

ЭКСТРАКЦИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ ИЗ АЛЬГИНАТНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ *in vitro* И *in vivo*

Т. В. Шканд¹
А. Д. Рошаль^{2,3}
Н. А. Чиж¹
А. С. Вареников²
В. О. Черановский²
Б. П. Сандомирский¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

²НИИ химии при Харьковском национальном университете
им. В. Н. Каразина, Украина

³ГНУ «Научно-технологический комплекс
Институт монокристаллов НАН Украины», Харьков

E-mail: cryo_tatyana@mail.ru

Получено 01.10.2013

Исследовали зависимость реологических и диффузионных свойств гелей от их состава, а также десорбцию активных компонентов из полученных имплантатов в биологических объектах. Работа проведена *in vitro* с применением ступенчатой экстракции полипептидов сердца новорожденных поросят и *in vivo* путем имплантации комплекса «гель-экстракт» в мышечную ткань. Динамику переноса полипептидов оценивали с использованием фотометрических и флуориметрических методов.

Установлено, что по мере роста концентрации альгината в геле происходит переход от конвективного механизма массопереноса к молекулярной диффузии. Использование флуоресцирующего протеина (R-фикоэритрин) позволило установить, что пептиды переходят из геля в окружающие ткани в течение 5 ч со скоростью 8–9% в 1 ч с последующим уменьшением скорости экстракции за счет встречной диффузии, что способствует пролонгации действия пептидов на орган-мишень.

Данные массопереноса полипептидов в альгинатных гелях следует учитывать при создании композиций «пептидный экстракт-гель» для трансплантации в биологические объекты.

Ключевые слова: полипептиды, экстракция, альгинат, гель, имплантат.

В структуре заболеваемости и смертности населения основная доля на протяжении последних десятилетий принадлежит сердечно-сосудистым заболеваниям. Наибольший процент гибели людей по-прежнему занимает летальность от ишемической болезни сердца, а точнее вследствие такого ее осложнения, как острый инфаркт миокарда [1]. Из-за ограниченной способности сердечной мышцы к восстановлению инфаркт миокарда приводит к необратимому нарушению работы сердца и хронической сердечной недостаточности, трудно поддающейся хирургическому и терапевтическому лечению [2].

В связи с этим проблема адекватного лечения больных инфарктом миокарда по-прежнему актуальна, что, в свою очередь, диктует необходимость разработки новых препаратов для предотвращения развития сердечной недостаточности в постинфарктный период. Новые эффективные методы лечения и профилактики осложнений при остром коронарном синдроме должны быть

направлены на ограничение зоны некроза, предупреждение сердечной недостаточности, достижение оптимизации гемодинамического профиля, коррекцию нарушений ритма сердца и на профилактику осложнений [3]. Альтернативой традиционной терапии сегодня считают трансплантацию стволовых клеток (СК) как эмбрионального, так и постнатального происхождения [4, 5], использование рекомбинантных протеинов и пептидных комплексов тканей [6], цитокинов (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора — Г-КСФ), а также генную терапию (введение плазмидных или вирусных генных конструкторов, кодирующих биологически активные протеины) [5]. В ряде случаев это позволяет достичь стимуляции регенераторных процессов в миокарде, частичного или полного восстановления способности сердечной мышцы к сокращению, активации ангиогенеза в поврежденном участке и периинфарктной зоне.

В последние годы значительно возрос интерес к полимерам, применяемым в каче-

стве механической «заплатки»-имплантата при ремоделировании сердечной мышцы [7, 8]. Важным вопросом использования биомеханических имплантатов является материал, из которого изготовлен полимер. Он должен быть не только толерантным к тканям организма, но и биodeградируемым, т. е. саморазрушающимся и постепенно выводющимся из зоны его применения. В настоящее время интенсивно исследуются и уже применяются имплантаты на основе поликапролактамов (капрон, нейлон) [9], полиэфигов [10], а также сополимеров — капролактама и гликолида [11] или стирола и гликолевой кислоты [12]. Очевидным недостатком этих полимеров является абиогенность, поскольку продукты их распада — ω-аминокапроновая кислота, многоатомные карбоновые кислоты — не типичны для человеческого организма и могут вызывать побочные эффекты.

С учетом вышесказанного целесообразным является создание полимеров на основе биогенных компонентов, например сополимеров молочной и гликолевой кислот [13], либо уже существующих биогенных полимеров животного (желатин [14]) и растительного (целлюлоза [15], альгинаты [16, 17]) происхождения.

