

Влияние сшивающих агентов на матриксные свойства гидрогелевых структур на основе альгината натрия

**М. А. Хворостина, П. Ю. Алгебраистова, И. А. Недорубова, Т. Б. Бухарова,
Д. В. Гольдштейн, А. Ю. Тетерина, В. С. Комлев, В. К. Попов**

Проведено сравнительное исследование процессов гелеобразования в водных растворах альгината натрия, иницированных их химической сшивкой двухвалентными ионами Ca^{2+} или Ba^{2+} . Методом трехмерной криопечати из исследованных композиций, содержащих различные концентрации сшивающих агентов, сформированы объемные гидрогелевые матриксы определенной архитектуры. Показано, что увеличение концентрации сшивающего агента от 2 до 10 масс. % приводит к улучшению прочностных характеристик альгинатных структур. При этом матриксы, сшитые 10 % водными растворами как CaCl_2 , так и BaCl_2 , сохраняют свою структурную стабильность в течение 21 суток инкубации в культуральной среде при температуре 37 °С. В ходе экспериментов *in vitro* с использованием культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани крыс обнаружено, что в отличие от нетоксичных матриксов, сшитых в водных растворах CaCl_2 , образцы, сшитые ионами Ba^{2+} , демонстрируют умеренный цитотоксический эффект и проявляют свою неспособность поддерживать клеточную адгезию. *In vivo* анализ экспериментальных образцов на модели внутримышечной имплантации самцам крыс породы Wistar также подтвердил умеренную цитотоксичность альгинатных матриксов, сформированных с использованием ионов Ba^{2+} в качестве сшивающих агентов. Полученные результаты позволяют утверждать, что из всех изученных нами материалов наиболее перспективным для различных биомедицинских применений можно считать альгинат натрия сшитый 10 % водным раствором CaCl_2 .

Ключевые слова: альгинат натрия, ионная сшивка, трехмерная криопечать, матриксные свойства, биосовместимость.

DOI: 10.30791/1028-978X-2023-12-22-31

Введение

Гидрогели на основе альгината натрия являются перспективными материалами для решения различных задач фармации, генной терапии и регенеративной медицины [1 – 3]. Сегодня их широко используют при формировании как отдельных частиц для доставки лекарственных средств [4, 5], так и пористых трехмерных (3D) конструкций (матриксов) для тканевой инженерии [6, 7]. При этом физико-химические и биологические свойства получаемых структур напрямую зависят от способа их гелеобразования.

Альгинат натрия — полисахарид природного происхождения, состоящий из блоков

D-маннуроной и L-гулууроной кислот. Он легко образует структурно устойчивые гидрогели при взаимодействии с двухвалентными ионами металлов (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} и др.) за счет возникновения специфических связей между этими ионами (сшивающими агентами) и карбоксильными группами звеньев L-гулууроной кислоты [8]. Это обстоятельство, в частности, делает его особенно привлекательным при использовании в качестве исходного материала для разнообразных биомедицинских применений [9].

Выбор определенного сшивающего агента, как правило, обусловлен требованиями, предъявляемыми к физическим, механическим и биологическим характеристикам формируемого продукта

[10]. Так, наиболее часто используемые в процессах гелеобразования ионы кальция обеспечивают высокий уровень жизнеспособности клеток как на поверхности, так и в объеме таких гидрогелей *in vitro* [11]. Ионы бария, обладающие большей реакционной способностью по сравнению с ионами кальция, позволяют заметно (на 50 %) снизить степень набухания альгинатного гидрогеля, улучшить его структурную стабильность и прочностные свойства [12, 13]. Однако, при создании материала, находящегося в непосредственном контакте с тканями живого организма, критически важно учитывать, что высокие (> 0,5 масс. %) концентрации двухвалентных ионов, как кальция [14], так и бария [15], могут оказывать токсическое действие на клеточные культуры.

Сегодня для формирования объемных 3D структур на основе альгината натрия, как правило, применяют хорошо изученные традиционные методы: порообразование с использованием газов высокого давления [16], лиофилизация [17] или электроспиннинг [18], не позволяющие однако точно контролировать и воспроизводить архитектуру таких матриц. Эта задача может быть решена с помощью различных технологий 3D печати и, в частности, развитого нами ранее метода 3D криопечати [19], основанного на послойном нанесении водного раствора альгината натрия определенной вязкости через сопло диаметром 200 – 400 мкм на охлажденную (вплоть до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) подложку с последующим отверждением в растворах выбранного сшивающего агента. Это дает возможность изготовления требуемых гидрогелевых объектов в соответствии с их, заранее подготовленными, 3D компьютерными моделями.

Несмотря на демонстрацию принципиальной возможности использования метода 3D криопечати для формирования биоактивных матриц на основе альгината натрия, необходимо проведение комплексного исследования влияния ионов металлов различных концентраций (Ca^{2+} и Ba^{2+}) на физико-механические, биохимические и биологические свойства формируемых 3D структур, а также оценку изменений морфологии поверхности и внутреннего объема последних со временем как в ростовых средах, содержащих культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), *in vitro*, так и с использованием модели их внутримышечной имплантации лабораторным животным *in vivo*.

