

УДК 617.713–089.843:547.962.9:544.641

Антивірусні властивості колагенового еквіваленту рогівки з впровадженою системою постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37

О. І. Бузник, зав. відділенням відновлювально-реконструктивної мікрохірургії опіків ока, к.мед.н.¹; Ч.-Ж. Лі, інженер-дослідник, Ph.D.², М. М. Іслам, аспірант³; Н. В. Пасечнікова, директор Інституту, чл.-кор. НАМН України¹; М. Гріффіт, зав. центром, Ph.D.²

¹ ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім.

В. П. Філатова НАМН України», м. Одеса, Україна

² Центр інтегративної регенеративної медицини, відділ клінічної та експериментальної медицини, Лінчюпінгський університет, м. Лінчюпінг, Швеція

³ Каролінський інститут, м. Стокгольм, Швеція

E-mail: a_buznik@bk.ru

Ключові слова: штучна рогівка, система постійної доставки, протиінфекційний пептид LL37, вірус простого герпесу

Ключевые слова: искусственная роговица, система постоянной доставки, противoinфекционный пептид LL37, вирус простого герпеса

Вступ. У зв'язку з недостатньою ефективністю існуючих протиінфекційних препаратів в лікуванні очних інфекцій [6], а також невисокою ефективністю пересадки рогівки при інфекційних кератитах та їх наслідках [13, 15], пошук альтернативних методів лікування інфекційних захворювань рогівки є вельми актуальним.

Серед альтернатив протиінфекційним препаратам був добре вивчений пептид LL37, який має широкий спектр противірусної та антибактеріальної активності, що зберігалася і в разі введення цього пептиду у різні системи постійної доставки лікарських засобів [3, 4, 9, 11].

Досягнення тканинної інженерії останніх років дозволили синтезувати на основі колагену заміники рогівки людини, які мають оптичні, хімічні та механічні властивості, що наближаються до людської рогівки [10]. Експериментальні та клінічні дослідження продемонстрували добру біосумісність колагенових імплантів, що не вимагала імуносупресії [8, 12, 14].

Цель. Оценить антивирусные свойства коллагенового эквивалента роговицы (КЭР) с системой постоянной доставки (СПД) антиинфекционного пептида (АИП) LL37 *in vitro*.

Материалы и методы. АИП LL37 был инкапсулирован в кремниевые наночастицы (КНЧ) под действием магнитного поля. КНЧ с LL37 внедрялись в КЭР во время его изготовления путем создания взаимопроникающих сетей из коллагена I типа и фосфорилхолина. Антивирусные свойства композитного КЭР оценивали в отношении вируса простого герпеса I типа (ВПГ) методом подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ).

Результаты. При добавлении КЭР с СПД LL37 к культуре клеток роговичного эпителия человека (КРЭЧ), инфицированными ВПГ, концентрация вируса составила <50 КОЕ/мл через 24 ч и 39333,3±9291,6 КОЕ/мл через 72 ч культивации. Концентрация ВПГ в среде для культивации КРЭЧ без лечения составила 2800±1928,7 КОЕ/мл и 221666,7±36855,6 КОЕ/мл через 24 ч и 72 ч культивации соответственно ($p_{24ч} = 0,039$, $p_{72ч} = 0,063$). В случае добавления ВПГ к КРЭЧ, предварительно культивированными с композитным КЭР, концентрация вируса составила 666,7±381,9 КОЕ/мл через 24 ч и 2133,3±321,4 КОЕ/мл через 72 ч. В контроле без лечения концентрация ВПГ была $5 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$ КОЕ/мл через 24 ч и $19,3 \times 10^6 \pm 4,3 \times 10^6$ КОЕ/мл через 72 ч ($p_{24ч} = 0,032$, $p_{72ч} = 0,027$).

Выводы. При блокировании распространения ВПГ в КРЭЧ *in vitro* КЭР с СПД LL37 хорошо останавливал развитие инфекции в течение 24 ч культивации. В случае использования КЭР для профилактики возникновения инфекции его действие было эффективным и через 24, и через 72 ч культивации.

Нами раніше був синтезований колагеновий еквівалент рогівки (КЕР) людини з системою постійної доставки (СПД) протиінфекційного пептиду (ППП) LL37 на основі кремнієвих наночасток [2]. Такий композитний імплант зберігав задовільні механічні та оптичні властивості, а поступове вивільнення пептиду з нього відбувалося протягом трьох тижнів.

