечного ξ -потенциала КТ (от 0,04 ммоль для $\xi = -26$ мВ до 0,25 ммоль для $\xi = +22$ мВ) и 0,45 ммоль ЭДК. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в закрытой колбе в течение 1 ч, а затем добавляли 2 мл буфера МЭС (рН 6,8). Для полного завершения реакции между карбоксыльными группами ПМАТ и гидразидными группами реагента Жирара Т добавляли в реакционную смесь 58 мг (0,3 ммоль) ЭДК · HCl и оставляли перемешиваться на ночь. Все полимеры очищались от избытка модификаторов и побочных продуктов реакции посредством диализа против воды на ацетатно-целлюлозной мембране с границей проницаемости, равной

12 000 кДа. После диализа воду испаряли при $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, а модифицированные полимеры растворялись в азеотропной смеси изопропанол/хлороформ в соотношении 1 : 12 по объему. Далее полученные растворы использовались для инкапсуляции КТ.

Коллоидный раствор КТ в хлороформе обрабатывали 1-октантриолом в течение 2 ч при комнатной температуре в присутствии триэтиламина в качестве депротонирующего агента для формирования лигандного монослоя алифатического тиола, который за счет сил Ван-дер-Ваальса взаимодействует с алифатическими цепями ПМАТ [12]. Затем КТ очищали от избытка тиола с помощью процедуры осаждения метанолом и повторного диспергирования в свежей порции хлороформа. Для инкапсулирования НК химически модифицированным ПМАТ последний добавляли в азеотропную смесь изопропанол/хлороформ из расчета 10 мг полимера на 5 мг НК. Полученный раствор высушивали при комнатной температуре в течение 1–2 дней. Затем твердую стеклообразную фазу растворяли в воде, получая прозрачный красно-оранжевый коллоидный раствор НК. Нерастворимые остатки удаляли центрифугированием при 7000 об/мин в течение 5 мин. Избыток полимера отделяли гель-фильтрацией на колонке, заполненной DEAE-сефадексом А-50. Полученные растворы очищенных КТ концентрировались центрифугированием с мембраной с границей проницаемости 10 000 кДа при 2000 об/мин в течение 20 мин.

Маркирование клеточных культур КТ. Клетки глиомы С6 и U937 культивировали в чашках Петри (60 мм; Corning, США) в DMEM с добавлением 10 % ЭТС и антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В, Sigma) в CO_2 -инкубаторе (Shellab, США) при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 5 % CO_2 . Перед проведением экспериментов клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (рН 7,2) и ресуспендировали в том же буфере или в буфере, содержащем дополнительно хлорид кальция в количестве 0,14 г/л. Суспензии клеток с концентрацией 0,5 млн/мл вносили в лунки 96-луночного культурального планшета или в пробирки для проточной цитометрии. Затем добавляли водный раствор наночастиц в конечной концентрации 0,1 мкмоль/л. Инкубировали в CO_2 -инкубаторе 30 мин, отмывали в соответствующем фосфатном буфере (ФБ). Количество проб (n) в каждой серии – 5.

При исследовании путей эндоцитоза КТ к клеткам за 30 мин до введения наночастиц добавляли ингибиторы эндоцитоза в конечных концентрациях: сахарозу (0,45 моль/л); генистеин (100 мкмоль/л); динасор (80 мкмоль/л); этилизопропил амилорид (ЭИПА) (20 мкмоль/л); монензин (50 мкмоль/л); этиленгликоль-бис-аминоэтиловый эфир тетрауксусной кислоты (ЭГТА) (10 ммоль/л); ионофор А23187 (10 мкмоль/л).

Инструментальный анализ. Исследование морфологии КТ проводили методом ПЭМ с использованием просвечивающих электронных микроскопов Leo-906 (Германия) и JEOL Jem-1200 (США). Гидродинамический размер и ξ -потенциал измеряли с помощью прибора Malvern Nano ZS-90 (Великобритания).

Спектры оптического поглощения коллоидных растворов КТ записывали с помощью спектрофотометра Ocean Optics HR-2000+ (Германия), оборудованного источником белого света Ocean Optics DH-2000 (Германия). Спектры фотолюминесценции записывали с использованием спектрофлуориметра Jobin Yvon Fluoromax-2.

Проточную цитофлуориметрию проводили с помощью прибора BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Источником возбуждения являлся аргоновый ионный лазер ($\lambda_{\text{возб}} = 488\text{ нм}$). Для микроскопического анализа применяли микроскоп ЛЮМ 1 LED (Альтами, Россия). Для визуализации ядер клетки окрашивали красителем Hoechst 33342 с концентрацией 10^{-5} моль/л в ФСБ в течение 15–30 мин при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Статистический анализ результатов проточной цитометрии проводился с использованием программного обеспечения Excel и Statistics 7. Отклонения считались значимыми для значений $p < 0,05$ согласно критерию Манна – Уитни. Экспериментальные точки представлены в виде средних значений \pm СОС (стандартная ошибка среднего).

Результаты и их обсуждение

Влияние катионов кальция на физико-химические и оптические свойства КТ. Поскольку на поверхности квантовых точек, инкапсулированных химически модифицированным ПМАТ, присутствуют карбоксильные группы, ионы Ca^{2+} и другие многозарядные ионы могут связываться с ними, влияя на ξ -потенциал и гидродинамический размер через нарушение коллоидной стабильности КТ и их КВЛ. Для этого мы измеряли указанные параметры КТ в ФСБ, а также в ФСБ с добавлением 0,14 г/л хлорида кальция или 0,26 г/л хлорида бария.

Из таблицы видно, что наличие в среде двухвалентных катионов Ca^{2+} , а также Ba^{2+} приводило к увеличению ξ -потенциала и гидродинамического размера НЧ, имеющих в оболочке даже небольшую долю карбоксильных групп. Наиболее выраженный эффект наблюдался для НЧ, покрытых ПМАТ и несущих в оболочке только карбоксильные группы, в буферных растворах, содержащих двухвалентные катионы кальция или бария, ξ -потенциал этих НЧ сдвигался в сторону положительных значений, НЧ образовывали агрегаты размером более 200 нм.

Влияние ионов кальция и бария на характеристики КТ,
инкапсулированных амфифильным полимером на основе ПМАТ

The calcium and barium ions influence on properties of QDs, encapsulated with modified and non-modified PMAT

Образец	Состав полимерной оболочки	ζ-Потенциал, мВ			Гидродинамический диаметр, нм		
		ФБ	ФБ + Ca ²⁺	ФБ + Ba ²⁺	ФБ	ФБ + Ca ²⁺	ФБ + Ba ²⁺
КТ(-33)*	—COOH (100 %)	-33	-15	-11	15	>200	>200
КТ(-26)*	—COOH (80 %) —N(CH ₃) ₃ ⁺ (20 %)	-26	+9	+16	15	63	56
КТ(+13)*	—COOH (20 %) —N(CH ₃) ₃ ⁺ (80 %)	+13	+27	+17	15	26	23
КТ(+22)*	—N(CH ₃) ₃ ⁺ (100 %)	+22	+26	+25	17	17	18

*В сокращениях названий образцов водорастворимых квантовых точек в скобках указано значение ζ-потенциала в милливольтах, полученное в ФБ; pH 7, I = 0,01 моль/л.

