

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИКАТИОНА ПОЛИ-2-ДИМЕТИЛАМИНОЭТИЛМЕТАКРИЛАТА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РЕЗИДЕНТНЫХ И НЕРЕЗИДЕНТНЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2023 г. В. П. Иванова^{1, *}, Л. Л. Алексеенко², О. В. Назарова³, И. В. Миндукшев¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

³Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004 Россия

*E-mail: valet@iephb.ru

Поступила в редакцию 21.06.2023 г.

После доработки 19.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

Катионные полимеры представляют собой положительно заряженные высокомолекулярные соединения, в состав которых входят N-содержащие функциональные группы, такие как первичные, вторичные и третичные аминогруппы, четвертичные аммонийные группы и др. В настоящей работе изучено действие синтетического поликатиона поли-2-диметиламиноэтилметакрилата (ПДМАЭМ) на биологическую активность фибробластов китайского хомячка и эритроцитов человека. На культуре фибробластов проведен анализ воздействия поликатиона на клеточную адгезию. В качестве субстрата использовали культуральный пластик, обработанный или необработанный поликатионом. Адсорбция поликатиона на полистироловой поверхности не приводила к изменению адгезивной способности фибробластов. Предварительная обработка фибробластов ПДМАЭМ в малых концентрациях (0.1 и 1 мкг/мл) не влияла на адгезионные свойства клеток, посеянных на необработанный пластик. При концентрациях 10 и 100 мкг/мл ПДМАЭМ ингибировал прикрепление фибробластов к этому субстрату. Установлена связь между подавлением клеточной адгезии под влиянием полимера и его токсическим действием на жизнеспособность фибробластов. Обработка эритроцитов человека поликатионом при концентрациях 10 и 100 мкг/мл приводила к повреждению клеток и выделению гемоглобина из эритроцитов. При малых дозах поликатион практически не оказывал влияния на процессы гемолиза эритроцитов. Показано, что ПДМАЭМ вызывал морфологические изменения эритроцитов и их агрегацию. Токсический эффект поликатиона в отношении эритроцитов человека в целом совпадал с таковым для фибробластов животных. Обсуждаются возможные клеточные мишени, на которые может воздействовать изученный поликатион.

Ключевые слова: синтетический поликатион, адгезия, цитотоксичность, гемолиз, агрегация, фибробласты, эритроциты

DOI: 10.31857/S0041377123050115, **EDN:** NWYVEA

Катионные полимеры – это высокомолекулярные соединения, положительный заряд которых обусловлен наличием N-содержащих функциональных групп (первичных, вторичных и третичных аминогрупп или четвертичных аммонийных групп) в структуре линейных поликатионов или дендритных/(гидрогелевых) сферических полимерных образований (Samal et al., 2012; Madaan et al., 2014).

В настоящее время поликатионы рассматриваются в качестве перспективных инструментов для формирования наноструктур для транспортировки раз-

личных белков, пептидов и лекарственных препаратов, в качестве невирусных векторных систем для переноса нуклеиновых кислот в клетки-мишени, а также для тканевого конструирования (Lv et al., 2006; Rihová et al., 2009; Samal et al., 2012).

Поликатион поли-2-диметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМ) представляет собой линейный полимер с третичной аминогруппой в боковой цепи. Это водорастворимый полиэлектролит, обладающий биоактивностью. В частности, ПДМАЭМ проявляет антибактериальную активность в отношении широкого спектра бактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis* (Rawlinson et al., 2010; Phillips et al., 2017; Stawski et al., 2022). ПДМАЭМ адгезирует к монослою клеток кишечника человека, секретирующих

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ПДМАЭМ – поли-2-диметиламиноэтилметакрилат.

слизь. При этом поликатион усиливает барьерную функцию клеток кишечника, уменьшая проницаемость слизистой оболочки кишечника (Keely et al., 2005). Благодаря способности поликатиона формировать комплексы с противоположно заряженными соединениями, ПДМАЭМ может использоваться в качестве носителя при трансфекции и для доставки лекарственных препаратов в поврежденные и (или) инфицированные ткани человека (You et al., 2007; Keely et al., 2009; Layman et al., 2009; Tanasienko et al., 2015).

Стратегия тканевого конструирования заключается в создании на основе синтетических полимерных носителей матриц, обеспечивающих оптимальную адгезию клеточного материала (фибробластов, остеобластов, кератиноцитов, эпителиоцитов и др.) для структурирования или формирования зон регенеративного роста тканей в местах их повреждения (Lutolf, Hubbell, 2003; Vačáková et al., 2004; Ravichandran et al., 2012). В связи с этим важной задачей остается подбор полимерных соединений для получения матриц с инкорпорированными линкерными фрагментами известных белков внеклеточного матрикса (ВКМ) (например, коллагена или фибронектина), обладающих высокой адгезивной активностью и связывающихся с определенными участками интегринных рецепторов, определяющих в итоге степень клеточной адгезии к полимерной поверхности (Lutolf, Hubbell, 2003; VandeVondele et al., 2003; Santiago et al., 2006; Thompson et al., 2006; Tsai et al., 2009). Кроме того, поликатионы могут использоваться для создания полимерных средств доставки различных растворимых соединений (от регуляторных пептидов до ростовых факторов), регулирующих клеточную адгезию, воздействуя на процесс регенерации в целом (Gribova et al., 2012; Ravichandran et al., 2012).

Кроме воздействия на резидентные ядродержащие клетки поликатионные носители, попадая в кровотоки, могут воздействовать на форменные элементы крови, включая безъядерные клеточные элементы – эритроциты человека, являющиеся доминирующей клеточной формой в крови (Шербак, 2005; Трошкина и др., 2007). Ввиду высокого положительного заряда поликатионы изменяют физиологические характеристики эритроцитов, что может приводить к их повреждению или трансформации их структурных элементов (Moreau et al., 2000).

Основная сложность, ограничивающая использование поликатионных носителей в медицинской практике, связана с их токсическими свойствами (Fischer et al., 2003; Lv et al., 2006; Madaan et al., 2014; Xie et al., 2022). Для снижения негативных последствий при использовании поликатионов разрабатываются способы минимизации токсического эффекта за счет маскировки периферического заряда у молекулы полимера посредством модификации поверхностных характеристик полимерного носителя (Samal et al., 2012; Xie et al., 2022).

В представленной работе исследовали влияние синтетического поликатиона ПДМАЭМ на функции фибробластов (резидентных клеток) и эритроцитов (нерезидентных клеток) млекопитающих. Основное внимание уделено анализу воздействия поликатиона, во-первых, на адгезивную активность фибробластов, которая определяет все последующие стадии развития и дифференцировки резидентных клеток в растворенной форме или в виде субстрата на твердой поверхности и, во-вторых, на морфофункциональные характеристики эритроцитов, развитие гемотоксического эффекта, включая лизис и агрегацию эритроцитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. В работе использовали фибробласты легкого китайского хомячка линии CHL V-79 RJK (предоставленной Иельским университетом, США), а также эритроциты человека. Фибробласты культивировали в среде ДМЕМ/F12, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco, США), в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Клетки, достигшие монослоя, промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Sigma, США) и суспендировали в питательной среде без сыворотки. Действие поликатиона на фибробласты оценивали по изменению адгезии и выживаемости. Эритроциты выделяли из венозной крови здоровых доноров, стабилизированной добавлением 2 мМ EGTA. Суспензию эритроцитов получали после двукратной промывки цельной крови PBS (рН 7.4). Отмытые эритроциты (гематокрит 2.2%) ресуспендировали в том же буфере. Действие поликатиона на эритроциты оценивали по его влиянию на лизис эритроцитов, а также на их морфофункциональные характеристики.

Оценка адгезии клеток линии CHL V-79 RJK. Влияние ПДМАЭМ (с мол. массой 30000), синтезированного в Институте высокомолекулярных соединений РАН (Санкт-Петербург), на адгезию клеток оценивали по описанному ранее методу (Иванова, 2023). Клетки линии CHL V-79 RJK (10⁶ кл./мл) культивировали в питательной среде в 96-луночных планшетах (Corning, США), обработанных или необработанных полимером. Во втором случае клетки выдерживали в питательной среде без сыворотки с ПДМАЭМ в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл или без поликатиона (контроль) 30 мин при 37°C, затем в питательную среду добавляли сыворотку, переносили клеточную суспензию в планшет и выдерживали 1 ч в тех же условиях. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. Связанный краситель экстрагировали этанолом и определяли его оптическую плотность на анализаторе “Униплан” (Пикон, Россия) при длине волны 570 нм. По величине оптической плотности судили об изменении количества прикрепленных клеток. Результаты выражали в % от контроля, принятого за 100%.

