

ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА ДЕСФЕРАЛА КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ПРОТИВОХЛАМИДИЙНЫЙ АГЕНТ

Н.В. Рукосуева, аспирант, Д.А. Захарова, студент, Д.А. Безруков, доцент,

А.П. Каплун, профессор, В.И. Швец, заведующий кафедрой,

*Н.А. Зигангирова, руководитель лаборатории

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

*ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН

e-mail: Nata1i@list.ru

Десферал является блокатором ионов свободного железа, уже более 30 лет применяемым при лечении последствий инфарктов и инсультов. В нескольких исследованиях *in vitro* было также показано, что десферал в концентрациях 15–100 мкМ вызывает нехватку железа у *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia trachomatis*, влияя на рост и развитие данных бактерий. Основными проблемами применения этого соединения для лечения хламидиоза является его токсичность и низкая способность к прохождению через клеточную мембрану. В настоящей работе десферал инкапсулировали в липосомы из соевого фосфатидилхолина и исследовали *in vitro* токсичность и активность полученной дисперсии. Было продемонстрировано, что липосомальная форма хелатора менее токсична и более активна по сравнению с его раствором.

Desferal is a free iron ions blocker used for heart attacks and strokes treatment for more than 30 years. In several *in vitro* studies it was also shown that desferal concentrations of 15–100 mM cause shortage of iron in *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*, affecting these bacteria growth and development. The main problems of this compound for treatment of chlamydia are its toxicity and low ability to pass through the cell membrane. In this research the *in vitro* toxicity and activity of desferal encapsulated in soybean phosphatidylcholine liposomes were studied. It was demonstrated that the liposomal form of the chelator is less toxic and more active as compared to its solution.

Ключевые слова: хламидиоз, десферал, липосомы, цитотоксичность.

Key words: chlamydiosis, desferal, liposomes, cytotoxicity.

Введение

Проблема лечения заболеваний, обусловленных патогенными для человека *Chlamydia*, является одной из острейших в современной медицине. Микроорганизмы данного рода, в частности, *Chlamydia trachomatis*, являются внутриклеточными облигатными паразитами, инфицирующими клетки нереснитчатого кубического или цилиндрического эпителия слизистых оболочек (конъюнктивы, шейки матки, эндометрия, маточных труб, уретры), эпителиальные клетки внутренних органов, клетки ретикулоэндотелия, лейкоциты и макрофаги [1]. Бактерии *C. trachomatis* способны вызывать ряд необратимых патологических изменений органов малого таза, что, в итоге, может привести к развитию тяжелых хронических заболеваний, приводящих к бесплодию [2]. Сложность терапии урогенитальной хламидийной инфекции, основанной на применении антибиотиков и стимуляции иммунной системы пациента, обусловлена, во-первых, особенностями жизненного цикла патогена (наличием двух чередующихся функционально и морфологически различных жизненных форм: ретикулярных и элементарных тел), во-вторых, формированием устойчивости к традиционным антибиотикам (тетрациклам, макролидам и фторхинолонам), в-третьих, частым переходом инфекции в хроническую форму, плохо поддающуюся лечению [1]. При этом эпидемиологическая ситуация как в России, так и в мире остается очень напря-

женной, поскольку развитие заболевания протекает бессимптомно, а наличие патогена может быть выявлено только в ходе лабораторной диагностики образцов биоматериала пациента. Одним из возможных альтернативных подходов к лечению хламидийной инфекции, не связанных с использованием традиционных антибиотиков, является применение препаратов, связывающих свободные ионы железа, поскольку недостаток железа препятствует росту и развитию внутриклеточных бактериальных патогенов, включая и *C. trachomatis* [3]. Одним из таких веществ является десферал (десферроксамин) (рис. 1).

