

УДК 57.01

## СПОСОБ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

© 2021 г. Л. А. Сафонова<sup>1</sup>, М. М. Боброва<sup>1</sup>, А. Е. Ефимов<sup>1</sup>,  
О. И. Агапова<sup>1</sup>, И. И. Агапов<sup>1,\*</sup>, академик РАН С. В. Готье<sup>1,2</sup>

Поступило 17.03.2021 г.

После доработки 31.03.2021 г.

Принято к публикации 31.03.2021 г.

Разработка микроносителей для культивирования и доставки клеток является актуальной задачей тканевой инженерии и регенеративной медицины. В работе представлен новый способ модификации поверхности альгинатных микроносителей в виде микросфер диаметром 200–300 мкм. Описанный способ заключается в ковалентной пришивке коллагена к поверхности альгинатных микроносителей. Было показано, что способ позволяет полностью модифицировать поверхность альгинатного микроносителя, что может использоваться для улучшения биологических свойств микроносителя. Такие микроносители с улучшенными биологическими свойствами могут рассматриваться в качестве эффективных систем для доставки и культивирования клеток.

*Ключевые слова:* микроносители, альгинат, коллаген, ковалентная пришивка, клеточный носитель

**DOI:** 10.31857/S2686738921040211

Разработка новых технологий культивирования клеток является одной из важных задач тканевой инженерии. Для сохранения нативной морфологии клеток и межклеточных взаимодействий применяется трехмерное культивирование клеток на различных конструкциях. В качестве таких конструкций применяются как трехмерные пористые скаффолды [1–3], так и микроносители различной формы [4–6]. Помимо подложки для культивирования клеток, микроносители являются эффективным средством для доставки клеток в область поврежденной ткани или органа, так как позволяют обеспечить благоприятные условия для клеток в ходе их доставки, что значительно повышает жизнеспособность клеток [7]. Технология инкапсуляции позволяет получить

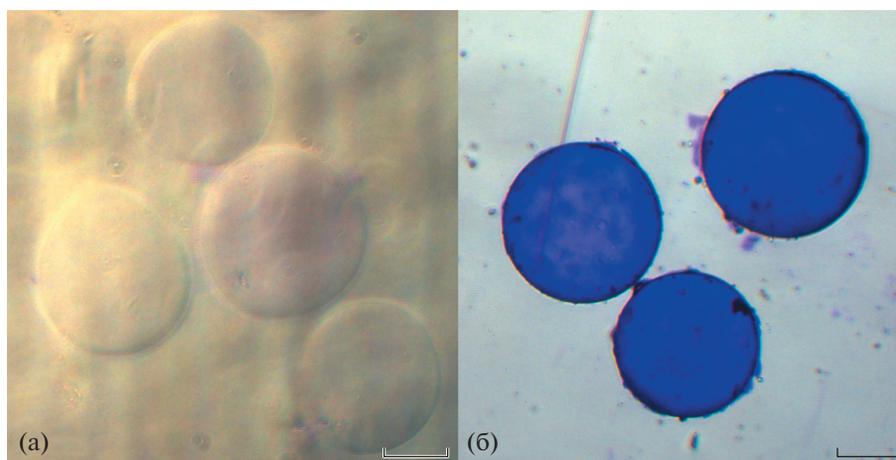
стабильные альгинатные микроносители в форме микросфер заданного диаметра, однако культивирование клеток на поверхности таких микроносителей неэффективно вследствие низкой шероховатости поверхности и отрицательного заряда альгината при физиологических условиях [6]. На данный момент охарактеризовано множество биосовместимых материалов, которые являются эффективными субстратами для культивирования клеток, таких как коллаген, эластин, хитозан и др., однако, получение микроносителей на их основе затруднено в связи с рядом природных особенностей полимеров – ограниченной растворимостью, сложностями при стабилизации и структурировании [8]. В данной работе предлагается оригинальная методика модификации поверхности альгинатных микроносителей путем ковалентной пришивки коллагена к поверхности микроносителей.

Нами разработан способ получения альгинатных микроносителей, покрытых коллагеном, выделенным из хвоста крыс породы Wistar, путем ковалентной пришивки коллагена к альгинату. Для получения альгинатных микроносителей диаметром 200–300 мкм был использован инкапсулятор модели В-390 (BUCHI Labortechnik AG, Швейцария) [6]. Активацию карбоксильных групп на поверхности альгинатных микроносителей производили путем последовательной обработки 3 мМ раствором 1-этил-3-(3-диметилами-

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова” Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

\*e-mail: igor.agapov@gmail.com



**Рис. 1.** Альгинатные микроносители (а) и альгинатные микроносители, поверхность которых покрыта коллагеном (б), после отмывки от красителя Кумасси R-250, световая микроскопия, изображение в проходящем свете,  $\times 100$ , масштабный отрезок — 100 мкм.

нопропил)карбодиимида и 10 мМ раствором N-гидроксисукцинимидом в течение 1 ч в каждом растворе [9]. Данные вещества не оказывают токсического эффекта на клетки, в отличие от глутарового альдегида или параформальдегида, которые также применяются в качестве перешивающих агентов, что позволяет сохранить биосовместимые свойства получаемых микроносителей. Активацию проводили при pH 6 в растворе, содержащем 5 мМ дигидрофосфата натрия и 100 мМ хлорида натрия. Далее микроносители осаждали путем центрифугирования в течение 15 мин при 1800 г и переносили в раствор аналогичного состава с pH 6. К суспензии микроносителей добавляли раствор коллагена с концентрацией 3 мг/мл, выделенного из хвостов крыс породы Wistar, в объемном соотношении микроносителей к раствору коллагена 1 : 3. Раствор коллагена получали по описанной ранее методике [10], такой раствор содержит около 60% коллагена I типа. Полученную смесь инкубировали при перемешивании в течение 12 ч при комнатной температуре. Далее полученные альгинатные микроносители, покрытые коллагеном, центрифугировали в течение 15 мин при 1800 г и переносили в раствор, содержащий 5 мМ дигидрофосфата натрия и 100 мМ хлорида натрия с pH 6. Полученные микроносители покрывали вторым слоем коллагена по аналогичному протоколу.