Метою цієї роботи було вивчення противірусних властивостей КЕР з впровадженою СПД ППП LL37 по відношенню до вірусу простого герпесу першого типу (ВПГ) *in vitro*.

Матеріал і методи

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

Виготовлення системи постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37. СПД ППП LL37 була створена

шляхом інкапсуляції LL37 у кремнієві наночастки (КНЧ) під впливом магнітного поля. Детальний протокол виготовлення цієї СПД був описаний раніше [1].

Виготовлення колагенового еквіваленту рогівки з або без системи постійної доставки LL37 / вільним LL37. КЕР виготовляли шляхом створення мереж з свинячого ателоколагену I типу (Nippon Meat Packers, Inc., Японія) та 2-метакрилолоксетилфосфорілхоліну — МФХ (Paramount Fine Chemicals Co. Ltd, Китай), що взаємно проникають [12]. Коротко, 500 мг 14 % (вага/вага) розчину свинячого ателоколагену I типу змішували з 150 мкл 0,625 М буферу MES (Sigma Aldrich, Канада) у змішувальній системі з двох шприців. Потім у змішувальну систему додавали 200 мкл розчину МФХ в 0,625 М MES буфері. Співвідношення МФХ до колагену (вага/вага) було 1:2. Потім додавали полі (етилен гліколь)діакрилат — ПЕГДА (Sigma Aldrich). Співвідношення ПЕГДА : МФХ (вага/вага) дорівнювало 1:3. У випадку створення композитного імпланту на цьому етапі в розчин додавали КНЧ з LL37 або вільний LL37. Для цього в змішувальну систему вводили 300 мкл розчину вільного ПП LL37 в концентрації 500 мкг/мл або 300 мкл розчину КНЧ з інкапсульованим пептидом в концентрації 7 мг/мл. Після цього у змішувальну систему вводили розраховані об'єми 4 % розчину (вага/об'єм) персульфату амонію — ПСА (Sigma Aldrich) в MES буфері та 2 % розчину (вага/об'єм) N,N,N,N-тетраметилетилендіаміну — ТЕМЕД (Sigma Aldrich) в MES буфері. Співвідношення ПСА : МФХ (вага/вага) = 0,03:1, ПСА : ТЕМЕД = 1:0,77. Після ретельного перемішування додавали розраховані об'єми 10 % (вага/об'єм) розчину N-гідроксисукциніміду — НГС (Sigma Aldrich) в MES буфері та 5 % (вага/об'єм) розчину N-(3-діметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіміду — ЕКІ (Sigma Aldrich) в MES буфері. Усі реагенти ретельно перемішували при 0°C. Молярні співвідношення ЕКІ : колаген-NH₂ = 0,7:1, ЕКІ : НГС = 2:1. Отриманий розчин одразу розподіляли на скляні платівки. На платівку з розчином накладали другу платівку з прокладками по краях висотою 500 мкм. Гідрогелі розміщували у камері із 100 % вологістю в присутності азоту на 16 год. при кімнатній температурі. Після відділення від платівок гідрогелі відмивали та зберігали у 10 mM розчині фосфатного буферу при +4°C.

Оцінка протівірусних властивостей колагенового еквіваленту рогівки з впровадженою системою постійної доставки пептиду LL37. Оцінка здатності КЕР з СПД LL37 зупиняти розвиток інфекції. В першій частині експерименту лінію іморталізованих клітин рогівкового епітелію людини (КРЕЛ) [5] культивували у середовищі KFSM™, 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 [7] в концентрації 1 одиниця вірусу, що утворює колонію (КУО), на 20 клітин (множинність зараження (англ. «МОІ») = 0,05) протягом однієї години при 37° С. Після відмивання КРЕЛ від вірусу до них додавали свіже середовище KFSM™ та синтезований композитний імплант, що містив інкапсульований в КНЧ LL37, та культивували протягом 72 год. Контролем слугували інфіковані КРЕЛ без лікування та КРЕЛ, до яких додавали чистий КЕР або КЕР з вільним LL37, які також культивували протягом 72 год. Середовище для культивації забирали через 24 та 72 год. для оцінки концентрації вірусу методом підрахунку КУО.

