

Получение липосомальных форм модифицированных пиримидиновых нуклеозидов и изучение их антибактериальных свойств

И. Л. КАРПЕНКО¹, Г. М. СОРОКОУМОВА², И. Г. СУМАРУКОВА³,
С. К. ГАЙДУКЕВИЧ², М. А. ЗАРЕЦКАЯ², О. В. ЕФРЕМЕНКОВА^{3*}, Л. А. АЛЕКСАНДРОВА¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

² Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий, Москва

³ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Development of Liposomal Forms of Modified Pyrimidine Nucleosides and Investigation of Their Antibacterial Properties

I. L. KARPENKO¹, G. M. SOROKOUMOVA², I. G. SUMARUKOVA³, S. K. GAYDUKEVICH²,
M. A. ZARETSKAYA², O. V. EFREMENKOVA³, L. A. ALEXANDROVA¹

¹ V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

² Moscow Technological University, Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow

³ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Созданы комплексы различного состава фосфохолин-кардиолипин-производные 2'-дезоксиуридина, что позволило получить водорастворимую форму аналогов нуклеозидов с установленной ранее противотуберкулёзной активностью. Установлено, что полученные липосомы эффективно проникают в клетки, а возрастание цитотоксичности, свидетельствует об увеличении накопления нуклеозида в клетках. Этот результат подтверждает возможность применения липосомальных форм для доставки малорастворимых соединений в клетки для дальнейшего изучения их эффективности. Показано, что введение модифицированных нуклеозидов в липосомальной форме в бактериальные клетки не влияет на рост последних.

Ключевые слова: липосомы, модифицированные пиримидиновые нуклеозиды, фосфолипиды, цитотоксичность, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*.

Different phosphocholine-cardiolipin-2'-deoxyuridine inclusion complexes were developed, that allowed to compose a water-soluble form of nucleoside analogues with previously defined antituberculosis activity. It was found that the resulting liposomes effectively penetrated to the cells. The increase of cytotoxicity was undoubtedly indicative of accumulation of the nucleoside in the cell culture. The result proved the ability of the liposomes for delivery of the low-soluble compounds to the cells for further investigation of their efficacy. It was shown that treatment of the bacterial cells with the liposomes of the modified nucleosides did not affect the bacterial growth.

Key words: liposomes, modified pyrimidine nucleosides, phospholipids, cytotoxicity, *Mycobacterium tuberculosis*, *M.smegmatis*.

Введение

Согласно статистическим данным, в Российской Федерации наблюдается высокий уровень заболевания туберкулёзом [1]. Интенсивное применение в терапии туберкулёза препаратов первого и второго рядов привело к возникновению большого количества штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, обладающих либо множественной (МЛУ) либо широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивостью к препаратам и, вследствие этого, к значительным осложнениям при лечении [2]. В

связи с этим чрезвычайно актуальными являются как поиск новых лекарственных препаратов, активных в отношении резистентных штаммов патогена, так и разработка эффективных способов их доставки.

Липосомы представляют собой замкнутые сферические структуры, содержимое которых отделено от окружающей среды фосфолипидным бислоем. Важным достоинством липосомальных форм лекарственных соединений является возможность осуществления внутриклеточной доставки малорастворимых лекарственных субстанций. Липосомы (как мультиламмелярные, так и одноламмелярные везикулы) активно используются в лекарственных формах уже существующих противотуберкулёзных препаратов, в частности, в

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: ФГБНУ «НИИНА», Москва 119021, ул. Б. Пироговская, 11. НИИНА им. Г. Ф. Гаузе. E-mail: ovefr@yandex.ru.

аэрозолях [3–6]. Поскольку природные фосфолипиды активируют антимикробактериальный врождённый иммунный ответ [3], липосомальные формы препаратов часто более эффективны, чем водные растворы или таблетированные формы последних [6]. Включение препаратов в липосомы приводит к увеличению растворимости и улучшению фармакокинетических характеристик, позволяющему понизить применяемую дозу препарата. Для противотуберкулёзных лекарственных препаратов показано также, что включение их в липосомы снижает токсичность, позволяет пролонгировать их действие и обеспечивает доставку препарата в инфицированные макрофаги организма хозяина, которые способны к слиянию с липосомами [7–10]. В отечественной и зарубежной литературе приводятся варианты эффективных липосомальных лекарственных форм для рифампицина и изониазида [10–13], а также и для рифабутина [14].

Аналоги нуклеозидов успешно применяются для терапии вирусных инфекций (ВИЧ, герпеса, гепатитов и др.) [15]. В начале этого столетия была впервые продемонстрирована их способность ингибировать рост микобактерий (в том числе *M. tuberculosis*) *in vitro* [16], а затем показано подавление роста *M. tuberculosis* отрицательно-заряженными фосфолипидами (ОЗФ) [17, 18]. Весьма перспективным в этой связи представляется объединение этих двух подходов.

Целью данной работы являлось изучение влияния ОЗФ в составе липосом на антибактериальную активность и цитотоксичность последних, а также получение липосомальных форм модифицированных пирамидиновых нуклеозидов, обладающих противотуберкулёзной активностью, и определение вносимых ими изменений в эти показатели.