Цель работы — проведение сравнительного исследования процессов гелеобразования альгината натрия в процессе 3D криопечати его водных

растворов при использовании ионов Ca^{2+} и Ba^{2+} в качестве сшивающих агентов и определение оптимальных условий формирования биосовместимых гидрогелевых матриц, отвечающих требованиям тканевой инженерии.

Материалы и методы

В качестве исходной композиции для 3D криопечати гидрогелевых матриц использовали 8 масс. % раствор альгината натрия (АН, Химмед) в дистиллированной воде. В качестве источников ионов Ca^{2+} и Ba^{2+} для межмолекулярной сшивки и гелеобразования АН применяли 2 масс. % и 10 масс. % водные растворы хлорида кальция (CaCl_2 , Sigma-Aldrich) и хлорида бария (BaCl_2 , Sigma-Aldrich).

Для формирования экспериментальных образцов определенной архитектуры использовали разработанный и изготовленный ранее [19] специализированный 3D принтер, размещенный в асептическом боксе.

Роль печатающей головки 3D принтера выполнял стеклянный шприц объемом 2 мл с иглой диаметром 400 мкм, заполненный водным раствором альгината натрия. В процессе 3D криопечати на подложку, температуру которой поддерживали на уровне $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, в автоматическом режиме послойно наносили контуры из исходной композиции, соответствующие определенным сечениям, толщиной $\approx 300\text{ }\mu\text{m}$, предварительно подготовленной компьютерной 3D модели — диск диаметром 10 мм и толщиной 3 мм с размером ячеек $1 \times 1\text{ }\text{mm}^2$. После завершения процесса 3D печати, изготовленные образцы отделяли скальпелем от рабочей подложки и в замороженном состоянии помещали на 1 ч в пробирку объемом 50 мл 10 масс. % водного раствора CaCl_2 или BaCl_2 при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем экспериментальные образцы трижды промывали в избыточном количестве дистиллированной воды при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин для удаления излишков непрореагировавших соединений. Для проведения *in vitro* и *in vivo* исследований матрицы стерилизовали в этиловом спирте в течение 10 минут и промывали стерильной деионизованной водой (ПанЭко).

Исследования механических свойств матриц проводили на испытательной тест-машине EZ-Test EZ-SX (Shimadzu), управление которой осуществляли посредством программного обеспечения TRAPEZIUM X. С его помощью задавали исходные параметры механических испытаний, а также проводили сбор и анализ полученных дан-

ных. Для определения модуля упругости гидрогелей использовали экспериментальные образцы с размерами $25 \times 5 \times 0,5 \text{ мм}^3$ (Д × Ш × Т). Модули Юнга рассчитывали по линейным участкам кривых “напряжение – деформация”, полученных со скоростью растяжения исследуемого образца 1 мм/мин.

Морфологию поверхности и внутреннего объема альгинатных матриксов изучали методом оптической микроскопии на микроскопе Zeiss Axio Observer.D1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Анализ цитотоксичности, а также матричных свойств исследуемых образцов проводили с использованием культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс, на 3 – 4 пассаже. Для этого клеточные культуры инкубировали в ростовой среде: DMEM/F12 (ПанЭко), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (РАА), 0,584 мг/мл L-глутамин (ПанЭко), 5000 ед./мл стрептомицина (ПанЭко) и 5000 ед./мл пенициллина (ПанЭко) в чашках Петри при стандартных культуральных условиях (37 °С, 5 % CO₂). Замену среды на свежую проводили каждые 2 – 3 суток.

Степень набухания образцов определяли путем их выдержки в ростовой среде в присутствии ММСК в течение 21 суток. Кинетические особенности деградации материалов, в частности структурные изменения матричных волокон, оценивали каждые 7 суток методом оптической микроскопии.

Для определения цитотоксического действия исследуемых матриксов, а также их компонентов, использовали колориметрический метод с применением МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид). Клетки культур ММСК снимали с поверхности чашек Петри с помощью раствора Версена (ПанЭко) с добавлением 0,25 % трипсина (ПанЭко), высевали в 24-луночные планшеты (Corning) с плотностью 50 тыс. клеток на лунку. Исследуемый материал помещали на дно культуральных вставок с размером пор 8 мкм (Corning Transwell). В контрольные лунки материал не добавляли. Через 3 суток в лунки добавляли МТТ (ПанЭко) в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С, визуально контролируя развитие окраски. Кристаллы формазана экстрагировали из клеток с помощью ДМСО (ПанЭко), перемешивая на шейкере в течение 20 мин. Поглощение формазана оценивали, измеряя на планшетном ридере BioRad Reader xMark (Bio-Rad Laboratories, США) оптическую плотность элюата при длине волны 570 нм и вычитая фоновое значение при 620 нм.