Оцінка здатності КЕР з СПД LL37 запобігати розвитку інфекції. В другій частині експерименту ВПГ в концен-

трації (МОІ) = 0,1 додавали до КРЕЛ через 24 години після того, як вони культивувалися разом з КЕР, що містив СПД LL37 або з контрольними імплантатами, що зазначені вище. Після інкубації з ВПГ типу I протягом 1 години при 37°С клітини відмивали та продовжували культивувати у середовищі KFSM™ разом з КЕР з СПД LL37 протягом 48 год. Середовище для культивації забирали для оцінки концентрації вірусу методом підрахунку КУО.

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

Статистичний аналіз. Різницю між дослідною групою (КЕР з СПД пептиду LL37) та контрольними групами (чистий КЕР, КЕР з вільним LL37 та КРЕЛ, інфіковані вірусом, без лікування) визначали за допомогою непараметричного тесту Kruskal-Wallis. В кожній групі було по 4 зразки. Різниця вважалася значущою при p<0,05.

Результати

Оцінка здатності колагенового еквіваленту рогівки з впровадженою системою постійної доставки пептиду LL37 зупиняти розвиток інфекції

КЕР з впровадженою СПД LL37 мали добру протівірусну активність через 24 години після інфікування в порівнянні з контролем — інфікованими клітинами без лікування та з клітинами, що культивувалися разом з КЕР, який містив вільний КЕР. Концентрація ВПГ в інфікованих КРЕЛ без лікування склала (2800±1928,7) КУО/мл, при наявності КЕР з вільним LL37 концентрація вірусу знижувалася до (1167,7±763,7) КУО/мл, а при наявності КЕР з пептидом LL37, що був інкапсульований у кремнієві наночастки, концентрація ВПГ була нижчою від 50 КУО/мл (p=0,039) — рис. 1А. Через 72 години після інфікування протівірусна активність композитних імплантів була помірною, однак різниця з контрольними групами все одно залишалася помітною, хоч вже не була статистично значущою — p = 0,063. В інфікованих КРЕЛ без лікування концентрація ВПГ склала (221666,7±36855,6) КУО/мл, при наявності КЕР з вільним LL37 концентрація вірусу майже не знижувалася і дорівнювала (206666,7±30550,5) КУО/мл, при КЕР з СПД LL37 концентрація ВПГ склала (39333,3±9291,6) КУО/мл. Чисті КЕР не мали власної протівірусної активності (рис. 1Б).

Оцінка здатності колагенового еквіваленту рогівки з впровадженою системою постійної доставки пептиду LL37 попереджати розвиток інфекції

У разі додавання КЕР, що містив СПД LL37, до КРЕЛ за 24 години перед їхнім інфікуванням

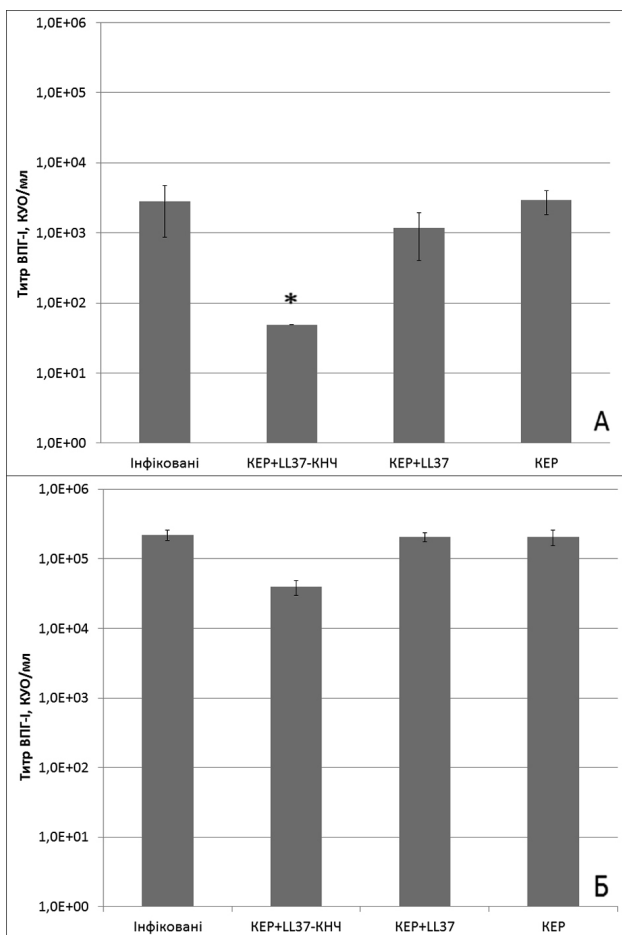


Рис. 1. Оцінка здатності колагенового еквіваленту рогівки з впровадженою системою постійної доставки пептиду LL37 зупиняти розвиток інфекції *in vitro* — титр ВПГ типу I в основній (KER + LL37-КНЧ) та контрольних групах через 24 год. культивування (А) та через 72 год. культивування (Б).

