

УДК 617.7:616–002.9–085

Система постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 — потенційний новітній метод лікування очних інфекцій. Повідомлення 1. Тестування різних нано- та мікрочасток у якості носіїв LL37

О. І. Бузник, канд. мед. наук

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»
Одеса, Україна

E-mail: a_buznik@bk.ru

Цель. Создать систему постоянной доставки антиинфекционного пептида (АИП) LL37, которая могла бы быть использована для лечения глазных инфекций.

Материалы и методы. АИП LL37 (кателицидин) был инкапсулирован в различные нано- и микрочастицы (хитозановые, альгинатные, кремниевые). Эффективность инкапсуляции (ЭИ) и динамика высвобождения LL37 из частиц определялись иммуноферментным анализом. Морфология частиц изучалась под электронным или световым микроскопом. Цитотоксичность частиц с инкапсулированным LL37 оценивалась колориметрическим методом с реагентом WST-1.

Результаты. ЭИ LL37 в альгинатные микрочастицы (АМЧ) составила 13,8 %. Размер АМЧ составил 15–20 мкм. ЭИ LL37 в кремниевые наночастицы (КНЧ) была 54,4 %. Размер КНЧ составил 10–20 нм. Дозированное высвобождение LL37 происходило до 7 дня при инкапсулировании LL37 в АМЧ и до 21 дня — при инкапсулировании в КНЧ. Высвобождения LL37 из хитозановых частиц получено не было. Колориметрический анализ не выявил повышения цитотоксичности частиц с LL37 в отношении клеток роговичного эпителия человека (КРЭЧ) в сравнении с контрольными частицами без LL37.

Выводы. Впервые была создана система постоянной доставки антиинфекционного пептида LL37 на основе микро- и наночастиц. Доказано дозированное высвобождение LL37 из альгинатных микрочастиц (АМЧ) и кремниевых наночастиц (КНЧ). АМЧ и КНЧ с инкапсулированным LL37 не угнетают пролиферацию клеток роговичного эпителия человека. LL37, инкапсулированный в КНЧ, имеет лучшую эффективность инкапсуляции и более длительное высвобождение пептида в сравнении с LL37, инкапсулированным в АМЧ.

Ключевые слова: глазная инфекция, противоинфекционный пептид, система доставки лекарственных средств

Ключові слова: очна інфекція, протиінфекційний пептид, система доставки лікарських засобів

The sustained delivery system of the antiinfection peptide LL37 system — a potentially new treatment method of ocular infections. Report 1. Testing of different nano- and microparticles as carriers of LL37

Buznyk O.

State Institution The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine, Odessa, (Ukraine)

Purpose. To develop anti-infective peptide (AIP) LL37 sustained delivery system that can be used for ocular infections treatment.

Methods. AIP LL37 (cathelicidin) was encapsulated in different particles (alginate, chitosan, silica) under magnetic stirring. Encapsulation efficacy (EE) and LL37 release from particles was checked using the ELISA method. The particle morphology was studied by transmission electron or light microscopy. Cytotoxicity of particles with encapsulated LL37 was assessed using WST-1 based colorimetric assay.

Results. EE of LL37 in the alginate microparticles (AMPs) was 13.8 %. AMP size was 15–20 μm. EE of LL37 in silica nanoparticles (SiNPs) was 54.4 %. SNP size was 10–20 nm. Sustained release of LL37 in AMPs occurred up to the 7th day and in SNP's — up to the 21st day. No LL37 release occurred from chitosan particles. WST-1 based colorimetric assay showed no increased cytotoxicity regarding human corneal epithelial cells of particles with encapsulated LL37 compared to control clear particles.

Key words. Ocular infection, LL37, anti-infection peptide, sustained delivery system

Conclusion. For the first time micro- and nanoparticle based AIP LL37 sustained delivery system was developed. Sustained release of LL37 from AMPs and SiNPs was proved. No cell toxicity was found. SiNP encapsulated LL37 showed better EE and longer release of AIP compared to AMP encapsulated LL37.