Материал и методы

Объект исследования. Объектами исследования были 5-алкилоксиметильные и (4-алкил-1,2,3-триазол-1-ил)-метильные производные 2'-дезоксиуридуна (рис.1), синтезированные по описанным методикам [19, 20]; большие одноламеллярные везикулы (БОЛВ) на основе фосфолипидов (ФЛ) и комплексы, образуемые за счёт включения аналогов нуклеозидов в состав БОЛВ. Для создания БОЛВ применяли фосfatидилхолин (ФХ) из сои — LipoidS 100 (LipoidGmbH, Германия) 97% чистоты; отрицательно заряженные фосфолипиды (ОЗФ) — фосфатидную кислоту (ФК) и фосфатидилглицин (ФГ), полученные методом перефосфатилирования ФХ [21], динатриевую соль кардиолипина (КЛ) из сердца крупного рогатого скота, (AvantiPolarLipids, США). Использовали БОЛВ, образованные различно заряженными липидами в соотношениях 4:1, 2:1; 1:1; 1:2 и 1:4 и БОЛВ на основе ФХ и флуоресцентномеченного ФХ (1-олеоил-2-[12-[(7-нитро-2-1,3-бензоксидаизол-4-ил)амино]додеcanoил]-sn-глицеро-3-фосфохолина (NBD PC Ex/Emit 460/534 нм) в соотношении 19:1

Оборудование Липосомы получали при помощи экструдера LiposoFast-Basic (Avestin, Inc., США) с двумя микроприцами (Hamilton, Швейцария) на 1 мл каждый, с использованием поликарбонатных фильтров Nuclepore (Whatman, США) с диаметром пор 100 нм.

Гель-фильтрацию проводили на колонке illustra NAP 5 Sephadex G-25 DNAGrade (GEHealthcare, Великобритания).

Спектры в видимой и ультрафиолетовой областях регистрировали на спектрофотометре UV 1700 PharmaSpec (Shimadzu, Япония).

Результаты МТТ-теста определяли на планшетном ридере Chameleon (Hidex, Финляндия)

Штаммы микроорганизмов. В качестве тест-штаммов для определения антимикробной активности использовали 3 коллекционных штамма бактерии *Mycobacterium smegmatis* ВКПМ Ac 1339; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Культуры клеток. Для определения цитотоксичности производных 2'-дезоксиуридуна и фосфолипидов и изучения проникновения БОЛВ в клетки использовали перевиваемые культуры клеток: аденоактиномы лёгких А549 из коллекции ИМБ РАН и макрофаги мыши J774 из коллекции ИБХ РАН. Клетки выращивали в среде DMEM (Gibco, Life Technologies, США) с 10% эмбриональной сывороткой телёнка (HyClone, Великобритания).

Получение БОЛВ. Навеску липида (ФХ, ФК, ФГ и КЛ) массой 20 мг растворяли в спирте и упаривали при 34°C. Полученную липидную пленку диспергирували в 1 мл фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) и перемешивали на Vortex до полного перехода липида со стенок колбы в водный раствор. В случае приготовления БОЛВ из ФК применяли технику четырёхкратного замораживания мультиламеллярных везикул МЛВ с помощью жидкого азота с последующим их оттаиванием. Далее методом экструзии дисперсии МЛВ через поликарбонатный фильтр с размером пор 100 нм получали липидные БОЛВ.

Липосомы с добавлением флуоресцентномеченого фосфолипида NBD-PC получали по вышеописанной методике.

Стоковая концентрация всех исследованных липидов составляла 20 мг/мл.

Получение БОЛВ, содержащих С-5-модифицированные 2'-дезоксиуридины (Н3). БОЛВ:Н3 получали экструзией дисперсии мультиламеллярных везикул, состоящих из различных липидов и модифицированных нуклеозидов, через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 100 нм. Навеску 20 мг ФХ растворяли в этаноле и добавляли 200 мкл стокового раствора Н3 в этаноле (5 мг/мл). Смесь упаривали при температуре 34 °C. Далее получали БОЛВ из ФХ:Н3 (20 мг/мл ФХ:1 мг/мл Н3) по вышеописанной методике. Для определения концентрации и степени включения Н3 в липосомы проводили гель-фильтрацию липосомальных форм Н3 через колонку illustra NAP 5, заполненную сорбентом Sephadex G-25. На слой сорбента наносили 500 мкл образца БОЛВ с Н3 (0,5 мг Н3). Фракции элюировали фосфатно-солевым буфером (рН 7,4), при этом Н3 в составе липосом выходил в первой фракции объёмом 1,5 мл (выход БОЛВ с колонки контролировали спектрофотометрически при длине волн 750 нм), а Н3, не включившийся в липосомы — во второй фракции объёмом 1,5 мл (отсутствие липосом во фракции контролировали при длине волн 450 нм). Для определения степени включения Н3 в липосомы разрушали липосомальную фракцию этанолом, добавляя к 10 мкл фракции 990 мкл этанола. Полноту разрушения липосом контролировали спектрофотометрически при длине волн 450 нм. Далее измеряли оптическую плотность разрушенной липосомальной фракции при длине волн 265–266 нм. Чтобы определить количество не включившегося в липосомы Н3, измеряли оптическую плотность неразбавленной фракции при длине волн 276–279 нм. Затем рассчитывали степень включения и загрузку Н3 в липосомы.

