

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

МИКРОБИЦИДЫ С АНТИ-ВИЧ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ АДДУКТОВ УГЛЕРОДНЫХ НАНОКЛАСТЕРОВ

© 2011 г. А.В. Гилязова^{*,**}, Г.В. Корнилаева^{**}, А.Н. Пономарев^{***},
В.А. Черешнев^{****}, Э.В. Карамов^{*,**}

^{*}ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

^{**}ФГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия;

^{***}НТЦ «Прикладных нанотехнологий», Санкт-Петербург, Россия;

^{****}Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Поступила: 07.06.2010. Принята: 25.08.2010

Принимая во внимание увеличение количества новых случаев ВИЧ-инфекции среди женщин, особенно в развивающихся странах, создание топических микробицидов становится важной частью комплексных мер по профилактике ВИЧ/СПИД. В рамках данной работы мы провели исследование водорастворимых аддуктов нанокластеров углерода (АНКУ), активных в отношении штаммов ВИЧ-1, для разработки анти-ВИЧ микробицидов. Все исследованные водорастворимые аддукты углеродных нанокластеров, различающиеся по способу получения (эталон, №2, №5, №6, АНКУ и раствор АНКУ ВТП), являются малотоксичными для клеток СЕМ SS: 50%-ная токсическая доза не была достигнута. Изучение антивирусной активности показало, что водорастворимые аддукты углеродных нанокластеров обладают невысокой ингибирующей активностью в отношении ВИЧ-инфекции *in vitro*. 50% эффективная доза (ED_{50}) этой группы препаратов находится в пределах 21,4–27,5 мкг/мл. Был обнаружен значительный вирулицидный эффект: все образцы способны инактивировать вирус, предотвращая заражение клеток-мишеней. Наиболее эффективным препаратом является легкая фракция АНКУ.

Ключевые слова: микробициды, ВИЧ-инфекция, нанокластеры углерода

ВВЕДЕНИЕ

Разработка эффективной вакцины для предотвращения ВИЧ-инфекции сможет снизить или элиминировать распространение ВИЧ/СПИД. Несмотря на интенсивные исследования в течение последних 20 лет, эта цель пока не достигнута. Принимая во внимание увеличение количества новых случаев ВИЧ-инфекции среди женщин, особенно в развивающихся странах, создание топических микробицидов становится важным направлением среди мирового научного сообщества.

Микробициды — иммунобиологические препараты, гелевые или мазевые композиции, содержащие активные составляющие, способные предотвращать половую передачу ВИЧ и

других (или сопутствующих) инфекций, передающихся половым путем (таких, как гонорея, хламидиозы, генитальный герпес). Такие продукты предназначены, прежде всего, для женщин, которые могут пользоваться данным средством профилактики независимо от партнера.

Общее число микробицидов, находящихся на разных стадиях испытаний, составляет несколько десятков. К сожалению, клинические испытания III фазы большинства кандидатных микробицидов показали невысокую защиту от ВИЧ-инфекции. Таким образом, работы в этом направлении продолжаются, и разработка микробицидов остается актуальной, при этом особое внимание уделяется микробицидам, обладающим более высокой эффективностью и продолжительностью действия.

В рамках данной работы мы провели исследование водорастворимых аддуктов нанокластеров углерода (АНКУ), активных в отношении штаммов ВИЧ-1, для разработки микробицидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки

Была использована Т-лимфобластоидная линия CD4⁺ клеток CEM-SS [1], полученная из коллекции Национального Института Здоровья (НИН, США). Данная линия представляет собой перевиваемую суспензионную клеточную культуру. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂, в ростовой среде RPMI1640 (Sigma, США) с 10% фетальной телячьей сыворотки (Sigma, США), 2 мМ глутамина (Sigma, США), 100 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения).

Вирусы

В работе использовали штамм HIV-1_{BRU} — референс-штамм, активно реплицирующий в Т-лимфобластоидных клеточных линиях.

