

УДК 577.1

©Коллектив авторов

## ВКЛЮЧЕНИЕ И ВЫСВОБОЖДЕНИЕ *IN VITRO* ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

Т.В. Суханова<sup>1\*</sup>, А.А. Артюхов<sup>2</sup>, И.А. Прудченко<sup>1</sup>, А.С. Голунова<sup>2</sup>,  
М.А. Семенихина<sup>2</sup>, М.И. Штильман<sup>2</sup>, Е.А. Марквичева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;  
тел.: (495)3360600; эл. почта: sukhonovat@mail.ru

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет  
имени Д.И. Менделеева, Москва

Целью работы было включение дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) в сшитые полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта различного строения с последующим изучением кинетики выхода из них пептида в модели *in vitro*.

В работе были использованы изотропные и макропористые гидрогели на основе акрилового производного поливинилового спирта (Акр-ПВС), а также эпоксидсодержащие макропористые гидрогели, получаемые сополимеризацией данного макромера с глицидиловым эфиром метакриловой кислоты

В макропористый гидрогель ПВС пептид включали путем нанесения его водного раствора на предварительно сформированную матрицу, в эпоксидсодержащий гель ПВС-ГМА – путём адсорбции из водного раствора, а в изотропный гель ПВС – путём введения пептида в полимерную смесь в процессе формирования гидрогеля. Кинетику выхода пептида из гидрогелей исследовали при инкубации матриц в фосфатно-солевом буфере (PBS; pH 7,4), в физ. растворе (0,9% раствор NaCl) и в воде, определяя концентрацию ДСИП в супернатантах с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ.

Из макропористого гидрогеля ПВС в течение первых 30 мин инкубации выход ДСИП составлял 74%, 70% и 64% в воде, PBS и 0,9% растворе NaCl, соответственно, а завершился через 3 ч. Из гидрогеля, содержавшего эпоксигруппы, даже спустя 48 ч инкубации не наблюдали выделения ни пептида, ни продуктов его распада.

Для свежеприготовленного изотропного геля кинетика выхода пептида выглядела следующим образом: 27% в течение первых 30 мин и 78% через 33 ч. Для лиофильно высушенных образцов гидрогелей выход пептида составлял 63% в течение первых 30 мин, в то время как высушивание образцов гидрогеля при комнатной температуре в течение 3 сут. приводило к потере значительной части пептида в результате разрушения его структуры.

**Ключевые слова:** макропористые полимерные гидрогели, модифицированный ПВС, дельта-сон индуцирующий пептид, включение пептидов, кинетика выхода пептида *in vitro*, тканевая инженерия.

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** Возникновение тканевой инженерии связывают с работами Langer и Vacanti, которые первыми сформулировали определение тканевой инженерии и первыми предложили включать стволовые или дифференцированные клетки, выделенные из организма донора или пациента, в пористую биodeградируемую полимерную матрицу (т.н. скаффолд) с последующей имплантацией в организм пациента [1]. Особенно быстрое развитие данная область биомедицины получила в последние несколько лет [2, 3].

Для получения полимерных матриц используются различные природные полимеры, например, коллаген [4], шёлк [5], полигидроксibuтират [6] и синтетические полимеры, такие как полиэферы молочной и гликолиевой кислот [7-10], полиаминокислоты [11], поливиниловый спирт [12, 13], либо их композиты, например, ПВС-альгинат [14], ПВС-хитозан [15-16]. Полимерные матрицы изготавливают в виде макропористых губок [12,17], либо микро- и нановолокон [18-19], либо микроносителей [20].

Одним из способов улучшения биосовместимости матрицы является ковалентная иммобилизация на ее поверхности ростовых факторов, которые способствуют усилению синтеза межклеточного матрикса клетками [21–22]. На матрице иммобилизуют также биоактивные пептиды (например, RGD пептид), которые взаимодействуют с мембранными рецепторами клетки и обеспечивают более хорошую адгезию и распластывание клеток на полимерной матрице [23].

Полимерная подложка с включенными в неё лекарственными препаратами и биоактивными молекулами (например, белками или пептидами) является биоактивным имплантатом, при этом биомолекулы высвобождаются за счёт диффузии и/или при постепенной биodeградации матрицы и ускоряют процесс репарации тканей [24–25].

В данной работе исследовали гидрогели на основе акрилового производного ПВС, в которые включали дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП, Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu), взятый в качестве модельного пептида. Выбор данного пептида можно обосновать следующим образом. ДСИП является эндогенным пептидом, поскольку был обнаружен в 1977 г. в венозной крови кроликов, подвергнутых медленно-волновому сну [26]. Этот пептид обладает целым спектром изученных биологических активностей [27, 28], в том числе ярко выраженным стресс-протекторным действием [29, 30]. На основе этого пептида создан лекарственный препарат нейропротекторного действия “Дельтаран”, проведены доклинические и клинические испытания и показана его безопасность. Биологические испытания на животных выявили его ранозаживляющие эффекты и при его периферийном введении (внутрибрюшинном, внутривенном) [31].

