

УДК 617.713–089.843:547.962.9:544.641

Колагеновий еквівалент рогівки з впровадженою системою постійної доставки протиінфекційного пептиду LL37

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.; М. М. Іслам², аспірант; М. Гріффіт², зав. центром²

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)

E-mail: a_buznik@bk.ru

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

Ключевые слова: искусственная роговица, система постоянной доставки, противомикробный пептид LL37,

Цель. Синтезировать эквивалент донорской роговицы (ЭДР) с двойной функцией: 1) заместитель стромы роговицы, и 2) доставка антиинфекционных пептидов (АИП) из ЭДР.

Материалы и методы. АИП LL37 (кателицидин) был инкапсулирован в кремниевые наночастицы (КНЧ) под действием магнитного поля. КНЧ с LL37 внедрялись в ЭДР во время изготовления путем создания взаимопроникающей сети из коллагена I типа и 2-метакрилоилоксиэтилфосфорилхолина. Оценивали: 1) динамику высвобождения LL37 из ЭДР (иммуноферментный анализ); 2) токсичность ЭДР к клеткам роговичного эпителия человека (КРЭЧ) — колориметрический анализ; 3) рефракционные свойства ЭДР (рефрактометр Abbe); 4) механические свойства (наложение швов на ЭДР при послойной кератопластике на свином глазу *ex vivo*).

Результаты. Дозированное высвобождение LL37 из ЭДР происходило до 21 дня. Рефракционный индекс ЭДР с LL37 в КНЧ = 1,3 (человеческая роговица 1,37). ЭДР с LL37 в КНЧ не были токсичны к КРЭЧ в сравнении с чистыми ЭДР. Механическая прочность ЭДР с LL37 оказалась незначительно ниже чистых ЭДР.

Выводы. Впервые был синтезирован ЭДР, содержащий систему дозированного высвобождения АИП. Доказано дозированное высвобождение АИП LL37 из ЭДР. Полученные ЭДР не угнетают пролиферацию КРЭЧ и сохраняют удовлетворительные оптические и механические свойства.

Collagen-Based Corneal Substitutes with Incorporated Anti-infective Peptide LL37 Sustained Delivery System

N. V. Pasychnikova¹, S. A. Yakymenko¹, O. I. Buznyk¹, M. M. Islam², M. Griffith²

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

²Linköping University; Linköping (Sweden)

Key words: artificial cornea, antiinfective peptide LL37, sustained delivery system

Purpose. To develop corneal substitutes (CS) with a dual function: 1) corneal stroma substitute, and 2) antiinfective peptide (AIP) delivery.

Methods. AIP LL37 (cathelicidin) was encapsulated in silica nanoparticles (SiNP) under the effect of magnetic field. SiNP with LL37 were then introduced in CS during their production using the method of creation of interpenetrating network of type I collagen and 2 methacryloyloxyethylphosphorylcholine. Dynamics of LL37 release from CS using ELISA method was evaluated. Refractive properties of CS with incorporated AIP release system were assessed using Abbe refractometer. Cytotoxicity of the CS to the cells of the human corneal epithelium was assessed by using WST-1 based colorimetric assay. Mechanical properties were checked by performing lamellar keratoplasty on *ex vivo* porcine eyes.

Results. Gradual release of LL37 from within CS occurred up to 21 day. Release from control CS (with incorporated free LL37) stopped on the 1st day. Refractive index (RI) of CS with LL37 in SiNP was equal to 1.3 (human cornea 1.37). There was no increased cytotoxicity of CS with incorporated release system compared to clear CS. Mechanical strength of CS with LL37 was non-significantly lower compared to clear CS.

Conclusion. For the first time CS containing AIP sustained delivery system was developed. Gradual release of AIP LL37 from within CS was proved. No cell toxicity, satisfactory optical and mechanical properties of the constructs were found.

Вступ. Ураження рогівки є другою найбільш частою причиною сліпоти після катаракти, на які страждають приблизно 10 мільйонів людей по всьому світу [14]. Серед захворювань рогівки найбільш частими причинами зниження зору залишаються інфекційні кератити, частота яких збільшується з кожним роком [2]. Це пов'язане з тим, що резистентність інфекційних збудників до існуючих антибактеріальних та противірусних препаратів наростає швидшими темпами ніж з'являються нові препарати [6]. Тому основним методом лікування інфекційних кератитів залишається пересадка донорської рогівки, але її дефіцит також постійно наростає, особливо в країнах, що розвиваються, та, наприклад, в Індії сягає 85 % [12]. Як наслідок, вкрай важливими є питання пошуку альтернатив і сучасним протиінфекційним препаратам, і донорській рогівці.