Следующий важный фактор — наличие у имплантата необходимых механических и реологических свойств, в частности пластичности, устойчивости к постоянному механическому воздействию, способности принимать форму окружающих тканей, возможности технологичного и быстрого изготовления имплантатов любых размеров и форм и т. д. Существуют два основных подхода к решению таких задач. Первый подход предусматривает химическое модифицирование полимеров или изменение химического состава сополимеров в процессе синтеза [11–13], что неизбежно приводит к повышению их стоимости. Второй подход основан на изменении физико-химических и механических свойств полимеров путем введения дополнительных компонентов — биоадгезивных добавок, наполнителей и разбавителей [15, 17], структурообразующих и гелеобразующих агентов [9, 17]. Этот подход заостряет проблему биосовместимости компонентов, стабильности композиций, изменения механизма их биodeградации под влиянием добавок.

Актуальным является вопрос о совмещении механических функций имплантата с терапевтическим эффектом, что подразумевает использование полимерной основы имп-

лантата в качестве депо биологически активных веществ, обеспечивающего диффузию последних в зону поражения. Здесь также существуют 2 основных подхода — химическое модифицирование полимеров низко- и высокомолекулярными биологически активными молекулами [18] и добавление в полимерные композиции фармацевтических препаратов [19, 20]. Первый подход не только технологически сложный и дорогостоящий, но может быть использован лишь для замедленного выделения биологически активного компонента. Последний высвобождается по мере биodeструкции полимерной основы, что удлиняет продолжительность процесса. Второй подход — введение биологически активных добавок в полимер — требует наличия компонентов, регулирующих динамику и кинетику диффузии.

По нашему мнению, наиболее перспективной полимерной основой для имплантатов являются альгинаты. Альгинаты — это биodeградируемые полимеры природного происхождения, по химическому составу относящиеся к полисахаридам и поликарбоновым кислотам. Эти полимеры безвредны, используются в качестве фармацевтических препаратов и пищевых добавок. По физико-химическим свойствам альгинаты удовлетворяют большинству требований, предъявляемых к имплантатам. Они обладают значительной биоадгезией, не требуют структурирующих и гелеобразующих добавок, поскольку сами по себе являются структурированными гелями. За счет водородных связей альгинаты могут образовывать устойчивые смеси с биологически активными компонентами. Механические, физико-химические, абсорбционные и диффузионные свойства альгинатов можно модифицировать путем изменения количества воды или изотонического раствора в геле.

Целью работы был подбор соотношения «альгинат — вода», при котором свойства полученного полимера в наибольшей степени соответствуют предъявляемым к имплантатам и, в то же время, обеспечивают оптимальную десорбцию и диффузию биологически активных веществ в зону поражения. В предыдущей работе на примере гелей альгината натрия с добавками экстракта биоактивных полипептидов было показано, что гели, содержащие 0,5% мас и 5% мас альгината, обладают совершенно разными физико-химическими и реологическими свойствами, различными термоустойчивостью и механизмами десорбции полипептидов [21]. Мы исследовали зависимость реологических

и диффузионных свойств гелей от их состава, а также десорбцию активных компонентов из полученных имплантатов в биологических объектах.

Материалы и методы

Для проведения экспериментов с гелями и изготовления имплантатов были использованы коммерческий альгинат натрия и физиологический раствор (0,9% -го хлорида натрия). В качестве биологически активного компонента применяли экстракт полипептидов (ЭП) из сердца новорожденных поросят, ускоряющий процесс репаративной регенерации и восстановления тканей [22, 23]. Флуоресцирующий протеин (ФП) — R-фикоэритрин массой 240 КД (Febico) использовали как флуоресцентный маркер для оценки полноты диффузии.

Гели готовили, смешивая альгинат натрия и физиологический раствор, содержащий 100 мкг/мл ФП или количество ЭП, соответствующее 100 мкг суммы полипептидов на 1 мл раствора. Смешивание проводили в пробирках с одинаковым внутренним диаметром таким образом, чтобы перенос введенных компонентов из геля в водный раствор проходил через межфазную границу с одинаковой площадью поверхности. В условиях эксперимента эта площадь составляла 1,32 см². После застудневания геля его выдерживали в течение 1 сут для окончательного структурирования. Исследования динамики экстракции проводили на серии гелей, содержащих ЭП с концентрацией альгината натрия 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 и 10,0% мас. Имплантаты для исследований на биологических объектах изготавливали на основе гелей с концентрацией альгината 5; 7,5 и 10% мас. Кроме гелей, содержащих ФП и ЭП, были приготовлены референтные гели, не содержащие пептидов.

