

Е.М. Ермоленко<sup>1</sup>, Ж.А. Ибрагимова<sup>1</sup>, Е.В. Ходосовская<sup>1</sup>, С.Е. Семерихина<sup>1</sup>,  
Т.С. Колесникова<sup>1</sup>, К.В. Лазнев<sup>2</sup>, Г.К. Жавнерко<sup>2</sup>, Б.Э. Кашевский<sup>3</sup>, В.Е. Агабеков<sup>2</sup>

### **Гидрогелевые магнитные микросферы: применение для магнитной сепарации клеток.**

<sup>1</sup> - Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> - Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>3</sup> - Институт теплообмена им. А.В.Лыкова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Введение.** Иммуномагнитная сепарация становится стандартным и широко используемым методом выделения клеток, субклеточных структур, биомолекул при биологических и медицинских исследованиях, в клинической диагностике и терапии, трансплантационной медицине, анализе пищевых продуктов, загрязнений окружающей среды [1-5]. Поверхность магнитных микросфер (ММС), применяемых для магнитной сепарации клеток, должна обладать низкой способностью к неспецифическому связыванию с плазматической мембраной клетки и нести молекулы-лиганды, обеспечивающие селективное связывание ММС с клетками целевой популяции. Низкое неспецифическое связывание обеспечивается модификацией поверхности ММС гидрофильными незаряженными полимерами, такими как полиэтиленгликоль и полисахариды [4, 6, 7], а также наличием в среде белков, конкурирующих с ММС за связывание с клетками, таких как бычий сывороточный альбумин (БСА) [8].

**Цель исследования** – изучить и сравнить способности хитозановых и желатиновых ММС обеспечить сепарацию клеток CD4<sup>+</sup> из суспензии мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови с применением биотинилированных антител (АТ<sub>биот.</sub>) к CD4<sup>+</sup>.

#### **Материалы и методы**

Были синтезированы гидрогелевые микросферы на основе сшитых глутаральдегидом хитозана или желатина, содержащие в качестве магнитного материала наночастицы магнетита. Поверхность ММС была функционализирована путем ковалентной иммобилизации стрептавидина (СА). Сопоставлена способность ММС обеспечить сепарацию клеток CD4<sup>+</sup> из суспензии мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови с применением биотинилированных антител (АТ<sub>биот.</sub>) к CD4<sup>+</sup>. Также сопоставлена эффективность двух протоколов сепарации: в одном ММС были проинкубированы с АТ<sub>биот.</sub> перед добавлением в культуру клеток («клетки+АТ+ММС»); в другом клетки обрабатывали АТ<sub>биот.</sub>, а затем добавляли ММС («клетки+(АТ+ММС)»).

Наночастицы магнетита. Монодисперсные частицы магнетита размером около 10 нм получали методом соосаждения оксидов двух- и трехвалентного железа из их солей под действием избытка щелочи [9]. Смешивали 10%-ные водные растворы  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (подкисленный) и  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Мольное отношение Fe(II):Fe(III) в смеси составляло 1,1:2,0. 500 мкл приготовленного раствора быстро добавляли к 200 мкл 25 %-го раствора аммиака при интенсивном механическом перемешивании, после чего инкубировали при 60 °С 10 минут. Осадок несколько раз отмывали дистиллированной водой.

Магнитные жидкости (МЖ). Смешивали 1 часть осадка магнетита и 9 частей 5% р-р желатина, обрабатывали ультразвуком (УЗ). Доводили pH до 9, добавляя 1М NaOH.

Смешивали 4 части осадка магнетита, 1 часть ледяной уксусной кислоты и 35 частей 0,75% раствора хитозана в 1% уксусной кислоте, обрабатывали УЗ.

Магнитные микросферы. Готовили сшивающий раствор: смешивали растворы глутаральдегида (ГА) 50% и  $\text{CaCl}_2$  2М в соотношении 1:1.

Готовили сшивающий буфер: NaCl 0,5М, ГА 15%,  $\text{Na}_n\text{H}_{3-n}\text{PO}_4$  0,2М, pH7.

Готовили отмывочный буфер pH7: NaCl 0,5М,  $\text{Na}_n\text{H}_{3-n}\text{PO}_4$  0,2М, pH7.

