

УДК 577.151.036:541.64

© Коллектив авторов

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ПЕПТИДОМ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН

*К.С. Сташевская¹, Е.А. Марквичева¹, С.М. Струкова², А.В. Русанова²,
А.М. Макарова², Л.Р. Горбачева², И.А. Прудченко¹, В.П. Zubov¹, К. Грандфис³*

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; тел.: 336-06-00; факс: 335-10-11; эл. почта: kira_st@mail.ru;

²Московский государственный университет им. Ломоносова, Биологический факультет;

³Университет г. Льежа, Межфакультетский центр биоматериалов

Пептидный агонист тромбинового рецептора (TRAP-6) может успешно заменить тромбин для стимулирования регенерации поврежденных тканей, поскольку применение тромбина ограничено его высокой стоимостью и нестабильностью, а также наличием провоспалительного эффекта в случае использования высоких концентраций. Иммобилизация пептида TRAP-6 в матрицу на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) защищает его от разрушения пептидазами, присутствующими в ране, а также может обеспечить контролируемое высвобождение пептида.

Методом двойного эмульгирования были получены микрочастицы PLGA с иммобилизованным TRAP-6. Исследование морфологии поверхности полученных микрочастиц с помощью сканирующей электронной микроскопии позволило установить, что пористость поверхности микрочастиц с иммобилизованным пептидом увеличивается по сравнению с контрольными микрочастицами (без пептида).

Кинетика высвобождения TRAP-6 характеризуется резким скачком его концентрации в буферном растворе (рН 7,5) в течение 2 часов после начала эксперимента, а полное высвобождение пептида происходит через 20 часов после начала эксперимента. Исследование скорости деструкции микрочастиц с помощью электронной микроскопии показало, что увеличение пористости поверхности и размеров микрочастиц наблюдается уже через 1 день инкубации в буферном растворе, а на седьмой день происходит агрегация разрушающихся микрочастиц.

Таким образом, на основе пептида, иммобилизованного в PLGA микрочастицы, можно будет создать препарат пролонгированного действия с контролируемым высвобождением лекарственного средства (пептида).

Ключевые слова: иммобилизация, TRAP-6, PLGA микрочастицы, контролируемое высвобождение.

ВВЕДЕНИЕ. Выдающиеся достижения в клеточной и молекулярной биологии последних двух десятилетий привели к значительным успехам в понимании основных биологических процессов, происходящих при регенерации тканей. Заживление раны - сложный процесс, включающий одновременное взаимодействие нескольких типов клеток, медиаторов воспаления (цитокинов, протеиназ и др.) и внеклеточного матрикса. Процесс заживления раны состоит из ряда последовательных, переходящих из одной в другую, фаз, а именно, фазы свертывания крови, воспаления, пролиферации и регенерации ткани [1].

В настоящее время существует несколько подходов к стимулированию заживления ран. Некоторые из них основаны на применении различных факторов роста, например, сосудистого эндотелиального (VEGF-165) и тромбоцитарного (PDGF) факторов роста, которые вызывают пролиферацию фибробластов и ускоряют ангиогенез (формирование сосудов) [2], а также эпидермальных факторов роста (EGF), которые стимулируют миграцию и пролиферацию кератиноцитов и эпителизацию ран [3, 4]. Однако клинические исследования показали, что подобные методы терапии малоэффективны, по-видимому, из-за высокой активности протеаз, присутствующих в ране.

Одним из известных биологически активных веществ, используемых при лечении ран, является тромбин – сериновая протеаза семейства трипсина. Тромбин обладает рядом уникальных свойств: он не только регулирует свертывающие и противосвертывающие механизмы, но включается в воспалительную и пролиферативную фазы заживления раны. [5]. Кроме того, тромбин стимулирует продукцию коллагена фибробластами и, таким образом, влияет на развитие соединительной ткани [6].

Действие тромбина на клетки реализуется через мембранные рецепторы семейства PAR (protease-activated receptor). Механизм активации рецепторов семейства PAR заключается в расщеплении протеиназами (тромбином, трипсином или триптазой) пептидной связи в N-концевой последовательности аминокислот экзодомена рецептора. Однако применение тромбина ограничено из-за его высокой стоимости и нестабильности, а также провоспалительного эффекта, который может иметь место в случае использования высоких концентраций.

Для предотвращения нежелательных эффектов, возникающих при использовании тромбина, и решения проблем, связанных с нестабильностью фермента, нами предложено заменить тромбин пептидами, способными имитировать действие тромбина в процессе заживления ран [5].

Известно, что пептиды, повторяющие аминокислотную последовательность освобождающихся при действии протеаз N-концевых фрагментов PAR (активируемых протеазой рецепторов), могут имитировать действие тромбина. Например, шестичленные пептидные агонисты рецептора тромбина PAR-1 (так называемые TRAPы – thrombin receptor agonist peptides) могут вызывать освобождение внутриклеточного кальция, агрегацию тромбоцитов [7], стимулировать синтез ДНК и ингибировать аденилатциклазу [8], активировать MAP-киназы [9]. Таким образом, использование пептидов вместо тромбина способствует инициации каскада биологических реакций, вовлеченных в процесс заживления ран.

Первые результаты, подтверждающие эффективность *in vivo* ускорения пептидом TRAP-6, иммобилизованным в гидрогелевые композитные пленки поливинилкапролактан-Са-альгината, регенерации ткани, были представлены ранее на модели кожных резаных ран у крыс [10]. Иммобилизация TRAP-6 в полимерную матрицу предохраняет его от внешних воздействий, защищает от разрушения пептидазами, присутствующими в ране, а также обеспечивает постепенное высвобождение и направленное действие пептида.

Ранее было показано, что метод двойного эмульгирования является наиболее подходящим для иммобилизации лабильных веществ, например, ферментов [11, 12]. Впоследствии методом двойного эмульгирования ферменты и ингибиторы были иммобилизованы в матрицу на основе полистирола [13], а также были получены инъекционные формы микрочастиц [14].

