

СТРУКТУРА КОМПОЗИТНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ФИБРИНА И ГАЛАКТАНА КАРТОФЕЛЯ

Файзуллин Д.А., Валиуллина Ю.А., Сальников В.В.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН

ул. Лобачевского, 2, г. Казань, 420111, РФ; dfaizullin@mail.ru

Поступила в редакцию: 24.07.20

Аннотация. Композитные белок-полисахаридные гидрогели находят применение при разработке средств доставки и в регенеративной медицине благодаря дешевизне сырья, биосовместимости, малотоксичности и собственной биологической активности компонент. В работе исследована возможность получения композитных гидрогелей с использованием слабозаряженного нежелатирующего полисахарида галактана картофеля и гель-образующего белка фибриногена. Результаты проведенного исследования показывают, что фибриноген связывается с галактаном, сохраняя способность к энзиматической полимеризации. Образующиеся композитные гидрогели состоят из волокон фибрина с включенными в них глобулярными частицами полисахарида и по сравнению с чистым фибрином характеризуются большей плотностью, упругостью и устойчивостью к лизису, что делает их перспективными материалами для биотехнологического и биомедицинского применения.

Ключевые слова: белок-полисахаридные гидрогели, фибрин, галактан картофеля.

ВВЕДЕНИЕ

Композитные гидрогели на основе белков и полисахаридов являются предметом многолетнего интереса исследователей, поскольку находят применение в области разработки средств доставки лекарств и в регенеративной медицине для замены и лечения тканей и органоклеточной терапии [1-3]. Это связано с биосовместимостью гидрогелей и сходством их физических свойств с натуральными тканями. Композитные гидрогели предоставляют возможность регулировать в широких пределах функциональные свойства создаваемых систем путем вариации соотношения компонент и химической модификации входящих в их состав макромолекул. Однако биомедицинское применение гидрогелей часто затруднено токсичностью сшивающих агентов и ограничениями в формировании гидрогелей в физиологических условиях, что сохраняет актуальность поиска новых комбинаций для их создания.

Белок-полисахаридные гидрогели на основе гелеобразующих белков коллагена, фибрина или желатина используются для восстановления поврежденных тканей кожи, хрящей, сухожилий, сердца, мышц, глаз и других органов [4-7]. Широкий спектр их применения связан с уникальными свойствами этих белков – они позволяют создавать трехмерные структуры с различной архитектурой и функциями. Полученные материалы имеют высокий уровень гидратации, пористости, обеспечивая как обширную площадь поверхности для адгезии клеток, так и условия, необходимые для поддержания их жизнеспособности, миграции и пролиферации [5, 7-9]. Привлекательность этих белков с точки зрения тканевой инженерии является результатом наличия активных центров взаимодействия с клеточными интегринами, которые остаются доступными и после полимеризации [10, 11].

Использование заряженных полисахаридов в качестве второго компонента гидрогелей упрощает технологию их получения, но неблагоприятно сказывается на токсичности и стабильности в организме вследствие существенных электростатических взаимодействий с окружением. Поэтому предпочтительно использование нейтральных полисахаридов. Превосходными желирующими свойствами в сочетании с низкой стоимостью и биологической активностью обладают пектины, состоящие из смеси полигалактуроновой кислоты и рамногалактуронанов I и II [12]. Пектины желируют в присутствии ионов Ca^{+} или при низких значениях pH за счет образования упорядоченных структур полигалактуроновой кислоты. Удаление или модификация кислотных остатков лишает пектины желирующих свойств. Выход из положения видится в оптимальном сочетании нейтральных или слабозаряженных компонент пектина с гелеобразующими белками. В данной работе исследованы свойства композитных гидрогелей на основе фибрина и галактана картофеля. Последний представляет собой продукт энзиматического гидролиза рамногалактуронана I картофеля, и состоит из остова с чередующимися остатками галактуроновой кислоты и рамнозы и боковых, преимущественно галактановых, цепей различной длины. Химический состав галактана картофеля, согласно спецификации производителя, включает 87% галактозы, 3% арабинозы, 4% рамнозы и 6% галактуроновой кислоты. Галактан картофеля до сих пор не был исследован в качестве компонента гелей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы.

