

УДК 617.7:616–002.9–085

Система постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 — потенційний новітній метод лікування очних інфекцій. Повідомлення 3. Протимікробна активність LL37, що інкапсульований у кремнієві наночастки

О. І. Бузник¹, канд. мед. наук; Н. В. Пасечнікова¹, член-кор. НАМН України, д-р мед. наук; С. А. Якименко¹, д-р мед. наук, проф.; А. Л. Молода¹, зав. сан.-епід відділом; М. М. Іслам, аспірант²; М. Гріффіт, зав. центром²

¹ ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»; Одеса (Україна)

² Центр інтегративної регенеративної медицини, відділ клінічної та експериментальної медицини, Лінчопінгський університет; Лінчопінг (Швеція)

E-mail: a_buznik@bk.ru

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

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

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

Материал и методы. АИП LL37 (кателицидин) был инкапсулирован в КНЧ под влиянием магнитного поля. Для оценки антимикробной активности СПД штаммы *St. aureus* и *P. aeruginosa* в концентрации 1×10^5 колониеобразующих единиц на 1 мл (КОЕ/мл) культивировали в течение 2 ч на питательном бульоне вместе с СПД LL37. Контролем служили штаммы бактерий той же концентрации, которые культивировались без СПД LL37, со свободным LL37 или вместе с КНЧ без LL37. Среду для культивации забирали для оценки концентрации бактерий методом подсчета КОЕ.

Результаты. LL37, инкапсулированный в КНЧ, приводит к значительному снижению концентрации *St. aureus* и *P. aeruginosa*: концентрация *St. aureus* в среде для культивации, которая содержала LL37 в КНЧ, была $3466,7 \pm 450,9$ КОЕ/мл, концентрация *St. aureus* без СПД LL37 была 410000 ± 168226 КОЕ/мл ($P = 0,012$); концентрация *P. aeruginosa* в присутствии СПД LL37 была $3,1 \times 10^7 \pm 1,85 \times 10^7$ КОЕ/мл, в контроле без лечения — $4,67 \times 10^{11} \pm 2,08 \times 10^{11}$ КОЕ/мл ($P = 0,012$).

Вывод. Впервые доказана активность *in vitro* системы постоянной доставки антиинфекционного пептида LL37 на основе кремниевых наночастиц в отношении грам-положительных и грам-отрицательных бактерий — *St. aureus* и *P. aeruginosa*.

The sustained delivery system of the antiinfection peptide LL37 — a potential new method of treatment of ocular infections. Report 3. Antimicrobial activity of LL37 encapsulated in silica nanoparticle

A. Buznyk¹, N. Pasychnikova¹, S. Yakymenko¹, A. Moloda¹, M. M. Islam², M. Griffith²

¹ State Institution The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine, Odessa, (Ukraine)

² Linköping University; Linköping (Sweden)

Purpose. To test anti-microbial activity of the anti-infection peptide (AIP) LL37 sustained delivery system (SDS) based on silica nanoparticles (SiNP).

Materials and Methods. AIP LL37 (cathelicidin) was encapsulated in SiNP under magnetic stirring. For anti-microbial activity testing, *St. aureus* and *P. aeruginosa* strains in the concentration 10^5 PFU/ml were co-cultured for 2 hours in nutrient broth together with LL37 SDS. Bacterium strains of the same concentrations cultured without LL37 SDS, with free LL37 or with empty SiNP served as controls. Culture medium was collected to count bacteria titer using plaque formation assay.

Results. SiNP encapsulated LL37 had significant anti-microbial effect compared with controls: *St. aureus* titer in the culture medium contained SiNP encapsulated LL37 was 3466.7 ± 450.9 PFU/ml, *St. aureus* titer in culture medium without

*SDS of LL37 was 410000 ± 168226 PFU/ml ($P = 0.012$); *P. aeruginosa* titer in presence of SiNP encapsulated LL37 was $3.1 \times 10^7 \pm 1.85 \times 10^7$ PFU/ml, its titer was $4.67 \times 10^7 \pm 2.08 \times 10^7$ PFU/ml in the culture medium without SDS of LL37 ($P = 0.012$).*

Key words: eye infection, anti-infective peptide system of constant drug delivery

Conclusion. For the first time there was shown in vitro the activity of anti-infective peptide LL37 sustained delivery system based on silica nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria — *St. aureus* and *P. aeruginosa*.