Для доказательства ковалентной пришивки коллагена к поверхности альгинатных микроносителей сами микроносители были окрашены красителем Кумасси R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250). Для окрашивания использовали 15-кратный раствор красителя в смеси этанола, дистиллированной воды и ледяной уксусной кислоты в объемном соотношении 4 : 4 : 1 с концентрацией 2.5 мг/мл. Перед

окрашиванием микроносители отмывали от несвязавшегося белка путем двукратного центрифугирования в течение 15 мин при 1800 г в дистиллированной воде. Затем микроносители переносили в однократный раствор красителя на 30 мин и отмывали аналогичным путем. Таким образом была доказана ковалентная пришивку коллагена к поверхности альгинатных микроносителей. На рис. 1б представлено изображение окрашенных микроносителей. Было выявлено равномерное окрашивание поверхности микроносителей. Также важно отметить, что производственные манипуляции по модификации поверхности не приводят к разрушению микроносителей, их деформации и агрегации. Альгинатные микроносители были окрашены аналогичным способом, микроносители также сохранили характерные размеры и форму, однако окрашивания выявлено не было (рис. 1а).

Коллаген I типа является самым распространенным белком межклеточного матрикса и играет ключевую роль в поддержании его структурной и функциональной целостности, а также является важной функциональной биомолекулой. Молекула коллагена содержит последовательности аминокислот, которые обеспечивают специфическое связывание с рецепторами-интегринами на поверхности клеток. Такое взаимодействие приводит к активации внутриклеточных цитоплазматических сигнальных каскадов. Адгезия клеток, обусловленная взаимодействием с интегринными, играет ключевую роль во многих биологических процессах, таких как эмбриогенез, поддержание гомеостаза и формирование и регенерация тканей [11]. Таким образом, введение коллагена в состав конструкций для тканевой инженерии и регенеративной медицины может значительно увеличить жизнеспособность клеток на поверхности

микроносителей. Кроме того, разработанный протокол модификации может быть адаптирован для получения альгинатных микроносителей с поверхностью, модифицированной различными белками и их комплексами, что позволит получить широкий спектр микроносителей с различными свойствами для культивирования и доставки клеток для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена частично при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2598.2020.7.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Panas-Perez E., Gatt C.J., Dunn M.G.* Development of a silk and collagen fiber scaffold for anterior cruciate ligament reconstruction // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013. V. 24. P. 257–265.
2. *She Z., Jin C., Huang Z., et al.* Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization, and culture with HepG2 cell // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008. V. 19. P. 3545–3553.
3. *Soffer L., Wang X., Zhang X., et al.* Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts // *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. 2008. V. 19. N5. P. 653–664.
4. *Kotliarova M., Goncharenko A., Arkhipova A., et al.* Microcarriers based on silk fibroin for cultivation and directional osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *FEBS Journal*. 2017. V. 284. P. 382.
5. *Боброва М.М., Сафонова Л.А., Ефимов А.Е., и др.* Микроносители в виде волокон из натурального шелка для культивирования клеток // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020. Т. 22. № 4. С. 98–104.
6. *Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., et al.* Cryo scanning probe nanotomography study of the structure of alginate microcarriers // *RSC Advances*. 2017. № 7. P. 8808–8815.
7. *Quittet M.S., Touzani O., Sindji L., et al.* Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat // *Acta Biomaterialia*. 2015. V. 15. P. 77–88.
8. *Vepari C., Kaplan D.L.* Silk as a Biomaterial // *Progress in Polymer Science*. 2007. V. 32. P. 991–1007.
9. *Wang Y., Fan S., Li Y., et al.* Silk fibroin/sodium alginate composite porous materials with controllable degradation // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. V. 1. № 150. P. 1314–1322.
10. *Сафонова Л.А., Боброва М.М., Агапова О.И., и др.* Биологические свойства пленок из регенерированного фиброина шелка // *Современные технологии в медицине*. 2015. Т. 7. № 3. С. 6–13.
11. *Luo J., Tong Y.* Self-Assembly of Collagen-Mimetic Peptide Amphiphiles into Biofunctional Nanofiber // *ACS Nano*. 2011. V. 5. № 10. P. 7739–7747.

## SURFACE MODIFICATION OF ALGINATE MICROCARRIERS FOR IMPROVEMENT OF THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES

L. A. Safonova<sup>a</sup>, M. M. Bobrova<sup>a</sup>, A. E. Efimov<sup>a</sup>, O. I. Agapova<sup>a</sup>,  
I. I. Agapov<sup>a, #</sup>, and academician of the RAS S. V. Gautier<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> *Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Sechenov University, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: igor.agapov@gmail.com*

The obtaining of microcarriers for the cell culture and delivery is an urgent task of tissue engineering and regenerative medicine. The novel method of surface modification of alginate microcarriers in the form of microspheres with a diameter of 200–300 μm was developed. The described method consists in covalent crosslinking between collagen and surface of alginate microcarriers. It was shown that the method makes it possible to completely modify the surface of the alginate microcarrier, which can be used to improve the biological properties of the microcarrier. Such microcarriers with improved biological properties can be considered as effective systems for cell delivery and culture.

*Keywords:* microcarriers, alginate, collagen, covalent crosslinking, cell carrier