Оценка цитотоксичности соединений

Цитотоксическое действие тестируемых препаратов оценивали, сравнивая жизнеспособность клеток в присутствии различных доз соединений с жизнеспособностью клеток без соединения. Клетки вносили в стерильный 96-луночный планшет в концентрации 300—500 × 10³ и культивировали в присутствии разных доз соединений в течение 3 дней. Жизнеспособность клеток определяли подсчетом живых клеток в камере Горяева после окраски витальным красителем трипановым синим. 50%-ая цитотоксическая доза (TD₅₀) — доза препарата, при которой 50% исследуемых клеток сохраняют жизнеспособность, — была рассчитана с помощью линейно-логарифмической интерполяции.

Оценка антивирусной активности

Клетки, чувствительные к ВИЧ, в течение 2 часов инкубировали при 37 °C с различными концентрациями соединений и затем заражали вирусом с множественностью заражения 100 TCID₅₀. После 24-часовой инкубации клеток с вирусом в присутствии препаратов ростовую среду заменяли на свежую.

На основании данных ИФА по оптической плотности (450 нм) определяли уровень ингибирования инфекции в опытных образцах по отношению к контролю (без препарата). Расчет ED₅₀ (50% эффективной дозы) проводили с помощью линейно-логарифмической интерполяции.

Исследование вирулицидного действия соединений

Изучение вирулицидного действия препарата проводили следующим образом: к вирус-содержащему стоку добавляли сухие навески или раствор препарата, создавая определенные концентрации. Затем инкубировали 20—30 мин при комнатной температуре, встряхивая на вортексе. Смесь центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин, осаждая агрегаты частиц. Полученный супернатант использовали для заражения клеток, чувствительных к ВИЧ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Аддукты нанокластеров углерода (АНКУ) представляют собой новые соединения углерода, обладающие высокой растворимостью в полярных растворителях, в т.ч. и воде. АНКУ разработаны в «НТЦ Прикладных нанотехнологий» (Санкт-Петербург, Россия), получены в результате переработки каменно-угольных смол. Общая структурная формула аддуктов: [OH]_k—[C]_n—(OSO₂)_m. Средний размер нанокластеров составлял 10—100 нм.

При изучении цитотоксических свойств клетки линии CEM SS культивировали в присутствии разных концентраций соединений. Результаты этих исследований представлены на рисунке 1.

Все исследованные водорастворимые аддукты углеродных нанокластеров, различающиеся по способу получения (эталон, № 2, № 5, № 6, АНКУ и раствор АНКУ ВТП), являются малотоксичными для клеток CEM SS: 50%-ная токсическая доза не была достигнута. При этом наименьшей токсичностью обладали препарат № 5 (натриевая соль АНКУ) и легкая фракция АНКУ (раствор АНКУ ВТП): жизнеспособность культивируемых клеток снижалась на 14,7—15,2% в присутствии концентраций 100 мкг/мл. Остальные препараты проявляли несколько большую токсичность, снижая жизнеспособность клеток на 20—37,4% по сравнению с контролем при тех же концентрациях.

Для изучения антивирусных свойств препаратов клетки CEM SS заражали штаммом ВИЧ-1_{BRU} с множественностью инфекции 100 TCID₅₀ и культивировали в присутствии различных концентраций препаратов. При этом было показано, водорастворимые аддукты углеродных нанокластеров обла-

