

УДК 544.778.3+547-316+544.723.212+621.318.134

*К. В. ЛАЗНЕВ, академик В. Е. АГАБЕКОВ***СВЯЗЫВАНИЕ ГЕЛЕВЫХ МАГНИТНЫХ МИКРОСФЕР
С МОНОУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ***Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь
kvlaznev@mail.ru; agabekov@ichnm.basnet.by*

Покрытие поливиниловым спиртом (ПВС) магнитных микросфер (ММС) на основе хитозана, сшитого глутаральдегидом, уменьшает их неспецифическое связывание с моноуклеарными клетками крови (МНК) эффективнее, чем покрытие карбоксиметилдекстраном со степенью карбоксилирования <10 %. Поливинилспиртовые ММС, покрытые дополнительным слоем ПВС после сшивки глутаральдегидом, в т. ч. функционализированные карбоксильными группами благодаря обработке H_2O_2 , характеризуются низким неспецифическим связыванием с МНК. В осадке после магнитной сепарации на одну клетку приходится 4670 ± 760 поливинилспиртовых ММС, обработанных 4 % H_2O_2 , а коммерческих ММС Magnosphere™ MS300/Carboxyl – 2040 ± 400 .

Ключевые слова: поливиниловый спирт, иммуномагнитная сепарация, микросферы, лейкоциты, неспецифическое связывание.

*K. V. LAZNEV, V. E. AGABEKOV***BINDING OF MAGNETIC GEL MICROSPHERES TO BLOOD MONONUCLEAR CELLS***Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
kvlaznev@mail.ru; agabekov@ichnm.basnet.by*

A polyvinyl alcohol (PVA) coating decreases the non-specific binding of magnetic microspheres (MMS) composed of glutaraldehyde-cross-linked chitosan to blood mononuclear cells (BMC) more efficiently than a carboxymethyl dextran (carboxylation degree <10 %) coating. PVA-composed MMS coated with an additional PVA layer after glutaraldehyde cross-linking, including ones functionalized with carboxyl groups due to the H_2O_2 treatment, demonstrate low non-specific binding to BMC. In the pellets resulting from magnetic separation, there were 4670 ± 760 PVA MMS and 2040 ± 400 Magnosphere™ MS300/Carboxyl commercial MMS per one BMC.

Keywords: polyvinyl alcohol, immunomagnetic separation, microspheres, leukocytes, nonspecific binding.

Введение. Иммуномагнитная сепарация применяется в медицине, биологии и биотехнологии. Метод основан на способности магнитных микросфер (ММС) селективно связываться с определенными клетками или молекулами в биологической или культуральной жидкости и затем осаждаться магнитом. В настоящее время этим способом получают очищенные на 95–99 % клеточные фракции с производительностью до 10^{10} клеток в час. Иммуномагнитная сепарация применяется в тканевой инженерии и регенеративной медицине (получение стволовых клеток и клеток-предшественниц для последующего культивирования; очистка трансплантируемого материала от лейкоцитов), а также для диагностики и мониторинга течения заболеваний (в частности, обнаружения циркулирующих опухолевых клеток и редких популяций лейкоцитов) [1].

Поверхность ММС, применяемых для сепарации клеток, должна обладать как можно меньшей способностью к неспецифическому связыванию с плазматической мембраной клетки и нести молекулы-лиганды (например, антитела), обеспечивающие селективное связывание ММС с определенной клеточной популяцией. Неспецифическое связывание с клетками уменьшается за счет покрытия ММС гидрофильными нейтральными полимерами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (ПВС) [2] и полисахариды (декстран) [2; 3], которые в фи-

зиологической среде химически инертны. Для иммобилизации лигандов, ответственных за селективность связывания, в состав покрытия ММС должны быть введены реакционно активные группы: карбоксильные, аминные, тиольные или эпоксидные [4]. Количество заряженных групп не должно быть избыточным во избежание потери полимером способности блокировать неспецифическую адгезию клеток, причем наличие в составе гидрофильной поверхности аминогрупп в большей степени способствует адгезии, чем присутствие карбоксильных [5].

Цель работы – путем модификаций поверхности гелевых ММС на основе желатина, хитозана и ПВС уменьшить их неспецифическое связывание с мононуклеарными клетками крови (МНК) до уровня коммерческих ММС Magnosphere™ MS300/Carboxyl (полистироловых с гидрофильным покрытием), обеспечив при этом наличие в составе поверхности функциональных групп.