Готовили отмывочный буфер pH9: NaCl 0,5М,  $\text{Na}_n\text{H}_{3-n}\text{PO}_4$  0,2М, pH9.

К 2400 мкл раствора ИО/ПАВ добавляли 300 мкл желатиновой или хитозановой МЖ, перемешивали диспергатором 5 минут. Давали эмульсии отстояться, отбирали супернатант.

К 2400 мкл раствора ИО/ПАВ добавляли 150 мкл сшивающего р-ра, обрабатывали УЗ.

Смешивали эмульсии МЖ и сшивающего раствора, перемешивали 30 минут. Отмывали 1 раз в 5% растворе ГА в этаноле, 1 раз в отмывочном буфере pH 7. Ресуспендировали в 3 мл сшивающего буфера, перемешивали 1 час, инкубировали ночь. Сшитые ММС трижды отмывали отмывочным буфером pH 7.

Иммобилизация СА, нейтрализация альдегидных групп, конверсия шиффовых оснований. Непосредственно после сшивки ГА и отмывки ММС осаждали, удаляли супернатант, ресуспендировали до концентрации  $10^9$ /мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH 9, содержащем 160 мкг/мл СА, инкубировали в течение ночи. Дважды отмывали 0,1М TRIS-буфером pH9, ресуспендировали в буферном растворе  $\text{NaBH}_4$  (0,5 М NaCl, 0,2М  $\text{Na}_n\text{H}_{3-n}\text{PO}_4$ , 1% m/V  $\text{NaBH}_4$ , pH 9), инкубировали 2 часа, дважды отмывали ФСБ.

Магнитная сепарация «клетки+(АТ ММС)». Готовили сепарационную среду (СС): ФСБ pH 7,4 с добавками 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 2 мМ ЭДТА.

ММС ( $10^8$ ) инкубировали 4 часа в 1 мл ФСБ с добавкой 10 мкг АТ<sub>биот</sub> анти-CD4, трижды отмывали ФСБ с добавкой 1% БСА.

МНК ( $10^6$ ) в 50 мкл СС переносили в эппендорф с предварительно осажденными  $\approx 10^7$  ММС-антиCD4 (контроль – ММС, не прошедшие инкубации с анти-CD4), ресуспендировали.

Инкубировали 20 мин при 4°C, доводили объем среды до 1 мл и трижды подвергали сепарации на магнитной колонке, каждый раз ресуспензируя осадок в 1 мл СС. Экспериментальный образец колонки был предоставлен ИТМО НАНБ.

Магнитная сепарация «(клетк + АТ) + ММС».  $2 \cdot 10^7$  мононуклеарных клеток периферической крови ресуспензировали в 1,5 мл СС, добавляли 10 мкл р-ра, содержащего 1 мкг АТ<sub>биот</sub> анти-CD4 (контроль – 10 мкл ФСБ), инкубировали 20 минут при 4°C. Клетки осаждали на центрифуге, отмывали СС, ресуспендировали в 2,5 мл СС. Смешивали аликвоту 500 мкл обработанных АТ<sub>биот</sub> клеток и 500 мкл суспензии ММС (соотношение ММС:клетки  $\approx 1:10$ ), инкубировали 20 минут и трижды подвергали сепарации на магнитной колонке, каждый раз ресуспензируя осадок в 1 мл СС.

Оценка результатов магнитной сепарации. Клетки подсчитывали в камере Горяева. Выход клеток нормировали к коммерческому аналогу – MagCelect Streptavidin Ferrofluid. О специфичности судили косвенно – по соотношению количеств клеток, выделенных с ММС в присутствии и в отсутствие АТ.

#### Результаты и их обсуждение

Хитозановые и желатиновые ММС, ковалентно сшитые ГА, были стабильны в воде и сепарационной среде. При хранении в воде в течение 60 дней при 4°C не теряли магнитный материал (оценка по цвету супернатанта после осаждения ММС) и не проявляли тенденции к разбуханию. Распределение по размеру было узким: полидисперсность  $\approx 0,1$  (рисунок 1).