Вступ. Проблема резистентності інфекційних збудників до існуючих медикаментів є однією з найактуальніших в сучасній медицині, що призводить до активного пошуку альтернатив традиційним препаратам [8].

Перспективним напрямком в цій сфері є використання протиінфекційних пептидів (ПП), що мають протимікробні та противірусні властивості. Природні молекули імунної системи людини, такі як катіонні пептиди — дефенсіни та кателіцидини, вивчалися у якості альтернатив традиційним лікам [6]. Зокрема, в рогівці та кон'юнктиві людини був знайдений кателіцидин LL37, який має широкий спектр активності проти патогенних бактерій, вірусів та грибків [10].

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 [4]. Попередні роботи показали, що використання мікро- та наночасткових носіїв (наприклад, поліетил-2-цианакрілатних наночасток, ліпосом та ін.) подовжувало час виділення препаратів та, відповідно, їхню дію на патогенну мікрофлору [7, 9].

Задачею нашого проекту була розробка системи постійного виділення ПП LL37 для застосування в офтальмологічній практиці. В попередніх роботах ми протестували різні мікро- та наночастки в якості носіїв LL37, а також випробували розроблену систему постійної доставки (СПД) по відношенню до найбільш поширеної очної вірусної інфекції — вірусу простого герпесу [1, 2].

Метою даної роботи було вивчити протимікробну активність створеної системи постійної доставки ПП LL37 на основі кремнієвих наночасток (КНЧ) по відношенню до поширених грам-позитивних та грам-негативних збудників очних інфекцій — *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*.

Матеріал і методи

Робота з інкапсуляції LL37 в КНЧ виконана в лабораторії клітинної біології відділу експериментальної та клінічної медицини Університету м. Лінчюпінг (Швеція), тестування протимікробної активності проведено в групі мікробіології санітарно-епідеміологічного відділу Інституту ім. В. П. Філатова.

Інкапсуляція LL37 у кремнієві наночастки. Матеріали: тетраетилортосилікат (ТЕОС), Тритон X-100, оцтова кислота, альбінат натрію, желатин, женепін, хлорид кальцію,

хітозан, триполіфосфат — «Sigma-Aldrich Canada Co.» (Канада), циклогексан — «Acros organics» (США). ПП LL37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-NH2) був синтезований «A⁺Peptide» (Китай).

Для виготовлення КНЧ використовували протокол, що детально був описаний в попередній статті [1].

Тестування активності LL37, інкапсульованого у кремнієві наночастки, по відношенню до *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. *St. aureus* штамм ATCC 29223 F-49 та *P. aeruginosa* штамм 415 культивували 5 год. на м'ясопептонному поживному агарі з додаванням 5 % телячої крові (КА) до середньо-логарифмічної фази (середина фази ділення). Після цього їх суспендували у 0,9 % розчині натрію хлориду, доводили концентрацію бактерій до 10^5 одиниць, що утворюють колонії, на 1 мл (КУО/мл). Потім 1 мл бактерій (10^5 КУО) інкубували протягом 2 год. при 37°C разом з ПП LL37, що був інкапсульований у КНЧ (10 мг), у поживному бульйоні з pH 7,4 з додаванням 1 % розчину глюкози. В якості контролю використовувалась бактеріальна суспензія тієї ж концентрації, що інкубувалась в ідентичних умовах без LL37, інкапсульованого у КНЧ, або разом з КНЧ без пептиду, або з вільним LL37 в концентрації 15 мкг/мл. Для кількісної оцінки протимікробної активності серійні розведення інкубованих розчинів (10^{-1} – 10^{-11}) висівали на 5 % КА та інкубували при 37°C протягом 24 год. Після цього проводили візуальний підрахунок кількості колоній тест-штамів у досліді та контролі.

Статистичний аналіз. Розраховували середню (М) та стандартне відхилення ($\pm SD$) по кожній групі спостережень. Різницю між дослідною групою (бактерії з LL37, що інкапсульований у КНЧ) та контрольними групами (бактерії без пептиду у КНЧ, бактерії з КНЧ без LL37 та бактерії з вільним LL37 в концентрації 15 мкг/мл) 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