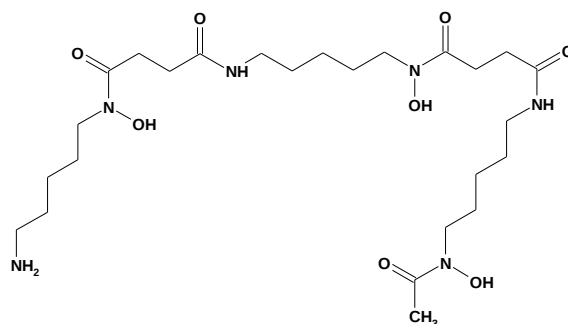


Рис. 1. Структурная формула десферала (десферроксамина).

Данное соединение уже более 30 лет широко применяется в клинической практике при лечении заболеваний, обусловленных присутствием в организме больного избытка свободного железа [4]. В нескольких исследованиях *in*

in vitro было показано, что десферал в концентрациях 15–100 мкМ вызывает нехватку железа у *C. pneumoniae* и *C. trachomatis*, влияя на рост и развитие данных бактерий [5]. Основными проблемами применения этого соединения для лечения хламидиоза в клинической практике является его токсичность (блокирование клеточного цикла в фазе G1/S [6]) и низкая способность к прохождению через клеточную мембрану. Задачей настоящей работы было создание средства доставки данного вещества, хорошо проходящего через клеточную мембрану, и определение активности полученного препарата в отношении *C. trachomatis in vitro*.

Результаты и их обсуждение

В качестве частиц-носителей нами были выбраны липосомы, поскольку данный вид наночастиц обладает высокой биосовместимостью, как правило, они не токсичны для клеток, относительно просты в получении [7]. Включение десферала в липосомы, по нашему мнению, позволит улучшить способность данного соединения проходить через клеточную мембрану, благодаря чему снизится его терапевтическая концентрация и уменьшится ток-

сическое воздействие на организм. Для получения липосом использовалась смесь состава соевый фосфатидилхолин (сФХ): холестерин (Хол) 7:3 (моль/моль). С целью предотвращения быстрого окисления липидов в систему также добавляли α -токоферол (1% мол.). Липосомы получали экструзией мультиламеллярной дисперсии через ядерный поликарбонатный фильтр с размером пор 200 нм. В результате был приготовлен образец липосомальной дисперсии с концентрацией активного вещества 5 мг/мл, массовым соотношением десферал:липид 1:6 и степенью включения вещества 33%.

Токсичность данной дисперсии исследовали *in vitro* в культуре эпителиальных клеток легкого человека (HL) с окрашиванием метиленовым синим и последующей спектрофотометрической фиксацией результата после 24-часового инкубирования. Тест проводился в формате 96-луночного планшета, в качестве контрольных образцов использовали растворы десферала концентрации 100, 200, 400, 600 мкМ, дисперсию незагруженных липосом сФХ:Хол 7:3 с токоферолом (1% мол.), приготовленную аналогично липосомальным дисперсиям с десфералом (рис. 2).