Динамику выделения пептидной составляющей экстрактов *in vitro* исследовали таким образом. В пробирку с гелем вносили 2 мл физиологического раствора, перемешивали водный слой в течение 2 мин над гелем, не нарушая целостности последнего, и отбирали полученный водный экстракт. Затем добавляли новую порцию раствора и повторяли операцию экстракции пептидов из геля. Процедуру извлечения полипептидов из геля осуществляли в 9–10 этапов. Описанную выше ступенчатую экстракцию проводили как с гелями, содержащими ЭП и ФП, так и с аналогичными референтными образцами, не содержащими полипептидов.

Первичную оценку количества извлеченных ЭП и ФП на каждой стадии экстракции осуществляли путем измерения оптической плотности экстрактов относительно соответствующих референтных растворов на длине волны поглощения полипептида 280 нм. Для измерений оптической плотности и регистрации спектров поглощения был использован спектрофотометр Hitachi U3210 (Япония).

Последующее количественное определение полипептидов в ЭП, а также в гелях и экстрактах из гелей проводили модифицированным биуретовым методом [11], дающим возможность детектировать протеин в присутствии углеводов, в т. ч. и полисахаридов. Содержание фикоэритрина определяли флуориметрически на длине волны 575 нм.

Характеристиками ступенчатой экстракции являются масса полипептидов, выделенных на *i*-м шаге экстракции — M_i (поскольку каждая стадия экстракции длится одинаковое время, номер стадии можно заменить временем экстракции), а также суммарная масса полипептидов — M_Σ , равная сумме массы, выделенной на данной стадии экстракции и на всех предыдущих стадиях. Поскольку масса полипептидов в экстрактах ЭП пропорциональна оптической плотности последних или интенсивности флуоресценции ФП, анализ массопереноса можно проводить без расчета масс экстрагируемых продуктов, используя непосредственно соответствующие величины оптической плотности или интенсивности — A_i и A_Σ (или I_i и I_Σ):

$$M_\Sigma = \sum_{i=1}^j M_i \quad \text{и} \quad A_\Sigma = \sum_{i=1}^j A_i,$$

где *j* — текущий шаг экстракции, для которого определяются A_i , A_Σ , M_i и M_Σ .

Исследование массопереноса проводили в трех повторениях, средние величины массопереноса определяли методом медианы.

Поведение гелей в биологических объектах изучали путем введения имплантатов в *m. gluteus* 12 самцам крыс Вистар в межфасциальные пространства на глубину 1 см с дальнейшим закрытием операционной раны кожным лоскутом. Эксперименты выполняли в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», согласованными с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Методики утверждены комиссией по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

Имплантаты были изготовлены из геля, содержащего 10% альгината натрия в виде цилиндрических таблеток диаметром 0,5 см и высотой 0,25 см. Таким образом, площадь поверхности контакта геля с окружающей средой составляла 2,36 см². Имплантаты извлекали из мышечного массива через 1, 3, 6, 12 и 24 ч после имплантации, далее целиком растворяли их в воде и затем определяли количество протеина методом [24], измеряя величину оптической плотности при 570 и 680 нм.

Результаты и обсуждение

Физико-химические свойства гелей. Исследование динамики экстракции полипептидов *in vitro*

Реологические и некоторые физико-химические свойства гелей в зависимости от их состава приведены в таблице.

Гели, содержащие 0,5–1,0% мас альгината натрия, по консистенции близки к жидкости, хотя и сохраняют в процессе экстракции межфазную границу с физиологическим раствором. Гель с 2,5% мас альгината представляет собой легко деформируемое и не сохраняющее первоначальную форму желе.

Таким образом, эти гели не могут быть использованы для изготовления имплантатов. Кроме того, как было показано нами ранее [21], гели с низким содержанием альгината не выдерживают нагревания и разрушаются в условиях стерилизации.

Плотность гелей уменьшается с ростом концентрации альгината натрия. При низких концентрациях последнего (0,5% мас) она составляет $d_{25} = 0,991$ г/см³, т. е. близка к плотности воды. При 5% и 10% мас альгината плотность соответственно снижается до $d_{25} = 0,960$ г/см³ и $0,938$ г/см³.

На рис. 1 представлена зависимость A_1 и A_2 от количества стадий экстракции полипептидов из геля, содержащего 7,5% мас альгината натрия. Каждая стадия экстракции длится 2,5 мин. Как следует из рисунка,

в течение семи стадий экстракции, т. е. ~18 мин, из геля извлекается более 98% полипептидов.

