

УДК 612.111:541.6:541.69

ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ КВАТЕРНИЗОВАННОГО ПОЛИ-2-ДИМЕТИЛАМИНОЭТИЛМЕТАКРИЛАТА

© 2025 г. В. П. Иванова^{1, *}, О. В. Назарова², Ю. И. Золотова²

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

² Филиал Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» —
Институт высокомолекулярных соединений, Санкт-Петербург, 199004, Россия
*E-mail: valet@iephb.ru

Поступила в редакцию 16.05.2025

После доработки 11.06.2025

Принята к публикации 12.06.2025

Обоснование и цель. Кватернизованные поликатионы используются не только для переноса генетического материала и фармакологических препаратов в клетки, но и в качестве эффективных антимикробных агентов. Катионный сополимер 2-диметиламиноэтилметакрилат (ДМАЭМ) с N, N-диметил-N-октил-метакрилоилоксиэтиламмоний йодидом (ДМОАЭМ) содержит третичные аминогруппы и четвертичные аммонийные группы. **Цель работы** — изучить влияние катионного сополимера ДМАЭМ-ДМОАЭМ на функции эритроцитов человека. **Методы.** Использовали методы химического синтеза поликатиона, спектральные, проточной цитометрии и микроскопического анализа. **Результаты.** Показано, что октилированный поликатион при малых концентрациях (0.1 и 1 мкг/мл) не вызывает лизис и агрегацию эритроцитов. Увеличение концентрации поликатиона (до 10 и 100 мкг/мл) приводило к усилению гемолиза и агрегации эритроцитов с максимальным гемотоксическим эффектом при обработке клеток полимером в дозе 100 мкг/мл. Поликатион (в дозе от 0.1 до 100 мкг/мл) не оказывал токсического действия на эритроциты человека в образцах цельной крови. Показано, что обработка отмытых эритроцитов бычьим сывороточным альбумином (БСА) приводила к полному или частичному ингибированию гемолитического эффекта, индуцированного поликатионом в дозе 10 и 100 мкг/мл. Влияние БСА на агрегационные процессы, индуцированные поликатионом, зависело от использованной концентрации полимера. Установлено, что БСА практически полностью ингибировал агрегацию эритроцитов, обработанных кватернизованным поли-ДМАЭМ в дозе 10 мкг/мл, но не компенсировал агрегационный эффект, индуцированный полимером в дозе 100 мкг/мл. **Выводы.** Процесс кватернизации молекул поликатионов является перспективным инструментом для трансформации характеристик полимерных соединений. Полученные данные расширяют существующие представления о структурно-функциональных связях у катионных полимеров.

Ключевые слова: кватернизованный поликатион, сывороточный альбумин, гемосовместимость, эритроциты

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин; ДМАЭМ — 2-диметиламиноэтилметакрилат; ДМОАЭМ — N, N-диметил-N-октил-метакрилоилоксиэтиламмоний йодид; ПДМАЭМ — поли-2-диметиламиноэтилметакрилат.

DOI: 10.7868/S3034606125030064

Полиэлектролитные системы можно использовать в тканевой инженерии в качестве имплантируемого материала, содержащего или не содержащего клеточный материал, и (или) в качестве средств адресной доставки различных фармакологических препаратов к клеткам-мишеням (Leclercq et al., 2003; Meka et al., 2017; Potaś, Winnicka, 2022; Lim et al., 2024). Многофункциональные полимерные комплексы содержат положительно заряженные (катионные) и отрицательно заряженные (ани-

онные) макромолекулы, создающие структурную основу подобных комплексов (Lim et al., 2024). При изменении внутренних и внешних параметров в процессе взаимодействия с электролитами и различными белками могут проходить частичная диссоциация или разрушение полимерного комплекса с выходом компонентов этой системы во внешнюю среду (межклеточное пространство) с последующим поступлением этих фрагментов в кровотоки или непосредственно в кровь.

Клетки крови, являясь наиболее чувствительными клеточными элементами, первыми реагируют на воздействие любых чужеродных для организма соединений и комплексов, попавших в кровотоки. В связи с этим оценка гемосовместимости синтетических полимерных материалов остается одной из важнейших для характеристики биополимерных соединений, которые в перспективе могут быть использованы в биомедицинской практике.

Поликатионы объединяют обширную группу полимеров, различающихся по химическому строению основной цепи и боковых групп (Samal et al., 2012). Индивидуальные структурные особенности любого поликатиона, включая природу, число катионных групп и архитектуру полимера, обуславливают специфику воздействия полимера на клетку и клеточную популяцию в целом. Поликатионы характеризуются наличием первичных, вторичных или третичных аминогрупп. В качестве катионных групп могут использоваться четвертичные (кватернизованные аммонийные центры), образованные введением алкильных групп, ковалентно связанных с атомом азота (Rapport et al., 2023; Terper et al., 2023).

Поликатионы, содержащие четвертичные аммонийные группы, образуют комплексы как с молекулами ДНК (Thomas, Klibanov, 2002; Kainthan et al., 2006; Slita et al., 2007; Haladjova et al., 2021), так и с гидрофобными лекарственными препаратами (Kafetzi, Pispas, 2021) и потому могут использоваться для переноса генетического материала и фармакологических препаратов в клетки-мишени. Трансфекционная активность подобных комплексов с нуклеиновыми кислотами либо уступала таковой поликатионов с первичными

аминогруппами в боковой цепи (Thomas, Klibanov, 2002; Slita et al., 2007), либо превышала таковую исходного некватернизованного поликатиона (Thomas, Klibanov, 2002; Haladjova et al., 2021). Кроме того, полимеры, содержащие четвертичные аммонийные группы, обладают выраженной антибактериальной активностью (Jiao et al., 2017; Manouras et al., 2021; Terper et al., 2023; Santoro, Izzo, 2024).

В предлагаемой работе изучали воздействие катионного сополимера 2-диметиламиноэтилметакрилата с N, N-диметил-N-октилметакрилоилоксиэтиламмоний йодидом [поли-(ДМАЭМ-ДМОАЭМ)], содержащего третичные аминогруппы и четвертичные аммонийные группы, на некоторые морфофункциональные характеристики эритроцитов человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Синтез полимеров. Поли-2-диметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМ) (рис. 1, I) получали методом радикальной полимеризации мономера ДМАЭМ (Sigma-Aldrich, Германия) в 10 %-ном растворе N, N-диметилформаида (ДМФА) (Sigma-Aldrich, Германия) при 60 °C в течение 24 ч с использованием в качестве инициатора 2,2'-азо-бис-изобутиронитрила. Для удаления низкомолекулярных примесей полученный полимер подвергали диализу против воды. Использовали диализные мембраны Spectra/Por 7 (Spectrum Lab. Inc., США), позволяющие удалять соединения с молекулярной массой $M \leq 1000$. Из водного раствора полимер выделяли методом лиофильной сушки. С выходом 75 % получен полимер с массой,

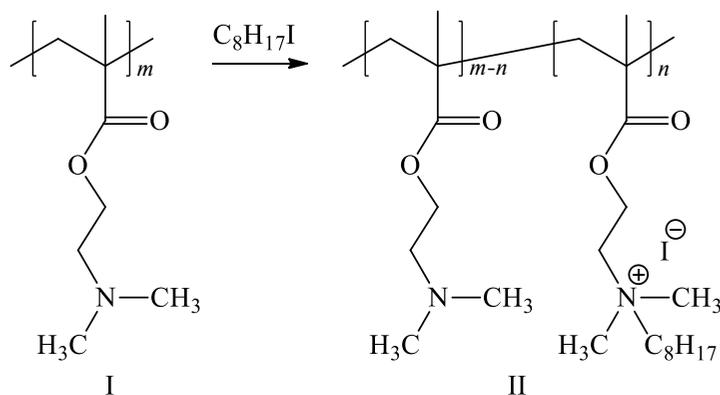


Рис. 1. Схема синтеза и структура сополимера N, N-диметиламиноэтилметакрилата с N, N-диметил-N-октилметакрилоилоксиэтиламмоний йодидом [поли-(ДМАЭМ-ДМОАЭМ)]. I – ПДМАЭМ, II – поли-(ДМАЭМ-ДМОАЭМ).

равной 28 000. Молекулярная масса ПДМАЭМ определена методом диффузии и седиментации.

Алкилированием ПДМАЭМ в растворе ДМФА при 100 °С в течение 6 ч йодистым октилом (Merck, Германия) синтезирован сополимер ДМАЭМ с N, N-диметил-N-октил-метакрилоилоксиэтиламмоний йодидом (ДМОАЭМ) (рис. 1, II).

Полимер выделяли осаждением и многократным переосаждением в диэтиловый эфир. Выход полимера после сушки в вакууме составил 82 %. По данным ¹H ЯМР- спектроскопии и аргентометрического потенциометрического титрования, он содержал 14 мол. % звеньев ДМОАЭМ.

Выделение эритроцитов. В работе использовали венозную кровь здоровых доноров. Кровь стабилизировали добавлением антикоагулянта [2 мМ EGTA (Sigma, США)]. Эритроциты дважды промывали PBS (Sigma, США) (pH 7.4) и ресуспендировали в том же буфере или в буфере, содержащем 10 или 40 мг/мл бычьего сывороточного альбумина БСА (Sigma, США), для получения суспензии эритроцитов (гематокрит 2.2–2.3 %). Количество эритроцитов контролировали с помощью гематологического анализатора Medonic-M20 (Boule Medical A. B., Швеция).

