

## ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИКАТИОНА ПОЛИАЛЛИЛАМИНА НА АДГЕЗИЮ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА CHL V-79 RJK С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ УСТОЙЧИВОСТИ К НАГРЕВУ

© В. П. Иванова,<sup>1</sup> Т. М. Гринчук,<sup>2</sup> Л. Л. Алексеенко,<sup>2</sup> И. В. Арцыбашева,<sup>2</sup> И. И. Гаврилова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,

<sup>2</sup>Институт цитологии РАН,

<sup>3</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: valet@iephb.ru

Изучено влияние синтетического поликатиона полиаллиламина (ПАА) на адгезию фибробластов китайского хомячка линии CHL V-79 RJK и ее сублинии CHL V-79 RJK40, устойчивой к 40 °С, а также степень прикрепления указанных клеток к поликатиону, иммобилизованному на пластике. Оценивали также цитотоксичность исследованного поликатиона. Показано, что адгезия клеток к твердой поверхности, покрытой ПАА, усиливалась или ингибировалась в зависимости от концентрации ПАА, используемой для его иммобилизации, и не зависела от степени устойчивости исследованных клеточных линий к 40 °С. Влияние ПАА на клеточную адгезию к необработанной полистироловой поверхности после экспозиции клеток с поликатионом зависело не только от концентрации ПАА, но и от степени устойчивости клеточных линий к нагреву. Предварительная обработка клеток линии CHL V-79 RJK поликатионом в нетоксических концентрациях приводила к ингибированию клеточной адгезии; при тех же условиях адгезивные свойства терморезистентных клеток не изменялись. Цитотоксический эффект в отношении фибробластов обеих исследованных линий ПАА проявляет только при концентрации 100 мкг/мл. При этом в условиях острой токсичности гибель клеток происходит по некротическому пути. Обсуждается возможный механизм влияния ПАА на поведение клеток с изначально различными метаболическими характеристиками, обусловленными их культивированием при разных температурах.

**Ключевые слова:** полиаллиламин, поликатион, адгезия, жизнеспособность, термоустойчивость, фибробласты.

**Принятые сокращения:** БТШ — белки теплового шока, ПАА — полиаллиламин.

Полимерные биоматериалы широко используются в медицинской практике не только в качестве имплантатов, но и как средство направленной транспортировки лекарственных препаратов к месту повреждения (Nahar et al., 2006; Nair, Laurencin, 2006). Материалы, способствующие регенерации тканей, должны обладать, с одной стороны, механической стабильностью, чтобы поддерживать структуру ткани, с другой — обеспечивать прочное механическое связывание клеток на начальном этапе их взаимодействия с искусственной поверхностью (Weigel et al., 2006; Dado, Levenberg, 2009).

Одним из существенных аспектов тканевого моделирования является обеспечение контролируемого процесса клеточной адгезии. Очевидно, что степень клеточного прикрепления зависит как от типа клеток, так и от физико-химических свойств поверхности прикрепления (Ito, 1999; Wang et al., 2004). Таким образом, основная задача при создании синтетических материалов сводится к усилению или ослаблению клеточных взаимодействий с искусственными носителями. Не менее важным направлением является изучение влияния экзогенных растворимых факторов, включая и полимерные гидрофильные соединения, на адгезивные свойства клеток, которые мо-

гут быть использованы в перспективе в качестве биоматериала для регуляции регенеративных процессов.

Практически все регенеративные процессы, протекающие при повреждении тканей, сопровождаются воспалительной фазой, которая проходит с повышением температуры. Увеличение температуры относится к стрессорным факторам, которые вызывают изменения метаболических процессов, позволяющие клеткам выживать при неблагоприятных условиях окружающей среды. При этом увеличивается экспрессия белков теплового шока (БТШ), которые защищают клетки от теплового воздействия и других факторов стресса и способствуют удалению из них поврежденных и агрегированных белков, образующихся в клетках в большом количестве (Маргулис, Гужова, 2000; Kampinga, 2006). Предварительный мягкий прогрев вызывает формирование у клеток устойчивости не только к более жесткому температурному воздействию, но и к действию различных цитотоксических агентов в концентрациях, летальных для клеток (Freeman, Meredith, 1989; Wiegant et al., 1999; Saydam et al., 2003).

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния синтетического поликатиона полиаллиламина (ПАА) на адгезию фибробластов китайского хомячка с

разной степенью устойчивости к температуре (40 °С), а также на степень прикрепления указанных клеток к поликатиону, иммобилизованному на пластике. Учитывая сведения о проявлении цитотоксического действия синтетических поликатионов на различные типы клеток (Hill et al., 1999; Moreau et al., 2002), оценивали также влияние ПАА на жизнеспособность исследованных клеток.

### Материал и методика

Объектом исследования служили фибробласты легко китайского хомячка линии CHL V-79 RJK (предоставленной Йельским университетом, США) и клетки ее сублинии, устойчивые к 40 °С (CHL V-79 RJK40).

Терморезистентные клетки получали путем селективного отбора клеток линии CHL V-79 RJK, сохранивших способность к пролиферации при 40 °С. Для этого клетки из нормальных условий культивирования (37 °С) помещали в условия повышенной температуры (40 °С), при которых большая их часть погибала. Через 10—12 сут культивирования в условиях повышенной температуры жизнеспособными оставались единичные клетки. Последние помещали в свежую питательную среду и культивировали при 37 °С до достижения клетками логарифмической фазы роста. Размножившиеся клетки рассевали (1 : 3) и культивировали при 40 °С постоянно. Интервал между посевами составлял 48—72 ч.

Для проведения экспериментов клетки обеих линий культивировали в среде ДМЕМ/F12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco, США) в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Клетки, достигшие монослоя, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS; Sigma, США) и суспендировали в питательной среде без сыворотки.

Влияние поликатиона ПАА, синтезированного в лаборатории гидрофильных полимеров ИВС РАН, на адгезию клеток оценивали по описанному ранее методу (Иванова и др., 2008). Клетки (10<sup>6</sup>/мл) инкубировали в 96-луночных планшетах (Corning, США), обработанных или необработанных полимером. Во втором случае клетки преинкубировали с поликатионом в концентрации от 0.01 до 100 мкг/мл или без него 30 мин при 37 °С, затем в питательную среду добавляли сыворотку, перенесли клеточную суспензию в планшет и выдерживали 1 ч в тех же условиях. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым.

Иммобилизацию полимера проводили в концентрациях 10, 20 и 50 мкг/мл (в PBS) в течение 18 ч при 4 °С. После двукратной отмывки PBS в лунки планшета вносили клеточную суспензию в полной питательной среде и проводили постановку реакции, как описано выше.