Для изучения первичной клеточной адгезии образцы матриксов заселяли ММСК, предварительно мечеными витальным флюоресцентным красителем РКН-26. Для этого клетки культур ММСК снимали с чашек Петри раствором Версена (ПанЭко) с добавлением 0,25 % трипсина (ПанЭко) и центрифугировали при 1100 об/мин в течение 10 мин. Окрашивание клеток красителем РКН-26 проводили согласно инструкции производителя. Матрикс помещали в 48-луночные планшеты (Nunc), наносили на них клеточную суспензию ($2,5 \cdot 10^4$ клеток/матрикс). Через 3 суток образцы с адгезированными на них клетками исследовали методом флуоресцентной микроскопии на микроскопе Zeiss Axio Observer.D1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

In vivo эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями биоэтического комитета Сеченовского университета (№ PRC-079 от 06.04.2021), “Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказы МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 и № 701 от 24.07.1978), “Правилам лабораторной практики в Российской Федерации” от 2003 г., а также ISO 10993 “Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements” и “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes ETC 123” от 1985 г.

Оценку тканевой реакции на исследуемые гидрогелевые матриксы проводили при их внутримышечной имплантации самцам крыс породы Wistar ($N = 6$) массой 200 г. Лабораторных животных наркотизировали, вводя внутримышечно Золетил (Virbac, Франция) и Ксилазин (Interchemie Werken “de Adelaar” BV, Нидерланды) в дозировке 30 мг/кг и 5 мг/кг, соответственно. Затем шерсть в области задней поверхности бедра сбрасывали, проводили антисептическую обработку спиртом и выполняли продольный разрез кожи. Тупым способом в мышце формировали карман глубиной 1 см, куда помещали исследуемые образцы. После этого послойно ушивали мышечную ткань и кожные покровы, а также в целях профилактики инфекционных осложнений внутримышечно вводили Цефтриаксон (Биохимик, Россия) из расчета 10 мкг на 1 кг веса животного. В одну крысу имплантировали 2 идентичных матрикса, сшитых либо ионами Ca²⁺, либо ионами Ba²⁺.

Через 14 суток животных выводили из эксперимента в специализированной CO₂-камере с соблюдением всех действующих норм по гуманному обращению с животными. Биоптаты с имплантированными альгинатными матриксами фиксиро-

вали 10 % формалином, заливали в парафиновые блоки, и изготавливали срезы толщиной 5 – 10 мкм (HistoCore Arcadia C, Leica) по стандартной методике. Затем срезы окрашивали гематоксилином и эозином (ГЭ) согласно стандартному протоколу и оценивали степень воспаления с помощью оптической микроскопии (Axio Observer.D1, Zeiss Microscopy).

Построение графиков и статистическую обработку результатов выполняли в программе SigmaPlot v14.0 (Systat Software Inc.). Для сравнения двух групп использовали t-тест Стьюдента и для сравнения трёх и более групп — тест Тьюки. Статистически значимыми считали различия при вероятности ошибки отклонения от нулевой гипотезы ниже 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных исследований методом 3D криопечати сформированы четыре группы гидрогелевых образцов на основе альгината натрия, сшитого 2 % и 10 % водными растворами CaCl_2 или BaCl_2 . В табл. 1 представлены результаты исследования их механических свойств.

При использовании ионов Ca^{2+} в качестве сшивающего агента матриц показано, что увеличение их концентрации в растворе в 5 раз приводит к увеличению значения модуля Юнга, и как следствие жесткости получаемых структур, почти в 2 раза. Это может быть объяснено возрастанием степени сшивки гидрогеля при наличии доступа к большему числу двухвалентных ионов в водном растворе.

Ионы Ba^{2+} в сравнении с ионами Ca^{2+} обладают большим сродством с молекулами альгината натрия [20], и их применение в качестве сшивающих агентов позволяет увеличить степень сшивки полимера. При использовании 2 % и 10 % водных

растворов BaCl_2 модули упругости образующихся гидрогелей в 4 и 2,5 раза, соответственно, превышают величину аналогичного параметра для альгинатных гидрогелей, сшитых такими же растворами CaCl_2 . При этом снижение эластичности образцов приводит к уменьшению их относительного удлинения при растяжении в 1,5 раза. При повышении концентрации BaCl_2 в растворе не выявлено статистически значимых различий в модуле Юнга, максимальной силе на разрыв и относительном удлинении альгинатных образцов, что говорит о том, что длительность 60 мин оказывается достаточной для полной сшивки гидрогеля вне зависимости от исходной концентрации сшивающего агента.

Степень межмолекулярной сшивки гидрогелей влияет на стабильность их трехмерной структуры. Поскольку применение 10 % раствора CaCl_2 позволило увеличить степень сшивки, а концентрация раствора BaCl_2 не оказала на нее существенного влияния, матрицы, сшитые 10 % растворами, были выбраны нами для дальнейших исследований.