Снижение доли карбоксильных групп в оболочке при их замещении на четвертичные аммонийные группы способствовало уменьшению агрегации КТ в присутствии ионов кальция, однако не предотвращало его полностью. В присутствии двухвалентных катионов КТ, несущие в оболочке 20 или 80 % карбоксильных групп, образовывали агрегаты, примерно в 2 или 4 раза превышающие размер исходных КТ соответственно. КТ(+22), несущие в оболочке преимущественно четвертичные аммонийные группы, не изменяли свой ζ-потенциал и гидродинамический размер в присутствии исследуемых двухвалентных катионов.

Из рис. 1 видно, что при добавлении CaCl₂ к раствору КТ в фосфатном буфере КТ(-33) агрегируют. Это приводит к снижению КВЛ. Агрегация происходит из-за связывания карбоксильных групп ионами Ca²⁺, уменьшения абсолютного значения ζ-потенциала и нарушения агрегативной устойчивости.

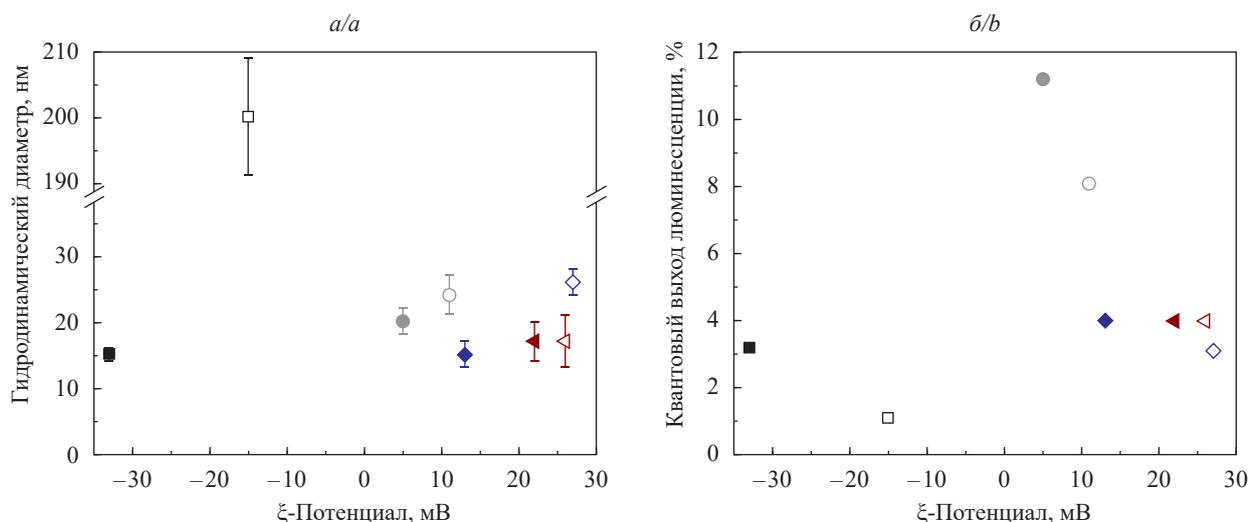


Рис. 1. Зависимость гидродинамического диаметра (а) и КВЛ (б) от присутствия в среде ионов Ca²⁺: квадраты – КТ(-33); круги – КТ(+5); ромбы – КТ(+13); треугольники – КТ(+22). Закрашенные фигуры показывают характеристики КТ до добавления Ca²⁺, незакрашенные – после добавления хлорида кальция.

Данные для гидродинамического размера представлены как среднее трех измерений

Fig. 1. The influence of Ca²⁺ on hydrodynamic size (a) and PL quantum yield (b) of QDs(-33) – squares, QDs(+5) – circles, QDs(+13) – diamonds, QDs(+22) – triangles. Colored and blank circles represent QDs before and after Ca²⁺ adding, respectively.

Data for hydrodynamic size are presented as the averaged over three measurements

Гидродинамический размер слабopоложительных КТ(+5) и КТ(+13) не изменяется, но ζ-потенциал увеличивается, а КВЛ уменьшается. Изменение заряда происходит из-за соединения свободных карбоксильных групп ионами Ca²⁺. Изменение КВЛ связано с увеличением значения ζ-потенциала. Гидродинамический размер, ζ-потенциал и КВЛ сильноположительных КТ(+22) не изменяются при введении CaCl₂ в раствор. Данный эффект объясняется электростатическим отталкиванием четвертичных аммонийных групп в полимерной оболочке КТ(+22) и катионов кальция.

Влияние ионов кальция в инкубационной среде на связывание КТ с клетками. Исследования методом проточной цитометрии показали, что в среде, не содержащей ионов кальция, интенсивность флуоресценции клеток С6 и U937, маркированных КТ(–33), была низкой (рис. 2). Ионы кальция в среде инкубации в 18 раз усилили среднюю интенсивность флуоресценции клеток. При использовании отрицательно заряженных КТ с поверхностной оболочкой, содержащей четвертичные аммонийные группы, действие ионов кальция было менее выражено. Ионы Ca^{2+} усиливали связывание КТ(–26) с клетками глиомы С6 и U937 в 4,8 и 3,1 раза соответственно.

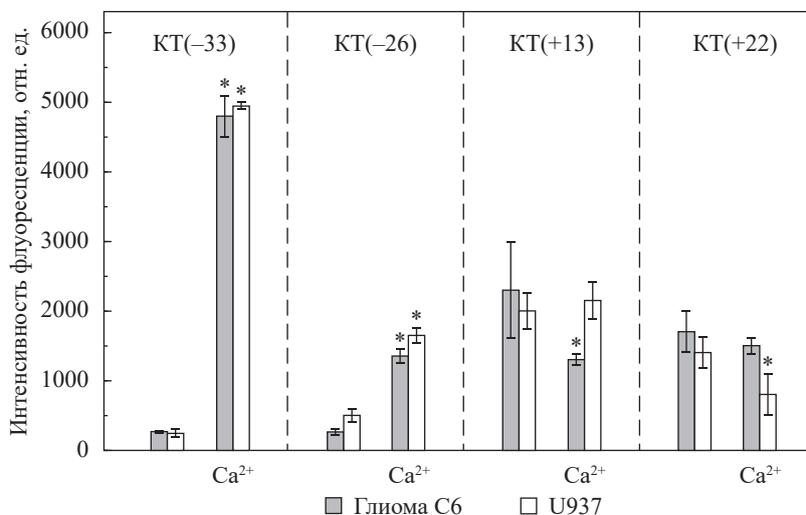


Рис. 2. Результаты проточной цитофлуориметрии клеток глиомы С6 и U937, маркированных КТ с различным ξ -потенциалом (интенсивность флуоресценции нормирована на данные по КВЛ из рис. 1). * – флуоресценция клеток, инкубированных с наночастицами в среде, содержащей ионы кальция, статистически достоверно отличается от флуоресценции тех же клеток, инкубированных в среде, не содержащей ионов кальция ($p < 0,05$)

Fig. 2. Flow cytometry data for glioma C6 and U937 cells incubated with QDs of different ξ -potential (PL intensity was normalized to the values of PL quantum yield from fig. 1). * – fluorescence of cells incubated with nanoparticles in a medium containing calcium ions is statistically significantly different from fluorescence of the same cells incubated in a medium without calcium ions ($p < 0.05$)

При культивировании клеток глиомы С6 и U937 со слабopоложительными частицами КТ(+13) наблюдалось снижение флуоресценции клеток глиомы С6 в 1,6 раза в присутствии ионов кальция, однако Ca^{2+} не влиял на эффективность маркирования клеток U937. Ионы кальция в среде также снижали флуоресценцию клеток, культивируемых с сильноположительными КТ(+22), в 1,2 и 1,6 раза для С6 и U937 соответственно.