Фибриноген из бычьей плазмы (Фб) (Calbiochem); тромбин из бычьей плазмы (Тб) (Sigma); трипсин из поджелудочной железы свиньи (Sigma); галактан картофеля (ГК) (Megazyme, Lot 120501c).

Исходные растворы Фб и ГК готовили в буфере 1 (20 мМ Трис-НСl с 150 мМ NaCl, pH 7.4) или в буфере 2 (5 мМ Трис-НСl с 30 мМ NaCl, pH 7,4), тромбин и трипсин растворяли в буфере 1.

Приготовление растворов.

Коммерческий лиофилизированный порошок Фб растворяли в 0.9% водном растворе NaCl при 37°C и переводили в буфер 1 или буфер 2 используя колонки для обессоливания Zeba 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Концентрацию Фб в растворах определяли в кювете толщиной 1 см, используя коэффициент экстинкции 1,51 ($\lambda = 280$ нм, 1 мг/мл). Тб в концентрации 133 НИН растворяли в буфере 1. Исходные растворы Фб и Тб разделяли на аликвоты по 1 мл, замораживали в жидком азоте и хранили при -18°C до использования. Трипсин в концентрации 1мМ и ГК в концентрациях 0,1, 0,5 и 1 вес% растворяли в соответствующем буфере непосредственно перед измерениями.

Микрогравиметрия.

Измерение проводили с помощью кварцевых микровесов QCM-200 (SRS, США). Использовали кварцевые резонаторы 5 МГц с золотым покрытием. Исследуемый раствор Фб или смесь Фб/ГК наносили на поверхность электрода кварцевого резонатора. Конечные концентрации Фб и ГК составляли 0,5 и 1 мг/мл, соответственно. Образование фибринового сгустка инициировали внесением тромбина. Конечная концентрация Тб составляла 0,52 НИН. Об адсорбции компонент на поверхности электрода и кинетике полимеризации судили по изменению частоты колебаний резонатора. Величина адсорбированной массы связана с частотой резонатора соотношением: $\Delta F = -C \cdot \Delta m$, где $C = 56,6$ Гц мкг⁻¹ см².

Турбидиметрия.

Кинетику полимеризации и лизис фибрина исследовали с помощью метода турбидиметрии [13] с использованием спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer). Исходный раствор Фб, приготовленный в буфере 1, смешивали 1:1 с буфером 1 (контроль) или с ГК в кювете спектрофотометра, инкубировали 30 мин при 25°C и добавляли Тб. Конечные концентрации Фб и Тб составляли 0,5 мг/мл и 0,26 НИН, соответственно. Конечные концентрации ГК – 0,1, 0,5 и 1 вес.%. Формирование сгустка регистрировали по увеличению оптической плотности на длине волны 350 нм в течение 1 часа. Лизис фибрина инициировали, распределяя 10 мкл исходного раствора трипсина по поверхности сгустка. Измеряли следующие параметры, характеризующие кинетику полимеризации фибрина: лаг-период, максимальная скорость реакции и максимальная оптическая плотность при выравнивании кинетики (уровень плато) [14].

Динамическое светорассеяние.

Дзета-потенциал и гидродинамический диаметр частиц в смесях Фб/ГК измеряли на спектрометре Zetasizer Nano (Malvern Panalytical Ltd.). Применяли буфер 2 с пониженным содержанием соли для уменьшения джоулева нагрева и деструкции электродов [15]. Буфер фильтровали через PTFE фильтры с диаметром отверстий 0,22 мкм. Готовили растворы Фб с концентрацией 0; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1 мг/мл и постоянной концентрацией ГК. Исследуемые растворы инкубировали в течение 30 минут при 25°C, центрифугировали в течение 10 минут при 10000 G и отбирали 700 мкл супернатанта в капиллярную U-кювету в соответствии с имеющимися рекомендациями [15, 16]. Концентрация ГК – 0,1 вес%. Каждое значение данных представляет собой среднее из трех измерений.