При изучении процесса набухания альгинатных матриц на протяжении 21 суток их инкубации в культуральной среде при физиологических условиях (рис. 1) показано, что средний диаметр волокон увеличивается всего на 51 % и 56 % при сшивке CaCl_2 и BaCl_2 . Сформированные методом 3D криопечати альгинатные матрицы в течение трех недель оставались стабильны, что вполне позволяет обеспечить условия для эффективной пролиферации и дифференцировки клеток в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [21, 22]. При этом, характерный размер пор уменьшился с 500 до 250 мкм, что, в принципе, является допустимым для обеспечения требуемой в тканевой инженерии пористости матричных структур [23]. Также стоит отметить, что альгинатные волокна, сшитые BaCl_2 , являются более оптически плотными в сравнении с волокнами, сшитыми хлоридом кальция. Это мо-

Таблица 1

Механические свойства гидрогелевых образцов на основе АН, сшитого 2 % и 10 % водными растворами ионов Ca^{2+} или Ba^{2+}

| Гидрогелевые образцы | Модуль Юнга, Н/мм ² | Максимальная сила на разрыв, Н | Относительное удлинение, % |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| АН + 2 % Ca^{2+} | 1,1 ± 0,2 | 1,4 ± 0,1 | 110 ± 8 |
| АН + 10 % Ca^{2+} | 2,0 ± 0,2* | 1,7 ± 0,1* | 113 ± 8 |
| АН + 2 % Ba^{2+} | 4,3 ± 0,5* # | 2,2 ± 0,2* # | 77 ± 4* # |
| АН + 10 % Ba^{2+} | 5,3 ± 0,5* # | 2,5 ± 0,4* # | 67 ± 11* # |

* — $p < 0,05$ (vs. АН + 2 % Ca^{2+}), # — $p < 0,05$ (vs. АН + 10 % Ca^{2+}).

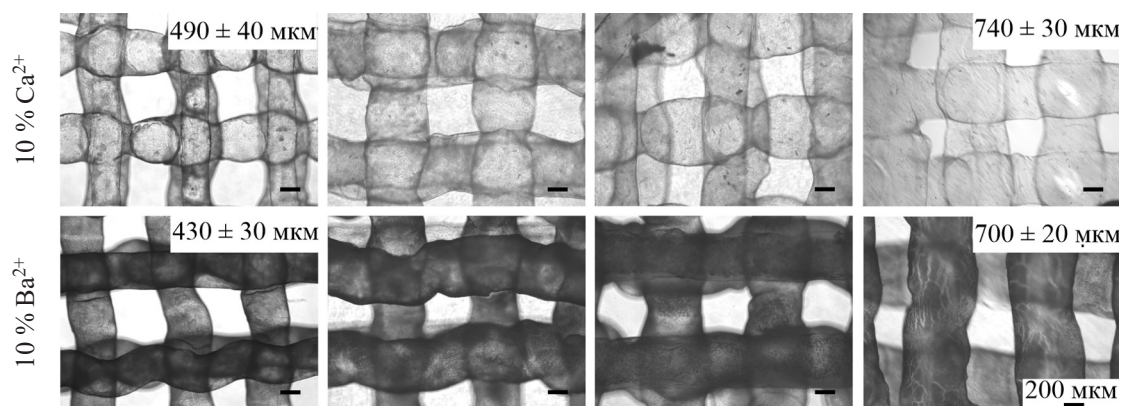


Рис. 1. Набухание АН матриц. Внешний вид структуры АН матриц на различных сроках их инкубации в культуральной среде. Оптическая микроскопия.

Fig. 1. Swelling of SA scaffolds. The appearance of SA scaffolds structure at different periods of their incubation in a culture medium. Light microscopy.