Микроскопический анализ (рис. 3) свидетельствует о том, что НЧ, несущие в оболочке только отрицательно заряженные карбоксильные группы, агрегируют на клеточной мембране и способствуют образованию больших конгломератов клеток и НЧ.

Для НЧ с положительным ξ -потенциалом не выявлено значительной агрегации в среде культивирования и на клеточной мембране в присутствии ионов кальция (рис. 4).

Влияние ионов кальция в среде на механизмы эндоцитоза КТ. Мы исследовали механизмы эндоцитоза, которые задействованы в поглощении НЧ в среде, содержащей или не содержащей ионы кальция, клетками глиомы С6. Для этого инкубировали клетки с НЧ в присутствии ингибиторов эндоцитоза: сахарозы (ингибитор клатринзависимого эндоцитоза); генестеина (ингибитор эндоцитоза, зависящего от липидных рафтов-кавеол); ЭИПА (ингибитор макропиноцитоза); динасора (ингибитор эндоцитоза, зависящего от ГТФазы динамина); монензина (нарушает баланс одновалентных катионов, вызывает повышение рН лизосом и ингибирует переход содержимого эндоцитозных везикул в лизосомы) [13].

Из рис. 5 видно, что при наличии в среде ионов кальция никакие из исследованных механизмов эндоцитоза не играют существенной роли в поглощении КТ(–33). Это объясняется тем, что НЧ агрегируют и оседают на мембранах, как показано на рис. 4. В среде без ионов кальция поглощение КТ(–33) снижалось при ингибировании механизмов, зависящих от клатрина и липидных рафтов-кавеол (см. рис. 5, а).

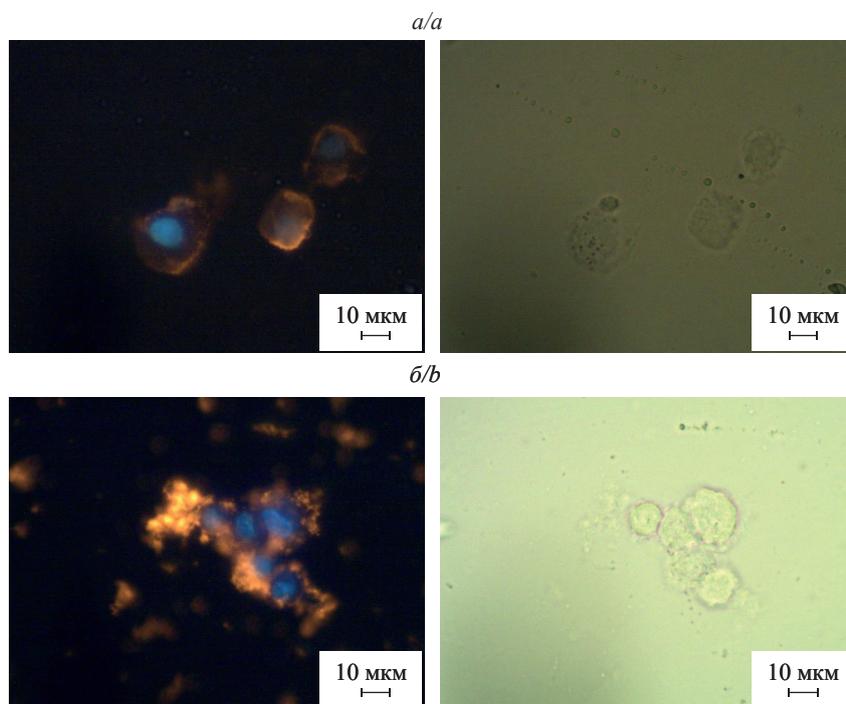


Рис. 3. Флуоресцентные (слева) и светлополевые (справа) изображения клеток U937, окрашенных КТ(-33) в среде без CaCl_2 (*a*) и с CaCl_2 (*б*). Ядра клеток окрашены красителем Hoechst 33342

Fig. 3. Fluorescent (left) and transmitted light (right) images of U937 cells labeled with QDs(-33) in media without (*a*) and with (*b*) CaCl_2 . The nuclei were additionally stained with Hoechst 33342

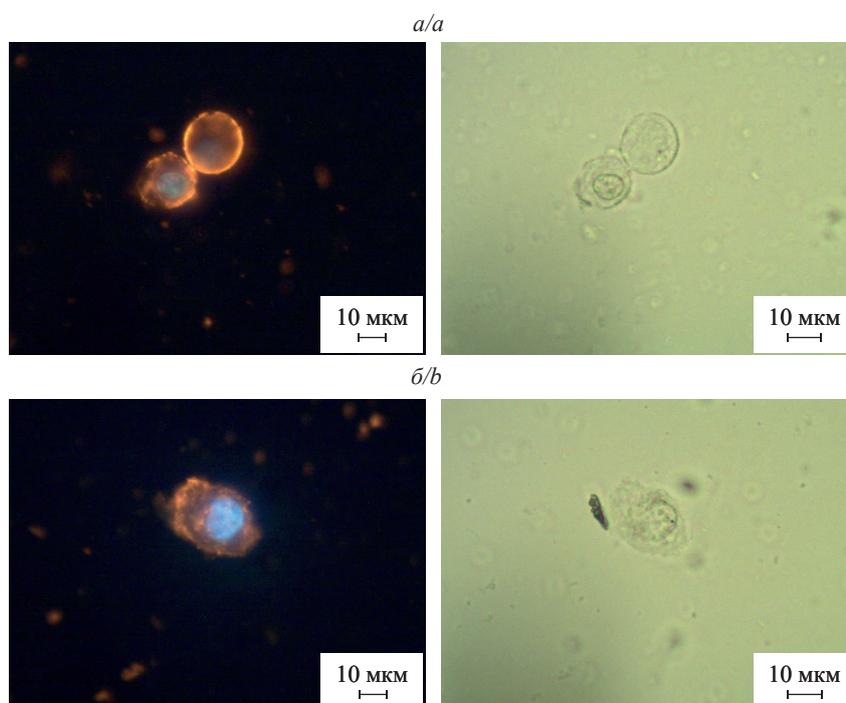


Рис. 4. Флуоресцентные (слева) и светлополевые (справа) изображения клеток U937, окрашенных КТ(+22) в среде без CaCl_2 (*a*) и с CaCl_2 (*б*). Ядра клеток окрашены красителем Hoechst 33342

Fig. 4. Fluorescent (left) and transmitted light (right) images of U937 cells labeled with QDs(+22) in media without (*a*) and with (*b*) CaCl_2 . The nuclei were additionally stained with Hoechst 33342