Сканирующая электронная микроскопия.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) гидрогели готовили, добавляя Тб в раствор Фб или в смесь Фб/галактан. Конечные концентрации Тб, Фб и галактана составляли 0,26 НИН, 1 мг/мл и 1 вес%, соответственно. Фибриновые гели формировали в течение 1 часа при 22°C и затем трижды промывали избытком буфера в течение 15 минут. Промытые гели фиксировали в 2% глутаровом альдегиде в течение 1 часа, промывали водой и дегидратировали в возрастающих концентрациях этанола. Затем образцы погружали на 3 мин в 100% HMDS и избыток HMDS удаляли на фильтровальной бумаге. Гели исследовали на сканирующем электронном микроскопе Auriga Cross Beam (Carl Zeiss, Германия) в «Казанском национальном исследовательском техническом университете им. А.Н. Туполева-КАИ» (КНИТУ-КАИ).

Статистический анализ.

Статистический анализ и аппроксимацию зависимостей проводили с использованием Origin 8.6 (OriginLab, MA, США). Определяли среднее по трем измерениям и среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным СЭМ, гель на основе чистого фибрина имеет рыхлую структуру из длинных слабветвящихся волокон со средним диаметром 80 ± 20 нм (рис. 1А). В присутствии 1 вес% ГК образуется более плотная структура из тонких сильноветвящихся волокон диаметром 50 ± 12 нм (Рисунок 1Б). Пространственная структура геля неоднородна: тонкие волокна объединены в более толстые тяжи с широкими порами между ними. Молекулы полисахарида включены в структуру волокон геля в виде компактных частиц диаметром $20 \div 40$ нм. Включение ГК в структуру волокон фибрина возможно при связывании ГК с молекулами мономерного Фб, которые после полимеризации удерживают частицы полисахарида.

Взаимодействие Фб с ГК в растворе исследовали методом динамического светорассеяния. На рисунке 2а представлена зависимость гидродинамического диаметра частиц в растворе ГК при добавлении возрастающего количества Фб, а на рисунке 2б – аналогичная зависимость для дзета-потенциала.

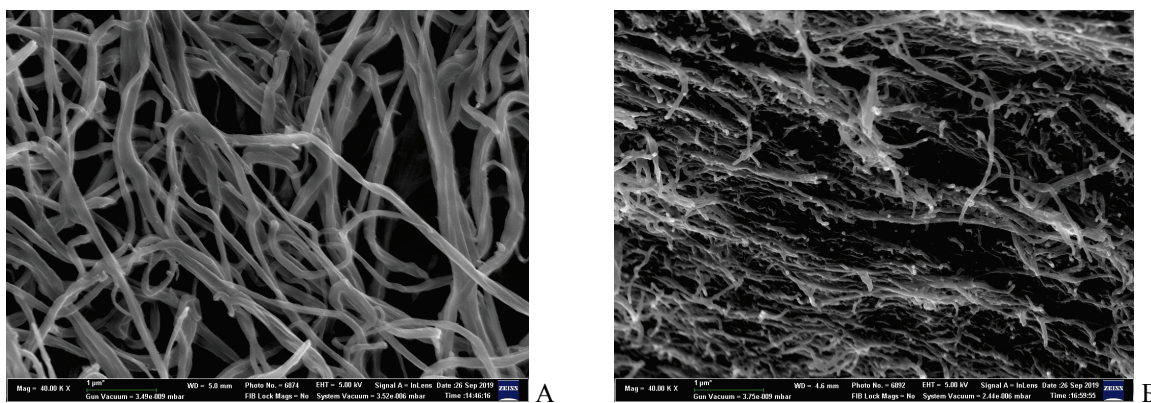


Рисунок 1. Морфология фибриновых гелей. А – контроль, чистый фибрин; Б – композит фибрин/галактан картофеля. Сканирующая электронная микроскопия, увеличение 40К