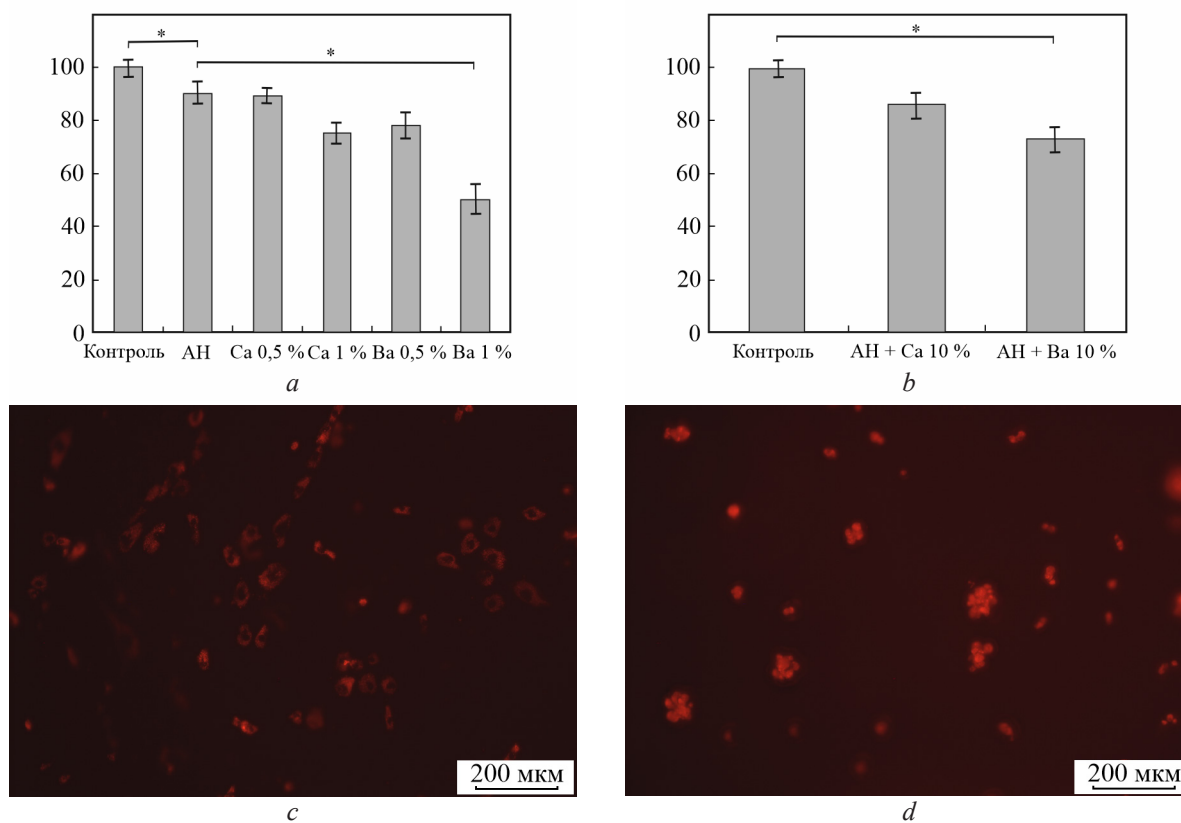


Рис. 2. МТТ-тест исходных соединений (а) и образцов АН матриц (b) на 3 суток. За 100 % взяты значения оптической плотности контрольной группы. * — $p < 0,05$. Флуоресцентная микроскопия ММСК на поверхности альгинатного матрикса сшитого Ca^{2+} (c) и Ba^{2+} (d). Окрашивание РКН-26.

Fig. 2. MTT-test of initial compounds (a) and SA scaffolds (b) for 3 days. The control group optical density values were taken as 100 %. * — $p < 0.05$. Fluorescence microscopy of MSCs on the surface of an alginate scaffold crosslinked with Ca^{2+} (c) and Ba^{2+} (d). PKH-26 staining.

жет быть объяснено возникающей в процессе полимеризации более плотной внешней оболочкой, обусловленной большей реакционной способностью ионов Ba^{2+} [20].

В результате исследования влияния компонентов АН матриксов на жизнеспособность ММСК (рис. 2а) после 1 суток инкубации в лунках с исходным альгинатом натрия (8 мг), а также с 1 % растворами $CaCl_2$ и $BaCl_2$, наблюдается статистически значимое ($p < 0,05$) отличие от контроля количества живых клеток. Снижение жизнеспособности ММСК на 10 % в присутствии альгината натрия можно объяснить увеличением вязкости среды и замедлением в ней процессов диффузии, обеспечивающей клеткам доступ к питательным веществам. Растворы $CaCl_2$ и $BaCl_2$ в высоких концентрациях оказывают негативное воздействие на ММСК, приводя к уменьшению количества живых клеток на 30 % и 50 %, соответственно, что следует учитывать при разработке процесса сшивки гидрогелевых матриксов.

В присутствии сформированных методом 3D криопечати АН матриксов, тщательно промытых в дистиллированной воде для удаления непрореагировавших соединений, жизнеспособность клеток снижалась на 15 % при использовании $CaCl_2$ в качестве сшивающего агента и на 30 % при использовании $BaCl_2$, что свидетельствует о более выраженном цитотоксическом эффекте последнего (рис. 2б).

Результаты исследования адгезионных свойств поверхности АН матриксов представлены на

рис. 2с, 2д. Образцы, сшитые $CaCl_2$, обеспечивают эффективную адгезию ММСК на 3 сутки, способствуя распластыванию клеток по поверхности гидрогеля. На образцах, сшитых $BaCl_2$, на 3 сутки наблюдали прикрепленные к поверхности агрегаты клеток, имеющих шарообразную форму. Вероятной причиной ослабления адгезии ММСК к структурообразующим волокнам АН матриксов, сшитых ионами Ba^{2+} , может служить изменение микротвердости их поверхности при применении более реакционноспособного иона [24].