Определение цитотоксического эффекта. Определение цитотоксичности проводили методом МТТ-теста [22] в трёх повторах. При определении цитотоксичности производных 2'-дезоксиуридуна использовали их растворы в ДМСО в стоковой концентрации 20 мг/мл.

Определение локализации БОЛВ в культурах клеток. Для определения локализации БОЛВ в клетках использовали флу-

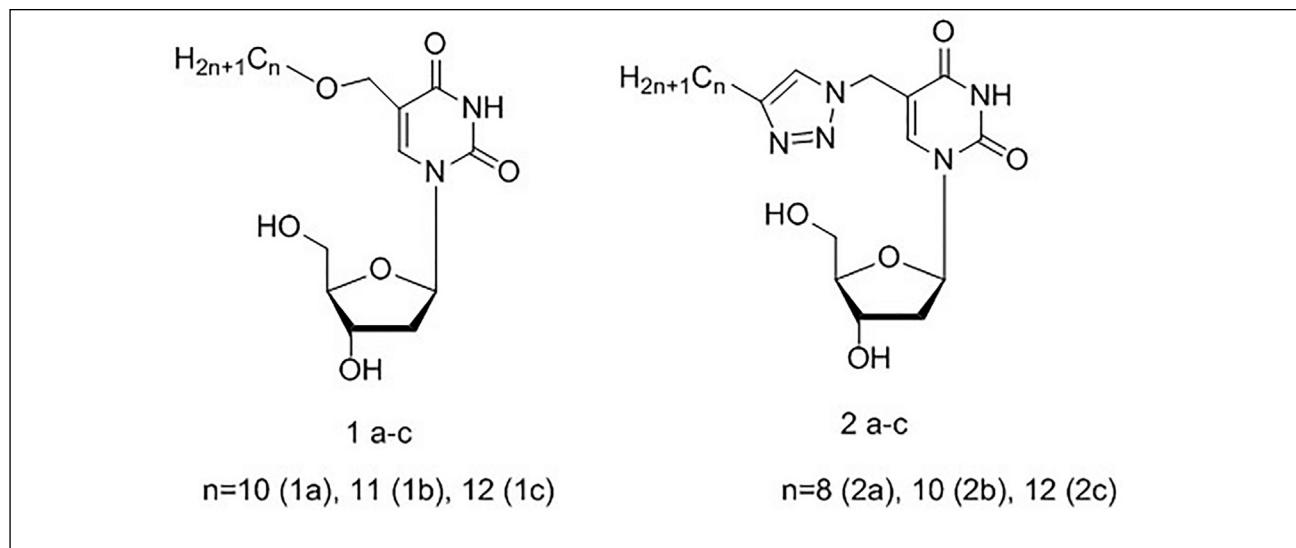


Рис. 1. Структура 5-алкилоксиметильных (1) и 5 алкилтриазолилметильных (2) производных 2'-дезоксиуридина.

рессетномеченный фосфолипид NBD-PC. Липосомы, содержащие NBD-PC в концентрации 0,5 мг/мл добавляли к культурам клеток A549 и J774 и инкубировали в течение 20 ч. Далее культуру клеток промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4), добавляли к клеткам среду DMEM без содержания фенолового красного и краситель NucBlue (30 мкг/мл среды), связывающийся с ядерной ДНК. Затем определяли локализацию липосом методом флуоресцентной микроскопии.

Определение antimикробной активности. Для стерилизации растворов использовали мембранны с диаметром пор 0,22 мкм MILLEX®GP фирмы MILLIPORE IRELAND. В жидкую питательную среду вносили 10%/об исходных растворов соединений. При выборе тест-штаммов для определения антибиотических свойств исследуемых веществ учитывали их способность расти в присутствии 10% указанной смеси (контроль роста). Эксперименты проводили в соответствии с ранее разработанными для каждого микроорганизма методиками [23].

Результаты и обсуждение

Как сообщалось нами ранее [16, 24, 25], 5-алкилоксиметильные и (4-алкил-1,2,3-триазол-1-ил)-метильные производные 2'-дезоксиуридина (рис. 1) и 5-(1-алкинильные) производные карбоциклических нуклеозидов [26] проявили высокую противотуберкулёзную эффективность на двух штаммах *M. tuberculosis* — лабораторном H37Rv и клиническом изоляте с МЛУ MS-115 (устойчивом к действию 5 противотуберкулёзных

препаратах 1-й линии). Максимальная активность была показана для соединений 1с и 2b и составляла на обоих штаммах 10—20 мкг/мл. Было продемонстрировано также ингибирование роста ряда грамположительных бактерий и грибов [27].

Ранее нами было также показано [18], что отрицательно-заряженные фосфолипиды в высоких концентрациях (выше 335 мкМ) ингибируют рост и вызывают гибель клеток грамотрицательных (*E.coli* BL21(DE3) и грамположительных (*M.tuberculosis* H37Rv) бактерий. Мы полагали, что включение аналогов нуклеозидов в состав липосом позволит повысить их растворимость и, возможно, увеличить их биодоступность.