В качестве полимерной матрицы для иммобилизации гидрофильных веществ наибольшее распространение получили биоразрушаемые биосовместимые полимеры, такие как полигликолевая кислота (PGA), полимолочная кислота (PLA) и их сополимеры (PLGA) [15], поликапролактоны (PCL) [16], полиэтилен- и полипропиленкарбонаты (PEC, PPC) [17], полиамиды [18] и полиангидриды [19]. Полимолочная кислота и сополимеры молочной и гликолевой кислот широко

используются в медицине в качестве шовного материала и для восстановления костной ткани [20, 21], печени [22] и нервной ткани [23]. Биодеструкция этих материалов происходит без помощи ферментов неспецифическим гидролизом эфирных связей, а затем образовавшиеся кислоты легко метаболизируются [24].

МЕТОДИКА. В работе использовали пептид TRAP-6 (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH₂; SFLLRN), полученный в лаборатории химии пептидов ИБХ РАН твердофазным синтезом [25]. В работе также использовали сополимер молочной и гликолевой кислот (P(d,l)LA-GA: (50/50) (RG 503), “Boehringer Ingelheim”, (Германия); желатин G2500 (type III), метилен хлорид CH₂Cl₂ “Sigma”, (США); поливиниловый спирт (ПВС): 3-83, “Hoechst”, (Германия).

Получение микрочастиц с иммобилизованным пептидом. Микрочастицы были получены методом двойного эмульгирования. Для получения микрочастиц 0,703 г сополимера растворяли в 6,37 мл CH₂Cl₂. Затем 300 мкл 1,6 % раствора TRAP-6 в воде milliQ добавляли к 100 мкл 0,2% раствора желатина, заранее приготовленного при 40°C, и перемешивали в течение 30 с при помощи гомогенизатора Omni International 2000 (скорость n°2) при 40°C. К полученной дисперсии водной фазы, не прекращая перемешивания, добавляли 1,8 мл раствора PLGA в метилен хлориде. Добавив раствор полимера, увеличивали скорость перемешивания (n°3-4) и продолжали процесс еще 30 с. Далее, полученную первичную эмульсию (вода₁/масло) добавляли при перемешивании к 30 мл вторичной водной фазы (2,5% раствор ПВС), находящейся в термостатируемой качалке (Julabo SW 20C) при 15°C. Перемешивание продолжали 15 мин при 15°C для получения вторичной эмульсии (вода₁/масло/вода₂). Затем температуру увеличивали до 30°C и продолжали перемешивание еще 30 мин до полного испарения растворителя. Затем к полученной суспензии микрочастиц добавляли 40 мл воды milliQ комнатной температуры и останавливали процесс через 1 мин. Осажденные микрочастицы промывали на бумажном фильтре и лиофильно сушили. Выход микрочастиц составил 0,158 г. Микрочастицы хранили при температуре – 20°C в полипропиленовых пробирках Eppendorf до проведения последующих анализов.

Приготовление образцов для исследования физико-химических свойств PLGA микрочастиц с иммобилизованным пептидом TRAP-6. Чтобы исследовать стабильность микрочастиц в процессе высвобождения пептида, изучали кинетику его выхода и скорость разрушения полученных микрочастиц.

Первую серию образцов использовали для исследования кинетики выхода TRAP-6 из микрочастиц, а вторую – для исследования морфологии поверхности и скорости разрушения микрочастиц. Образцы в пробирках Eppendorf инкубировали в термостатируемой качалке Julabo SW 20C (100 об/мин, 37°C).

Была приготовлена первая серия следующих образцов в 1 мл буферного раствора (5 mM HEPES, pH 7,5):

- 1) 10 мг микрочастиц с иммобилизованным пептидом;
- 2) 10 мг пустых микрочастиц и 0,2 мг пептида (для исследования возможности физической адсорбции пептида к поверхности микрочастиц);
- 3) 0,2 мг пептида (для контролирования стабильности пептида в буферном растворе).

Из каждого образца первой серии были отобраны следующие аликвоты супернатантов через 5 мин, 30 мин, 1 ч, 4 ч, 8 ч, 1 день, 2 дня, 5 дней, 7 дней и 15 дней после начала инкубации:

- 1) по 100 мкл из раствора, содержащего 0,2 мг пептида, а также из супернатанта, содержащего пустые микрочастицы и 0,2 мг пептида. Затем к аликвотам добавляли 0,9 мл свежего буферного раствора;
- 2) 750 мкл из супернатанта, содержащего микрочастицы с иммобилизованным пептидом.

Вместо отобранных для анализов аликвот супернатанта в каждый образец добавляли соответствующий объем буферного раствора.

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ПЕПТИДОМ

Для получения второй серии образцов в 0.5 мл буферного раствора (5 мМ HEPES, pH 7,5) инкубировали по 5 мг микрочастиц с пептидом и микрочастиц без пептида.

Из каждого образца второй серии были отобраны аликвоты микрочастиц (0,1 мг) до инкубации и через 1 день, 2 дня, а также через 7 дней после начала инкубации.

Полученные образцы хранили при -20°C до момента проведения необходимых анализов.

Исследование морфологии полученных микрочастиц. Морфологию полученных микрочастиц исследовали при помощи световой и сканирующей электронной микроскопии. Образцы второй серии использовали для исследования морфологии поверхности и скорости разрушения микрочастиц с помощью сканирующей электронной микроскопии (JEOL-840M, "A Technics", Co, Ltd, Япония).

После инкубирования (см. предыдущий раздел) микрочастицы трижды промывали водой milliQ для очистки от солей и лиофильно высушивали. Высушенные микрочастицы закрепляли на металлических пластинах и металлизировали напылением двойного Au-Pd слоя (установка Sputtering Balzer, SCP-20). Пробы микрочастиц с пептидом и без пептида для определения формы и размера полученных микрочастиц с помощью светового микроскопа (Olympus PROVIS AX 70, камера DP 50) были отобраны сразу после окончания процесса испарения растворителя при получении микрочастиц.

