

СТАТЬИ

УДК 57.04:576.5

**ВЛИЯНИЕ ДОБАВОК НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ГИДРОГЕЛЕЙ
НА ОСНОВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА**

¹Алексеев В.А., ²Мамаева С.Н., ¹Павлова Н.И.

¹ФГБОУ ВО «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск,
e-mail: vldslvalexseev@gmail.com;

²ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», Якутск

Регенеративная медицина является перспективной и активно развивающейся отраслью на стыке медицины, биологии, материаловедения и инженерии, основной целью которой является улучшение регенеративных способностей организма человека через разработку новых технологий и материалов. Благодаря своим свойствам, гидрогели, в частности гидрогели на основе внеклеточного матрикса (ВКМ), имеют большой потенциал применения в регенеративной медицине. Однако одним из немногочисленных недостатков ВКМ гидрогелей являются их слабые адгезивные свойства, что ограничивает возможность их применения и затрудняет аппликацию на раневую поверхность. В данной работе мы попытались улучшить адгезивные свойства и вязкость гидрогелей, полученных из внеклеточного матрикса свиных мочевого пузыря при помощи таких добавок, как агар и альгинат натрия, которые имеют широкий спектр применения в косметологии, пищевой промышленности и медицине. Органолептический анализ показал, что вязкость и адгезивные свойства гидрогелей на основе ВКМ значительно изменились после добавления агара и альгината натрия в определенной пропорции. Мы надеемся, что данная модификация найдет практическое применение и расширит применение ВКМ гидрогелей в ветеринарии, а также поможет облегчить проведение доклинических испытаний подобных материалов для будущего их применения в медицине.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, ВКМ, гидрогель, регенеративные материалы

**EFFECT OF ADDITIVES ON ADHESIVE PROPERTIES
OF ECM HYDROGELS**

¹Alekseev V.A., ²Mamaeva S.N., ¹Pavlova N.I.

¹Yakut Science Center of Complex Medical Problems, Yakutsk, e-mail: vldslvalexseev@gmail.com;

²M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk

Regenerative medicine is a promising and rapidly developing field standing on the intersection of medicine, biology, material science and engineering, the main goal of which is to enhance the regenerative abilities of the human body through the development of new technologies and materials. Due to their properties, hydrogels, in particular those based on extracellular matrix (ECM), have great potential for application in regenerative medicine. However, one of the few disadvantages of ECM hydrogels is their weak adhesive properties, which limits their use and make their application to the wound surfaces very difficult. In this study, we tried to improve the adhesive properties and viscosity of hydrogels derived from the extracellular matrix of porcine urinary bladders using additives such as agar and sodium alginate, which have a wide range of applications in cosmetics, food industry and medicine. Organoleptic analysis showed that the viscosity and adhesive properties of ECM-based hydrogels changed significantly after the addition of agar and sodium alginate in a certain proportion. We believe that this modification will find practical application and expand the use of ECM hydrogels in veterinary medicine, and also facilitate preclinical testing of such materials for their future application in medicine.

Keywords: extracellular matrix, ECM, hydrogel, regenerative materials

В последнее время все большее внимание в регенеративной медицине стало уделяться децеллюляризованным биологическим тканям и их производным [1]. И если раньше в хирургии в основном использовали такие материалы в форме заплаток или объемных структур, например применимо к сердцу [2], печени [3], трахее [4] и т.д. то в последнее время стало появляться все больше исследований и разработок связанных с использованием гелеобразных материалов. Преимущество последних заключается в том, что они сами принимают необходимую форму, а также могут быть доставлены в необходимое место минимально инвазивным способом.