В настоящей работе были получены липосомы, сформированные на основе как положительно-заряженного фосфолипида (ФХ), так и ряда отрицательно-заряженных (ФК, ФГ, КЛ) фосфолипидов, проваривали соотношение ФХ:ОЗФ. Полученные образцы были охарактеризованы методом динамического и электрофоретического рассеяния света, при этом определяли гидродинамический диаметр наночастиц (d), полидисперсность системы (PDI) и дзета-потенциал (поверхностный заряд) липосом (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика «пустых» БОЛВ различного липидного состава

Липидный состав БОЛВ	Гидродинамический диаметр БОЛВ, нм	Полидисперсность системы	Дзета-потенциал БОЛВ
ФХ	151,2±42,3	0,142	-1,52±0,8
ФК	135,5±33	0,127	-36,4±2,5
ФГ	96±18,9	0,130	-27,7±1,5
КЛ	124±24,2	0,102	-43,3±3,1
ФХ/ФК (1:1)	145,5±33	0,130	-20,5±2,6
ФХ/ФГ (1:1)	126,4±30	0,133	-18,3±2,4
ФХ/КЛ (1:1)	130,6±35	0,125	-22,8±2,5

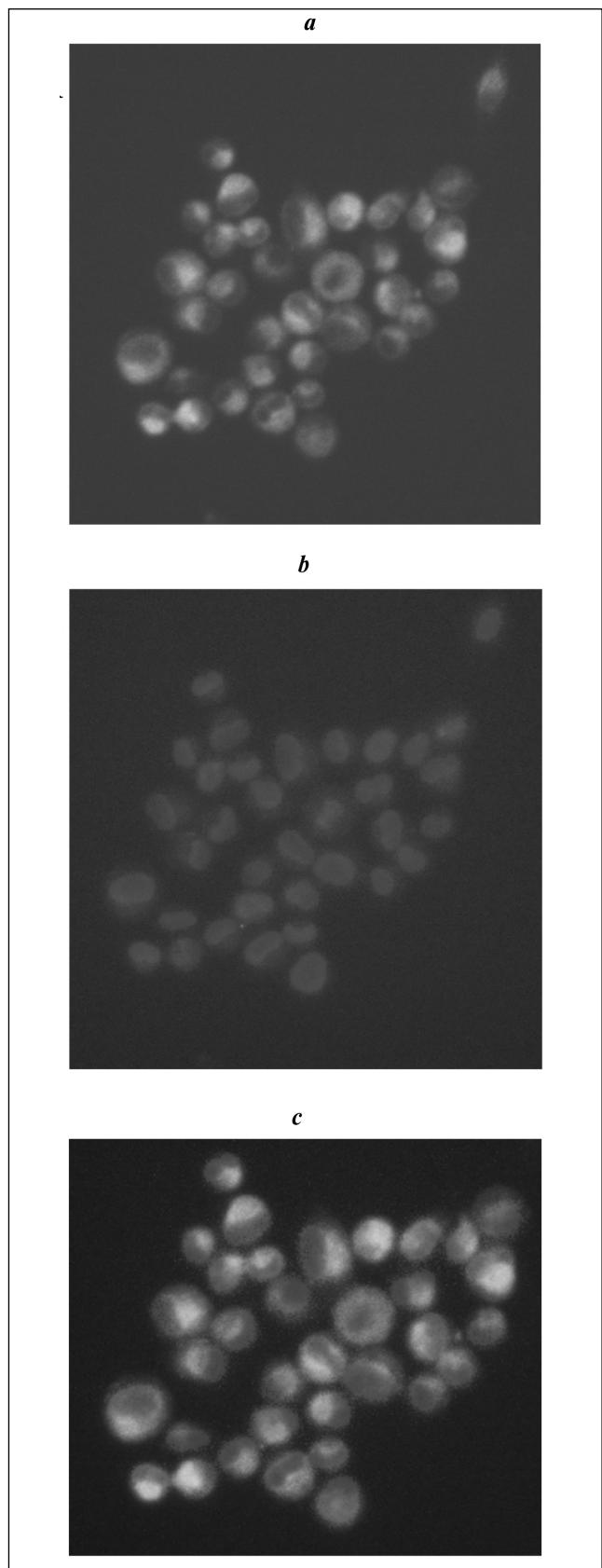


Рис. 1. Проникновение БОЛВ состава ФХ:NBD-PC в культуру клеток А549.

a – клетки, содержащие БОЛВ-ФХ:NBD-PC; *b* – клетки, окрашенные NucBlue; *c* – наложение изображений с различным окрашиванием.

Анализ табл. 1, показывает, что все исследуемые БОЛВ представляют собой системы гомогенных наночастиц размером менее 200 нм, имеющие отрицательный заряд, не превышающий величины 46 мВ.

Проникновение липосом в культуры клеток А549 и J774 (для последних результаты аналогичны и не представлены) и их локализацию определяли методом флуоресцентной микроскопии. Для этого были использованы БОЛВ, состоящие из ФХ и его флуоресцентномеченого аналога: 1-олеоил-2-[12-[(7-нитро-2-1,3-бензоксиазол-4-ил)амино] додеканоил]-спиро-глицеро-3-фосфохолина (NBD-PC). При этом, наиболее контрастные изображения получались при соотношении ФХ:NBD-PC = 19:1 (рис. 2, *a*). Из рис. 2, *a* следует, что БОЛВ эффективно проникает в клетки, а применение красителя NucBlue, связывающегося с ядерной ДНК (рис. 2, *b*), позволило выявить локализацию БОЛВ в цитоплазме (рис. 2, *c*).