Изучение кинетики выхода TRAP-6 из микрочастиц in vitro. Кинетику выхода пептида изучали методом ВЭЖХ на хроматографе Beckman Gold, модуль 126/166. Фракционирование пептида проводили на твердофазной колонке PR 18 (Lichrosphere 100 Merck, 125 - 4 мм) при постоянной скорости элюирования 0,75 мл/мин. Для эффективного анализа пептида использовали систему растворителей А ($\text{H}_2\text{O}/0,1\%$ TFA) и В (ацетонитрил/ $0,1\%$ TFA). Растворители были дегазированы потоком гелия. Инъекционная проба 20 мкл содержала 0,5 – 5 мкг TRAP-6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. *Получение микрочастиц на основе PLGA с иммобилизованным пептидом.* Метод двойного эмульгирования используется для иммобилизации широкого спектра биологически активных веществ, таких как стероиды [26], антибиотики [27, 28], противоопухолевые препараты [29, 30], вакцины [31] пептиды и белки [32, 33]. Метод двойного эмульгирования имеет несколько очевидных преимуществ для микрокапсулирования гидрофильных нестабильных веществ. Главным достоинством метода является то, что он позволяет уменьшить контакт между органической фазой и пептидом, и тем самым сохранить биологическую активность биологически активных веществ, в нашем случае - пептида.

Метод двойного эмульгирования состоит из трех основных этапов:

- 1) приготовления первичной эмульсии (вода₁/масло), стабилизированной желатином, где сополимер растворен в органической фазе, а пептид растворен во внутренней водной фазе;
- 2) повторного эмульгирования во вторичной водной фазе с образованием двойной эмульсии (вода₁/масло/вода₂);
- 3) испарения растворителя с образованием твердых микрочастиц.

Выбранный нами метод двойного эмульгирования был оптимизирован с целью создания системы пролонгированного высвобождения TRAP-6, удовлетворяющей следующим требованиям:

- содержание пептида: 2,5 (% масс);
- период разрушения микрочастиц: 14 дней;
- биосовместимость;
- средний размер микрочастиц в диапазоне от 50 до 300 мкм;
- смачиваемость водой;
- стабильность формы микрочастиц.

Результаты анализа полученных микрокапсул методом световой микроскопии, представленные на рисунке 1, позволяют сделать вывод, что с помощью метода двойного эмульгирования нам удалось получить микрокапсулы с иммобилизованным пептидом сферической формы с узким распределением микрокапсул по размерам в интервале 50-300 мкм. Из рисунков 1 и 2 видно, что иммобилизация пептида способствует увеличению среднего размера микрокапсул с пептидом по сравнению с микрокапсулами без пептида. Можно предположить, что увеличение размера микрокапсул является результатом присутствия пептида, растворенного во внутренней водной фазе.