Вступ. Резистентність інфекційних збудників до існуючих антибактеріальних та противірусних препаратів є завжди актуальною проблеми медицини у зв'язку з тим, що резистентність збудників наростає швидшими темпами ніж з'являються нові препарати [6]. Тому сьогодні ведеться активний пошук альтернатив традиційним препаратам. Для лікування найбільш поширених бактеріальних інфекцій очного яблука сьогодні використовуються фторхінолони, тетрациклін та хлорамфенікол; ациклогуанозін та валацикловір є найбільш частими препаратами для лікування вірусних інфекцій очного яблука [3, 10].

Перспективними напрямками в цій сфері є: 1) використання протиінфекційних пептидів, що мають протимікробні та противірусні властивості, а також 2) використання металевих та інших наночастинок, в які можна інкапсулювати протимікробні та противірусні препарати, для подовшення їхньої дії в осередку інфекції.

Протиінфекційні пептиди (ППП) синтезуються цілим рядом організмів. Природні молекули імунної системи, такі як катіонні пептиди — дефенсіни та кателіцидини, вивчалися у якості альтернатив традиційним лікам [4]. Зокрема, в рогівці людини був знайдений кателіцидин LL37, який має потенційно широкий спектр активності проти ряду патогенних бактерій, вірусів та грибків [8].

З іншого боку, попередні роботи показали, що використання мікро- та наночастинок носіїв (наприклад, поліетил-2-цианакрилатних наночастинок [7], ліпосом [5], та ін.) подовжувало час виділення препаратів та, відповідно, їхню дію на патогенну мікрофлору.

На сьогоднішній день спроб розробити систему постійного виділення ППП LL37 для застосування в офтальмологічній практиці ще не було.

Метою даної роботи було створити систему постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37, що могла б бути використана для лікування очних інфекцій.

Матеріал і методи

Робота виконана в лабораторії клітинної біології факультету експериментальної та клінічної медицини Університету м. Лінчюпінг (Швеція).

Інкапсуляція LL37 у нано- та мікрочастки. Матеріали: тетраетилортосилікат (ТЕОС), Тритон X-100, оцтова кислота, альгінат натрію, желатин, женепін, хлорид кальцію, хітозан, триполіфосфат були придбані у «Sigma-Aldrich Canada Co.» (Канада), циклогексан — у «Acros organics» (США). ППП LL37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIK

FLRNLVPRTES-NH2) був синтезований «A+Peptide» (Китай).

Кремнієві наночастки. Для виготовлення кремнієвих наночастинок (КНЧ) використовували протокол, що був описаний раніше [1]: 4 мл циклогексану змішували з 1 мл Тритону, після цього додавали 1 мл H₂O, що містила 14 мг LL37. Під впливом магнітного змішувача до розчину крапельно додавали 0,75 мл ТЕОС, після чого отриману суміш повільно нейтралізували концентрованим розчином гідроксиду амонію. Цільовий рН розчину був 4,0–6,0. Суміш залишали на магнітному перемішувачі при температурі 50°C на дві доби. Після цього отримані наночастки двічі відмивали 50 % етиловим спиртом та ліофілізували. Розміри та морфологію наночастинок вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) на мікроскопі JEOL1230 (Японія).

Хітозанові наночастки. Для виготовлення хітозанових наночастинок (ХНЧ) 13 мл розчину хітозану 2 мг/мл у 0,5 % оцтової кислоті змішували з 1 мл H₂O, що містила 5 мг LL37, після цього додавали 4 мл триполіфосфату під дією магнітного змішувача. Суміш залишали на змішувачі на одну добу при кімнатній температурі. Отримані наночастки тричі відмивали H₂O та ліофілізували.