В качестве модельного биологического объекта были выбраны МНК ввиду их доступности, гетерогенности фенотипа, а также с учетом того, что МНК содержатся в крови и костном мозге – наиболее широко применяемых источниках клеточного материала для регенеративной медицины [1].

Экспериментальная часть.

Наночастицы магнетита получали по методике, упрощенной по сравнению с применявшейся нами ранее [6]: смешивали 180 мкл раствора FeSO_4 0,36М подкисленного и 320 мкл раствора FeCl_3 0,37М; добавляли полученный раствор в пробирку с 200 мкл 25 %-ного раствора NH_3 на вортексе; инкубировали 15 мин при 60 °С; осаждали магнитом, трижды отмывали 2 мл дистиллированной воды.

Для получения *магнитной жидкости* (МЖ) на основе желатина к 10 мкл сконцентрированной суспензии магнетита добавляли 1 мл фракции пищевого желатина (РБ), полученной путем преципитации ацетоном [7], удаления жидкой (низкомолекулярной) фракции и перерастворения преципитата в дистиллированной воде. Обрабатывали ультразвуком (УЗ) 22 кГц 100 Вт до кипения.

Для получения *МЖ на основе хитозана* к 10 мкл сконцентрированной суспензии магнетита добавляли 50 мкл ледяной уксусной кислоты, 400 мкл дистиллированной воды и 500 мкл раствора хитозана 1,5 %_{м/об} и обрабатывали УЗ 22 кГц 100 Вт до кипения.

Для получения *МЖ на основе ПВС* к 10 мкл сконцентрированной суспензии магнетита добавляли 50 мкл ледяной уксусной кислоты, 200 мкл дистиллированной воды и 250 мкл ПВС (ГОСТ 10779–78, марка 11/2) 10 %_{м/об} и обрабатывали УЗ 22 кГц 100 Вт до кипения.

Эмульгирование и сшивку МЖ проводили, внося по 200 мкл в 2400 мкл раствора Tween 85 1,5 %_м и Span 85 2,8 %_м в изооктане (ИО/ПАВ) и пипетируя 5 мин на водяной бане при 60 °С. Для пипетирования использовали дозатор 150 мкл с наконечником 200 мкл, укороченным до выходного сечения ≈ 1 мм², приводимый с частотой ≈ 400 Гц электромешалкой с зажатым в патрон эксцентриком. По окончании пипетирования суспензию отстаивали 5 мин и удаляли прозрачную фракцию. Эмульсии МЖ обрабатывали сшивающим агентом – глутаральдегидом (ГА). В 2400 мкл ИО/ПАВ вносили 100 мкл раствора CaCl_2 1М и ГА 25 %_{об} в дистиллированной воде, обрабатывали УЗ 22 кГц 100 Вт до прозрачного состояния и объединяли с эмульсией МЖ. Эмульсию МЖ на основе желатина пипетировали с ГА 30 мин при комнатной температуре; на основе хитозана 30 мин при 70 °С; на основе ПВС 1 ч при 60 °С. Полученные ММС осаждали магнитом.

ММС на основе желатина отмывали 5 %-ным раствором ГА в этаноле и дважды – дистиллированной водой, суспендировали в сшивающем буфере (ГА 15 %_{об}, NaCl 0,5М, фосфатов натрия (NaP_i) 0,2 М, рН 7), инкубировали при комнатной температуре в течение ночи и трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) рН 7,4 (Sigma кат. № Р4417).

ММС на основе хитозана отмывали 5 %-ным раствором ГА в этаноле и дважды – буфером NaCl 0,5М, фосфаты натрия 0,2 М, рН 7, суспендировали в сшивающем буфере такого же состава, как и применявшийся для получения ММС на основе желатина, перемешивали при 70 °С 1 ч и трижды отмывали ФСБ рН 7,4.

ММС на основе ПВС инкубировали в 5 %_{об} растворе ГА в этаноле 2 мин при 60 °С и трижды отмывали дистиллированной водой.