Микрокапсулы без TRAP-6

Микрокапсулы с TRAP-6

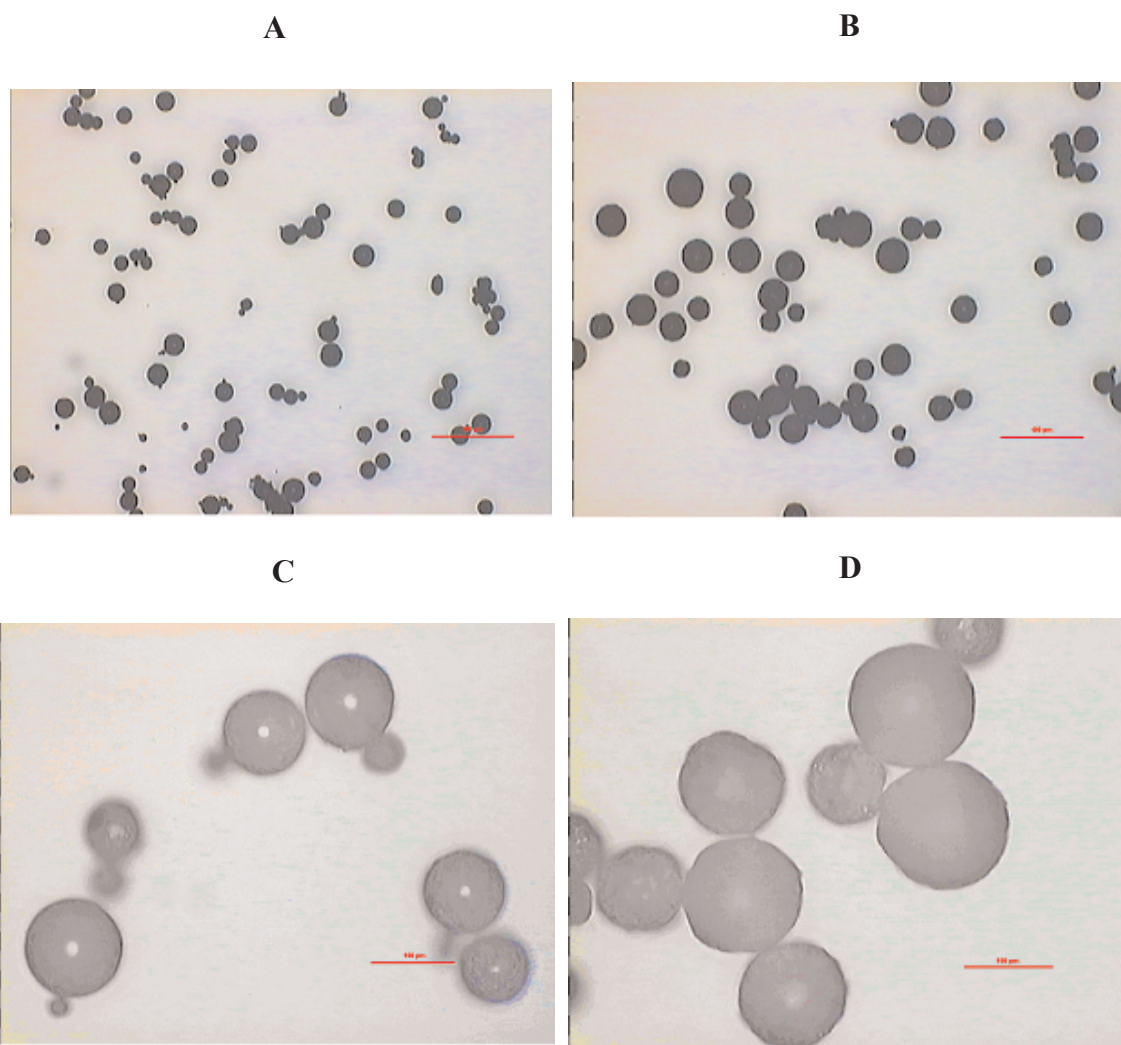


Рисунок 1.

Микрофотографии микрокапсул без пептида (контроль) и частиц с пептидом. Длина масштабной линейки равна 400 мкм для рисунков А, В и 100 мкм для рисунков С, D.

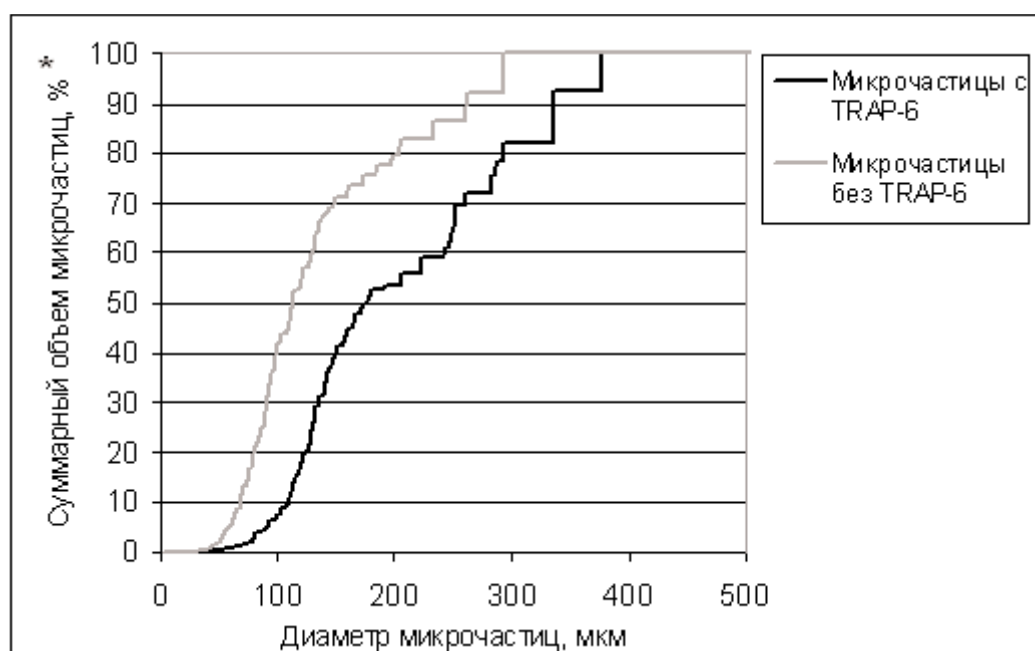


Рисунок 2.

Распределение по размерам микрокапсул без TRAP-6 и микрокапсул с иммобилизованным TRAP-6.

*За 100% принят суммарный объем всех микрокапсул, имеющих диаметр в диапазоне (20 - 300) мкм для микрокапсул без TRAP-6 и (20 - 400) мкм - для микрокапсул с TRAP-6.

Изучение кинетики выхода пептида TRAP-6 из микрокапсул in vitro. Кинетику выхода пептида изучали методом ВЭЖХ. На рисунке 3 представлена кривая высвобождения пептида. Высвобождение пептида происходит в два этапа. Первый этап характеризуется резким увеличением концентрации пептида в буферном растворе (около 90% масс.) через 2 часа после начала эксперимента, что можно объяснить диффузией в буферный раствор пептида TRAP-6, локализованного в приповерхностных слоях микрокапсул. На втором этапе, в последующие 18 часов, происходит постепенное высвобождение оставшегося количества пептида (10% масс.). Можно предположить, что на втором этапе начинается деструкция полимерных микрокапсул, которая сопровождается диффузией пептида, локализованного внутри микрокапсул. Для изучения поведения пептида, высвободившегося в течение этих 20 часов, а также для доказательства того, что пептид был действительно иммобилизован внутри микрокапсул, был проведен эксперимент по проверке возможности физической адсорбции пептида на поверхности контрольных микрокапсул (без пептида).

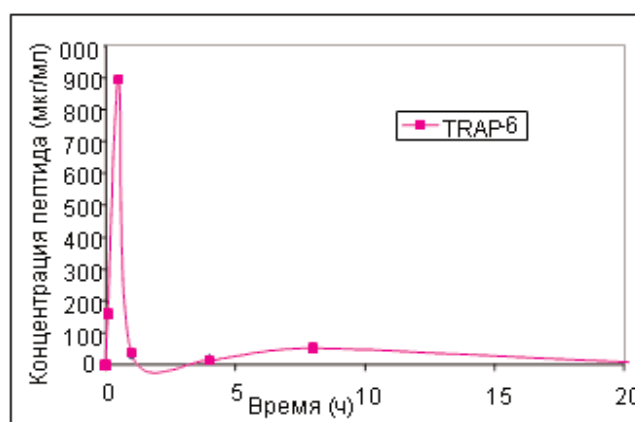


Рисунок 3.

Кинетика выхода TRAP-6 из PLGA микрокапсул в процессе их инкубации в буферном растворе (Нерес, рН 7,5) при 37°C.