В якості альтернативи протиінфекційним препаратам інтерес викликають природні молекули імунної системи, такі як катіонні пептиди — дефенсіни та кателіцидини. Зокрема, в рогівці людини був знайдений кателіцидин LL37, який має широкий спектр активності проти ряду патогенних бактерій, вірусів та грибків [8]. Для подовшення його дії в осередку інфекції нами була запропонована система постійної доставки (СПД) LL37 шляхом його інкапсуляції у кремнієві наночастки, а також доведена противірусна та антибактеріальна активність такої системи [1, 3, 4].

Серед альтернатив донорській рогівці звертають на себе увагу біосинтетичні імпланти на основі колагену, які мають оптичні, хімічні та механічні властивості, що наближаються до людської рогівки [9]. В експериментах на тваринах, а також при першій фазі клінічних випробувань, коли ці колагенові замітники донорської рогівки імплантувалися методом пошарової кератопластики, вони продемонстрували добру біосумісність, що не вимагала імуносупресії [7, 10, 11]. Перевагою біосинтетичних рогівок є потенційна можливість їхнього програмування на виконання певних задач. Так, перспективним є введення у штучну рогівку в процесі її синтезу, наприклад, антибіотиків, противірусних препаратів для отримання рогівки з подвійною функцією — замітника строми рогівки при кератопластиці та одночасного джерела протиінфекційного препарату для лікування або профілактики інфекції [5].

Метою цієї роботи було створення колагенового еквіваленту рогівки (КЕР) з впровадженою системою постійної доставки протиінфекційного пептиду (ППП) LL37 та вивчення його оптичних, цитотоксичних та механічних властивостей.

Матеріал і методи

Робота виконана в лабораторії клітинної біології факультету 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. КЕР виготовляли шляхом створення мереж з свинячого колагену I типу (Nippon Meat Packers, Inc., Японія) та 2-метакрилоїлоксетилфосфорілхоліну — МФХ (Paramount Fine Chemicals Co. Ltd, Китай), що взаємно проникають, по протоколу, описаному раніше [10]. 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. 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 поміщали у камеру із 100 % вологістю в присутності азоту на 16 год. при кімнатній температурі. Після відділення від платівок гідрогелі відмивали та зберігали в 10 mM розчині фосфатного буферу при +4°C.

Виготовлення колагенових еквівалентів рогівки з системою постійної доставки LL37 або вільним LL37. КЕР з СПД пептиду LL37 або з вільним LL37 виготовлялися за технологією, що описана вище, а КНЧ з LL37 або вільний LL37 вводились в імплант, що синтезується, перед додаванням ПСА. Для цього в змішувальну систему вводили 300 мкл розчину вільного ППП LL37 в концентрації 500 мкг/мл або 300 мкл розчину КНЧ з інкапсульованим пептидом в концентрації 7 мг/мл.

Оцінка механічних та оптичних властивостей колагенових еквівалентів рогівки. Механічні властивості КЕР з СПД ППП LL37 оцінювали шляхом накладання вузлових швів на імплант при пошаровій кератопластиці на свинячому оці *ex vivo*. Контролем слугували КЕР без СПД ППП LL37, які також фіксували вузловими швами при пошаровій кератопластиці на свинячому оці *ex vivo*. Рефракційні властивості КЕР оцінювали на рефрактометрі Abbe 60 (Bellingham+Stanley, Велика Британія).

Оцінка динаміки вивільнення LL37 з колагенових еквівалентів рогівки. КЕР, що містили вільний LL37 або КНЧ з інкапсульованим LL37, розміщували у 10 мл фосфатного буферу (ФБ) при 37°C на механічному шейкері на 21 день. На 1й, 3й, 7й, 14й та 21й день ФБ збирався та замінювався свіжим буфером. ФБ з вказаних днів аналізували методом імуноферментного аналізу (ІФА). Коротко, зразки вкривали буфером для покриття антигену

(ImmunoChemistry Technologies, США) та залишали на ніч при кімнатній температурі в 96-чашечних тарілках. Після цього чашечки відмивали буфером для ІФА та вкривали моноклональним антитілом до мишачого LL37 (Santa Cruz Biotechnology, США). Після відмивання додавали проти-мишаче вторинне антитіло (Bio-Rad Laboratories, США), за ним — тетраметил-бензидін (Sigma Aldrich, 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.

