

АДСОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ЭМУЛЬСИЙ ПЕРФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИРУСОВ

Е.В. Терешина

Российский НИИ геронтологии Минздрава РФ, г. Москва

Эмульсии перфторорганических соединений (ПФС) представляют собой дисперсии искусственных гидрофобных соединений в воде. Частицы дисперсии содержат ядро, составленное либо из индивидуальных ПФС, либо из их смесей, покрытое монослоем из амфифильных соединений. При приготовлении эмульсии поверхностный монослой образуется из молекул эмульгатора, проксанола или фосфолипидов яичного желтка, которые используются для диспергирования ПФС - маслообразных жидкостей. При инфузии эмульсий ПФС в кровоток или при инкубации с различными липидсодержащими средами на частицах образуется новый монослой, который в качестве основных компонентов содержит фосфолипиды (ФЛ) и холестерин (ХС). Состав ФЛ и количество ХС в монослое зависят от качественного состава гидрофобного ядра. ПФС, имеющие различную химическую структуру, демонстрируют предпочтительную аффинность к тем или иным классам ФЛ. Адсорбция ХС начинается только после того как на поверхности частицы сформируется монослой, состоящий целиком из ФЛ (в случае использования фосфолипидного эмульгатора) или из ФЛ и остаточного количества проксанола (в случае использования этого синтетического поверхностно-активного вещества). Эмульсии ПФС обладают огромной адсорбционной поверхностью и способны извлекать из липидсодержащей среды значительные количества холестерина. Такой средой может быть цельная кровь, плазма, взвесь эритроцитов, липопротеиды. Частицы дисперсии ПФС не способны индуцировать отток ХС от мембран лимфоцитов. Очевидно, это обусловлено особенностями клеточной поверхности, препятствующими непосредственному контакту частиц эмульсии с липидным бислоем. Отток ХС с донорной на акцепторную структуру происходит при непосредственном контакте двух поверхностей без участия переносчиков.

Индуктировать отток ХС из любой среды, содержащей его в доступной форме, способны и другие дисперсии, такие как жировые эмульсии и липосомы. Жировые эмульсии являются дисперсией триглицеридов, которые образуют при 37°C жидкую фазу, в воде. Частицы такой дисперсии окружены монослоем из ФЛ. Липосомы также образуют с водой дисперсную систему. Однако частицы этих дисперсий не содержат гидрофобное ядро и представляют собой везикулу, состоящую из одного или нескольких липидных бислоев. Любая частица дисперсии типа «масло в воде», имеющая в поверхностном монослое ФЛ, способна адсорбировать ХС. По своим характеристикам как адсорбент ХС, предназначенный для практического использования, эмульсии ПФС превосходят жировые эмульсии и липосомы. Будучи химически инертными соединениями, они не подвергаются атаке липолитических ферментов и не разрушаются, подобно липосомам, при взаимодействии с белками.

Высокая адсорбционная активность дисперсий ПФС по отношению к ХС может найти широкое применение, например, в качестве внутривенного сорбента. Представляет интерес использование дисперсий ПФС для снижения инфекционности вирусов, имеющих липидную оболочку. Существует довольно многочисленная группа вирусов, к которым относятся в частности вирус везикулярного стоматита, вирус гриппа, вирус иммунодефицита человека и др., нуклеокапсиды которых заключены в липидную оболочку (1, 3, 4, 10, 14, 18). Липиды оболочки принимают участие в первичном акте взаимодействия вируса с клеткой-мишенью, а именно в закреплении

вируса на поверхности клетки. Вирусные липиды могут определять степень экспозиции мембранных белков на поверхности вирусной частицы, что влияет на способность вируса прикрепляться к плазматической мембране клетки (5, 11). Химическая модификация липидов оболочки различными агентами приводит к полной утрате вирусом способности инфицировать клетку (12, 14, 19). На взаимодействие вирусов, имеющих липидную оболочку, с клеткой может влиять и такое «инертное» (не обладающее активными полярными группами) соединение как ХС. ХС оказывает влияние на активную ориентацию специфических мембраносвязанных белков оболочки, изменяя ее микровязкость (13, 15, 16, 17). Показано, что ХС легко обменивается между одноламеллярными фосфатидил-холиновыми (ФХ) везикулами и вирусом гриппа. Инкубация с ФХ липосомами при 37° С приводила к тому, что около 65% ХС выходило из вирусной оболочки, при этом размеры и субструктура вируса не нарушались. Потеря ХС влияет на инфекционность вируса. Так, через час после инкубации вирусная оболочка потеряла до 30% ХС, и инфекционность вируса составила только 14% (17, 21). Липосомы - «неудобный» инструмент для прямого наблюдения оттока ХС с плазматических мембран, так как они очень неустойчивы даже в инкубационной среде, поэтому о способности липосом сорбировать ХС судили по его остаточному содержанию в оболочке.