Чистый ГК присутствует в растворе в виде частиц с эффективным диаметром 8 нм, несущими отрицательный заряд, что следует из отрицательного значения дзета-потенциала и является следствием присутствия небольшого количества остатков галактуроновой кислоты в молекуле полисахарида. При добавлении Фб наблюдается рост размеров частиц и дзета-потенциала с выходом на насыщение при концентрации Фб $> 0,3$ мг/мл. В итоге, эффективный диаметр частиц увеличивается более чем в 2 раза, а дзета-потенциал становится менее отрицательным, что свидетельствует о связывании молекул Фб с частицами ГК. Можно предположить, что включение частиц полисахарида в структуру волокон фибрина должно отразиться на механических свойствах геля. Для оценки этого эффекта мы исследовали процесс полимеризации фибрина в присутствии ГК методом кварцевых микровесов, позволяющим сравнить величину массы вещества, сцепленной с поверхностью электрода, с величиной энергетических потерь на возбуждение колебаний в этой массе [17].

На рисунке 3 представлен временной ход полимеризации и образования геля в растворе чистого Фб. После добавления тромбина (отмечено стрелкой) происходит процесс понижения частоты F резонатора, эквивалентный росту сцепленной с резонатором массы и одновременно растет величина коэффициента потерь R. Соотношение между этими величинами характеризует механические свойства образующегося геля [18], что отражено на рисунке 4. Начальный пологий участок зависимостей, регистрируемый в течение времени инкубации смеси над кристаллом, соответствует адсорбции компонент раствора на поверхности электрода. В смесях Фб+ГК сдвиг частоты больше, чем в чистом Фб, что указывает на большую адсорбированную массу. В течение нескольких минут после добавления тромбина в обеих системах наблюдаются небольшое, но резкое увеличение величины ΔR , свидетельствующее о реорганизации адсорбированного слоя. Затем, на зависимости для чистого Фб формируется протяженный линейный участок, указывающий на скоррелированные изменения ΔR и ΔF , что связано с образованием однородной пространственной сети фибрина. Угол наклона зависимости пропорционален вязкости прилежащего к резонатору слоя фибрина. В смеси Фб+ГК угол наклона меньше, что соответствует более упругому слою [19-21].

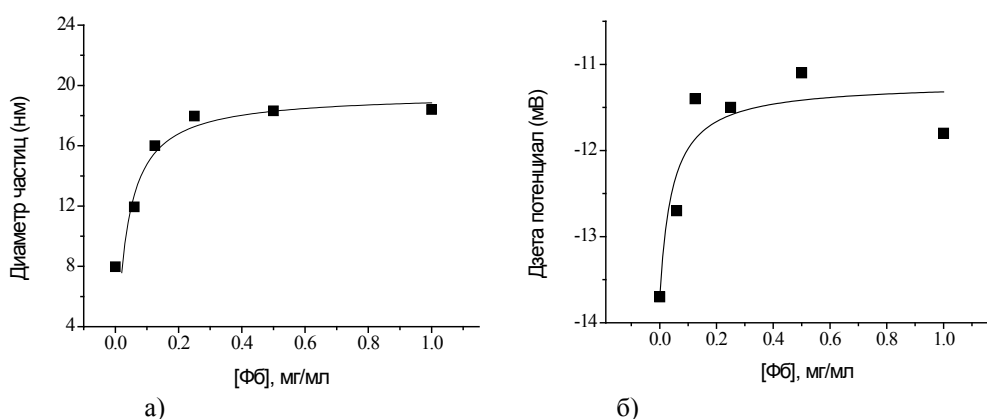


Рисунок 2. Зависимость размера (а) и дзета-потенциала (б) частиц ГК от концентрации фибриногена. Параметры аппроксимации изотермой Ленгмюра: а) $V_{\max} = 19,4 \pm 7,7$ нм, $k = 0,031 \pm 0,008$ мг/мл; б) $V_{\max} = -11,2 \pm 4,2$ мВ, $k = 0,044 \pm 0,031$ мг/мл