Было показано, что ДСИП влияет на биосинтез белков и нуклеиновых кислот, снижая активность рибонуклеотидредуктазы, что, в свою очередь, усиливает пролиферативную активность клеток [32]. Вышеперечисленные свойства ДСИП могут оказаться полезными в клеточной инженерии. Однако, существенным недостатком ДСИП является его быстрое разрушение пептидазами в организме (5-7 мин) [33], поэтому требуется пролонгирование его действия, например, путём его включения в полимерные матрицы.

Целью данной работы было включение ДСИП различными методами в полимерные гидрогели на основе модифицированного ПВС и последующее исследование кинетики выхода из них пептида в модели *in vitro*.

**МЕТОДИКА.**

*Материалы.* В работе использовали ДСИП (Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu, pI 4,7; ММ 849 Да), синтезированный в ИБХ РАН; PBS (“Панэко”, Россия), NaCl (“Реахим”, Россия), ацетон (“Химмед”, Россия), ацетонитрил (“Biosolve”, Нидерланды), трифторуксусная кислота (ТФУ) (“Aldrich”, USA), поливиниловый спирт (ПВС) (BF-03, ММ 13000-18000 Да), (“ССР”, Тайвань), персульфат калия (ПСК), N,N,N',N'-тетраметилендиамин (ТМЕД), (“Sigma” США), глицидилметакрилат (ГМА), (“Пента91”, Россия), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Самарская фармацевтическая фабрика, Россия), аскорбиновая кислота (“Люми”, Россия), этиловый спирт 96% (“Главспирт”, Россия), диметилформамид (ДМФА), (“Химмед”) и вода, очищенная с помощью установки Millipore.

*Модификация поливинилового спирта.* Модификацию ПВС с помощью ГМА с целью введения в состав полимера двойных связей, способных к сшивке по радикальному механизму, проводили в среде ДМФА, как описано ранее в [12]. Навеску поливинилового спирта растворяли в диметилформамиде. Раствор охлаждали до температуры реакции, добавляли раствор глицидилметакрилата в диметилформамиде и перемешивали при нагревании в атмосфере азота. По завершении процесса реакцию систему охлаждали. Полимер высаживали в ацетон, очищали диализом и высушивали лиофильно. Для получения всех исследуемых гидрогелей использовался ПВС со степенью замещения 3,5 моль/%.

*Синтез макропористых полимерных гидрогелей на основе модифицированного ПВС.* Навеску полимера Акр-ПВС (0,6 г) растворяли в 10 мл дистиллированной воды при 80°C, после чего охлаждали до ~5°C. Для удаления растворенного кислорода раствор выдерживали под вакуумом и продували аргоном, после чего добавляли иницирующую систему (0,6 мл 2% водного раствора ПСК и 0,06 мл ТМЕД). После добавления иницирующей системы реакцию систему заливали в стеклянные формы и помещали в криотермостат (Julabo F-32, США), где поддерживали температуру -15±0,2°C в течение 6 ч.

По завершении процесса реакцию систему быстро размораживали, образовавшийся гидрогель промывали в кипящей воде до полного исчезновения в промывных водах непрореагировавших компонентов. Качество отмывки определяли спектрофотометрически, измеряя интенсивность поглощения в интервале длин волн 200-300 нм (Beckman DU-65, Германия). Отмытые гидрогели замораживали и сушили лиофильно с помощью Alpha I-4LD (“Martin Christ GmbH”, Германия) [12].

*Синтез макропористых полимерных гидрогелей ПВС-ГМА.* Навеску модифицированного полимера Акр-ПВС (0,38 г) растворяли в 10 мл дистиллированной воды при 80°C, после чего охлаждали, добавляли ГМА (2,2 г), после чего раствор охлаждали до температуры ~ 5°C. Для удаления растворённого кислорода раствор вакуумировали и продували аргоном, после чего добавляли иницирующую систему (0,6 мл 2% водного раствора ПСК и 0,06 мл ТМЕД). Затем реакцию систему заливали в стеклянные формы и помещали в криотермостат (Julabo F-32, США) и инкубировали при -15±0,2°C в течение 6 ч.

*Исследование структуры геля.* Исследование структуры геля проводили методом сканирующей электронной микроскопии с помощью системы WinEDS (JSM U3, Япония) при увеличении 100×, 300× и 1000×, напряжении 15 кВ и силе тока 1×10<sup>-10</sup> А.

## ВКЛЮЧЕНИЕ И ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ДСИП ИЗ ГИДРОГЕЛЕЙ

*Включение ДСИП в макропористый гидрогель модифицированного ПВС.* Раствор ДСИП (100–400 мкл, 0,1 мг/мл) наносили на образец гидрогеля модифицированного ПВС массой 12–14 мг и после 1 ч инкубации при комнатной температуре замораживали и лиофилизировали.

*Иммобилизация ДСИП в макропористом гидрогеле ПВС-ГМА.* Образцы гидрогеля (17–25 мг) помещали в 1 мл водного раствора ДСИП (0,1 мг/мл) и инкубировали при осторожном перемешивании на качалке (Ika-Vibrax-Vxr, “Ika”, Германия, 100 об./мин) в течение ночи. Затем водный раствор отбирали с последующим определением содержания остаточного ДСИП в растворе с помощью ВЭЖХ, а полученный матрикс сушили лиофильно.