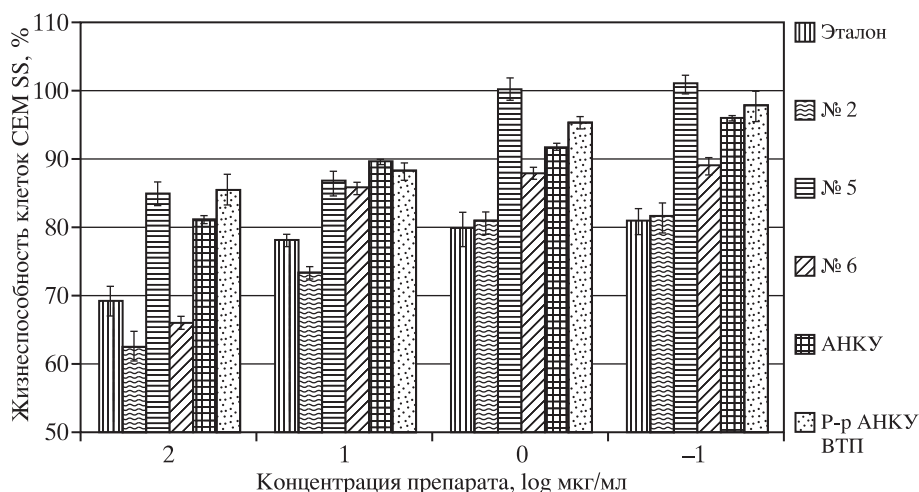


Рис. 1. Жизнеспособность клеток CEM SS, культивируемых в присутствии различных концентраций препаратов, выраженная в процентах от контроля клеток ($M \pm SD$).

Таблица. Влияние препаратов АНКУ на ВИЧ-инфекцию.

А. Уровень активности инфекции* в присутствии различных концентраций препаратов. Оптическая плотность при 450 нм, данные ИФА р24 ($M \pm SD$).

Препарат	Концентрация, мкг/мл			
	100	10	1	0,1
Эталон	0,282±0,010	2,902±0,029	3,007±0,008	3,469±0,034
№ 2	0,203±0,008	2,903±0,036	3,136±0,011	3,480±0,034
№ 5	0,069±0,004	2,853±0,030	3,063±0,007	3,392±0,092
№ 6	0,182±0,009	2,920±0,057	3,098±0,018	3,500±0,000
АНКУ	0,178±0,010	2,537±0,023	2,895±0,010	3,473±0,022
Р-р АНКУ ВТП	0,219±0,007	2,903±0,006	2,962±0,035	3,179±0,059

* Средняя ОП для контроля инфекции составила $3,500 \pm 0,000$, средняя ОП для контроля клеток составила $0,006 \pm 0,006$.

Б. Уровень активности инфекции в присутствии различных концентраций препаратов, выраженный в процентах от контроля инфекции ($M \pm SD$).

Препарат	Концентрация, мкг/мл				ED50, мкг/мл
	100	10	1	0,1	
Эталон	7,9±0,3	82,9±0,8	85,9±0,2	99,1±1,0	27,5
№ 2	5,6±0,2	82,3±0,2	89,6±0,3	99,4±1,0	26,3
№ 5	1,8±0,1	81,5±0,9	87,5±0,2	96,9±2,6	24,8
№ 6	5,0±0,3	83,4±1,7	88,5±0,5	100,0±0,0	26,6
АНКУ	4,9±0,3	72,4±0,7	82,7±0,3	99,2±0,6	21,4
Р-р АНКУ ВТП	6,1±0,2	82,9±0,2	84,6±1,0	90,8±1,7	26,8

дают невысокой ингибирующей активностью в отношении ВИЧ-инфекции *in vitro*. Результаты представлены в таблице (А и Б). 50% эффективная доза (ED_{50}) этой группы препаратов находится в пределах 21,4 – 27,5 мкг/мл.