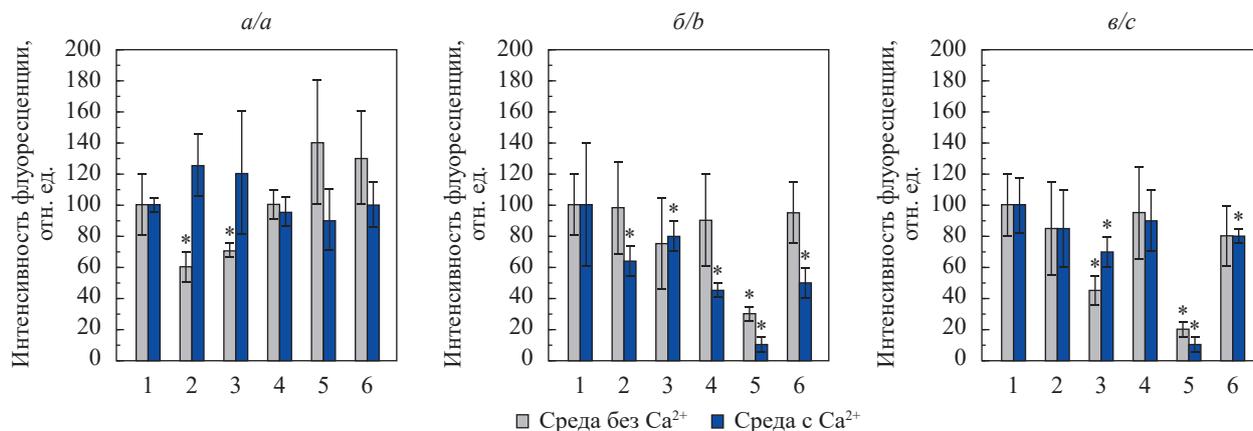


Рис. 5. Результаты проточной цитометрии клеток глиомы C6, маркированных КТ(-33) (а), КТ(+13) (б), КТ(+22) (в), в средах с различными ингибиторами эндоцитоза: 1 – контроль; 2 – сахароза; 3 – генистеин; 4 – ЭИПА; 5 – динасор; 6 – монензин. * – флуоресценция клеток, инкубированных с наночастицами в среде, статистически достоверно отличается от флуоресценции контрольного измерения ($p < 0,05$)

Fig. 5. Flow cytometry data for glioma C6 cells incubated with QDs(-33) (a), QDs(+13) (b), QDs(+22) (c) in media with different inhibitors of endocytosis: 1 – control; 2 – sucrose; 3 – genistein; 4 – EIPA; 5 – dynasore; 6 – monensin. * – fluorescence of cells incubated with nanoparticles in the medium is statistically significantly different from the fluorescence of the control measurement ($p < 0.05$)

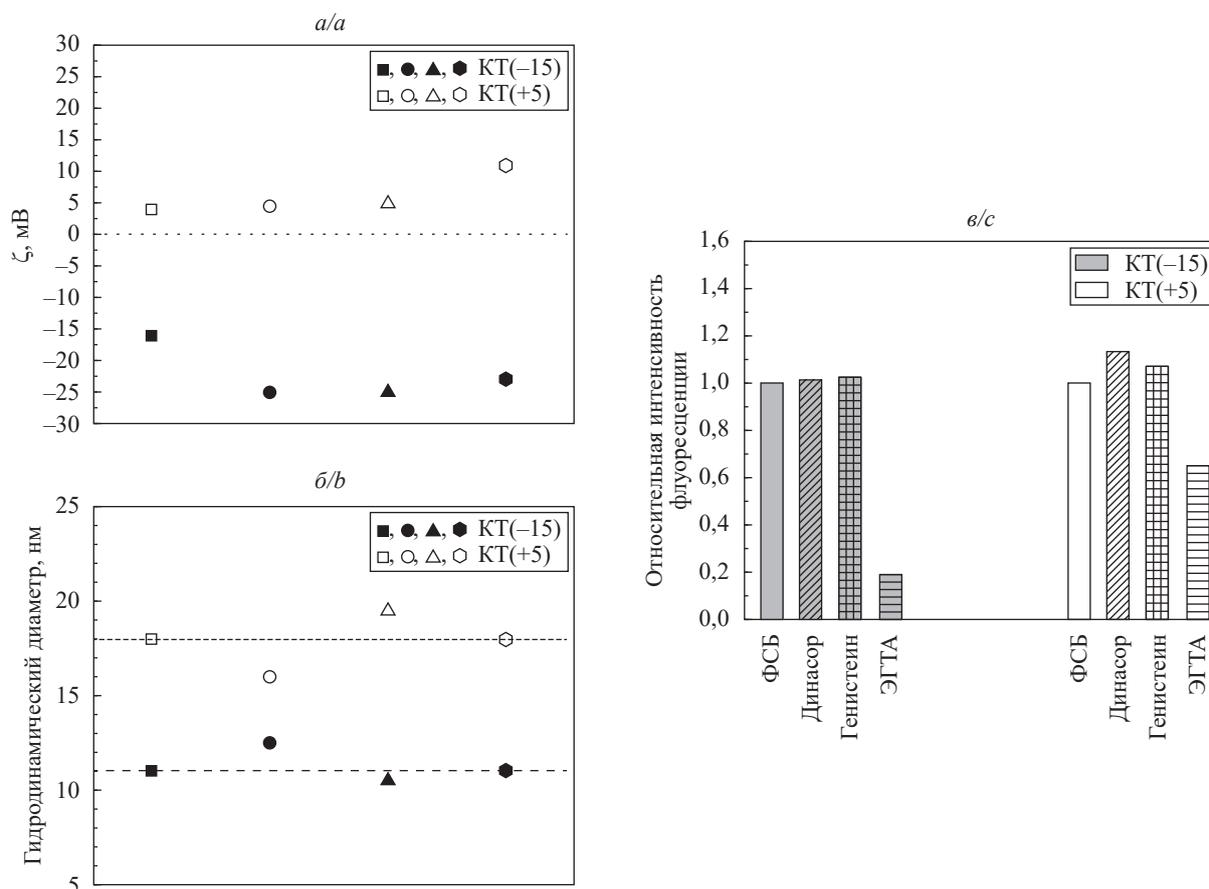


Рис. 6. Зависимость ξ -потенциала (а), гидродинамического диаметра (б) и относительной интенсивности ФЛ (в) от присутствия ингибиторов эндоцитоза и ЭГТА для коллоидных растворов КТ(-15) и КТ(+5).

На рис. а, б фосфатно-солевой буфер обозначен квадратами, динасор – кругами, генистеин – треугольниками, ЭГТА – шестиугольниками

Fig. 6. The influence of inhibitors of endocytosis and EGTA on ξ -potential (a), hydrodynamic diameter (b), and relative PL intensity (c) for samples QDs(-15) and QDs(+5). The fig. a, b represents PSB (squares), dynasore (circles), genistein (triangles) and EGTA (diamonds)

КТ(+13) в среде с ионами кальция индуцируют эндоцитоз, зависимый от клатрина, липидных рафтов-кавеол, а также макропиноцитоз. Поглощение КТ(+13) сильно зависит от динамина и баланса одновалентных катионов в клетке. В среде без ионов кальция также наблюдается сильная зависимость поглощения КТ(+13) от динамина. В присутствии кальция все исследованные механизмы эндоцитоза более выражены (см. рис. 5, б).