В Израиле была разработана модельная жировая эмульсия AL-721 (active lipid) (6), которая представляет собой смесь липидов, получаемых из яичного желтка. Она содержит 70% ацилглицеридов, 20% ФХ и 10% фосфатидилэтаноламина.

AL-721 был испытан на культуре Т-лимфоцитов, зараженных HTLV-III (20) и ВИЧ (6). Эксперименты показали, что препарат влияет на липидную оболочку вируса, снижая в ней содержание ХС и модифицируя тем самым ее состав и микровязкость. Вслед за изменением липидного состава оболочки изменяется активная конформация белков оболочки - гликопротеидов, ответственных за связывание вируса с клеткой (8, 11). Было проведено клиническое испытание этого препарата как средства профилактики и лечения СПИДа и СПИД-ассоциированного комплекса (7, 9). Проводили мониторинг уровня антител против ВИЧ в циркуляции и количества Т-лимфоцитов. Препарат применялся перорально в дозе 10 г в сутки утром натощак в течение 16 месяцев (самый длительный срок) ежедневно, причем больные находились на обезжиренной диете (AL-721 был единственным источником пищевого жира). Другие противовирусные препараты в этот период не применялись. Была показана эффективность препарата у серопозитивных бес-симптоматических больных. Количество антигенов снижалось и оставалось на низком уровне в течение всего срока приема препарата (22).

В связи с этим, представляет интерес использование модели инфицирования клеток вирусом, имеющим липидную оболочку, для оценки эффективности влияния различных дисперсий гидрофобных соединений (жировые эмульсии, эмульсии ПФС) на липидный бислой и, соответственно, на способность вируса инфицировать клетку.

С этой целью были использованы коммерческие жировые эмульсии Интралипид 10% и Интралипид 20%, а также эмульсия ПФС, стабилизированная проксанолом (Перфторан) и эмульсия, стабилизированная проксанолом и смесью яичных фосфолипидов (Перфукол). Интралипид 10% помимо основного продукта содержит большое количество бесхолестериновых мультламеллярных липосом, обладающих свойством активно сорбировать мембранный ХС. Оказалось, что и коммерческие эмульсии, и модельные эмульсии ПФС обладают высокой протективной активностью в культуре МТ-4 лимфоцитов, зараженных ВИЧ-1 (табл.). Жировые эмульсии и эмульсии ПФС демонстрировали практически одинаковую протективную активность, несмотря на то, что обладали различным адсорбционным потенциалом. Во всех случаях

протективная активность зависела от концентрации частиц эмульсии в культуральной среде и снижалась при повышении концентрации с 100 до 300 мкг/мл (рис.).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффективность сорбции ХС частицами эмульсии не пропорциональна количеству частиц в инкубационной среде. Наиболее активно сорбция ХС происходит, по-видимому, при определенных концентрационных соотношениях частиц донора и акцептора ХС.

Данные, представленные в таблице, косвенно указывают на то, что снижение протективной активности при повышении концентрации может быть связано не со способностью исследованных препаратов связывать мембранный ХС, а с возрастанием цитотоксического эффекта, подобного тому, который наблюдался при взаимодействии макрофагов с ФХ липосомами (2).