*Включение ДСИП в изотропный гидрогель модифицированного ПВС.* К 1 мл раствора Акр-ПВС добавляли 25 мкл раствора ДСИП (10 мг/мл) и иницирующую систему (10 мкл 15% аскорбиновой кислоты и 10 мкл 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), быстро разливали по 300 мкл в стеклянные пробирки или плоские формы (10×10×4 мм).

В зависимости от цели эксперимента полученные гели сушили на воздухе или лиофильно, либо исследовали кинетику выхода пептида из влажных свежеприготовленных гелей.

*Исследование кинетики выхода ДСИП в модели in vitro.* Образцы полимерных носителей с иммобилизованным ДСИП инкубировали в воде MilliQ, 0,9% р-ре NaCl или PBS (pH 7,4) в стеклянных пробирках при осторожном перемешивании на качалке (Ika-Vibrax-Vxr, “Ika”, 100 об./мин) с отбором проб через 0,5, 1, 3, 6, 24, 48 и 52 ч. Концентрацию ДСИП в супернатанте определяли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ.

ВЭЖХ проводили в изократическом режиме на хроматографе System Gold (“Beckman”, США), колонка Gemini 5u C18 110Å (250×4,6 мм, 5 мкм) (“Phenomenex”, США) и колонка (3) Luna 5u C18(2) 100Å (250×4,6 мм, 5 мкм) при длине волны 222 нм. Объём вводимой в инжектор пробы составлял 20 мкл. Подвижная фаза содержала 0,07% ТФУ в 13% р-ре ацетонитрила, скорость элюции составляла 1 мл/мин.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Синтетические полимерные матрицы на основе поливинилового спирта и его производных широко используются в тканевой инженерии, так как они обладают длительной механической стабильностью и при наличии сообщающихся пор поддерживают адгезию и пролиферацию клеток [19, 20].

Для гидрогелей ПВС характерны биосовместимость, отсутствие токсичности и удобство в обработке. Гидрогели на основе ПВС используются как полимерные покрытия для заживления наружных ран [34–37], так и в качестве матриц в тканевой инженерии [19]. Пористость гидрогелевой матрицы позволяет создавать комфортные условия для 3-D роста и пролиферации клеток в случае использования гидрогеля в качестве имплантата и улучшает газообмен, когда применяется как раневое покрытие.

Одним из методов получения сшитых гидрогелей поливинилового спирта является метод, основанный на использовании предварительно модифицированного ПВС, содержащего в боковой цепи ненасыщенные группы, которые способны образовывать межмолекулярные сшивки в присутствии инициаторов радикальной полимеризации [12, 38–39]. Данный метод позволяет увеличить термостабильность синтезируемых полимерных систем, а также делает возможным регулирование размера полимерных фрагментов, образующихся при биodeградации полимерного гидрогеля.

В данной работе был использован низкомолекулярный ( $M_n=12\times10^3$ ) ПВС модифицированный глицидиловым эфиром метакриловой кислоты.



Процесс сшивки в водных растворах модифицированного ПВС осуществляли в присутствии инициаторов радикальной полимеризации как при положительных температурах, с образованием изотропных гидрогелей, так и в криоусловиях, для получения пористых полимерных систем (рис. 1А).

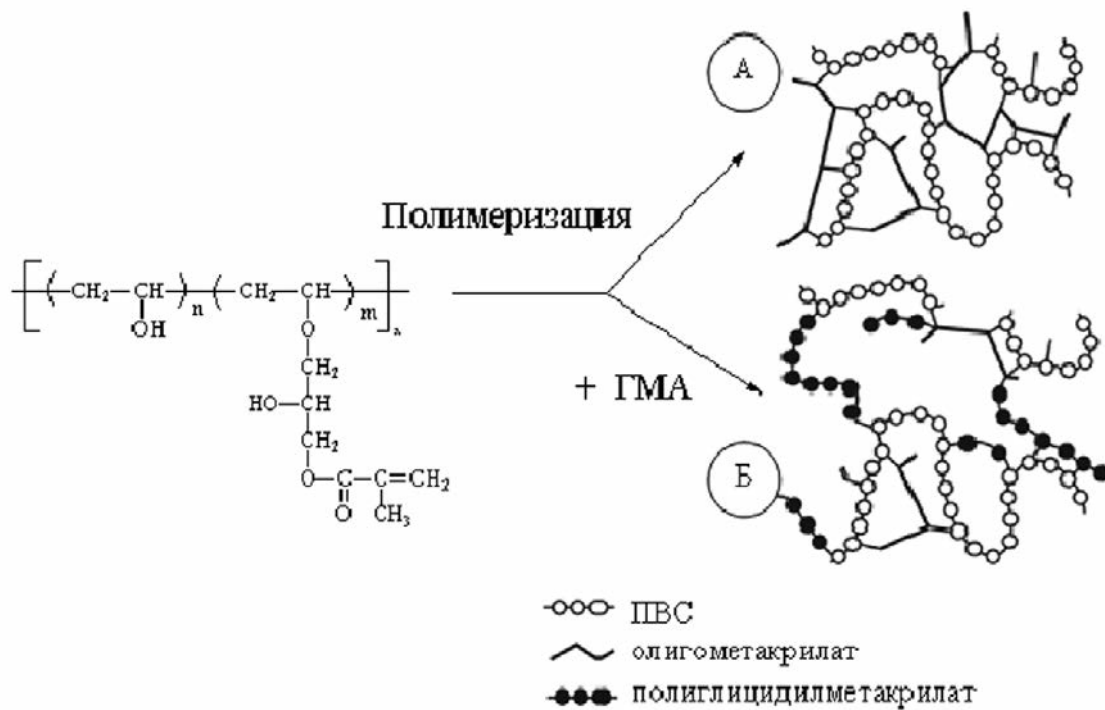


Рисунок 1.