Из рисунка 4 следует, что абсорбция пептида на поверхности микрочастиц также происходит в два этапа. В начале процесса инкубации часть пептида немедленно абсорбируется из раствора. Затем, в течение первых десяти часов инкубации, происходит частичная десорбция TRAP-6 обратно в раствор. Через десять часов после начала инкубации снова происходит адсорбция пептида (около 54% масс.) на поверхности микрочастиц. Однако спустя 20 часов после начала инкубации наблюдается обратный переход TRAP-6 в раствор, что объясняется набуханием и начинающейся деструкцией полимерных частиц в буферном растворе.

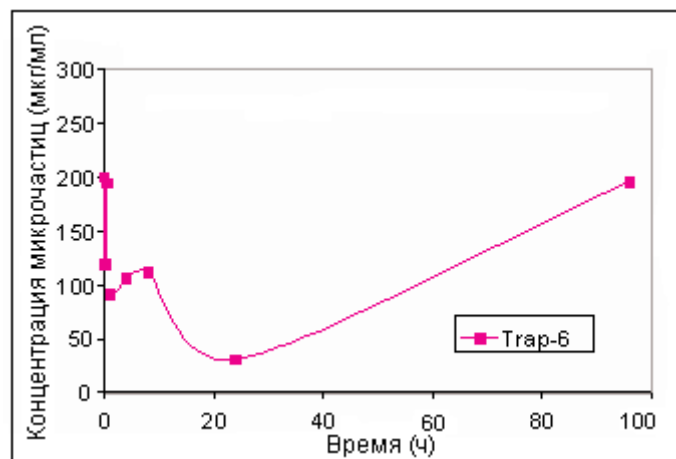


Рисунок 4.

Абсорбция TRAP-6 из раствора к поверхности микрочастиц без TRAP-6 в процессе инкубации в буферном растворе (Hepes, pH 7,5) при 37°C. Начальная концентрация пептида в буферном растворе - 200 мкг/мл.

Для понимания такого характера кинетики выхода пептида, мы детально проанализировали все растворы, использованные при инкубации образцов:

- 1) буферный раствор (5 мМ HEPES, pH 7,5);
- 2) буферный раствор в присутствии пустых микрочастиц;
- 3) буферный раствор в присутствии пептида;
- 4) буферный раствор с пептидом и пустыми микрочастицами.

Анализ полученных хроматограмм, представленных на рисунке 5, позволил нам сделать следующие выводы:

- Пустые микрочастицы высвобождают некоторые побочные продукты в начале инкубационного периода (см. пик относительно времени 30' на рисунке 5B). Отклонение базовой линии было отмечено после инкубации микрочастиц в течение 1-го и 2-х дней. Это может быть следствием появления некоторых продуктов деградации сополимера (молочной и/или гликолевой кислоты, а также водорастворимых олигомеров, которые могут содержаться в полимерной матрице).

- Из рисунка 5C следует, что TRAP-6 в процессе инкубации оставался химически стабильным в заданном интервале времени в пределах чувствительности хроматографического анализа.

- Сравнение площадей пиков на рисунках 5C и 5D подтверждает, что пептид довольно быстро и в значительном количестве адсорбируется на поверхности PLGA микрочастиц. Эту физическую адсорбцию можно объяснить ионным взаимодействием между положительно заряженным пептидом и отрицательно заряженными карбоксилированными группами полиэфира.

- Графики, приведённые на рисунках 5E и 5F, соответствуют анализам микрочастиц с иммобилизованным пептидом в инкубационной среде без учета и с учетом нулевой линии соответственно. Эти результаты доказывают, что с точки зрения химической чистоты и в пределах разрешения используемого метода ВЭЖХ, иммобилизация в полимерную матрицу не повлияла на структурные свойства пептида.