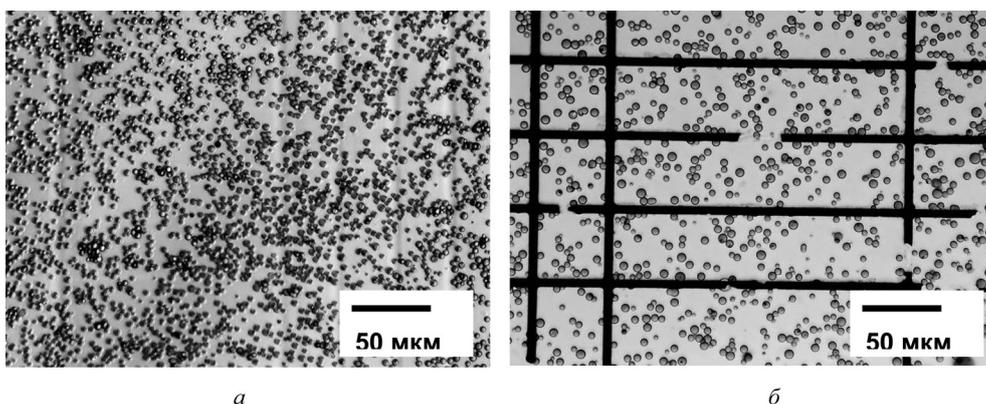


Рис. 1. Оптические изображения ММС: *а* – хитозановых, средний диаметр 2,9 мкм; *б* – поливинилспиртовых, средний диаметр 4,2 мкм

Полученные ММС имели средний размер 3–5 мкм, коэффициент полидисперсности $\approx 0,1$ (рис. 1).

Карбоксилирование декстрана (60 кДа) проводили в растворе бромуксусной кислоты 0,125М и NaOH 2М с перемешиванием в течение 8 ч. Доводили pH до 3,0, диализовали и высушивали. Для характеристики КМД определяли дзета-потенциал покрытых им наночастиц CdSe/ZnS (PlasmaChem кат. № PL-QD-O-560).

Модификация микросфер КМД. 1 мг КМД и 2 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида (EDC) растворяли в 500 мкл MES-буфера – 0,1 М р-ра 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты в воде, pH 5. К полученному раствору добавляли 250 мкл суспензии ММС в MES-буфере 0,1М pH 5, приготовленной непосредственно после сшивки; инкубировали с перемешиванием 2 ч при 37 °С, отмывали дистиллированной водой и ФСБ pH 7,4.

Модификация микросфер глицином. Непосредственно после сшивки ММС инкубировали 30 мин при 60 °С в растворе глицина 0,25 %_{м/об}, NaCl 0,5М, фосфаты натрия 0,2 М, при pH 7 или 9, или в растворе глицина 0,5 %_{м/об}, уксусной кислоты 10 %_{об}, затем трижды отмывали дистиллированной водой.

Модификация микросфер ПВС. Непосредственно после сшивки ММС ресуспендировали в водном растворе ПВС 0,5 %_{м/об} и уксусной кислоты 10 %_{об}, обрабатывали УЗ 22 кГц 100 Вт до кипения, перемешивали 45 мин при 60 °С и трижды отмывали дистиллированной водой.

Модификация микросфер ПВС и глицином. Непосредственно после сшивки ММС суспендировали в водном растворе ПВС 0,5 %_{м/об}, глицина 0,5 %_{м/об} и уксусной кислоты 10 %_{об}, обрабатывали УЗ 22 кГц 100 Вт до кипения, перемешивали 45 мин при 60 °С и трижды отмывали дистиллированной водой.

Обработка перекисью водорода. ММС суспендировали в водном растворе, содержащем 10 %_{об} уксусной кислоты и 4,5 %_{об} или 15 %_{об} H₂O₂, перемешивали 45 мин при 70 °С, дважды отмывали дистиллированной водой и один раз – буфером NaCl 0,5М, NaP_i 0,2М при pH 9.

Обработка боргидридом натрия. Финальной стадией синтеза и модификации всех микросфер была обработка боргидридом натрия для конверсии непрореагировавших альдегидных групп в спиртовые, а оснований Шиффа (продуктов сшивки) – во вторичные амины. Проводили 2 цикла обработки NaBH₄ 10 мг/мл в буфере NaCl 0,5М, NaP_i 0,2М, pH 9, 20 мин при 60 °С, в конце первого цикла – обработка УЗ 22 кГц 50 Вт в течение 15 с. Восстановленные боргидридом ММС трижды отмывали PBS и ресуспендировали в PBS.