Что касается КТ(+22), то согласно рис. 5, в, как в присутствии, так и в отсутствие ионов кальция в среде в поглощении участвуют процессы, зависимые от липидных рафтов-кавеол, которые более выражены в среде без кальция. Поглощение НЧ зависит от динамина как в бескальциевой среде, так и в среде, содержащей ионы кальция. В последнем случае зависимость от динамина более выражена, как и для КТ(+13) (см. рис. 5, б, в).

Влияние внутриклеточных ионов кальция на механизмы поглощения КТ. Эксперимент проводили в фосфатном буфере без ионов кальция, что позволило избежать агломерации отрицательно заряженных КТ. Хелатор кальция ЭГТА использовался для того, чтобы связать внутриклеточный свободный кальций и ингибировать кальцийзависимые клеточные механизмы поглощения. Известно, что ЭГТА в миллимолярных дозах способен хелатировать внутриклеточный кальций [13] и снижать его уровень в клетке как при наличии [14], так и в отсутствие ионов кальция во внеклеточной среде [15]. Исследование влияния ЭГТА на физико-химические и оптические свойства КТ с различным ξ -потенциалом показало, что при добавлении к 2 мл раствора ингибитора 100 мкл КТ ($c = 10^{-5}$ моль/л) в ФСБ наблюдается смещение в более отрицательную область значений ξ -потенциала для образца КТ(-15) от -15 до -25 мВ. Для КТ(+5) значение ξ -потенциала увеличивается на ~10 мВ только в среде с ЭГТА (рис. 6).

ЭГТА снижает КВЛ КТ(-15) на 80 %, а КТ(+5) – на 40 %. ЭГТА не влияет на гидродинамический размер частиц, следовательно, изменение интенсивности фотолюминесценции не связано с агрегацией КТ. В среде с ЭГТА наблюдается увеличение абсолютного значения ξ -потенциала и уменьшение КВЛ для КТ(+5), поскольку возрастает абсолютное значение ξ -потенциала.

В следующем эксперименте исследовали влияние ЭГТА на поглощение наночастиц клетками. При оценке результата учитывали снижение флуоресценции КТ, вызываемое ЭГТА, и соответствующим образом увеличивали цифровые значения интенсивности флуоресценции клеток. На рис. 7 показано, что ЭГТА уменьшает флуоресценцию клеток, инкубированных с КТ, которые несут в оболочке положительно заряженные группы. Чем больше в оболочке КТ положительно заряженных групп и чем выше ее положительный ξ -потенциал, тем сильнее подавляет ЭГТА флуоресцентную маркировку клеток. При этом ЭГТА усиливает флуоресценцию клеток, инкубированных с КТ, которые несут только отрицательно заряженные группы, в 6,8 раза. Совместное действие ЭГТА и А23187 приводит к усилению этого эффекта – флуоресценция клеток увеличивается более чем в 12 раз.

Значительное снижение уровня свободного кальция в цитоплазме клеток при совместном применении кальциевого ионофора А23187 и ЭГТА показано во многих работах [14–17]. Это позволяет полагать, что наблюдаемые нами эффекты обусловлены снижением уровня свободного внутриклеточного кальция.

Ионофор А23187, сходно с ЭГТА, хотя и в меньшей степени, снижает поглощение НЧ, имеющих в оболочке положительно заряженные группы. Вместе с тем А23187, в отличие от ЭГТА, несколько снижает, а не усиливает поглощение отрицательно заряженных частиц. Возможно, это объясняется тем, что А23187 переносит ионы кальция не только через плазматическую мембрану (в бескальциевой среде по градиенту концентрации – из цитоплазмы во внеклеточную среду), но и через мембраны внутриклеточных структур, таких как эндоплазматическая сеть и аппарат Гольджи [18; 19], которые являются внутриклеточными депо кальция. В этом случае кальций будет выходить из депо в цитоплазму. Исходя из этого и полученных нами результатов, можно предположить, что эндоцитоз наночастиц зависит не только от присутствия в клетке свободного кальция, но и от его распределения в цитоплазме и клеточных органеллах.

Динасор, ингибирующий динамин, действует аналогично хелатору ионов кальция ЭГТА, хотя и менее выражено, а генистеин, ингибирующий тирозин-киназы, – подобно ионофору А23187. Возможно, эффект ЭГТА и А23187 хотя бы в некоторой степени обусловлен их действием на динамин и тирозинкиназы, участвующие в эндоцитозе.

Для того чтобы определить, расположены ли КТ на наружной или внутренней стороне клеточной мембраны, окрашенные КТ клетки были обработаны красителем трипановым синим. Трипановый синий, поглощая в широкой области спектра, тушит внеклеточную флуоресценцию наночастиц. Однако этот краситель не проникает в живые клетки с интактной мембраной, поэтому не влияет на флуоресценцию наночастиц внутри клеток. Жизнеспособность клеток во время цитометрического анализа составляла $(93,6 \pm 0,6)$ % (данные не представлены). На рис. 8 показано, что при окраске КТ с положительным зарядом часть КТ обнаруживалась внутри живых клеток: через 30 мин – в среднем 16 %, через 1 ч – 39 %, через 3 ч – 36 %. Значительная часть КТ была сорбирована на клеточной мембране. Отрицательно заряженные КТ окрашивали клетки в 7–11 раз хуже, чем положительно заряженные. В то же время

флуоресценция отрицательно заряженных КТ не тушилась трипановым синим. Это указывает либо на локализацию КТ внутри клеток, либо на то, что они не тушатся эффективно трипановым синим, возможно, из-за локализации КТ в агрегатах.

На рис. 9 представлены фотографии клеток глиомы С6, окрашенных КТ(-20) и КТ(+20). Из рис. 9 видно, что уже через 30 мин после начала окрашивания КТ образуют глобулярные скопления, интенсивно маркируя клетку. ЭГТА и динасор усиливают взаимодействие отрицательно заряженных КТ и снижают взаимодействие положительно заряженных КТ с клетками.

Полученные данные показывают, что ионы кальция в растворе влияют на ξ -потенциал и гидродинамический размер КТ, которые несут в оболочке отрицательно заряженные карбоксильные группы. Это является причиной изменения как КВЛ, так и биологических свойств наночастиц, в частности их связывания с клетками. КТ с высоким абсолютным значением отрицательного ξ -потенциала агрегируют в среде, содержащей ионы кальция, их КВЛ снижается, а при добавлении к клеткам такие КТ вызывают образование конгломератов из клеток и наночастиц.