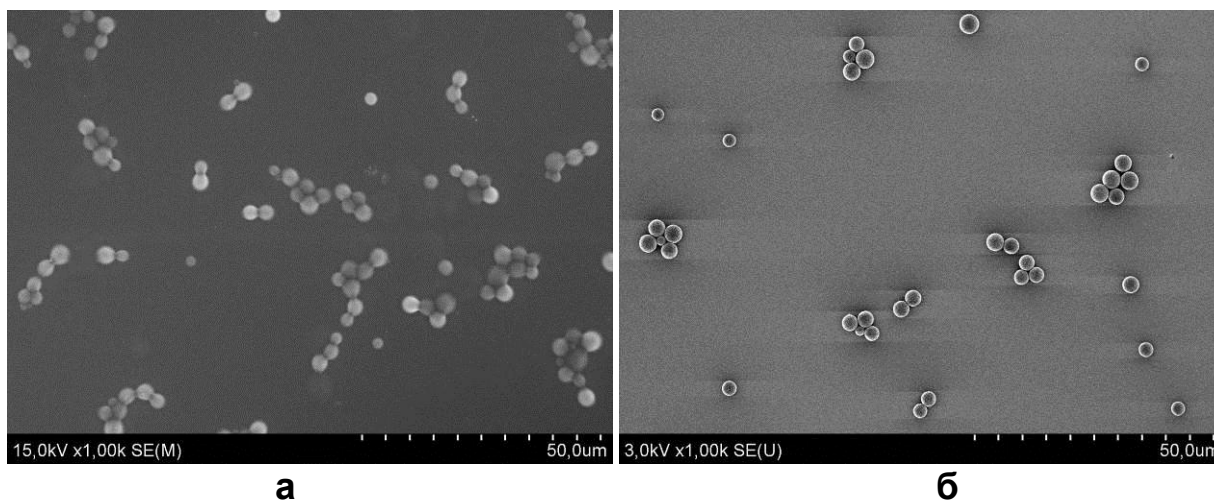


Рисунок 1 – СЭМ-изображения ММС

**а** – желатиновые; **б** – хитозановые

Содержание магнетита в микросферах составляло  $\approx 3\%$  (по данным измерения намагниченности в магнитном поле). ММС проявляли суперпарамагнитные свойства: остаточной намагниченности отмечено не было, кривые намагничивания и размагничивания

совпадали; в водной среде ММС были дисперсны и не образовывали агрегатов, в отличие от ферромагнитных частиц (рисунок 2).

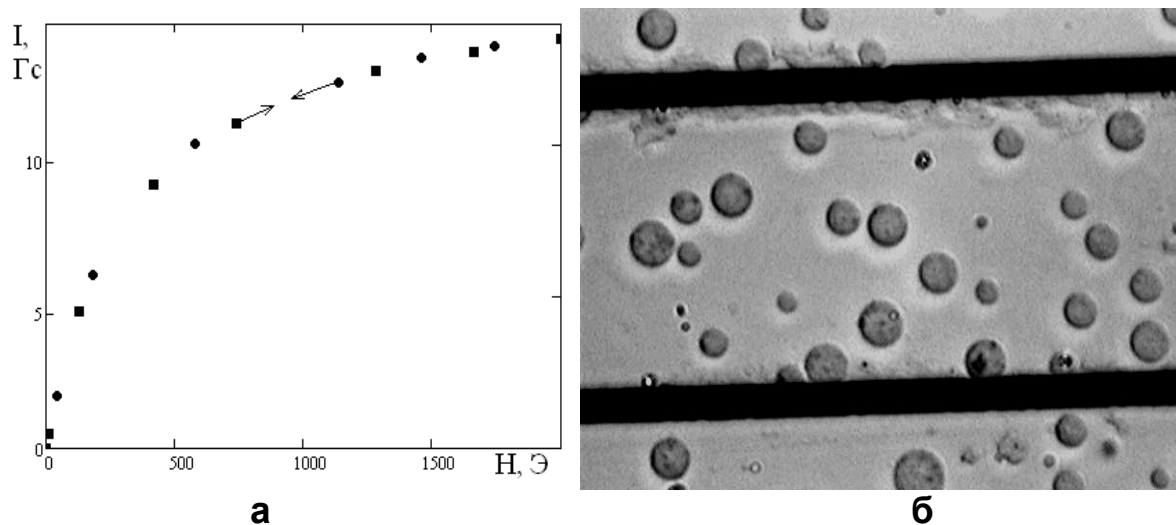


Рисунок 2 – Подтверждение суперпарамагнитных свойств ММС

**а** – Кривая намагничивания концентрированного образца суспензии хитозановых ММС при увеличении и уменьшении поля; **б** – желатиновые ММС в водной среде.