Связывание ММС с клетками. Мононуклеарные клетки крови (МНК) получали по стандартной методике [8] центрифугированием крови, стабилизированной этилендиаминтетраацетатом натрия (Na₂ЭДТА), на гистопаке (Sigma кат. № 10771). Отмывали ФСБ pH 7,4 с добавкой 10⁻⁵М красителя Hoechst-3342 для витального окрашивания ядер, затем – ФСБ pH 7,4 без красителя и сепарационной средой (СС) состава: ФСБ pH 7,4 с добавками 0,5 %_{м/об} бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 2 мМ Na₂ЭДТА. Суспензии ММС и МНК в СС объединяли, обеспечивая со-

отношение ММС : МНК 10 : 1, инкубировали 20 мин при 4 °С, перемешивая каждые 5 мин, и проводили 3 цикла магнитной сепарации, каждый раз удаляя супернатант и ресуспендируя осадок в свежей СС. Клетки в осадке идентифицировали по синей флуоресценции ядер при освещении в ультрафиолетовой области спектра на люминесцентном микроскопе «Планар Микро МБ» (Беларусь).

Результаты и их обсуждение. Сшитые ГА и восстановленные боргидридом натрия желатиновые и хитозановые ММС без покрытия характеризуются высоким неспецифическим связыванием с МНК. Это характерно для частиц, несущих на поверхности значительное количество заряженных групп, особенно катионных [3; 5]. Неспецифическое связывание поливинилспиртовых ММС на порядок меньше, чем хитозановых (таблица).

Соотношения ММС : МНК в осадке после магнитной сепарации

ММС			ММС : МНК
Полимер ядра	Полимер оболочки	Модификация оболочки	
Желатин	–	–	110 ± 30
Хитозан	–	–	180 ± 40
	ПВС	–	720 ± 190
	КМД	–	280 ± 10
ПВС	–	–	2960 ± 540
		глицин в присутствии CH ₃ COOH	180 ± 20
		глицин при pH 7	1000 ± 110
		глицин при pH 9	130 ± 40
	ПВС	–	4800 ± 600
		глицин	4000 ± 1100
		H ₂ O ₂ (15%)	3600 ± 410
		H ₂ O ₂ (4%)	4670 ± 760
Magnosphere™ MS300/Carboxyl			2040 ± 400

В результате обработки ПВС неспецифическое связывание хитозановых ММС с МНК уменьшается в 4 раза, но остается в 4,1 раза больше, чем у поливинилспиртовых ММС (таблица). Можно предположить, что применявшаяся методика обработки не обеспечивает полного покрытия микросфер ПВС либо происходит появление участков хитозановых цепей на поверхности обработанных ММС в результате их диффузии. Известно, что даже для сшитых полимеров характерна определенная степень диффузии; этим явлением объясняется, в частности, зависимое от времени упрочнение пленок, сформированных из латексных микросфер [9].

При обработке хитозановых микросфер КМД их неспецифическое связывание с МНК уменьшается в 1,6 раза (таблица, рис. 2, а). Сравнение дзета-потенциала покрытых КМД наночастиц ($\zeta = -4,3 \pm 0,5$ В при pH 7) с данными [10] позволяет заключить, что применявшийся КМД имеет степень карбоксилирования менее 10 %.

Модификация поливинилспиртовых ММС глицином (с целью обеспечить наличие карбоксильных групп в составе поверхности) увеличивает количество связываемых ими МНК в 3–23 раза (таблица). Обработка глицином при pH 7 меньше влияет на связывание ММС с МНК, чем в кислой и щелочной средах. Известно, что в нейтральных и щелочных условиях преобладающая реакция альдегидов с аминокислотами – образование оснований Шиффа, которое в интервале pH 7–9 практически необратимо и интенсивнее протекает при pH 9, чем при pH 7 [4]. Повышенное связывание ММС, обработанных при pH 9, с МНК, возможно, обусловлено тем, что они несут на поверхности больше иммобилизованного глицина (и, соответственно, карбоксильных групп). Кроме того, при pH 9 ММС проявляют склонность к агрегации, при этом вероятно появление сшивок между контактирующими микросферами за счет наличия на их поверхности свободных альдегидных групп. Механический разрыв этих сшивок при перемешивании суспензии может вносить вклад в модификацию поверхности. Кислая среда способствует гидролизу ацета-