Табл. Протективная активность Интралипида 10% и 20%, эмульсии Перфторан и эмульсии Перфукол в культуре лимфоцитов, зараженных ВИЧ-1

Наименование препарата	Концентрация препарата мкг/мл	Цитотоксичность (% жизнеспособных клеток в незараженной культуре)	Протективная активность (% жизнеспособных клеток в зараженной культуре)
Контроль клеток	-	91	-
Контроль вируса	-	-	46
Положительный контроль (азидотимидин)	0,015	89	87
Интралипид 10%	100	90	80
Интралипид 10%	300	90	6
Интралипид 20%	100	91	65
Интралипид 20%	300	91	5
Эмульсия 1	100	89	77
Эмульсия 1	300	89	7
Эмульсия 2	100	89	83
Эмульсия 2	300	89	6

Было проведено исследование зависимости количества жизнеспособных клеток в культуре от концентрации частиц эмульсии Перфторан и эмульсии Перфукол (рис.). Проведенные ранее исследования показали, что для эмульсии Перфукол зависимость ХС-акцепторной способности от концентрации выражена наиболее отчетливо, чем для эмульсии Перфторан. Однако в общем случае протективная активность эмульсий ПФС зависит от количества частиц ПФС в среде и выражена для двух типов эмульсий практически одинаково. Наибольшую протективную активность эмульсии проявляют в диапазоне концентраций 100-300 мкг/мл. При возрастании концентрации частиц количество жизнеспособных клеток снижается, а эмульсия Перфторан при больших концентрациях обнаруживает даже цитотоксический эффект. Как показали наши исследования, инфузия 5% раствора проксанола не вызывает значительных изменений в соотношении ХС\ФЛ в мембране эритроцитов, следовательно, проксанол не акцептирует мембранный ХС. Между тем, в определенных концентрациях проксанол вызывает изменение микровязкости мембраны, что может препятствовать успешной адсорбции вируса на поверхности клетки. Можно предположить, что цитотоксический эффект, наблюдаемый при концентрации эмульсии Перфторан равной 500 мкг/мл,

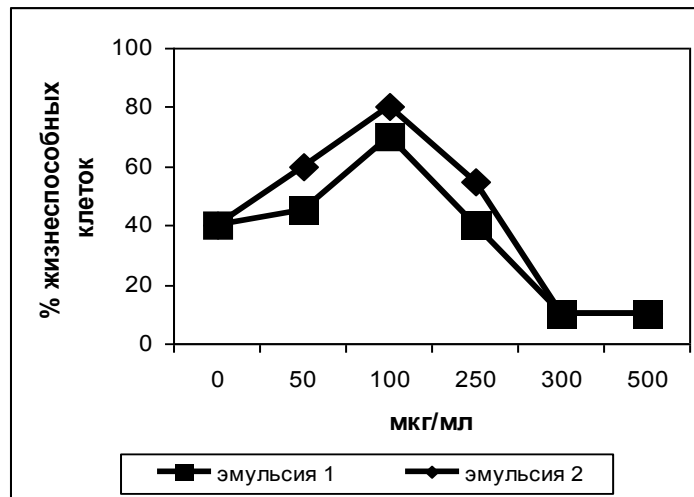


Рис. Зависимость количества жизнеспособных клеток в культуре MT-4 лимфоцитов, зараженных ВИЧ-1 от концентрации частиц эмульсии Перфторан и эмульсии Перфукол в инкубационной среде

обусловлен также возрастанием концентрации проксанола в среде. Однако эмульсия Перфукол содержит меньше проксанола, чем эмульсия Перфторан, а цитотоксический эффект этой дисперсии проявляется в той же степени. При исследовании ФХ липосом их цитотоксический эффект проявлялся при концентрациях более 300 мкг/мл (16). Возможно, при взаимодействии частиц двух дисперсий - частиц эмульсии и клеток - проявляются некие еще не изученные закономерности.