Альгінатні та альгінатно-желатинові мікрочастки. Для виготовлення альгінатних мікрочастинок (АМЧ) 5 мл 2 % розчину альгінату натрію підігрівали до 50°C та змішували з 1 мл H₂O, що містила 5 мг LL37. Цей розчин крапельно додавали до 150 мл 2 % розчину хлориду кальцію з 500 мг женепіну під дією магнітного змішувача з використанням системи інкапсуляції NISCO версії J30 (Nisco Engineering AG, Швейцарія). Суміш залишали на змішувачі на 2 год. при кімнатній температурі.

Для виготовлення альгінатно-желатинових мікрочастинок (АЖМЧ) 10 мл 1 % розчину альгінату натрію додавали до 2 мл 5 % розчину желатину, підігрівали до 50°C та змішували з 1 мл H₂O, що містила 5 мг LL37. Цей розчин крапельно додавали до 150 мл 2 % розчину хлориду кальцію з 50 мл 70 % етилового спирту та 500 мг женепіну під дією магнітного змішувача з використанням системи інкапсуляції NISCO версії J30. Суміш залишали на змішувачі на 2 год. при кімнатній температурі.

Отримані АМЧ та АЖМЧ тричі відмивали водою та ліофілізували. Розмір та морфологію часток оцінювали на інвертованому флуоресцентному мікроскопі Zeiss AxioVert A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Німеччина).

Вивчення динаміки вивільнення LL37 з нано- та мікрочастинок та оцінка ефективності інкапсуляції LL37. Для оцінки динаміки вивільнення LL37 з наночастинок (НЧ) або мікрочастинок (МЧ) 10 мг пустих НЧ (МЧ) — контроль — або 10 мг НЧ (МЧ) з інкапсульованим LL37 уклали у 1,5 мл фосфатного буферу (ФБ) в 12-часові тарілки при 37°C на механічному змішувачі та залишали на 14–28 днів. На 1, 3, 7, 14, 21 та 28 днів ФБ збирали та замінювали свіжим ФБ. ФБ з усіх днів та надосадну рідину, що була зібрана під час відмивання НЧ (МЧ), аналізували методом імуноферментного аналізу (ІФА). Коротко, зразки вкривали буфером для покриття антигену («ImmunoChemistry Technologies», США) та залишали на ніч при кімнатній температурі в 96-ча-

шечних тарілках. Після цього чашечки відмивали буфером для ІФА та вкривали моноклональним антитілом до мишачого LL37 («Santa Cruz Biotechnology», США). Після відмивання додавали протимишаче вторинне антитіло («Bio-Rad Laboratories», США), за ним — тетраметил-бензидін («Sigma-Aldrich Canada Ltd.», Канада). Реакцію зупиняли 1М розчином H_3PO_4 . Чашечки аналізували при довжині хвилі 450 нм на аналізаторі Victor3 V 1420 (PerkinElmer, США). Концентрацію LL37 визначали за допомогою калібрувальної кривої, що була побудована на результатах аналізу зразків LL37 з стандартними концентраціями (0,1, 0,25, 0,5 та 1,0 мг/мл) ідентичним методом ІФА.

Для оцінки ефективності інкапсуляції LL37 у різні НЧ (МЧ) використовували наступні рівняння:

Ефективність інкапсуляції (%) =

$((\text{загальна вага LL37} - \text{вага вільного LL37}) / \text{загальна вага LL37}) \times 100$

Ефективність завантаження (%) =

$((\text{загальна вага LL37} - \text{вага вільного LL37}) / \text{загальна вага НЧ/МЧ}) \times 100$

Примітки: ефективність інкапсуляції — відсоток пептиду, що потрапив до НЧ (МЧ); ефективність завантаження — кількість пептиду в 1 мг НЧ (МЧ); загальна вага LL37 — вага пептиду, що використовували для інкапсуляції; вага вільного LL37 — вага пептиду в надосадній рідині, що була зібрана під час відмивання часток.