Замена части карбоксильных групп оболочки четвертичными аммонийными группами приводит к формированию положительного ξ -потенциала КТ и их устойчивости к образованию агрегатов в среде, содержащей ионы кальция. Тем не менее связывание оставшихся карбоксильных групп оболочки с ионами кальция приводит к увеличению ξ -потенциала таких КТ и снижению КВЛ. Квантовые точки, в оболочке которых практически все карбоксильные группы заменены четвертичными аммонийными группами, нечувствительны к ионам кальция. Как показано на рис. 2, КТ с отрицательным поверхностным зарядом слабо взаимодействуют с клетками в среде, не содержащей ионов кальция. Следует отметить, что если КТ с оболочкой из немодифицированного ПМАТ оседали на клетках и образовывали агрегаты в среде с ионами кальция, то КТ, в оболочке которых около 20 % карбоксильных групп были заменены на четвертичные аммонийные группы, оставаясь отрицательно заряженными, проявляли менее выраженный эффект усиления связывания с клетками в присутствии ионов кальция.

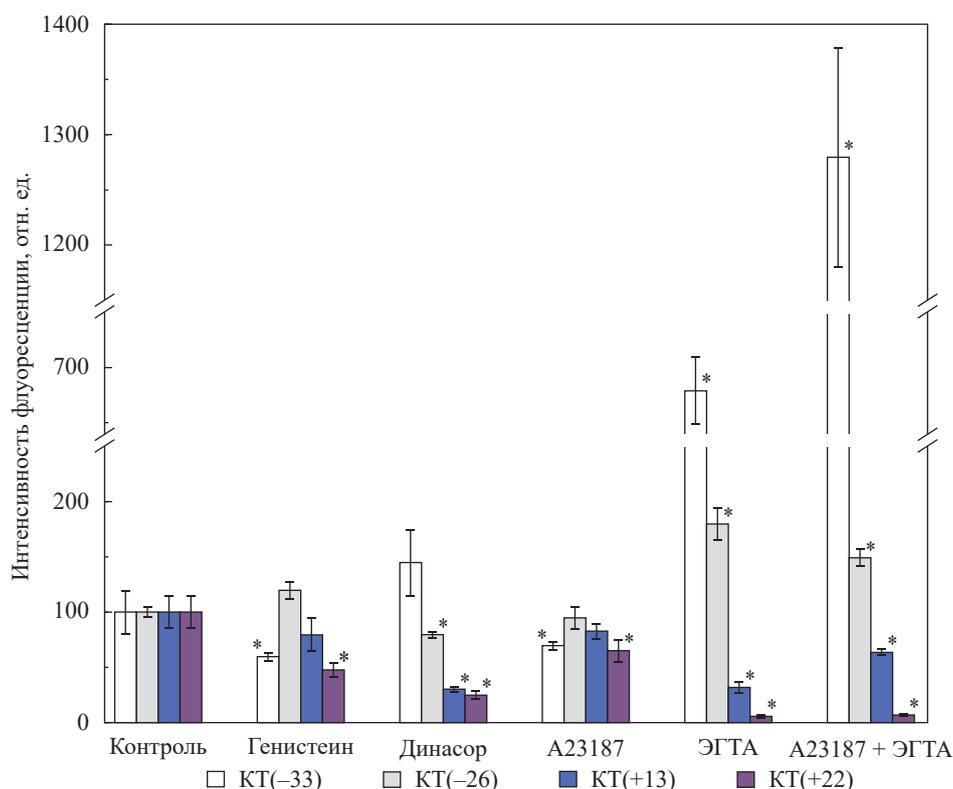


Рис. 7. Результаты проточной цитометрии для клеток глиомы С6, маркированных КТ с различным ξ -потенциалом, в средах с разными ингибиторами эндоцитоза / хелаторами кальция с учетом влияния последних на интенсивность флуоресценции.

* – флуоресценция клеток, инкубированных с ингибиторами эндоцитоза, статистически достоверно отличается от флуоресценции контрольного измерения ($p < 0,05$)

Fig. 7. Normalized flow cytometry data for glioma C6 cells labeled with QDs of different ξ -potential. The data is provided given the influence of inhibitors and chelators on intensity of photoluminescence. * – fluorescence of cells incubated with endocytosis inhibitors is statistically significantly different from the fluorescence of the control measurement ($p < 0.05$)

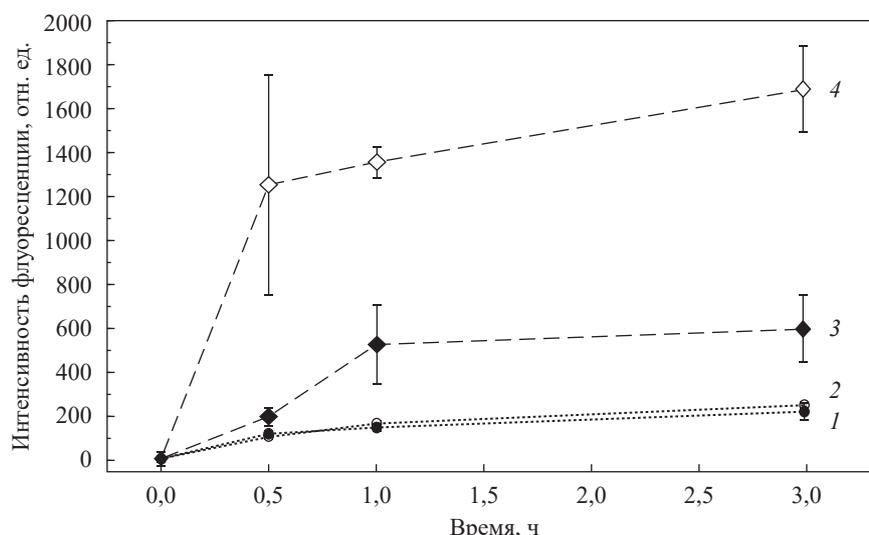


Рис. 8. Зависимость интенсивности флуоресценции клеток глиомы С6 от продолжительности маркирования: 1, 2 – КТ(-20); 3, 4 – КТ(+20). Для экспериментов 1 и 3 использовался трипановый синий для тушения внеклеточной флуоресценции

Fig. 8. The influence of photoluminescence intensity on glioma C6 labeling time with: 1, 2 – QDs(-20); 3, 4 – QDs(+20). Trypan blue was used to quench PL of extracellular QDs in the experiments 1 and 3

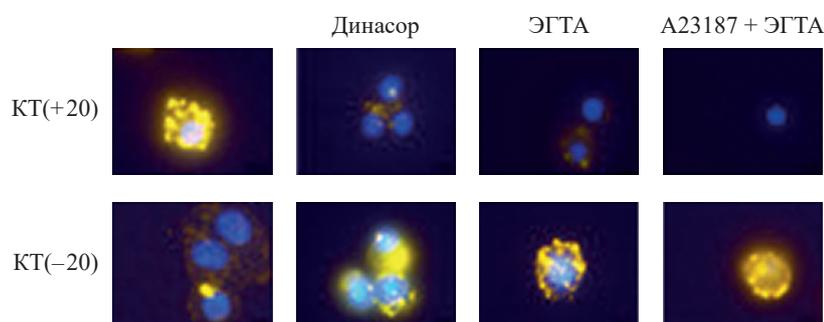


Рис. 9. Флуоресцентные изображения клеток глиомы С6, окрашенных КТ(+20) и КТ(-20) в различных средах. Ядра клеток окрашены красителем Hoechst 33342

Fig. 9. Fluorescent images of glioma C6 cells labeled with QDs(+20) and QDs(-20) in different media. The nuclei were additionally stained with Hoechst 33342