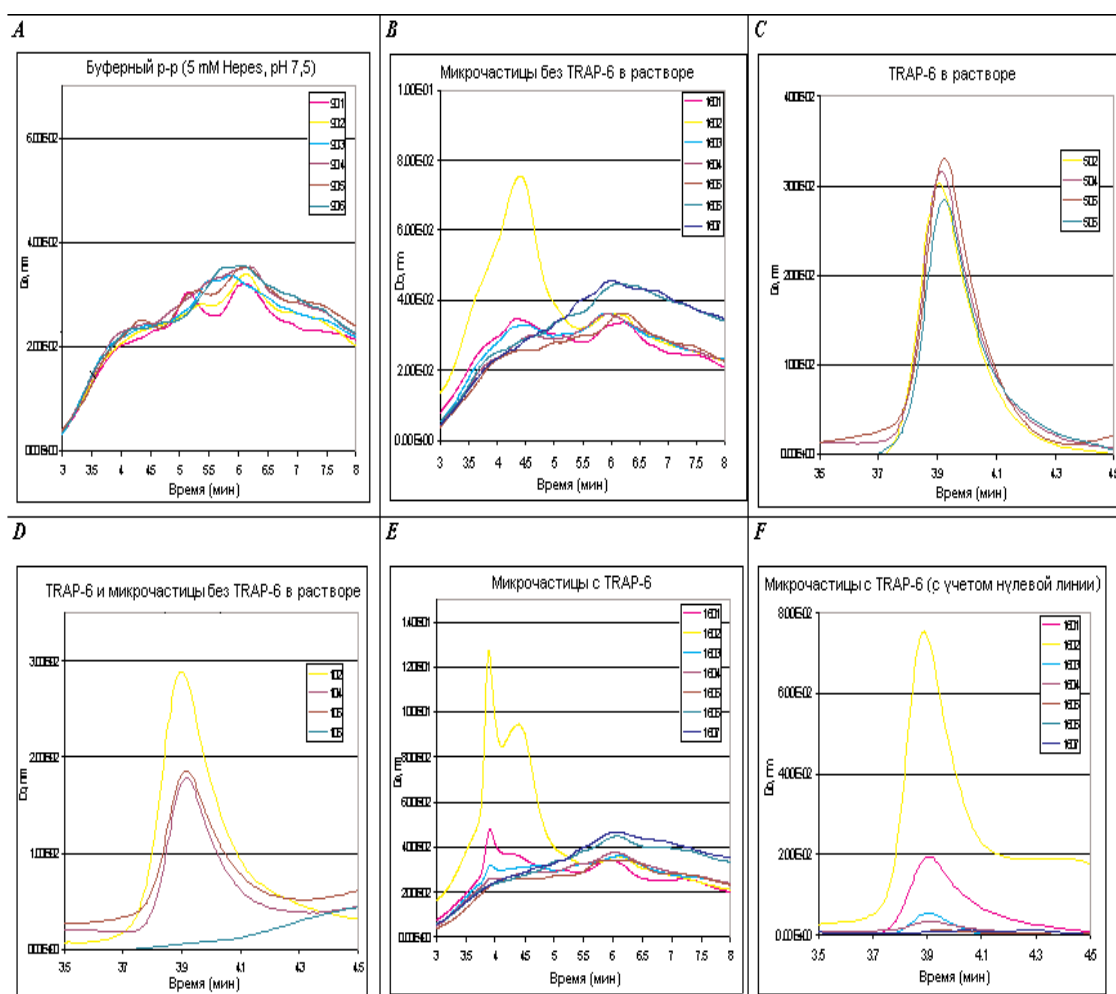


Рисунок 5.

Хроматограммы образцов, взятых через 5', 30', 1 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч после начала инкубации микрокапсул (каждому моменту времени соответствуют следующие легенды хроматограмм: ..01; 02, - до ..07 соответственно).

Изучение морфологии поверхности и скорости разрушения микрокапсул с иммобилизованным пептидом. Так как скорость кинетики выхода пептида связана со структурой поверхности и скоростью разрушения полученных микрокапсул, следующим этапом изучения эффективности иммобилизации TRAP-6 стало исследование морфологии поверхности микрокапсул с пептидом и без пептида методом сканирующей электронной микроскопии.

На рисунке 6 представлены снимки рельефа поверхностей микрокапсул без пептида и микрокапсул с TRAP-6. Результаты сканирующей электронной микроскопии подтверждают, что с помощью метода двойного эмульгирования нам удалось получить сферические гомогенные микрокапсулы с узким распределением по размерам в интервале от 50 до 100 мкм. При сравнении морфологии поверхностей микрокапсул с пептидом и без пептида видно, что присутствие TRAP-6 значительно увеличивает пористость поверхности микрокапсул. Можно предположить, что усиление пористости поверхности микрокапсул с пептидом по сравнению с микрокапсулами без пептида может быть следствием того, что нерастворимый в фазе сополимера пептид легко переходит в водную фазу, диффундируя через поры на поверхность микрокапсул.

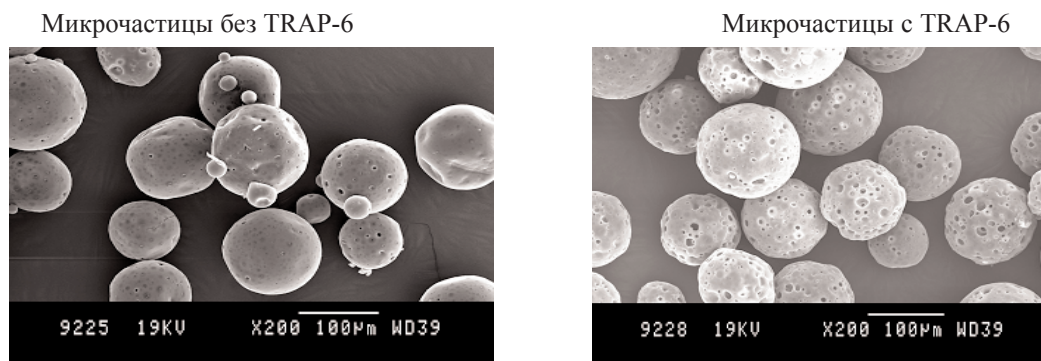


Рисунок 6.

Морфология поверхности микрочастиц без TRAP-6 (контроль) и микрочастиц с иммобилизованным TRAP-6.

На рисунке 7 представлены микрочастицы с иммобилизованным пептидом TRAP-6 до инкубации и спустя 1 день, 2 дня и 7 дней после начала их инкубации в буферном растворе (5 мМ HEPES, pH 7,5) при 37°C. Можно видеть, что пористость поверхности микрочастиц значительно увеличивается уже после первого дня инкубации. Значительное увеличение микрочастиц в размерах наблюдалось в течение первых двух дней инкубации, что объясняется набуханием полимера в водной среде. Нарушение сферической формы и агрегация микрочастиц становится очевидной на седьмой день инкубации.

