

УДК 577.151.036:541.64

© Коллектив авторов

ПОЛИМЕРНЫЕ ПОКРЫТИЯ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В НИХ ТРОМБИНОМ ИЛИ ПЕПТИДАМИ: ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ РАНОЗАЖИВЛЕНИЯ

Е. А. Марквичева¹, С.В. Купцова¹, Л.Д. Руми¹, Т.Н. Дугина², М.А. Ланге²,
И.В. Чистов², С.М. Струкова², В.П. Zubov¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.В. Овчинникова РАН,
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, факс: 095 335 10 11;

эл. почта: lemark@ibch.ru

²Биофак МГУ, 119899, Москва, Воробьевы Горы

Описан метод получения композитных гидрогелевых покрытий на основе поливинилкапролактама и альгината кальция (ПВК-CaAlg) с иммобилизованными в них тромбином или синтетическими пептидами, которые имитируют механизм действия тромбина в процессе репарации тканей. Эффекты действия иммобилизованных в полимерные матрицы тромбина/пептидов при ранозаживлении изучены *in vivo* на мышах. Показано, что разработанные покрытия ускоряют ранозаживление на их основе могут быть созданы новые препараты пролонгированного действия для терапии ран.

Ключевые слова : гидрогелевые покрытия, иммобилизация, тромбин, пептиды, ранозаживление.

ВВЕДЕНИЕ Тромбин (сериновая протеаза семейства трипсина) обладает рядом уникальных свойств: он не только регулирует свертывающие и противосвертывающие механизмы и ангиогенез, но включается в воспалительную и пролиферативную фазы заживления ран. При этом он усиливает проницаемость сосудов и миграцию клеток, принимающих участие в остром адаптивном ответе организма, в ране; способствует адгезии тромбоцитов, моноцитов и Т-лимфоцитов к эндотелиальным клеткам капилляров. Тромбин также стимулирует пролиферацию клеток эндотелия, фибробластов и Т-лимфоцитов, при этом усиливает способность клеток секретировать ростовые факторы и медиаторы воспаления [1,2]. Кроме того, показано, что тромбин стимулирует продукцию коллагена фибробластами и, таким образом, влияет на количество одного из основных компонентов соединительной ткани [3, 4].

Эти свойства тромбина позволяют рассматривать его как перспективное биологически активное вещество для терапии ран. Однако применение тромбина ограничено из-за его высокой лабильности и провоспалительного эффекта, который может иметь место в случае использования высоких концентраций. В настоящее время известен только один препарат на основе тромбина, используемый в качестве гемостатического и ранозаживляющего средства - сиаалант (фирма "Immuno", Австрия). Сиаалант представляет собой сгусток фибрина, который можно получить непосредственно на поверхности раны при ее обработке

свежеприготовленной смесью растворов фибриногена и тромбина (в присутствии ионов кальция, адгезивных белков и ингибиторов фибринолиза) [5, 6]. Сиаланты имеют высокую стоимость, поскольку требуют тщательной очистки, и не нашли широкого применения в России. Другим подходом к решению задачи использования тромбина для ранозаживления может быть включение (иммобилизация) тромбина в полимерные матрицы (пленки), что обеспечивает как стабилизацию его активности, так и возможность получения лекарства пролонгированного действия. Ранее нами был разработан метод инкапсулирования тромбина в композитные пленки гидрогеля на основе поли-N-винилкапролактама и альгината кальция и продемонстрировано ускорение ранозаживления при использовании таких пленок в модели на крысах [7]. Наконец, возможно и еще одно решение этой проблемы. Так, для предотвращения нежелательного провоспалительного эффекта тромбина, который может наблюдаться при использовании его высоких концентраций, и решения проблем, связанных с нестабильностью фермента, можно заменить тромбин пептидами, которые способны имитировать механизм действия тромбина в процессе репарации тканей. Отметим также, что пептиды значительно дешевле тромбина и могут быть получены синтетическим путем.