Существенной характеристикой соединений, применяемых в терапии, является их цитотоксичность. Комплекс БОЛВ с НЗ мог существенно влиять на увеличение цитотоксичности как аналога нуклеозида, за счёт увеличения биодоступности, так и липосом, за счёт изменения ряда характеристик последних. Цитотоксичность синтезированных соединений определяли на культурах клеток А549 и J774. Поскольку растворимость исследованных нами производных 2'-дезоксиуридина в воде составляет не более 1 мкг/мл, при проведении МТТ-теста и определении их активности на ряде патогенов были использованы растворы соединений в ДМСО. Значение ЦД₅₀ составило ≥100 мкг/мл, что соответствует ЦД₅₀, описанным в литературе соединениям, проявляющих антибактериальную активность [28].

Цитотоксичность БОЛВ из ФХ и БОЛВ смешанного состава также оценивали на культурах клеток А549 и J774. БОЛВ из ФХ:ФЛ получали в четырёх различных соотношениях 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 (табл. 2).

БОЛВ-ФХ в концентрациях 50–70 мкг/мл проявляли пролиферативный эффект, что подтверждает литературные данные и результаты, полученные нами на предварительном этапе работы. При соотношении ФХ:ОЗФ = 4:1, 2:1 и 1:1 также наблюдался пролиферативный эффект в диапазоне 70–300 мкг/мл концентраций, что видимо обусловлено высокой концентрацией ФХ (данные не приводятся).

Увеличение количества включённого отрицательно-заряженного фосфолипида хотя и приводило к возрастанию цитотоксичности, однако позволяло купировать пролиферацию клеток. Наиболее явно эта зависимость проявилась для

Таблица 2. Значения ЦД₅₀ для трёх серий БОЛВ, включающих фосфатидилхолин (ФХ) и отрицательно-заряженные фосфолипиды (ОЗФ)

Культура клеток	ФХ:ФГ,		ФХ:ФК,		ФХ:КЛ,		ФХ	
	ЦД ₅₀ *, мкг/мл	1:1	ЦД ₅₀ *, мкг/мл	1:1	ЦД ₅₀ *, мкг/мл	1:1	ЦД ₅₀ *, мкг/мл	1:4
A549	800	800	450	300	600	300	250	>400
J774	1000	1000	1000	450	1000	70	H.o	>600

Примечание.* – ЦД₅₀ – доза препарата, подавляющая рост неинфицированной культуры клеток на 50%; ** – пролиферативный эффект (концентрации БОЛВ из ФХ, при которых наблюдается пролиферация клеток).

Таблица 3. Определение антибактериальной активности в отношении БОЛВ из ФХ:КЛ** на основе отрицательно-заряженных фосфолипидов на *M.smegmatis*, *E.coli* и *P.aeruginosa*

Тест-микроорганизмы	Контроль *	БОЛВ из ФХ:КЛ**, мкг/мл		
		250	500	750
<i>M.smegmatis</i> ВКПМ Ac 1339	+	++	+++	+++
<i>E.coli</i> ATCC 25922	+	+++	+++	+++
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	+++	+++	+++	+++

Примечание.* – по 0,9 мл зараженной среды; ** – исходная концентрация БОЛВ в физиологическом растворе – 10 мг/мл.

Таблица 4. Характеристика полученных липосомальных форм Н3

Состав ЛС (липид:нуклеозид)	Масса ФХ, мг	Масса Н3, мг	Масса Н3 в ЛС, мг	Степень включения, %	Загрузка Н3, %
ФХ:1 (n=12)	20	1	0,94±0,03	94±3	4,7±0,2
	20	4		препарат не формируется*	
	40	4		препарат не формируется **	
ФХ:2 (n=10; n=12)	80	4	3,68	92	4,6
	20	1	0,78	78	
	30	1	0,88	88	
	80	4	3,6	90	4,5

Примечание.* – Н3 не растворяется; ** – Н3 выпадает в осадок.

БОЛВ из ФХ:КЛ. Поскольку, как указывалось выше, ранее была показана анти-микобактериальная активность липосом на основе ОЗФ, в частности, кардиолипина [18], мы применили его для создания комплекса БОЛВ с Н3.

Для изучения эффекта включения кардиолипина в состав БОЛВ мы определили активность БОЛВ из ФХ:КЛ состава 4:1 на двух различных бактериях – *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* и на непатогенном представителе микробактерий – штамме *Mycobacterium smegmatis*, часто используемым в качестве модели при поиске антитуберкулёзных препаратов (табл. 3).

Показано, что БОЛВ (ФХ:КЛ) такого состава не подавляли рост испытанных микроорганизмов. Кроме того, рост *M.smegmatis* ВКПМ Ac 1339 и *E.coli* ATCC 25922 на средах со всеми тремя липосомами был эффективнее, по сравнению с контролем, что согласуется с пролиферативным эффектом, показанным на культурах клеток. Более того, на *M.smegmatis* наблюдалась зависимость дозы – активность роста.

