

Клеточная инкапсуляция в полупроницаемые альгинатные микрокапсулы с использованием высокого напряжения

О. ГРИШКОВ, Х. ЦЕРНЕЧ, Т. ХАКРАДЕО, Б. ГЛАСМАХЕР

Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

Cell Encapsulation in Semi-Permeable Alginate Micro-Capsules Using High Voltage Processes

O. GRYSHKOV, H. ZERNETSCH, T. CHAKRADEO, B. GLASMACHER

Institute for Multiphase Processes, Leibniz University Hannover, Germany

Клеточная терапия имеет большой потенциал лечения широкого спектра заболеваний (печеночная недостаточность, болезнь Паркинсона и др.). Инкапсуляция живых клеток в полупроницаемые мембраны (например, альгинатные микрокапсулы) была предложена как средство избежания нежелательного иммунного ответа реципиента, достижения контролируемой доставки терапевтических веществ, произведенных инкапсулированными клетками, и долгосрочного выхода терапевтических веществ. Большой интерес в костно-тканевой инженерии также представляют быстро деградирующие микрокапсулы на основе альгината, содержащие стволовые клетки. Размер альгинатных микрокапсул, их проницаемость и скорость деградации должны соответствовать типу живых клеток и скорости их пролиферации, которые используются для инкапсуляции.

В этой работе представлена возможность инкапсуляции живых клеток в альгинатные микрокапсулы с помощью электрораспыления. Раствор полимерного альгината находится внутри шприца и откачивается через наконечник с помощью электрического поля с высокой напряженностью в заземленную ванну со сшивающим раствором CaCl_2 . При попадании в сшивающий раствор альгинат сразу превращается в гель за счет быстрого физико-химического взаимодействия между сшиваемыми агентами. Для получения мелких микрокапсул с регулируемым распределением размеров были оптимизированы такие параметры процесса, как: концентрация альгината, скорость потока, расстояние распыления, прикладываемое напряжение, концентрация сшивающего раствора. Фибробласты NIH 3T3 были инкапсулированы при различных концентрациях (10^6 , 5×10^6 , 10^7 кл/мл) в стерильных условиях. Распределение размеров микрокапсул, а также эффективность инкапсуляции клетки изучали с помощью микроскопа «Carl Zeiss Axiovert 200M» с 5- или 10-кратными увеличениями и программного обеспечения «AxioVision V 4.8.2.0».

При электрораспылении размер микрокапсулы альгината можно регулировать путем корректировки одного или нескольких оптимизированных параметров. Было показано, что точное управление диаметром гранулы возможно только при распылении струйного потока (от 15–17 кВ). Существенного влияния скорости потока на гранулу не наблюдается (в пределах напряженности электрического поля 2 кВ/см). Было обнаружено, что напряжение и концентрация альгината являются наиболее значимыми параметрами, определяющими размеры микрокапсул, в то время как концентрация CaCl_2 в основном влияет на их морфологию и однородность. Эффективность клеточной инкапсуляции, а также диаметр гранулы можно контролировать с помощью концентрации клеток, скорости потока, прикладываемого напряжения, концентрации сшивающего раствора. Кроме того, было установлено, что увеличение начальной концентрации клеток приводит к уменьшению диаметра микрокапсул. Проведенные эксперименты по выживаемости клеток после инкапсуляции доказали эффективность технологии клеточной инкапсуляции в альгинатные полупроницаемые полимерные матрицы с использованием высокого электрического напряжения.

Cell therapies have a great potential to treat a wide variety of diseases (liver failure, Parkinson disease *etc.*). Encapsulation of living cells in semi-permeable membranes (such as alginate micro-capsules) has been proposed as a means to avoid undesired host immune response, to achieve controlled delivery of therapeutic products produced by encapsulated cells and to continuously release therapeutic products for longer durations [1]. Fast degradable alginate-based micro-capsules containing stem cells are also of great interest in bone-tissue engineering [2]. Size of alginate micro-capsules, their permeability and degradation rate should be previously matched with the type of living cell and their proliferation rate being used for encapsulation.

This work indicates the possibility to encapsulate living cells into alginate micro-capsules using electrospraying. Alginate polymer solution is kept inside the syringe and pumped through the nozzle applied high-strength electric field into the grounded bath with CaCl_2 cross-linking solution. When being dropped into the cross-linking solution, alginate becomes immediately gelled due to the fast physic-chemical interaction between cross-linkable agents. To provide small micro-capsules with controlled size distribution the process parameters (alginate concentration, flow rate, spraying distance, applied voltage, concentration of cross-linking solution) were optimized. NIH 3T3 fibroblasts cells were encapsulated at different densities (10^6 , 5×10^6 , 10^7 cells/ml) under sterile conditions. Size distribution of micro-capsules as well as cell encapsulation efficiency was studied using Carl Zeiss Axiovert 200M microscope with 5× or 10× magnifications and AxioVision V 4.8.2.0 built-in software.

Using electro-spraying the size of alginate micro-capsules can be controlled by adjusting one or a couple of optimized parameters. It has been shown that the precise control over the bead diameter is only possible when spraying in jet flow regime (ranging from 15–17 kV). No significant effect of flow rate on bead diameter (within strength of electric field 2 kV/cm) has been observed. Voltage and alginate concentration were found to be the most important parameters that determine the micro-capsules size, while CaCl_2 concentration affects mainly their morphology and homogeneity. Cell encapsulation efficiency as well as bead diameter can be controlled by cell density, flow rate, applied voltage, concentration cross-linking solution. Moreover, it has also been observed that an increase in initial cell concentration causes a decrease in micro-capsules diameter. Previous experiments on cell survival post encapsulation process have proven the effectiveness of cell encapsulation technology into alginate semi-permeable polymer matrices using high-voltage processes.