Основой децеллюляризованных тканей является внеклеточный матрикс (ВКМ), который представляет собой сложный трехмерный комплекс из фибриллярных белков и других биополимеров и является каркасом и средой, в которой существуют клетки многоклеточных животных организмов [5–7]. ВКМ обеспечивает не только структурную функцию, но также участвует во многих клеточных процессах, включая коммуникацию и взаимодействие между клетками, их миграцию и дифференцировку, что отчасти обусловлено содержанием в ВКМ различных ростовых факторов и других сигнальных молекул [8, 9]. Так как белки и другие компоненты, входящие в состав межклеточ-

ного матрикса, практически идентичны среди млекопитающих, это позволяет использовать ВКМ животного происхождения для его применения по отношению к человеку, ввиду сведения к минимуму (или практически исключения) иммунного отторжения организмом человека материалов, созданных на основе животного ВКМ [7].

Внеклеточный матрикс в форме гидрогелей и их производных является идеальной средой для клеток, поэтому применение именно гелевых форм регенеративных материалов наиболее оптимально при таких поражениях, как термические ожоги, инфаркт и др. Для эффективного результата использования гидрогелей в регенеративной медицине они должны обладать определенными свойствами и характеристиками, такими как вязкость, адгезия, плотность, pH и т.д. В данной работе мы попытались изменить адгезивные свойства ВКМ гидрогеля при помощи полисахаридных добавок агара и альгината натрия.

Целью данного исследования являлось улучшение адгезивных свойств и вязкости гидрогелей на основе внеклеточного матрикса при помощи добавок для их более надежной фиксации на раневой поверхности.

Материалы и методы исследования

Внеклеточный матрикс получали из свиных мочевых пузырей, которые были собраны непосредственно после убоя животных. Органы были тщательно промыты дистиллированной водой, а излишки жировой ткани были удалены. Очищенные мочевые пузыри были взвешены и заморожены при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего использования. Замороженный мочевой пузырь размораживали в дистиллированной воде и тщательно промывали 3 раза. Далее органы погружали в фосфатный буфер на 15 мин. Внутренний слой рыхлой соединительной ткани мочевого пузыря (*lamina propria*) отделялся механически, при помощи ножниц и скальпеля. Ткань промывалась 4 раза дистиллированной водой, затем 2 раза фосфатным буфером. Промытую ткань помещали в 1М раствор NaCl и инкубировали на орбитальном шейкере при 200 об/мин в течение суток. Раствор меняли три раза в ходе инкубации по мере отмытки. После инкубации, ткань промывали 3 раза дистиллированной водой на шейкере при тех же условиях в течение 15 мин на каждую промывку. Отмытая ткань помещалась на полтора часа в раствор 0,1 % надуксусной кислоты и 4% этанола для обеззараживания. После обеззараживания, ткань промывали дистиллированной водой на шейкере 4 раза по 15 мин. На этом этапе обработки были

взяты образцы ткани для дальнейшего гистологического исследования и электронной микроскопии.

После промывки ткань лиофилизировали в течение суток до полного удаления влаги при помощи лиофильной сушки FreeZone 1L (Labconco). Высушенный внеклеточный матрикс стерилизовали ультрафиолетовым излучением внутри ламинарного бокса в течение 1 ч, после чего нарезали при помощи ножниц на небольшие куски размером 3–5 мм. Все подготовительные манипуляции с внеклеточным матриксом проводились внутри ламинарного бокса. Нарезки материала помещались в заранее подготовленные стерильные размольные стаканы, куда также добавляли 2 стальных шара. Подготовленные закрытые размольные стаканы с предварительно размельченным материалом и шарами погружались на 3 минуты в жидкий азот, для предотвращения нагрева измельчаемого материала. Затем размольные стаканы фиксировались в зажимах вибрационной мельницы GT200 (Grinder). Образцы измельчали при 1800 об/мин в течение 10 мин. Измельченный порошок (рис. 1, А) переносили в стерильную пробирку внутри ламинарного бокса для дальнейшей обработки.