Вследствие полученных данных по токсичности и активности как липосом, так и производных 2'-дезоксиуридина при изучении эффективности БОЛВ, содержащих аналоги

нуклеозидов, мы использовали ФХ и КЛ в соотношениях 1:1, 1:2 и 1:4, в концентрациях выше 30 мкг/мл.

Исходя из данных по активности и цитотоксичности нуклеозидов 1 и 2, их содержание в исходном комплексе должно было составлять не менее 1 мг/мл. Нашей задачей было определить концентрацию липида, позволяющего добиться оптимального включения вещества в БОЛВ (табл. 4).

Размер липосом, определённый методом динамического светорассеивания, составлял 200–235 нм. Из табл. 3 видно, что рассмотренные 5-модифицированные производные 2'-дезоксиуридина хорошо включаются в БОЛВ из ФХ (степень включения находится в интервале от 78 до 97 %), причём оптимальное массовое соотношение липиды:Н3 составляет 20:1. При соотношениях липиды:Н3 (5:1 или 10:1 по массе) препарат Н3 на стадии получения водной дисперсии мультиламеллярных везикул не формировался. Часть Н3 не солюбилизовалась и оставалась в осадке.

При получении липосом на основе ФХ и КЛ в соотношении 2:1; 1:1; 1:2 и 1:4 по массе концентрация нуклеозида составляла 1 мг/мл, а количеств-

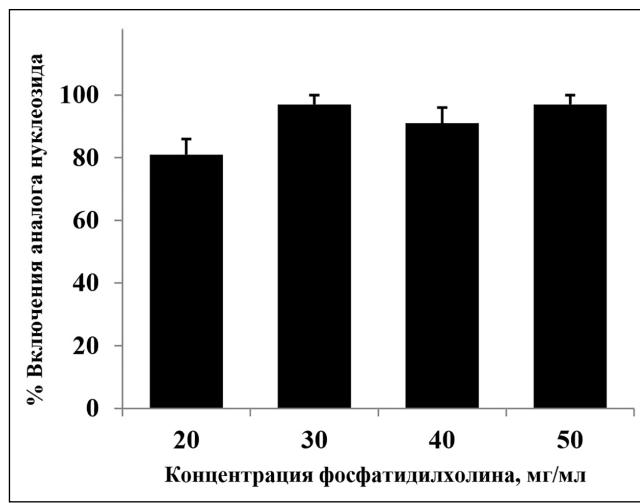


Рис. 3. Эффективности включения производных 2'-дезоксиуридуна в БОЛВ при соотношении ФХ:КЛ 2:1.

во липида варьировали для того, чтобы добиться максимального включения вещества в липосомы (полученные данные представлены на рис. 3).

Результаты эксперимента показали, что во всех исследованных вариантах, оптимальным по эффективности включения модифицированного нуклеозида в липосомы было соотношение ФЛ:НЗ 20:1. При этом увеличение доли отрицательно заряженных фосфолипидов не приводило к существенному увеличению включения модифицированных нуклеозидов в липосомы.

Цитотоксичность синтезированных комплексов оценивали методом МТТ-теста на культурах клеток А549. Включение слабо растворимых аналогов нуклеозидов в состав липосомальных комплексов увеличивало степень их проникновения и накопления в культурах клеток, что приводило к уменьшению цитотоксической дозы как фосфолипида, так и аналога нуклеозида. Для комплекса, содержащего ФХ:КЛ в соотношении 1:1 с включённым аналогом нуклеозида, значение ДД_{50} достигалось при концентрации ФХ:КЛ 500

ЛИТЕРАТУРА

- Couvin D., Rastogi N. Tuberculosis — A global emergency: tools and methods to monitor, understand, and control the epidemic with specific example of the *Beijing* lineage. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015; 95: Suppl 1: S177–189.
- TBDRUGS (Database of Drugs for Tuberculosis, version 1.0). Available from URL: http://bic.icmr.org.in/tbdrugs/tb Browse_name.php
- Greco E., Santucci M.B., Sali M., De Angelis F.R., Papi M., De Spirito M., Delogu G., Colizzi V., Fraziano M. Natural lysophospholipids reduce *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytotoxicity and induce antimycobacterial activity by a phagolysosome maturation-dependent mechanism in A549 type II alveolar epithelial cells. *Immunology* 2010; 129: 125–132.
- Greco E., Quintiliani G., Santucci M.B., Serafino A., Ciccaglione A.R., Marcantonio C., Papi M., Maulucci G., Delogu G., Martino A., Goletti D., Sarmati L., Andreoni M., Alfieri A., Alma M., Caccamo N., Di Liberto D., De Spirito M., Savage N.D., Nisini R., Dieli F., Ottenhoff T.H., Fraziano M. Janus-faced liposomes enhance antimicrobial innate immune response in *Mycobacterium tuberculosis* infection *PNAS* 2012; 109: 21: E1360–1368.
- Delogu G., Sali M., Rocca S., Quintiliani G., Santucci M.B., Greco E., Cabibbo A., Mariani F., Colizzi V., Fadda G., Fraziano M. Lysophosphatidic acid enhances antimycobacterial response during *in vivo* primary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cell Immunol* 2011; 271: 1–4.
- Misra A., Hickey A.J., Rossi C., Borchard G., Terada H., Makino K., Fourie P.B., Colombo P. Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011; 91: 1: 71–81.
- Pandey R., Khuller G.K. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55: 4: 430–435.
- Khuller G.K., Kapur M., Sharma S. Liposome technology for drug delivery against mycobacterial infections. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 26: 3263–3274.
- Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis (Edinb)* 2005; 85: 5–6: 415–420.
- Vyas S.P., Kannan M.E., Jain S., Mishra V., Singh P. Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. *Int J Pharm* 2004; 269: 1: 37–49.
- Курунов Ю.Н., Каледин В.И., Попова Н.А., Пантелеева А.Г. Эффективность липосомальной формыrifampicina при лечении экспериментального туберкулеза мышей. Проблемы туберкулеза. 1992; 1–2: 13–15. / Kurunov Ju.N., Kaledin V.I., Popova N.A., Panteleeva A.G. Jeffektivnost' liposomal'noj formy rifampicina pri lechenii eksperimentálnoj tuberkuléza myšej.