Планшеты предварительно (до посева клеток) обрабатывали поликатионом в концентрациях 10, 20 и 50 мкг/мл (в PBS) в течение 18 ч при 4°C. После двукратной отмывки PBS в лунки планшета вносили клеточную суспензию в полной питательной среде и выдерживали клетки 1 ч при 37°C. Количество прикрепившихся клеток оценивали, как описано выше.

Оценка цитотоксичности клеток линии CHL V-79 RJK. Цитотоксичность поликатиона оценивали по выживаемости клеток, которую определяли с помощью МТТ-теста (Niks, Otto, 1990) по количеству образовавшегося в процессе реакции продукта формазана. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты по 2×10^4 клеток в лунку в полной питательной среде, через 1 сут ее удаляли и добавляли питательную среду без сыворотки с исследуемым полимером (в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл) или без него. Клетки выдерживали 1.5 ч при 37°C, после чего проводили замену питательной среды. В каждую лунку добавляли 0.5 мг/мл МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид; Sigma, США) в PBS и культивировали 2 ч 40 мин при 37°C в атмосфере 5% CO₂. О количестве жизнеспособных клеток судили по изменению величины оптической плотности экстрагированного из клеток формазана. Оптическую плотность измеряли на анализаторе Униплан (Пикон, Россия) при длине волны 570 нм.

Определение количества эритроцитов в крови. Венозную кровь здоровых доноров использовали для анализа влияния ПДМАЭМ на содержание эритроцитов. От здоровых доноров получали информированное согласие на работу с их кровью. Кровь стабилизировали добавлением антикоагулянта (2 мМ EGTA). В пробы цельной крови вносили исследуемый поликатион в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл и выдерживали в течение 30 мин при 35°C. После этого проводили подсчет эритроцитов на гематологическом анализаторе МЕК-6550 (Nihon Kohden, Япония). Контролем служили образцы цельной крови без добавления поликатиона.

Гемолиз эритроцитов. Гемолитическую активность поликатиона оценивали по модифицированному методу (Jacobson et al., 2005). Эритроциты человека выделяли из венозной крови здоровых доноров. Эритроциты дважды промывали PBS (pH 7.4) и ресуспендировали в том же буфере. Суспензию эритроцитов в PBS (гематокрит 2.2%) инкубировали с полимером (в различных концентрациях от 0.1 до 100 мкг/мл) или без него 30 мин при 37°C. Степень гемолиза оценивали по величине выделившегося гемоглобина. Количество выделенного гемоглобина оценивали по оптической плотности, которую измеряли при 540 нм, используя анализатор Clariostar Plus Reader (BMG Labtech, Германия). Полный лизис эритроцитов получали после добавления в суспензию эритроцитов 1%-ного раствора Тритона X-100. Результаты выражали в % от содержания гемоглобина в эритроцитах после их полного лизиса.

Морфология эритроцитов. Для изучения действия ПДМАЭМ на эритроциты использовали их суспензию (гематокрит 2.2%), разведенную PBS в 20 раз. Образцы суспензии эритроцитов переносили в 96-луночный планшет, куда вносили ПДМАЭМ в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл. Через 5 мин анализировали изменение клеточной формы эритроцитов с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS2-FL (Nikon, Япония), оснащенного фотокамерой Retiga R1 (Cairn, Великобритания). Использовали объективы с увеличением 20× и 40×.

Одновременно исследовали влияние поликатиона на изменение клеточной формы эритроцитов после внесения ПДМАЭМ в тех же концентрациях в суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2%) и инкубирования в течение 30 мин при 37°C. Анализ изменения клеточной формы эритроцитов проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS2-FL (Nikon, Япония), оснащенного фотокамерой Retiga R1 (Cairn, Великобритания). Использовали объективы с увеличением 20× и 40×.

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для сравнения контрольных и экспериментальных групп. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как правило, поверхностная модификация субстрата осуществляется посредством адсорбции белков ВКМ или их фрагментов на ригидной или полуригидной подложке для имитации существующего *in vivo* внеклеточного окружения.

В последнее время используются синтетические полимеры, в том числе поликатионы, в качестве биоактивных субстратов для изучения адгезивной активности клеток различного происхождения (Thompson et al., 2006; Иванова и др., 2010). Использование природных биодegradуемых полимеров (белков ВКМ, таких как коллаген, фибронектин) (Спичкина и др., 2008; Иванова и др., 2012) и синтетических катионных полимеров (таких как полилизин, полиэтиленимин) (Vancha et al., 2004) в качестве адсорбируемого материала на субстратной подложке ускоряет адгезионные процессы у клеток различных типов.

Поиск синтетических поликатионов (среди известных или новых соединений) с оптимальным сочетанием биосовместимости и биодegradации полимерных материалов, используемых в качестве покрытия для изменения (усиления или подавления) адгезионной активности клеток, остается важным направлением биотехнологии. Биосовместимость синтетических полимеров связана с клеточным поведением в процессе контакта клеток с этими материалами и, чаще всего она определяется клеточной адгезией к полимерным субстратам.

Таблица 1. Влияние адсорбированного на пластике поликатиона ПДМАЭМ на адгезию фибробластов линии CNL V-79 RJK

Концентрация поликатиона, мкг/мл	Количество прикрепившихся клеток, %
– (Контроль)	100
10	100.1 ± 3.6
20	102.1 ± 4.2
50	99.7 ± 12.9

Примечание. Интактные клетки сеяли на поликатион, адсорбированный на пластике. Через 1 ч культивирования в полной питательной среде при 37°C оценивали количество прикрепившихся клеток. Показаны средние значения и их ошибки из 4-х независимых экспериментов.

В настоящей работе исследовали влияние адсорбированного на полистироловой поверхности ПДМАЭМ на адгезию фибробластов линии CNL V-79 RJK. Данные, представленные в табл. 1, показывают, что адсорбция ПДМАЭМ на культуральном пластике во всех использованных концентрациях (10, 20 и 50 мкг/мл) не влияла на степень прикрепления клеток к субстрату и не отличалась от контрольных значений. Таким образом, ПДМАЭМ, адсорбированный на синтетической поверхности другого химического состава, не подавляет адгезионную активность фибробластов, а значит не вызывает токсического эффекта в данных условиях.

Нейтральный статус в отношении регуляции клеточной адгезии исследованного нами ПДМАЭМ в качестве поверхности прикрепления не совпадает с действием ряда других поликатионов на адгезивный ответ клеток. Так, установлено, что катионные полиэлектролиты способствуют прикреплению, распластыванию и пролиферации фибробластов, а также синтезу ВКМ (коллагенов I и III типов) этими клетками (Rosa et al., 2004). Кроме того, полистироловый субстрат, покрытый полиэтиленгликолем, обеспечивал быстрое прикрепление и распластывание клеток гепатомы человека (HepG2) (Soravia, Tоса-Неггера, 2009), эмбриональных клеток почки человека (HEK293) и клеток феохромоцитомы крысы (PC12) (Vancha et al., 2004), а также ускорял созревание нейрональных клеток после их прикрепления к поликатиону (Lelong et al., 1992). Адгезия фибробластов к полиаллиламину, адсорбированному на культуральном пластике, усиливалась или ингибировалась в зависимости от концентрации поликатиона (Иванова и др., 2010). Возможно, менее выраженный эффект ПДМАЭМ на клеточную адгезию фибробластов связан с тем, что этот поликатион содержит третичные аминокислоты, что обуславливает снижение его реакционной способности.

Положительно заряженные поверхности часто используются на практике, чтобы обеспечить прикрепление клеток к субстрату. Вместе с тем не все субстратные поверхности, несущие заряд, обеспечи-

вают оптимальную клеточную адгезию в ходе культивирования клеток. Определяющую роль в этом процессе играют плотность заряда и ориентация в пространстве аминокислот у поликатионов. Можно предположить, что при адсорбции поликатиона ПДМАЭМ на искусственной поверхности (полистироле) формирующаяся пространственная ориентация функционально значимых аминокислот ПДМАЭМ не препятствует взаимодействию клеток с субстратом.

Нельзя исключить также возможность адсорбции сывороточных белков, включая белки ВКМ, содержащихся в среде культивирования, на адсорбированный слой ПДМАЭМ. В этом случае фибробласты могут специфически взаимодействовать с адсорбированными белками ВКМ через интегриновые рецепторы (Humphries et al., 2006; Iwamoto, Calderwood, 2015). Установлено, что эндотелиальные клетки человека, адгезированные на многослойных пленках, терминирующим слоем которых являются поликатионы поли-D-лизин или полиаллиламин, экспрессируют интегрины, содержащие β_1 -субъединицу (Boura et al., 2005).

