

УДК 617.7:616–002.9–085

Система постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 — потенційний новітній метод лікування очних інфекцій. Повідомлення 2. Противірусна активність LL37, що інкапсульований у кремнієві наночастки

М. М. Іслам¹, М. Гриффіт¹, О. І. Бузник², канд. мед. наук,

¹ Університет м. Лінчюпінг (Швеція)

² ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України», Одеса (Україна)

E-mail: a_buznik@bk.ru

Джерело фінансування: робота частково профінансована грантом Шведського Інституту (Стокгольм, Швеція)

Цель. Изучить противирусную активность системы постоянной доставки (СПД) антиинфекционного пептида (АИП) LL37 на основе кремниевых наночастиц.

Материал и методы. АИП LL37 (кателицидин) был инкапсулирован в кремниевые наночастицы (КНЧ) под влиянием магнитного поля. Для оценки противирусной активности СПД культуру клеток роговичного эпителия человека (КРЭЧ) инфицировали вирусом простого герпеса I (ВПГ I), после этого к КРЭЧ добавляли КНЧ с инкапсулированным LL37, КНЧ без LL37 и свободный LL37 и культивировали дополнительные 24–72 ч. Среду для культивации забирали для оценки концентрации вируса методом подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ).

Результаты. LL37, инкапсулированный в КНЧ, приводит к значительному снижению концентрации ВПГ I по сравнению с контролем: количество КОЕ в среде для культивации, которая содержала LL37 в КНЧ, составило (91,2±49,7) КОЕ/мл через 24 ч культивации и (44333,3±8891,9) КОЕ/мл через 72 ч культивации. В то же время концентрация ВПГ I в среде для культивации без СПД АИП LL37 составила (6716,7±3489,6) КОЕ/мл та (327500±36159,4) КОЕ/мл через 24 ч и 72 ч культивации соответственно ($p = 0,024$).

Выводы. Впервые была доказана активность *in vitro* системы постоянной доставки антиинфекционного пептида LL37 на основе кремниевых наночастиц в отношении самой распространенной вирусной инфекции — вируса простого герпеса.

Ключові слова: очна інфекція, LL37, протиінфекційний пептид, система постійної доставки лікарських засобів, вірус простого герпесу.

Ключевые слова: глазная инфекция, LL37, противоиnфекционный пептид, система постоянной доставки лекарственных средств, вирус простого герпеса.

Anti-infective peptide LL37 sustained delivery system — a potential novel treatment method of ocular infections. Report 2. Anti-viral properties of silica nanoparticle encapsulated LL37

М. М. Islam¹, М. Griffith¹, О. Buznyk²

¹ Linkoping University, Linkoping (Sweden)

² The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine, Odessa (Ukraine)

Purpose. To test anti-viral activity of anti-infective peptide (AIP) LL37 sustained release system (SRS) based on silica nanoparticles.

Material and Methods. AIP LL37 (cathelicidin) was encapsulated in silica nanoparticles (SiNP) under magnetic stirring. For anti-viral activity testing, human corneal epithelial cell (HCEC) culture was infected by type I herpes simplex virus (HSV). SiNP encapsulated LL37 or empty SiNP or free LL37 were added to the infected HCEC after that and were co-cultured for additional 24–72 h. Culture medium was collected to count virus titer using plaque formation assay.

Results. SiNP encapsulated LL37 had significant anti-viral effect against HSV compared to control: virus titer in culture medium contained SiNP encapsulated LL37 was 91,2±49,7 plaque forming units (PFU) per ml. in 24 h culturing

Key words: eye infection, LL37, Antagonists peptide system of constant drug delivery, herpes simplex virus.

Вступ. Проблема резистентності інфекційних збудників до існуючих медикаментів є однією з найактуальніших в сучасній медицині, що призводить до активного пошуку альтернатив традиційним препаратам [7].