Определение гематологических параметров в суспензии эритроцитов. В пробы суспензии отмытых эритроцитов (гематокрит 2.2 %) вносили исследуемый препарат в концентрации от 0.1 до 10 мкг/мл и инкубировали в течение 5, 10 и 15 мин при 37 °С. После каждого указанного отрезка времени фиксировали гематологические показатели у эритроцитов, подвергнутых воздействию определенной дозой полимера, используя гематологический анализатор Medonic-M20 (Boule Medical A. B., Швеция). Контролем служили образцы суспензии эритроцитов без добавления поликатиона.

Определение гематологических параметров в цельной крови. В образцы цельной крови добавляли поликатион в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл и инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем проводили измерение гематологических показателей в указанных пробах, используя гематологический анализатор Medonic-M20 (Boule Medical A. B., Швеция). Контролем служили образцы цельной крови без добавления поликатиона.

Гемолиз эритроцитов. Гемолитическую активность полимера оценивали по модифицированному методу (Jacobson et al., 2005). Суспензию отмытых эритроцитов в различных буферах (гематокрит 2.2 %) инкубировали с различными кон-

центрациями полимера (от 0.1 до 100 мкг/мл) или без полимера 30 мин при 37 °С. Степень гемолиза оценивали по величине выделившегося гемоглобина в среду инкубации. Количество выделенного гемоглобина оценивали по оптической плотности, которую измеряли при длине волны 540 нм, используя мультимодальный планшетный ридер Clariostar Plus (BMG Labtech, Германия). Полный лизис эритроцитов получали после добавления в суспензию эритроцитов 1 %-ного раствора тритона X-100 (Merck, Германия). Результаты выражали в процентах от содержания гемоглобина в эритроцитах после их полного лизиса.

Анализ морфологической трансформации эритроцитов. Для изучения действия поликатиона на морфологию эритроцитов использовали суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2 %), разведенную PBS в 20 раз. Отмытые эритроциты инкубировали 30 мин при 37 °С в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл. Эритроциты, обработанные поликатионом, переносили в 96-луночный планшет и анализировали их морфологию с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS2-FL (Nikon, Япония), оснащенного фотокамерой Retiga R1 (Cairn, Великобритания). В экспериментах использовали объективы 20× и 40×.

Агрегация эритроцитов. Распределение эритроцитов и их агрегатов оценивали с помощью проточной цитометрии, используя цитометр CytoFLEX (Beckman Coulter, США). В каждом образце учитывали не менее 10 000 событий.

Суспензию эритроцитов в PBS или буфере, содержащем 10 или 40 мг/мл БСА, (гематокрит 2.2–2.3 %) инкубировали с поликатионом в тех же концентрациях или без него 30 мин при 37 °С. Затем инкубированную суспензию разводили в 30 раз. Полученные пробы анализировали на проточном цитометре, регистрируя комбинацию прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния клеточными элементами в пробе. Регистрация интенсивности прямого и бокового светорассеяния позволяет судить о размерах и степени гранулярности эритроцитов в пробе. Точечная диаграмма показывает плотность распределения имеющихся в пробе популяций эритроцитов и их агрегатов. Популяции агрегированных и не агрегированных эритроцитов выражали в процентном соотношении от общего числа зарегистрированных событий.

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

В последнее время большое внимание уделяется изучению поликатионов, в состав которых входят четвертичные аммонийные группы, ввиду их высокой реакционной способности (Терег et al., 2023). Процесс трансформации третичных аминогрупп за счет присоединения по атому азота алкильных групп в четвертичные аминогруппы (или аммонийные группы) называется кватернизацией молекулы полимера. В представленной работе исследовали гемосовместимость катионного сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ, который содержит как третичные аминогруппы, так и четвертичные аммонийные группы (за счет введения октилового заместителя у атома азота) в боковых радикалах полимера (рис. 1). Далее в тексте используется название поликатиона – сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ.

На первом этапе проводили анализ влияния сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ на некоторые гематологические параметры, такие как количество эритроцитов, гематокрит, средний объем эритроцита и ширина распределения эритроцитов (Агеева и др., 2014).

Для выявления краткосрочных эффектов сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ на указанные ранее параметры в суспензию отмытых эритроцитов человека вносили полимер в концентрации от 0.1 до 10 мкг/мл и инкубировали при 37 °С в течение 5, 10 и 15 мин. После каждого указанного отрезка времени фиксировали гематологические показатели у эритроцитов, подвергнутых воздействию определенной дозы полимера, с помощью гематологического анализатора.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что обработка эритроцитов сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ приводит к уменьшению количества эритроцитов в клеточной популяции. Уменьшение числа эритроцитов в суспензии наблюдали при добавлении полимера в концентрации 1 мкг/мл уже на 5-й мин, которое сохранялось неизменным на протяжении 10 и 15 мин обработки клеток полимером. В концентрации 10 мкг/мл сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ вызывал более сильный эффект по сравнению с дозой 1 мкг/мл,

уменьшая популяцию эритроцитов, при этом с увеличением времени инкубации суспензии эритроцитов с полимером степень сокращения количества клеток возрастала.

Гематокрит, как известно, связан с содержанием эритроцитов (Агеева и др., 2014). При обработке эритроцитов сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ отмечается общая тенденция к уменьшению этого показателя при всех использованных концентрациях полимера, что связано с сокращением числа эритроцитов в клеточной суспензии после воздействия этого поликатиона (см. табл. 1).

Оценить размеры эритроцитов после воздействия сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ можно с помощью определенных эритроцитарных индексов, определяемых гематологическим анализатором. Средний объем эритроцита позволяет судить в первом приближении об изменении размера эритроцита (Агеева и др., 2014). Установлено, что полимер в дозах 0.1 и 1 мкг/мл не влиял на объем эритроцитов во всех временных интервалах. Но в концентрации 10 мкг/мл выявлено увеличение среднего объема эритроцита после 10- и 15-минутной обработки клеток сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ в 1.11 раза ($P < 0.05$ и $P < 0.01$) по сравнению с контрольными клетками (см. табл. 1). Увеличение среднего размера эритроцита, в результате воздействия исследованного поликатиона, может быть связано с разрушением части популяции эритроцитов с меньшими размерами, которые, как известно, являются менее устойчивыми к различным внешним воздействиям. Кроме того, полученный нами эффект можно объяснить процессом образования клеточных агрегатов. Формирующиеся агрегаты на гематологическом анализаторе могут интерпретироваться как отдельная крупная клеточная единица.

Индекс ширина распределения эритроцитов оценивает вариабельность размеров эритроцитов и показывает, насколько размер эритроцита отклоняется от среднего значения. Согласно полученным нами данным, сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ не изменял этот показатель в дозах 0.1 и 1 мкг/мл, а в дозе 10 мкг/мл вызывал значительный рост этого индекса в 1.48 ($P < 0.01$) и 1.56 ($P < 0.001$) раза после 10- и 15-минутной инкубации клеток с полимером соответственно (см. табл. 1).

Как правило, более высокое значение ширины распределения эритроцитов означает, что эритроциты в популяции значительно отличаются по размеру. В данном случае большая вариабельность

Таблица 1. Влияние сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ на содержание и индексы эритроцитов человека

Гематологический показатель	Величина показателя при концентрации сополимера, мкг/мл												
	0			0.1			1			10			
	Время инкубации, мин												
Число эритроцитов, $10^{12}/л$	0 (контроль)	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
	0.268 ± 0.003	0.257 ± 0.004	0.260 ± 0.003	0.256 ± 0.005	$0.255^a \pm 0.003$	$0.254^a \pm 0.004$	$0.255^a \pm 0.005$	$0.149^b \pm 0.014$	$0.121^c \pm 0.018$	$0.117^c \pm 0.020$			
Средний объем эритроцита, фл	83.71 ± 0.58	83.71 ± 0.62	83.45 ± 0.71	82.79 ± 0.67	83.65 ± 0.75	83.71 ± 0.70	83.64 ± 0.57	98.60 ± 7.55 $n = 3^{\#}$	$93.27^a \pm 2.45$ $n = 3^{\#}$	$93.33^b \pm 1.13$ $n = 3^{\#}$			
Гематокрит, %	2.22 ± 0.02	2.12 ± 0.04	2.17 ± 0.03	2.11 ± 0.04	2.13 ± 0.04	2.13 ± 0.05	2.12 ± 0.04	1.93 ± 0.14 $n = 3^{\#}$	1.96 ± 0.07 $n = 3^{\#}$	1.96 ± 0.08 $n = 3^{\#}$			
Ширина распределения эритроцитов, %	16.28 ± 0.36	16.17 ± 0.17	16.42 ± 0.22	15.96 ± 0.38	16.32 ± 0.29	16.19 ± 0.29	16.84 ± 0.35	28.93 ± 5.54 $n = 3^{\#}$	$24.10^b \pm 1.20$ $n = 3^{\#}$	$25.53^b \pm 0.63$ $n = 3^{\#}$			

Примечание. В суспензию эритроцитов добавляли сополимер (0.1–10 мкг/мл) и инкубировали 5, 10 или 15 мин при 37 °С. Контролем служили клетки без добавления сополимера. Показаны средние значения и их ошибки из 11 независимых экспериментов. Отличия от контроля достоверны при (a) – $P < 0.05$, (b) – $P < 0.001$, (c) – $P < 0.01$; для всех случаев, кроме указанных в таблице, $n = 11$. (#) – Часть гематологических параметров в пробах эритроцитов из-за снижения количества клеток не фиксировалась анализатором.