Процесс выделения биологически активных компонентов из геля может описываться соотношением двух предельных механизмов массопереноса — молекулярной и конвективной диффузией. При конвективной диффузии скорость переноса ЭП или ФП в геле может быть очень велика и сопоставима со скоростью в водном растворе. В этом случае при контакте поверхности геля с током водного раствора масса извлеченных полипептидов будет линейно зависеть от времени экстракции. При молекулярной диффузии миграция молекул полипептидов в геле происходит с меньшей скоростью, чем скорость их перехода через границу гель–растворитель. В этом случае массоперенос полипептидов будет зависеть от скорости их миграции из глубины геля к границе раздела фаз и нелинейно изменяться во времени.

Зависимость массы извлеченного биологически активного компонента от времени экстракции может быть описана единым уравнением независимо от механизма массопереноса [25]:

$$\lg M_{\Sigma}(t) = n \lg t + \lg SC_0 \sqrt{\frac{\tilde{D}}{\pi}}$$

или

$$\lg A_{\Sigma}(t) = n \lg t + \lg SC_0 \sqrt{\frac{\tilde{D}}{\pi}} + const, (1)$$

где M_{Σ} — суммарная масса ЭП или ФП, выделяемая на каждой стадии экстракции; A_{Σ} — суммарная оптическая плотность экстракта, пропорциональная M_{Σ} ; t — время экстракции; C_0 — начальная объемная концентрация ЭП или ФП в геле; S — площадь поверхности раздела гель/раствор; \tilde{D} — эффективный коэффициент переноса (при реализации механизма молекулярной диффузии соответствует коэффициенту диффузии).

Зависимость свойств геля от концентрации альгината натрия

Массовая доля альгината натрия, %	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Консистенция	Жидкая		Желеподобная	Твердая пластичная		
Способность сохранять форму	Форма не сохраняется			Форма сохраняется		
Показатель типа диффузии	0,900	0,847	0,886	0,726	0,687	0,536
Показатель массопереноса ($\times 10^6$), кг/с ²	1,74	1,75	1,81	1,74	1,70	1,10

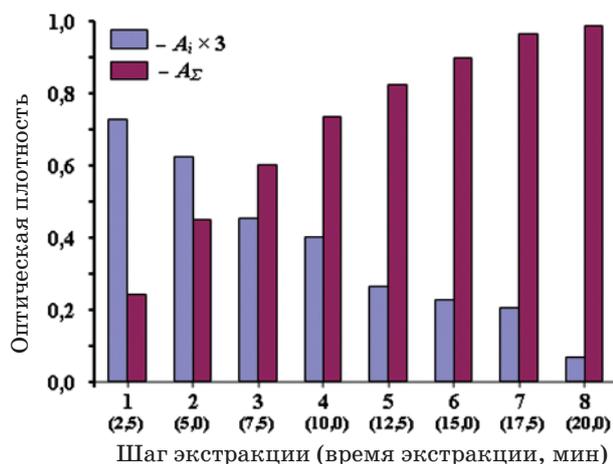


Рис. 1. Зависимость A_i и A_Σ от количества стадий экстракции полипептидов из геля, содержащего 7,5% мас альгината натрия

Коэффициент n в случае конвективного механизма равен единице, при молекулярной диффузии — 0,5. В реальных системах диффузия имеет смешанный характер, поэтому для величины n выполняется неравенство $0,5 < n < 1$. Зависимость $\lg A_\Sigma$ от $\lg t$, построенная для исследуемых гелей согласно уравнению (1), приведено на рис. 2, а.

Линейность $\lg A_\Sigma = f(\lg t)$ сохраняется на протяжении 18–20 мин после начала экстракции, а далее нарушается в связи с проникновением воды в гель и изменением состава и физико-химических характеристик поверхностных слоев последнего.

Фактически экстракция полипептидов из геля может быть описана параметрами \bar{D} и n . Первый характеризует эффективность массопереноса, второй показывает, в какой мере реальный механизм экстракции определяется процессами конвективной или молекулярной диффузии. Величины \bar{D} и n для гелей разного состава приведены

в таблице, зависимость этих параметров от количества альгината натрия в геле — на рис. 2, б. Зависимость n от количества альгината натрия в геле носит линейный характер: по мере роста концентрации альгината n уменьшается от ~0,9 до ~0,5, что свидетельствует о переходе от конвективного механизма массопереноса к молекулярной диффузии.