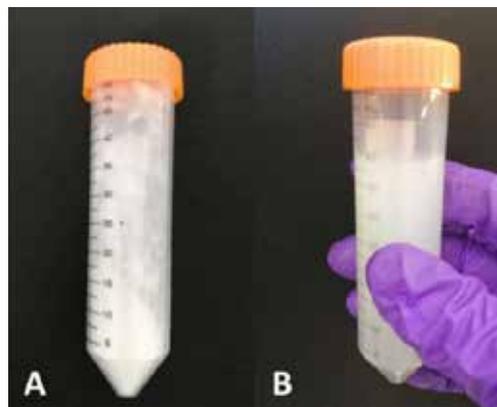


Рис. 1. А) Порошкообразный ВКМ.
В) Растворенный ВКМ
до момента гелеобразования

Для оценки качества децеллюляризации *lamina propria* и её морфологии использовали стандартное окрашивание гематоксилин-эозином с последующим анализом фиксированных препаратов с использованием светового микроскопа. По-видимому, ввиду изначального малого содержания клеточек в данной ткани мы не наблюдали интенсивного окрашивания ядер на срезах необработанных образцов (рис. 2, А), образцы после интенсивной отмытки полностью теряли клеточные элементы и давали очень слабое окрашивание (рис. 2, В).

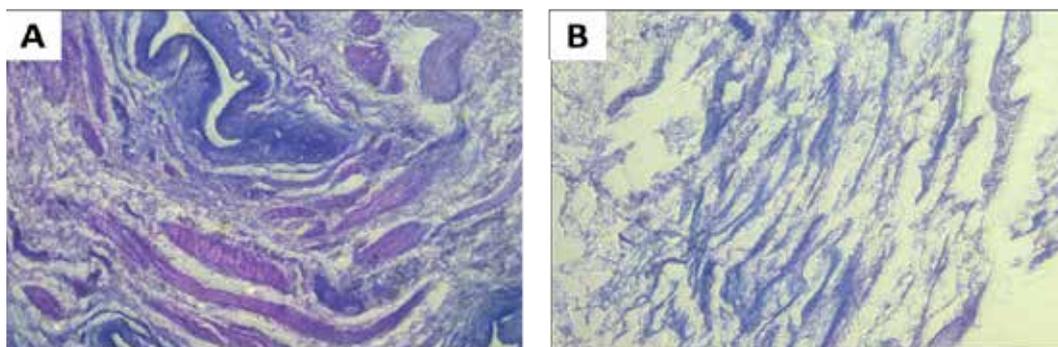


Рис. 2. Гистологические срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, до (А) и после децеллюляризации (В)

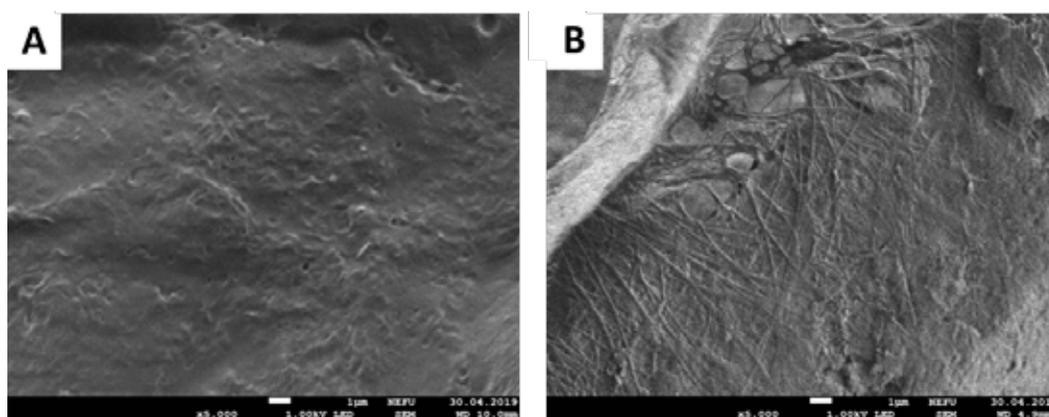


Рис. 3. Микрофотографии, сделанные при помощи метода сканирующей электронной микроскопии при 5000-кратном увеличении, до (А) и после децеллюляризации (В)