в размерах эритроцитов под действием сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ может быть связана с процессами агрегирования эритроцитов, при этом степень агрегации может варьировать, а это означает, что размеры агрегатов тоже могут изменяться в сторону увеличения размера условного эритроцита, который и фиксируется прибором.

Данные, полученные на первом этапе исследования, свидетельствуют о том, что катионный сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ при определенных условиях, возможно, вызывает как гибель эритроцитов, так и их агрегацию. Чтобы подтвердить или опровергнуть выдвинутое предположение, нами проведен анализ влияния этого полимера на гемолиз и морфологическую трансформацию эритроцитов человека.

Как уже упоминалось, для использования поликатионов в медицинской практике необходимо проводить анализ гемолитической активности подобных синтетических материалов. Лизис эритроцитов, фиксируемый по выделению гемоглобина из клеток, указывает на повреждение целостности мембраны эритроцитов. Установлено, что после 30-минутной инкубации отмытых эритроцитов при 37 °С сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ в дозах 0.1 и 1 мкг/мл практически не оказывал влияния на лизис эритроцитов (рис. 2). Дальнейшее увеличение полимера в среде инкубации приводило к интенсификации процесса гемолиза эритроцитов. Так, при концентрациях 10 и 100 мкг/мл сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ ускорял лизис эритроцитов соответственно в 7.7 и 26.9 раза ($P < 0.001$) по сравнению с контрольными клетками.

Ранее нами показано (Иванова и др., 2023), что гомополимер ПДМАЭМ также вызывал лизис эритроцитов человека в дозах 10 и 100 мкг/мл, как и изученный в данной работе сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ. Однако степень воздействия на эритроциты человека у сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ была выше, чем у гомополимера ПДМАЭМ. Катионный сополимер увеличивал степень гемолиза эритроцитов в сравнении с таковым под действием ПДМАЭМ при обеих токсических дозах приблизительно в равной степени (соответственно в 1.9 и 1.8 раза). Очевидно, что столь выраженная гемолитическая активность сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ обусловлена наличием в его структуре гидрофобной октиловой группы, связанной с атомом азота (см. рис. 1).

Имеющиеся малочисленные источники свидетельствуют о том, что действие кватернизованных

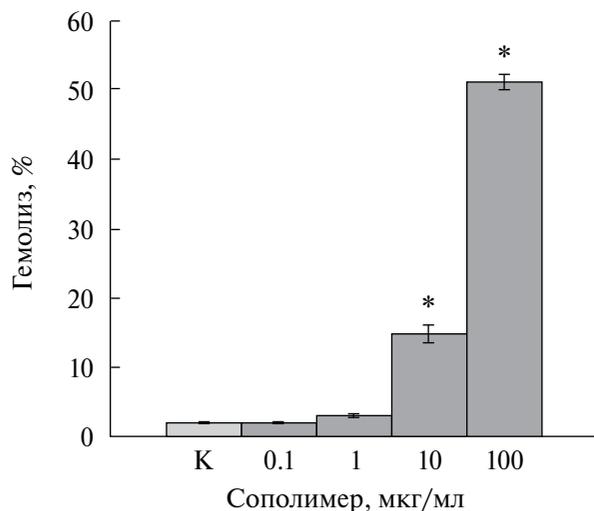


Рис. 2. Влияние сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ на гемолиз эритроцитов человека. Пробы суспензии эритроцитов инкубировали в PBS в присутствии сополимера (от 0.1 до 100 мкг/мл) 30 мин при 37 °С. Контролем служили клетки, не обработанные поликатионом. Степень гемолиза оценивали по величине выделившегося гемоглобина в среду инкубации. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм. Результаты, представленные в процентах от содержания гемоглобина в эритроцитах после их полного гемолиза, показаны в виде средних значений и их ошибок из 10 независимых измерений. (*) – отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

поликатионов на лизис эритроцитов не однозначный. Наряду с сообщениями об индукции гемолиза эритроцитов под действием подобных поликатионов, были получены данные об отсутствии у кватернизованных поликатионов повреждающего действия на эритроциты. Так, кватернизованный полимер 2-метакрилоилоксиэтилтриметиламмоний не оказывал гемолитического действия на эритроциты барана (Naktaniyan et al., 2023). С одной стороны, более сложные катионные макромолекулы, представляющие собой амфифильные блок-сополимеры, в состав которых входят кватернизованный ДМАЭМ, гидрофобный блок бутилметакрилат и блок метакрилата, связанный с D-глюкозамином, практически не оказывали влияния на лизис эритроцитов человека (Alvarez-Raino et al., 2014). С другой стороны, частично кватернизованный поли-тио-2-диэтиламинотетилэтилен (Q-ПТДАЭ), состоящий из двух катионных повторяющихся единиц, содержащих третичные аминогруппы или четвертичные аммонийные группы, вызывал значительный лизис (около 30 %) эритроцитов человека (Moreau et al., 2000).

На скорость гемолиза оказывают влияние особенности структуры молекулы поликатионов. Так, степень гемолиза эритроцитов мыши зависела от структуры кватернизованных сополимеров ДМАЭМ с метакрилатом метилового эфира олигоэтиленгликоля (ОЭГМ) (ДМАЭМ–ОЭГМ), содержащих алкильные группы различной длины (Venkataraman et al., 2010). Авторы показали, что катионные сополимеры, в состав которых входят более длинные алкильные спейсеры, вызывали более сильный гемолитический эффект, что было связано с увеличением гидрофобности молекулы полимера. Аналогичный результат был получен для полиметакрилатных катионных сополимеров, у которых варьировала длина алкильных заместителей по атому азота в первичных аминогруппах полимера (Kuroda et al., 2009). Отмечена прямая зависимость между степенью гидрофобности поликатиона и его литическими свойствами в отношении эритроцитов человека.

Агрегация эритроцитов – сложный процесс, который влияет на распределение клеток и скорость их перемещения в мелких сосудах и капиллярах (Bascurt, Meiselman, 2013). В потоке крови эритроциты сближаются, и в присутствии в среде полимерных соединений происходит взаимодействие эритроцитов. Любые чужеродные для организма соединения, включая полимерные биоматериалы, способны в той или иной степени изменять агрегационную способность эритроцитов (Armstrong et al., 2004; Wang et al., 2010). Поэтому нами проведен анализ влияния сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ на агрегацию и морфологическую трансформацию эритроцитов человека.

Для оценки распределения эритроцитов и их агрегатов после обработки суспензии эритроцитов (в PBS) сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл использовали метод проточной цитометрии. На рис. 3 представлены точечные диаграммы, на которых отмечены две гейтированные области, соответствующие двум популяциям эритроцитов. Левый гейт (коричневая рамка) и правый гейт (синяя рамка) представляют соответственно одиночные и агрегированные эритроциты. Сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ в малых дозах (рис. 3б, в) не изменяет параметры популяции эритроцитов, состоящей из одиночных клеток (левый гейт), при этом процентная доля нативных клеток остается на уровне контрольных значений (рис. 3а). Увеличение концентрации сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ в среде инкубации