Примітки. Інфіковані — клітини рогівкового епітелію людини, інфіковані вірусом простого герпесу I без лікування; KER + LL37-КНЧ — клітини рогівкового епітелію людини, інфіковані вірусом простого герпесу I, що культивувалися разом з колагеновим еквівалентом рогівки, що містив LL37, інкапсульованим у кремнієві наночастки; KER+LL37 — клітини рогівкового епітелію людини, інфіковані вірусом простого герпесу I, що культивувалися разом з колагеновим еквівалентом рогівки, в який був введений вільний LL37; KER — колагеновий еквівалент рогівки без додавання пептиду та наночасток. * — $p < 0,05$ порівняно з контрольними групами.

ВПГ захисна дія LL37 була виражена і через 24, і через 72 години після початку інфекції в порівнянні з KER, що містив вільний пептид, а також в порівнянні з інфікованими клітинами без лікування. В контролі без лікування концентрація ВПГ дорівнювала ($5 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$) КУО/мл через 24 години та ($19,3 \times 10^6 \pm 4,3 \times 10^6$) КУО/мл через 72 години після інфікування. В контролі з KER, що містив вільний пептид, концентрація вірусу через 24 години склала ($3,1 \times 10^5 \pm 0,8 \times 10^5$) КУО/мл, через 72 години — ($3,8 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$) КУО/мл. Чисті KER не мали

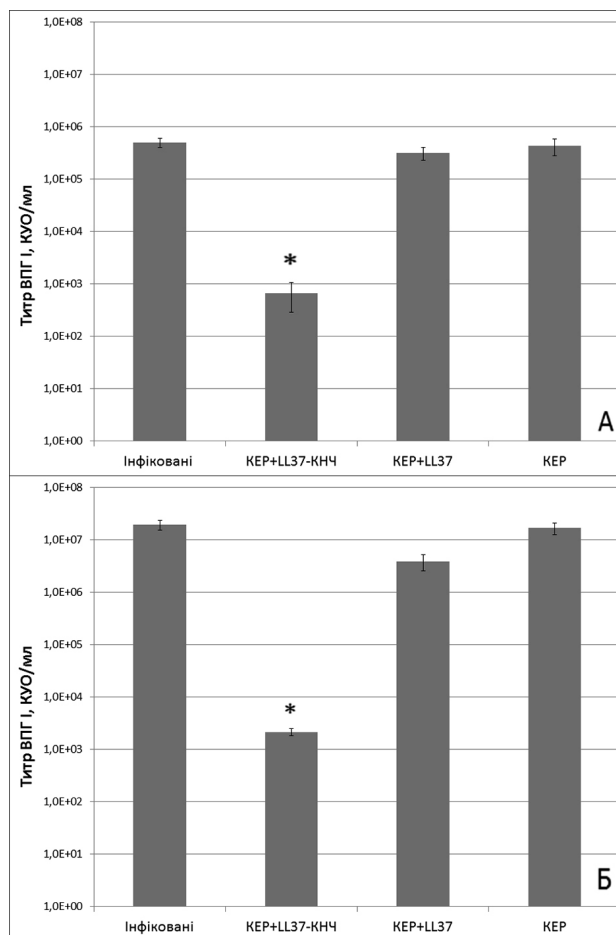


Рис. 2. Оцінка здатності колагенового еквіваленту рогівки з впровадженою системою постійної доставки пептиду LL37 попереджати розвиток інфекції *in vitro* — титр ВПГ типу I в основній (KER + LL37-КНЧ) та контрольних групах через 24 год. культивування (А) та через 72 год. культивування (Б).

Примітки. Див. рис. 1.

власної противірусної активності. В той же час в основній групі концентрація ВПГ через 24 години становила ($666,7 \pm 381,9$) КУО/мл та ($2133,3 \pm 321,4$) КУО/мл через 72 години після інфікування ($p_{24\text{год}} = 0,032$, $p_{72\text{год}} = 0,027$) — рис. 2.