Для визуализации структуры ткани до и после обработки применяли растровую (сканирующую) электронную микроскопию с использованием микроскопа JEOL JSM 7800F с разрешающей способностью 1,2 нм при ускоряющем напряжении 1 кВ с термоэлектронным катодом Шоттки и с системой Gentle Veem, позволяющую сканировать объекты нанометрового размера без проводящих покрытий образцов в режиме низких ускоряющих напряжений (1–2 кВ). На полученных микрофотографиях отчетливо видна волокнистая структура, характерная для очищенного внеклеточного матрикса (рис. 3).

Результаты исследования и их обсуждения

Гидрогель из сухого ВКМ был получен по методике, описанной ранее [10] с небольшими модификациями. Вкратце 400 мг порошкообразного ВКМ растворяли в 40 мл раствора пепсина 1 мг/мл в 0,01N HCl. Смесь инкубировали на орбитальном шейкере при комнатной температуре течение

48 ч. После инкубации пре-гель (рис. 1, В) пропускали через нейлоновый фильтр с размером ячейки 100 микрон, для удаления нерастворенных частиц. Далее, пепсин, содержащийся в растворе, инактивировали добавлением 0,1 N NaOH до достижения pH 7,4. Гелеобразование было индуцировано нагреванием раствора на водяной бане до 37 °C в течение 45 мин. Готовый гель доводили до нужной концентрации при помощи фосфатного буфера для использования в дальнейших экспериментах.

Полученный нами ВКМ гидрогель имел нестабильную консистенцию. Это выразилось достаточно твердой желеобразной структурой непосредственно после гелеобразования, однако после хранения в холодильнике или резкой встряски он необратимо переходил в жидкое состояние. Мы предположили, что это могло быть вызвано избытком жидкости в его составе. Поэтому часть жидкости была удалена из геля при помощи центрифугирования в течение 5 мин при 14000 об/мин. В результате объем гидрогеля уменьшился вдвое, однако он стал более плотным.

Характеристики ВКМ гидрогеля в зависимости от состава

Компонент/состав	Адгезивные свойства	Плотность	Гомогенность	Стабильность
2% агар	низкие, смесь не проявляла адгезивных свойств	высокая	высокая	низкая, смесь расслоилась на фракции спустя некоторое время
4% альгинат натрия	средние, легкое прилипание к поверхности	низкая	высокая	высокая
4% альгинат натрия в присутствии ионов Ca^{2+}	низкие, смесь не проявляла адгезивных свойств	средняя	низкая	высокая
6,4% альгинат натрия	средние	средняя	высокая	высокая
1,6% агар и 3,2% альгинат натрия в фосфатном буфере	высокие	средняя	высокая	высокая

Стоит отметить, что внеклеточный матрикс, подвергшийся измельчению в вибрационной шаровой мельнице, давал более гомогенный раствор после обработки пепсином нежели измельченный при помощи режущей мельницы в предыдущих экспериментах.

Адгезивные свойства полученного гидрогеля были очень низкими, в связи с чем нами была предпринята попытка изменить консистенцию и адгезию гидрогеля добавлением дополнительных веществ.

Для этой цели были выбраны два кандидата, нейтральных, безопасных и широко используемых в косметологии, пищевой промышленности и медицине, а именно агар (#141792.1208, Panreac) и альгинат натрия (#A3249, AppliChem). Компоненты нагревали до 80 °С и перемешивали на шейкере при 1200 об/мин до полного растворения. Затем полученную смесь охлаждали до комнатной температуры и смешивали с ВКМ гидрогелем. Готовую смесь доводили до нужной концентрации фосфатным буфером.