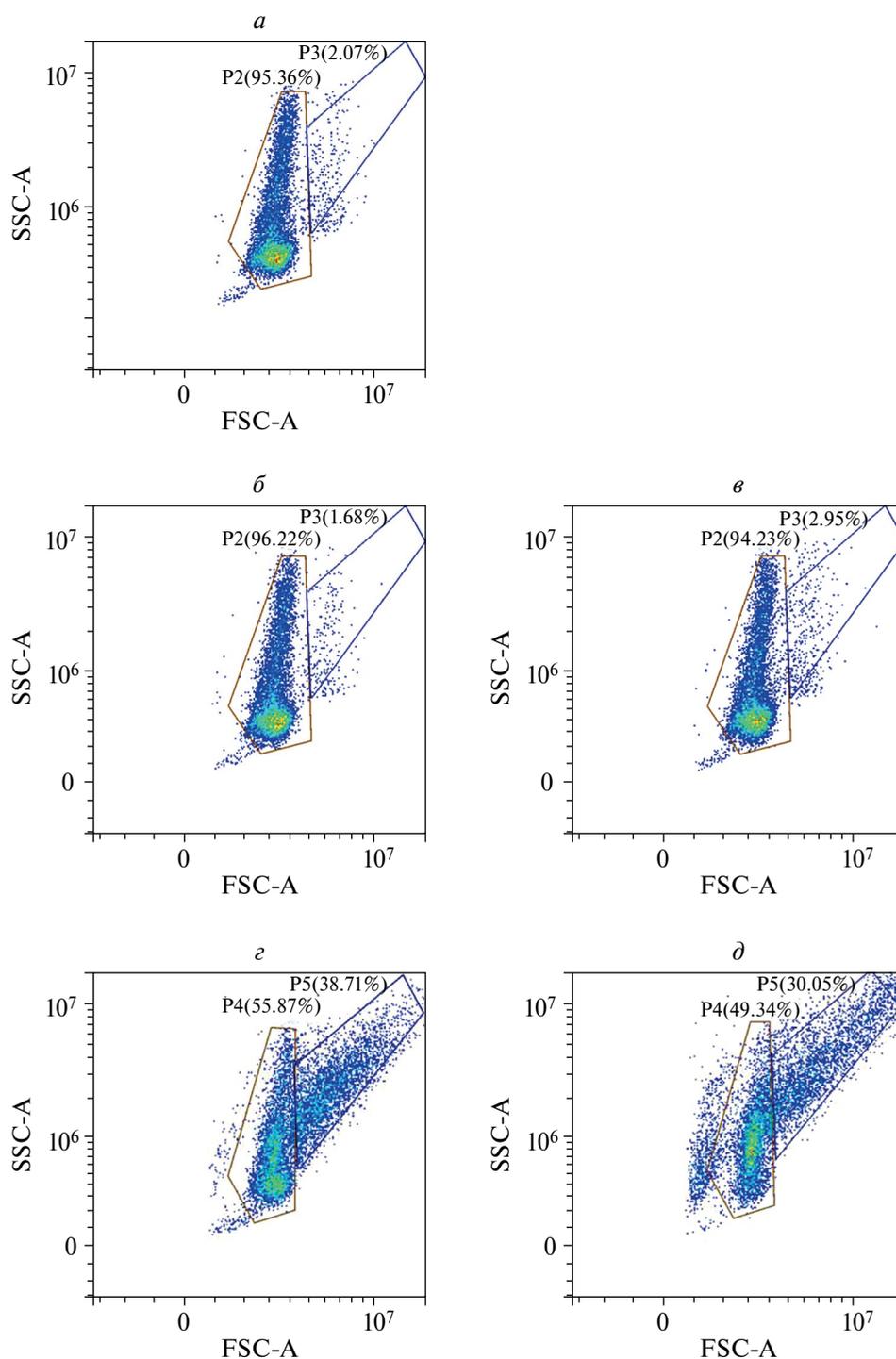


Рис. 3. Распределение популяций эритроцитов в суспензии (в PBS) в присутствии или при отсутствии (контроль) сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ (30 мин, 37 °С). Данные проточной цитометрии (цитометр CytoFLEX [Beckman Coulter, США]). FSC-A — прямое светорассеяние; SSC-A — боковое светорассеяние. *a* — Контроль; *б–д* — эритроциты, обработанные сополимером в концентрации 0.1 (*б*), 1 (*в*), 10 (*з*) и 100 (*д*) мкг/мл. Представлены типичные точечные диаграммы (из 11 независимых экспериментов). Левый гейт (коричневая рамка) характеризует распределение одиночных суспендированных клеток, правый гейт (синяя рамка) — распределение агрегированных эритроцитов. Популяции не агрегированных (P2) и агрегированных (P3) эритроцитов выражены в процентах от общего числа зарегистрированных событий.

(PBS) до 10 и 100 мкг/мл приводит к расщеплению исходной популяции эритроцитов на две области клеток: одиночные (левый гейт) и агрегированные (правый гейт) (рис. 3з, д).

Данные, представленные на рис. 3 и 4, показывают, что эритроциты, инкубированные в присутствии сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ (в PBS), в зависимости от использованной дозы полимера изменяют свою способность к агрегации. Так, при малых дозах (0.1 и 1 мкг/мл) полимер не влиял на агрегацию эритроцитов, в то время как при концентрации 10 и 100 мкг/мл вызывал значительную клеточную агрегацию. При этом количество агрегированных эритроцитов увеличивается соответственно до 37.9 и 31.4% ($P < 0.001$) после обработки сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ в дозе 10 и 100 мкг/мл, т. е. интенсивность агрегации эритроцитов возрастает соответственно в 16.8 и 13.9 раза по сравнению с клетками, не обработанными полимером (рис. 4).

Одновременно мы проводили анализ морфометрических характеристик эритроцитов человека, инкубированных в PBS, после воздействия сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ (рис. 5). Установлено, что при обработке эритроцитов сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ в дозе 0.1 мкг/мл клетки сохраняли нормальную двояковогнутую форму (дис-

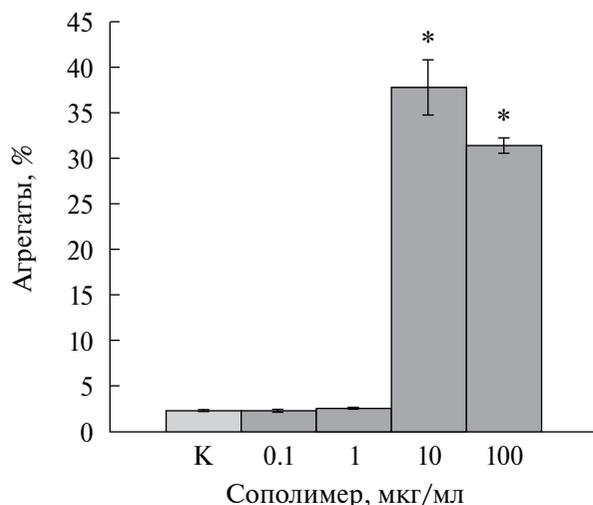


Рис. 4. Влияние сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ (0.1–100 мкг/мл) на агрегацию эритроцитов в растворе PBS (30 мин при 37 °С). По данным проточной цитометрии (цитометр CytoFLEX [Beckman Coulter, США]). Количество агрегированных эритроцитов выражено в процентах от общего числа зарегистрированных событий. Данные показаны в виде средних значений и их ошибок из 11 независимых измерений. (*) – отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

коциты) (рис. 5б). Инкубация клеток с 1 мкг/мл катионного сополимера приводила к изменению клеточной формы у части популяции эритроцитов. Отмечен частичный эхиноцитоз в популяции эритроцитов (рис. 5в). Дальнейшее увеличение концентрации полимера в среде инкубации (PBS) вызывало образование агрегатов (рис. 5г, д). Так, доза сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ 10 мкг/мл индуцировала образование различных по размеру агрегатов (см. рис. 5г). При этом мелкие агрегаты сохраняли линейную форму, напоминая стопку монет (рулекс), которую рассматривают как проявление процесса нормального агрегирования эритроцитов в кровотоке (Bascurt, Meiselman, 2013). Более крупные агрегаты, замыкая линейную форму группы клеток в псевдоциклическую, принимали нерегулярную форму. Обработка клеток сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ в концентрации 100 мкг/мл вызывала образование агрегатов нерегулярной формы, включая более крупные конгломераты (рис. 5д). При этом формирование крупных клеточных агрегатов протекало более интенсивно, чем в популяции эритроцитов, обработанных дозой сополимера 10 мкг/мл.

Противоречивые данные получены рядом исследователей о влиянии поликатионов с четвертичной аминогруппой на агрегацию эритроцитов. Так, частично кватернизованный поликатион Q-ПТДАЭ (Moreau et al., 2000) индуцировал образование агрегатов эритроцитов человека. Разветвленные катионные сополимеры глицерола и этиленгликоля с терминирующими аминогруппами с разной степенью кватернизации (18, 43 и 100 %) не проявляли гемотоксического эффекта в отношении эритроцитов при внесении полимеров в цельную кровь человека и не влияли на процесс агрегирования эритроцитов (Kainthan et al., 2006).

В ходе проведенного нами исследования обнаружено, что сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ в фосфатном буфере (PBS) при малых дозах не активировал процессы лизиса и агрегации эритроцитов, а при средних и высоких концентрациях проявлял гемолитическую и агрегационную активность, что может быть связано с особенностями химического строения этого полимера (Wang et al., 2004).

Необходимым этапом анализа биологической активности катионных сополимеров является выявление наличия или отсутствия гемотоксических эффектов исследуемых соединений при контакте с цельной кровью. Из данных, представленных