На рис. 3 представлены микрофотографии окрашенных гематоксилином и эозином тканей лабораторных животных в зоне имплантации АН матриксов. При гистологической проводке при дегидратации в спиртах материал отделялся от тканей, в ряде случаев оставляя пустые пространства. В поры всех исследуемых сетчатых образцов активно вращалась грануляционная ткань, богатая полнокровными сосудами и молодыми фибробластами. В толще грануляционной ткани и вблизи поверхности матриксов наблюдали скопления сегментоядерных лейкоцитов и лимфоцитов, при этом иммунный ответ на компоненты матрикса был более выраженным для матриксов, сшитых $BaCl_2$, по сравнению с образцами, сшитыми $CaCl_2$. Причиной этого может являться выявленная нами еще на стадии *in vitro* экспериментов умеренная токсичность ионов Ba^{2+} . Также показано, что происходит активная биорезорбция сшитых ионами Ca^{2+} матриксов, характеризующаяся вращанием клеток соединительной ткани в толщу материала, в

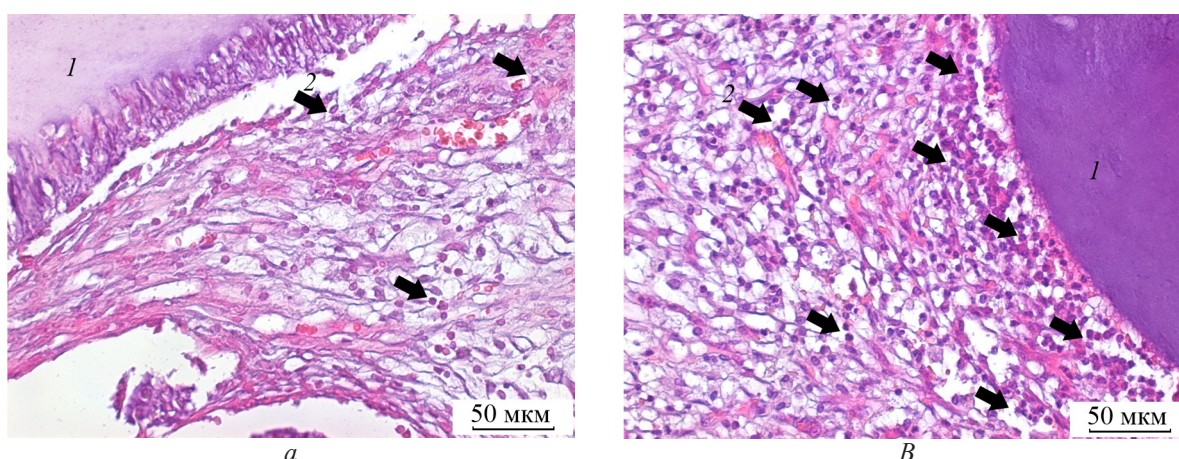


Рис. 3. Имплантированный внутримышечно АН матрикс, сшитый ионами Ca^{2+} (а) и Ba^{2+} (б) (14 суток). Окрашивание гематоксилином и эозином. 1 — материал, 2 — клетки воспаления. Оптическая микроскопия.

Fig. 3. Intramuscularly implanted SA scaffold crosslinked with Ca^{2+} (a) and Ba^{2+} (b) ions (14 days). Hematoxylin and eosin staining. 1 — material, 2 — inflammatory cells. Light microscopy.

то время как процесс деградации матриц, сшитых ионами Ba^{2+} , сильно затруднен в связи с протеканием выраженной иммунной реакции.

Выводы

Исследованы физические, механические и биологические свойства АН матриц, сформированных методом 3D криопечати, в зависимости от типа и концентрации используемого сшивающего агента.

Показано, что увеличение концентрации сшивающего агента приводит к улучшению прочностных характеристик исследованных образцов, снижению степени их набухания и стабилизации их трехмерной структуры при инкубации в ростовых средах.

При исследовании биологических свойств полученных матричных структур продемонстрировано, что применение ионов Ca^{2+} в качестве сшивающих агентов является более предпочтительным и перспективным по сравнению с ионами Ba^{2+} , поскольку они не оказывают выраженного токсического действия на клетки *in vitro* и на ткани лабораторных животных *in vivo*.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части разработки метода 3D криопечати и ФГБНУ «МГНЦ» в части *in vitro* исследований. Авторы выражают благодарность А.В. Васильеву за обсуждение результатов гистологического исследования.*