Нами было опробовано несколько комбинаций состава и концентраций агара и альгината натрия, из которых смесь с объемным соотношением 1,6 и 3,2% соответственно показала наилучшие результаты по сравнению с другими вариантами (таблица). Мы также протестировали различные концентрации обоих загустителей. Также, согласно литературным данным, присутствие ионов кальция улучшает кинетику гелеобразования альгината натрия посредством сшивания его молекул между со-

бой [11, 12]. Поэтому в одном из вариантов мы добавили небольшое количество хлорида кальция в раствор альгината натрия.

Как и ожидалось, концентрированные растворы ($\geq 2\%$) приводили к образованию плотных хрупких гелей, которые весьма затруднительно наносить на раневую поверхность, а более низкая концентрация приводила к очень текучим гелеобразным растворам, которые просто стекали с поверхности.

Мы считаем, что разработанный нами состав может стать основой для гелеобразных регенеративных материалов и может облегчить применение внеклеточного матрикса в медицине и ветеринарии.

Заключение

В данной статье мы описали быстрый и недорогой способ модификации гидрогелей на основе внеклеточного матрикса для придания им необходимых свойств, необходимых для их удобного и эффективного применения в ветеринарии и медицине. Нами было опробовано несколько комбинаций состава и концентраций агара и альгината натрия, среди них смесь с объемным соотношением 1,6 и 3,2% соответственно показала наилучшие адгезивные свойства по сравнению с другими вариантами. В своих будущих экспериментах мы планируем протестировать другие возможные добавки и загустители, а также планируем проведение серии экспериментов с использованием клеточных культур и лабораторных животных, для выявления наиболее оптимальной формулы разрабатываемого регенеративного гидрогеля.

Список литературы

1. Harrison R.H., St-Pierre J.P., Stevens M.M. Tissue engineering and regenerative medicine: a year in review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014. No. 20 (1). P. 1–16.
2. D'Amore A., Yoshizumi T., Luketich S.K., Wolf M.T., Gu X., Cammarata M., Hoff R., Badylak S.F., Wagner W.R. Bi-layered polyurethane – Extracellular matrix cardiac patch improves ischemic ventricular wall remodeling in a rat model. *Biomaterials.* 2016. No. 107. P. 1–14.
3. Nobakht Lahrood F., Saheli M., Farzaneh Z., Taheri P., Dorraj M., Baharvand H., Vosough M., Piryaei A. Generation of Transplantable Three-Dimensional Hepatic-Patch to Improve the Functionality of Hepatic Cells In Vitro and In Vivo. *Stem Cells Dev.* 2020. No. 29 (5). P. 301–313.
4. Lei C., Mei S., Zhou C., Xia C. Decellularized tracheal scaffolds in tracheal reconstruction: An evaluation of different techniques. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2021. 19:2280800021106494.
5. Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *J Glaucoma.* 2014. No. 23 (8 Suppl 1). P. 20–23.
6. Kular J.K., Basu S., Sharma R.I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng.* 2014. No. 5:2041731414557112.
7. Badylak S.F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials.* 2007. No. 28 (25). P. 3587–3593.
8. Wilgus T.A. Growth Factor-Extracellular Matrix Interactions Regulate Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012. No. 1 (6). P. 249–254.
9. Schultz G.S., Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009. No. 17 (2). P. 153–162.
10. Freytes D.O., Martin J., Velankar S.S., Lee A.S., Badylak S.F. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials.* 2008. No. 29 (11). P. 1630–1637.
11. Hecht H., Srebnik S. Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. *Biomacromolecules.* 2016. No. 17. P. 2160–2167.
12. Mession J.L., Blanchard C., Mint-Dah F.V., Lafarge C., Assifaoui A., Saurel R. The effects of sodium alginate and calcium levels on pea proteins cold-set gelation. *Food Hydrocolloids.* 2013. No. 31 (2). P. 446–457.