Перспективним напрямком в цій сфері є використання протиінфекційних пептидів, що мають протимікробні та противірусні властивості. Природні молекули імунної системи людини, такі як катіонні пептиди — дефенсіни та кателіцидини, вивчалися у якості альтернатив традиційним лікам [5]. Зокрема, в рогівці людини був знайдений кателіцидин LL37, який має потенційно широкий спектр активності проти ряду патогенних бактерій, вірусів та грибків [11].

Ще одним варіантом покращення ефективності лікування є використання нано- та мікрочасток, ліпосом та ін., в які можна інкапсулювати препарати, для подовження їхньої дії в осередку інфекції [18]. Попередні роботи показали, що використання мікро- та наночасткових носіїв (наприклад, поліетил-2-цианакрилатних наночасток, ліпосом та ін.) подовжувало час виділення препаратів та, відповідно, їхню дію на патогенну мікрофлору [6, 10].

Задачею нашого проекту була розробка системи постійного виділення (СПД) ППП LL37 для застосування в офтальмологічній практиці. В попередній роботі ми протестували різні мікро- та наночастки в якості носіїв LL37. Оптимальним носієм з найменшим розміром та найдовшим виділенням пептиду виявились кремнієві наночастки (КНЧ) [1].

Метою даної роботи було протестувати противірусну активність створеної системи постійної доставки ППП LL37 на основі КНЧ по відношенню до вірусу простого герпесу (ВПГ) типу I.

Матеріал і методи

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

Інкапсуляція LL37 у кремнієві наночастки. 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 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-NH₂) був синтезований «A⁺Peptide» (Китай).

Для виготовлення КНЧ використовували наступний протокол: 4 мл циклогексану змішували з 1 мл тритону

and 44333,3±8891,9 PFU/ml in 72 h culturing. At the same time, virus titer in culture medium without SRS of AIP LL37 was 6716,7±3489,6 PFU/ml and 327500±36159,4 PFU/ml in 24 h and 72 h culturing respectively ($P = 0,024$).

Conclusion. For the first time it was shown in vitro activity of anti-infective peptide LL37 sustained release system based on silica nanoparticles against the commonest ocular viral infection — herpes simplex virus.

X-100, 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.

Тестування активності LL37, інкапсульованого у кремнієві наночастки, по відношенню до вірусу простого герпесу типу I. Для того, щоб оцінити, чи може розроблена система постійної доставки ППП LL37 зупиняти розповсюдження ВПГ в тканинах, лінію іморталізованих клітин рогівкового епітелію людини (КРЕЛ) [3] культивували у середовищі KSFМ™, що містило L-глутамін, епідермальний фактор росту людини та бичачий екстракт гіпофізу (Life Technologies Europe BV, Швеція), у 24-чашечних тарілках до конфлуентності 90 %. Після цього клітини інфікували ВПГ типу I штамм F [8] в концентрації 1 одиниця вірусу, що утворює колонію (КУО), на 10 клітин (множинність зараження (англ. «MOI») = 0,1) протягом однієї години при 37°C. Після відмивання КРЕЛ від вірусу до них додавали свіже середовище KSFМ™ з 5 мг КНЧ, в які був інкапсульований LL37, та культивували протягом 72 год. Контролем слугували КРЕЛ, до яких після відмивання від ВПГ в середовище для культивування не додавали препаратів або КНЧ; КРЕЛ, до яких додавали КНЧ без пептиду; та КРЕЛ, до яких додавали вільний LL37 в концентрації 15 мкг/мл, які також культивували протягом 72 год. Середовище для культивування забирало через 24 та 72 год. для оцінки концентрації вірусу методом підрахунку КУО.

Метод підрахунку КУО: ряд розведень (10^{-1} – 10^{-6}) отриманих середовищ для культивування додавали до лінії клітин ниркового епітелію зелених африканських мавп (лінія клітин «Vero», «American Type Culture Collection», США) конфлуентністю 80 % та інкубували при 37°C протягом 1 год. Після видалення середовища для культивування до клітин додавали середовище DMEM (Life Technologies Europe BV, Швеція), що містило 5 % телячої сироватки та 1 % агарозу та культивували протягом 72 год. Після цього клітини фіксували 10 % формальдегідом, фарбували 0,5 % кристалічним фіолетовим та підраховували кількість сформованих плям (КУО).