Схема синтеза гидрогелей на основе Акр-ПВС (А) и эпоксидсодержащих гидрогелей ПВС-ГМА (Б).

Кроме того, путём добавления при радикальной сшивке в реакцию систему низкомолекулярного эпоксидсодержащего мономера (глицидилметакрилата) получали эпоксидсодержащие гидрогели ПВС, содержащие высокореакционные эпоксидные группы, способные обеспечивать ковалентное связывание различных лигандов с поверхностью матрикса (рис. 1Б).

*Исследование эффективности иммобилизации ДСИП в макропористом гидрогеле ПВС-ГМА.* Ковалентную иммобилизацию ДСИП в макропористом геле осуществляли путем инкубирования образцов геля в растворе пептида в течение 16-18 ч при комнатной температуре с последующим определением содержания остаточного ДСИП в растворе методом ВЭЖХ. При этом по истечении указанного времени пептида в растворе не обнаруживали, что позволяло сделать вывод о том, что весь ДСИП связался ковалентно с матрицей.

*Исследование кинетики выхода ДСИП из гидрогелей ПВС.* На рисунке 2 представлена кинетика выхода пептида из макропористого геля на основе Акр-ПВС, в который пептид был включен методом нанесения раствора пептида на предварительно сформированную матрицу с последующим лиофильным высушиванием (кривые 1, 2, 3), и изотропного геля, в который пептид включали непосредственно на стадии формирования гидрогеля (кривая 4).

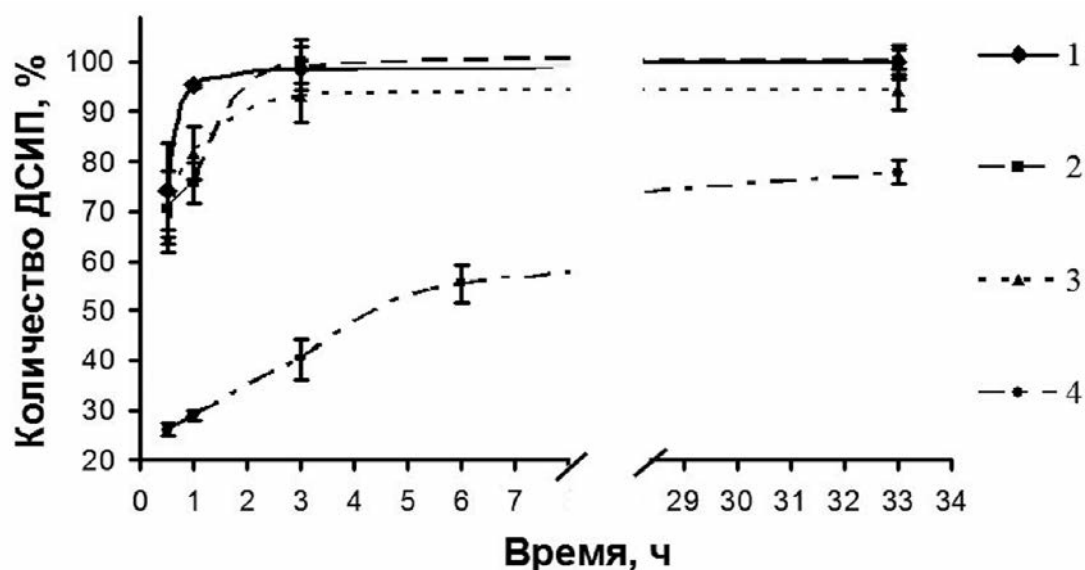


Рисунок 2.

Кинетика выхода ДСИП из макропористого гидрогеля на основе модифицированного ПВС в воде (1), физ. растворе (2), фосфатно-солевом буфере, pH 7,4 (3), и из свежеприготовленного изотропного геля в физ. растворе (4). За 100% принимали кол-во ДСИП, включённого в матрицу.

Видно, что при инкубации макропористого гидрогеля с включённым пептидом в 0,9% растворе NaCl и PBS (pH 7,4) практически полный выход пептида наблюдали в течение 3 ч, а в воде MilliQ — в течение 1 ч. При этом более 50% ДСИП выделилось в течение первых 30 мин инкубации: 64% в PBS, 71% в 0,9% растворе NaCl и 74% в воде, соответственно (рис. 2, кривые 1, 2, 3). Выделение ДСИП из изотропных гелей ПВС происходило значительно медленнее: 26% спустя 30 мин и 75% спустя 33 ч инкубации (рис. 2, кривая 4).