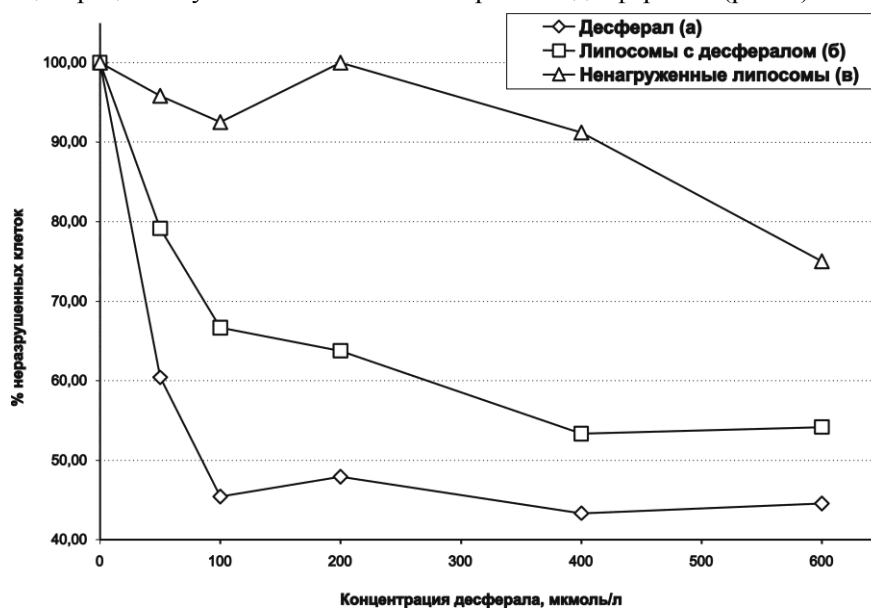


Рис. 2. Результаты теста на токсичность. Выживаемость клеток линии HL при различных концентрациях десферала: вводимого в виде раствора (а); вводимого в липосомах сФХ:Хол 7:3, соотношение липиды:десферал 6:1 (б); контрольный образец липосом с концентрацией липидов, совпадающей с концентрацией в образцах с десфералом (в).

Как видно из полученных данных, десферал в не включенном в липосомы виде проявляет токсический эффект по отношению к клеткам, начиная с минимальной исследованной концентрации 50 мкМ, тогда как липосомальный препарат сФХ:Хол 7:3 в диапазоне концентраций десферала 50–100 мкМ слабо токсичен для клеток. Незагруженные липосомы не токсичны до концентрации 1.7 мг/мл («400 мкМ» на графике), однако при дальнейшем увеличении концентрации липидов наблю-

дается выраженный токсический эффект (порядка 26% при концентрации 2.5 мг/мл («600 мкМ» на графике)).

Исследование антихламидийной активности полученной дисперсии проводили в той же клеточной культуре, зараженной *C. trachomatis*. Результат оценивали методом флуоресцентной микроскопии с предварительным окрашиванием образцов с помощью моноклональных, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) антител к белковому антигену всех серотипов

C. trachomatis, через 48 ч после заражения. В качестве контрольных образцов использовали: 1) пустую липосомальную дисперсию, 2) липосомальную дисперсию, смешанную непосредственно перед экспериментом с раствором десферала и 3) растворы десферала различной концентрации. Было показано, что липосомальная форма десферала проявляет антихламидийный

эффект уже при концентрации препарата 50 мкМ. При концентрации десферала в липосомальной форме 100 мкМ включения становятся мельче, значительно уменьшается их количество по сравнению с раствором десферала той же концентрации и контрольными образцами инфицированных клеток (рис. 3).

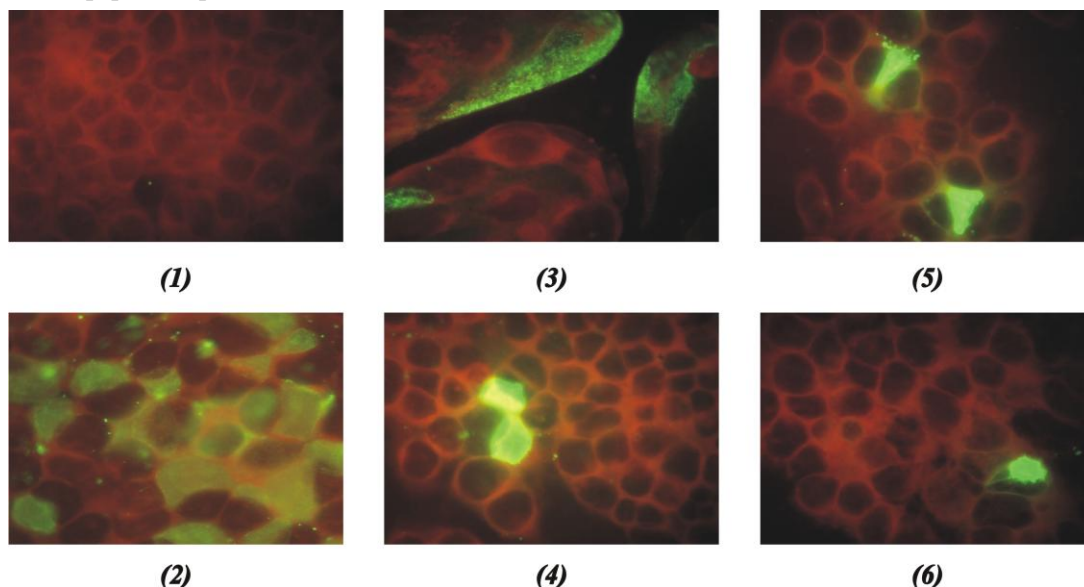


Рис. 3. Тест на противохламидийную активность:

(1) – чистые клетки; (2)–(6) – клетки, инфицированные *C. trachomatis*; (3) – десферал 50 мкМ; (4) – липосомы сФХ:Хол 7:3 с десфералом 50 мкМ; (5) – десферал 100 мкМ; (6) – липосомы сФХ:Хол 7:3 с десфералом 100 мкМ.

Антихламидийный эффект оценивали также с помощью теста на жизнеспособность хламидий. Для этого монослой клеток после первичного воздействия препаратов и культивирования в течение 48 ч лизировали замораживанием и оттаиванием, после чего высевали на новый монослой клеток. Через 24 ч проводили количественную оценку жизнеспособности

хламидий при определении процента инфицированных клеток с помощью метода проточной цитометрии. В результате было установлено, что количество жизнеспособных хламидий на 18% меньше в случае воздействия на них липосомальной формы препарата по сравнению с раствором десферала с той же концентрацией (рис. 4).

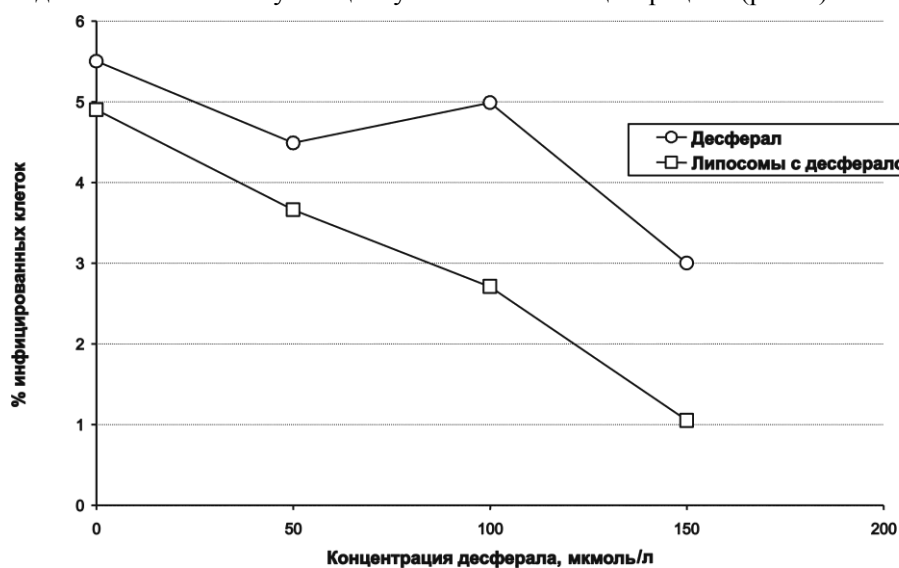


Рис. 4. Данные количественного теста определения процента инфицированных клеток методом проточной цитометрии. Процент инфицированных клеток линии HL, зараженных *C. trachomatis*, при различных концентрациях десферала: -○- – вводимого в виде раствора; -□- – вводимого в липосомах сФХ:Хол 7:3, соотношение липиды:десферал 6:1.

Таким образом, было установлено, что дисперсия, содержащая липосомы состава сФХ:Хол 7:3 (моль/моль), загруженные десфералом, проявляет антихламидийную активность при концентрации десферала 50 мкМ, тогда как десферал в свободной форме начинает влиять на хламидийные включения в концентрации 100 мкМ. При этом композиция, содержащая липосомы, загруженные десфералом с концентрацией 50 мкМ, эффективнее контрольной смеси дисперсии пустых липосом и свободного десферала с той же концентрацией.