В гелях, содержащих менее чем 5% мас альгината натрия, эффективность массопереноса примерно одинакова, затем, по мере увеличения количества альгината, скорость выхода полипептидов из геля в раствор уменьшается. Таким образом, изменяя количество полимерной основы в геле, можно регулировать скорость извлечения биологически активного компонента.

Исследование динамики экстракции полипептидов в биологических объектах

Данные, полученные на системах *in vitro* — физико-химические свойства имплантата, тип и эффективность массопереноса, незначительно изменяются с переходом к биологическим объектам. Однако в биологических системах имплантат контактирует не с током биологической жидкости, как рассматривалось ранее, а непосредственно с тканями организма. Поэтому скорость массопереноса пептидов из геля в окружающую среду в биологических объектах должна быть существенно ниже.

Кроме того, следует принимать во внимание внешнее механическое давление тканей на имплантат, более высокую и изменяющуюся во времени температуру окружающей среды, обратную диффузию протеинов из тканей в гель, обмен ионов натрия с ионами окружающей среды. Все указанные факторы плохо поддаются моделированию, поэтому нами было проведено исследование

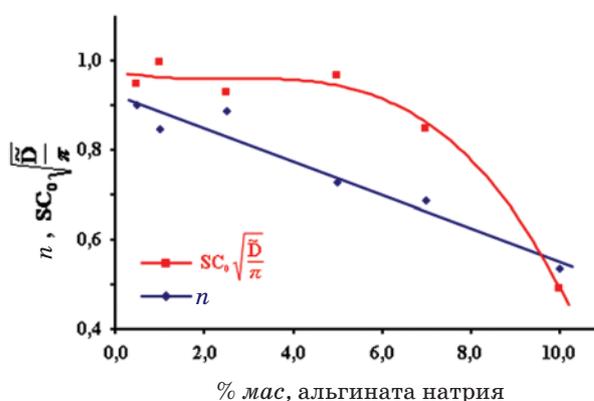
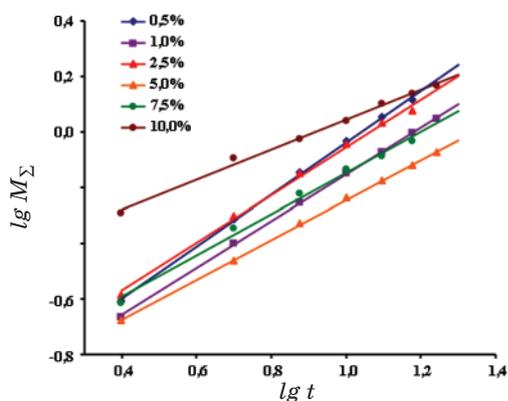


Рис. 2. Зависимость параметров массопереноса от: времени (а) и состава геля (б)

процессов переноса полипептидов ЭП и ФП из имплантата в мышечную ткань самцов крыс.

Следует отметить, что в пробах, извлеченных через 6 и более часов, имплантаты теряли исходную форму и с трудом отделялись от окружающих их тканей. Количество протеина в контрольных, не имплантированных образцах геля принимали равным 100%. Результаты представлены на рис. 3.

Как следует из приведенной кривой, общее количество полипептидов в геле не снижается, как следовало бы ожидать, а наоборот, увеличивается. Рост концентрации полипептидов в первое время после имплантации происходит практически линейно, и после 15–20 ч на кривой наблюдается тенденция к насыщению. В пробах, извлеченных из тканей через 24 ч после имплантации, концентрация протеина в 9,62 раза превышала исходную. Наблюдаемый эффект объясняется тем, что помимо экстракции полипептидов ЭП из имплантата происходит также и обратный процесс — диффузия протеинов из окружающих мышечных тканей в имплантат. В гелях с высоким содержанием альгината натрия, где реализуется механизм молекулярной диффузии и концентрация полипептидов в слое вблизи поверхности раздела гель/среда ниже, чем в глубине гелевой фазы, встречная диффузия протеинов в гель может тормозить выделение биологически активного компонента.