Таким образом, показано, что дисперсии ПФС, независимо от состава гидрофобного ядра и эмульгатора, который использовался при их приготовлении, обладают одинаковым свойством в значительной степени снижать инфекционность вируса иммунодефицита человека в культуре. Это их свойство может быть использовано для превентивной обработки донорской крови в целях снижения риска переноса ВИЧ-инфекции при переливании донорской крови и ее компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колонцов А.А. Липиды вирусов африканской чумы свиней //Мол. Генетика, вирусол. и микробиол. -1993.-Т.6.-С. 16-22.
2. Никитина Р.А., Халилов Э.М., Торховская Т.Н., Тертов В.В., Орехов А.Н. Снижение атерогенности сыворотки крови т у11го под воздействием мицелл полиненасыщенного фосфатидилхолина //Бюл. Экспер. Биол. Мед. - 1995. - №5. - С. 497 - 505.
3. Aloia R.C., F.C. Jensen, C.C, Curtain, P.W. Mobley, L.M. Gordon. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. //PNAS USA. -1988. -V.85.-P.900- 911.
4. Ben-Porat T., A.S. Kaplan. Studies on the biogenesis of herpes virus envelope. // Nature (London). - 1972.-V.235.-P.165-172.
5. Choppin P.W., A.Schild. The role of viral glycoproteins in absorption, penetration and pathogenicity of viruses. //Rev. Infect. Dis. - 1980. - V.2. - P.40.
6. Crews F.T.J., P.I.Laurence, M.E.Scheer, P.Wensler, C.Satin, C.Klepner, A.S.Lippa. Modification of HIV envelope lipids protein structure and infectivity by AL 721 - a unique lipid mixture. //J.Cell Biochem. -Abstr.P304. - 1987.
7. Grieco M.N., M. Lange, M. Reddy, C. Metroka. Open study of AL-721 treatment of HIV-infected subjects with generalized lymphadenopathy syndrome. //Antiviral Res. -

1988. - V.9. - P. 177 -190.

8. Hasetline W.A., F. Wong-Staal. The molecular biology of AIDS virus.//Sci. Am. - 1988. - N.10 - P.34-44.

9. Klajman A. Treatment of AIDS with AL-721. //Isr. I Med. Sci. - 1990. - V.26. - P.2-5.

10. Kluge S., P. Nuhn, N.P.Kertscher, B.Dobner. Effect of lysolecithin analogues on plant viruses. // Acta Virol. - 1984. - V.28. - P. 128 -134.

11. Kowalska M., J.Potz, L.Basiripose. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 //Science.-1987. -V.237. -P.1351-1360.

12. Kucera L.S., N. Iver, E. Leake. Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectiuos HIV-1 production and induce defective virus formation. //AIDS Res. Human Retroviruses. -1990. - V.6. -N.4. -P.491 -498.

13. Lenard J., R.W. Compans. The membrane structure of lipid-containing viruses. // Bioph. Biochem. Acta. -1974.-V.344.-N.51-57.

14. Mitzulani H. Action of phospholipase C on influenza virus. //Nature (London). - 1964. - V.204. P.781 - 787.

15. Moore N.F., E.J. Patzer, J.M. Shaw, T.E. Thompson, R.D. Wagner. Interaction of vesicular stomatitis virus with lipid vesicles: depletion of cholesterol and effect on virion membrane fluidity and infectivity. //J. Virol. -1978. -V.27.-P.320- 326.

16. Oie M. Reversible inactivation and reactivation of vaccinia virus by manipulation of viral lipid composition. //Virology. - V. 142. - P.299-308.

17. Pal R., Y. Barentholz, R.Wagner. Effect of cholesterol concentration on organization of viral and vesicle membranes. //J.Biol. Chem. -1980. - V.255. - P.5802 - 5810.

18. Patzer E.J., J.M. Shaw, N.F. Moore, T.E. Thompson, R.R. Wagner. Transmembrane movement in the membrane of vesicular stomatitis virus. //Biochemistry. -V. 17.-P.4192-4198.

19. Piantadosi C., CJ. Marasco, S.L. Morris-Natshke. Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity. //J. Med. Chem. -1991.-V.34.- P. 1408-1415.

20. Sarin P.S., R.C. Gallo, P.I. Scheer, F. Crews, A.S. Lippa. Effects of a novel compound (AL-721) on HTLV-III infectivity in vitro. //N. Engl. J. Med. - 1985. -V.313.- P.1289-1295.

21. Sefton B.M., BJ.Gafthey. Complete exchange of viral cholesterol. //Biochemistry. -1979. - V.18. - P.438 - 444.

22. Yust I., N.Vardinov, Y.Skornick. Reduction of circulating HIV antigens in seropositive patients after treatment with AL-721. //Br. J. Med. Sci.-1995.- V.53.-P.542-549