Изучение вирулицидного действия углеродных нанокластеров проводили, добавляя

препараты к вирусному стоку. Полученным супернатантом инфицировали клетки CEM SS. В результате этого исследования было показано, что все образцы способны инактивировать вирус, предотвращая заражение клеток-мишеней (рис. 2). Наиболее эффективным препаратом является легкая фракция

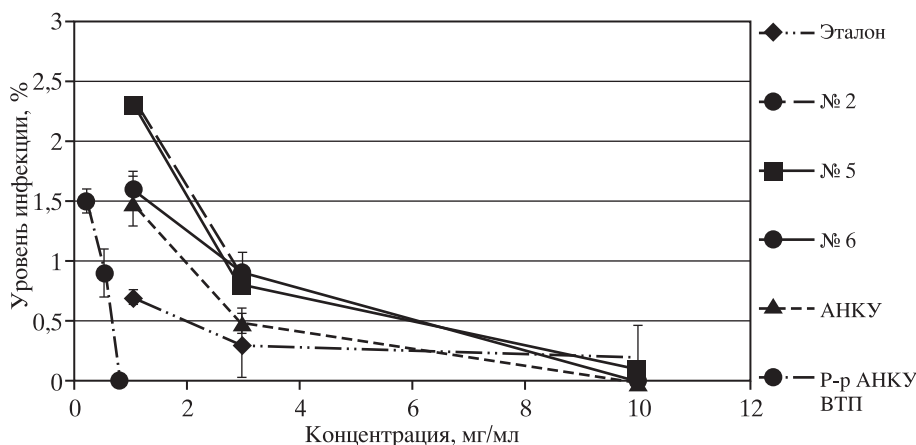


Рис. 2. Вирулицидный эффект водорастворимых аддуктов нанокластеров углерода, выраженный в процентах от контроля инфекции ($M \pm SD$).

АНКУ (раствор АНКУ ВТП): при добавлении 0,75 мг/мл препарата уровень инфекции снижается до 0%, а при добавлении 0,2 мг/мл — снижается на 98,5%. После инкубирования вирусного стока с каждым из остальных препаратов в концентрации 3 мг/мл уровень инфекции клеток составлял 0,3–0,9% от контроля инфекции (без препарата). Таким образом, для вирулицидного действия ED_{50} для легкой фракции АНКУ (раствор АНКУ ВТП) составила $< 0,2$ мг/мл, а для остальных образцов < 1 мг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие нанотехнологий привело к значительным успехам в области биоинженерии, молекулярной биологии, диагностики и терапии. Получение новых наноматериалов с помощью модификации поверхности, связывания с лигандами, полимерами, углеводами, пептидами, белками, нуклеиновыми кислотами делает их важным инструментом современной науки [2]. Несмотря на многочисленные исследования, безопасность и токсичность наночастиц остается предметом дискуссий.

В наши задачи входило исследование аддуктов нанокластеров углерода (АНКУ), полученных переработкой каменно-угольных смол. АНКУ представляет собой новое углеродное соединение, обладающее высокой растворимостью в полярных растворителях, в том числе в воде. Данный препарат относится к группе фуллероидов — гигантских каркасных однослойных, либо многослойных молекул, составленных из сочетания углеродных гек-

сагонов и пентагонов. При этом размеры фуллероидов (диаметр фуллерена C60 — 0,71 нм, характерные диаметры однослойных нанотрубок — 1–3 нм, многослойных — 10–40 нм, размеры астраленов колеблются от 30 до 150 нм) позволяют отнести их к ряду классических наноматериалов [3].

Показано, что фуллерены (C60) и их производные обладают антивирусной активностью, что имеет большое значение для лечения и предотвращения ВИЧ-инфекции. Анти-ВИЧ активность производных фуллерена связана с некоторыми биологическими свойствами, включая уникальную структуру молекулы и антиоксидантные свойства [4]. В исследованиях Fridman с соавторами доказано, что производные фуллерена способны образовывать комплекс с протеазой ВИЧ [5, 6]. Имеются сообщения об антипротеазной активности дендрофуллеренов [7, 8], о способности производных фуллеренов блокировать процесс репликации ВИЧ-1 [9], а также предотвращать инфицирование клеток СЕМ SS [10].