Действие тромбина на клетки реализуется через мембранные рецепторы семейства PAR (protease-activated receptor). В настоящее время известно четыре представителя семейства PAR, три из которых могут активироваться тромбином (PAR-1, PAR-3 и PAR-4), а четвертый (PAR-2) может быть активирован трипсином или триптазой тучных клеток. Механизм активации рецепторов семейства PAR заключается в расщеплении протеиназами (тромбином, трипсином или триптазой) пептидной связи в рецепторе. Например, N-концевой фрагмент PAR-1 человека имеет расщепляемую тромбином пептидную связь Arg41-Ser42 [8, 9]. Укороченный протеазой новый N-концевой фрагмент рецептора (5-6 аминокислот), который называют "привязанным лигандом", активирует рецептор, взаимодействуя с участками его второй внеклеточной петли (аминокислотными остатками 244-268) и/или с N-концевым экзодоменом (76-93 аминокислотные остатки) [10, 11]. Известно, что пептиды, повторяющие аминокислотную последовательность освободившихся при действии протеаз новых N-концевых фрагментов PAR, могут имитировать действие тромбина. Например, шестичленные пептиды-агонисты рецептора тромбина PAR-1 (так называемые TRAPы) могут вызывать освобождение внутриклеточного кальция [12], агрегацию тромбоцитов [9, 12], стимулировать синтез ДНК и ингибировать аденилатциклазу [12, 13], активировать MAP-киназы [14]. Таким образом, с помощью пептидов-агонистов рецепторов PAR (ag-PAR) можно индуцировать весь каскад биологических событий, связанных с процессом репарации ткани, минуя стадию протеолиза рецепторов тромбином. Использование иммобилизованных в полимерную матрицу пептидов, во-первых, может защитить их от разрушения пептидазами, присутствующими в ране, а во-вторых, обеспечить постепенное освобождение пептида, то есть создать препарат пролонгированного действия. Принимая во внимание механизм действия ag-PAR, метод ковалентной иммобилизации представляется нецелесообразным. По нашему мнению, именно включение в гидрогель позволяет получить эффективные препараты с контролируемым освобождением пептидов-агонистов PAR.

В данной работе для включения (иммобилизации) в полимерные пленки использовали следующие синтетические пептиды: 1) TRAP-6 (агонист PAR-1 рецептора тромбина, имеющий аминокислотную последовательность SFLLRN); 2) агонист - PAR-2 (SLIGKV). Пептиды иммобилизовали либо в пленки композитного ПВК-CaAlg гидрогеля, либо в пленки, имеющие тот же состав, но дополнительно покрытые положительно заряженными полимерами поли-L-лизинном или хитозаном, которые при взаимодействии с отрицательно заряженным альгинатом давали на поверхности пленки полиэлектролитную мембрану.

ПОЛИМЕРНЫЕ ПОКРЫТИЯ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ТРОМБИНОМ

МЕТОДИКА. В работе использовали следующие реактивы: поли-N-винилкапролактан (Мм 900000), ароматический сульфосодержащий полиамид ПОЛАР-2 (Мм 25000), полученные в Физико-химическом институте им. М. Я. Карпова и любезно предоставленные проф. Ю.Э. Киршем; хитозан (Мм 330000, степень деацетилирования > 85%), любезно предоставленный проф. Г.А. Вихоревой, альгинат натрия (medium viscosity), поли-L-лизин (Мм 120 кДа) и хлорид кальция (все реактивы фирмы "Sigma", США); резорцин (1,3-дигидроксibenзол), овальбумин ("Serva", Германия); трис-гидроксиметил-аминометан (трис) фирмы "Gerbu" (Германия); хлорид натрия отечественного производства марки о. с. ч.; тромбин бычий (КФ 3.4.21.5, 2500 МЕ/мг), фибриноген производства завода бакпрепаратов г. Каунас (Литва); ацетат N-тозил-глицил-пролил-аргинин-4-нитроанилида (Chromozym-TH) фирмы "Boehringer Mannheim" (Германия), N-тозил-глицил-пиперазин-аргинин-4-нитроанилида (S-2238), ("Serva"); синтетические пептиды (агонисты PAR-1 (TRAP-6) и PAR-2) были синтезированы и любезно предоставлены фирмой "Biosyntan" (Berlin, Германия).

Получение полимерных покрытий на основе композитного гидрогеля ПВК-CaAlg с иммобилизованными в них тромбином/пептидами. Для получения двух пленок готовили полимерную смесь следующего состава: раствор тромбина (активность 3,5 либо 10 единиц НИИ) или 100 мкл раствора пептида (0,01 М) смешивали с 0,135 мл 14% раствора ПВК, добавляли 0,025 мл 1% раствора ПОЛАР-2, затем 0,65 мл 2% раствора альгината натрия. Затем смесь делили на две равные по объему части, и каждую часть помещали между целлюлозными фильтрами (диаметр 1,0 см), пропитанными раствором 1% хлорида кальция и 0,1% резорцина при температуре 37-40°C. Пленку, образовавшуюся в результате диффузии ионов кальция в полимерный раствор между фильтрами, выдерживали в течение 15 мин, затем фильтры удаляли. Далее к пленкам добавляли 0,3-0,4 мл раствора 0,5 % поли-L-лизина (либо хитозана) в 0,15 М NaCl, затем 0,25 % раствора альгината натрия, затем опять 0,5 % поли-L-лизина (хитозана) и далее высушивали пленку на воздухе при 40°C. Пленки хранили либо в физиологическом растворе (с добавлением 1% CaCl₂, 0,02 % азида натрия), либо в сухом виде при комнатной температуре, а перед проведением экспериментов на животных помещали в физ. раствор на 30 мин.