Достаточно быстрое высвобождение пептида из макропористых гидрогелей может быть объяснено, в первую очередь, их высокой удельной поверхностью, обусловленной наличием в них развитой пористой структуры (рис. 3) [12]. Кроме того, следует учесть и тот факт, что связывание пептида с поверхностью матрицы обеспечивалось лишь за счёт образования непрочных водородных связей между гидроксигруппами поливинилового спирта и функциональными группами молекул пептида [40]. Характер связывания пептида с матрицей, очевидно, объясняет и слабое влияние ионной силы на кинетику его выделения (рис. 2, кривые 1, 2, 3).

Для изотропного геля, не обладающего пористой структурой, скорость выхода пептида была существенно ниже. Как видно из рисунка 2 (кривая 4), в течение первых 30 минут инкубации в физиологическом растворе из изотропного геля выделилось только 26% включенного в матрицу ДСИП, а максимума концентрация пептида в растворе достигла лишь спустя 33 ч (78%).

Наблюдаемый неполный выход пептида из объёма изотропного геля, может объясняться, очевидно, его частичной “прививкой” на поверхности матрицы за счёт реакций передачи цепи при сшивке модифицированного поливинилового спирта по свободнорадикальному механизму.

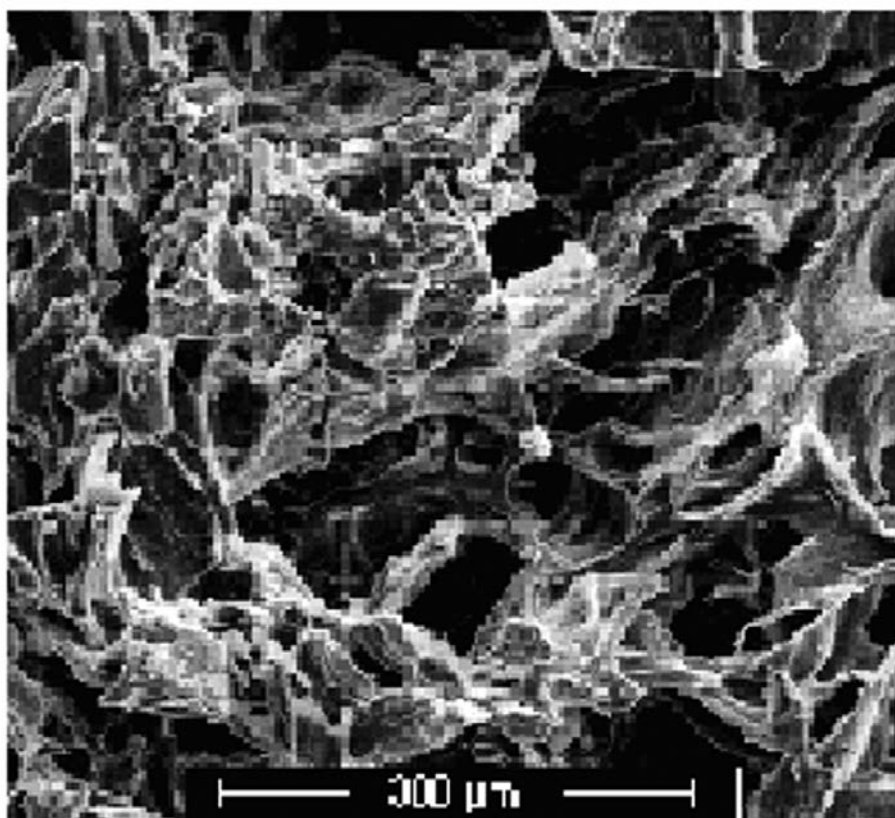


Рисунок 3.

Микрофотография макропористого гидрогеля на основе модифицированного ПВС (сканирующая электронная микроскопия).

Далее изучали возможность высушивания изотропных гелей ПВС с включённым в него пептидом и влияние метода сушки на кинетику выхода из него ДСИП.

На рисунке 4 показаны кинетические кривые выхода пептида из свежеприготовленного образца изотропного гидрогеля и образцов, высушенных различными методами.

Видно, что выход пептида из лиофилизированных образцов изотропных гидрогелей происходил существенно быстрее, чем из влажных свежеприготовленных. Так, из лиофилизированного образца за первые 30 мин выделялось 62% пептида, а максимальная концентрация пептида в растворе (85%) достигалась после 3-х ч инкубирования. Таким образом, кинетика выделения пептида из лиофилизированного изотропного геля была сравнима с таковой для образцов макропористого гидрогеля. Столь быстрый выход пептида может быть объяснён образованием при кристаллизации воды в объёме гидрогеля пор-дефектов структуры, существенно увеличивающих его удельную поверхность.

В случае сушки на воздухе в силу высокой гидрофильности полимера, образующего матрицу гидрогеля, процесс сушки занимал до 3 суток. При этом было обнаружено разрушение значительной доли включённого пептида (рис. 4, кривые 2а и 2б), что выражалось в появлении на хроматограмме дополнительного пика (рис. 5).