Обговорення результатів

В цій роботі вперше була доведена противірусна активність *in vitro* проти вірусу простого герпесу типу I композитного трансплантату, що може бути застосований в якості матеріалу для кератопластики при лікуванні інфекційних захворювань рогівки одночасно і як замітник рогівки, і як носій протиінфекційного агента. Нами показано, що розроблена система постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 на основі кремнієвих наночасток не втрачає своїх властивостей в разі введення у розчин колагену під час синтезу KER, пептид продовжує чинити противірусний ефект. Найбільший ефект LL37 має, коли використовується в якості агента для про-

філактики інфекції, однак, коли імпланти з впровадженою СПД LL37 використовували для зупинки розповсюдження ВПГ у клітинах, LL37 також чинив значний вплив на вірус порівняно з контрольними групами, хоча противірусна активність і дещо зменшувалася через 72 години після інфікування. Враховуючи те, що традиційна кератопластика має досить низьку ефективність при лікуванні інфекційних кератитів [15], подібні комбіновані імпланти можуть стати альтернативою донорській рогівці людини. Також цікавим є використання КЕР з СПД LL37 в якості матеріалу для кератопластики у хворих з помутніннями рогівки після герпетичних кератитів для профілактики реактивації інфекції. Шляхами удосконалення подібних імплантів мо-

жуть бути зміцнення механічних властивостей, покращення їхньої прозорості та збільшення концентрації лікувальних препаратів в них. Враховуючи те, що розроблена СПД пептиду LL37 не втратила своїх противірусних властивостей у разі введення у колагеновий замітник рогівки під час його синтезу, можна з великою імовірністю припустити, що КЕР з СПД протиінфекційного пептиду буде зберігати і свої антибактеріальні властивості, які були протестовані раніше [4].

Отримані дані свідчать про перспективність подальшого вивчення заміників рогівки з впровадженою системою постійної доставки лікарських засобів в лікуванні вірусних та бактеріальних очних інфекцій.

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. Бузник О. І. Колагеновий еквівалент рогівки з впровадженою системою постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 / О. І. Бузник, Н. В. Пасечнікова, С. А. Якименко, М. М. Іслам, М. Гріффіт // Офтальмол. журн. — 2015. — № 1. — С. 110–114.
3. Іслам М. М. Система постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 — потенційний новітній метод лікування очних інфекцій. Повідомлення 2. Противірусна активність LL37, що інкапсульований у кремнієві наночастки / М. М. Іслам, М. Гріффіт, О. І. Бузник // Офтальмол. журн. — 2014. — № 3. — С. 53–57.
4. Пасечнікова Н. В. Система постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37 — потенційний новітній метод лікування очних інфекцій. Повідомлення 3. Протимікробна активність LL37, що інкапсульований у кремнієві наночастки / Н. В. Пасечнікова, С. А. Якименко, О. І. Бузник [та ін.] // Офтальмол. журн. — 2014. — № 5. — С. 4–8.
5. 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.
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. 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.
8. Fagerholm P. A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study / P. Fagerholm, N. S. Lagali, K. Merrett, [et al.] // Sci. Transl. Med. — 2010. — Vol. 2. — P. 46ra61.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Liu W. Collagen-phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes / W. Liu, C. Deng, C. R. McLaughlin, [et al.] // Biomaterials. — 2009. — Vol. 30. — P. 1551–1559.
13. Lyall D. A. Long term visual outcomes, graft survival and complications of deep anterior lamellar keratoplasty in patients with herpes simplex related corneal scarring / D. A. Lyall, S. Tarafdar, M. J. Gilhooly, F. Roberts, K. Ramaesh // Br. J. Ophthalmol. — 2012. — Vol. 96. — P. 1200–1203.
14. Pasyechnikova N. Collagen-based bioengineered substitutes of donor corneal allograft implantation: assessment and hypotheses / N. Pasyechnikova, V. Vit, M. Leus, [et al.] // Med. Hypothesis Discov. Innov. Ophthalmol. — 2012. — Vol. 1 (№ 1). — P. 10–13.
15. Sharma N. Therapeutic keratoplasty for microbial keratitis / N. Sharma, R. Sachdev, V. Jhanji, [et al.] // Curr. Opinion Ophthalmol. — 2010. — Vol. 21. — P. 293–300.

Поступила 18.05.2015