Проследить за выделением полипептидов из геля на фоне интенсивной встречной диффузии можно, используя флуоресцирующий протеин ФП, поскольку он, в отличие от обычных полипептидов, имеет полосу испускания в длинноволновой области спектра. Изменение относительного количества ФП

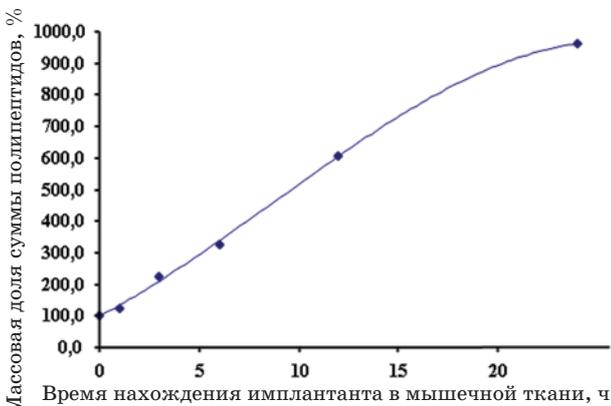


Рис. 3. Относительное содержание пептидов в геле с 10%-м альгинатом натрия в зависимости от времени нахождения имплантата в мышечной ткани

в имплантатах после их извлечения из мышечной ткани представлены на рис. 4, а.

Как следует из рис. 4, а, кривая выхода ФП отличается от кривых, полученных в эксперименте *in vivo*. Примерно 45% мас ФП переходит в окружающие ткани за 5 ч со скоростью 8–9% / ч. Далее выход ФП существенно замедляется, и в промежутке между 10 и 24 ч с начала эксперимента скорость выхода падает до 0,2–0,3% / ч. Логарифмическая зависимость массопереноса от времени не является линейной и не соответствует уравнению (1). Поскольку механизм диффузии (наклон линии) определяется составом геля, а различия в скорости диффузии (величина отрезка, отсекаемого линией на оси абсцисс при $\lg t = 0$) зависят от разницы средних молекулярных масс ЭП и ФП (рис. 4, б), главной причиной, вызывающей отклонение процесса извлечения ФП из геля, по нашему мнению, является интенсивная встречная диффузия полипептидов из тканей в гель.

Приведенные выше данные позволяют

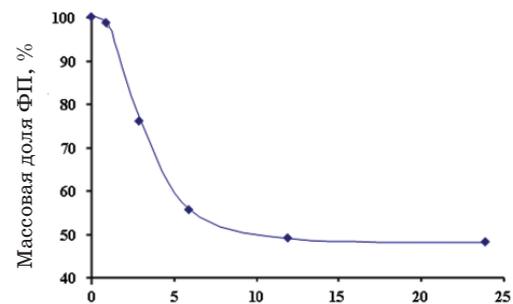


Рис. 4, а. Массовая доля ФП, %

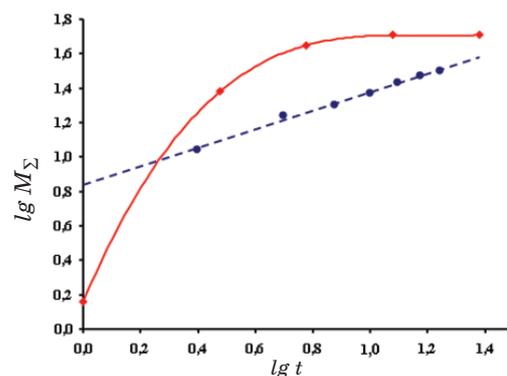


Рис. 4. Динамика массообмена флуоресцирующего протеина в геле, содержащем 10% альгината натрия:

а — изменение концентрации флуоресцирующего протеина в геле в процессе экстракции в мышечную ткань; б — логарифмическая зависимость количества экстрагированного флуоресцирующего протеина от времени (сплошная линия — экспериментальная зависимость; штриховая, смещенная на 0,3 ед., — теоретическая зависимость для $n = 0,5$ и $\bar{D} = 1,10 \cdot 10^{-6}$ кг/с²)

сделать ряд выводов о массопереносе полипептидов в альгинатных гелях, которые следует принимать во внимание при создании композиций пептидный экстракт — гель: механизм экстракции пептидов из геля зависит от соотношения количества альгината натрия и воды (физиологического раствора); по мере роста концентрации альгината происходит переход от конвективного механизма массопереноса к молекулярной диффузии; при определении динамики экстракции полипептидов из имплантата, помещенного в мышечную ткань, выявлено, что наряду с

выделением биологически активных полипептидов из геля отмечается интенсивная встречная диффузия пептидов из окружающих тканей животного в гель; изучение динамики массопереноса флуоресцирующего протеина (R-фикоэритрина) показало, что пептиды переходят из геля в окружающие ткани в течение 5 ч со скоростью 8–9% / ч с последующим уменьшением скорости экстракции за счет встречной диффузии, и таким образом происходит удлинение времени действия пептидов на орган-мишень.