В результате исследования на жизнеспособность бактерий было показано, что липосомы с десфералом снижают количество жизнеспособных хламидийных включений более эффективно по сравнению со свободным десфералом, о чем можно косвенно судить по проценту инфицированных клеток после пересева. Кроме того, липосомальная форма десферала обладает более длительным действием по сравнению с раствором, очевидно, за счет постепенного высвобождения хелатора из липосом.

Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие реактивы: десферал, дезоксихолат натрия (ДХН), α -токоферол (Sigma-Aldrich); соевый фосфатидилхолин Lipoid S100 «Lipoid GmbH» (Германия); холестерин (Россия).

Растворители: хлороформ, ацетон, метанол, этанол («Химмед», Россия) квалификации не ниже «ч.д.а.». Хроматографию проводили на колонке с Sephadex G75.

Липосомы получали с использованием роторного испарителя «Heidolph» (Германия), экструдера LiposoFast Basic «Avestin» (Канада), поликарбонатных ядерных фильтров 200 нм «Тензор» (Россия).

В работе использовали перевиваемую культуру клеток легкого человека HL, *C. trachomatis*, биовар LGV, серовар L2, штамм Bu434. Инфицирование проводили в дозе 1 включениеобразующая единица (БОЕ) на клетку. Культивирование осуществлялась на среде RPMI. Для проведения прямой иммунофлуоресценции с целью оценки эффективности действия препаратов против хламидий использовали коммерческие наборы ЗАО «НИАРМЕДИК плюс» при НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН «Хламоносрин-2» для определения моноклональных антител к видоспецифическому белковому антигену *C. trachomatis*.

Получение липосом с десфералом

Липосомы получали диспергированием липидной пленки (с добавлением 1% мол. токоферола) в водном растворе десферала с концентрацией 5 мг/мл с последующей экструзией через поликарбонатный ядерный фильтр с диаметром пор 200 нм.

В экспериментах получали дисперсии с конечной концентрацией липидов 30 мг/мл.

Определение степени включения вещества в липосомы

Проводили отделение липосом от не включившегося вещества колоночной хроматографией на Sephadex G75. Степень включения вещества в липосомы (ω) рассчитывали по данным измерения оптической плотности раствора при 226 нм после добавления к 1 мл образцов дисперсии и раствора десферала после разделения 100 мкл 5.4% водного раствора ДХН (2-х-кратный мольный избыток в пересчете на субстанцию-носитель). Расчетная формула:

$$\omega (\%) = \frac{Abs_1 * V_1}{Abs_1 * V_1 + Abs_2 * V_2} * 100\%$$

где Abs_1 – оптическое поглощение фракции липосом после добавления ДХН; Abs_2 – оптическое поглощение фракции не включившегося десферала после добавления ДХН; V_1 – суммарный объем фракции липосом; V_2 – суммарный объем фракции не включившегося десферала.

Оценка токсичности липосом с десфералом при помощи окрашивания клеток метиленовым синим

Работу проводили в формате 96-луночных планшетов. В суточном монослое клеток HL заменяли среду культивирования и вносили исследуемые образцы в транспортной среде RPMI. Клетки инкубировали в течение 48 ч в CO_2 -инкубаторе при 37°C. Спустя 48 ч из лунок отбирали надосадочную жидкость и фиксировали клетки охлажденным метанолом (30 мкл) в течение 20 мин при 4°C. К фиксированным клеткам добавляли 40 мкл 0.5% метиленового синего и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. После инкубации метиленовую синь отбирали из лунок и отмывали клетки фосфатно-солевым буфером (PBS), pH 7.4, 4×175 мкл. В лунки добавляли 100 мкл додецилсульфата натрия (SDS) в PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре до полного лизиса клеток, измеряли оптическую плотность полученных растворов при длинах волн 540 и 620 нм.