Цитотоксичность действия полимера оценивали по выживаемости клеток, которую определяли с помощью МТТ-теста (Niks, Otto, 1990). Клетки рассевали в 96-луночные планшеты по 2 · 10<sup>4</sup> клеток в лунку в полной питательной среде, через 1 сут ее удаляли и добавляли питательную среду без сыворотки с исследуемым полимером (от 0.01 до 100 мкг/мл) или без него. После 1.5 ч инкубации клеток при 37 °С инкубационную среду удаляли и вносили свежую среду. В каждую лунку добавляли 0.5 мг/мл МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; Sigma, США) в PBS и инкубировали 2 ч 40 мин при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. О количестве жизнеспособных клеток судили по изменению величины

оптической плотности экстрагированного из клеток формазана. Оптическую плотность измеряли на анализаторе Униплан (Пикон, Россия) при  $\lambda = 570$  нм.

Выживаемость клеток также оценивали с использованием трипанового синего. Клеточную суспензию вносили по 10<sup>5</sup> клеток в лунку планшета в питательной среде без сыворотки и инкубировали с полимером (100 мкг/мл) или без него при 37 °С в течение 30, 60 или 90 мин. Затем клетки окрашивали 0.2%-ным трипановым синим и через 5 мин подсчитывали количество живых (с интактной мембраной) и неживых (с поврежденной мембраной и потому окрашенных) клеток, используя гемоцитометр. Результаты представлены в % живых клеток.

Морфологию клеток после 1.5-часовой инкубации с полимером или без него оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии. Для выявления влияния полимера на морфологию клеточных ядер фибробласты обрабатывали 1.5 ч препаратом при 37 °С. После отмывки монослоя от полимера клетки фиксировали 4%-ным формальдегидом и окрашивали DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндолом) (1 мкг/мл) в течение 10 мин при комнатной температуре. Морфологию флуоресцентномеченных ядер анализировали с помощью микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия) с фотокамерой Leica DFC 360 FX.

При статистической обработке результатов использовали критерий Стьюдента.

### Результаты

В результате проведенных исследований показано, что степень прикрепления фибробластов к иммобилизованному на пластике полимеру зависела от использованной для иммобилизации дозы препарата (рис. 1). Так, ПАА при наименьшей из использованных концентраций усиливал прикрепление клеток линии CHL V-79 RJK и ее терморезистентной сублинии соответственно на 18 ( $P < 0.01$ ) и 30 ( $P < 0.05$ ) % по сравнению с адгезией этих клеток к пластиковой поверхности, не обработанной полимером. Увеличение концентрации полимера, использованной для его иммобилизации, приводило к дозозависимому ингибированию адгезии обеих исследованных клеточных линий. При этом количество прикрепившихся клеток обеих линий к поверхности, обработанной максимальной (50 мкг/мл) дозой ПАА, сокращалось приблизительно в 1.6 раза ( $P < 0.01$ ) по сравнению с контролем. Таким образом, не выявлено существенных различий в адгезионной способности клеток линии CHL V-79 RJK и ее терморезистентной сублинии к иммобилизованному на твердой поверхности поликатиону.

Полимер в иммобилизованном состоянии взаимодействует с клетками, находясь в достаточно неизменном структурированном состоянии, определяемом, с одной стороны, собственной химической структурой, с другой — особенностями строения твердой поверхности, такими как химический состав, поверхностный заряд, структурированность поверхности подложки и т. д. Нас интересовал вопрос о том, изменится ли влияние исследованного поликатиона на клеточную адгезию при обработке им клеток, суспендированных в культуральной среде, по составу приближающейся к тканевой жидкости млекопитающих.

В ходе работы установлено, что после предварительной обработки суспендированных фибробластов обеих линий полимером ПАА в дозе 100 мкг/мл количество

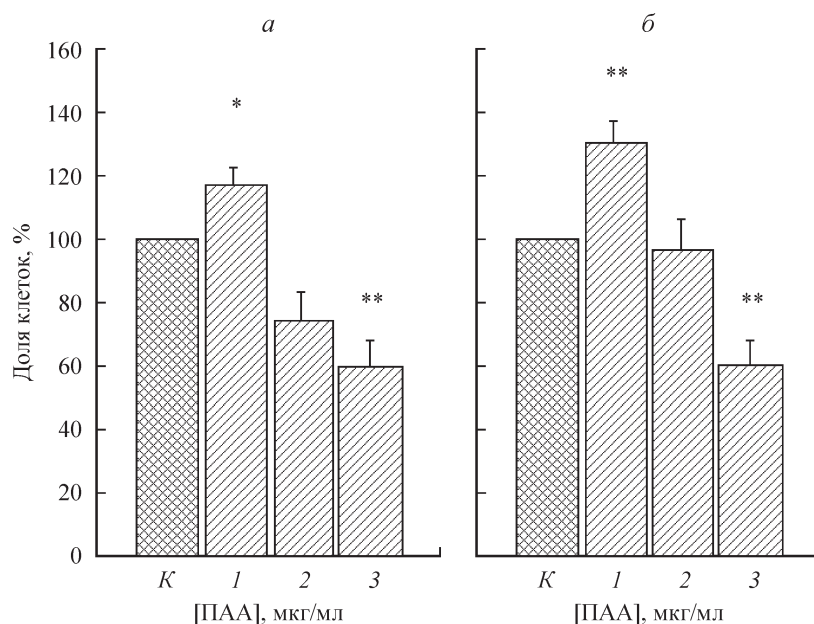


Рис. 1. Адгезия фибробластов линии CHL V-79 RJK (а) и ее терморезистентной сублинии (б) к иммобилизованному на пластике поликатиону ПАА.

По горизонтали — концентрация поликатиона (мкг/мл): К — контроль, 1 — 10, 2 — 20, 3 — 50. Интактные клетки сеяли на иммобилизованный на пластик полимер. Через 1 ч инкубации в полной среде при 37 °С оценивали количество прикрепившихся клеток. Достоверность отличий от контроля отмечена одной ( $P < 0.05$ ) или двумя ( $P < 0.01$ ) звездочками. Представлены данные четырех экспериментов.

прикрепившихся клеток к полистироловой пластиковой поверхности сокращалось в 2 раза ( $P < 0.001$ ) по сравнению с клетками, не обработанными полимером (рис. 2). В отличие от терморезистентных клеток, способность к прикреплению у которых после обработки полимером при меньших концентрациях практически не отличалась от

контрольных фибробластов, адгезивные свойства клеток исходной линии CHL V-79 RJK частично ингибировались под действием поликатиона даже при наименьшей из исследованных концентраций препарата.