Оцінка токсичності нано- та мікрочасток з інкапсульованим LL37 по відношенню до клітин рогівкового епітелію людини. Для того, щоб оцінити, чи пригнічують створені НЧ та МЧ з інкапсульованим пептидом LL37 проліферацію клітин, виконували колориметричне дослідження з додаванням реагенту WST-1 згідно з інструкціями виробника (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Швейцарія). Для цього лінію клітин рогівкового епітелію людини (КРЕЛ) — Life Technologies Europe BV, Sweden — культивували у 96-чашечних тарілках у середовищі KSFМ™, що містило L-глутамін, епідермальний фактор росту людини та бичачий екстракт гіпофізу (Life Technologies Europe BV, Sweden), разом з LL37, що був інкапсульований у КНЧ, АМЧ та АЖМЧ, протягом 24–72 год. Контролем слугували КРЕЛ, в які додавали КНЧ, АМЧ та АЖМЧ без LL37. Після цього у чашки додавали реагент WST-1, що оцінює життєздатність клітин, інкубували протягом 30 хв. та піддавали колориметричному аналізу при довжині хвилі 450 нм за допомогою аналізатора Victor3 V1420 (PerkinElmer, США). В кожній групі проведено по три вимірювання.

Статистичний аналіз. Різницю між дослідною групою (LL37, що інкапсульований у НЧ або МЧ) та контролем (НЧ або МЧ без LL37) визначали за допомогою непараметричного тесту Mann-Whitney. Різниця вважалася значущою при $p < 0,05$. У випадку множинних порівнянь використовували поправку Bonferroni для рівня статистичної значимості (p).

Результати

Інкапсуляція LL37 у нано- та мікрочастки. За описаними методиками були отримані частки розмірами 10–20 нм (кремнієві та хітозанові наночастки) та 20–30 мкм (альгінатні та альгінатно-желатинові мікрочастки) — рис. 1.

Динаміка вивільнення LL37 з нано- та мікрочасток та оцінка ефективності інкапсуляції LL37. Не

було знайдено вивільнення АІП LL37 з хітозанових НЧ. Пептид не визначався ані в надосадній рідині, ані в зразках, що були зібрані під час вивчення динаміки вивільнення АІП.

Найкраща ефективність інкапсуляції LL37 була отримана при створенні КНЧ — 54,4 %, ефективність інкапсуляції пептиду у АМЧ та АЖМЧ не перевищувала 21,2 %. Ефективність завантаження LL37 у всі види часток була невисокою та складала від 2 до 3,4 % (табл. 1).

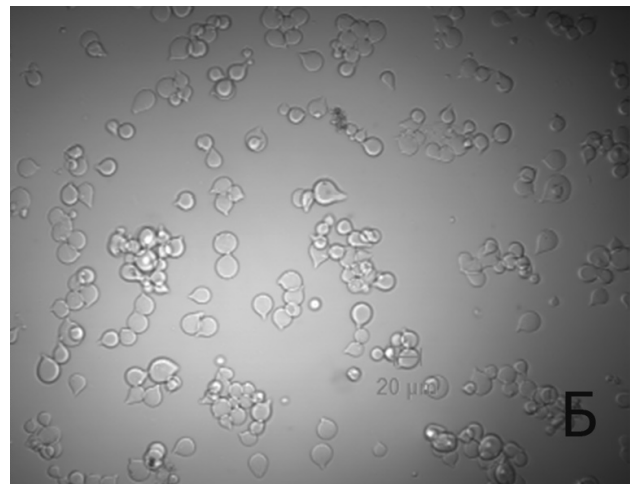
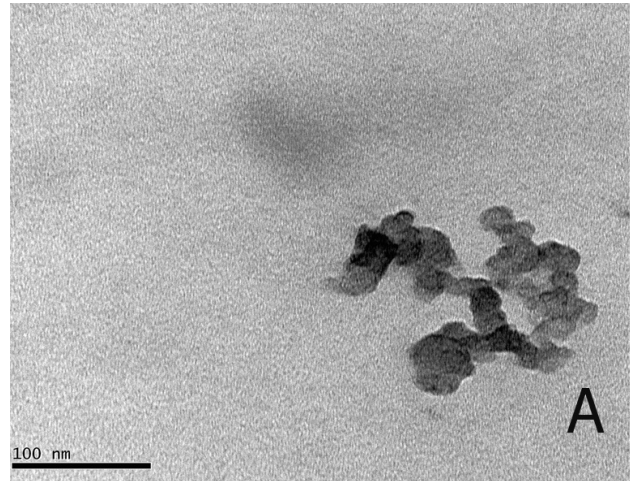