Статистичний аналіз. Розраховували середню (M) та стандартне відхилення (\pm SD) по кожній групі спостережень. Різницю між дослідною групою (LL37, що інкапсульований у КНЧ) та контрольними групами (КРЕЛ без лікування, КРЕЛ з КНЧ без LL37 та КРЕЛ з вільним LL37) визначали за допомогою непараметричного тесту Mann-Whitney. Різниця вважалася значущою при $p < 0,05$. Всі розраховані рівні статистичної значимості (p) представлені з поправкою Bonferroni для множинних порівнянь.

Результати

Додавання до КРЕЛ, що були інфіковані ВПГ типу I, LL37, інкапсульованого у КНЧ, призводило до значного зниження концентрації ВПГ порівняно з контролем без лікування (рис. 1, 2): кількість КУО у середовищі для культивування, яке містило LL37 у КНЧ, склало (91,2±49,7) КУО/мл через 24 год. культивування та 44333,3±8891,9 КУО/мл через 72 год. культивування. В той же час концентрація ВПГ I в середовищі для культивування без СПД ПП LL37 склала (6716,7±3489,6) КУО/мл та (327500±36159,4) КУО/мл через 24 та 72 год. культивування відповідно (p=0,024). КНЧ без LL37 не мали власної противірусної активності.

Через 24 год. противірусний ефект LL37, інкапсульованого у КНЧ, був схожим з противірусним ефектом вільного пептиду: середній титр ВПГ був (91,2±49,7) КУО/мл в групі з інкапсульованим у КНЧ пептидом та (116,3±61,0) КУО/мл в групі з

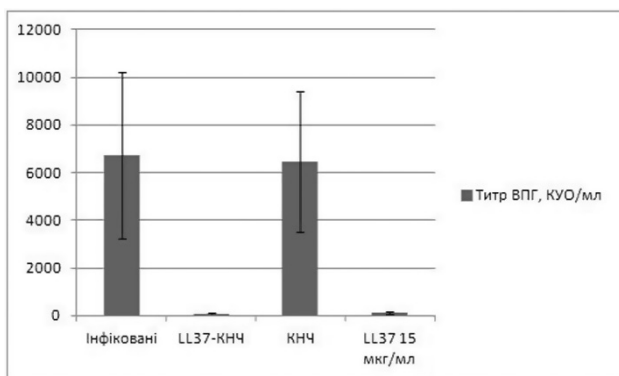


Рис. 1. Титр ВПГ типу I в основній (LL37-КНЧ) та контрольних групах через 24 год. культивування.

Примітки. Інфіковані — КРЕЛ, інфіковані ВПГ без лікування; LL37-КНЧ — КРЕЛ, інфіковані ВПГ, що культивувалися разом з LL37, інкапсульованим у КНЧ; КНЧ — КРЕЛ, інфіковані ВПГ, що культивувалися з КНЧ без LL37; LL37 15 мкг/мл — КРЕЛ, інфіковані ВПГ, що культивувалися з LL37 15 мкг/мл в концентрації 15 мкг/мл.

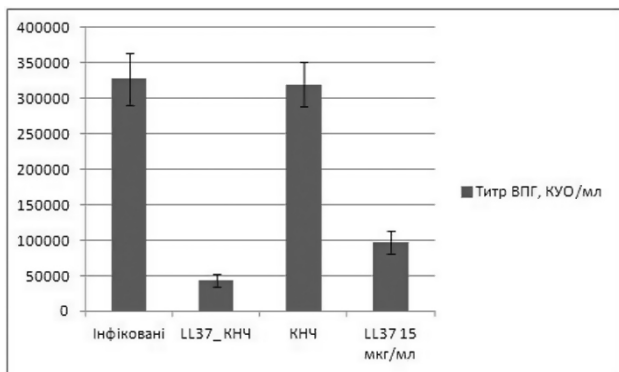


Рис. 2. Титр ВПГ типу I в основній (LL37-КНЧ) та контрольних групах через 72 год. культивування.