LL37, що інкапсульований у КНЧ, призводить до значного зниження концентрації *St. aureus* (рис. 1): концентрація *St. aureus* у середовищі для культивування, яке містило LL37 у КНЧ, складало ($3466,7 \pm 450,9$) КУО/мл, концентрація *St. aureus* без СПД LL37 складала (410000 ± 168226) КУО/мл та ($400000 \pm 264575,1$) КУО/мл в присутності КНЧ без LL37 ($p = 0,012$). Також добрий протимікробний ефект створена СПД ПП LL37 показала по відношенню до грам-негативного мікроорганізму — *P. aeruginosa* (рис. 2): концентрація тест-штаму в присутності СПД LL37 складала ($3,1 \times 10^7 \pm 1,85 \times 10^7$) КУО/мл, в контролі без лікування — ($4,67 \times 10^{11} \pm 2,08 \times 10^{11}$) КУО/мл, в контр-

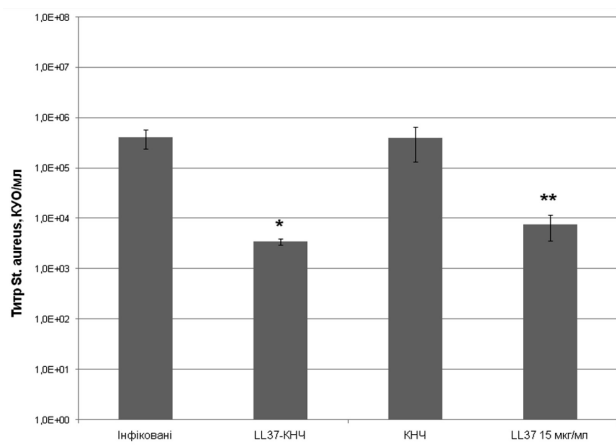


Рис. 1. Титр *Staphylococcus aureus* в основній (LL37-КНЧ) та контрольних групах через 24 год. інкубації.

Примітки. Інфіковані — *St. aureus* без лікування; LL37-КНЧ — *St. aureus*, що інкубувався разом з LL37, інкапсульованим у КНЧ; КНЧ — *St. aureus*, що інкубувався разом з КНЧ без пептиду; LL37 15 мкг/мл — бактерії, що інкубувалися з LL37 в концентрації 15 мкг/мл; * — значима різниця порівняно з *St. aureus* без лікування; ** — значима різниця порівняно з LL37-КНЧ.

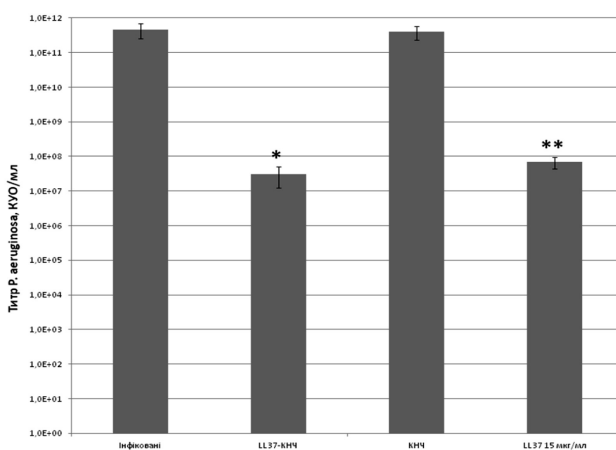


Рис. 2. Титр *Pseudomonas aeruginosa* в основній (LL37-КНЧ) та контрольних групах через 24 год. інкубації.

Примітки. Інфіковані — *P. aeruginosa* без лікування; LL37-КНЧ — *P. aeruginosa*, що інкубувався разом з LL37, інкапсульованим у КНЧ; КНЧ — *P. aeruginosa*, що інкубувався разом з КНЧ без пептиду; LL37 15 мкг/мл — бактерії, що інкубувалися з LL37 в концентрації 15 мкг/мл; * — значима різниця порівняно з *P. aeruginosa* без лікування; ** — значима різниця порівняно з LL37-КНЧ.

олі з КНЧ без LL37 — $(4,0 \times 10^{11} \pm 1,63 \times 10^{11})$ КУО/мл ($p = 0,012$).

КНЧ без пептиду не мали протимікробного ефекту. Подовжене виділення LL37 за рахунок його інкапсуляції у наночастки також призводило до незначного зменшення титру обох бактерій порівняно з вільним пептидом у концентрації 15 мкг/мл ($p = 0,012$).