Рис. 1. Нано- та мікрочастки, що були отримані за описаними методиками: А — кремнієві наночастки з інкапсульованим LL37, $\times 100000$; Б — альгінатно-желатинові мікрочастки з інкапсульованим LL37, $\times 200$.

Таблиця 1. Типи часток, що використовували для інкапсуляції LL37, та ефективність інкапсуляції.

Частки	Розмір	Ефективність інкапсуляції, %	Ефективність завантаження, %
Хітозанові	нм	–	–
Кремнієві	10–20 нм	54.4	2.1
Альгінатно-желатинові	15–20 мкм	21.2	3.4
Альгінатні	15–20 мкм	13.8	2.0

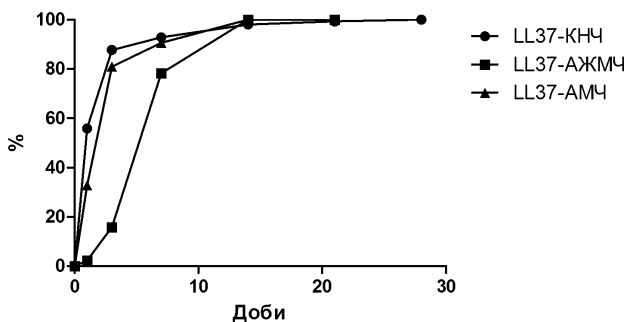


Рис. 2. Динаміка вивільнення LL37 з нано- та мікрочасток (%). Примітки. LL37-КНЧ — LL37, що інкапсульований у кремнієві НЧ; LL37-АМЧ — LL37, що інкапсульований в альгінатні МЧ; LL37-АЖМЧ — LL37, що інкапсульований в альгінатно-желатинові МЧ.

Колориметричний аналіз на основі WST-1

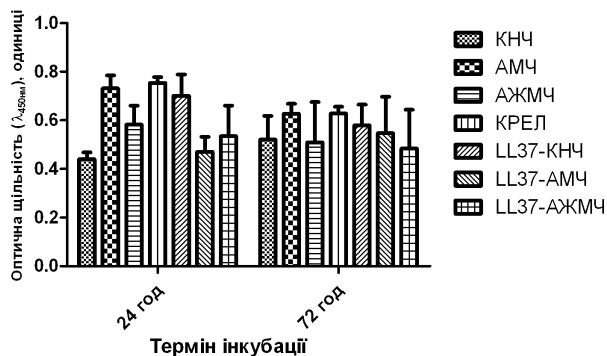


Рис. 3. Результати оцінки цитотоксичності інкапсульованого в нано- та мікрочастки LL37 ($p > 0,05$). Примітки. КНЧ — кремнієві НЧ; АМЧ — альгінатні МЧ; АЖМЧ — альгінатно-желатинові МЧ; КРЕЛ — клітини рогівкового епітелію людини; LL37-КНЧ — LL37, що інкапсульований у кремнієві НЧ; LL37-АМЧ — LL37, що інкапсульований в альгінатні МЧ; LL37-АЖМЧ — LL37, що інкапсульований в альгінатно-желатинові МЧ.

Найдовше вивільнення LL37 було отримано з КНЧ — пептид поступово звільнявся до 30 доби, в той же час, 85 % LL37 звільнялося до 3 дня. Звільнення пептиду з АМЧ та АЖМЧ завершувалося до 14 доби (рис. 2).