Модификация поверхности СА подтверждена методом люминесцентной микроскопии с применением биотин-4-флуоресцеина (рисунок 3).

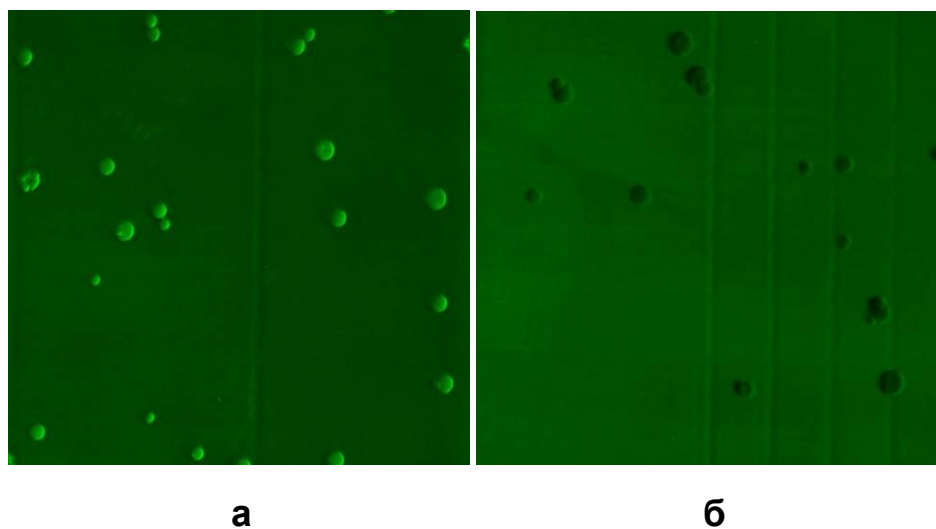


Рисунок 3 – Флуоресценция биотин-4-флуоресцеина на пектинатно-желатиновых ММС.

**а** – образец, проинкубированный с СА; **б** – образец, проинкубированный без СА.

При магнитной сепарации выход клеток у образца, показавшего лучшие результаты, (2-й образец на рисунке 4) составил 27% от достигнутого с коммерческим аналогом при специфичности около 75%. Существенных отличий между протоколами «(клетки + АТ) + ММС» и «клетки + (АТ + ММС)» по эффективности сепарации отмечено не было.

Хитозановые ММС в обоих протоколах показали лучшие результаты, чем желатиновые.

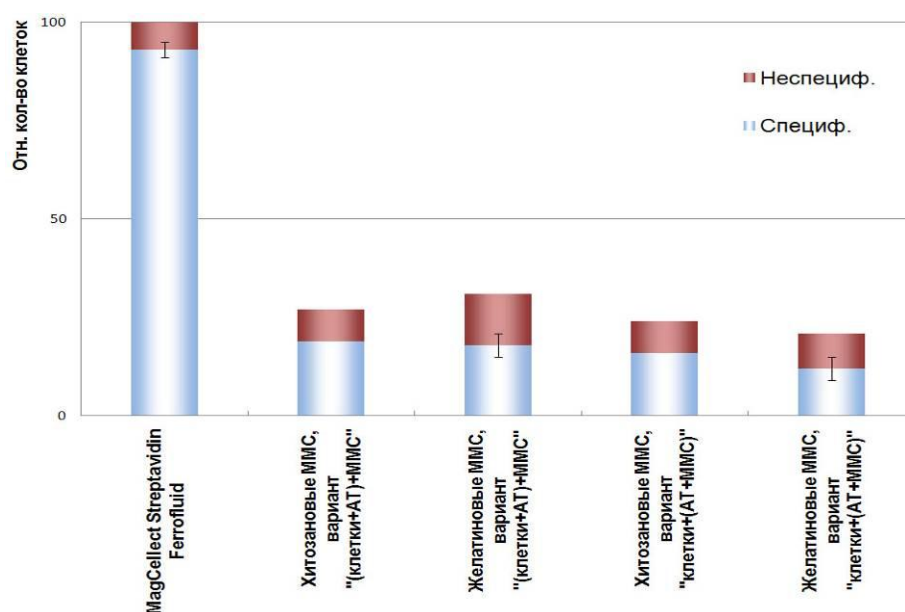


Рисунок 4 – Эффективность и специфичность сепарации клеток CD4+, нормированных к коммерческому аналогу.