Обговорення результатів

Бактеріальні інфекції очного яблука (кератити, ендодальміти та ін.) можуть призводити до серйозних ускладнень, аж до втрати органа зору. Протимікробні препарати (антибіотики) є основою лікування таких інфекцій. Як правило, їх застосовують у вигляді інстиляцій на поверхню ока, а також у вигляді субкон'юнктивальних, парабульбарних та ендовітреальних ін'єкцій. Однак широке застосування системних протимікробних препаратів призвело до всесвітнього збільшення резистентності серед Грам-позитивних та Грам-негативних бактерій до ряду старих антибіотиків, а також до деяких новітніх фторхінолонів, що використовують для лікування очних інфекцій [5]. З метою зниження токсичності протимікробних препаратів та зменшення кількості ін'єкцій розробляються різні СПД [4, 14].

LL37 є поліфункціональним пептидом з багатьма біологічними властивостями, який має протимікробну та протівірусну активність [3, 10, 13]. Раніше LL37 був введений до плівок на основі кремнію, з яких він поступово звільнявся, автори також показали протимікробну активність пептиду, що звільнювався [12]. Але така 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.

Нами була розроблена СПД пептиду LL37 на основі КНЧ. КНЧ мали розмір 10–20 нм, пептид поступово виділявся з них протягом 30 діб [1]. Раніше ми показали, що LL37 після інкапсуляції у КНЧ не втрачає своєї активності по відношенню до вірусу простого герпесу [2]. В цій роботі вперше було доведено, що СПД ПІП LL37 на основі КНЧ також має і протимікробну активність *in vitro* по відношенню до поширених Грам-позитивних та Грам-негативних інфекцій.

Ця система може бути апробована як для лікування інфекцій заднього відрізка ока у вигляді ендовітреальних ін'єкцій, так і для лікування кератоектів, наприклад, у вигляді субкон'юнктивальних ін'єкцій для створення депо пептиду. Крім того, перспективним є введення такої системи у штучну рогівку на основі колагену [11] в процесі її синтезу для отримання рогівки з подвійною функцією — замінника строми рогівки при кератопластиці та одночасного джерела протівірусного 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 бактерій — *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. В подальшому плануються дослідження по створенню колагенових замінників рогівки, що міститимуть СПД LL37, та вивчення її активності по відношенню до бактерій та вірусів.

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. — № 2. — С. 17–21.
2. Іслам М. М. Система постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 — потенційний новітній метод лікування очних інфекцій. Повідомлення 2. Протівірусна активність LL37, що інкапсульований у кремнієві наночастки / М. М. Іслам, М. Гріффіт, О. І. Бузник // Офтальмол. журн. — 2014. — № 3. — С. 53–57.
3. 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.
4. Balmayor E. R. Controlled delivery systems: from pharmaceuticals to cells and genes / E. R. Balmayor, H. S. Azevedo, R. L. Reis // Pharm. Res. — 2011. — Vol. 28. — P.1241–1258.
5. 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.
6. Brogden K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / Brogden K. A. // Nature Rev. Microbiol. — 2005. — Vol. 3. — P. 238–250.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Griffith M. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function / M. Griffith, N. Polisetti, L. Kuffova, [et al.] // Ocul. Surf. — 2012. — Vol. 10 (№ 3). — P. 170–183.
12. 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.
13. 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.
14. Wang T. A Preliminary Study to Treat Severe Endophthalmitis via a Foldable Capsular Vitreous Body with Sustained Levofloxacin Release in Rabbits / T. Wang, X. Huang, Q. Gao, [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2013. — Vol. 54. — P. 804–812.

Поступила 19.06.2014

References

1. Buznyk O. 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. Oftalmol Zh. 2014;2:17–21. Ukrainian.
2. Islam MM, Griffith M, Buznyk O. 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. Oftalmol Zh. 2014;3:53–7. Ukrainian.
3. 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.
4. Balmayor ER, Azevedo HS, Reis RL. Controlled delivery systems: from pharmaceuticals to cells and genes. Pharm. Res. 2011;28:1241–58.
5. 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.
6. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Rev. Microbiol. 2005;3:238–50.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Griffith M, Polisetti N, Kuffova L et al. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function. Ocul. Surf. 2012;10 (3):170–83.
12. 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.

13. **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. Mñndez-Vilas]. Badajoz : Formatex Research Center. 2011; 2: 915–25.
14. **Wang T, Huang X, Gao Q** et al. A Preliminary Study to Treat Severe Endophthalmitis via a Foldable Capsular Vitreous Body with Sustained Levofloxacin Release in Rabbits. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013;54:804–12.

Received 19.06.2014