Показано, что подавление клеточной адгезии после обработки обеих клеточных линий полимером в концент-

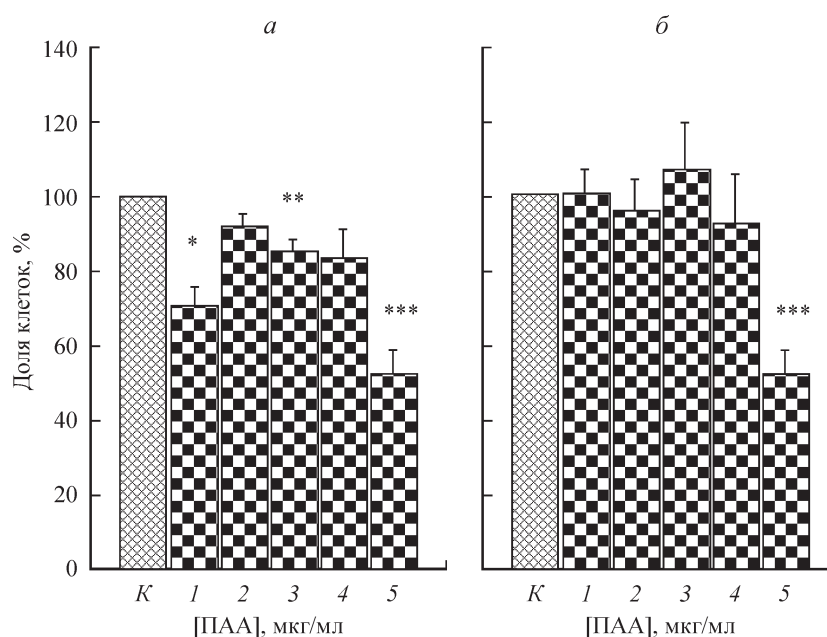


Рис. 2. Влияние поликатиона ПАА на адгезию фибробластов линии CHL V-79 RJK (а) и ее терморезистентной сублинии (б) к необработанной пластиковой поверхности.

По горизонтали — концентрация поликатиона (мкг/мл): К — контроль, 1 — 0.01, 2 — 0.1, 3 — 1, 4 — 10, 5 — 100. Клетки инкубировали с полимером в течение 30 мин при 37 °С в питательной среде без сыворотки, затем оценивали количество прикрепившихся клеток через 1 ч инкубации в полной среде при 37 °С. Достоверность отличий от контроля отмечена одной ( $P < 0.05$ ), двумя ( $P < 0.01$ ) или тремя ( $P < 0.001$ ) звездочками. Представлены данные пяти экспериментов.

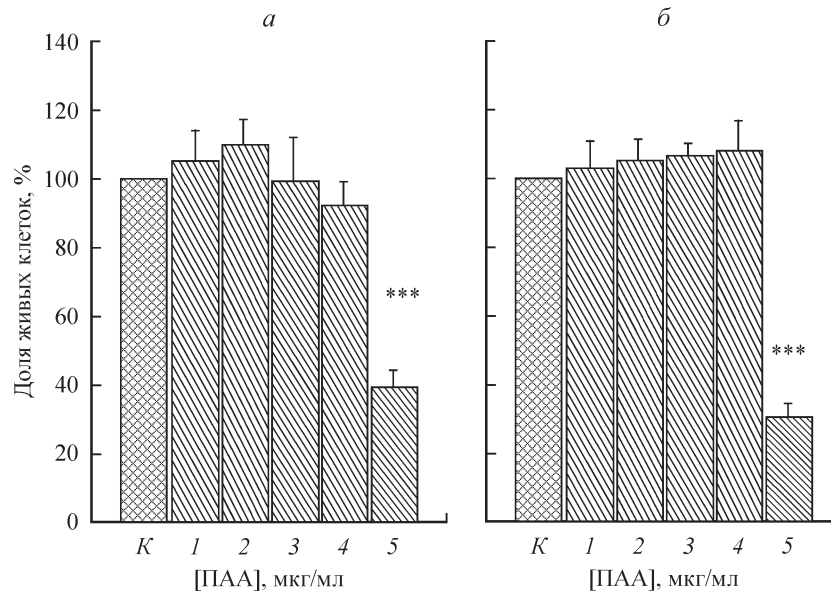


Рис. 3. Влияние полиакрилатона ПАА на жизнеспособность фибробластов линии CHL V-79 RJK (а) и ее терморезистентной сублинии (б).

По горизонтали — концентрация полиакрилатона (мкг/мл): К — контроль, 1 — 0.01, 2 — 0.1, 3 — 1, 4 — 10, 5 — 100. Клетки инкубировали с полимером при 37 °С в течение 1.5 ч. После удаления инкубационной среды с полимером в лунки планшета вносили свежую питательную среду без сыворотки. Жизнеспособность клеток оценивали по активности митохондриальных дегидрогеназ, которую определяли по МТТ-тесту. Представлены данные четырех экспериментов. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

рации 100 мкг/мл сопровождается значительным снижением числа жизнеспособных клеток (рис. 3). В меньших дозах полиакрилатон ПАА практически не оказывал цитотоксического действия на фибробласты изученных линий.

Сопоставляя данные о влиянии исследованного полиакрилатона на адгезию и жизнеспособность клеток с различной степенью устойчивости к действию температуры, можно отметить, что эффект торможения адгезии фибробластов линии CHL V-79 RJK, чувствительных к повышенной температуре, при воздействии на них ПАА в концентрациях 0.01 ( $P < 0.05$ ) и 1 ( $P < 0.01$ ) мкг/мл не связан с подавлением жизнеспособности клеток (рис. 2, 3).

Обнаруженный в ходе исследований цитотоксический эффект ПАА (в дозе 100 мкг/мл) может быть связан с повреждением либо клеточной мембраны и (или) цитоплазматических компонентов различной структурной сложности, либо ядерного аппарата клетки. Чтобы приблизиться к пониманию того, на какие мишени действует полиакрилатон, исследовали морфологию ядер после 1.5-часовой обработки препаратом клеток обеих линий. Оказалось, что ядра клеток, подвергнутых обработке токсической дозой ПАА, не отличались по морфологии от ядер контрольных клеток, но наблюдалось уменьшение размеров ядер (рис. 4, 5), т. е. полученные нами данные не

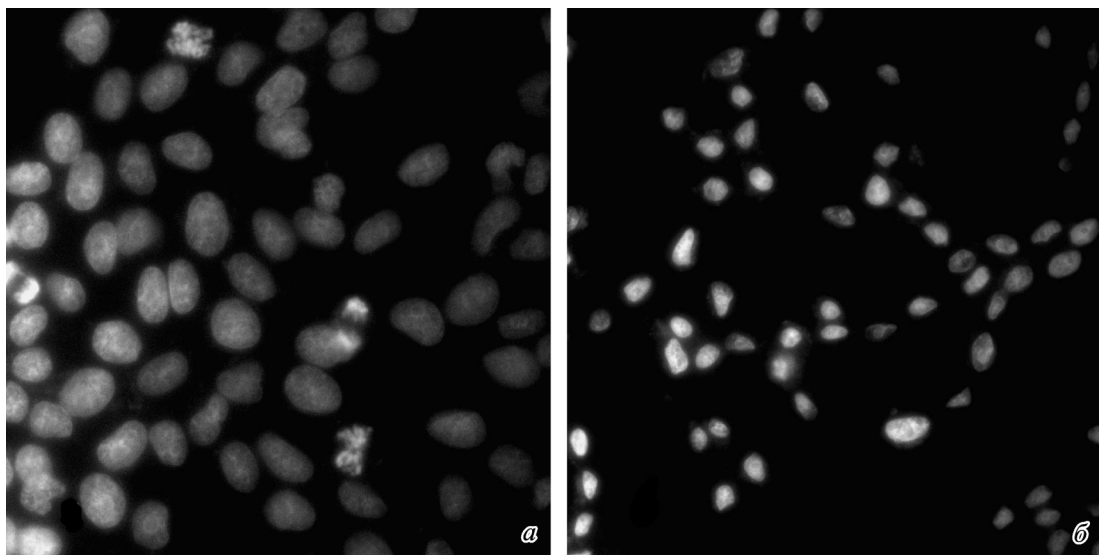


Рис. 4. Влияние полиакрилатона ПАА на морфологию ядер фибробластов линии CHL V-79 RJK.