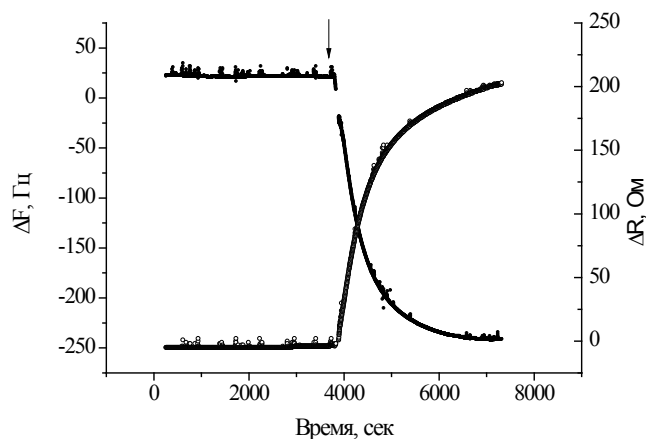


Рисунок 3. Кинетика изменений частоты ΔF (крестики, левая шкала) и эквивалентного сопротивления потерь ΔR (кружки, правая шкала) при полимеризации чистого Фб

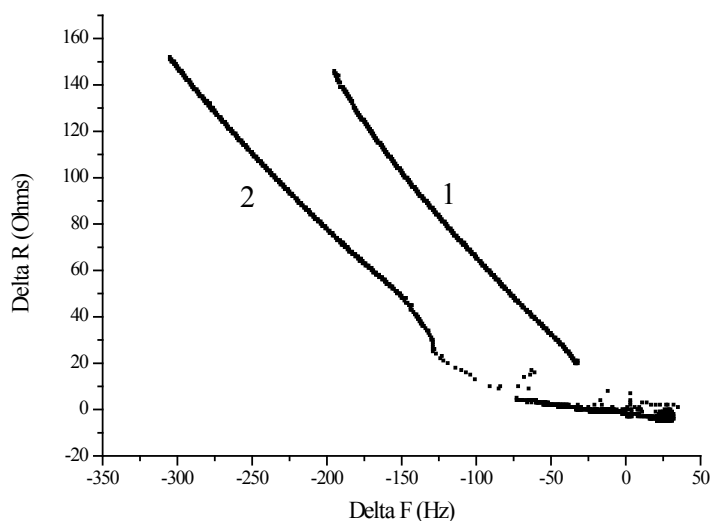


Рисунок 4. Соотношение между приростом частоты ΔF и сопротивлению ΔR при адсорбции и полимеризации Фб (кривая 1) и Фб+PI (кривая 2)

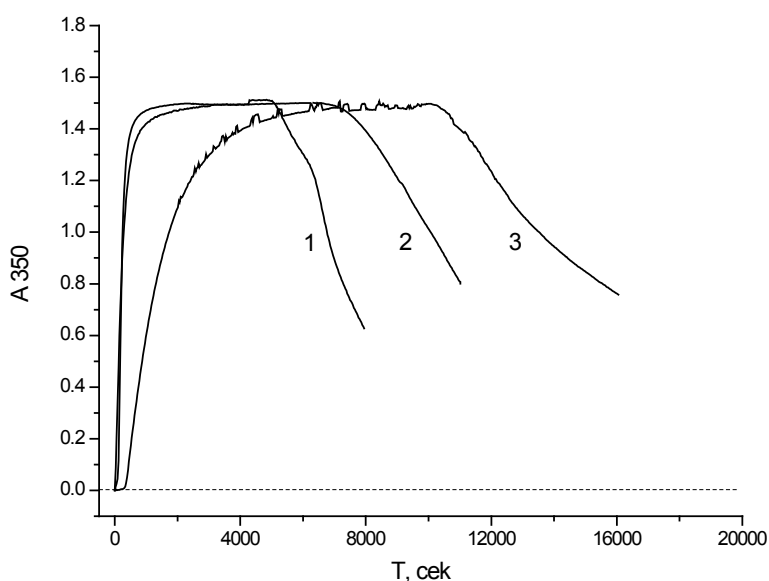


Рисунок 5. Нормированные кинетические кривые фибринообразования и последующего гидролиза в контроле (чистый Фб, 1) и в присутствии ГК 0,1% (2) и 1% (3)