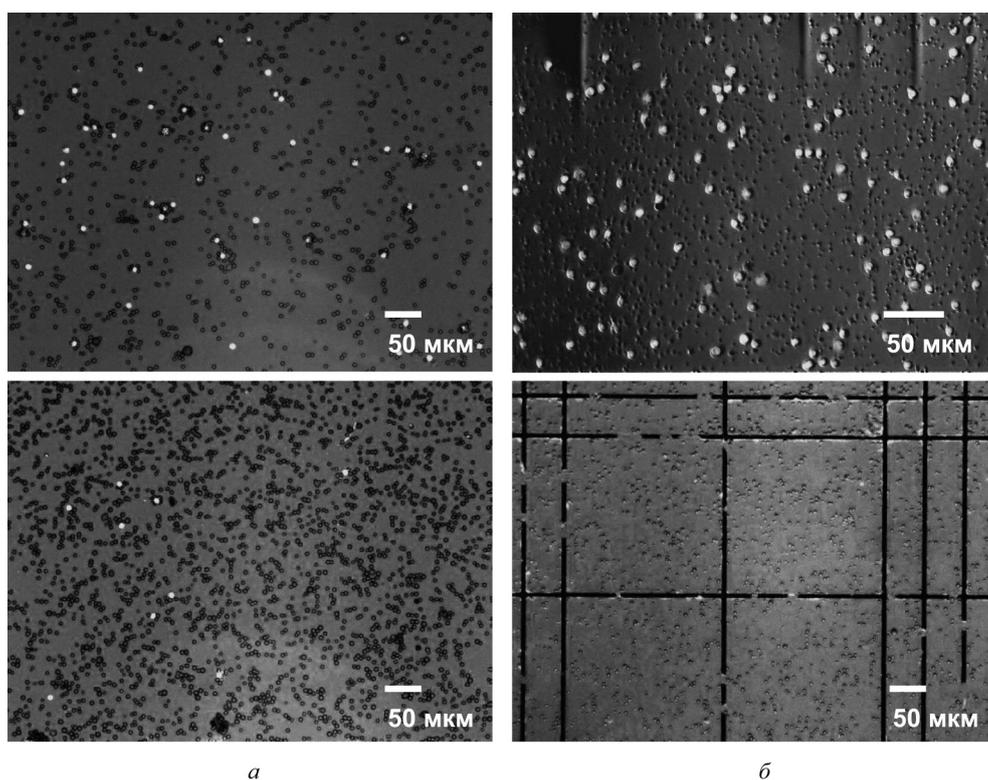


Рис. 2. Магнитная сепарация. Вверху – суспензия клеток и ММС до сепарации, внизу – осадок после сепарации. Светящиеся объекты – ядра клеток. *а* – хитозановые ММС с оболочкой из КМД; *б* – поливинилспиртовые ММС с оболочкой из ПВС

лей, формирование которых лежит в основе сшивки ПВС глутаральдегидом [11]: с уменьшением рН на единицу скорость гидролиза возрастает примерно в 10 раз [12]. Гидролиз, кроме разрыхления ММС, может вести к появлению на их поверхности дополнительных свободных альдегидных групп, а также образованию свободного ГА (включая полимерные формы) [13] и растворимых форм модифицированного глутаральдегидом ПВС. Как следствие возможно протекание целого ряда побочных реакций, которые могут быть ответственны за повышенное связывание с МНК микросфер, модифицированных глицином в присутствии уксусной кислоты.

Обработка поливинилспиртовых ММС дополнительным количеством ПВС, предпринятая с целью уменьшения количества свободных альдегидных групп после удаления из среды глутаральдегида перед восстановлением боргидридом натрия, приводит к снижению неспецифического связывания ММС с МНК в 1,6 раза (таблица, рис. 2, *б*).

Совместная обработка ПВС и глицином поливинилспиртовых ММС, предпринятая непосредственно после сшивки с целью уменьшения количества свободных альдегидных групп и создания групп –СООН, приводит к увеличению неспецифического связывания в 1,2 раза по сравнению с ММС, обработанными ПВС без глицина (таблица).