Контрольные клетки (а) и клетки, обработанные полимером (100 мкг/мл) в течение 1.5 ч (б). После отмывки клеток от полимера ядра окрашивали DAPI (1 мкг/мл) в течение 10 мин. Флуоресцентный микроскоп Axioskop (Carl Zeiss, Германия). Об.: 40×.

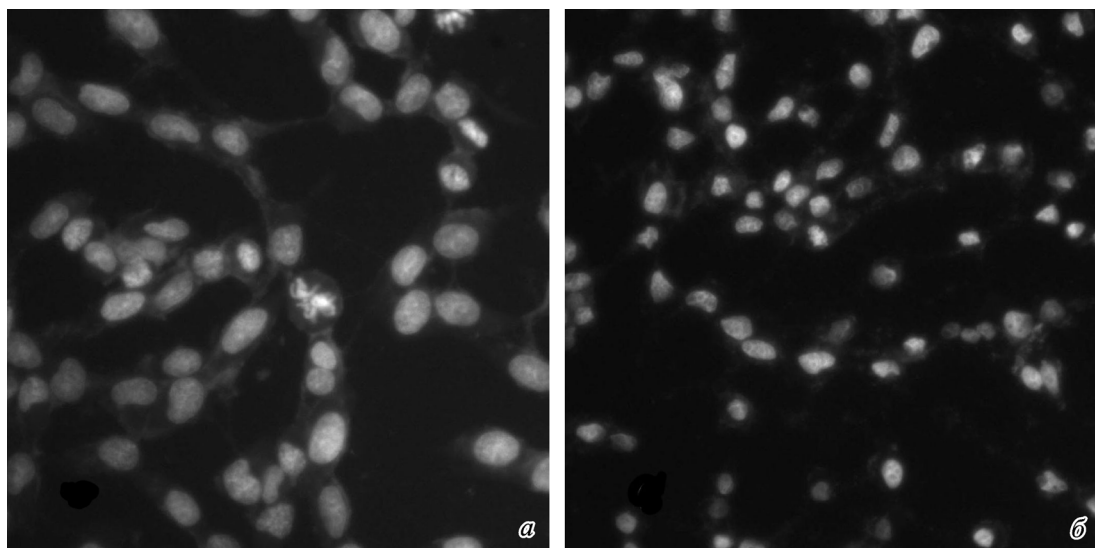


Рис. 5. Влияние поликатиона ПАА на морфологию ядер фибробластов терморезистентной сублинии CHL V-79 RJK40. Обозначения те же, что и на рис. 4.

дают основания утверждать, что гибель клеток после 1.5-часовой инкубации фибробластов с поликатионом (100 мкг/мл) обусловлена изменениями их ядерного аппарата. Можно предположить, что выявленная токсичность ПАА связана с нарушениями в функционировании плазматической мембраны клеток.

Это предположение подтверждается данными о влиянии ПАА на гибель клеток, определяемую по их окраске трипановым синим, что свидетельствует о разрушении клеточной мембраны, а значит, о гибели клеток по некротическому пути (Kim et al., 2009). Как видно из данных таблицы, поликатион в течение 30 мин обработки разрушал около 50 % популяции клеток вне зависимости от типа клеточной линии. При этом дальнейшее увеличение времени инкубации клеток линии CHL V-79 RJK с ПАА до 60—90 мин практически не изменяло достигнутого ранее уровня гибели клеток. В то же время увеличение времени экспозиции терморезистентных клеток с полимером до 60 или 90 мин приводило к дополнительному уменьшению количества жизнеспособных клеток соответственно на 11 и 16 %. В клеточных суспензиях, не подвергнутых воздействию полимера, количество живых клеток оставалось практически неизменным в течение всего периода инкубации (1.5 ч), а число погибших клеток состав-

ляло менее 2 %, т. е. при внесении токсической дозы поликатиона в инкубационную среду суспендированные клетки подвергаются ударному воздействию, в результате которого часть клеточной популяции гибнет в ходе некроза.

## Обсуждение

Как правило, для усиления процессов клеточной адгезии полистироловую поверхность, обычно используемую для культивирования клеток, покрывают либо гидрофильным полимером полилизинном, либо белками внеклеточного матрикса (фибронектином, коллагеном, витронектином и др.) (Mazia et al., 1975; Kleinman et al., 1987). При этом прикрепление клеток к положительно заряженному полилизину происходит за счет неспецифических электростатических взаимодействий (Reuter et al., 2009), а связывание клеток с белками внеклеточного матрикса осуществляется специфически посредством интегриновых рецепторов (Humphries et al., 2004; Arnaout et al., 2005), концентрирующихся в ходе клеточной адгезии в местах формирования фокальных контактов (Berrier, Yamada, 2007).

Поликатион ПАА, подобно полилизину, связывается с клеткой неспецифически за счет электростатических взаимодействий положительно заряженных аминогрупп с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидных молекул (Афиногенов, Панарин, 1993), формирующих липидный бислой клеточной мембраны. Казалось бы, с увеличением количества адсорбированного на полистироловой поверхности поликатиона число прикрепившихся к нему клеток должно возрастать. Однако на деле этого не происходит. Эффект усиления адгезионной способности клеток обеих исследованных линий наблюдался только при одной (10 мкг/мл) из концентраций ПАА, использованных для его иммобилизации на пластике. Увеличение концентрации полимера в 2 и 5 раз не только не увеличивало количество прикрепившихся клеток, напротив, приводило к уменьшению этого показателя (рис. 1). Возможно, выявленный столь неоднозначный эффект обусловлен способностью клеток по-разному реа-

**Зависимость выживаемости фибробластов линии CHL V-79 RJK и ее терморезистентной сублинии от времени действия поликатиона ПАА (100 мкг/мл)**

Время экспозиции, мин (37 °С)	Выживаемость, % от контроля	
	клеток CHL V-79 RJK	клеток сублинии CHL V-79 RJK40
0	100	100
30	52.5 ± 4.1	56.5 ± 5.8
60	45.8 ± 5.1	45.3 ± 3.6
90	48.7 ± 2.6	40.5 ± 1.1

Примечание. Выживаемость клеток оценивали по окраске трипановым синим. Представлены данные трех экспериментов для каждого варианта. Все значения достоверно отличаются от контроля при  $P < 0.01$ .

гировать на изменения физических параметров окружающей среды, например на локальную плотность распределения молекул полимера (Pelham, Wang, 1997; Mei et al., 2006), адсорбированных на поверхности пластика, обработанного разными дозами ПАА.