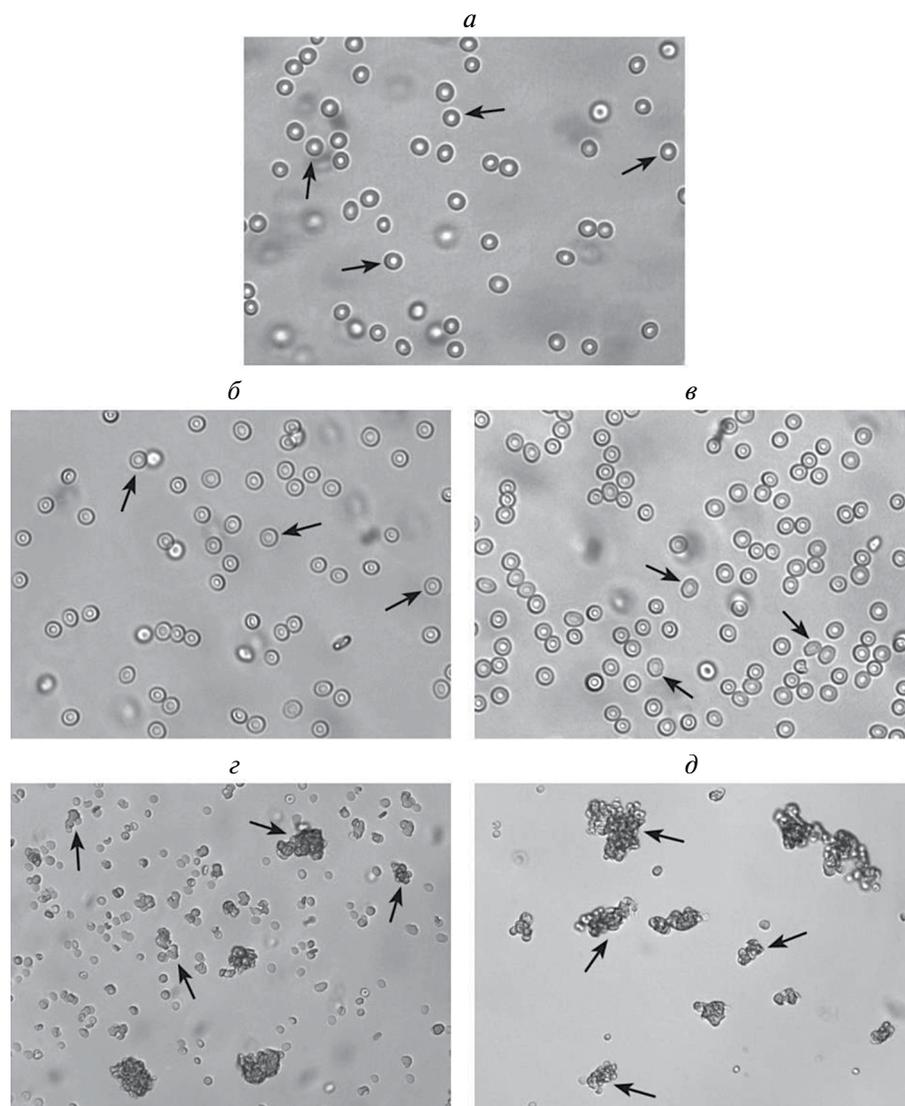


Рис. 5. Морфология и агрегация эритроцитов человека в присутствии сополимера ДМАЭМ—ДМОАЭМ в растворе PBS. *a* — Контроль (в отсутствие сополимера); *б–д* — в присутствии сополимера в концентрации 0.1 (*б*), 1 (*в*), 10 (*г*) и 100 (*д*) мкг/мл. Сополимер вносили в суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2%) на 30 мин при 37 °С. Форму эритроцитов оценивали после разбавления суспензии эритроцитов PBS в 20 раз, используя микроскоп Nikon Eclipse TS-FL (Япония) и объективы 20× (*г, д*) и 40× (*а–в*). Стрелками указаны дискоциты (*а, б*), эхиноциты (*в*) и агрегаты эритроцитов (*г, д*).

в табл. 2, следует, что в образцах цельной крови сополимер ДМАЭМ—ДМОАЭМ при всех использованных концентрациях не оказывал токсического действия на эритроциты человека. При этом все отмеченные гематологические параметры — содержание эритроцитов, гематокрит, средний объем эритроцита и ширина распределения эритроцитов — не отличались от таковых у эритроцитов, не обработанных поликатионом. Другими словами, в данных условиях сохраняется практически в неизменном виде число эритроцитов, их объем (можно говорить о сохранении формы клеток)

и уровень гетерогенности эритроцитов под воздействием исследованного сополимера.

Полученные нами результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями. Как уже отмечалось (Kainthan et al., 2006), разветвленные сополимеры глицерола и этиленгликоля с терминирующими аминогруппами не оказывали токсического действия на эритроциты человека при добавлении поликатионов в цельную кровь.

Отсутствие гемотоксического эффекта сополимера ДМАЭМ—ДМОАЭМ в отношении

Таблица 2. Влияние сополимера ДМАЭМ-ДМОАЭМ на гематологические параметры цельной крови человека

Гематологический показатель	Величина показателя при концентрации сополимера, мкг/мл				
	0 (контроль)	0.1	1	10	100
Число эритроцитов, $10^{12}/л$	4.24 ± 0.13	4.05 ± 0.16	4.15 ± 0.13	4.18 ± 0.13	4.12 ± 0.13
Средний объем эритроцита, фл	83.88 ± 1.68	83.65 ± 1.70	83.39 ± 1.64	83.25 ± 1.61	83.55 ± 1.63
Гематокрит, %	35.63 ± 1.47	33.99 ± 1.69	34.66 ± 1.45	34.95 ± 1.46	34.49 ± 1.45
Ширина распределения эритроцитов, %	18.18 ± 0.40	18.28 ± 0.44	18.15 ± 0.41	18.28 ± 0.42	18.35 ± 0.40

Примечание. В пробы цельной крови добавляли сополимер (0.1–100 мкг/мл) и инкубировали 30 мин при 37 °С.

Контролем служила кровь без добавления сополимера. Показаны средние значения и их ошибки из 8 независимых экспериментов.

эритроцитов человека в образцах цельной крови может быть связано с взаимодействием полимера с белками плазмы (Liu et al., 2012). Как известно, самым распространенным (мажорным) белком плазмы крови является альбумин, содержание которого находится в пределах 30–50 г/л (Щербак, 2005; Wu et al., 2024). В функциональном отношении альбумин играет существенную роль в связывании и транспортировке с током крови как эндогенных, так и экзогенных веществ (Пшенкина, 2011; Larsen et al., 2016; Wu et al., 2024). Альбумин относится к простым белкам. В его молекуле содержится два гидрофобных кармана, которые служат для связывания соединений, содержащих неполярные сегменты.

В связи со сказанным проведен анализ возможного влияния сывороточного альбумина БСА на выявленный нами гемотоксический эффект катионного сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ (в дозах 10 и 100 мкг/мл) (см. рис. 2 и 5). В экспериментах использовали две концентрации БСА: 10 и 40 мг/мл; вторая из упомянутых относится к нативным концентрациям альбумина в сыворотке крови.

Данные, представленные в табл. 3, показывают, что инкубация суспензии эритроцитов в среде, содержащей 10 или 40 мг/мл БСА, практически полностью блокировала лизис эритроцитов после воздействия сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ в дозе 10 мкг/мл.

Токсический эффект сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ в концентрации 100 мкг/мл при добавлении в суспензию эритроцитов БСА в дозе 10 мг/мл в абсолютных значениях уменьшался в 1.59 раза по сравнению с гемолитическим эффектом этого поликатиона, выявленного при инкубации клеток в PBS без добавления альбумина. Вместе с тем скорость гемолиза под действием сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ в дозе 100 мкг/мл в среде, содержащей 10 мг/мл БСА, сохранялась приблизительно на том же уровне, что и для эритроцитов, инкубированных в PBS (без добавления БСА), в сравнении с клетками, не обработанными исследованным полимером (соответствующими контролями).

БСА в концентрации 40 мг/мл (нативная концентрация альбумина в сыворотке крови)

Таблица 3. Влияние БСА на индуцированный сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ лизис эритроцитов человека

Концентрация сополимера, мкг/мл	Степень гемолиза, %		
	Инкубационная среда		
	PBS	PBS + 10 мг/мл БСА	PBS + 40 мг/мл БСА
0 (Контроль)	1.90 ± 0.18	1.18 ± 0.06	1.19 ± 0.05
0.1	1.92 ± 0.15	1.23 ± 0.06	1.45 ± 0.15
1	2.99 ± 0.27	1.55 ± 0.17	1.57 ± 0.16
10	$14.76^a \pm 1.23$	2.63 ± 0.25	1.49 ± 0.15
100	$51.15^a \pm 1.10$	$32.09^a \pm 1.73$	$5.38^a \pm 0.55$

Примечание. Время обработки эритроцитов 30 мин при 37 °С. Степень гемолиза оценивали спектрометрически по количеству выделившегося гемоглобина в среду инкубации при длине волны 540 нм. Результаты представлены в процентах от содержания гемоглобина в эритроцитах после их полного гемолиза. Даны средние значения и их ошибки из 10 независимых измерений. (°) – Отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

ингибировал гемолитический эффект сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ в дозе 100 мкг/мл. Степень гемолиза эритроцитов в указанных условиях уменьшалась почти в 10 раз, если сравнивать таковую для эритроцитов, инкубированных с поликатионом в среде без добавления альбумина. По сравнению с контрольными клетками, не обработанными сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ, альбумин (40 мг/мл) полностью не блокировал лизис эритроцитов, индуцированный 100 мкг/мл полимера (степень лизиса 5.38 ± 0.55 , $P < 0.001$).

Некоторые исследователи относят степень гемолиза в 5% к незначимому токсическому эффекту полимера в отношении эритроцитов (Cuervo-Rodríguez et al., 2020). В отличие от полученных нами данных о защитном эффекте БСА от литического воздействия сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ на эритроциты человека, имеются сведения об отсутствии протекторного влияния БСА (в нативной концентрации) на гемолиз эритроцитов человека, индуцированный частично кватернизованным поликатионом Q-ПТДАЭ (Moreau et al., 2000), что может быть связано с различиями в химической структуре указанных поликатионов.

Интересные данные получены нами в ходе анализа влияния БСА на агрегационные свойства эритроцитов, индуцированные обработкой сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ. Как показано на рис. 6 и в табл. 4, инкубация суспензии эритроцитов в буфере, содержащем 10 или 40 мг/мл БСА, полностью ингибировала агрегационные процессы у эритроцитов после воздействия исследованного полимера в дозе 10 мкг/мл. Интенсивность образования агрегатов при обработке сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ в дозе 100 мкг/мл остается приблизительно на одном уровне вне зависимости от добавленного количества БСА. В этих условиях количество агрегатов возрастает в 13 и 14 раз по сравнению с соответствующими контрольными значениями (см. табл. 4). То есть альбумин снимал агрегационный эффект, индуцированный 10 мкг/мл поликатиона, но практически не влиял на этот процесс, индуцированный дозой сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ 100 мкг/мл. Согласно данным, полученным другими исследователями, БСА не влиял на агрегацию эритроцитов человека, индуцированную частично кватернизованным Q-ПТДАЭ (Moreau et al., 2000). Другими словами, БСА не проявлял протекторного действия в отношении Q-ПТДАЭ-индуцированной агрегации эритроцитов.