Таблица 1. Параметры кинетики образования и лизиса фибрина в присутствии ГК

	Лаг период	Скорость свертывания	Уровень плато	Скорость лизиса
	Δt , сек	V_{\max} , 10^{-4} сек^{-1}	H_{\max}	V_{\max} , 10^{-4} сек^{-1}
Фибрин 1 мг/мл	50 ± 10	$17,15 \pm 1,7$	$0,11 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,1$
Фибрин/ ГК 0,1 вес%	62 ± 10	$19,4 \pm 2,8$	$0,37 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,1$
Фибрин/ ГК 0,5 вес%	257 ± 10	$10,6 \pm 2$	$1,48 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$
Фибрин/ ГК 1 вес%	516 ± 10	$6,1 \pm 2$	$1,42 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,4$

Влияние ГК на скорость полимеризации фибрина и последующего гидролиза под действием трипсина изучали методом турбидиметрии (рис. 5). Приведенные на рисунке зависимости нормированы на максимум рассеяния, чтобы нагляднее выявить различия во временном ходе процессов. Из зависимостей определяли следующие параметры: длительность лаг-периода, соответствующую времени образования мономеров фибрина и их ассоциации в протофибриллы; максимальную скорость полимеризации V_{\max} , определяемую как повышение оптической плотности в единицу времени и характеризующую формирование фибриновых волокон; максимальную оптическую плотность на плато, H_{\max} , отражающую толщину и число волокон в единице объема [14] (табл. 1). Там же приведены значения скорости V_{\max} лизиса образовавшегося сгустка под действием трипсина.

Из данных таблицы 1 следует, что присутствие ГК модифицирует все ключевые стадии полимеризации концентрационно-зависимым образом: удлиняется лаг-период и уменьшается скорость роста светорассеяния, увеличивается предельный уровень рассеяния на плато (увеличивается эффективная толщина волокон геля). Гель, сформированный в присутствии ГК, более устойчив к действию протеазы трипсина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показывают, что Фб связывается с ГК, сохраняя способность к энзиматической полимеризации. Образующиеся композитные гидрогели состоят из волокон фибрина с включенными в них глобулярными частицами полисахарида, характеризуются более высокой плотностью волокон в объеме, упругостью и устойчивостью к лизису по сравнению с чистым фибрином, что делает их перспективными для биотехнологического и биомедицинского применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке совместного проекта РФФИ и Правительства Республики Татарстан № 18-415-160011

Список литературы / References:

1. Karfeld-Sulzer L.S., Siegenthaler B., Ghayor C., Weber F.E. Fibrin Hydrogel Based Bone Substitute Tethered with BMP-2 and BMP-2/7 Heterodimers. *Materials*, 2015, vol. 8, pp. 977-991. DOI: 10.3390/ma8030977.
2. Yahia L.H. History and Applications of Hydrogels. *J. Biomed. Sci.*, 2015, vol. 4, pp.1-23.
3. Velema J., Kaplan D. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2006, vol. 102, pp. 187-238. DOI: 10.1007/10_013.
4. Silva A.K., Richard C., Bessodes M., Scherman D., Merten O.W. Growth factor delivery approaches in hydrogels. *Biomacromolecules*, 2009, vol. 10, pp. 9-18.
5. Hubbell J.A. Materials as morphogene guides in tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, vol. 14, pp. 551-558.
6. de la Puente P., Ludeña D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp. Cell Res.*, 2014, vol. 322, pp. 1-11. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.12.017.
7. Dong C., Lv Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. *Polymers*, 2016, vol. 8, p. 42. DOI: 10.3390/polym8020042.
8. Rajangam T., An S.S.A. Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. *Int. J. Nanomed.*, 2013, vol. 8, pp. 3641-3662. DOI: 10.2147/IJN.S43945.
9. Noori A., Ashrafi S.J., Vaez-Ghaemi R., Hatamian-Zaremi A., Webster T.J. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int. J. Nanomed.*, 2017, vol. 12, pp. 4937-4961. DOI: 10.2147/IJN.S124671.
10. Davidenko N., Schuster C.F., Bax D.V., Farndale R.W. et al. Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2016, vol. 27, p. 148. DOI: 10.1007/s10856-016-5763-9.
11. Laurens M., Engelse M.A., Jungerius C., Löwik C.W., van Hinsbergh V.W., Koolwijk P. Single and combined effects of $\alpha 5 \beta 1$ - and $\alpha 5 \beta 1$ -integrins on capillary tube formation in a human fibrinous matrix. *Angiogenesis*, 2009, vol. 12, pp. 275-285. DOI: 10.1007/s10456-009-9150-8.
12. Thakur B.R., Singh R.K., Handa A.K., Rao M.A. Chemistry and uses of pectin - A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1997, vol. 37, no. 1, pp. 47-73. DOI: 10.1080/10408399709527767.