Исследование эффектов покрытий на основе композитного ПВК-CaAlg гидрогеля с иммобилизованными в них тромбином/пептидами на процесс ранозаживления в экспериментах in vivo. Все эксперименты проводились в стандартных условиях на женских особях F1-гибридных мышей C57BL/6J. Пленки с включенным тромбином/пептидами помещали на полнослойную кожную рану (1 x 1 см²) на спину экспериментальных животных сразу же после нанесения раны. Контрольным животным наносили на рану полимерную пленку без тромбина/пептидов.

Пробы грануляционной ткани с ран брали на 3-й и 7-й дни после нанесения раны и исследовали методами световой микроскопии ("Leitz", Germany) и радиоавтографии, как описано в [15]. В пробах грануляционной ткани определяли: 1) общее количество микрососудов и количество микрососудов с пролиферирующими клетками ([³H]тимидин-меченые сосуды), что отражает процесс неоваскуляризации; 2) общее количество и количество пролиферирующих фибробластов ([³H]тимидин-меченых); 3) количество эндотелиальных и эпителиальных клеток, а также 4) соотношение фибробласты/макрофаги, которое отражает процессы пролиферации-воспаления. Все гистологические исследования проводились на Биологическом факультете МГУ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. 1. *Получение покрытий на основе композитного ПВК-CaAlg гидрогеля с иммобилизованными в них тромбином или пептидами.*

В данной работе были получены пленки композитного ПВК-CaAlg гидрогеля с иммобилизованным в них тромбином или пептидами. Для оценки

эффективности иммобилизации приготовленные пленки разрушали и определяли амидазную активность тромбина. Было показано, что разработанный метод позволяет сохранить до 95-98 % активности тромбина/пептидов в полимерной матрице (неопубликованные данные). При хранении пленок в физиологическом растворе и в сухом состоянии активность иммобилизованного фермента/пептидов полностью сохранялась в течение как минимум 6 месяцев.

Так как включить в пленки композитного ПВК-CaAlg гидрогеля низкомолекулярные пептиды по схеме, предложенной ранее для тромбина [16], было невозможно, нами был разработан новый метод с использованием целлюлозных мембран, пропитанных раствором 1% хлорида кальция и 0,1% резорцина. Резорцин образует с ПВК нерастворимый комплекс, что препятствует мгновенному освобождению пептидов. Кроме того, резорцин широко используется в медицине как антисептик. Для конструирования полимерных покрытий с пролонгированным освобождением пептида было предложено дополнительно покрывать ПВК-CaAlg пленки полиэлектролитными мембранами, которые образуются при взаимодействии отрицательно заряженного альгината с положительно заряженными поли-L-лизинном или хитозаном.

Выбор альгината натрия (полианиона), поли-L-лизина и хитозана (поликатионов) был обусловлен как их биосовместимостью, так и тем фактом, что они уже широко используются для создания полимерных покрытий для ран, а также различных препаратов с контролируемым освобождением низкомолекулярных веществ.

Таким образом, нами были получены пленки композитного ПВК-CaAlg гидрогеля с иммобилизованными в них тромбином или синтетическими пептидами ag-PAR-1 и ag-PAR-2. При этом некоторые ПВК-CaAlg пленки были модифицированы путем создания на их поверхности полиэлектролитных мембран.

2. Исследование эффектов покрытий на основе композитного ПВК-CaAlg гидрогеля с иммобилизованными в них тромбином/пептидами на процесс ранозаживления.

Для изучения возможности использования полимерных пленок с иммобилизованным тромбином/пептидами в качестве эффективных покрытий для заживления ран были проведены эксперименты *in vivo*. Для этого пленки с тромбином/пептидами апплицировали на полнослойную рану размером 1x1 см² группе опытных животных (мышей) непосредственно после ранения. Контрольная группа животных имела рану, закрытую полимерной пленкой без тромбина/пептидов. Степень заживления ран определяли: 1) по изменению площади раны; 2) с помощью гистологических исследований образцов грануляционной ткани, взятых из раны на 3 и 7 дни после ранения.