Таблица 4. Влияние сывороточного альбумина на интенсивность агрегации эритроцитов человека, вызванной сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ

Концентрация сополимера, мкг/мл	Количество агрегированных клеток, %	
	10 мг/мл БСА в PBS	40 мг/мл БСА в PBS
0 (Контроль)	3.12 ± 0.21	3.22 ± 0.18
0.1	3.02 ± 0.15	3.18 ± 0.20
1	3.01 ± 0.21	3.16 ± 0.20
10	3.98 ± 0.11	3.12 ± 0.18
100	$41.05^a \pm 2.17$	$46.06^a \pm 2.84$

Примечание. Суспензию эритроцитов инкубировали в PBS с сополимером и БСА 30 мин при 37 °С. Контроль — клетки в PBS, содержащем БСА без сополимера. Анализ с помощью проточной цитометрии. Количество агрегированных эритроцитов выражали в процентах от общего числа зарегистрированных событий. Даны средние значения и их ошибки из 10–11 независимых измерений. (a) — Отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

Наши выводы подтверждаются данными, полученными в ходе анализа морфологической трансформации эритроцитов при совместной аппликации БСА (10 и 40 мг/мл) и сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ (в дозах 10 и 100 мкг/мл). Из данных, представленных на рис. 7, следует, что добавление БСА в обеих использованных концентрациях в суспензию эритроцитов в присутствии 10 мкг/мл исследованного нами сополимера блокирует агрегацию эритроцитов, но вызывает трансформацию клеточной формы — появление эхиноцитов в клеточной популяции. БСА при обеих использованных концентрациях не влиял на процесс агрегирования эритроцитов, стимулированный при добавлении 100 мкг/мл катионного сополимера (см. рис. 7). Формирующиеся агрегаты в этих условиях сохраняют нерегулярную форму, размеры которых варьируют. По морфологическим характеристикам агрегаты мало отличаются от агрегатов, образованных эритроцитами при инкубации в PBS в присутствии только сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ (см. рис. 5).

В условиях инкубации эритроцитов в присутствии БСА гемолитический эффект сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ при обработке эритроцитов этим полимером в концентрации 10 или 100 мкг/мл компенсировался соответственно полностью или частично. Одновременно, БСА (10 и 40 мг/мл) практически полностью тормозил агрегационные процессы, индуцированные 10 мкг/мл сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ (см. рис. 6 и табл. 4). При

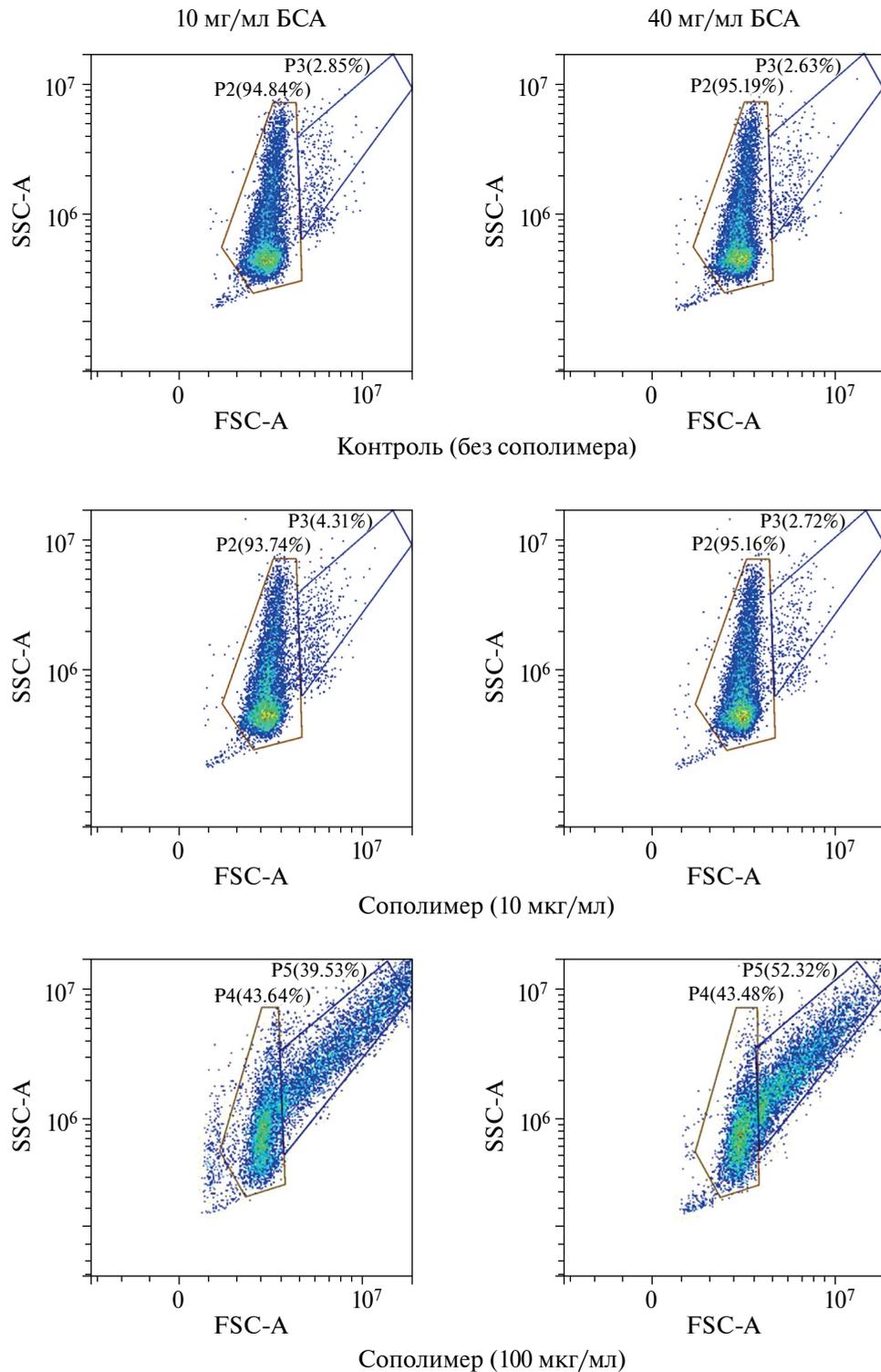


Рис. 6. Распределение популяций эритроцитов человека, подвергнутых совместной обработке бычьим сывороточным альбумином (БСА, 10 или 40 мг/мл) и сополимером ДМАЭМ—ДМОАЭМ (10 или 100 мкг/мл) в растворе PBS (30 мин, 37 °С). Точечные диаграммы проточной цитометрии. FSC-A — прямое светорассеяние; SSC-A — боковое светорассеяние. Контролем служили клетки в PBS, содержащем БСА, но без сополимера. Левый гейт (коричневая рамка) соответствует популяции одиночных суспендированных клеток, правый гейт (синяя рамка) — популяции из агрегированных эритроцитов. Представлены типичные точечные диаграммы (из 10–11 независимых экспериментов). Популяции агрегированных и не агрегированных эритроцитов выражены в процентах от общего числа зарегистрированных событий.

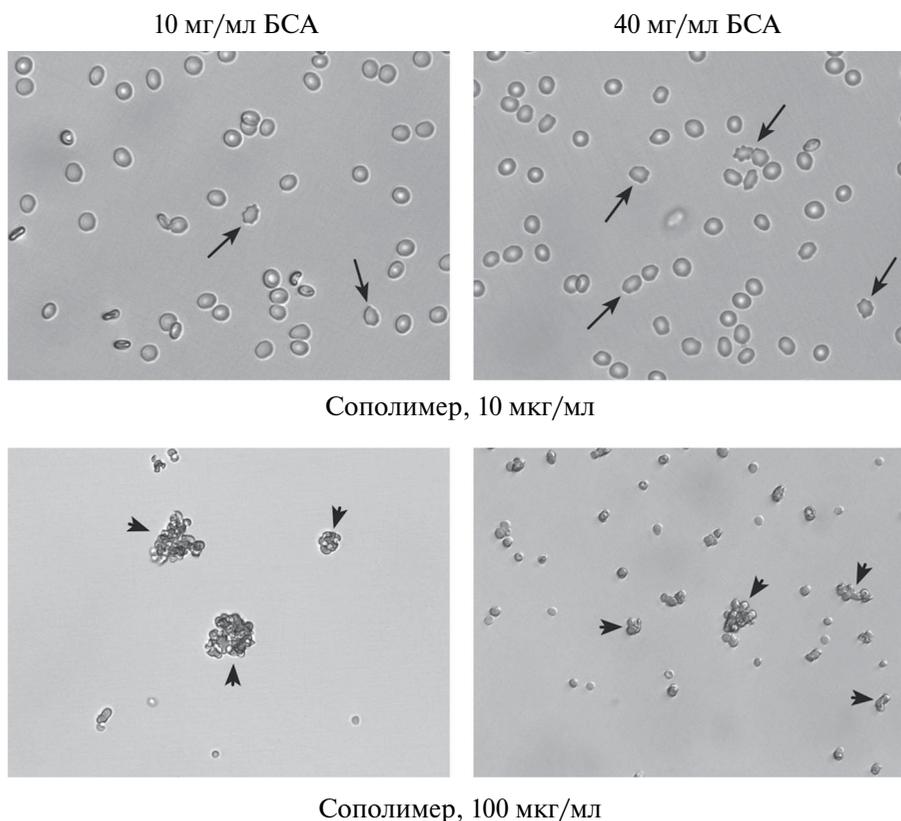


Рис. 7. Морфологическая трансформация эритроцитов человека, подвергнутых совместной обработке БСА (10 или 40 мг/мл) и сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ (10 или 100 мкг/мл) в течение 30 мин при 37 °С. После разбавления суспензии эритроцитов PBS в 20 раз оценивали форму эритроцитов, используя микроскоп Nikon Eclipse TS-FL (Япония) и объективы 40× или 20× для проб, обработанных сополимером в дозе 10 или 100 мкг/мл соответственно. Длинными стрелками указаны эхиноциты, короткими стрелками – агрегаты эритроцитов.