Результаты наших исследований показали низкую токсичность тестируемых препаратов (50% цитотоксическая доза не была достигнута), наличие незначительной анти-ВИЧ активности (ED_{50} составила от 21,4 до 27,6 мкг/мл для разных препаратов), а также вирулицидный эффект, особенно выраженный у раствора АНКУ ВТП (легкая фракция АНКУ) ($ED_{50} < 0,2$ мг/мл).

Таким образом, АНКУ являются перспективными для дальнейших исследований с использованием других моделей, с целью создания микробицидов с анти-ВИЧ действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nara P.L., Hatch W.C., Dunlop N.M., Robey W.G., Arthur L.O. *et al.* Simple, rapid, quantitative, synctiumforming microassay for the detection of human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1987, 3, 283–302.
2. Nahar M., Dutta T., Murugesan S., Asthana A., Mishra D. *et al.* Functional polymeric nanoparticles: an efficient and promising tool for active delivery of bioactives. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2006, 23(4), 259–318.
3. Пономарев А.Н. Нанобетон: концепция и проблемы. Синергизм наноструктурирования цементных вяжущих и армирующих фибры. *Строительные материалы* 2007, 6, 69–71.
4. Bakry R., Vallant R.M., Najam-ul-Haq M., Rainer M., Szabo Z. *et al.* Medicinal applications of fullerenes. *Int. J. Nanomedicine* 2007, 2(4), 639–649.
5. Friedman S.H., DeCamp D.L., Sijbesma R.P., Srdanov G., Wudl F. *et al.* Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 6506–6509.
6. Sijbesma R., Srdanov G., Wudl F., Castoro J.A., Wilkins C. *et al.* Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 6510–6512.
7. Brettreich M., Hirsch A. A highly water-soluble dendro[60]fullerene. *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 2731–2734.
8. Schuster D.I., Wilson S.R., Kirschner A.N., Schinazi R.F., Schlueter-Wirtz S. *et al.* Evaluation of the anti-HIV potency of a water-soluble dendrimeric fullerene. *Proc. Electrochem. Soc.* 2000, 9, 267–270.
9. Marchesan S., Da Ros T., Spalluto G., Balzarini J., Prato M. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 3615–3618.
10. Bosi S., Da Ros T., Spalluto G., Balzarini J., Prato M. Synthesis and Anti-HIV properties of new water-soluble bis-functionalized[60]fullerene derivative. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 4437–4440.

ANTI-HIV MICROBICIDES ACTIVITY BASED ON ADDUCTS OF CARBON NANOCLUSTERS

A.V. Gilyazova^{*,**}, G.V. Kornilaeva^{**}, A.N. Ponomarev^{***},
V.A. Chereshev^{****}, E.V. Karamov^{*,**}

^{*}*Institute of Immunology, Moscow, Russia;*

^{**}*D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow, Russia;*

^{***}*Scientific-Technology Center of Applied Nanotechnologies,
St-Petersburg, Russia;*

^{****}*Institute of Immunology and Physiology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ekaterinburg, Russia*

Taking into account the increase in the number of new HIV infections among women, especially in developing countries, the development of topical microbicides is an important part of comprehensive measures to prevent HIV/AIDS. In this work we investigated the water-soluble adducts of carbon nanoclusters (ANCC), which are active against strains of HIV-1, for the development of anti-HIV microbicides. All tested water-soluble adducts of carbon nanoclusters, which differ in method of preparation (reference, № 2, № 5, № 6, ANCC, and ANCC solution), are low-toxic to cells CEM SS: 50% toxic dose was not achieved. Study of antiviral activity showed that water-soluble adducts of carbon nanoclusters have a low inhibitory activity against HIV-infection *in vitro*. 50% effective dose (ED50) of this group of drugs is in the range 21.4–27.5 µg/ml. It was revealed significant virucidal effect: all the samples can inactivate the virus, preventing infection of target cells. The most effective drug is a light fraction of ANCC.