Как известно, линейные полиэлектролиты (поликатионы и полианионы) используются для получения многослойных пленок, способных регулировать клеточную адгезию, свойства которых определяются зарядом и эластическими свойствами поверхности субстрата (VandeVondele et al., 2003; Boura et al., 2005; Tsai et al., 2009). Представляется возможным использование исследованного поликатиона в качестве матрицы для обеспечения регулируемой адгезии клеток к полимерной поверхности или в качестве составляющей многослойных пленок для трансплантации клеток в места тканевого повреждения для оптимизации регенеративных процессов.

Далее мы исследовали влияние ПДМАЭМ в растворенном виде на функции фибробластов. При внесении этого синтетического поликатиона в клеточную суспензию выявлено его заметное действие на адгезивные свойства фибробластов линии CNL V-79 RJK. Данные, представленные на рис. 1, показывают, что ПДМАЭМ после предварительной обработки клеток не изменяет количество прикрепившихся клеток к культуральному пластику в концентрациях 0.1 и 1 мкг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации ПДМАЭМ в среде культивирования приводит к резкому сокращению числа прикрепившихся клеток: в концентрации 10 мкг/мл – в 2.7 раза ($P < 0.001$) и 100 мкг/мл – в 8.1 раза ($P < 0.001$) по сравнению с клетками, не обработанными поликатионом.

Известно, что степень заряженности ПДМАЭМ в водных растворах зависит от величины pH. При нейтральных значениях pH молекула этого поликатиона содержит заряженные и незаряженные участки молекулы. Это создает предпосылки для дифференцированного взаимодействия его с липидными

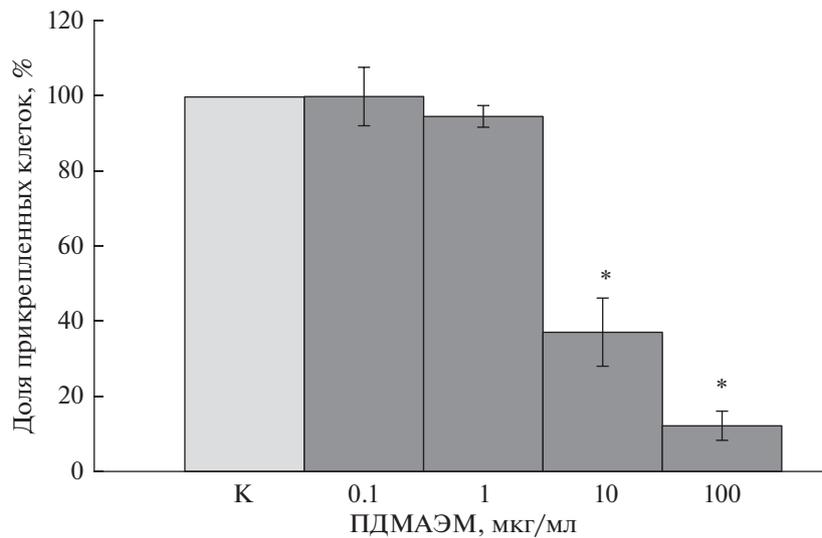


Рис. 1. Адгезия фибробластов линии CHL V-79 RJK, предварительно обработанных поликатионом ПДМАЭМ, к культуральному пластику. Клетки выдерживали с поликатионом или без него (Контроль, К) в течение 30 мин при 37°C в питательной среде без сыворотки, затем сеяли на пластик и оценивали количество прикрепившихся клеток через 1 ч культивирования в питательной среде с 10% сыворотки при 37°C. Показаны средние значения и их ошибки из 6 независимых измерений, (*) – отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

компонентами клеточной мембраны. Незаряженные фрагменты поликатиона взаимодействуют с гидрофобными участками мембранных фосфолипидных молекул (Schwieger, Blume, 2009), а положительно заряженные фрагменты полимера взаимодействуют электростатически с отрицательно заряженными участками липидных молекул (Oku et al., 1986; Reuter et al., 2009). При этом поликатион может не только адсорбироваться на поверхности клеточной мембраны, но и инкорпорироваться во внутренний монослой липидного бислоя мембран (Flebus et al., 2015). В последнем случае ПДМАЭМ, возможно, может взаимодействовать с фосфатидилсеринем, индуцируя формирование липидных доменов, обогащенных этим фосфолипидом, как это было показано для поликатиона поли-L-лизина (Franzin, Macdonald, 2001). Сегрегация фосфолипидов в мембране (Oku et al., 1986) обуславливает перераспределение плотности поверхностного заряда у клеток, а значит изменяет силу электростатического взаимодействия между поликатионом и клеточной поверхностью.

Токсичность любого препарата, в том числе полимерных соединений, обусловлена повреждением ими клеточной мембраны и выходом внутриклеточных компонентов во внеклеточное пространство. Для оценки влияния ПДМАЭМ на жизнеспособность резидентных клеток мы использовали МТТ-тест, т.к. он позволяет оценить внутриклеточное действие анализируемого препарата на активность митохондриальных дегидрогеназ.

При наименьших из использованных концентраций ПДМАЭМ (0.1 и 1 мкг/мл) жизнеспособность фибробластов практически не изменялась и не отлича-

лась от таковой клеток, не обработанных ПДМАЭМ. Увеличение дозы ПДМАЭМ в среде культивирования приводило к уменьшению числа жизнеспособных фибробластов в клеточной популяции. Но если ПДМАЭМ в дозе 10 мкг/мл приводит только к появлению тенденции к ингибированию метаболической активности клеток, то в дозе 100 мкг/мл он вызывал сильный токсический эффект, уменьшая количество жизнеспособных клеток более, чем в 9 раз ($P < 0.001$) (рис. 2). Аналогичные данные были получены другими исследователями. Так, линейный ПДМАЭМ не влиял на жизнеспособность эндотелиальных клеток и опухолевых клеток поджелудочной железы человека в дозе 10 мкг/мл, но вызывал сильный цитотоксический эффект в дозах 20 и 50 мкг/мл, уменьшая число жизнеспособных клеток соответственно до 40 и 10% (You et al., 2007) или 20% (Layman et al., 2009). Кроме того, при обработке клеток поликатионом поли-L-лизинем или полиэтилениминем в дозе 55 мкг/мл жизнеспособность сохраняли около 10% гладкомышечных клеток (Putnam et al., 2001) или 2–5% фибробластов мыши (при 100 мкг/мл; Fischer et al., 2003).

Изменение метаболической активности митохондрий под действием поликатиона свидетельствует о проникновении полимера в клетку. Недавно подтверждено, что токсичность полимеров, оцениваемая по МТТ-тесту, обусловлена повреждением клеточных мембран (Monperu et al., 2017) и связанным с этим процессом входом молекул поликатиона во внутриклеточное пространство. Авторы полагают, что поликатион может поступать в клетки, минуя процесс эндоцитоза.

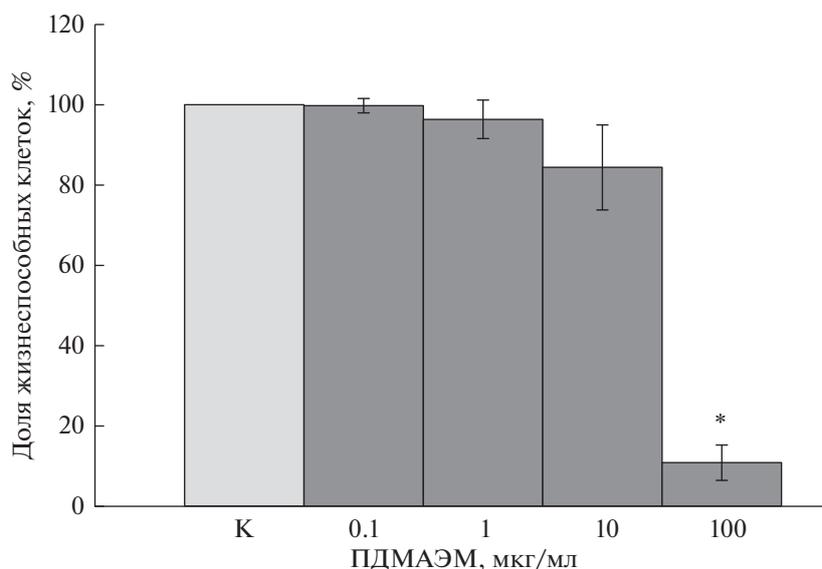


Рис. 2. Влияние поликатиона ПДМАЭМ на жизнеспособность фибробластов линии CHL V-79 RJK. Клетки культивировали в присутствии поликатиона или без него при 37°C в течение 1.5 ч. После удаления культуральной среды с полимером в лунки планшета вносили свежую питательную среду без сыворотки. Жизнеспособность клеток оценивали по активности митохондриальных дегидрогеназ с помощью МТТ-теста. Показаны средние значения и их ошибки из 4-х независимых измерений, (*) – отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