Литература/References

1. Aljohani W., Jumah, Wencho Li, Ullah M.W., et al. Application of sodium alginate hydrogel. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 2017, v. 03, no. 3, pp. 19–31.
2. Sahoo D.R., Biswal T. Alginate and its application to tissue engineering. *SN Applied Sciences*, 2021, v. 3, no. 1, <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04096-w>.
3. Cohen E., Merzendorfer H. Extracellular sugar-based biopolymers matrices. 2019, v. 12: Biological-inspired systems, 820 p.
4. Ching S.H., Bansal N., Bhandari B. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Taylor & Francis, 2017, v. 57, no. 6, pp. 1133–1152.
5. Abasalizadeh F., Moghaddam S.V., Alizadeh E., et al. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *Journal of Biological Engineering*, 2020, v. 14, no. 1, pp. 1–22.
6. Alsberg E., Anderson K.W., Albeiruti A., et al. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *Journal of Dental Research*, 2001, v. 80, no. 11, pp. 2025–2029.
7. Łabowska M.B., Cierluk K., Jankowska A.M., et al. A review on the adaption of alginate-gelatin hydrogels for 3D cultures and bioprinting. *Materials*, 2021, v. 14, no. 4, pp. 1–28.
8. Hu C., Lu W., Mata A., et al. Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, Elsevier B.V., 2021, v. 177, pp. 578–588.
9. Kothale D., Verma U., Dewangan N., et al. Alginate as promising natural polymer for pharmaceutical, food, and biomedical applications. *Current drug delivery*, Bentham Science Publishers, 2020, v. 17, no. 9, pp. 755–775.
10. Doderio A., Pianella L., Vicini S., et al. Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: An experimental design approach to predict the crosslinking degree. *European Polymer Journal*, 2019, v. 118, pp. 586–594.
11. Sarker M., Izadifar M., Schreyer D., et al. Influence of ionic crosslinkers (Ca^{2+} / Ba^{2+} / Zn^{2+}) on the mechanical and biological properties of 3D Bioprinted Hydrogel Scaffolds. *Journal of Biomaterials Science*, Polymer Edition, Taylor & Francis, 2018, v. 29, no. 10, pp. 1126–1154.
12. Mörch Ä.A., Donati I., Strand B.L., et al. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. *Biomacromolecules*, 2006, v. 7(5), pp. 1471–1480, doi: 10.1021/bm060010d.
13. Naghieh S., Karamooz-Ravari M.R., Sarker M.D., et al. Influence of crosslinking on the mechanical behavior of 3D printed alginate scaffolds: Experimental and numerical approaches. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2018, v. 80, no. October 2017, pp. 111–118.
14. Cao N., Chen X.B., Schreyer D.J. Influence of calcium ions on cell survival and proliferation in the context of an alginate hydrogel. *ISRN Chemical Engineering*, 2012, v. 2012, pp. 1–9.
15. Zimmermann U., Mimietz S., Zimmermann H., et al. Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy. *BioTechniques*, 2000, v. 29, no. 3, pp. 564–581.
16. Eiselt P., Yeh J., Latvala R.K., et al. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials*, 2000, v. 21, no. 19, pp. 1921–1927.
17. Zhang Y., Wang C., Jiang W., et al. Influence of stage cooling method on pore architecture of biomimetic alginate scaffolds. *Scientific Reports*, 2017, v. 7, no. 1, pp. 1–8.
18. Chae T., Yang H., Leung V., et al. Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2013, v. 24, no. 8, pp. 1885–1894.

19. Mironov A.V., Algebraistova P.Y., Komlev V.S., Mironova O.A., Popov V.K. An experimental device for studying the 3D cryoprinting processes. *Instruments and Experimental Techniques*, 2020, v. 63, iss. 6, pp. 890 – 892, doi: 10.1134/S0020441220050310.
20. Haug A., Smidsrod O. Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. *Acta Chemica Scandinavica*, 1970, v. 24, pp. 843 – 854.
21. Kurowiak J., Kaczmarek-Pawelska A., Mackiewicz A.G., et al. Analysis of the degradation process of alginate-based hydrogels in artificial urine for use as a bioresorbable material in the treatment of urethral injuries. *Processes*, 2020, v. 8, no. 3, p. 304.
22. Shahriari D., Koffler J., Lynam D.A., et al. Characterizing the degradation of alginate hydrogel for use in multilumen scaffolds for spinal cord repair. *Journal of Biomedical Materials Research — Part A*, John Wiley and Sons Inc., 2016, v. 104, no. 3, pp. 611 – 619.
23. Gao J., Ding X., Yu X., et al. Cell-free bilayered porous scaffolds for osteochondral regeneration fabricated by continuous 3D-printing using nascent physical hydrogel as ink. *Adv. Healthcare Materials*, 2020, v. 10, art. 2001404.
24. Alizadeh Sardroud H., Nemati S., Baradar Khoshfetrat A., et al. Barium-cross-linked alginate-gelatine microcapsule as a potential platform for stem cell production and modular tissue formation. *Journal of Microencapsulation*, 2017, v. 34, no. 5, pp. 488 – 497.

*Статья поступила в редакцию — 04.05.2023 г.
после доработки — 21.06.2023 г.
принята к публикации — 22.06.2023 г.*

Хворостина Мария Александровна — Институт фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук (108840, Москва, Троицк, ул. Пионерская, 2), младший научный сотрудник, специалист в области технологий аддитивного производства, физики полимеров и медицинского материаловедения; Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова (115522, Москва, ул. Москворечье, 1), младший научный сотрудник, специалист в области генетики эукариотических клеток и регенеративной медицины. E-mail: khvorostina.m@gmail.com.

Алгебраистова Полина Юрьевна — Институт фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук (108840, Москва, Троицк, ул. Пионерская, 2), инженер, специалист в области технологий аддитивного производства. E-mail: polina.alg@gmail.com.

Недорунова Ирина Алексеевна — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова (115522, Москва, ул. Москворечье, 1), научный сотрудник, специалист в области клеточной биологии и регенеративной медицины. E-mail: nedorubova.ia@gmail.com.