мкг/мл и содержании НЗ 25 мкг/мл. Увеличение уровня кардиолипина в БОЛВ до 1:2 и 1:4 приводило к увеличению цитотоксичности до концентраций 250 мкг/мл ФХ:КЛ: 12,5 мкг/мл НЗ и 200 мкг/мл ФХ:КЛ: 10 мкг/мл НЗ, соответственно.

Изучение антибактериальной активности полученных липосомальных комплексов, содержащих производные 2'-дезоксиуридуна, проведённое на различных тест-штаммах бактерий (*E.coli*, *P.aeruginosa* и *M.smegmatis*) практически соответствовало данным, приведённым в табл. 3, что показывает отсутствие ингибирующего действия липосомальных комплексов на данные бактерии.

Заключение

Таким образом, созданы комплексы различного состава фосфохолин—кардиолипин—производные 2'-дезоксиуридуна, что позволило получить водорастворимую форму аналога нуклеозида. Показано, что образованные липосомы эффективно проникают в клетки, а возрастание цитотоксичности свидетельствует об увеличении накопления нуклеозида в клетках. Этот результат подтверждает возможность применения липосомальных форм для доставки малорастворимых соединений в культуры клеток для дальнейшего изучения их эффективности. Однако введение в бактериальные клетки модифицированных нуклеозидов с установленной противотуберкулёзной активностью в липосомальной форме никак не влияло на рост последних. Возможным объяснением этого явления может быть наличие двух противоположных эффектов — ингибирования роста нуклеозидами и стимуляция роста фосфолипидами. Наложение этих факторов может приводить к кажущемуся отсутствию влияния нуклеозидов на рост клеток.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №15-04-05116 и №14-04 00755.

- tal'nogo tuberkulzoza myshej. Problemy tuberkulzoza. 1992; 1–2: 13–15. [in Russian]
12. Гуревич Г.Л., Березовская Л.Н., Мануилов К.К. Особенности фармакокинетики рифампицина, включенного в липосомы, у крыс при внутривентрахеальном введении. Антибиотики и химиотерапия 1992; 37; 7: 25–28. / Gurevich G.L., Beregovskaja L.N., Manuilov K.K. Osobennosti farmakokinetiki rifampicina, vkljuchennogo v liposomy, u krys pri vnutri- traeal'nom vvedenii Antibiotiki i khimioterapija 1992; 37; 7: 25–28.
 13. Labana S., Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. Int J Antimicrob Agents 2002; 20; 4: 301–304.
 14. Gaspar M. M., Neves S., Portaels F., Pedrosa J., Silva M. T., Cruz M. E. Therapeutic efficacy of liposomal rifabutin in a *Mycobacterium avium* model of infection. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 9: 2424–2430.
 15. De Clercq E. Human viral diseases: what is next for antiviral drug discovery? Curr Opin Virol 2012; 2: 572–579.
 16. Шмаленюк Э.Р., Кочетков С.Н., Александрова Л.А. Новые ингибиторы роста *M. tuberculosis* на основе модифицированных пиримидиновых нуклеозидов и их аналогов. Успехи химии 2013; 82: 896–915. / Shmalenjuk Je. R., Kochetkov S. N., Aleksandrova L. A. Novye inhibitory rosta *M. tuberculosis* na osnove modifitsirovannyh pirimidinovyh nukleozidov i ih analogov. Uspehi himii 2013; 82: 896–915. [in Russian]
 17. Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Жогина Ю.А., Смирнова И., Микулович Ю.Л., Сороцумова Г.М., Черноусова Л.Н., Селишева А.А., Швец В.И. Влияние экзогенного кардиолипина на рост и жизнеспособность *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro*. Доклады Академии наук 2010; 434: 5: 705–708. / Andreevskaja S.N., Smirnova T.G., Zhogina Ju.A., Smirnova T.G., Mikulovich Ju.L., Sorokumova G.M., Chernousova L.N., Selishsheva A.A., Shvec V.I. Vlijanie jekzogenennogo kardiolipina na rost i zhiznesposobnost' *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro*. Doklady Akademii nauk 2010; 434: 5: 705–708. [in Russian]
 18. Sosunov V., Mischenko V., Eruslanov B., Svetoch E., Shakina Y., Stern N., Majorov K., Sorokumova G., Selisheva A., Apt A. Activity of bacteriocins and their complexes with liposomes. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 5: 919–925.
 19. Иванов М.А., Карпенко И.Л., Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Александрова Л.А. Синтез и биологические свойства 5'-арилфосфонатов α-тимидинаBioorgan. Химия 2013; 39: 6: 718–727. / Ivanov M.A., Karpenko I.L., Chernousova L. N., Andreevskaja S.N., Smirnova T.G., Aleksandrova L.A. Sintez i biologicheskie svojstva 5'-arilfosfonatov α-timidinaBioorgan. Himija 2013; 39: 6: 718–727. [in Russian]
 20. Шмаленюк Э.Р., Карпенко И.Л., Черноусова Л.Н., Чихов А.О., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Александрова Л.А. Новые 5-модифицированные производные 2'-дезоксирибонукидина: синтез и противотуберкулезная активность. Известия Академии наук. Серия химическая. 2014; 5: 1197–1200. / Shmalenjuk Je.R., Karpenko I.L., Chernousova L.N.,