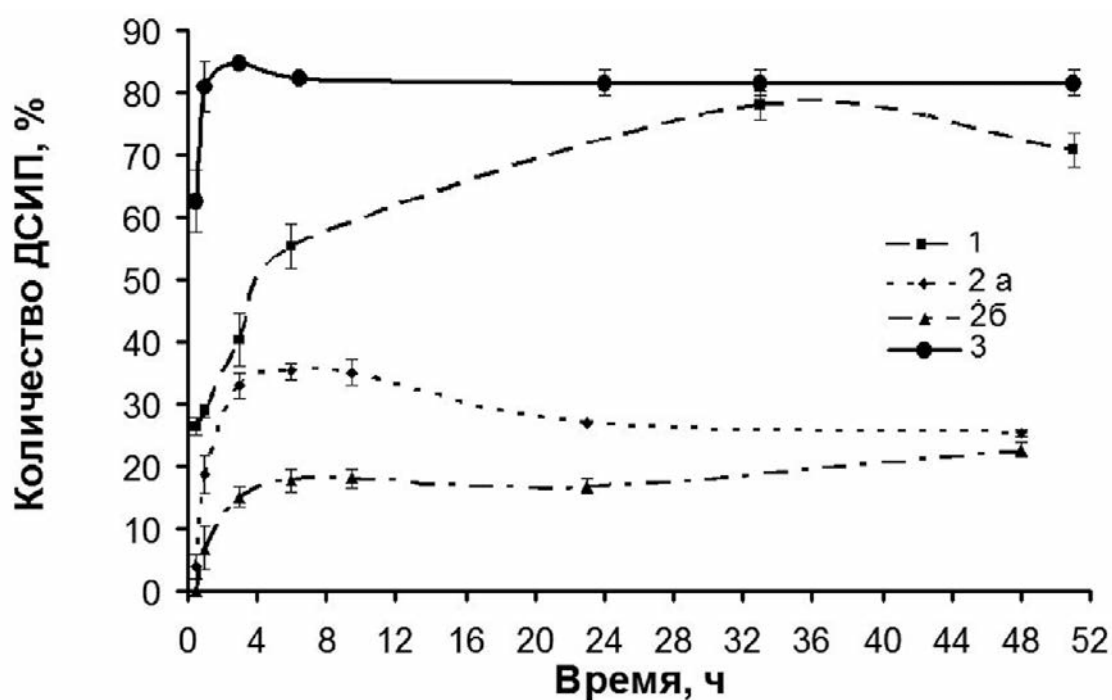


Рисунок 4.

Кинетика выхода ДСИП из изотропного гидрогеля на основе модифицированного ПВС при инкубации в физ. растворе в зависимости от способа его высушивания:

- 1 -свежеприготовленный образец (без сушки), 2 - образец после сушки в течение 3 сут. при комнатной температуре (2а - основной пик, соответствующий ДСИП, 2б - дополнительный пик), 3 -лиофильно высушенный образец.  
За 100% принимали количество ДСИП, введенное в матрицу.

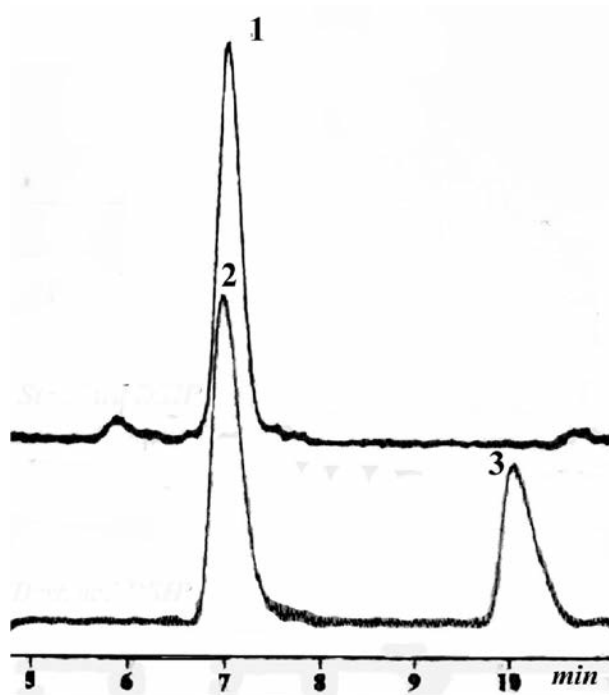


Рисунок 5.

Хроматограммы ДСИП (верхняя кривая-стандарт, нижняя кривая - ДСИП в супернатанте). 1, 2 - пики, соответствующие ДСИП, 3 - дополнительный пик, появляющийся после сушки образца изотропного гидрогеля ПВС в течение 3 суток на воздухе.



На основании полученных результатов можно заключить, что макропористый гидрогель с включенным в него пептидом более пригоден в качестве основы для имплантатов, так как имеет развитую поверхность и сообщающиеся поры, что создает условия для трёхмерного роста клеток. Включение же пептида в изотропный гель на стадии его получения можно предложить для использования в инъекционных формах, отверждаемых *in vivo*.