Различия в локальной плотности распределения ПАА на твердой поверхности создают разную степень шероховатости у поверхности прикрепления, которая может усиливать или ослаблять механический контакт с клеточной мембраной (Ranucci, Moghe, 2001). По-видимому, наиболее оптимальной плотность распределения ПАА на пластике достигается при его обработке наименьшей из исследованных концентраций полимера. При этом образующиеся на адсорбированном ПАА неровности могут способствовать формированию в клеточной мембране протрузий, усиливающих взаимодействие клеток с контурами субстрата (Milner, Siedlecki, 2007) и, следовательно, прикрепление к нему. Дальнейшее увеличение плотности распределения поликаатиона на единицу поверхности приводит к ослаблению контакта клетки с иммобилизованным полимером, что может быть связано с потерей оптимальной структурированности субстрата ввиду формирования более равномерного полимерного покрытия на твердой пластиковой поверхности, ослабляющего механическую составляющую клеточно-субстратных взаимодействий.

Если характер адгезии клеток линии CHL V-79 RJK и ее терморезистентной сублинии к иммобилизованному на пластике поликаатиону практически не отличались друг от друга, то преинкубация клеток обеих линий с ПАА выявила некоторые различия в способности этих клеток прикрепляться к необработанной полистироловой поверхности (рис. 2). Клетки линии CHL V-79 RJK оказались более чувствительными к воздействию нетоксических доз (от 0.01 до 10 мкг/мл) полимера, что приводило к уменьшению числа прикрепившихся фибробластов к пластиковой поверхности в указанном диапазоне концентраций. В то же время при тех же условиях полимер практически не оказывал влияния на адгезию терморезистентных клеток. Возможно, выявленные различия в поведении клеток, многократно пассируемых при разных температурах, связаны со структурными изменениями в липидном бислое мембран у клеток разных линий.

Известно, что повышение температуры окружающей среды приводит к увеличению микровязкости липидного бислоя клеточных мембран (Крепс, 1981; Nash, Meiselman, 1985), что обусловлено либо уменьшением количества полиненасыщенных жирнокислотных остатков у фосфолипидов (Крепс, 1981; Guffy et al., 1982), либо относительным увеличением содержания холестерина и фосфолипидов с насыщенными жирнокислотными остатками (Sinensky, 1974; Cress, Gerner, 1980). Можно предположить, что более ригидные клеточные мембраны терморезистентных фибробластов обладают такими стерическими характеристиками, которые препятствуют проникновению через мембрану молекул полимера при обработке клеток нетоксическими дозами ПАА. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что по мере увеличения содержания холестерина в клеточных мембранах они становятся менее проницаемыми для многих веществ (Muccillo et al., 1976; Ивков, Берестовский, 1981).

Исходя из имеющихся в литературе данных, подтверждающих возможность проникновения синтетических поликаатионов в клетку (Godbey et al., 1999; Fischer et al.,

2003; Reuter et al., 2009), можно предположить, что выявленный нами эффект ингибирования адгезии клеток линии CHL V-79 RJK может быть связан с влиянием поликаатиона на функции клетки до или после его проникновения в клетку. В первом случае аминогруппы полимера могут взаимодействовать с карбоксильными группами боковых радикалов аминокислотных остатков мембранных белков, изменяя их конформацию и тем самым влияя на степень агрегации мембранных белков, в том числе и интегринов. Известно, например, что ослабление кластеризации интегриновых рецепторов приводит к уменьшению клеточной адгезии (Yauch et al., 1997). Попав в клетку, полимер может воздействовать на различные белки, ассоциированные с адгезионными внутриклеточными структурами, обеспечивающими связь клетки с субстратом (Critchley et al., 1999; Brakebusch, Fässler, 2003). Это может быть актиновый цитоскелет или белки, непосредственно связанные с цитоскелетом, такие как винкулин, паксиллин и др. (Calderwood et al., 2000; Zamir, Gieger, 2001).

Количество образующихся фокальных контактов непосредственно связано с организацией актинового цитоскелета (Burrige et al., 1990). Известно, что блокирование формирования актиновых стресс-фибрилл приводит к разрушению фокальных контактов (Grosheva et al., 2006). Не исключено, что исследованный полимер может ингибировать процессы полимеризации актина, тем самым сокращая количество мембранных сайтов, способных к формированию многокомпонентных адгезионных структур. Кроме того, полимер, взаимодействуя электростатически с белками, ассоциированными с цитоскелетом, и изменяя их конформацию, а значит, и функциональную активность, может влиять на соотношение скоростей формирования и разборки адгезионных структур и в результате, замедлять процесс формирования фокальных комплексов.

При воздействии исследованного полимера на клетку на уровне плазматической мембраны могут происходить два явления: 1) неспецифическое взаимодействие поликаатиона с белковыми компонентами мембраны, в результате чего изменяется их структурная и функциональная активность; 2) неспецифическое взаимодействие с отрицательно заряженными областями фосфолипидов, приводящее к уменьшению относительного поперечного сечения полярной группы у фосфолипидных молекул. Это приводит к инвагинации липидного бислоя в месте его контакта с молекулами поликаатиона, которая завершается формированием инвертированных мицеллярных структур в бислое, способствующих проникновению полярных молекул внутрь водного компартмента клетки (Элойа, 1989).

Известно, что мембрана, содержащая внутри бислоя незначительное количество инвертированных фосфолипидных мицелл, может сохранять барьер проницаемости. Эти мицеллярные образования могут дискретно распределяться в липидном бислое клетки в отличие от длинных инвертированных цилиндров, сегрегация которых ведет к дестабилизации бислоевой структуры мембраны, а значит, может приводить к нарушению барьерной функции клеточной мембраны вплоть до ее дезинтеграции (Элойа, 1989). В свете этих представлений данные об эффекте ПАА на адгезионную способность клеток линии CHL V-79 RJK можно интерпретировать следующим образом. При низком содержании поликаатиона в клеточной суспензии молекулы полимера, взаимодействуя с фосфолипидами, формируют инвертированные мицеллы, спо-