Только для максимальной из использованных концентраций ПДМАЭМ (100 мкг/мл) установлена четкая взаимосвязь между ингибированием клеточной адгезии и снижением числа жизнеспособных клеток. Т.е. сокращение числа прикрепленных клеток к субстрату при 100 мкг/мл ПДМАЭМ напрямую связано с его токсическим действием. Ранее уже показано, что ПДМАЭМ обладает токсичностью (You et al., 2007). Кроме того, установлено, что токсичность ПДМАЭМ обусловлена гибелью клеток по некротическому механизму, т.е. обработка этим поликатионом приводила к гибели клеток через повреждение клеточных мембраны, что подтверждается данными об усилении выделения цитозольного фермента ЛДГ из эндотелиальных клеток человека под действием ПДМАЭМ в концентрации от 20 до 50 мкг/мл (Laumann et al., 2009). Поликатионы полиэтиленминин и поли-L-лизин также вызывали повреждение мембран фибробластов мыши, увеличивая выделение ЛДГ соответственно на 45 и 18% (Fischer et al., 2003).

В результате проведенных нами исследований установлено, что адсорбированный на полистироловой поверхности ПДМАЭМ поддерживает адгезию фибробластов линии CHL V-79 RJK на одном уровне с контрольными значениями вне зависимости от использованной дозы поликатиона для его адсорбции на пластиковой поверхности. Предварительная обработка фибробластов ПДМАЭМ по-разному влияла на адгезию клеток к необработанному пластику. Если при малых концентрациях ПДМАЭМ практически не влиял на адгезионные свойства клеток, то дальнейшее увеличение его дозы в культуральной

среде приводило к дозозависимому ингибированию клеточной адгезии к необработанному пластику, связанному с уменьшением числа жизнеспособных фибробластов в клеточной популяции.

Эритроциты привлекают внимание исследователей в качестве объекта изучения, т.к. они обладают уникальными биологическими и биофизическими свойствами. Эритроциты, относящиеся к нерезидентным клеткам, являются наиболее важными компонентами крови, основная функция которых состоит в поддержании дыхательной активности резидентных клеток (Щербак, 2005).

При внутривенном введении синтетических полимеров и их комплексов последние непосредственно взаимодействуют с циркулирующими компонентами крови. Повреждение эритроцитов различными фармакологическими препаратами и средствами доставки последних, в том числе поликатионных полимеров, может приводить к серьезным негативным эффектам, включая гемолиз, пойкилоцитоз и др. (Боровская и др., 2010). Попадая в кровеносную систему, молекулы поликатионов в свободной или связанной форме могут взаимодействовать с клетками крови и белковыми компонентами плазмы крови (Moreau et al., 2002; Flebus et al., 2015). Поэтому в доклинических исследованиях необходимо проводить оценку токсичности полимеров, включая поликатионы, в отношении форменных элементов крови.

Гемолиз является простым и надежным способом оценки совместимости полимерных материалов с компонентами крови, индикатором цитотоксичности. В представленной работе проведен анализ влия-

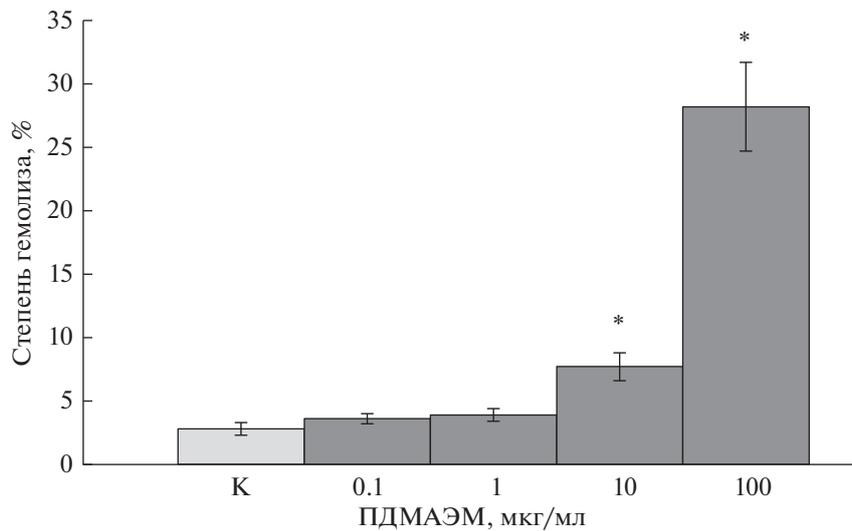


Рис. 3. Влияние поликатиона ПДМАЭМ на степень гемолиза эритроцитов человека. В суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2%) вносили ПДМАЭМ в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл на 30 мин при 37°C. Контролем служили эритроциты, не обработанные ПДМАЭМ. Степень гемолиза оценивали по величине выделившегося гемоглобина в среду инкубации. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм. Результаты представлены в % от содержания гемоглобина в эритроцитах после их полного гемолиза (см. Материал и методика). Показаны средние значения и их ошибки из 8–9 независимых измерений, (*) – отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

ния ПДМАЭМ на гемолиз эритроцитов человека. Показано, что ПДМАЭМ в зависимости от использованной дозы по-разному влиял на интенсивность гемолиза. Так, в дозах 0.1 и 1 мкг/мл ПДМАЭМ не влиял на гемолиз и полученные показатели фактически не отличались от контрольных значений. При добавлении ПДМАЭМ в суспензию эритроцитов в дозах 10 и 100 мкг/мл гемолитический эффект возрастал соответственно в 2.8 и 10 раз ($P < 0.001$) по сравнению с эритроцитами, не обработанными этим полимером (рис. 3).

Согласно данным из литературы (Moreau et al., 2002), ПДМАЭМ не оказывал значительного влияния на гемолиз эритроцитов человека. Возможно, это связано с тем, что эти авторы использовали для анализа активности полимера 40%-ную суспензию эритроцитов, в то время мы использовали суспензию эритроцитов 2.2%.

Поскольку гемолиз (выделение гемоглобина из эритроцитов во внешнюю среду) связан с нарушением целостности мембран эритроцитов, а эритроциты человека являются безъядерными клеточными формами, которые не содержат каких-либо органелл, можно с большой вероятностью утверждать, что основной мишенью токсического действия исследованного поликатиона является их мембрана.

Поэтому на следующем этапе мы исследовали влияние ПДМАЭМ на изменение формы эритроцитов (пойкилоцитоз) (Мороз и др., 2012). Обнаружено, что краткосрочная обработка эритроцитов полимером ПДМАЭМ в дозах 0.1 и 1 мкг/мл не влияла на морфологию эритроцитов, поскольку они сохраня-

ют дисковидную форму. Дальнейшее увеличение концентрации поликатиона (10 и 100 мкг/мл) в инкубационной среде приводило к резкому изменению клеточной формы эритроцитов (рис. 4) и часть из них приобретала сферическую форму. В этом случае мембрана эритроцитов становится более контрастной в поле зрения микроскопа. Другая часть популяции эритроцитов приобретала более вытянутую форму. Происходило уплощение эритроцитов с потерей дисковидной формы. Кроме того, отмечено слияние 2–3-х эритроцитов с измененной клеточной формой. Можно предположить, что при краткосрочном воздействии ПДМАЭМ на эритроциты адсорбция поликатиона на поверхности клетки вызывает структурные изменения, скорее всего, во внешней листке липидного бислоя мембраны эритроцитов, трансформируя взаимодействие компонентов цитоскелета с интегральными трансмембранными комплексами. Это приводит к запуску пойкилоцитоза и морфологическим деформациям эритроцитов.