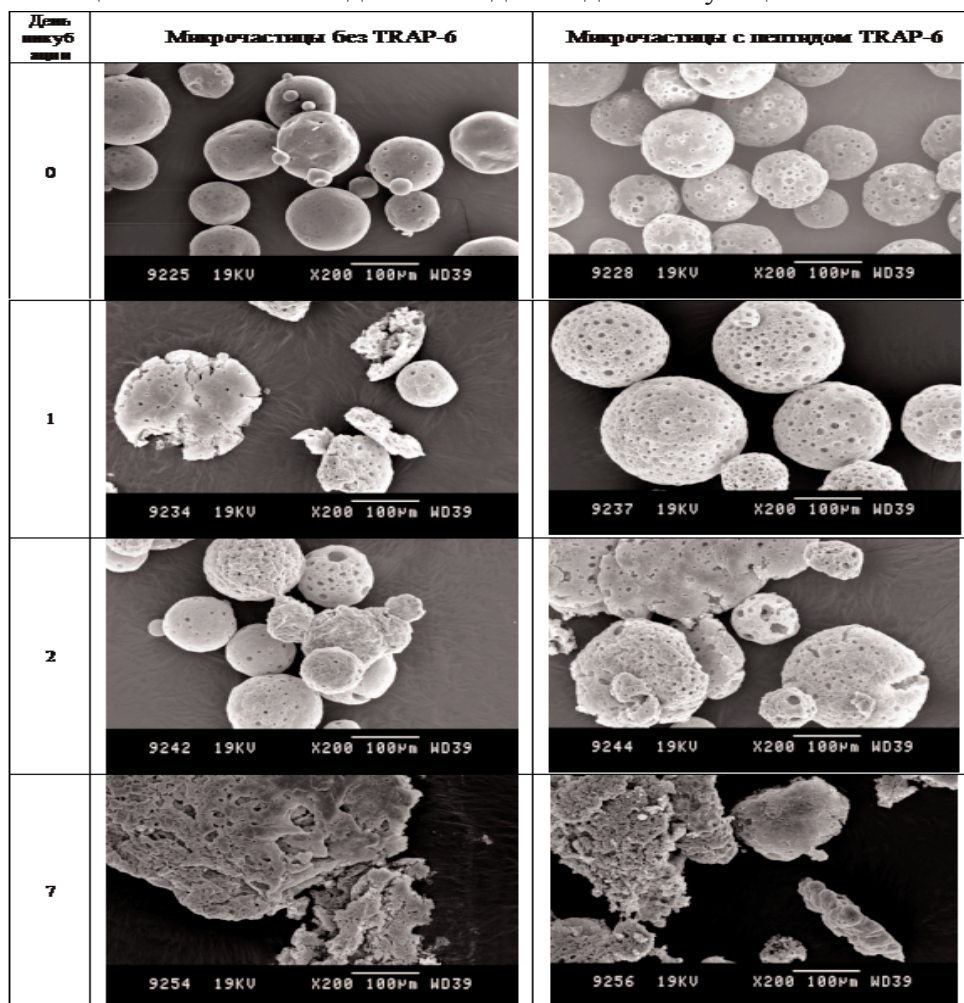


Рисунок 7.

Деструкция микрочастиц без пептида (контроль) и микрочастиц с пептидом в процессе их инкубации в буферном растворе (Hepes, pH 7,5) при 37°C. Снимки микрочастиц были сделаны до и спустя 1 день, 2 дня и 7 дней после начала инкубации.

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ПЕПТИДОМ

Результаты исследования морфологии полученных микрочастиц подтверждают данные хроматографии. Очевидно, что резкий скачок концентрации пептида в буферном растворе спустя 2 часа после начала инкубации является результатом диффузии пептида, локализованного в приповерхностных слоях микрочастиц, а также значительного увеличения пористости поверхности микрочастиц уже в первый день инкубации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Проведенные эксперименты показали, что с помощью метода двойного эмульгирования нам удалось получить микрочастицы с иммобилизованным пептидом сферической формы с узким распределением по размерам в интервале 50 – 300 мкм.

Кинетика выхода пептида из PLGA микрочастиц представляет собой двухфазную кривую с резким увеличением концентрации пептида в буферном растворе через 2 часа после начала инкубации микрочастиц и полным выходом пептида через 20 часов после начала эксперимента. Также было установлено, что пептид способен на короткое время (около 10 мин) адсорбироваться на поверхности микрочастиц, однако вследствие набухания и деструкции полимерных микрочастиц в дальнейшем происходит его десорбция обратно в раствор.

Высвобождение пептида в два этапа можно объяснить следующим образом. Резкое увеличение концентрации пептида в буферном растворе спустя 2 часа после начала инкубации объясняется высвобождением пептида, прежде всего локализованного в приповерхностных слоях микрочастиц. Дальнейшее постепенное высвобождение пептида происходит за счет его диффузии через поры в структуре микрочастиц, сопровождающееся их постепенным набуханием и деструкцией.

Данные кинетики выхода пептида подтверждаются результатами исследования морфологии поверхности микрочастиц и скорости их деструкции в процессе инкубации в буферном растворе. Результаты сканирующей электронной микроскопии показали, что спустя сутки после инкубации микрочастиц с иммобилизованным пептидом в буферном растворе, происходит значительное увеличение микрочастиц в размерах, а также увеличение пористости их поверхности, что стимулирует высвобождение пептида.

Полученные результаты будут использованы в дальнейшей работе по оптимизации процесса иммобилизации пептида в микрочастицы на основе биосовместимых полимеров с целью снижения отрицательного воздействия используемых органических растворителей на биологическую активность пептида, а также для увеличения времени высвобождения пептида из микрочастиц.

Авторы благодарят FEBS и UNESCO за финансовую поддержку аспиранта ИБХ РАН Сташевской К.С. Эта поддержка позволила провести часть экспериментальной работы в Межфакультетском центре биоматериалов университета г. Льежа (Бельгия) в рамках сотрудничества между Институтом биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова и этим университетом.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Regan M., Barbul A., Schlag G., Redl H. (eds.)* (1994) *Wound Healing*, Springer Verlag, New-York-Berlin-Heidelberg.
2. *Richardson T., Petrs M., Ennett A., Mooney D.* (2001) *Nature Biotechnol.*, **19**, 1029-1034.
3. *Shirakata Y., Kimura R., Nanba D., Iwamoto R., Tokumaru S., Morimoto C., Yokota K., Nakamura M., Sayama K., Mekada E., Higashiyama S., Hashimoto K.* (2005) *J. Cell Sci.* **118**(Pt 11), 2363-2370.
4. *Tanaka A., Nagate T., Matsuda H.* (2005) *J. Vet. Med. Sci.*, **67**, 909-913.
5. *Струкова С.М., Дугунова Т.Н., Чистов И.В., Марквичева Е.А.* (1998) *Биоорг. химия*, **24**, 256-259.