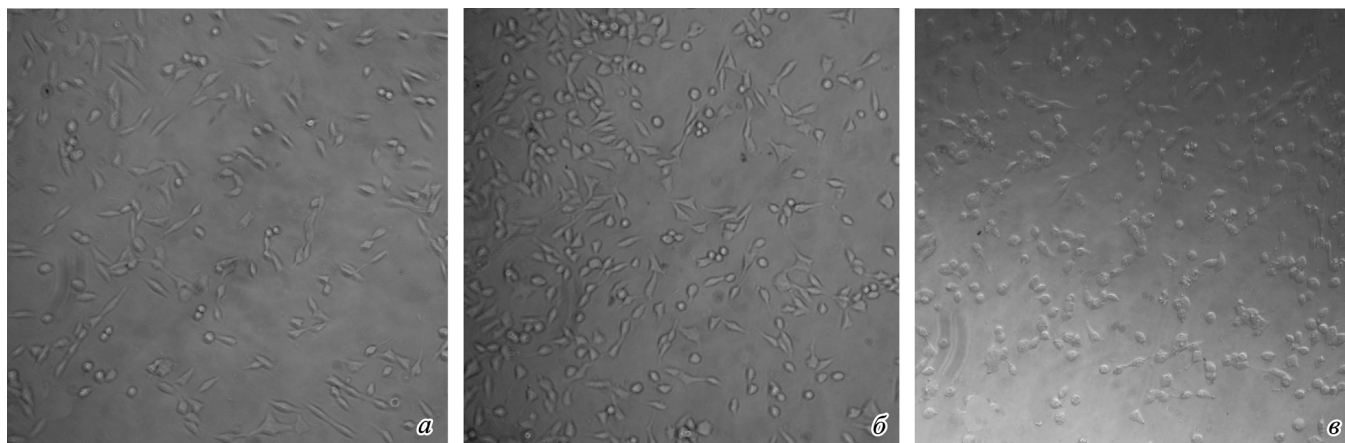


Рис. 6. Влияние поликатиона ПАА на морфологию фибробластов терморезистентной сублинии CHL V-79 RJK40. Контрольные клетки (а), клетки после 1.5-часовой обработки полимером в концентрациях 0.01 мкг/мл (б) и 100 мкг/мл (в). Микроскоп Axiovert 40C (Carl Zeiss, Германия). Об.: 10×.

способствующие проникновению ПАА внутрь клетки, где полимер может взаимодействовать с цитоскелетными структурами, препятствуя полимеризации актина и тем самым ингибируя адгезию клеток. При высоких концентрациях полимер формирует в бислое мембраны длинные инвертированные цилиндрические структуры, состоящие из фосфолипидных молекул, которые нарушают бислою структуру мембраны. При этом часть клеток в суспензии погибает из-за перфорации клеточной мембраны, а выжившая часть подвергается действию молекул поликатиона, проникших в цитоплазму клетки и осуществляющих свое действие на рассмотренные выше клеточные мишени. Что касается фибробластов терморезистентной сублинии, необходимо отметить, что нетоксические дозы полимера, по-видимому, не оказывают влияния на структуру липидного бислоя мембраны, возможно, как это уже отмечалось, ввиду большей ригидности их клеточной мембраны. Однако этих структурных особенностей в строении клеточных мембран у клеток терморезистентной сублинии явно недостаточно, чтобы предотвратить

повреждения в мембранах у части популяции клеток при действии токсической дозы полимера (100 мкг/мл).

Повышение теплоустойчивости клеток, как известно, связано не только с изменением липидного состава клеточных мембран, но и с экспрессией в клетках БТШ, основная функция которых состоит в защите многих клеточных компонентов от различных цитотоксических факторов как экзогенного, так и эндогенного происхождения (Lindquist, Craig, 1988; Маргулис, Гужова, 2000). Любое стрессорное воздействие, в том числе тепловой стресс и различные химические агенты, вызывает появление и накопление в клетках ошибочно собранных или денатурированных белков, а также белковых агрегатов (Ohtsuka et al., 2005; Kampinga, 2006), что и является сигналом для индукции БТШ.

Можно предположить, что молекулы ПАА, взаимодействуя с белковыми соединениями, изменяют их пространственную ориентацию и суммарный заряд и тем самым способствуют агрегации белков в клетке. В свою очередь появление в клетках белковых агрегатов и по-

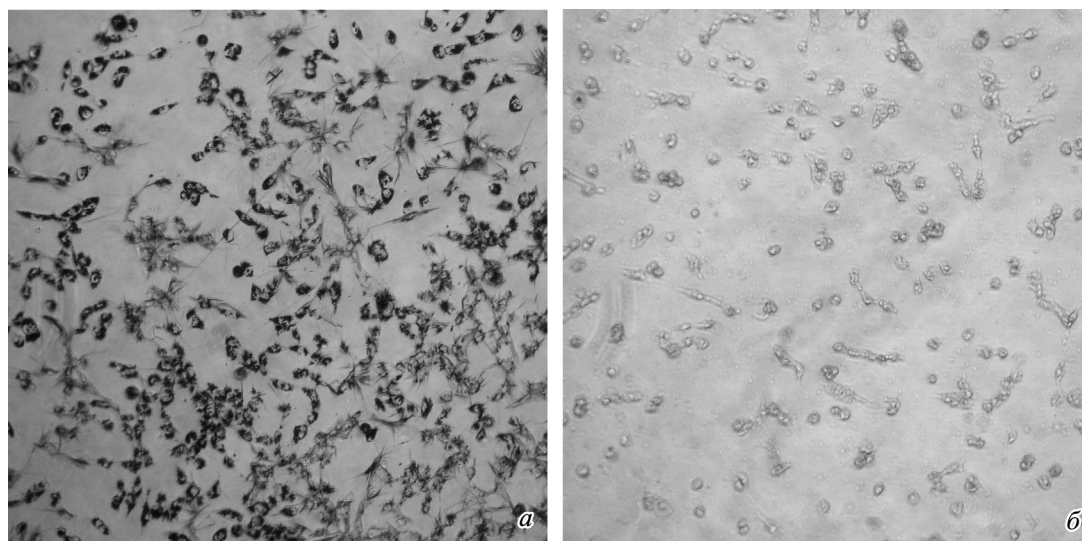


Рис. 7. Влияние токсической дозы поликатиона ПАА на метаболическую активность клеток терморезистентной сублинии CHL V-79 RJK40.

Контрольные клетки (а) и клетки после 1.5-часовой обработки полимером (100 мкг/мл) (б) инкубировали с МТТ 2 ч 40 мин при 37 °С. Об.: 10×.

врежденных полипептидов активирует синтез БТШ. Исходно клетки линии CHL V-79 RJK и терморезистентной сублинии различаются по базовому уровню конститутивных БТШ и скорости перехода к синтезу индуцибельных БТШ при появлении нового стрессорного фактора. При экспозиции клеточной суспензии с ПАА в терморезистентных клетках процессы элиминации поврежденных и агрегированных белков происходят быстрее за счет большего содержания конститутивных и индуцибельных БТШ, чем в клетках исходной линии. Вполне возможно, что именно с увеличением содержания в адгезионных внутриклеточных комплексах модифицированных белков с измененной функциональной активностью ввиду недостаточной протекторной активности БТШ и связано ингибирование адгезии к необработанной полистироловой поверхности клеток линии CHL V-79 RJK при воздействии на них нетоксических доз исследованного поликатиона.

Как уже отмечалось, ПАА проявляет цитотоксический эффект в отношении обеих исследованных клеточных линий только при одной из использованных концентраций — 100 мкг/мл (рис. 3). Полученные нами данные не противоречат имеющимся в литературе, согласно которым поликатионы являются токсическими в отношении различных типов клеток (Florea et al., 2002; Fischer et al., 2003; Wu et al., 2006; Slita et al., 2007).