REFERENCES

1. *Martinez-Selles M., Lopez-Palop R., Perez-David E., Bueno H.* Influence of age on gender differences in the management of acute inferior or posterior myocardial infarction. *Chest*. 2005, 128(2), 792–797.
2. *Jessup M., Brozena S.* Medical progress: heart failure. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 2007–2018. doi: 10.1056/NEJMra021498.
3. *Rankin J. M., Spinelli J. J., Carere R. G., Ricci D. R., Penn I. M., Hilton J. D., Henderson M. A., Hayden R. I., Buller C. E.* Improved clinical outcome after widespread use of coronary artery stenting in Canada. *N. Engl. J. Med.* 1999, V. 341, P. 1957–1965. doi: 10.1056/NEJM199912233412602
4. *Kovacic J. C., Muller D. W., Harvey R., Graham R. M.* Update on the use of stem cells for cardiac disease. *Intern. Med. J.* 2005, 35(6), 348–356. doi: 10.1111/j.1445-5994.2005.00840.x.
5. *Lovell M. J., Mathur A.* The role of stem cells for treatment of cardiovascular disease. *Cell Prolif.* 2004, 37(1), 67–87.
6. *Davis M. E., Motion J. P., Narmoneva D. A., Takahashi T., Hakuno D., Kamm R. D., Zhang S., Lee R. T.* Injectable self-assembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells. *Circulation*. 2005, 111(4), 442–450. doi: 10.1161/01.CIR.0000153847.47301.80.
7. *Christman K. L., Lee R. J.* Biomaterials for the treatment of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006, 48(5), 907–913.
8. *Wall S. T., Walker J. C., Healy K. E., Ratcliffe M. B., Guccione J. M.* Theoretical impact of the injection of material into the myocardium: a finite element model simulation. *Circulation*. 2006, 114, 2627–2635. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.657270
9. *Popov V. O., Gal'braj L. S., Vihoreva G. A., Kil'deeva N. R., Judanova T. N., Bonarceva G. A., Mahina T. K.* Biologically active polymerase composition. *RF. Patent 2 318 535*. March 10, 2008.
10. *Juhua L., Bendzhamin C.* Pharmaceutical compositions for delivery of peptides with sustained release. *US. Patent 2 456 018*. July 20, 2012.
11. *Shelebi Sh. V., Dzhekson S. A., Moro Zh.-P.* Ion molecular conjugates of biodegradable complex polyethers and bioactive polypeptides. *US. Patent 2 237 681*. October 10, 2004.
12. *Saikava A., Igari J., Hata J., Yamamoto K.* Compositions of sustained release, method for their derivation and application. *JP. Patent 2 230 550*. June 20, 2004.
13. *Pelle M., Rum S.* Compositions of sustained release and method for their derivation. *FR. Patent 2 198 678*. February 20, 2003.
14. *Murray O., Holl M., Green R., Kearney P.* Fast-dispersing dosage forms containing fish gelatin. *US. Patent 2 242 969*. December 27, 2004.
15. *Constantini D., Lemarchand C.* Mucosal bioadhesive slow release carrier for delivering active components. *FR. Patent 2 420 267*. December 27, 2012.
16. *Salvador G. G., Nardi R. A., Suñe N. J. M., Tico G. J. R., Miñarro C. M.* Composition of biocompatible microparticles of alginic acid for the controlled release of active ingredients by intravenous administration. *US. Patent 2 476 235*. February 27, 2013.
17. *Howard J. R., Timmins P.* Controlled release formulation. *US Pat. 4 792 452*. December 20, 1988.
18. *Marie E., Landfester K., Antonietti M.* Synthesis of chitosan-stabilized polymer dispersions, capsules, and chitosan grafting products via miniemulsion. *Biomacromolecules*. 2002, 3(3), 475–481. doi: 10.1021/bm015634s.
19. *Bingbing J., Ling H., Changyou G., Jiacong S.* Crosslinked polysaccharide nanocapsules: Preparation and drug release properties. *Acta Biomaterialia*. 2006, 2(1), 9–18.
20. *Kamada M., Hirayama F., Udo K., Yano H., Arima H., Uekama K.* Cyclodextrin conjugate-based controlled release system: repeated- and prolonged-releases of ketoprofen after oral administration in rats. *J. of Controlled release*. 2002, 82(2–3), 407–416.
21. *Roshal' A. D., Shkand T. V., Chizh N. A., Chervonovskij V. O., Kalinkevich A. N., Sandomirskij B. P.* Study of dynamics of polypeptide extraction from alginate microgels. *Vestnik neotlozhnoj i vosstanovitel'noj mediciny*. 2012, 13(1), 109–114. (In Ukrainian).