*Исследование кинетики выхода ДСИП из макропористых гидрогелей, содержащих эпоксидные группы (ПВС-ГМА).* Изучение кинетики выхода ДСИП из макропористых гидрогелей, содержащих эпоксидные группы, показало, что практически весь пептид связывается полимерным носителем, а при инкубации матрикса с иммобилизованным пептидом в 0,9% растворе NaCl даже спустя 48 ч не наблюдали выхода ДСИП или продуктов его распада. Это, очевидно, можно объяснить взаимодействием эпоксидных групп носителя с карбоксильными и аминогруппами С- и N-концевых аминокислот - Glu и Trp, соответственно, а также с карбоксильной группой Asp с образованием не гидролизуемых в мягких условиях эксперимента ковалентных связей. В то же время можно предположить, что выделение иммобилизованного пептида вполне возможно при биодеградациии матрицы в случае её имплантации *in vivo* путём постепенной биодеструкции геля.

**ВЫВОДЫ.** Разработаны методы включения ДСИП в макропористые и изотропные гидрогели на основе модифицированного поливинилового спирта. Показано, что высвобождение пептида из макропористых матриц происходит в течение 3 ч, а в случае изотропного геля достигается пролонгирование до 33 ч. При использовании эпоксидсодержащего гидрогеля ПВС-ГМА, происходит необратимое связывание пептида с полимерной матрицей. Кинетика выхода пептида из изотропного гидрогеля зависит от способа его высушивания. Полученные результаты могут быть полезны при разработке методов включения других пептидов в матрицы на основе поливинилового спирта, предназначенные для тканеинженерных конструкций (макропористые гидрогели), раневых покрытий и инъектируемых отверждаемых композиций для малоинвазивной хирургии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Langer R., Vacanti J.P. (1993) Science, **260**, 920-926.
2. Sachlos E., Czernuszka J.T. (2003) ECM, **5**, 29-40.
3. Grayson W.L., Martens T.P., Eng G.M., Radisic M., Vunjak-Novakovic G. (2009) Semin. Cell. Dev. Biol., **20**, 665-673.
4. Yannas I.V., Tzeranis D.S., Harley B.A., So P.T. (2010) Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci., **368**(1917), 2123-2139.
5. Leal-Egaña A., Scheibel T. (2010) Biotechnol. Appl. Biochem., **55**(3), 155-167.
6. Ye C., Hu P., Ma M.X., Xiang Y., Liu R.G., Shang X.W. (2009) Biomaterials, **30**, 4401-4406.
7. Lu H.H., El-Amin S.F., Scott K.D., Laurencin C.T. (2003) J. Biomed. Mater. Res. A, **64**, 465-474.
8. Day R.M., Boccaccini A.R., Maquet V., Shurey S., Forbes A., Gabe S.M., Jérôme R. (2004) J. Mater. Sci. Mater. Med., **15**, 729-734.

9. *Cooper J.A., Lu H.H., Ko F.K., Freeman J.W., Laurencin C.T.* (2005) *Biomaterials*, **26**, 1523-1532.
10. *Jiang J., Tang A., Ateshian G.A., Guo X.E., Hung C.T., Lu H.H.* (2010) *Ann. Biomed. Eng.*, **38**, 2183-2196.
11. *Studenovská H., Vodicka P., Proks V., Hluuiová J., Motlík J., Rypáček F.* (2010) *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 454-463.
12. *Artyukhov A.A., Shtilman M.I., Kuskov A.N., Pashkova L.I., Tsatsakis A.M., Rizos A.K.* (2010) *J. Non-Cryst. Solids*, **21**, 783-786.
13. *Holloway J.L., Lowman A.M., Palmese G.R.* (2010) *Acta Biomater.*, **6**, 4716-4724.
14. *Doria-Serrano M.C., Ruiz-Treviño F.A., Rios-Arciga C., Hernández-Esparza M., Santiago P.* (2001) *Biomacromolecules*, **2**, 568-574.
15. *Lee S.Y., Pereira B.P., Yusof N., Selvaratnam L., Yu Z., Abbas A.A., Kamarul T.* (2009) *Acta Biomater.*, **5**, 1919-1925.
16. *Pu F., Rhodes N.P., Bayon Y., Chen R., Brans G., Benne R., Hunt J.A.* (2010) *Biomaterials*, **31**, 4330-4340.
17. *Moscato S., Mattii L., D'Alessandro D., Cascone M.G., Lazzeri L., Serino L.P., Dolfi A., Bernardini N.* (2008) *Micron*, **39**, 569-579.
18. *Kang Y.M., Lee B.N., Ko J.H., Kim G.H., Kang K.N., Kim da Y., Kim J.H., Park Y.H., Chun H.J., Kim C.H., Kim M.S.* (2010) *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 4140-4148.
19. *Shao S., Zhou S., Li L., Li J., Luo C., Wang J., Li X., Weng J.* (2011) *Biomaterials*, **32**, 2821-2833.
20. *Martin Y., Eldardiri M., Lawrence-Watt D.J., Sharpe J.R.* (2011) *Tissue Eng. Part B Rev.*, **17**, 71-80.
21. *DeLong S.A., Moon J.J., West J.L.* (2005) *Biomaterials*, **26**, 3227-3234.
22. *Mann B.K., Schmedlen R.H., West J.L.* (2001) *Biomaterials*, **22**, 439-444.
23. *Tsai W.-B., Chen R.P.-Y., Wei K.-L., Chen Y.-R., Liao T.-Y., Liu H.-L., Lai J.-Y.* (2009) *Acta Biomaterialia*, **5**, 3467-3477.
24. *Zilberman M., Kraitzer A., Grinberg O., Elsner J.J.* (2010) *Handb. Exp. Pharmacol.*, **197**, 299-341.
25. *Cartmell S.* (2009) *J. Pharm. Sci.*, **98**(2), 430-441.
26. *Schoenenberger G.A., Monnier M.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1282-1286.
27. *Graf M.V., Kastin A.J.* (1986) *Peptides*, **7**, 1165-1187.
28. *Ouichou A., Zitouni M., Raynaud F., Simonneaux V., Gharib A., Pevet P.* (1992) *Biol. Signals*, **1**, 65-77.
29. *Khvatova E.M., Samartzev V.N., Zagoskin P.P., Prudchenko I.A., Mikhaleva I.I.* (2003) *Peptides*, **24**, 307-331.
30. *Khvatova E.M., Rubanova N.A., Prudchenko I.A., Mikhaleva I.I.* (1995) *FEBS Lett.*, **368**, 367-369.
31. *Маклецова М.Г., Харин В.Г., Кураев Е.Г., Михалева И.Ю., Прудченко И.А.* (1993) RU патент 2070054 C1. 1993, май 21.
32. *Rikhireva G.T., Pulatova M.K., Sharigin V.L., Makletsova M.G., Mikhaleva I.I.* (2009) *Biol. Bull.*, **36**, 388-392.
33. *Прудченко И.А., Михалева И.И.* (1994) *Усп. совр. биол.*, **114**, 728-740.
34. *Pal K., Banthia A.K., Majumdar D.K.* (2006) *Biomed. Mater.*, **1**, 49-55.
35. *You Y., Park W.H.* (2004) *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **15**, 297-301.
36. *Huang M.-H., Yang M.-C.* (2008) *Int. J. Pharm.*, **346**, 38-46.
37. *Лесовой Д.Е., Кузнецов Н.Ю., Артюхов А.А., Штильман М.И., Чудных С.М.* (2010) *Биомедицина*, **4**, 33-39.