Примітки. Див. рис. 1.

вільним LL37 (p>0,05). Натомість, через 72 год. титр ВПГ в групі з інкапсульованим LL37 виявився більш ніж вдвічі меншим за титр вірусу в групі з вільним LL37 і склав (44333,3±8891,9) КУО/мл та (97666,7±16132,8) КУО/мл відповідно (p=0,024). Ці дані свідчать про те, що інкапсуляція пептиду сприяла подовженню його терапевтичної дії на ВПГ порівняно з вільним LL37.

Обговорення результатів

ВПГ типу I є найбільш розповсюдженою причиною захворювань рогівки, що у розвинених країнах призводять до інвалідності, внаслідок кератитів, які він викликає [2, 9]. Тому пошук альтернативних препаратів для лікування ВПГ є зараз вельми актуальним.

Однією з причин низької ефективності лікування також є швидке вимивання препаратів з поверхні очного яблука. Так одна капля сучасних препаратів в середньому містить 30 мкл речовини, після єдиного блимання на очній поверхні залишається тільки 10 мкл, в підсумку скрізь рогівку проходить лише 5 % від первинного об'єму препарату [15, 16, 17]

LL37 є поліфункціональним пептидом з багатьма біологічними властивостями, який має антимікробну та противірусну активність, в тому числі до ВПГ [4, 11, 14]. Раніше LL37 був введений до плівок на основі кремнію, з яких він поступово звільнявся, автори також показали антимікробну активність пептиду, що звільнювався [13]. Але така система постійного виділення (СПД) 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. Противірусна активність СПД з LL37 раніше не вивчалася.

Нами була розроблена СПД пептиду LL37 на основі КНЧ. КНЧ мали розмір 10–20 нм, пептид поступово виділявся з них протягом 30 діб [1]. В цій роботі вперше була доведена противірусна активність створеної СПД ПП LL37 по відношенню до найбільш поширеної інфекції рогівки — ВПГ типу I. Ця система може бути використана для лікування герпетичного кератиту самостійно, наприклад, у вигляді субкон'юнктивальних ін'єкцій для створення депо пептиду. Крім того, перспективним є введення такої системи у штучну рогівку на основі колагену [12] в процесі її синтезу для отримання рогівки з подвійною функцією — заміника строми рогівки при кератопластиці та одночасного джерела противірусного препарату.

Створена система постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 на основі кремнієвих наночасток є перспективним напрямком в лікуванні очних інфекцій. Доведена її активність in vitro по відношенню до вірусу простого герпесу. Подальшими дослідженнями буде вивчено протимікробна активність LL37, що інкапсульований у КНЧ.