Оцінка токсичності нано- та мікрочасток з інкапсульованим LL37 по відношенню до клітин рогів-

кового епітелію людини. Колориметричне дослідження з реагентом WST-1 не виявило підвищеної токсичності LL37, що був інкапсульований у різні типи часток, по відношенню до КРЕЛ порівняно з КНЧ, АЖМЧ та АМЧ без пептиду (рис. 3).

Обговорення результатів

LL37 є поліфункціональним пептидом з багатьма біологічними властивостями: антимікробна активність, хемоатракція, він впливає на диференціацію дендритичних клітин, на дегрануляцію тучних клітин, секрецію цитокінів. Пептид також стимулює ангиогенез та загоєння ран [11]. LL37 також виявився активним по відношенню до вірусу імунодефіциту людини [12], вірусу грипу типу А [2] та вірусу простого герпесу [8]. Пептид має потенціал, щоб замінити традиційні препарати для лікування бактеріальних та вірусних інфекцій.

Раніше LL37 був успішно введений до середньопористих плівок на основі кремнію, з яких він поступово звільнявся [9], автори також показали антимікробну активність пептиду, що звільнювався. Натомість, така система є занадто громіздкою для використання в офтальмологічній практиці. Адже для того, щоб не викликати зниження гостроти зору хворого, розмір часток, що вводяться в очне яблуко (наприклад, ендовітреально), не повинен перевищувати 50 нм.

В цій роботі були протестовані ряд мікро- та наночасток, які б могли бути використані у якості носіїв ППП LL37. Пептид був успішно інкапсульований та постійно виділявся протягом 7–30 діб з АМЧ, АЖМЧ та КНЧ. LL37, що був інкапсульований у різні типи часток, не чинив токсичного впливу на клітини рогівкового епітелію людини. Найдовше виділення пептиду (до 30 доби) спостерігалось з КНЧ, крім того, розмір КНЧ (10–20 нм) є таким, що не буде перешкоджати зору хворого при введенні ендовітреально або інтракорнеально.

Створена система постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 на основі кремнієвих наночасток є перспективним напрямком в лікуванні очних інфекцій. Подальшими дослідженнями будуть вивчення протимікробної та противірусної активності LL37, що інкапсульований у КНЧ.

Література

1. **Bareiss B.** Controlled release of acyclovir through bioengineered corneal implants with silica nanoparticle carriers / B. Bareiss, M. Ghorbani, F. Li, [et al.] // *Open Tissue Eng. Regen. Med. J.* — 2010. — Vol. 3. — P. 10–17.
2. **Barlow P. G.** Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37 / P. G. Barlow, P. Svoboda, A. Mackellar, [et al.] // *PLoS ONE.* — 2011. — Vol. 6, № 10. — P. e25333.
3. **Bertino J. S. Jr.** Impact of antibiotic resistance in the management of ocular infections: the role of current and future antibiotics / J. S. Bertino Jr. // *Clin. Ophthalmol.* — 2009. — Vol. 3. — P. 507–521.
4. **Brogden K. A.** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / Brogden K. A. // *Nature Rev. Microbiol.* — 2005. — Vol. 3. — P. 238–250.
5. **Chetoni P.** Comparison of liposome-encapsulated acyclovir with acyclovir ointment: ocular pharmacokinetics in rabbits / P. Chetoni, S. Rossi, S. Buralassi, [et al.] // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* — 2004. — Vol. 20, № 2. — P. 169–177.