38. Martens P., Anseth K.S. (2000) Polymer, **41**, 7715-7722.
39. Schmedlen R.H., Masters K.S., West J.L. (2002) Biomaterials, **23**, 4325-4332.
40. Belanger D., Tong X., Soumare S., Dory Y.L., Zhao Y. (2009) Chem. Eur. J., **15**, 4428-4436.

Поступила: 27. 04. 2011.

# DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE ENTRAPMENT AND RELEASE FROM POLYMER HYDROGELS BASED ON MODIFIED POLYVINYL ALCOHOL *IN VITRO*

*T.V. Sukhanova<sup>1</sup>, A.A. Artyukhov<sup>2</sup>, I.A. Prudchenko<sup>1</sup>, A.C. Golunova<sup>2</sup>, M.A. Semenikhina<sup>2</sup>, M.I. Shtilman<sup>2</sup>, E.A. Markvicheva<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia; tel.: (495)3360600; e-mail: suhanovat@mail.ru

<sup>2</sup>D.I. Mendeleyev University of Chemical Technology, Moscow, Russia

The aim of the study was to entrap delta-sleep inducing peptide (DSIP) in cross-linked poly(vinyl alcohol)-based hydrogels of different structures and to evaluate peptide release kinetics from these hydrogels using an *in vitro* model.

Isotropic and macroporous hydrogels on the basis of poly(vinyl alcohol) acrylic derivative (Acr-PVA) as well as macroporous hydrogels containing epoxy groups which were synthesized by copolymerization of this monomer with glycidyl methacrylate. The isotropic hydrogels were fabricated at positive temperatures while the macroporous hydrogels (cryogels) were prepared at the temperatures below zero.

The peptide was entrapped into macroporous modified PVA hydrogels by addition of a peptide solution on previously fabricated matrices, while into PVA-GMA hydrogels containing epoxy groups peptide immobilization was carried out by incubation of hydrogel matrices in the peptide solution. In the case of isotropic hydrogels the peptide was added into the polymer mixture at a hydrogel formation reaction. The peptide release kinetics was studied by incubation of hydrogels in PBS (pH 7.4), in physiological solution (0.9% NaCl) and in water. DSIP concentration in supernatants was determined by phase-reverse HPLC.

DSIP release from the macroporous PVA hydrogel after 30 min incubation was 74, 70 и 64% in water, PBS and 0.9% NaCl, relatively, and it was completed in 3 hs. From the isotropic hydrogel the release neither peptide nor products of its degradation was not observed even after 48 hs of incubation.

For freshly prepared hydrogel the release kinetics was as follows: 27 and 78% in 30 and 33 hs, relatively. In the case of the lyophilized hydrogel samples the peptide release was 63% in 30 min incubation while drying patterns at room temperature for 3 days resulted in significant peptide loss because its structure damage.

**Key words:** macroporous polymer gels, modified PVA, delta-sleep inducing peptide, peptide entrapment, kinetics of peptide release, tissue engineering.