13. Hantgan R.R., Hermans J. Assembly of fibrin. A light scattering study. *J Biol Chem*, 1979, vol. 254, pp. 11272-11281.
14. Weisel J.W., Nagaswami C. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J.*, 1992, vol. 63, pp. 111-128.
15. Smith M.C., Crist R.M., Clogston J.D., McNeil S.E. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem*, 2017, vol. 409, pp. 5779-5787.
16. Nakatuka Y., Yoshida H., Fukui K., Matuzawa M. The effect of particle size distribution on effective zeta-potential by use of the sedimentation method. *Adv Powder Technol*, 2015, vol. 26, pp. 650-656.
17. Reviakine I., Johannsmann D., Richter R.P. Hearing what you cannot see and visualizing what you hear- interpreting quartz crystal microbalance data from solvated interfaces. *Anal Chem*, 2011, vol. 83, pp. 8838-48. DOI: 10.1021/ac201778h.
18. Dixon M.C. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *Journal of biomolecular techniques*, 2008, vol. 19, pp. 151-158.
19. Wang X., Ruengruglikit C., Wang Y., Huang Q. Interfacial interactions of pectin with bovine serum albumin studied by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: Effect of ionic strength. *J Agric Food Chem*, 2007, vol. 55, pp. 10425-10431.
20. Marxer C.G., Coen M.C., Greber T., Greber U.F., Schlapbach L. Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative of viscosity changes. *Anal Bioanal Chem*, 2003, vol. 377, pp. 578-586. DOI: 10.1007/s00216-003-2080-1.
21. Marxer C.G., Coen M.C., Bissig H. et al. Simultaneous measurement of the maximum oscillation amplitude and the transient decay time constant of the QCM reveals stiffness changes of the adlayer. *Anal Bioanal Chem*, vol. 377, pp. 570-577. DOI: 10.1007/s00216-003-2081-0.

STRUCTURE OF COMPOSITE HYDROGELS BASED ON FIBRIN AND POTATO GALACTAN

Faizullin D.A., Valiullina Yu.A., Salnikov V.V.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS
Lobachevsky st. 2/31, Kazan, 420111 Russia; e-mail: dfaizullin@mail.ru

Abstract. Composite protein-polysaccharide hydrogels are used in the development of delivery systems and in regenerative medicine for the replacement and treatment of tissues and organocellular therapy due to the cheapness of raw materials, biocompatibility, low toxicity, and intrinsic biological activity of the components. In this work, the possibility of obtaining composite hydrogels based on the weakly charged non-gelling polysaccharide galactans from potatoes and the gel-forming protein fibrinogen was investigated. The results of the study show that fibrinogen binds to galactan, preserving the ability to enzymatic polymerization. The resulting composite hydrogels consist of fibrin fibers with polysaccharide globular particles incorporated into them, and characterized by a higher density, elasticity, and resistance to lysis as compared to pure fibrin, which makes them promising for biotechnological and biomedical applications.

Key words: protein-polysaccharide hydrogels, fibrin, potato galactan.