Оценка эффективности противохламидийных препаратов методом прямой иммунофлуоресценции

Работу проводили в культуре клеток HL, инфицированной *C. Trachomatis*, в формате 24-луночного планшета со стеклами (объем лунки 1 мл). Инфицирование проводили в дозе 1 БОЕ на клетку. После внесения инфекционного материала в 0.5 мл транспортной среды планшет центрифугировали при 3000 об/мин 1 ч при 25°C. Вносили исследуемые образцы в 0.5 мл

транспортной среды. Инкубировали клетки в течение 48 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C. Затем из лунок отбирали надосадочную жидкость, стекла промывали PBS и высушивали. После этого клетки фиксировали ацетоном (по 50 мкл) в течение 15 мин при комнатной температуре. На фиксированные клетки наносили 50 мкл моноклональных, меченных ФИТЦ, антител к белковым антигенам всех серотипов *S. trachomatis* и инкубировали в течение 30 мин во влажной камере при 37°C. После инкубации клетки промывали PBS. Препарат полностью высушивали. Подготовленные таким образом стекла монтировали на предметное стекло. Готовые препараты исследовали при помощи люминесцентного микроскопа.

Количественный тест для определения процента инфицированных клеток

Проводили подготовку образцов аналогично тесту на активность, но в лунках без стекол. Через 48 ч отбирали надосадочную жидкость, добавляли 0.5 мл холодного сахарозно-фосфатно-глутаминового буфера (SPG) и замораживали клетки при -70°C в течение 15-20 мин. Отбирали 10-50 мкл клеточного лизата, предварительно хорошо ресуспендировали и вносили в суточный монослой клеток HL, где заранее заменили клеточную среду на транспортную.

Планшет с инфицированными клетками центрифугировали при 3000 об/мин в течение 1 ч при 25°C. Инкубировали 1 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C. Промывали клетки 2×1 мл промывочным буфером. Вносили 1 мл транспортной среды и инкубировали клетки в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C.

Процент инфицированных клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. В основе метода лежит окрашивание препарата при помощи меченных ФИТЦ моноклональных антител к липополисахариду, для оценки наличия внутриклеточного возбудителя.

Суспензию клеток центрифугировали при 250 g в течение 10 мин при 10°C. Клетки однократно отмывали в PBS и фиксировали 70% раствором этанола в течение часа при температуре -20°C. После двукратной отмывки осадок клеток суспендировали и окрашивали мечеными ФИТЦ моноклональными антителами в течение 20 мин. Клетки однократно отмывали в PBS и суспендировали в 2 мл PBS. Процент инфицированных клеток оценивали с помощью проточного цитометра BD FACS Callibur в программе CellQuest Pro.

Работа поддерживается грантом Президента РФ МК-1145.2011.4.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Карягина А.С., Алексеевский А.В., Спирин С.А., Зигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. Эффекторные белки хламидий // Мол. биология. 2009. Т. 43. Вып. 6. С. 963–983.
2. Dean D. Chlamydia trachomatis today: Treatment, detection, immunogenetics and the need for a greater global understanding of chlamydial disease pathogenesis // Drugs Today. 2009. V. 25 (supple B). P. 25–31.
3. Raulston J. E. Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction *in vitro* and evidence for iron-regulated chlamydial proteins // Infect. Immun. 1999. V. 65. P. 4539–4547.
4. Chaston T.B., Richardson R. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: Relationship between structure, redox activity, and toxicity // Amer. J. Hematology. 2003. V. 73. P. 200–210.
5. Al-Younes H.M., Rudel T., Brinkmann V., Szczepek A.J., Meyer T.F. Low iron availability modulates the course of *Chlamydia pneumoniae* infection // Cell. Microbiol. 2001. V. 3. № 6. P. 427–437.
6. Kim H.J., Hida H., Jung C.G., Miura Y., Nishino H. Treatment with deferoxamine increases neurons from neural stem/progenitor cells // Brain Res. 2006. V. 1092. № 1. P. 1–15.
7. Швец В.И., Каплун А.П., Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Чехонин В.П. От липосом семидесятых к наночастицам XXI века // Рос. нанотехнологии. 2008. Т. 3. № 11-12. С. 6–20.