Данные, представленные на рис. 5, показывают, что инкубация эритроцитов с ПДМАЭМ в течение 30 мин при 37°C существенно влияет на активность полимера. При инкубировании эритроцитов с ПДМАЭМ в дозах 0.1 и 1 мкг/мл незначительная часть клеточной популяции изменяла форму на эхиноцитарную. По-видимому, трансформация в эхиноцитарную форму носит обратимый характер, поскольку не приводит к увеличению гемолиза при инкубировании эритроцитов при малых дозах ПДМАЭМ. В концентрациях 10 и 100 мкг/мл ПДМАЭМ вызывал агрегирование эритроцитов с образованием крупных конгломератов. Агрегирование эритроцитов связано

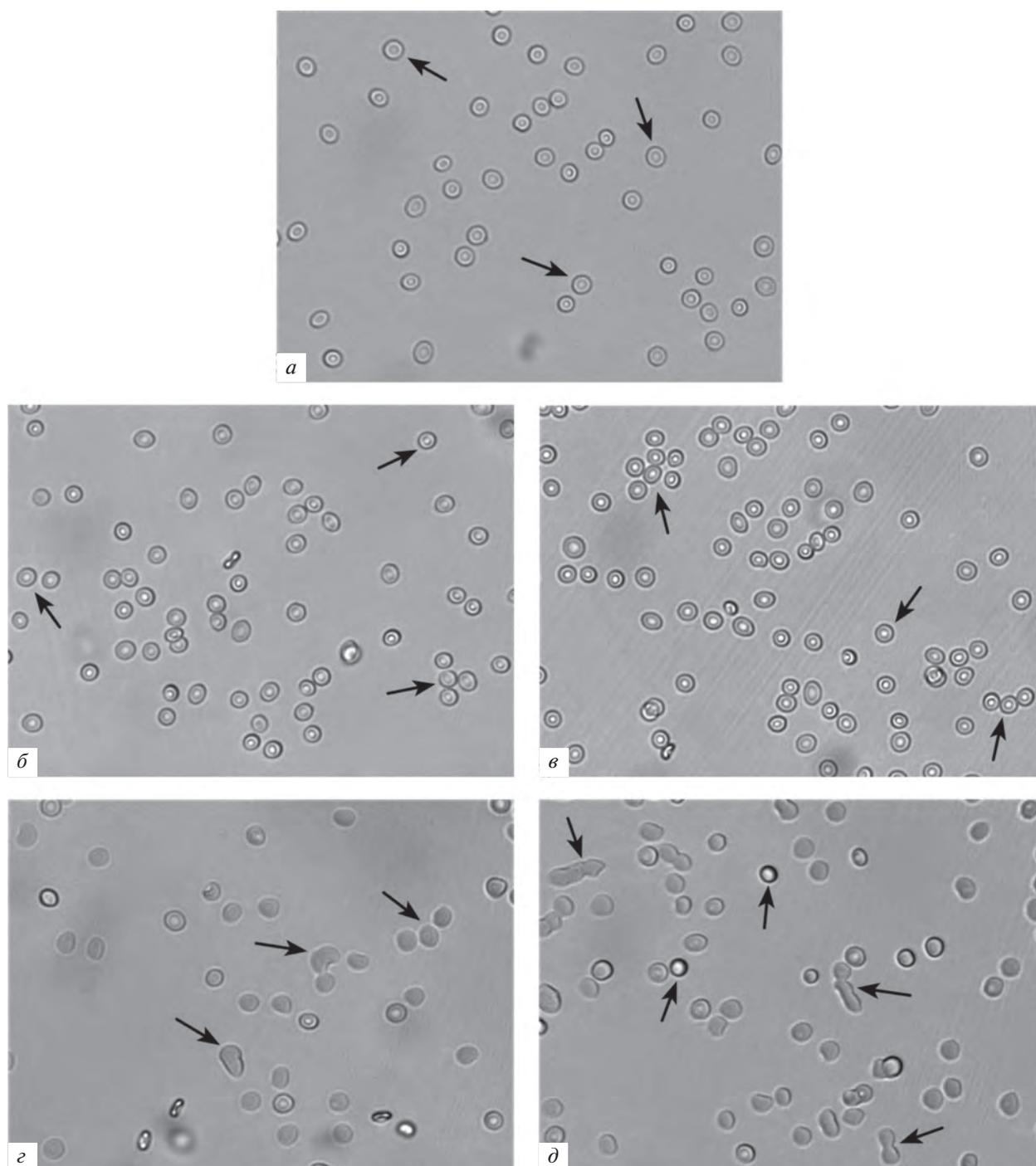


Рис. 4. Изменение формы эритроцитов человека при краткосрочном воздействии поликатиона ПДМАЭМ. *a* – Эритроциты, необработанные ПДМАЭМ (контроль); *б–д* – эритроциты, обработанные ПДМАЭМ в концентрации 0.1 (*б*), 1 (*в*), 10 (*г*) и 100 (*д*) мкг/мл. ПДМАЭМ добавляли в суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2%), разведенную PBS в 20 раз. Через 5 мин оценивали форму эритроцитов с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS2-FL (Япония), объектив 40×. Стрелками указаны дискциты (*a, б, в*), уплощение эритроцитов (*г*), сферизация эритроцитов (*д*) и слияние 2–3-х эритроцитов (*д*).

с полной или частичной потерей отрицательного заряда на их поверхности. В норме отрицательный заряд эритроцитов обеспечивает взаимное отталкивание эритроцитов, тем самым предотвращая их сближение и слипание в кровяном русле. Изменение

формы эритроцитов (потеря дисковидной формы) после обработки ПДМАЭМ приводит к увеличению контактной зоны у эритроцитов, что обуславливает ускорение процессов их агрегации. При этом прочность формирующихся агрегатов может возрастать.

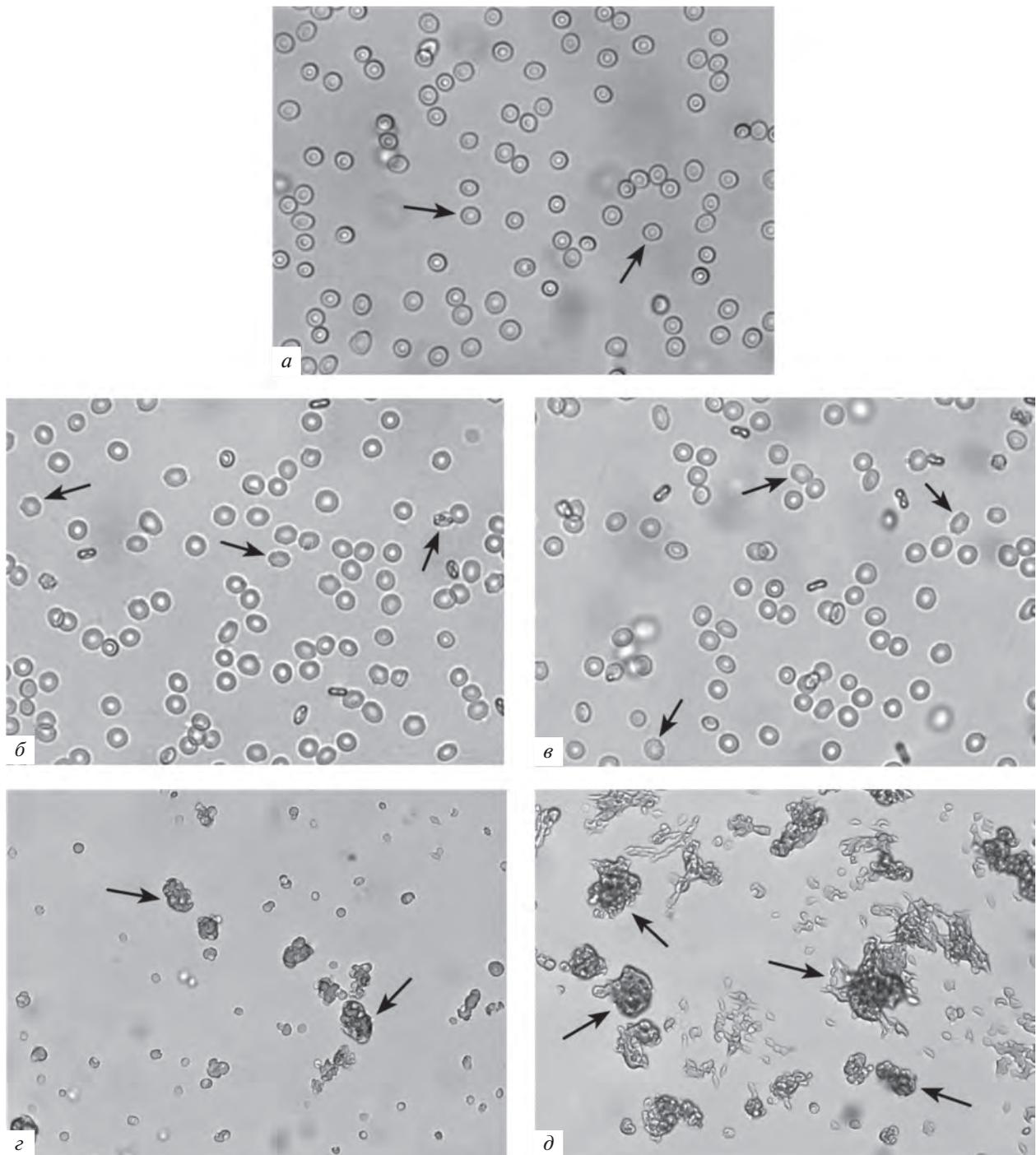


Рис. 5. Влияние поликатиона ПДМАЭМ на деформацию и агрегацию эритроцитов человека. *а* – Эритроциты, необработанные ПДМАЭМ (контроль); *б–д* – эритроциты, обработанные ПДМАЭМ в концентрации 0.1 (*б*), 1 (*в*), 10 (*г*) и 100 (*д*) мкг/мл. Поликатион добавляли в суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2%) на 30 мин при 37°C. Форму эритроцитов оценивали после разбавления суспензии эритроцитов PBS в 20 раз, используя микроскоп Nikon Eclipse TS2-FL (Япония) и объектив 20× (*г, д*) или 40× (*а–в*). Стрелками указаны дискоциты (*а*); эхиноциты (*б, в*); агрегаты эритроцитов (*г, д*).