6. **Donadio S.** Antibiotic discovery in the twenty-first century: Current trends and future perspectives / S. Donadio, S. Maffioli, P. Monciardini, M. Sosio, D. Jabes // *J. Antibiot. (Tokyo)*. — 2010. — Vol. 63, № 8. — P. 423–430.
7. **Fresta M.** Ocular tolerability and in vivo bioavailability of poly(ethyleneglycol) (PEG)-coated polyethyl-2-cyanoacrylate nanosphere-encapsulated acyclovir / M. Fresta, G. Fontana, C. Bucolo, [et al.] // *J. Pharm. Sci.* — 2001. — Vol. 90, № 3. — P. 288–297.
8. **Gordon Y. J.** Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity / Y. J. Gordon, L. C. Huang, E. G. Romanowski, [et al.] // *Curr. Eye Res.* — 2005. — Vol. 30, № 5. — P. 385–394.
9. **Izquierdo-Barba I.** Incorporation of antimicrobial compounds in mesoporous silica film monolith / I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regn, N. Kupferschmidt, [et al.] // *Biomaterials*. — 2009. — Vol. 30, № 29. — P. 5729–5736.
10. **Newman H.** Viral ocular manifestations: a broad overview / H. Newman, C. Gooding // *Rev. Med. Virol.* — 2013. — Vol. 23, № 5. — P. 281–294.
11. **Ramos R.** LL37, a human antimicrobial peptide with immunomodulatory properties / R. Ramos, L. Domingues, M. Gama // *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances: Microbiology Book Series* [edit. A. Míndez-Vilas]. — Badajoz : Formatex Research Center, 2011. — Vol. 2. — P. 915–925.
12. **Steinstraesser L.** Inhibition of early steps in the lentiviral replication cycle by cathelicidin host defense peptides / L. Steinstraesser, B. Tippler, J. Mertens, [et al.] // *Retrovirology*. — 2005. — Vol. 2. — P. 2.

Поступила 23.01.2014

References

1. **Bareiss B, Ghorbani M, Li F, et al.** Controlled release of acyclovir through bioengineered corneal implants with silica nanoparticle carriers. *Open Tissue Eng. Regen. Med. J.* 2010;3:10–7.
2. **Barlow PG, Svoboda P, Mackellar A, et al.** Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *PLoS ONE.* 2011;6(10):e25333.
3. **Bertino JS Jr.** Impact of antibiotic resistance in the management of ocular infections: the role of current and future antibiotics. *Clin. Ophthalmol.* 2009;3:507–21.
4. **Brogden K. A.** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev. Microbiol.* 2005;3:238–50.
5. **Chetoni P, Rossi S, Burgalassi S et al.** Comparison of liposome-encapsulated acyclovir with acyclovir ointment: ocular pharmacokinetics in rabbits. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2004;20(2):169–77.
6. **Donadio S, Maffioli S, Monciardini P, Sosio M, Jabes D.** Antibiotic discovery in the twenty-first century: Current trends and future perspectives. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2010; 63(8):423–30.
7. **Fresta M, Fontana G, Bucolo C et al.** Ocular tolerability and in vivo bioavailability of poly (ethyleneglycol) (PEG)-coated polyethyl-2-cyanoacrylate nanosphere-encapsulated acyclovir. *J. Pharm. Sci.* 2001;90(3):288–97.
8. **Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG et al.** Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr. Eye Res.* 2005; 30(5):385–94.
9. **Izquierdo-Barba I, Vallet-Regn M, Kupferschmidt N, et al.** Incorporation of antimicrobial compounds in mesoporous silica film monolith. *Biomaterials.* 2009; 30(29):5729–36.
10. **Newman H, Gooding C.** Viral ocular manifestations: a broad overview. *Rev. Med. Virol.* 2013;23(5):281–94.
11. **Ramos R, Domingues L, Gama M.** LL37, a human antimicrobial peptide with immunomodulatory properties. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances: Microbiology Book Series* [edit. A. Míndez-Vilas]. Badajoz : Formatex Research Center. 2011;2:915–25.
12. **Steinstraesser L, Tippler B, Mertens J et al.** Inhibition of early steps in the lentiviral replication cycle by cathelicidin host defense peptides. *Retrovirology.* 2005;2:2.

Received 23.01.2014