Оцінка цитотоксичності колагенових еквівалентів ро-гівки з системою постійної доставки LL37. Для того, щоб оцінити, чи пригнічують створені КЕР з СПД пептиду LL37 або з вільним 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 зі створеними імплантатами, що містили LL37, був інкапсульований у КНЧ протягом 24–72 год. Контролем слугували КРЕЛ, які культивувалися разом з «чистими» КЕР або з КЕР, що містив вільний пептид. 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 4 вимірювання.

Статистичний аналіз. Різницю між дослідною групою (КЕР з СПД пептиду LL37) та контролем (КЕР з вільним LL37 або «чисті» КЕР) 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 та їх обговорення

КЕР, що містили як КНЧ з LL37, так і вільний LL37, мали тендітні помутніння, що незначно знижували прозорість імплантів (Рис. 1). Рефракційний індекс КЕР з LL37 в КНЧ дорівнював 1,3, що незначно нижче індексу людської рогики — 1,37 та КЕР без пептиду — 1,35 [10].

Як вільний пептид, так і пептид, що інкапсульований у КНЧ, не впливали на механічні властивості КЕР — імпланти залишалися досить міцними та добре переносили накладання 12 вузлових швів при проведенні глибокої поширової кератопластики на ізольованому оці свині.

ІФА показав, що вільний LL37, що був впроваджений у КЕР, повністю вивільнювався з імпланту на перший день дослідження динаміки вивільнення. Натомість, вивільнення пептиду з КЕР з впровадженою СПД LL37 проходило поступово до 21го дня (Рис. 2).

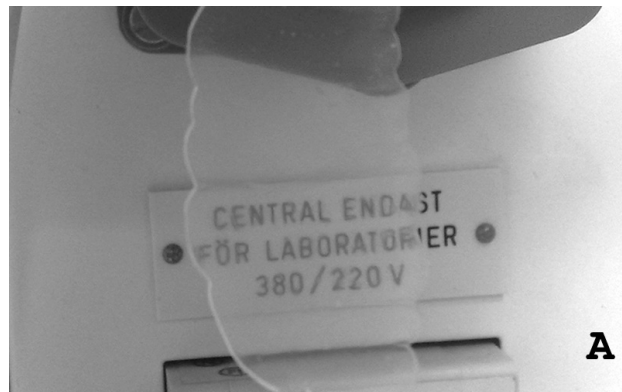


Рис. 1. Колагенові еквіваленти рогики, що містять вільний LL37 (А) або з LL37, впроваджений у кремнієві наночастки (Б).

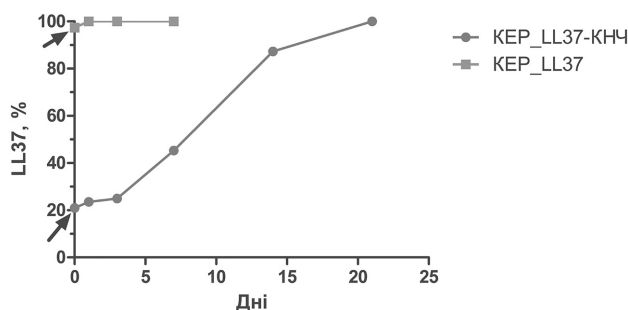


Рис. 2. Динаміка вивільнення LL37 з колагенових еквівалентів рогики, %.

Примітка. KEP_LL37-КНЧ — імпланти з впровадженою системою постійної доставки LL37; KEP_LL37 — імпланти з вільним пептидом; стрілка — відсоток LL37, що вивільнювався під час стерилізації імпланту.

Колориметричний аналіз з реагентом WST-1 не виявив підвищення токсичності КЕР з СПД LL37 по відношенню до КРЕЛ порівняно з «чистими» КЕР, КЕР з вільним LL37 та з вільним пептидом в концентрації 15 мкг/мл (Рис. 3).

В цій роботі вперше проведена спроба сумістити позитивні властивості заміників донорської рогики на основі колагену та СПД ПІП LL37 для створення композитного трансплантату, що може

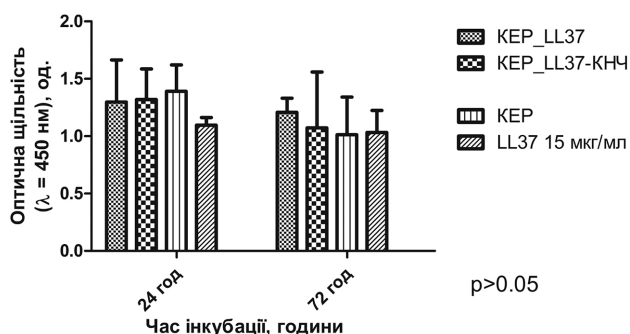


Рис. 3. Результати колориметричного аналізу цитотоксичності з результатом WST-1.