Ранее сообщалось, что обработка эритроцитов человека поли-L-лизином, ПДМАЭМ и диэтиламиноэтил-декстраном вызывала гемагглютинацию (Moreau et al., 2002; Cerda-Cristerna et al., 2011). Авторы показали, что линейный ПДМАЭМ в концентрации

500 мкг/мл при внесении в образцы цельной крови человека вызывал образование значительных агрегатов эритроцитов в течение 15–120 мин, а при меньших дозах ПДМАЭМ не влиял на процессы агрегирования эритроцитов человека (Cerda-Cristerna et al., 2011).

Таблица 2. Влияние поликатиона ПДМАЭМ на количество эритроцитов в цельной крови человека

Концентрация поликатиона, мкг/мл	Количество эритроцитов ($\times 10^{12}/л$)
Контроль	4.64 ± 0.29
0.1	4.22 ± 0.21
1	4.32 ± 0.15
10	4.06 ± 0.10
100	3.95 ± 0.13

Примечание. Образцы цельной крови человека инкубировали с поликатионом или без него (контроль) 30 мин при 35°C. Количество эритроцитов определяли на гематологическом анализаторе МЕК-6550 (Япония). Показаны средние значения и их ошибки из 8 независимых экспериментов.

Необходимо отметить, что авторы использовали цитратную кровь, возможно, наличие цитрата Na в образцах крови снижало протонирование поликатиона, а значит и реакционную способность ПДМАЭМ в данных условиях.

Не менее важным при изучении влияния на гемосовместимость является анализ воздействия полимера на содержание эритроцитов в цельной крови. Данные, представленные в табл. 2, показывают, что при внесении в цельную кровь в дозе от 0.1 до 10 мкг/мл ПДМАЭМ не влиял на количественные показатели эритроцитов. Только в процессе инкубации образцов цельной крови с ПДМАЭМ в дозе 100 мкг/мл отмечена тенденция к уменьшению числа эритроцитов в крови по сравнению с контрольными значениями. Отсутствие влияния этого поликатиона на содержание эритроцитов в крови может быть связано с адсорбционной активностью сывороточного альбумина, на долю которого в составе белков плазмы приходится около 60% (Щербак, 2005). Альбумины, связываясь с циркулирующими в организме соединениями природного или искусственного происхождения, защищают клетки крови от повреждающего воздействия, как при физиологических, так и патологических состояниях. Поликатионы, связываясь с белками плазмы, формируют полиэлектролитные комплексы с низкой аффинностью для эритроцитов. Подобные взаимодействия могут снижать реакционную способность поликатионов в цельной крови. Известно, что плазма, добавленная в суспензию эритроцитов, частично предотвращала гемостатический эффект поликатионов за счет электростатических взаимодействий с белками плазмы (Moreau et al., 2002). Низкая гемолитическая активность линейных поликатионов (ПДМАЭМ), обнаруженная и при инкубации цельной крови человека с полимерами, объясняется адсорбционной активностью белков плазмы,

снижающей концентрацию реактивных поликатионов в крови (Cerdea-Cristerna et al., 2011).

В представленной работе показано, что ПДМАЭМ сохраняет характеристики гемосовместимости при малых концентрациях. Увеличение концентрации поликатиона в среде инкубации приводит к дозозависимому гемолизу и агрегированию отмытых эритроцитов, но не влияет на количество эритроцитов в образцах цельной крови человека. Это означает, что ПДМАЭМ сохраняет свойство гемосовместимости при его добавлении в цельную кровь *in vitro*. Это дает основание полагать, что исследованный нами ПДМАЭМ может быть использован при определенных концентрациях в качестве полимерного носителя.

Необходимо подчеркнуть, что было выявлено сходство зависимости действия ПДМАЭМ на адгезивный ответ резидентных (фибробластов) клеток и на гемолитический ответ нерезидентных (эритроцитов) клеток от использованной дозы поликатиона. При относительно малых концентрациях ПДМАЭМ практически не оказывал действия на указанные физиологические реакции фибробластов и эритроцитов. Увеличение его концентрации до 10 и 100 мкг/мл в суспензии фибробластов и эритроцитов дозозависимо ингибировало клеточную адгезию или усиливало лизис эритроцитов (см. рис. 1 и 3). Возможно, выявленная корреляция между антиадгезивными свойствами в отношении фибробластов и гемолитической активностью в отношении эритроцитов ПДМАЭМ связана с однотипным воздействием поликатиона на фибробласты и эритроциты, скорее всего на физико-химическую структуру клеточных мембран.

Известно, что поликатионы взаимодействуют с отрицательно заряженными компонентами клеточных мембран и внутриклеточными структурами (Molotkovsky et al., 2021). В качестве мембранных компонентов, с которыми может связываться поликатион, могут выступать фосфолипиды, структурирующие липидный бислой клеточных мембран, а также гликолипиды, которые благодаря сиаловым кислотам вносят существенный вклад в суммарный отрицательный заряд клетки (Крепс, 1981). У эритроцитов отрицательный поверхностный заряд в большей степени обусловлен наличием олигосахаридных цепей, связанных с гликопротеинами, в первую очередь гликофоринами, наряду с фосфолипидами и гликолипидами (Боронихина и др., 2021).

Адсорбция молекул поликатиона на клеточной мембране вызывает многоуровневое воздействие. Во-первых, происходит частичная нейтрализация поверхностного заряда клетки под действием поликатиона, что не может не изменить физико-химические свойства клетки. Во-вторых, связывание молекул поликатиона с эктодоменами сложных белковых комплексов (рецепторов, ионных каналов и др.) приводит к прямому воздействию полимера на структуру белков/комплексов, изменяя в первую очередь конфор-

мационные характеристики последних (Gao et al., 2019). Это означает, что молекулы поликатиона, изменяя характеристики белковых структур, включая локальный заряд молекулы белка, влияя и на проведение сигнала из и в клетку, тем самым оказывая опосредованное воздействие на активность клеточной/эритроцитарной популяции в целом.

В настоящее время нет единого мнения о механизме воздействия поликатионов на мембрану ядерных и безъядерных клеток (Molotkovsky et al., 2021). Предполагается, что адсорбированный на клеточной мембране поликатион, электростатически взаимодействуя с фосфатными группами фосфолипидов, вызывает трансформацию липидного бислоя, которая при критических воздействиях может приводить к образованию пор (дыр) в липидном бислое мембраны (Oku et al., 1986; Reuter et al., 2009). Перфорация клеточной мембраны приводит к неконтролируемому выходу/входу внутриклеточных/внеклеточных соединений в тканевую жидкость или кровь/клетку. Кроме того, влияние адсорбированного на клеточной мембране поликатиона может ограничиваться локальными изменениями в структуре клеточной мембраны. Например, положительно заряженные поликатионы могут вызывать ограниченную в пространстве сегрегацию липидных молекул, чаще одноименно заряженных (Oku et al., 1986; Franzin, Macdonald, 2001), что приводит к мозаичному перераспределению плотности поверхностного заряда мембраны. Одновременно может происходить локальное изменение текучести клеточной мембраны (в сторону увеличения степени жидкостности или ригидности отдельных локусов мембраны), тем самым создаются условия для регулирования процессов деформации клеточных мембран, приводящих к нарушению пластических функций плазматической мембраны у резидентных и нерезидентных клеток.