22. Babaeva A. G., Chizh N. A., Gal'chenko S. E., Sandomirskij B. P. Effect of piglet heart extract on myocardial necrosis. *Teoretychna i eksperymental'na medycyna*. 2013, 59(2), 28–33. (In Ukrainian).
23. Gal'chenko S. Je. Extracts of cryopreserved fragments of xeno- organs: procurements and biological effect. *Problemy kriobiologii*. 2005, 15(3), 403–406. (In Ukrainian).
24. Mamontov V. V, Chujko V. A., Roshal' A. D. Method for determining royal jelly in pharmaceuticals and honey products. *SU. Patent 1 776 351*. November 15, 1992.
25. Dul'nev N. G. Theory of heat- and mass exchange. *St.-Petersburg: Information technologies, mechanics and optics*. 2012, 193 p. (In Russian).

**ЕКСТРАКЦІЯ ПОЛІПЕПТИДІВ
З АЛЬГІНАТНИХ ГІДРОГЕЛІВ
in vitro TA *in vivo***

T. V. Шканд¹, А. Д. Роголь^{2,3},
М. О. Чиж¹, А. С. Вареников²,
В. О. Черановський², Б. П. Сандомирський¹

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

²НДІ хімії при Харківському національному університеті ім. В. М. Каразіна, Україна

³ДНУ «Науково-технологічний комплекс Інститут монокристалів НАН України», Харків

E-mail: cryo_tatyana@mail.ru

Досліджували залежність реологічних та дифузійних властивостей гелів від їхнього складу, а також десорбцію активних компонентів з одержаних імплантатів у біологічних об'єктах. Роботу проведено *in vitro* із застосуванням ступінчастої екстракції поліпептидів із серця новонароджених поросят та *in vivo* імплантацією комплексу «гель–екстракт» у м'язову тканину щурів. Динаміку перенесення поліпептидів оцінювали з використанням фотометричних і флуориметричних методів.

Встановлено, що зі зростанням концентрації альгінату в гелі відбувається перехід від конвективного механізму масопереносу до молекулярної дифузії. Використання флуоресціюючого протеїну (R-фікоеритрин) дало змогу виявити, що пептиди переходять з гелю в прилеглі тканини протягом 5 год зі швидкістю 8–9% на 1 год з подальшим зменшенням швидкості екстракції за рахунок зустрічної дифузії, що сприяє пролонгації дії пептидів на орган-мішень.

Дані масопереносу поліпептидів в альгінатних гелях слід брати до уваги під час створення композицій «пептидний екстракт–гель» за трансплантації у біологічні об'єкти.

Ключові слова: поліпептиди, екстракція, альгінат, гель, імплантат.

**POLYPEPTIDE EXTRACTION
FROM ALGINATE HYDROGELS
in vitro AND *in vivo***

T. V. Shkand¹, A. D. Roshal^{2,3},
N. A. Chizh¹, A. S. Varenikov²,
V. O. Cheranovsky², B. P. Sandomirsky¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

²Chemistry Research Institute of Kharkiv Karazin National University, Ukraine

³State Scientific Organization «Scientific and Technological Complex Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine», Kharkiv

E-mail: cryo_tatyana@mail.ru

Dependence of rheological and diffusion properties of gels on their composition as well as desorption of active components from the resulted implants in biological objects have been studied.

The work has been performed *in vitro* using step-wise extraction of polypeptides from the heart of newborn piglets and also *in vivo* by implanting the «gel-extract» complex into muscular tissue of rats. The dynamics of peptide transfer was assessed using photometric and fluorometric methods.

It has been established that with the growth of alginate concentration in gel there is a transition from convective mechanism of mass transfer to molecular diffusion.

The study of the dynamics of mass transfer of fluorescent protein (R-phycoerythrin) has shown that peptides release from a gel into surrounding tissues for 5 hrs with the rate of 8–9% per hours with following decrease in the extraction rate due to cross diffusion, which contributes to prolonged effect of peptides to a target organ.

Thus the data presented about mass transfer in alginate gels should be taken into account when designing the compositions of «peptide-extract gels» during transplantation into biological objects.

Key words: polypeptides, extraction, alginate, gel, implant.