6. Surazynski A., Sienkiewicz P., Wolczynski S., Palka J. (2005) *Pharmacol. Res.* **51**, 217-221.
7. Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I., Coughlin S.R. (1991) *Cell*, **64**, 1057-1068.
8. Van Obberghen-Schilling E., Rasmussen U.B., Vouret-Craviari V. et al. (1993) *Biochem. J.*, **292**, 667-671.
9. Vouret-Craviari V., Van Obberghen-Schilling E., Scimeca J.C. (1993) *Biochem. J.*, **289**, 209-214.
10. Strukova S.M., Dugina T.N., Chistov I.V., Lange M., Markvicheva E.A., Kuptsova S., Zubov V.P., Glusa E. (2001) *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, **7**, 325-329.
11. Nihant N., Shugens Ch., Grandfils Ch., Jerome R., Teyssie Ph. (1994) *Pharm. Res.*, **11**, 1479-1484.
12. Nihant N., Schugens Ch., Grandfils Ch., Jerome R., Teyssie Ph. (1995) *J. Colloid Interfacial Sci.*, **173**, 55-65.
13. Mac A., Negi D., Friend D. (1989) *J. Microencapsulation*, **6**, 361-367.
14. Agawa Y., Yamamoto M., Takada S., Okada H., Shimamoto T. (1988) *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1502-1507.
15. Jain R., Shah N.H., Malick A.W., Rhodes C.T. (1998) *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 703-727.
16. Pitt G., Chasalow F.I., Hibionada Y.M., Klimas D.M., Schindler A. (1981) *J. Appl. Polym. Sci.*, **26**, 3779-3787.
17. Kawaguchi T., Nakano M., Juni K., Inoue S., Yoshida Y. (1982) *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1517-1520.
18. Bogdanský S. (1990) In: *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems.*, (Chasin M., Langer R. (eds.)). Marcel Dekker, New York, pp. 231-259.
19. Leong K.W., D'Amore P., Marletta M., Langer R. (1986) *J. Biomed. Mater. Res.*, **20**, 51-64.
20. Shea L.D., Wang D., Franceschi R.T., Mooney D.J. (2000) *Tissue Eng.*, **6**(6), 605-617.
21. Hollinger J.O., Schmitz J.P. (1987) *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **45**, 594-600.
22. Mayer J., Karamuk E., Akaike T., Wintermantel E. (2000) *J. Control. Release*, **64**(1-3), 81-90.
23. Widmer M.S., Gupta P.K., Lu L., Meszlenyi R.K., Evans G.R., Brandt K., Savel T., Gurlek A., Patrick C.W. Jr, Mikos A.G. (1998) *Biomaterials*, **19**, 1945-1955.
24. Agrawal C.M., Ray R.B. (2001) *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**(2), 141-150.
25. Михайлова А.Г., Лухарева В.В., Васильковский Б.В., Гараник С.К., Оноприенко Л.В., Прудченко И.А., Чикин Л.Д., Румиш Л.Д. (2004) *Биохимия*, **69**, 909-917.
26. Dhanaraju M.D., Jayakumar R., Vamsadhara C. (2004) *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, **52**(8), 976-979.
27. Huang Y.Y., Chung T.W. (2001) *J. Microencapsul.*, **18**, 457-465.
28. Sendil D., Gursel I., Wise D.L., Hasirci V. (1999) *J. Control Release*, **59**(2), 207-217.
29. Hussain M., Beale G., Hughes M., Akhtar S. (2002) *Int. J. Pharm.*, **234**(1-2), 129-138.
30. Fukushima S., Nishida M., Nakano M. (1987) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **35**, 3375-3381.
31. Singh M., Li X.M., McGee J.P., Zamb T., Koff W., Wang C.Y., O'Hagan D.T. (1997) *Vaccine*, **15**, 475-481.
32. Kumanohoso T., Natsugoe S., Shimada M., Aikou T. (1997) *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **40**, 112-116.
33. Porjazoska A., Goracinova K., Mladenovska K., Glavas M., Simonovska M., Janjevic E.I., Cvetkovska M. (2004) *Acta Pharm.*, **54**, 215-229.

Поступила: 11. 04. 2005

BIODEGRADABLE MICROPARTICLES WITH IMMOBILIZED PEPTIDE
FOR WOUND HEALING

*K.S. Stashevskaya¹, E.A. Markvicheva¹, S.M. Strukova², A.V. Rusanova², A.M. Makarova²,
L.R. Gorbacheva², I.A. Prudchenko¹, V.P. Zubov¹, K. Grandfis³*

¹M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy
of Sciences, Miklukho-Maklaya ul., 16/10; Moscow, 117997 Russia; tel.: (495) 336-06-00;
fax.: (495) 335-10-11; e-mail: kira_st@mail.ru

²School of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

³Liege University, Belgium

Thrombin receptor agonist peptide (TRAP-6) may effectively replace thrombin for stimulation of damaged tissue regeneration. (Thrombin employment is limited by its high cost, instability and proinflammatory effect at high concentrations.)

Immobilization of TRAP-6 into a poly(D,L)-lactide-co-glycolide (PLGA)-based matrix can protect peptides from a destruction by peptidases located in a wound area, and can also provide controlled release of the peptide.

PLGA microparticles with immobilized peptide were produced by double emulsion/evaporation technique.

An observation of microparticle morphology by scanning electron microscopy highlighted that peptide immobilization resulted in the increase of the microparticle porosity.

TRAP-6 release kinetics was characterized by burst increase of TRAP-6 concentration in HEPES buffer solution (pH 7.5) for first 2 hours from the beginning of the experiment, and TRAP-6 complete release occurred for 20 hours.

An investigation of TRAP-6 destruction by scanning electron microscopy revealed that the increase of microparticle size and surface porosity were observed already after 1 day of incubation in the buffer solution, and an aggregation of destructing microparticles was obvious by the 7th day of the incubation.

Thus, peptide immobilization into PLGA microparticles can allow to develop a novel controlled release drug delivery system.

Key words: immobilization, TRAP-6, PLGA microparticles, controlled release.