## Выводы

Синтезированы и функционализованы стрептавидином магнитные микросферы (ММС) на основе сшитых глутаральдегидом хитозана или желатина. Сравнивали их способность обеспечить сепарацию клеток с применением биотинилированных антител к CD4. Сопоставлена эффективность двух протоколов сепарации:

1. По результатам сепарации существенных различий между данными протоколами (в одном ММС были проинкубированы с антителами перед добавлением в культуру клеток («клетки + АТ) + ММС»); в другом – клетки обрабатывали антителами, а затем добавляли ММС («клетки + (АТ + ММС)») отмечено не было.

2. Хитозановые ММС в обоих протоколах показали лучшие результаты, чем желатиновые.

## Список литературы

- 1 Grutzkau A., Radbruch A. Small But Mighty: How the MACS<sup>®</sup>-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years // Cytometry Part A. – 2010. – Vol. 77A. – P. 643-647.
- 2 Corr S.A., Rakovich Y.P., Gun'ko Y.K. Multifunctional Magnetic-fluorescent Nanocomposites for Biomedical Applications // Nanoscale Res. Lett. – 2008. – Vol. 3. – P. 87–104.
- 3 Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J. Application of magnetic nanoparticle in biomedicine // Journal of Physics: Applied Physics. – 2003. – Vol.36, №13. – P. R167-R181.

- 4 Dias A.M.G.C., Hussain A., Marcos A.S., Roque A.C.A. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides // *Biotechnology Advances*. – 2011. – Vol. 29. – P. 142–155.
- 5 Ramadan Q., Gijs M.A.M. Microfluidic applications of functionalized magnetic particles for environmental analysis: focus on waterborne pathogen detection // *Microfluid Nanofluid*. – DOI 10.1007/s10404-012-1041-4.
- 6 <https://www.oceannanotech.com/upload/111107161601385425vpce1b.pdf>
- 7 <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=12D97D8D-5056-8A76-4E95-9EA0D0B54BDB>
- 8 [http://www.miltenyibiotec.com/download/protocols\\_cellsep\\_special\\_en/509/SP\\_CD4.pdf](http://www.miltenyibiotec.com/download/protocols_cellsep_special_en/509/SP_CD4.pdf)
- 9 Kekalo K. et al. Magnetic nanocomposites for sorbents and glue layers // *J. Magnetism and Magnetic Materials*. – 2007. – Vol. 311. – P.63-67.

## Summary

E.M. Ermolenko<sup>1</sup>, J.A. Ibragimova<sup>1</sup>, S.E. Semerikhina<sup>1</sup>, E.V. Hodosovskaya<sup>1</sup>, T.S. Kolesnikova<sup>1</sup>,  
K.V. Laznev<sup>2</sup>, G.K. Zhavnerko<sup>2</sup>, B.E. Kashevsky<sup>3</sup>, V.E. Agabekov<sup>2</sup>

### **Hydrogel magnetic microspheres: application for immunomagnetic cell separation**

<sup>1</sup> - *Belorussian State Medical University, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup> - *Institute of chemistry of new materials, Natl. Acad. Sci. of Belarus, Minsk, Belarus*

<sup>3</sup> - *A.V. Lykov Institute of Heat and Mass Transfer, Natl. Acad. Sci. of Belarus, Minsk, Belarus*

Magnetic microspheres (MMS) composed of chitosan or gelatin cross-linked with glutaraldehyde were synthesized and functionalized with streptavidin. Their abilities to provide separation of cells with biotinylated antibodies to CD4 were compared. Also the performances of the two protocols of separation briefly termed as "(cells + AT) + MMS" and "cells + (AT + MMC)" were compared. No significant difference between these protocols was observed. In both protocols, chitosan MMS performed better than gelatin MMS. With the best sample, cell yield was 27% compared to a commercial counterpart; specificity was about 75%.