максимальной из использованных концентраций поликатиона в присутствии БСА агрегация эритроцитов сохраняется, хотя гемолитические процессы при этих условиях практически полностью компенсировались. Возможно, это связано с особенностями поведения молекул сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ в среде, содержащей белки. Можно предположить, что в этом случае происходит частичная или полная инактивация свойств гидрофобных групп поликатиона молекулами БСА при сохранении активности третичных аминогрупп у молекул полимера. При этом сохраняется воздействие сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ в максимальной дозе на величину поверхностного заряда эритроцитов и соответственно его влияние на способность эритроцитов к агрегации.

Взаимодействие катионного сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ с альбумином, вероятно, осуществляется в основном за счет гидрофобных взаимодействий. Можно предположить, что при меньшей концентрации поликатиона (10 мкг/мл)

все молекулы полимера связываются с молекулами БСА, в результате чего происходит блокировка его токсического эффекта в этих условиях. Отсутствие полной блокировки гемотоксического эффекта сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ в дозе 100 мкг/мл в присутствии БСА (10 и 40 мг/мл) может быть связано с процессом образования сополимером сложных пространственных структур, не способных прочно связываться с молекулами БСА. Кроме того, не исключена возможность частичной денатурации БСА при высокой концентрации полимера, что и обусловит частичное ингибирование токсического действия сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ. Полученные нами данные свидетельствуют о полной или частичной адсорбции молекул сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ молекулами БСА, при этом степень взаимодействия варьирует в зависимости от дозы сополимера и БСА.

Согласно данным из литературы, поликатионы могут образовывать комплексы с сывороточным альбумином посредством гидрофобных и/или

электростатических взаимодействий. Положительно заряженные биогенные и синтетические полиамины могут образовывать комплексы с молекулами сывороточного альбумина (быка и человека), стабилизация которых осуществляется посредством гидрофобных и водородных связей (Beauchemin et al., 2007; Chanphai et al., 2016). Поликатионы, отличающиеся по степени разветвленности, графт сополимер N-винилпирролидон–ДМАЭМ (ПВП–ДМАЭМ) и блок сополимер ПВП–ДМАЭМ образуют комплексы с молекулами БСА (Zhang et al., 2016). При этом число молекул обоих поликатионов, адсорбированных на молекуле БСА, возрастает с увеличением использованной концентрации поликатионов. Наличие разветвленных боковых групп у графт сополимера обеспечивало более интенсивное взаимодействие указанного поликатиона с молекулами БСА.

Обобщая полученные нами данные, можно высказать предположение о возможном механизме действия исследованного сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ на эритроциты человека. В начальный момент контакта эритроцита с катионным сополимером взаимодействие осуществляется за счет электростатических связей между клетками и полимером, в результате чего происходит адсорбция полимера на поверхности эритроцитарной мембраны (Reuter et al., 2009; Molotkovsky et al., 2021). Наличие октилового заместителя у четвертичной аммонийной группы катионного сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ значительно увеличивает его гидрофобность, облегчая как проникновение поликатиона в мембрану эритроцита, так и взаимодействие с жирнокислотными остатками липидного бислоя мембран (Kuroda et al., 2009). В этой ситуации сополимер ДМАЭМ–ДМОАЭМ может оказывать двоякое действие: либо формировать пороподобные структуры, либо солибилизовать гидрофобные участки липидного бислоя мембраны эритроцитов. В последнем случае клеточная мембрана может уменьшаться по площади у эритроцита или полностью растворяться в зависимости от дозы и времени обработки клеток сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ, приводя к гемолизу.

Электростатическое взаимодействие третичных аминокислотных групп и четвертичных аммонийных групп исследованного поликатиона с отрицательно заряженными компонентами фосфо- и гликолипидов, а также белковых молекул, структурирующих эритроцитарные мембраны, приводит к объединению эритроцитов в конгломераты различных размеров

и формы. Усиление агрегации эритроцитов, обработанных катионным сополимером, связано с падением электроотрицательного заряда на клеточной поверхности, ослабляя процессы взаимного отталкивания эритроцитов в среде инкубации и увеличивая время контакта между эритроцитами, достаточное для образования агрегатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо отметить, что действие синтетического катионного сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ с октиловыми группами на свойства эритроцитов человека зависело от времени аппликации и использованной дозы полимера. Если при малых дозах сополимер не изменял гемолитическую и агрегационную активность эритроцитов, то при средних и высоких концентрациях он ускорял процессы гемолиза и клеточной агрегации. Обработка эритроцитов БСА приводила, соответственно, к полному или частичному ингибированию гемолитического эффекта сополимера при средних и высоких его дозах. Вместе с тем БСА оказывал различный эффект на процессы агрегации эритроцитов, индуцированные сополимером ДМАЭМ–ДМОАЭМ. БСА вне зависимости от использованной концентрации практически полностью ингибировал агрегацию эритроцитов, обработанных средней дозой сополимера ДМАЭМ–ДМОАЭМ, но не компенсировал агрегационного эффекта, индуцированного его максимальной из использованных концентраций.

Токсичность водорастворимых поликатионов может быть уменьшена за счет формирования комплексов с нетоксическими компонентами, снижающими как величину положительного заряда, так и гидрофобность биополимера. Вместе с тем необходимо сохранять баланс между уровнем заряда и гидрофобности разрабатываемого катионного полимера, поскольку эти характеристики чрезвычайно важны для формирования любых полиэлектролитных комплексов.

Анализ свойств полимерных молекул с различными характеристиками необходим для понимания структурно-функциональных связей у этих соединений. В идеале нужно стремиться к созданию катионных полимеров с оптимальным уровнем комплексобразования с другими полимерами (для доставки необходимого материала или воздействия на клетки-мишени), чтобы сохранить стабильность подобных полиэлектролитных комплексов в ходе

их циркуляции в организме в течение необходимого времени и обеспечить безопасное выведение этих соединений из организма.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность И. В. Миндукшеву (ИЭФБ РАН) за предоставленную возможность проведения экспериментальной работы и оказанную консультацию по использованию проточного цитометра для анализа клеточного материала.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН (№ 075-00263-25-00).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

От здоровых доноров получали информированное согласие на использование проб их крови в экспериментах. Опыты проводили в соответствии с рекомендациями этического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН (Санкт-Петербург); протоколы № 01-04 от 7 апреля 2022 г. и № 03-02 от 28 февраля 2024 г).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.П.И.: оригинальная идея и схема экспериментов, проведение экспериментов, анализ и интерпретация полученных данных, написание и редакция рукописи. О.В.Н. и Ю.И.З.: химический синтез поликатиона и его описание, подготовка рис. 1. Все авторы прочитали окончательную версию рукописи и согласились с ней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Агеева Т. С., Мишустина Е. Л., Тетнев Ф. Ф., Дубоделова А. В., Месько П. Е., Тетнев К. Ф. 2014. Клиническая интерпретация анализа периферической

крови: учебное пособие. Томск: Изд-во СибГМУ. 72 с. (Ageeva T. S., Mishustina E. L., Tetnev F. F., Dubodelova A. V., Mes'ko P. E., Tetnev K. F. 2014. Klinicheskaya interpretaciya analiza perifericheskoy krvi. Tomsk. SybSMU. 72 p.)

Иванова В. П., Алексеенко Л. Л., Назарова О. В., Миндукшев И. В. 2023. Влияние синтетического поликатиона поли-2-диметиламиноэтилметакрилата на биологическую активность резидентных и нерезидентных клеток млекопитающих. Цитология. Т. 65. № 5. С. 447. (Ivanova V. P., Alekseenko L. L., Nazarova O. V., Mindukshev I. V. 2024. The influence of synthetic polycation poly-2-dimethylaminoethyl methacrylate on the biological activity of resident and nonresident cells of mammals. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 18. No. 1. P. 89.)

<https://doi.org/10.31857/S0041377123050115>

Пшенкина Н. Н. 2011. Сывороточный альбумин: структура и транспортная функция. Журнал Медлайн. ру. Т. 12. С. 1067. (Pshenkina N. N. 2011. Serum albumin: structure and carrying function. Medline.ru. V. 12. P. 1067.)

<https://www.medline.ru./public/art/tom12/art87.html>

Щербак И. Г. 2005. Биологическая химия. СПб: СПбГМУ. 480 с. (Scherbak I. G. 2005. Biological Chemistry. St. Petersburg: SPbSMU. 480 p.)

Alvarez-Paino M., Muñoz-Bonilla A., López-Fabal F., Gómez-Garcés J. L., Heuts J. P. A., Fernández-García M. 2014. Effect of glyconunits on the antimicrobial properties and toxicity behavior of polymers based on quaternized DMAEMA. Biomacromol. V. 16. P. 295. <https://doi.org/10.1021/bm5014876>

Armstrong J. K., Wanby R. B., Meiselman H. J., Fisher T. C. 2004. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. Biophys. J. V. 87. P. 4259.

<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047746>

Baskurt O. K., Meiselman H. J. 2013. Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance. Clin. Hemorheol. Microcirc. V. 53. P. 23.

<https://doi.org/10.3233/CH-2012-1573>

Bauchemin R., N'soukpoé-Kossi C. N., Thomas T. J., Thomas T., Carpentier R., Tajmir-Riahi H. A. 2007. Polyamine analogues bind human serum albumin. Biomacromol. V. 8. P. 3177.