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Карпенко И.Л. — с.н.с. ФГБНУ «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

Сороцумова Г.М. — к.х.н., доцент кафедры биотехнологии и бионанотехнологии ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова», Москва

Сумарукова И.Г. — н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Chizhov A.O., Smirnova T.G., Andreevskaja S.N., Aleksandrova L.A. Novye 5-modifitsirovannye proizvodnye 2'-dezoksiuridina: sintez i protivotuberkuleznaja aktivnost'. Izvestija Akademii nauk. Serija himicheskaja. 2014; 5: 1197–1200. [in Russian]

21. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г. Препаративная химия липидов. Под ред. Л.Д. Бергельсон, Э.В. Дятловицкая. М.: Наука, 1981; 259. / Bergelson L.D., Djatlovickaja Je.V., Molotkovskij Ju.G. Preparativnaja himija lipidov. Pod red. L.D. Bergelson, Je.V. Djatlovickaja. M.: Nauka, 1981; 259. [in Russian]
22. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. J Immunol Methods. 1990; 130: 1: 149–151.
23. Маланичева И.А., Козлов Д.Г., Сумарукова И.Г., Ефременкова О.В., Зенкова В.А., Катруха Г.С., Резникова М.И., Тарасова О.Д., Синеокий С.П., Эль-Регистан Г.И. Антимикробная активность представителей рода *Bacillus megaterium*. Микробиология 2012; 81: 2: 196–204. / Malanicheva I.A., Kozlov D.G., Sumarukova I.G., Efremenkova O.V., Zenkova V.A., Katruha G.S., Reznikova M.I., Tarasova O.D., Sineoekij S.P., El'-Registan G.I. Antimikrobnaja aktivnost' predstaviteley roda *Bacillus megaterium*. Mikrobiologija 2012; 81: 2: 196–204. [in Russian]
24. Shmalenyuk E.R., Chernousova L.N., Karpenko I.L., Kochetkov S.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Efremenkova O.V., Aleksandrova L.A. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv and MDR MS-115 by a new set of C5 modified pyrimidine nucleosides. Bioorg. Med. Chem. 2013; 21: 4874–4884.
25. Александрова Л.А., Шмаленюк Э.Р., Кочетков С.Н., Ерохин В.В., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н. Новые 5 модифицированные пиримидиновые нуклеозиды — ингибиторы роста микобактерий. Acta Naturae 2010; 3: 89–92. / Aleksandrova L.A., Shmalenjuk Je.R., Kochetkov S.N., Erohin V.V., Smirnova T.G., Chernousova L.N. Novye 5 modifitsirovannye pirimidinovye nukleozidy — ingibitory rosta mikobakterij. Acta Naturae 2010; 3: 89–92. [in Russian].
26. Matyugina E., Khandazinskaya A., Chernousova, L., Andreevskaya S., Smirnova T., Chizhov A., Karpenko I., Kochetkov S., Aleksandrova L. The synthesis and antituberculosis activity of 5'-nor carbocyclic uracil derivatives. Bioorg. Med. Chem. 2012; 20: 6680–6686.
27. Александрова Л.А., Ефременкова О.В., Андронова В.Л., Галегов Г.А., Сольев П.Н., Карпенко И.Л., Кочетков С.Н. (4-алкил-1,2,3-триазол-1-il)метильные производные 2'-дезоксиуридина — ингибиторы роста бактерий и вирусов. Bioorgan. Химия 2016; 42: 6: 746–754. / Aleksandrova L.A., Efremenkova O.V., Andronova V.L., Galegov G.A., Sol'ev P.N., Karpenko I.L., Kochetkov S.N. (4-alkil-1,2,3-triazol-1-il)metil'nye proizvodnye 2'-dezoksiuridina — ingibitory rosta bakterij i virusov. Bioorgan. Himija 2016; 42: 6: 746–754. [in Russian]
28. Rai D., Johar M., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D.Y., Kumar R. Design and studies of novel 5-substituted alkylpyrimidine nucleosides as potent inhibitors of mycobacteria. J med Chem. 2005; 48: 22: 7012–1017.

Гайдукевич С.К. — студент магистратуры ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова» Москва

Зарецкая М.А. — студент магистратуры ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова» Москва

Ефременкова О.В. — руководитель сектора, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Александрова Л.А. — с.н.с. ФГБНУ «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва