

# Kalcio jonų įtaka molekulių pernašai pro plazminę membraną ir ląstelių gyvybingumui po ląstelių elektroporacijos

## The roles of calcium ions for molecular transfer across plasma membrane and cell viability after cell electroporation

Diana Navickaitė<sup>1</sup>, Paulius Ruzgys<sup>1</sup>, Rūta Palepšienė<sup>1</sup>, Martynas Maciulevičius<sup>1</sup>, Saulius Šatkauskas<sup>1</sup>,

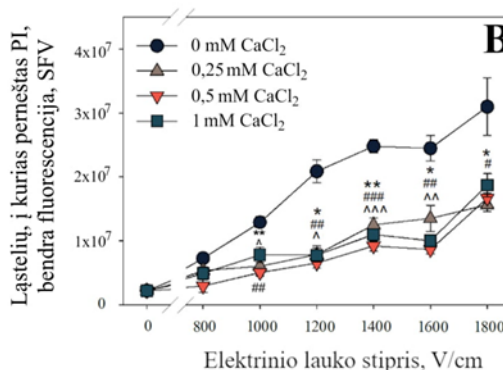
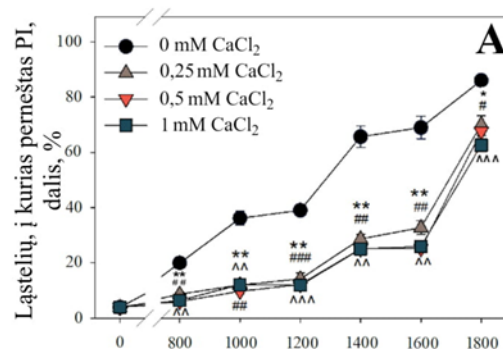
<sup>1</sup>Vytauto Didžiojo universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas  
saulius.satkauskas@vdu.lt

Kalcio jonai dalyvauja įvairiuose ląstelių procesuose – raumenų susitraukimuose, hormonų ir neuromediatorių išskyrimo, ląstelių proliferacijoje, genų raiškos valdyme, fermentų aktyvumo reguliavime (Carafoli et al., 2001), ląstelių plazminės membranos pažeidimų tvarkymo mechanizmuose (Bunney et al., 2017). Tiriant plazminės membranos pažeidimų susitvarkymo mechanizmus ląstelėse, pastebėta, kad kalcio jonai yra atsakingas už šio proceso iniciaciją. Šis kalcio jonų poveikis plazminės membranos pažeidimų tvarkyme gali taip pat turėti įtakos medžiagų transmembraninei pernašai po ląstelių elektroporacijos. Be to, padidinus kalcio jonų koncentraciją ląstelės citoplazmoje virš slenkstinės koncentracijos, ląstelės gyvybingumas yra negrįžtamai sutrikdomas (Frandsen et al., 2017). Šiuo metu, pradėti kalcio jonų pernašos (kalcio elektroporacijos) tyrimai, siekiant pritaikyti metodą priešvėžinėje terapijoje (Frandsen et al., 2020).

Darbo tikslas: iširti kalcio jonų įtaką molekulių transmembraninei pernašai ir ląstelių gyvybingumui po ląstelių elektroporacijos.

Tyrimams naudotos žiurkėno kiaušidžių CHO-K1, ląstelės bei skirtingų linijų vėžinės 4T1, B16F10, MX-1 ir U87 ląstelės. Ląstelės prieš eksperimentus buvo suspenduojamos HEPES pagrindu paruoštoje terpėje su skirtingomis kalcio jonų koncentracijomis. Ląstelių elektroporacijai buvo naudojami BTX T820 ar laboratorijoje pagaminti elektroporatoriai. Ląstelių elektroporacijos efektyvumui vertinti buvo naudojamos fluorescuojančios molekulės: propidžio jodidas (PI), YO-PRO-1 ir kalceinas. Kalcio jonų viduląstelinės dinamikos vertinimui buvo naudojamas kalbraitas 590AM. Ląstelių fluorescencijos pokyčiai vertinti naudojant fluorescencinę mikroskopiją bei tėkmės citometriją.

Rezultatai parodė, kad kalcio jonų koncentracijos didėjimas elektroporacijos terpėje sumažina mažų molekulių elektropernašos efektyvumą tiek į CHO-K1 (1 pav.) tiek ir į kitas tirtas vėžio linijų ląsteles. Be to, nustatėme, kad kalcio jonai ne tik mažina molekulių pernašą į ląsteles, bet taip pat slopina ir kalceino ištekėjimą iš ląstelių. Šie efektai yra susiję su kalcio jonų poveikyje pagreitėjusiu membranos barjerinės funkcijos atstatymu. Tiriant vienalaikį kalcio jonų viduląstelinės dinamikos pokyčius ir ląstelių gyvybingumą nustatyta, kad elektroporacijos terpę papildžius 1 mM kalcio jonų koncentracija, ląstelių žuvimo padidėjimas po elektroporacijos yra susijęs su ląstelių nesugebėjimu išpumpuoti kalcio jonų pertekliaus.



1 pav. PI elektropernašos priklausomybė nuo elektroporacijos terpėje esančios kalcio jonų koncentracijos. Ląstelių, į kurias perneštas PI, dalis (A) ir ląstelių, į kurias perneštas (B), bendra fluorescencija (B). Ląstelės buvo elektroporuojamos, taikant vieną aukštos įtampos (800–1800 V/cm) 100  $\mu$ s elektrinį impulsą. PI fluorescencija buvo matuojama praėjus 15 min po elektroporacijos.

*Reikšminiai žodžiai: ląstelių elektroporacija, kalcio jonai, elektrinio lauko stipris, ląstelių žuvimas*

### Literatūra

- [1] Carafoli, E. et al. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(2), 107–260 (2001).
- [2] Bunney, P. E. et al. Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. *Physiology and Behavior*. Elsevier Inc, 176, 139–148 (2017).
- [3] Frandsen, S. K. et al. Normal and malignant cells exhibit differential responses to calcium electroporation. *Cancer Research*, 77(16), 4389–4401 (2017).
- [4] Frandsen, S. K., Vissing, M., Gehl, J. A Comprehensive Review of Calcium Electroporation – A Novel Cancer Treatment Modality. 1–20 (2020).