При обработке H_2O_2 с целью конверсии части альдегидных групп в карбоксильные [14] (не прореагировавшие альдегидные группы затем восстанавливаются боргидридом натрия в спиртовые) неспецифическое связывание поливинилспиртовых ММС с МНК увеличивается в 1,2 раза при использовании 15 %-ного раствора H_2O_2 и практически не изменяется в случае 4 %-ного раствора H_2O_2 (таблица). Этот факт может отражать различие в количестве образующихся на поверхности ММС карбоксильных групп. Известно, что наличие заряженных групп способствует неспецифическому связыванию клеток с гидрофильными поверхностями [5]. В частности, адгезия эндотелиальных клеток к поливинилацетатным пленкам возрастает с увеличением количества групп –СООН на единице поверхности [15]. Таким образом, конверсия большого количества альдегидных групп в карбоксильные нежелательна. Известно также, что при 70 °С катали-

зируемая кислотой реакция окисления альдегидных групп в карбоксильные протекает медленно (выход порядка нескольких процентов в течение 2 ч [14]), что и обусловило выбор данного температурного режима для частичного окисления –СНО в –СООН.

Неспецифическое связывание с МНК поливинилспиртовых микросфер, покрытых после сшивки оболочкой ПВС и модифицированных глицином, меньше, чем у предназначенных для магнитной сепарации биологических материалов коммерческих микросфер Magnosphere™ MS300/Carboxyl в 2,0 раза (таблица). Поливинилспиртовые микросферы, покрытые после сшивки оболочкой ПВС и модифицированные H_2O_2 4 % или 15 %, связывают соответственно в 2,2 и 1,8 раза меньше МНК, чем Magnosphere™ MS300/Carboxyl.

Список использованной литературы

1. *Plouffe, B. D.* Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review / B. D. Plouffe, S. K. Murthy, L. H. Lewis // *Rep. Prog. Phys.* – 2015. – Vol. 78, N 1. – P. 016601. – doi: 10.1088/0034-4885/78/1/016601.
2. *Salmaso, S.* Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers / S. Salmaso, P. Caliceti // *J. Drug Deliv.* – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 374252.
3. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides / A. M. G. C. Dias [et al.] // *Biotechnology Advances.* – 2011. – Vol. 29. – P. 142–155.
4. *Hermanson, G. T.* Bioconjugate Techniques / G. T. Hermanson. – 2nd ed. – Elsevier, 2008.
5. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies / N. Faucheux [et al.] // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25. – P. 2721–2730.
6. Influence of Co amount on the efficiency of energy absorption of Fe-Co ferrite nanoparticles / K. A. Kekalo [et al.] // *J. Magn. Magn. Mater.* – 2009. – Vol. 321. – P. 1514–1516.
7. Gelatin nanoparticles by two-step desolvation – a new preparation method, surface modifications and cell uptake / C. J. Coester [et al.] // *J. Microencapsul.* – 2000. – Vol. 17. – P. 187–193.
8. *Panda, S. K.* Isolation of Human PBMCs / S. K. Panda, B. Ravindran // *Bio-protocol* 3(3): e323. – 2013 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.bio-protocol.org/e323>.
9. *Tamai, T.* Effect of cross-linking on polymer diffusion in poly(butylmethacrylate-co-butyl acrylate) latex films / T. Tamai, P. Pinenq, M. A. Winnik // *Macromolecules.* – 1999. – Vol. 32. – P. 6102–6110.
10. Effect of surface charge on the colloidal stability and in vitro uptake of carboxymethyl dextran-coated iron oxide nanoparticles / V. Ayala [et al.] // *J. Nanopart. Res.* – 2013. – Vol. 15, N 8. – P. 1874.
11. Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilisation / A. M. Araujo [et al.] // *Biotechnology Techniques.* – 1997. – Vol. 1, N 2. – P. 67–70.
12. *Gillies, E. R.* Acetals as pH-sensitive linkages for drug delivery / E. R. Gillies, A. P. Goodwin, J. M. J. Frechet // *Bioconjugate Chem.* – 2004. – Vol. 15. – P. 1254–1263.
13. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking / I. Migneault [et al.] // *BioTechniques.* – 2004. – Vol. 37. – P. 790–802.
14. Hydrogen peroxide oxidation of aldehydes to carboxylic acids: an organic solvent-, halide- and metal-free procedure / K. Sato [et al.] // *Tetrahedron Letters.* – 2000. – Vol. 41, N 9. – P. 1439–1442.
15. Surface chemistry and polymer film thickness effects on endothelial cell adhesion and proliferation / D. Bhattacharyya [et al.] // *Biomed. Mater. Res. A.* – 2010. – Vol. 94. – P. 640–648.

Поступило в редакцию 20.07.2015