Исследования механизмов эндоцитоза показали, что в среде без Ca^{2+} , где не наблюдается агломерации КТ(-33), в их поглощении играют роль пути, зависмые от клатрина и липидных рафтов-кавеол. В осуществлении эндоцитоза посредством этих механизмов принимает участие ГТФаза динамина [20]. В то же время согласно нашим результатам КТ с большим отрицательным зарядом могут поглощаться и динаминнезависимыми путями, так как ингибирование динамина не снижает поглощение. Среди динаминнезависимых путей поглощения – эндоцитоз CLIC/GEEC, регулируемый с участием ГТФазы Cdc42 и опосредованный в первую очередь клатриннезависимыми носителями (CLIC), которые сливаются, образуя тубулярные ранние эндоцитарные компартменты, называемые GPI-AP обогащенными эндосомными компартментами (GEECs). Этот процесс отличается от макропиноцитоза, так как он является конститутивным и нечувствителен к амилориду, селективному ингибитору макропиноцитоза [21; 22]. Еще один тип клатрин- и динаминнезависимого, но холестеролзависимого эндоцитоза – ARF6-ассоциированный путь, первоначально идентифицированный из-за его ассоциации с малой ГТФазой ARF6. ARF6 присутствует на клеточной поверхности и во многих клетках на эндосомах, которые содержат белки, эндоцитированные клатриннезависимым путем. К динаминнезависимым относят также флотиллинзависимый эндоцитоз, которым переносятся вещества в жидкой фазе и белки, связанные с гликозилфосфатидинозитолом. Механизм этого типа эндоцитоза до конца не раскрыт [21].

Положительно заряженные КТ связывались с клетками в 3–8 раз интенсивнее, чем отрицательно заряженные, что ранее нами было показано на клетках карциномы Эрлиха [10]. Более интенсивное

связывание с клетками положительно заряженных КТ или липосом объясняют прежде всего их электростатическим взаимодействием с отрицательно заряженной мембраной [23; 24]. Вероятно, что это объяснение неполное, так как в наших экспериментах положительно заряженные КТ с меньшим по значению ξ -потенциалом связывались с клетками лучше, чем КТ с большим ξ -потенциалом (при одинаковом гидродинамическом размере КТ). Остается неясным, играет ли здесь роль заряд КТ в целом или наличие в оболочке КТ как положительно, так и отрицательно заряженных групп.

Ионы кальция в среде культивирования снижали эффективность маркировки клеток КТ с положительным ξ -потенциалом. Для КТ(+13) это частично может объясняться увеличением гидродинамического диаметра (см. таблицу и рис. 1). Кроме того, ионы кальция влияют на индукцию эндоцитоза наночастиц. Согласно нашим данным, КТ, несущие в оболочке как положительно, так и отрицательно заряженные группы, но в целом обладающие положительным ξ -потенциалом, индуцируют макропиноцитоз, а также клатрин- и кавеолинзависимый эндоцитоз в среде, содержащей ионы кальция. В среде без кальция значительно снижается роль макропиноцитоза, а также механизмов, зависящих от клатрина и от клеточного катионного баланса и рН.

Что же касается частиц с высоким положительным ξ -потенциалом (КТ(+22)), то некоторое уменьшение (в 1,2 и 1,6 раза) интенсивности флуоресценции клеток в присутствии Ca^{2+} может объясняться снижением связывания КТ с клетками. Как показано на рис. 5, в, в присутствии Ca^{2+} уменьшается интенсивность механизмов эндоцитоза, зависящих от липидных рафтов-кавеол.

Из рис. 5, б, в, видно, что КТ с положительным ξ -потенциалом как в присутствии, так и в отсутствие Ca^{2+} поглощаются с участием динаминзависимых механизмов, которые несколько более выражены в среде, содержащей ионы кальция. Это означает, что для динаминзависимого эндоцитоза важны внутриклеточные запасы кальция.

Клетки, помещенные в бескальциевую среду, лишаются внеклеточного источника кальция, а добавление ЭГТА в высокой дозе вместе с А23187 способствует снижению уровня свободного кальция в клетке. Это приводит к ингибированию эндоцитоза положительно заряженных КТ и усилению поглощения КТ с высоким абсолютным значением отрицательного заряда. Аналогичные тенденции наблюдаются при использовании ингибитора динамина – динасора. Известно, что динамин является кальцийзависимым ферментом [20]. Это позволяет предположить, что динамин- и кальцийзависимые механизмы способствуют поглощению КТ, несущих положительно заряженные группы, и препятствуют поглощению КТ с высоким абсолютным значением отрицательного заряда.

При исследовании роли кальция в эндоцитозе показано, что кальций активирует клатринзависимое поглощение клетками синаптических везикул [25–27] и рецептора к эпидермальному ростовому фактору [28]. Клатринзависимый механизм является преимущественным типом эндоцитоза, особенно при поглощении положительно заряженных частиц [29; 30]. В наших экспериментах хелатор кальция и ингибитор динамина подавляли поглощение положительно заряженных КТ, однако ингибирование клатринзависимого эндоцитоза не приводило к аналогичным эффектам. Возможно, тут играет роль активация других динаминзависимых, но клатриннезависимых механизмов эндоцитоза, из которых к настоящему времени известны такие, как кавеолинопосредованный и RhoA- и эндофиллинзависимый эндоцитоз [31].

КТ, в оболочке которых присутствуют только отрицательно заряженные группы, в условиях хелатирования кальция и ингибирования динамина поглощаются клетками лучше. С этими результатами согласуются и данные, которые показали, что хелатирование кальция ЭГТА приблизительно в 50 раз усилило трансцитоз карбоксилатмодифицированных отрицательно заряженных, но не положительно заряженных наночастиц через монослой эпителиальных альвеолярных клеток [32]. Выяснение причин усиления взаимодействия клеток с отрицательно заряженными КТ при ингибировании кальцийзависимых механизмов требует дальнейших исследований.

Заключение

КТ, несущие в оболочке отрицательно заряженные карбоксильные группы, изменяют свои характеристики в присутствии Ca^{2+} и Ba^{2+} – уменьшается отрицательный ξ -потенциал и увеличиваются положительный ξ -потенциал и гидродинамический размер наночастиц, снижается квантовый выход флуоресценции. Эти эффекты становятся менее выраженными при частичной замене и совсем исчезают при полной замене отрицательно заряженных карбоксильных групп в оболочке на положительно заряженные четвертичные аммонийные группы. Изменение физико-химических характеристик КТ приводит к изменению их взаимодействия с клетками. КТ, несущие в оболочке только отрицательно заряженные группы, в присутствии Ca^{2+} агрегируют и образуют конгломераты из наночастиц и клеток. Положительно заряженные четвертичные аммонийные группы в оболочке наночастиц повышают их устойчивость к агрегации в присутствии Ca^{2+} и способствуют их эффективному поглощению клетками.

Хелатор кальция ЭГТА, в особенности в сочетании с кальциевым ионофором A23187, а также ди-насор – ингибитор динамина – снижают поглощение положительно заряженных КТ и способствуют усилению поглощения КТ с сильным отрицательным поверхностным зарядом.