Література

1. **Бузник О. І.** 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 // *Офтальмол. журн.* — 2014 (у друку).
2. **Гайдамака Т. Б.** Рецидивуючий герпетичний кератит. Патогенез, діагностика, лікування, профілактика : автореф. дис. на здобуття наук. ступ. докт. мед. наук : спец. 14.01.18 «Офтальмологія» / Тетяна Борисівна Гайдамака ; ДУ «Ін-т очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України». — Одеса, 2011. — 44 с. : табл. — Бібліогр.
3. **Araki-Sasaki K.** An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization / K. Araki-Sasaki, Y. Ohashi, T. Sasabe, [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1995. — Vol. 36. — P. 614–621.
4. **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.
5. **Brogden K. A.** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / Brogden K. A. // *Nature Rev. Microbiol.* — 2005. — Vol. 3. — P. 238–250.
6. **Chetoni P.** Comparison of liposome-encapsulated acyclovir with acyclovir ointment: ocular pharmacokinetics in rabbits / P. Chetoni, S. Rossi, S. Burgalassi, [et al.] // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* — 2004. — Vol. 20, № 2. — P. 169–177.
7. **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.
8. **Ejercito P. M.** Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells / P. M. Ejercito, E. D. Kieff, B. Roizman // *J. Gen. Virol.* — 1968. — Vol. 2. — P. 357–364.
9. **Farooq A.** The role of herpes viruses in ocular infections / A. Farooq, A. Shah, D. Shukla // *Virus Adaptation and Treatment.* — 2010. — Vol. 2. — P. 115–123.
10. **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.
11. **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.
12. **Griffith M.** Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function / M. Griffith, N. Polissetti, L. Kuffova, [et al.] // *Ocul. Surf.* — 2012. — Vol. 10 (№ 3). — P. 170–183.
13. **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.
14. **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. Mündez-Vilas].* — Badajoz : Formatex Research Center, 2011. — Vol. 2. — P. 915–925.
15. **Robinson J. R.** Ocular drug delivery: mechanisms of corneal drug transport & mucoadhesive delivery systems / J. R. Robinson // *S. T. P. Pharma.* — 1989. — Vol. 12. — P. 839–846.
16. **Saettone M. F.** Polymer effects on ocular bioavailability, II: the influence of benzalkonium chloride on the mydriatic response of tropicamide in different polymeric vehicles / M. F. Saettone, B. Giannaccini, A. Guiducci, [et al.] // *Int. J. Pharm.* — 1985. — Vol. 25. — P. 73–84.
17. **Shell J. W.** Ocular drug delivery systems — a review / J. W. Shell // *Cutaneous and Ocular Toxicol.* — 1982. — Vol. 1. — P. 49–63.
18. **Zarbin M. A.** Nanotechnology in ophthalmology / M. A. Zarbin, C. Montemagno, J. F. Leary, R. Ritch // *Can. J. Ophthalmol.* — 2010. — Vol. 45. — P. 457–476.

Поступила 14.02.2014

References

1. **Buznik OI.** Anti-infective peptide LL37 sustained delivery system — a potential novel treatment method of ocular infections. Report 2. *Oftalmol Zh.* 2014. In printing. Ukrainian.
2. **Gaidamaka TB.** Recurrent herpetic keratitis. Pathogenesis, diagnosis, treatment, prevention: Author's thesis for Doctor of Med. Sciences: 14.01.18 Ophthalmology. SI «The Filatove Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy». Odessa, 2011. 44 p.
3. **Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al.** An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995;36:614–21.
4. **Barlow PG, Svoboda P, Mackellar A et al.** Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *ONE.* 2011;6(10):e25333.
5. **Brogden K. A.** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev. Microbiol.* 2005;3:238–50.
6. **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.
7. **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.
8. **Ejercito PM, Kieff ED, Roizman B.** Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J. Gen. Virol.* 1968;2:357–64.
9. **Farooq A, Shah A, Shukla D.** The role of herpes viruses in ocular infections. *Virus Adaptation and Treatment.* 2010;2:115–23.

10. **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.
11. **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.
12. **Griffith M, Poliseti N, Kuffova L** et al. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function. *Ocul. Surf.* 2012;10(3):170–83.
13. **Izquierdo-Barba I, Vallet-Regu M, Kupferschmidt N** et al. Incorporation of antimicrobial compounds in mesoporous silica film monolith. *Biomaterials.* 2009;30(29):5729–36.
14. **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. Mñdez-Vilas]. Badajoz: Formatex Research Center, 2011;2:915–25.
15. **Robinson JR.** Ocular drug delivery: mechanisms of corneal drug transport & mucoadhesive delivery systems. *S. T. P. Pharma.* 1989;12:839–46.
16. **Saettone MF, Giannaccini B, Guiducci A** et al. Polymer effects on ocular bioavailability, II: the influence of benzalkonium chloride on the mydriatic response of tropicamide in different polymeric vehicles. *Int. J. Pharm.* 1985;25:73–84.
17. **Shell JW.** Ocular drug delivery systems — a review. *Cutaneous and Ocular Toxicol.* 1982;1:49–63.
18. **Zarbin MA, Montemagno C, Leary JF, Ritch R.** Nanotechnology in ophthalmology. *Can. J. Ophthalmol.* 2010;45:457–76.

Received 14.02.2014