На основании полученных данных можно заключить, что ПДМАЭМ может быть использован в медицинской практике в фармакологических концентрациях 0.1 и 1 мкг/мл в качестве средств доставки лекарственных препаратов (в частности противоопухолевых или противовоспалительных), а также в качестве одного из компонентов многослойных пленок для трансплантации клеток в места повреждения тканей, осуществляя тем самым регулирование процессов клеточной адгезии и восстановление целостности ткани. При малых концентрациях ПДМАЭМ сохраняет характеристики цито- и гемосовместимости. Увеличение фармакологической дозы ПДМАЭМ во внеклеточной жидкости или в плазме крови может приводить к негативным последствиям, трансформируя физиологические функции резидентных и нерезидентных клеток млекопитающих. При этом при подборе полимерных носителей необходимо учитывать не только используемую дозу ПДМАЭМ, но и величину положительного заряда полимера, которая определяет степень нейтрализации поверхностного

заряда клеток. Модификация структуры ПДМАЭМ посредством введения дополнительных заместителей с гидрофобными/гидрофильными свойствами или с разной степенью заряженности, а также использование сополимеров ДМАЭМ с различными сомономерами позволит регулировать реакционную способность поликатиона для обеспечения оптимального уровня биосовместимости полимеров с различными типами резидентных и нерезидентных клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН № 075-00967-23-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями Комитета по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 1-04 от 7 апреля 2022 года). От здоровых доноров получали информированное согласие на работу с их кровью.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.П.И.: оригинальная идея и схема экспериментов, эксперименты, анализ и интерпретация полученных данных, написание рукописи. Л.Л.А.: культивирование фибробластов, интерпретация результатов по выживаемости фибробластов. О.В.Н.: химический синтез поликатиона ПДМАЭМ, интерпретация результатов по эритроцитам. И.В.М.: обсуждение результатов. Все авторы прочитали окончательную версию рукописи и согласились с ней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И. 2010. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. № 3. С. 334. (Borovskaya M.K., Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Koriakina L.B., Kuril'skaya T.E., Pivovarov Ju.I. 2010. Structural and functional characteristics of membrane's erythrocyte and its change at pathologies of various genesis. Byulleten' Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo Tsentra Sibirskogo Otdeleniya Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk. № 3. P. 334.)
- Боронихина Т.В., Ломановская Т.А., Яцковский А.Н. 2021. Плазмолемма эритроцитов и ее изменения в течение жизни клеток. Журн. анатомии и гистопатологии. Т. 10. № 2. С. 62. (Boronikhina T.V., Lamanovskaya T.A., Yatskovskii A.N. 2021. Erythrocyte plasmalemma and its

- changes during the cell lifespan. *Zhurnal Anatomii i Gistopatologii*. V. 10. № 2. P. 62.)
- Иванова В.П. 2023. О вариативности клеточного адгезивного ответа под воздействием родственных коротких пептидов. *Цитология*. Т. 65. № 1. С. 92. (Ivanova V.P. 2023. On the variability of cellular adhesive response under the influence of related short peptides. *Cell Tissue Biol. (Tsitologiya)*. V. 17. № 3. P. 265.)
- Иванова В.П., Гринчук Т.М., Алексеенко Л.Л., Арцыбашева И.В., Гаврилова И.И. 2010. Влияние синтетического поликатиона полиаллиламина на адгезию и жизнеспособность фибробластов китайского хомячка CHL V-79 RJK с разной степенью устойчивости к нагреву. *Цитология*. Т. 52. № 9. С. 729. (Ivanova V.P., Grinchuk T.M., Alekseenko L.L., Artsybasheva I.V., Gavrilova I.I. 2010. Effect of synthetic polycation polyallylamine on adhesion and viability of CHL V-79 RJK Chinese hamster fibroblasts with various heat resistance. *Cell Tiss. Biol.* V. 4. P. 520.)
- Иванова В.П., Ковалева З.В., Анохина В.В., Кривченко А.И. 2012. Влияние трипептидного фрагмента коллагена (GER) на адгезию и распластывание фибробластов зависит от свойств адгезивной поверхности. *Цитология*. Т. 54. № 11. С. 823. (Ivanova V.P., Kovaleva Z.V., Anokhina V.V., Krivchenko A.I. 2013. The effect of a collagen tripeptide fragment (GER) on fibroblast adhesion and spreading depends on properties of an adhesive surface. *Cell Tiss. Biol.* V. 7. P. 21.)
- Крепс Е.М. 1981. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л.: Наука. 339 с. (Kreps E.M. 1981. Lipidy kletochnykh membran. Evolyutsiya lipidov mozga. Adaptatsionnaya funktsiya lipidov (Cell membrane lipids. Evolution of brain lipids. Adaptive functions of lipids). Leningrad: Nauka. 339 pp.)
- Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. 2012. Структура и функции эритроцита в норме и при критических состояниях. *Общая реаниматология*. Т. 8. № 1. С. 52. (Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Chernysh A.M. 2012. The structure and function of a red blood cell in health and critical conditions. *Obschaya Reanimatologiya*. V. 8. № 1. P. 52.)
- Спичкина О.Г., Пинаев Г.П., Петров Ю.П. 2008. Анализ гетерогенности кератиноцитов человека, взаимодействующих с иммобилизованными фибронектином, коллагеном I и IV типов. *Цитология*. Т. 50. № 1. С. 210. (Spichkina O.G., Pinaev G.P., Petrov Y.P. 2008. Analysis of heterogeneity of human keratinocytes interacting with immobilized fibronectin and collagenes of types I and IV. *Cell Tiss. Biol.* V. 2. P. 123.)
- Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. 2007. Эритроцит: строение и функции его мембраны. *Вятский мед. вестник*. № 2-3. С. 32. (Troshkina N.A., Tsirkin V.I., Dvoryansky S.A. 2007. Erythrocyte: structure and functions of its membrane. *Vyatskii Meditsinskii Vestnik*. V. 18. № 2-3. P. 32.)
- Щербак И.Г. 2005. Биологическая химия. СПб: Изд-во СПбГМУ. 480 с. (Scherbak I.G. 2005. Biological chemistry. St.Petersburg: SPbSMU. 480 p.)
- Вацáková L., Filová E., Rypáček F., Švorčík V., Starý V. 2004. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol. Rev.* V. 53. P. 35.
- Boura C., Muller S., Vautier D., Dumas D., Schaal P., Voegel J.C., Stoltz J.F., Menu P. 2005. Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*. V. 26. P. 4568.
- Cerda-Cristerna B.I., Flores H., Pozos-Guillén A., Pérez E., Sevrin C., Grandfils C. 2011. Hemocompatibility assessment of poly(2-dimethylamino ethylmethacrylate) (PDMAEMA)-based polymers. *J. Control. Release*. V. 153. P. 269.
- 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*. V. 24. P. 1121.
- Flebus L., Lombart F., Sevrin C., Defraigne J.O., Peters P., Parhamifar L., Molin D.G.M., Grandfils C. 2015. Low molecular weight (2-dimethylamino ethylmethacrylate) polymers with controlled positioned fluorescent labeling: Synthesis, characterization and *in vitro* interaction with human endothelial cells. *Int. J. Pharmaceut.* V. 478. P. 278.
- Franzin C.M., Macdonald P.M. 2001. Polylysine-induced ^2H NMR-observable domains in phosphatidylserine/phosphatidylcholine lipid bilayers. *Biophys. J.* V. 81. P. 3346.
- Gao S., Holkar A., Srivastava S. 2019. Protein-polyelectrolyte complexes and micellar assemblies. *Polymers*. V. 11. 1097. <https://doi.org/10.3390/polym11071097>
- Gribova V., Auzely-Velty R., Picart C. 2012. Polyelectrolyte multilayer assemblies on materials surfaces: From cell adhesion to tissue engineering. *Chem. Mater.* V. 24. P. 854.
- Humphries I.D., Byron A., Humphries M.J. 2006. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* V. 119. P. 3901.
- Iwamoto D.V., Calderwood D.A. 2015. Regulation of integrin-mediated adhesion. *Cur. Opin. Cell Biol.* V. 36. P. 41.
- Jacobson F., Baraniskin A., Mertens J., Mittler D., Mohammadi-Tabrisi A., Schubert S., Soltau M., Lehnhardt M., Behnke B., Gatermann S., Steinau H.U., Steinstraesser L. 2005. Activity of histone H1.2 in infected burn wounds. *J. Antimicrob. Chemother.* V. 55. P. 735.
- Keely S., Rullay A., Wilson C., Carmichael A., Carrington S., Corfield A., Haddleton D.M., Brayden D.J. 2005. *In vitro* and *ex vivo* intestinal tissue models to measure mucoadhesion of poly(methacrylate) and N-trimethylated chitosan polymers. *Pharmac. Res.* V. 22. P. 38.
- Keely S., Ryan S., Haddleton D.M., Limer A., Murphy E.P., Colgan S.P., Brayden D.J. 2009. Dexamethasone-poly(dimethylamino)ethyl methacrylate (pDMAEMA) conjugates reduce inflammatory biomaterials in human intestinal epithelial monolayers. *J. Control. Release*. V. 135. P. 35.
- Layman J.M., Ramirez S.M., Green M.D., Long T.E. 2009. Influence of polycation molecular weight on poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)-mediated DNA delivery *in vitro*. *Biomacromol.* V. 10. P. 1244.