Известно, что процесс репарации тканей включает три фазы: воспаление, пролиферацию и созревание грануляционной ткани. Фаза воспаления, которая обычно длится 3 дня, характеризуется присутствием большого количества макрофагов и других клеток, принимающих участие в остром адаптивном ответе. Для фазы пролиферации характерно резкое увеличение количества пролиферирующих фибробластов, продуцирующих коллаген и другие структурные компоненты, а также образование сосудов в грануляционной ткани (ангиогенез). Фибробласты можно наблюдать в ране уже на 3-й день после ранения; однако на 7-ой день их количество достигает максимального значения. Именно этим объясняется время тестирования размера ран и образцов грануляционной ткани (3-й и 7-ой день после нанесения раны).

Как видно из рис., у животных опытной группы на седьмой день эксперимента наблюдали более выраженное сокращение размеров ран по сравнению с контрольной группой (рана, покрытая полимерной пленкой без пептида/тромбина). Так, размер ран у мышей к седьмому дню уменьшался соответственно на 83 и 57% под пленками с иммобилизованными пептидами

ПОЛИМЕРНЫЕ ПОКРЫТИЯ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ТРОМБИНОМ

(агонистом PAR-1 (TRAP-6) и агонистом PAR-2). Для контрольных животных (с апплицированной полимерной пленкой без пептида) эта величина составляла только 37%. Отметим, что эффект TRAP-6 (агонист PAR-1) был выражен даже ярче, чем действие тромбина. На 7-й день после нанесения раны площадь раны под пленкой композитного ПВК-CaAlg гидрогеля с иммобилизованным TRAP-6 была в 2,0 - 2,4 раза меньше, чем под пленками с тромбином, и в 3,7 раз меньше, чем у контрольных животных.



Рисунок

Изменение размера ран под ПВК-CaAlg пленками с иммобилизованными тромбином/пептидами- агонистами PAR. За 100% принимали начальную площадь раны.

Анализ проб грануляционной ткани на 3-й и 7-й дни после ранения в опытах с пленками, содержащими тромбин, а также пептиды (агонист PAR-1 и агонист PAR-2) выявил повышение общего числа микрососудов, пролиферирующих клеток и соотношения фибробласты/макрофаги у опытных животных по сравнению с контрольными. Самые высокие показатели заживления также были определены в образцах, взятых из ран под пленками с агонистом PAR-1 на 7-й день после ранения (табл.1). Поскольку наиболее эффективным был TRAP-6, в следующей серии экспериментов использовали ПВК-CaAlg пленки, покрытые поли-L-лизин или хитозаном с иммобилизованным в них TRAP-6. Видно, что на 3-й и на 7-й дни все параметры заживления у опытных животных под пленками с TRAP-6 были лучше, чем у контрольных, имеющих пленки без пептида (табл. 2). Отметим, что в этой серии экспериментов использовали три вида пленок : пленка ПВК-CaAlg без дополнительной полиэлектролитной мембраны на поверхности полимерной матрицы и 2 пленки, которые отличались составом мембраны: альгинат-поли-L-лизин либо альгинат-хитозан. Видно, что уже к 3-му дню наименьший размер имели раны под пленкой с TRAP-6, покрытой хитозаном.

Таблица 1. Влияние ПВК-CaAlg пленок с иммобилизованными тромбином/пептидами (агонистами PAR) на количество клеток, меченных [³H]-тимидином в образцах грануляционной ткани, на процесс ранозаживления.

Пленки с иммобилизованными:	Соотношение фибробласты/ макрофаги	Количество клеток/поле зрения		
		фибробластов	эпителиальных	эндотелиальных
Седьмые сутки после ранения				
Тромбином 10 ME	3,71	3	19	1,3
Тромбином 3,5 ME	0,65	1,8	12,7	0,9
агонист PAR-1 (TRAP-6)	5,79	2,8	20	1,8
агонист PAR-2	0,72	2,3	10,1	1,4
Контроль (пленка без тромбина/ пептидов)	1,03	2,5	13,4	1

Таблица 2. Влияние пленок композитного ПВК-СаAlg гидрогеля с иммобилизованным TRAP-6 на процесс заживление ран.