Таким образом, ионы кальция изменяют физико-химические характеристики наночастиц и влияют на их взаимодействие с клетками. Тип и направленность этих изменений зависят от соотношения отрицательно и положительно заряженных химических групп в оболочке и, соответственно, ζ -потенциала наночастиц.

Библиографические ссылки / References

1. Treuel L, Docter D, Maskos M, Stauber RH. Protein corona – from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2015;6:857–873. DOI: 10.3762/bjnano.6.88.
2. Barbero F, Russo L, Vitali M, Piella J, Salvo I, Borrajo ML. Formation of the protein corona: the interface between nanoparticles and the immune system. *Seminars in Immunology*. 2017;34:52–60. DOI: 10.1016/j.smim.2017.10.001.
3. Arruda AP, Hotamisligil GS. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cell Metabolism*. 2015;22(3):381–397. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.06.010.
4. Brodskiy PA, Zartman JJ. Calcium as a signal integrator in developing epithelial tissues. *Physical Biology*. 2018;15(5):051001. DOI: 10.1088/1478-3975/aabb18.
5. Filippini A, D'Amore A, D'Alessio A. Calcium mobilization in endothelial cell functions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(18):4525–4538. DOI: 10.3390/ijms20184525.
6. Yao CK, Liu YT, Lee IC, Wang YT, Wu PY. A Ca^{2+} channel differentially regulates clathrin-mediated and activity-dependent bulk endocytosis. *PLoS Biology*. 2020;15(4):e2000931. DOI: 10.1371/journal.pbio.2000931.
7. Leitz J, Kavalali ET. Ca^{2+} dependence of synaptic vesicle endocytosis. *The Neuroscientist*. 2016;22(5):464–476. DOI: 10.1177/1073858415588265.
8. Heedoo L, Groota M, Pinilla-Vera M, Fredenburgh LE, Jin Y. Identification of miRNA-rich vesicles in bronchoalveolar lavage fluid: Insights into the function and heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Controlled Release*. 2019;294:43–52. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.12.008.
9. Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke & Thomas Nann R. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*. 2008;5(9):763–775. DOI: 10.1038/nmeth.1248.
10. Petrova EA, Terpinskaya TI, Fedosyuk AA, Radchanka AV, Antanovich AV, Prudnikau AV, et al. Luminescent quantum dots encapsulated by zwitterionic amphiphilic polymer: surface charge-dependent interaction with cancer cells. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry*. 2018;1:3–13.
11. Rosenthal SJ, McBride J, Pennycook SJ, Feldman LC. Synthesis, surface studies, composition and structural characterization of CdSe, core/shell and biologically active nanocrystals. *Surface Science Reports*. 2007;62(4):111–157. DOI: 10.1016/j.surfrep.2007.02.001.
12. Fedosyuk A, Radchanka A. Determination of concentration of amphiphilic polymer molecules on the surface of encapsulated semiconductor nanocrystals. *Langmuir*. 2016;32(8):1955–1961. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b04602.
13. Nakamura Y. EGTA Can Inhibit Vesicular Release in the Nanodomain of Single Ca^{2+} Channels. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2019;11(26):15. DOI: 10.3389/fnsyn.2019.00026.
14. Pepperell JR, Preston SL, Behrman HR. The antigonadotropic action of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ is not mediated by elevated cytosolic calcium levels in rat luteal cells. *Endocrinology*. 1989;125(1):144–151. DOI: 10.1210/endo-125-1-144.
15. Grant RL, Acosta D. Interactions of intracellular pH and intracellular calcium in primary cultures of rabbit corneal epithelial cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 1996;32(1):38–45. DOI: 10.1007/bf02722992.
16. Iida H, Sakaguchi S, Yagawa Y, Anraku Y. Cell cycle control by Ca^{2+} in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(34):21216–21222.
17. Timmers AC, Reiss HD, Schel JH. Digitonin-aided loading of Fluo-3 into embryogenic plant cells. *Cell Calcium*. 1991;12(7):515–521. DOI: 10.1016/0143-4160(91)90033-b.
18. Okorokov LA, Tanner W, Lehle L. A novel primary Ca^{2+} -transport system from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. 1993;216(2):573–577. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18176.x.
19. Almeida JC, Benchimol M, Okorokov LA. Ca^{2+} sequestering in the early-branching amitochondriate protozoan *Tritrichomonas foetus*: an important role of the Golgi complex and its Ca^{2+} -ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2003;1615(1–2):60–68. DOI: 10.1016/s0005-2736(03)00192-5.
20. Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL. Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*. 2018;87:871–896. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-012644.
21. Mayor S, Parton RG, Donaldson JG. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014;6:a016758. DOI: 10.1101/cshperspect.a016758.
22. Sathe M, Muthukrishnan G, Rae J, Disanza A, Thattai M, Scita G. Small GTPases and BAR domain proteins regulate branched actin polymerisation for clathrin and dynamin-independent endocytosis. *Nature Communications*. 2018;9:1835–1844. DOI: 10.1038/s41467-018-03955-w.
23. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:5577–5591. DOI: 10.2147/IJN.S36111.
24. Donahue ND, Acar H, Wilhelm S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;143:68–96. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.008.
25. Chen Y, Deng L, Maeno-Hikichi Y, Lai M, Chang S, Chen G. Formation of an endophilin- Ca^{2+} channel complex is critical for clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Cell*. 2003;115(1):37–48. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00726-8.

26. Teng H, Wilkinson RS. Clathrin-mediated endocytosis in snake motor terminals is directly facilitated by intracellular Ca^{2+} . *Journal of Physiology*. 2005;565(3):743–750. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.087296.
27. Zhang J, Fan J, Tian Q, Song Z, Zhang J, Chen Y. Characterization of two distinct modes of endophilin in clathrin-mediated endocytosis. *Cellular Signalling*. 2012;24(11):2043–2050. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.06.006.
28. Delos Santos RC, Bautista S, Lucarelli S, Bone LN, Dayam RM, Abousawan J, et al. Selective regulation of clathrin-mediated epidermal growth factor receptor signaling and endocytosis by phospholipase C and calcium. *Molecular Biology of the Cell*. 2017;28(21):2747–2903. DOI: 10.1091/mbc.E16-12-0871.
29. Bhattacharjee S, Ershov D, van der Gucht J, Alink GM, Rietjens IMCM, Zuilhof H. Surface charge-specific cytotoxicity and cellular uptake of tri-block copolymer nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2013;7(1):71–84. DOI: 10.3109/17435390.2011.633714.
30. Yameen B, Choi WI, Vilos C, Swami A, Shi J, Farokhzad OC. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *Journal of Controlled Release*. 2014;190:485–499. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.06.038.
31. Schmid SL. Reciprocal regulation of signaling and endocytosis: implications for the evolving cancer cell. *Journal of Cell Biology*. 2017;216(9):2623–2632. DOI: 10.1083/jcb.201705017.
32. Fazlollahi F, Kim YH, Sipos A, Hamm-Alvarez SF, Borok Z, Kim KJ, et al. Nanoparticle translocation across mouse alveolar epithelial cell monolayers: species-specific mechanisms. *Nanomedicine*. 2013;9(6):786–794. DOI: 10.1016/j.nano.2013.01.007.

Статья поступила в редколлегию 20.07.2020.
Received by editorial board 20.07.2020.