Бухарова Татьяна Борисовна — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова (115522, Москва, ул. Москворечье, 1), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, специалист в области клеточной биологии, генетики стволовых клеток и регенеративной медицины. E-mail: bukharova-rmt@yandex.ru.

Гольдштейн Дмитрий Вадимович — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова (115522, Москва, ул. Москворечье, 1), доктор биологических наук, заведующий лабораторией, специалист в области клеточных технологий в медицине. Email: dvgoldshtein@gmail.com.

Тетерина Анастасия Юрьевна — Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук (119334 Москва, Ленинский пр., 49), кандидат технических наук, научный сотрудник, специалист в области создания и исследования материалов медицинского назначения. Email: teterina_imet@mail.ru.

Комлев Владимир Сергеевич — Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук (119334 Москва, Ленинский пр., 49), чл.-корреспондент РАН, доктор технических наук, директор, специалист в области создания и исследования биоматериалов. Email: komlev@mail.ru.

Попов Владимир Карпович — Институт фотонных технологий федерального научно-исследовательского центра Кристаллография и фотоника Российской академии наук (108840, Москва, Троицк, ул. Пионерская, 2), доктор физико-математических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией, специалист в области физической химии, биоматериалов, лазерных, сверхкритических флюидных технологий и технологий аддитивного производства. E-mail: vladikarpov@gmail.com.

Influence of crosslinking agents on matrix properties of hydrogel structures based on sodium alginate

**M. A. Khvorostina, P. Y. Algebraistova, I. A. Nedorubova, T. B. Bukharova,
D. V. Goldshtein, A. Y. Teterina, V. S. Komlev, V. K. Popov**

A comparative study of gelation processes in aqueous solutions of sodium alginate initiated by their chemical crosslinking with divalent ions Ca^{2+} or Ba^{2+} was carried out. 3D cryoprinted hydrogel scaffolds of certain architectonics were formed from the studied compositions containing various concentrations of crosslinking agents. It is shown that the increase in the crosslinking agent concentration from 2 to 10 wt. % leads to the improvement in the strength characteristics of alginate structures. At the same time, scaffolds crosslinked with 10 % aqueous solutions of both CaCl_2 and BaCl_2 retain their structural stability during 21 days of incubation in a culture medium at a temperature of 37 °C. During *in vitro* experiments on cultures of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue, samples crosslinked with Ba^{2+} ions were found to demonstrate a moderate cytotoxic effect and showed their inability to maintain cell adhesion, unlike non-toxic scaffolds crosslinked in CaCl_2 aqueous solutions. *In vivo* analysis of experimental samples on an intramuscular implantation model for male Wistar rats also confirmed moderate cytotoxicity of alginate scaffolds formed using Ba^{2+} ions as crosslinking agents. The results obtained allow us to assert that of all the studied by us materials, sodium alginate crosslinked with a 10% CaCl_2 aqueous solution can be considered the most promising for various biomedical applications.

Keywords: sodium alginate, ion crosslinking, three-dimensional cryoprinting, matrix properties, biocompatibility.

Khvorostina Maria — Institute of Photon Technologies Federal Scientific Research Centre Crystallography and Photonics RAS (108840, Moscow, Troitsk, Pionerskaya str., 2), junior researcher; research interests: additive manufacturing, polymer physics and medical material science; Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics" (115522, Moscow, Moskvorechye str., 1), junior researcher; research interests: eukaryotic cell genetics and regenerative medicine. E-mail: khvorostina.m@gmail.com.

Algebraistova Polina — Institute of Photon Technologies Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics" Russian Academy of Sciences (108840, Moscow, Troitsk, Pionerskaya str., 2), engineer; research interests: additive manufacturing. E-mail: polina.alg@gmail.com.

Nedorubova Irina — Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics” (115522, Moscow, Moskvorechye str., 1), researcher; research interests: cell biology and regenerative medicine. E-mail: nedorubova.ia@gmail.com.

Bukharova Tatiana — Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics” (115522, Moscow, Moskvorechye str., 1), PhD in Biology, leading research scientist; research interests: cell biology, stem cells genetics and regenerative medicine. E-mail: bukharova-rmt@yandex.ru.

Goldstein Dmitry — Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics” (115522, Moscow, Moskvorechye str., 1), Dr Sci, head of laboratory; research interests: biomedical technologies. Email: dvgoldstein@gmail.com.

Teterina Anastasia — Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science (119334 Moscow, Leninskiy pr, 49), PhD, researcher; research interests: materials for medical application. Email: teterina_imet@mai.ru.

Komlev Vladimir — Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science (119334 Moscow, Leninskiy pr, 49), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr Sci, director; research interests: biomaterials. Email: komlev@mail.ru.

Popov Vladimir — Institute of Photon Technologies Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” Russian Academy of Sciences, Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” Russian Academy of Sciences (108840, Moscow, Troitsk, Pionerskaya str., 2) Dr Sci, chief researcher; head of laboratory; research interests: physical chemistry, biomaterials, laser and supercritical fluid technologies, additive manufacturing. E-mail: vladikarpopov@gmail.com.