Параметры ранозаживления	ПВК-СаAlg пленки		ПВК-СаAlg пленки, покрытые поли-L-лизинном		ПВК-СаAlg пленки, покрытые хитозаном	
	TRAP-6	Контроль*	TRAP-6	Контроль*	TRAP-6	Контроль*
Третьи сутки после ранения						
Относительный размер ран*, %	96,1	113,0	93,6	77,0	64,6	79,3
Соотношение фибробласты/макрофаги	0,33	1,69	0,75	0,31	0,78	0,35
Седьмые сутки после ранения						
Относительный размер ран**, %	17,1	63,1	24,9	31,2	16,2	26,2
Соотношение фибробласты/макрофаги	5,79	1,03	7,85	1,75	5,9	1,63

Примечание: *Контроль - пленка без пептида; ** - За 100% принимали начальный размер ран.

Таким образом, было показано, что использование иммобилизованных в пленки тромбина или пептидов (агонист PAR-1 и агонист PAR-2) ускоряло заживление ран. Мы полагаем, что на основе полученных гидрогелевых пленок с иммобилизованными в них тромбином и/или синтетическими пептидами могут быть созданы покрытия для эффективной терапии ран нового поколения с пролонгированным высвобождением биологически активных веществ.

Авторы благодарят Российский Фонд Фундаментальный Исследований за поддержку данной работы (грант РФФИ № 01-04-48624).

ЛИТЕРАТУРА

1. Струкова С.М., Дугина Т.Н., Члетов И.В. и др. (1998) Биоорган. химия, **24**, (4), 288-292
2. Fuger G. (1995) Circ Res, **77**, 645-649.
3. Chambers R.C., Dabbagh K., McAnulty R.J. et al. (1998) Biochem. J., **333**, 121-127.
4. Dabbagh K., Laurent G.J., McAnulty R.J et al. (1998) Thromb. Haemost., **79**, 405-409.
5. Scardino M.S., Swaim S.F., Morse B.S. et al. (1999) J. Biomed. Mater. Res., **48**, 315-321.
6. Dunn C.J., Goa K.L. (1999) Drugs, **58**, 863-886.
7. E.A Markvicheva, S.V. Kuptsova, T.Yu. Mareeva et al. (2000) Appl. Biochem. Biotechnol., **88** (1-3), 145-157.
8. Grand R.J.A., Turnell A.S. and Grabham P.W (1993) Biochem.J., **313**, 353-368.
9. Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I., and Coughlin S.R. (1991) Cell, **64**, 1057-1068.
10. Gerszten R.E., Chen J., Ishii M. et al. (1994) Nature, **368**, 648-651.
11. Bahou W.F., Kutok J.L., Wong A. et al. (1994) Blood, **84**, 4195-4202.
12. Vassallo R.R., Kieber-Emmons T., Cichowski K, et al. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 6081-6085.
13. Van Obberghen-Schilling E., Rasmussen U.B., Vouret-Craviari V. et al. (1993) Biochem. J., **292**, 667-671.

ПОЛИМЕРНЫЕ ПОКРЫТИЯ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ТРОМБИНОМ

14. *Vouret-Craviari V., Van Obberghen-Schilling E., Scimeca J.C.* (1993) *Biochem. J.*, **289**, 209-214.
15. *Саркисов Д.С., Пальцин А.А., Втюрин Б.В.* (1980) В кн. Электронная микроскопическая радиоавтография клетки, М.: Наука.
16. *Markvicheva E., Dugina T., Kuptsova S. et al.* (1996) *Proceedings of International Workshop on Bioencapsulation V* (Potsdam, September 22-25).

Поступила 25.07.2002.

POLYMER DRESSINGS WITH ENCAPSULATED THROMBIN OR PEPTIDES : PREPARATION AND USE FOR WOUND HEALING

*E.A. Markvicheva¹, S.V. Kuptsova¹, L.D. Rumsh¹, T.N. Dugina², M.A. Lange²,
I.V. Chistov², S.M. Strukova², V.P. Zubov¹*

¹Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Miklukho-Maklaya Str. 16/10, Moscow, 117997 Russia;
tel.: 095 336 06 00, fax: 095 335 10 11,
e-mail: lemark@ibch.ru

²Biological Faculty, Moscow State University, Vorobyevy Gory, 119899 Moscow

Polymer dressings with encapsulated thrombin or synthetic peptides which can mimic thrombin action are employed for wound healing. Paper describes the method for preparation of these hydrogel composites of PVCL-CaAlg [poly(N-vinyl caprolactam-calcium alginate)]. The effect of encapsulated thrombin/peptides on tissue repair process have been investigated *in vivo* experiments using a mouse model of wound healing. The developed dressings accelerated wound healing: they can be used as a basis for creation of novel formulations with controlled drug release for wound therapy.

Key words: hydrogel dressings, immobilization, thrombin, peptides, wound healing