Морфологические наблюдения показали, что клетки обеих линий после 1.5-часовой инкубации с полимером ПАА (100 мкг/мл) округлялись (рис. 6, в; данные морфологического анализа клеток линии CHL V-79 RJK не представлены ввиду их идентичности), при этом клетки, обработанные минимальной дозой (0.01 мкг/мл) ПАА, практически не отличались по морфологии от контрольных фибробластов (рис. 6, а, б). Терморезистентные клетки (рис. 7) и клетки линии CHL V-79 RJK (данные не представлены), подвергшиеся воздействию поликатиона в токсической дозе, проявляли низкую метаболическую активность (по МТТ-тесту). У них практически отсутствовали гранулы формазана, в то время как контрольные клетки содержали их в большом количестве. Активность митохондриальных дегидрогеназ падала до 40 и 30 % соответственно у клеток линии CHL V-79 RJK и ее терморезистентной сублинии (рис. 3). Одновременно приблизительно в 50 % популяции клеток обеих исследованных линий наблюдали нарушение целостности плазматической мембраны (по тесту с трипановым синим) (см. таблицу). Окраска ядер DAPI не выявила конденсации хроматина, а значит, и апоптотических структурных ядерных изменений у клеток обеих исследованных линий после указанного режима экспозиции с полимером (рис. 4, 5).

Скорее всего, токсический эффект ПАА на обе исследованные клеточные линии связан с нарушением целостности плазматической мембраны и угнетением клеточного дыхания. В данном случае можно говорить о I фазе острого клеточного ответа на повреждение, когда молекулы поликатиона непосредственно контактируют с клеточной мембраной, и о II фазе острого ответа, когда молекулы полимера, проникая в клетку, блокируют деятельность митохондрий. Четких морфологических изменений в клеточных ядрах не было выявлено, вероятно ввиду краткосрочности воздействия исследованного поликатиона на обе клеточные линии. Имеющиеся в литературе факты, согласно которым поликатион полиэтиленминимин локализуется в ядрах эндотелиальных клеток только спустя 4 ч после их обработки полимером (Godbey et al., 1999), могут служить косвенным подтверждением существования вре-

менной зависимости проявления влияния исследованного поликатиона ПАА на структурные изменения в клеточных ядрах. Вполне возможно, что существует еще отсроченный клеточный ответ на повреждающий фактор, который может быть зарегистрирован через больший промежуток времени после инкубации клеток с поликатионом ПАА.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные позволяют заключить следующее. Поликатион ПАА может использоваться в качестве полимерного матрикса, который поддерживает прикрепление фибробластов вне зависимости от степени устойчивости клеток к 40 °С. Однако необходимо контролировать концентрацию полимера, используемую для его иммобилизации на твердую поверхность.

Влияние ПАА на способность фибробластов прикрепляться к необработанной полистироловой поверхности зависит как от использованной концентрации полимера, так и от свойств исследованных клеток. Если предварительная обработка клеток исходной линии CHL V-79 RJK поликатионом (при нетоксических концентрациях) приводила к ингибированию клеточной адгезии, то при тех же условиях адгезивные свойства терморезистентных клеток не изменялись. Выявленная у терморезистентных клеток устойчивость к действию ПАА может быть обусловлена большей ригидностью липидного бислоя, благодаря чему проникновение молекул ПАА через клеточную мембрану затруднено, и (или) большим разнообразием и более высокой скоростью синтеза БТШ, что обеспечивает более быструю инактивацию поврежденных белков, накапливающихся в фибробластах при их экспозиции с нетоксическими концентрациями поликатиона ПАА.

Цитотоксический эффект в отношении фибробластов обеих исследованных линий поликатион ПАА проявляет только при концентрации 100 мкг/мл. При этом в условиях острой токсичности гибель клеток происходит по некритическому пути. ПАА можно рассматривать в качестве бивалентного регулятора клеточных функций, который поддерживает либо клеточную адгезию, либо гибель клеток в зависимости от подбора условий микроокружения культивируемых клеточных линий с заданными свойствами.

Авторы выражают благодарность Е. Ф. Панарину и О. В. Назаровой за обсуждение результатов.

#### Список литературы

- Афиногенов Г. Е., Панарин Е. Ф. 1993. Антимикробные полимеры. СПб.: Гиппократ. 264 с.
- Иванова В. П., Ковалева З. В., Забелинский С. А., Гринчук Т. М., Кривченко А. И. 2008. Роль трипептидного фрагмента коллагена GER в активации адгезии и модификации жирнокислотного состава фосфолипидов мембран клеток линии СНО-К1. Цитология. 50 (4) : 309 — 316.
- Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. 1981. Динамическая структура липидного бислоя. М.: Наука. 296 с.
- Кренс Е. М. 1981. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л.: Наука. 339 с.
- Маргулис Б. А., Гужова И. В. 2000. Белки стресса в эукариотической клетке. Цитология. 42 (4) : 323—342.
- Элоя Р. 1989. Текучесть мембраны в биологии: концепции мембранной структуры. Киев: Наук. думка. 312 с.
- Arnaout M. A., Mahalingam B., Xiong J.-P. 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 21 : 381—410.