- Lelong I.H., Petegnief V., Rebel G. 1992. Neuronal cells mature faster on polyethyleneimine coated plates than on polylysine coated plates. *J. Neurosci. Res.* V. 32. P. 562.
- Lutolf M.P., Hubbell J.A. 2003. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis and tissue engineering. *Nature Biotechnol.* V. 23. P. 47.
- Ly H., Zhang S., Wang B., Cui S., Yan J. 2006. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release.* V. 114. P. 100.
- Madaan K., Kumar S., Poonia N., Lather V., Pandita D. 2014. Dendrimers in drug delivery and targeting: drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J. Pharmacy Bioall. Sci.* V. 6. P. 139.
- Molotkovsky R.J., Galimzyanov T.R., Ermakov Y.A. 2021. Heterogeneity in lateral distribution of polycations at the surface of lipid membranes: from the experimental data to the theoretical model. *Materials.* V. 14. 6623.
<https://doi.org/10.3390/ma14216623>
- Monnery B.D., Wright M., Cavill R., Hoogenboom R., Shaunak S., Steinke J.H.G., Thanou M. 2017. Cytotoxicity of polycations: relationship of molecular weight and the hydrolytic theory of the mechanism of toxicity. *Int. J. Pharm.* V. 521. P. 249.
- 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.* V. 10. P. 161.
- Moreau E., Ferrari I., Drochon A., Chapon P., Vert M., Domurado D. 2000. Interactions between red blood cells and a lethal, partly quarternized tertiary polyamine. *J. Control. Release.* V. 64. P. 115.
- Niks M., Otto M. 1990. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Meth.* V. 130. P. 149.
- Oku N., Yamaguchi Na, Yamaguchi No, Shibamoto S., Tto F., Nango M. 1986. The fusogenic effect of synthetic polymers on negatively charged lipid bilayers. *J. Biochem.* V. 100. P. 935.
- Phillips D.J., Harrison J., Richards S.J., Mitchell D.E., Tichauer E., Hubbard A.T.M., Guy C., Portman I.H., Fullam E. 2017. Evaluation of the antimicrobial activity of cationic polymers against Mycobacteria: toward antitubercular macromolecules. *Biomacromol.* V. 18. P. 1592.
- Putnam D., Gentry C.A., Pack D.W., Langer R. 2001. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 98. P. 1200.
- Ravichandran R., Sundarajan S., Venugopal J.R., Mukherjee S., Ramakrishna S. 2012. Advances in polymeric systems for tissue engineering and biochemical applications. *Macromol. Biosci.* V. 12. P. 286.
- Rawlinson L.A., Ryan S.M., Mantovani G., Syrett J.A., Haddleton D.M., Brayden D.J. 2010. Antibacterial effects of poly(2-dimethylamino ethyl) methacrylate against selected gram-positive and gram-negative bacteria. *Biomacromol.* V. 11. P. 443.
- 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.* V. 144. P. 27.
- Rihová B., Kovár L., Kovár M., Hovorka O. 2009. Cytotoxicity and immunostimulation: double attack on cancer cells with polymeric therapeutics. *Trends Biotechnol.* V. 27. P. 11.
- Rosa M.D., Carteni M., Petillo O., Calarco A., Margarucci S., Rosso F., Rosa A.D., Farina E., Grippo P., Peluso G. 2004. Cationic polyelectrolyte hydrogel fosters fibroblast spreading, proliferation and extracellular matrix production: Implication for tissue engineering. *J. Cell Physiol.* V. 198. P. 133.
- Samal S.K., Dash M., Vlierberghe van S., Kaplan D.L., Chellini E., Blitterswijk van C., Moroni L., Dubruel P. 2012. Cationic polymers and their therapeutic potential. *Chem. Soc. Rev.* V. 41. P. 7147.
- Santiago L.Y., Nowak R.W., Rubin J.P., Marra K.G. 2006. Peptide-surface modification of poly(caprolactone) with laminin-derived sequences for adipose-derived stem cell application. *J. Biomaterials.* V. 27. P. 2962.
- Schwieger C., Blume A. 2009. Interaction of poly-L-arginine with negatively charged DPPG membranes: calorimetric and monolayer studies. *Biomacromol.* V. 10. P. 2152.
- Soravia V., Toca-Herrera J.L. 2009. Substrate influence on cell shape and cell mechanics: Hep G2 cells spread on positively charged surfaces. *Microsc. Res. Tech.* V. 72. P. 957.
- Stawski D., Rolińska K., Zielińska D., Sahariah P., Hjalmsdóttir M.A., Måsson M. 2022. Antibacterial properties of poly (NN-dimethylaminoethyl methacrylate) obtained at different initiator concentrations in solution polymerization. *R. Soc. Open Sci.* V. 9. 211367.
<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c5764223>
- Tanasienko I.V., Yemets A.I., Finiuk N.S., Stoiko R.P., Blume Y.B. 2015. DMAEM-based cationic polymers as novel carriers for DNA delivery into cells. *Cell Biol. Int.* V. 39. P. 243.
- Thompson M.T., Berg M.C., Tobias I.S., Lichter J.A., Rubner M.F., Vliet van K.J. 2006. Biochemical functionalization of polymeric cell substrata can alter mechanical compliance. *Biomacromol.* V. 7. P. 1990.
- Tsai W.B., Chen R.P.Y., Wei K.L., Chen Y.R., Liao T.Y., Liu H.L., Lai J.Y. 2009. Polyelectrolyte multilayer films functionalized with peptides for promoting osteoblast functions. *Acta Biomaterialia.* V. 5. P. 3467.
- Vanha A.R., Govindaraju S., Parsa K.V.L., Jasti M., Gonzalez-Garcia M., Ballester R.P. 2004. Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC Biotechnology.* V. 4. 23.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-23>
- VanderVondele S., Vörös J., Hubbell J.A. 2003. RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnol. Bioeng.* V. 82. P. 784.
- Xie B., Du K., Huang F., Lin Z., Wu L. 2022. Cationic nanomaterials for autoimmune diseases therapy. *Front. Pharmacol.* V. 12. 762362.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.762362>
- You Y.Z., Manickam D.S., Zhou Q.H., Oupicky D. 2007. Reducible poly (2-dimethylaminoethyl methacrylate): synthesis, cytotoxicity, and gene delivery activity. *J. Control. Release.* V. 122. P. 217.

The Effect of Synthetic Polycation Poly-2-Dimethylaminoethylmethacrylate on Biological Activity of Mammalian Resident and Nonresident Cells

V. P. Ivanova^{a, *}, L. L. Alekseenko^b, O. V. Nazarova^c, and I. V. Mindukshev^a

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia*

^b *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

^c *Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia*

*E-mail: valet@iephb.ru

Cationic polymers are the positively charged macromolecules that have in their structure N-containing functional groups such as primary, secondary and tertiary amine groups; quaternary ammonium groups and others. The effect of synthetic polycation poly-2-dimethylaminoethylmethacrylate (PDMAEM) on biological activity of animal fibroblasts (CHL V-79 RJK) and human red blood cells (RBCs) was studied. The influence of PDMAEM on cell adhesion using fibroblast culture was analyzed. Cultural plastic treated or untreated by polycation was used as substrate. The polycation adsorption on polystyrene surface did not change the adhesive capacity of fibroblasts. Pretreatment of fibroblasts with PDMAEM did not influence at low concentrations (0.1 and 1 µg/mL) the adhesive properties of cells plated on the untreated plastic surface. At high concentrations (10 and 100 µg/mL) PDMAEM inhibited the attachment of fibroblasts to this substrate. Relationship between the inhibition of cell adhesion under PDMAEM action and the toxic effect on fibroblast viability has been found. The PDMAEM treatment of human RBCs at high doses led to the damage of cells and release of hemoglobin to incubation medium. At low doses PDMAEM practically did not influence the hemolysis of RBCs. It was shown that PDMAEM induced the change of the shape and aggregation of RBCs. The toxic effect of PDMAEM on human RBCs coincided as a whole with such effect for animal fibroblasts. Possible cell targets upon the PDMAEM effect are discussed.

Keywords: synthetic polycation, adhesion, cytotoxicity, hemolysis, aggregation, fibroblasts, red blood cells