Примітки. KER_LL37-КНЧ — імпланти з впровадженою системою постійної доставки LL37; KER_LL37 — імпланти з вільним пептидом; KER — «чисті» імпланти; LL37 15 мкг/мл — LL37 в концентрації 15 мкг/мл.

бути застосований в якості матеріалу для кератопластики при лікуванні інфекційних захворювань

рогівки одночасно і як замітник рогівки, і як носій протиінфекційного препарату. Враховуючи те, що традиційна кератопластика має досить низьку ефективність при лікуванні інфекційних кератитів [13], подібні комбіновані імпланти можуть стати альтернативою донорській рогівці людини. Вперше показано, що KER з СПД LL37 мають задовільні оптичні та механічні властивості. Також доведено, що впровадження КНЧ з інкапсульованим в них пептидом в імплант не пригнічує вивільнення LL37 з KER, яке *in vitro* триває протягом 3 тижнів. Крім того, замітники донорської рогівки з впровадженою СПД LL37 не пригнічують проліферацію КРЕЛ *in vitro* порівняно з «чистими» KER.

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. 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. 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. (у друку).
5. 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.
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. 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.
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. Griffith M. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function / M. Griffith, N. Poliseti, L. Kuffova, [et al.] // Ocul. Surf. — 2012. — Vol. 10 (№ 3). — P. 170–183. (стаття гріффіт 2012)
10. 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.
11. Pasychnikova N. Collagen-based bioengineered substitutes of donor corneal allograft implantation: assessment and hypotheses / N. Pasychnikova, V. Vit, M. Leus, [et al.] // Med. Hypothesis Discov. Innov. Ophthalmol. — 2012. — Vol. 1 (№ 1). — P. 10–13.
12. Sangwan V. S. Eye Banking in India: A Road Ahead / V. S. Sangwan, U. Gopinathan, P. Garg, G. N. Rao // JIMSA. — 2010. — Vol. 23 (№ 3). — P. 197–200.
13. Sharma N. Therapeutic keratoplasty for microbial keratitis / N. Sharma, R. Sachdev, V. Jhanji, [et al.] // Curr. Opinion Ophthalmol. — 2010. — Vol. 21. — P. 293–300.
14. Whitcher J. P. Corneal blindness: a global perspective / J. P. Whitcher, M. Srinivasan, M. P. Upadhyay // Bull. World Health Organ. — 2001. — Vol. 79. — P. 214–221.

References

1. **Buznyk OI.** The sustained delivery system of the anti-infection 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. In Russian.
2. **Gaidamaka TB.** Recurrent herpetic keratitis. Pathogenesis, diagnosis, treatment, and prevention: Author's thesis for Doctor of Med. Science. 14.01.18. *Ophthalmology. SI «The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of NAMS of Ukraine».* Odessa, 2011. 44 p.
3. **Islam M. M., Griffith M., Mondal D., Buznyk O. I.** Anti-infection peptide LL37 sustained delivery system — a potential new treatment of ocular infections. Report 2. Antiviral activity of LL37 encapsulated in silica nanoparticles. *Oftalmol Zh.* 2014;3:53–7.
4. **Pasychnikova N, Buznyk A, Yakymenko S et al.** 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. *Oftalmol Zh.* In printing.
5. **Bareiss B, Ghorbani M, Li F et al.** Controlled release of acyclovir through bioengineered corneal implants with silica nanoparticle carriers. *B. Bareiss. Open Tissue Eng. Regen. Med. J.* 2010;3:10–7.
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. **Fagerholm P, Lagali NS, Merrett K et al.** A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study. *Sci. Transl. Med.* 2010;2:46–61.
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. 2005;30(5):385–94.
9. **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.
10. **Liu W, Deng C, McLaughlin CR et al.** Collagen-phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes. *Biomaterials.* 2009;30:1551–9.
11. **Pasychnikova N, Vit V, Leus M et al.** Collagen-based bioengineered substitutes of donor corneal allograft implantation: assessment and hypotheses. *Med. Hypothesis Discov. Innov. Ophthalmol.* 2012;1(1):10–3.
12. **Sangwan VS, Gopinathan U, Garg P, Rao GN.** Eye Banking in India: A Road Ahead. *JIM-SA.* 2010;23(3):197–200.
13. **Sharma N, Sachdev R, Jhanji V et al.** Therapeutic keratoplasty for microbial keratitis. *Curr. Opinion Ophthalmol.* 2010;21:293–300.
14. **Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP.** Corneal blindness: a global perspective. *Bull. World Health Organ.* 2001;79:214–21.