- Berrier A. L., Yamada K. M. 2007. Cell-matrix adhesion. *J. Cell Physiol.* 213 : 565—573.
- Brakebusch C., Fässler R. 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO J.* 22 : 2324—2333.
- Burridge K., Nuckolls G., Otey C., Pavalko F., Simon K., Turner C. 1990. Actin-membrane interaction in focal adhesions. *Cell Differ. Dev.* 32 : 337—342.
- Calderwood D. A., Shattil S. J., Ginsberg M. H. 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J. Biol. Chem.* 275 : 22 607—22 610.
- Cress A. E., Gerner E. W. 1980. Cholesterol levels inversely reflect the thermal sensitivity of mammalian cells in culture. *Nature.* 283 : 677—679.
- Critchley D. R., Holt M. R., Barry S. T., Priddle H., Hemmings L., Norman J. 1999. Integrin-mediated cell adhesion: the cytoskeletal connection. *Biochem. Soc. Symp.* 65 : 79—99.
- Dado D., Levenberg S. 2009. Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue. *Semin. Cell Develop. Biol.* 20 : 656—664.
- Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Krieglstein J., Kissel T. 2003. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials.* 24 : 1121—1131.
- Florea B. I., Meaney C., Junginger H. E., Borchard G. 2002. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS Pharm. Sci.* 4 : article 12 (<http://www.aapspharmsci.org>).
- Freeman M. L., Meredith M. J. 1989. Modulation of diamide toxicity in the thermotolerant cells by inhibition of protein synthesis. *Cancer Res.* 49 : 4493—4498.
- Godbey W. T., Wu K. K., Mikos A. G. 1999. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 5177—5181.
- Grosheva I., Vittitow J. L., Goichberg P., Gabelt B. T., Kaufman P. L., Borrás T., Geiger B., Bershadsky A. D. 2006. Caldesmon effects on the actin cytoskeleton and cell adhesion in cultured HTM cells. *Exp. Eye Res.* 82 : 945—958.
- Guffy M. M., Rosenberger J. A., Simon I., Burns C. P. 1982. Effect of cellular fatty acid alteration on hyperthermic sensitivity in cultured L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res.* 42 : 3625—3630.
- Hill I. R., Garnett M. C., Bignotti F., Davis S. S. 1999. *In vitro* cytotoxicity of poly(amidoamine)s: relevance to DNA delivery. *Biochim. biophys. acta.* 1427 : 161—174.
- Humphries M. J., Travis M. A., Clark K., Mould A. P. 2004. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. *Biochem. Soc. Trans.* 32 : 822—825.
- Ito Y. 1999. Surface micropatterning to regulate cell functions. *Biomaterials.* 20 : 2333—2342.
- Kampinga H. H. 2006. Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and protecting against cellular stress. *Handb. Exp. Pharmacol.* 172 : 1—42.
- Kim H., Yoon S. C., Lee T. Y., Jeong D. 2009. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damage. *Toxicol. Lett.* 184 : 13—17.
- Kleinman H. K., Luckenbill-Edds L., Cannon F. W., Sephel G. C. 1987. Use of extracellular matrix components for cell culture. *Anal. Biochem.* 166 : 1—13.
- Lindquist S., Craig E. A. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22 : 631—677.
- Mazia D., Schatten G., Sale W. 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *J. Cell Biol.* 66 : 198—200.
- Mei Y., Elliott J. T., Smith J. R., Langenbach K. J., Wu T., Xu C., Beers K. L., Amis E. J., Henderson L. 2006. Gradient substrate assembly for quantifying cellular response to biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 79A : 974—988.
- Milner K. R., Siedlecki C. A. 2007. Fibroblast response is enhanced by poly(L-lactic acid) nanotopography edge density and proximity. *Int. J. Nanomedicine.* 2 : 201—211.
- Moreau E., Domurado M., Chapon P., Vert M., Domurado D. 2002. Biocompatibility of polycations: *in vitro* agglutination and lysis of red blood cells and *in vivo* toxicity. *J. Drug Target.* 10 : 161—173.
- Muccillo S. S., Marsch D., Smith I. C. 1976. Monitoring the permeability profile of lipid membranes with spin probes. *Arch. Biochem. Biophys.* 172 : 1—11.
- Nahar M., Dutta T., Murugesan S., Asthana A., Mishra D., Rajkumar V., Tare M., Saraf S., Jain W. K. 2006. Functional polymeric nanoparticles: an efficient and promising tool to active delivery of bioactives. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 23 : 259—318.
- Nair L. S., Laurencin C. T. 2006. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 102 : 47—90.
- Nash G. B., Meiselman H. J. 1985. Alteration of red cell membrane viscoelasticity by heat treatment: effect on cell deformability and suspension viscosity. *Biorheology.* 22 : 73—84.
- Niks M., Otto M. 1990. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Meth.* 130 : 149—151.
- Ohtsuka K., Kawashima D., Gu Y., Saito K. 2005. Inducers and co-inducers of molecular chaperones. *Int. J. Hyperthermia.* 21 : 703—711.
- Pelham R. J., Wang Y.-L. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 : 13 661—13 665.
- Ranucci C. S., Moghe P. V. 2001. Substrate microtopography can enhance cell adhesive and migratory responsiveness to matrix ligand density. *J. Biomed. Mater. Res.* 54 : 149—161.
- Reuter M., Schwieger C., Meister A., Karlsson G., Blume A. 2009. Poly-L-lysines and poly-L-arginines induce leakage of negatively charged phospholipid vesicles and translocate through the lipid bilayer upon electrostatic binding to the membrane. *Biophys. Chem.* 144 : 27—37.
- Saydam N., Steiner F., Georgiev O., Schaffner W. 2003. Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor MTF-1. *J. Biol. Chem.* 278 : 31879 — 31883.
- Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation. A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71 : 522—525.
- Slita A. V., Kasyanenko N. A., Nazarova O. V., Gavrilova I. I., Eroplina E. M., Sirotkin A. K., Smirnova T. D., Kiselev O. I., Panarin E. F. 2007. DNA-polycation complexes. Effect of polycation structure on physico-chemical and biological properties. *J. Biochemol.* 127 : 679—693.
- Wang Y. X., Robertson J. L., Spillman W. B., Jr., Claus R. O. 2004. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharm. Res.* 21 : 1362—1373.
- Weigel T., Schinkel G., Lendlein A. 2006. Design and preparation of polymeric scaffolds for tissue engineering. *Expert. Rev. Med. Devices.* 3 : 835—851.
- Wiegant F. A., Souren J. E., van Wijk R. 1999. Stimulation of survival capacity in heat shocked cells by subsequent exposure to minute amounts of chemical stressors; Role of similarity in hsp-inducing effects. *Hum. Exp. Toxicol.* 18 : 460—470.
- Wu D., Liu Y., Jiang X., He C., Goh S. H., Leong K. W. 2006. Hyperbranched poly(amino ester)s with different terminal amine groups for DNA delivery. *Biomacromolecules.* 7 : 1879—1883.
- Yauch R. L., Felsenfeld D. P., Kraeft S.-K., Chen L. B., Sheetz M. P., Hemler M. E. 1997. Mutational evidence for control of cell adhesion through integrin diffusion/clustering, independent of ligand binding. *J. Exp. Med.* 186 : 1347—1355.
- Zamir E., Gieger B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 14 : 3583—3590.

THE EFFECT OF SYNTHETIC POLYCATION POLYALLYLAMINE ON ADHESION  
AND VIABILITY OF CHL V-79 RJK *CHINESE HAMSTER* FIBROBLASTS  
WITH DIFFERENT HEAT RESISTANCE

*V. P. Ivanova,<sup>1</sup> T. M. Grinchuk,<sup>2</sup> L. L. Alekseenko,<sup>2</sup> I. V. Artsybasheva,<sup>2</sup> I. I. Gavrilova<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS,

<sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, and <sup>3</sup> Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg;  
e-mail: valet@iephb.ru

The effects of synthetic polycation polyallylamine (PAA) on adhesion of CHL V-79 RJK fibroblasts and CHL V-79 RJK40 cells resistant to 40 °C, and attachment to these cells to polycation immobilized on polystyrene surface were studied. We have also investigated the cytotoxicity of PAA. It was shown that cell adherence to polystyrene plastic coated with PAA was enhanced or decreased in dependence of the PAA concentration used for surface coating and did not depend on heat resistance of investigated cell lines. The effect of PAA on cell adhesion to uncoated polystyrene surface after cell exposure with PAA depended not only on the polycation concentration, but also on the extent of heat resistance of investigated cell lines. Pretreatment of CHL V-79 RJK cells with PAA at the nontoxic concentrations led to inhibition of cell adhesion, and no change in adhesive properties of thermoresistant cells was found under the same conditions. PAA was toxic for CHL V-79 RJK and CHL V-79 RJK40 cells only at concentrations of 100 µg/ml (MTT assay). PAA-induced acute toxicity was accompanied by necrotic-like cell damage. Possible mechanisms of the PAA effect on the behaviour of cells with different structural and metabolic characteristics that are due to the temperature of cell cultivation are discussed.

**Key words:** polyallylamine, polycation, adhesion, viability, heat resistance, fibroblasts.

---