<https://doi.org/10.1021/bm700697a>

Chanphai P., Thomas T. J., Tajmir-Riahi H. A. 2016. Conjugation of biogenic and synthetic polyamines with serum proteins: a comprehensive review. Int. J. Biol. Macromol. V. 92. P. 515.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomol.2016.07.049>

Cuervo-Rodríguez R., Muñoz-Bonilla A., López-Fabal E., Fernández-García M. 2020. Hemolytic and antimicrobial activities of a series of cationic amphiphilic copolymers comprised of same centered comonomers with

- thiazole moieties and polyethylene glycol derivatives. *Polymers*. V. 12. Art. ID: 972.
<https://doi.org/10.3390/polym12040972>
- Haktaniyan M., Sharma R., Bradley M.* 2023. Size-controlled ammonium-based homopolymers as broad-spectrum antibacterials. *Antibiotics*. V. 12. Art. ID: 1320.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12081320>
- Haladjova E., Chrysostomou V., Petrova M., Ugrinova I., Pispas S., Rangelov S.* 2021. Physicochemical properties and biological performance of polymethacrylate based gene delivery vector systems: influence of amino functionalities. *Macromol. Biosci*. V. 21. Art. ID: 2000352.
<https://doi.org/10.1002/mabi.202000352>
- Jacobson F., Baraniskin A., Mertens J., Mittler D., Mohammedi-Tabrasi A., Schubert S., Soltan 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.
<https://doi.org/10.1093/jac/dki067>
- Jiao Y., Niu L., Ma S., Li J., Tay F. R., Chen J.-H.* 2017. Quaternary ammonium-based biomedical materials: state-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance. *Progr. Polym. Sci.* V. 71. P. 53.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.03.001>
- Kafetzi M., Pispas S.* 2021. Effects of hydrophobic modifications on the solution self-assembly of P(DMAEMA-co-QDMAEMA)-b-POEGMA random diblock copolymers. *Polymers*. V. 13. Art. ID: 338.
<https://doi.org/10.3390/polym.13030338>
- Kainthan R. K., Gnanamani M., Ganguli M., Ghosh T., Brooks D. E., Maiti S., Kizhakkedathu J. N.* 2006. Blood compatibility of novel water soluble hyperbranched polyglycerol-based multivalent cationic polymers and their interaction with DNA. *Biomaterials*. V. 27. P. 5377.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.021>
- Kuroda K., Caputo G. A., DeGrado W. F.* 2009. The role of hydrophobicity in the antimicrobial and hemolytic activities of polymethacrylate derivatives. *Chem. Eur. J.* V. 15. P. 1123.
- Larsen M. T., Kuhlmann M., Hvam M. L., Howard K. A.* 2016. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Mol. Cell. Therapies*. V. 4. Art. ID: 3.
<https://doi.org/10.1186/s40591-016-0048-8>
- Leclercq L., Boustia M., Vert M.* 2003. A physico-chemical approach of polyanion-polycation interactions aimed at better understanding the *In vivo* behaviour of polyelectrolyte-based drug delivery and gene transfection. *J. Drug Targ.* V. 11. P. 129.
<https://doi.org/10.1080/1061186031000150287>
- Lim C., Shin Y., Oh K. T.* 2024. Polyelectrolyte complex for drug delivery. *Drug Targ. Therap.* V. 3. P. 62.
<https://doi.org/10.58502/DTT.23.0027>
- Liu Z., Jiao Y., Wang T., Zhang Y., Xue W.* 2012. Interactions between solubilized polymer molecules and blood components. *J. Control. Release*. V. 160. P. 14.
<https://doi.org/10.1016/j.jcontrol.2012.02.005>
- Manouras T., Platania V., Georgopoulou A., Chatziniokolaidou M., Vamvakaki M.* 2021. Responsive quaternized PDMAEMA copolymers with antimicrobial action. *Polymers*. V. 13. Art. ID: 3051.
<https://doi.org/10.3390/polym13183051>
- Meka V. S., Sing M. K. G., Pichika M. R., Nali S. R., Kolaipalli V. R. M., Kesharwani P.* 2017. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discov. Today*. V. 22. P. 1697.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.008>
- 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. Art. ID: 6623.
<https://doi.org/10.3390/ma14216623>
- Moreau E., Ferrari I., Drochon A., Chapon P., Vert M., Domurado D.* 2000. Interactions between red blood cells and a lethal, partly quaternized tertiary polyamine. *J. Control. Release*. V. 64. P. 115.
[https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00128-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00128-5)
- Potaš J., Winnicka K.* 2022. The potential of polyelectrolyte multilayer films as drug delivery materials. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. Art. ID: 3496.
<https://doi.org/10.3390/ijms23073496>
- Rappoport S., Chrysostomou V., Pispas S., Talmon Y.* 2023. The nanostructure of polyelectrolyte complexes of QPDMAEMA-b-POEGMA copolymers and oppositely charged polyelectrolytes and their stability in the presence of serum albumin. *Soft. Matter*. V. 19. P. 3688.
<https://doi.org/10.1039/d3sm00467h>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2009.06.002>
- Samal S. K., Dash M., Vlierberghe van S., Kaplan D. L., Chiellini E., Blitterswijk van C., Moroni L., Dubrueil P.* 2012. Cationic polymers and their therapeutic potential. *Chem. Soc. Rev.* V. 41. P. 7147.
<https://doi.org/10.1039/c2cs35094g>
- Santoro O., Izzo L.* 2024. Antimicrobial polymer surfaces containing quaternary ammonium centers (QACs): synthesis and mechanism of action. *Int. J. Mol. Sci.* V. 25. Art. ID: 7587.
<https://doi.org/10.3390/ijms25147587>
- Slita A. V., Kasyanenko N. A., Nazarova O. V., Gavrilova I. I., Eroпкина 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. Biotechnology*. V. 127. P. 679.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.016>
- Teper P., Celny A., Kowalczyk A., Mendrek B.* 2023. Quaternized poly(N, N-dimethylaminoethyl methacrylate) star nanostructures in the solution and on the surface. *Polymers*. V. 15. Art. ID: 1260.
<https://doi.org/10.3390/polym15051260>
- Thomas M., Klibanov A. M.* 2002. Enhancing polyethyleneimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 99. P. 14640.
<https://doi.org/10.1073/pnas.192581499>
- Venkataraman S., Zhang Y., Liu L., Yang Y. Y.* 2010. Design, synthesis and evaluation of hemocompatible pegylated-antimicrobial polymers with well-controlled molecular structures. *Biomaterials*. V. 31. P. 1751.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.030>
- Wang W., Xiong W., Zhu Y., Xu H., Yang X.* 2010. Protective effect of PEGylation against poly(amidoamine) dendrimer-induced hemolysis of human red blood cells. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* V. 93. P. 59.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.31558>
- Wang Y. X., Robertson J. L., Spillman W. B., Claus R. O.* 2004. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharm. Res.* V. 21. P. 1362.
<https://doi.org/10.1023/b:pharm.0000036909.41843.18>
- Wu N., Liu T., Tian M., Liu C., Ma S., Cao H., Bian H., Wang L., Feng Y., Qi J.* 2024. Albumin, an interesting and functionally diverse protein, varies from “native” to “effective” (Review). *Mol. Med. Rep.* V. 29. Art. ID: 24.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13147>
- Zhang L., Jing F., Zhang T., Zhang L., Xing J.* 2016. Structural influence of graft and block polycations on the adsorption of BSA. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 85. P. 252.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.088>

HEMOCOMPATIBILITY OF QUATERNIZED POLY-N, N-DIMETHYLAMINOETHYLMETHACRYLATE

V. P. Ivanova^{a, *}, O. V. Nazarova^b, J. I. Zolotova^b

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

^b *Branch of Petersburg Konstantinov Nuclear Physics of National Research Centre “Kurchatov Institute” — Institute of Macromolecular Compounds, St. Petersburg, 199004, Russia*

*e-mail: valet@iephb.ru

Objective: Quaternized polycations have been used not only as gene and drug delivery materials, but also as effective antimicrobial agents. Cationic copolymer of 2-dimethylaminoethylmethacrylate (DMAEM) with N, N-dimethyl-N-octyl-methacryloiloxyethylammonium iodide (DMOAEM) contains tertiary amino groups and quaternary ammonium groups. **The aim of the work** was to investigate the effect of the cationic DMAEM-DMOAEM copolymer on functions of human red blood cells (RBCs). **Methods:** We used the methods of polycation chemical synthesis, spectral methods, methods of flow cytometry and microscopic analysis. **Results:** It was found that the octylated polycation at low doses (0.1 and 1 µg/mL) did not change the lysis and aggregation of RBCs. Increasing polycation concentration (to 10 and 100 µg/mL) led to strengthening hemolysis and erythrocyte aggregation with the maximal hemolytic effect at the highest polymer dose (100 µg/mL). Adding cationic copolymer DMAEM-DMOAEM (from 0.1 to 100 µg/mL) into whole blood samples did not exhibit the toxic effect on human RBCs. We found that the treatment of human erythrocytes with bovine serum albumin (BSA) led to the total or partial inhibition of hemolytic effect induced by the polycation at the doses of 10 and 100 µg/mL. The BSA effect on the aggregation processes, induced by the polycation, depended on the used polycation concentration. BSA inhibited near-totally the aggregation of RBCs treated with the polycation at a dose of 10 µg/mL but did not compensate the aggregation effect induced by the polycation at a dose of 100 µg/mL. **Conclusions:** Quaternization of polycation molecules belongs to perspective instruments for transformation of characters in polymer compounds. Our experimental data have expanded the existing concepts concerning the structural-functional relationships of the cationic polymers.

Keywords: quaternized polycation, serum albumin, hemocompatibility, erythrocytes