

### ИММУНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА КУКУРБИТ(н)УРИЛОВ (n=6,7,8)

А.А. Ермаков, А.А. Актанова, Е.А. Пашкина

Научный руководитель: академик РАН, проф., д.м.н. В.А. Козлов

Новосибирский государственный медицинский университет

Россия, г. Новосибирск, Красный проспект, 52, 630091

E-mail: [aleermak@mail.ru](mailto:aleermak@mail.ru)

### IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF CUCURBIT(n)URILS (n=6,7,8)

A.A. Ermakov, A.A. Aktanova, E.A. Pashkina

Scientific supervisor: Academic RAS, Prof., MD, V.A. Kozlov

Novosibirsk State Medical University

Russia, Novosibirsk, Krasny Ave., 52, 630091

E-mail: [aleermak@mail.ru](mailto:aleermak@mail.ru)

**Abstract.** *Considerable interest of the medical community is directed to the research of new means of drug delivery, including nanoscale molecular containers - cucurbit[n]urils. An obligatory stage in the development of new drugs is the study of their safety, in particular concerning the immune system. In this article, we studied the immunomodulating properties of cucurbiturils, especially the cytotoxic and cytostatic effects of cucurbiturils on mononuclear cells of peripheral blood.*

**Введение.** Одним из наиболее перспективных направлений в развитии современной фармакотерапии является таргетная доставка лекарств. Подобные способы транспортировки веществ тесно связаны с наномедициной и основаны на доставке веществ, «направляемых» с помощью наночастиц. Одним из ярких примеров подобных наночастиц являются кукурбит(н)урилы (СВ) - макроциклические молекулы, состоящие из мономеров гликолурила, связанных метиленовыми мостиками. Перспективность их применения была доказана на примере использования комплексов СВ(7) с противоопухолевым лекарством цисплатином. Принято считать, что в фармацевтических дозировках СВ не оказывают системного токсического действия, но возможность специфической органной токсичности нельзя полностью исключить.

**Цель исследования.** Изучалась цитотоксичность СВ в отношении клеток иммунной системы.

**Материалы и методы.** Для исследований использовали венозную кровь условно здоровых доноров. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) выделяли стандартно. Культивирование МНК ПК проводили в плоскодонных планшетах в концентрации 1 млн/мл в полной культуральной среде RPMI-1640. Для стимуляции пролиферации клеток использовали очищенные антиCD3 антитела в концентрации 1 мкг/мл. Культивирование МНК ПК проводили в присутствии СВ(н) (n=6, 7, 8) в концентрациях 0,1 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С в течение 72 часов. В качестве контроля использовались интактные МНК ПК. Для оценки поликлональной пролиферации МНК ПК здоровых доноров в ответ на активацию антиCD3 антителами был использован метод количественного анализа клеточного деления *in vitro*, основанный на применении внутриклеточного красителя карбоксифлуоресцеина (CFSE), флуоресценция которого снижается

пропорционально числу клеточных делений. Интенсивность флуоресценции красителя CFSE определялась методом проточной цитометрии. Пролиферация МНК ПК оценивалась как доля неподелившихся ( $CFSE^{high}$ ) и поделившихся ( $CFSE^{low}$ ) клеток. Результат регистрировался на 10 000 событий в случае. Для оценки цитотоксичности исследуемых соединений был применен МТТ тест. Клетки высаживали в 96-луночный планшет в среду RPMI-1640, содержащей 10 % FCS, с добавлением нарастающих концентраций СВ(n) (n=6,7,8), дублируя каждую лунку. Через 72 часа в каждую лунку добавляли по 15 мкл раствора МТТ в физрастворе (5 мкг/мл). Через четыре часа планшет центрифугировали, супернатант удаляли, к содержимому лунки добавляли 100 мкл диметилсульфоксида. После инкубирования была проведена оценка оптической плотности с помощью планшетного фотоколориметра. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0».

**Результаты.** СВ(6), СВ(7) и СВ(8) не оказывают цитотоксического действия на МНК ПК во всех используемых дозах от 0,1 до 1 мМ. Однако в ходе исследования (табл. 1) была замечена тенденция по проявлению эффекта цитотоксичности СВ(7) в концентрации 1 мМ. Полученные данные совпадают с данными зарубежных исследователей, согласно которым СВ нетоксичны по отношению к клеточным линиям, тканям человека и животных в домолярных концентрациях [1,2].

При исследованиях *in vivo* так же отмечалась низкая токсичность СВ [3]. Известно, что при применении СВ(7) в очень высоких дозах возможны проявления эффектов нейро- и миотоксичности, но в концентрациях, необходимых для формирования комплексов с лекарственными препаратами, признаков токсичности нет [4,5].

Таблица 1

Определение цитотоксического действия СВ(n) (n=6, 7, 8) на МНК ПК с помощью МТТ-теста

Тип СВ(n)	Показатели оптической плотности при длине волны 540 нм			
	0 мМ	0,1 мМ	0,5 мМ	1 мМ
СВ(6)	0,509(0,398-0,696)	0,488(0,382-0,680)	0,495(0,341-0,643)	0,487(0,382-0,680)
СВ(7)		0,559(0,365-0,675)	0,474(0,411-0,746)	0,473(0,340-0,582)*
СВ(8)		0,460(0,368-0,627)	0,545(0,418-0,635)	0,506(0,394-0,582)

\*-Тенденция ( $p=0,055$ ) по сравнению с контролем.

Поскольку оценка цитотоксичности по методу МТТ не позволяет точно оценить возможное влияние препарата на пролиферацию клеток, были проведены эксперименты с CFSE-окрашенными МНК ПК. Была проанализирована способность СВ(n) (n=6, 7, 8) подавлять как спонтанную пролиферацию МНК ПК, так и индуцированную антиCD3 антителами.

Показано, что СВ(6) и СВ(8) не оказывают влияния на пролиферативную активность МНК ПК в случаях и спонтанной, и антиCD3-индуцированной пролиферации. СВ(7) в исследуемых дозах не оказывал влияния на спонтанную пролиферацию (табл. 2), однако, при применении антиCD3 антител пролиферативная активность на уровне контроля была зафиксирована только при использовании дозы СВ(7) в 0,1 мМ. С дозами СВ(7) в 0,5 и 1 мМ пролиферация подавлялась на 30 % и 75 % соответственно (табл. 3).

Таблица 2

Влияние СВ(n) на спонтанную пролиферативную активность МНК ПК

Тип СВ(n)	Относительное количество пролиферирующих клеток			
	0 мМ	0,1 мМ	0,5 мМ	1 мМ
СВ(6)	4,40(4,0-8,40)	4,40(4,0-7,90)	7,10(4,40-7,60)	4,20(3,70-9,20)
СВ(7)		4,60(3,80-6,50)	5,70(4,50-8,60)	6,70(4,30-9,40)
СВ(8)		4,0(3,60-7,60)	4,20(4,10-5,40)	4,40(3,90-8,20)

Таблица 3

Влияние СВ(n) на антиCD3-индуцированную пролиферативную активность МНК ПК

Тип СВ(n)	Относительное количество пролиферирующих клеток			
	0 мМ	0,1 мМ	0,5 мМ	1 мМ
СВ(6)	41,60(38,70-43,50)	39,50(36,0-40,90)	39,50(35,30-40,0)	39,50(34,20-41,90)
СВ(7)		39,20(39,10-39,30)	29,30(22,0-35,20)*	10,40(8,70-22,60)*
СВ(8)		43,70(33,70-48,20)	42,50(36,70-47,60)	41,80(38,90-42,90)

\*-достоверные различия по сравнению с контролем.

**Выводы.** При оценке цитотоксичности СВ(n) (n=6, 7, 8) на МНК ПК было обнаружено, что СВ практически не оказывают цитотоксического действия на МНК ПК. СВ(7) в концентрации 0,5 и 1 ммоль способен подавлять пролиферативную активность, вызванную антиCD3 антителами. СВ(6) и СВ(8), а также СВ(7) в концентрации 0,1 ммоль не оказывают влияния, как на спонтанную, так и на индуцированную антиCD3 антителами пролиферацию.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jeon Y.J., Kim S.Y., Ko Y.H., Sakamoto S., Yamaguchi K., Kim K. (2005). Novel molecular drug carrier: encapsulation of oxaliplatin in cucurbit[7]uril and its effects on stability and reactivity of the drug. *Org. Biomol. Chem.*, v.3, no. 11, pp. 2122-2125.
2. Hettiarachchi G., Nguyen D., Wu J., Lucas D., Ma D., Isaacs L., Briken V. (2010). Toxicology and Drug Delivery by Cucurbit[n]uril Type Molecular Containers. *PLoS. One*, 5(5): e10514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010514> pp. 10514.
3. Uzunova V.D., Cullinane C., Brix K., Nau W.M., Day A.I. (2010). Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory in vitro and in vivo study. *Org. Biomol. Chem.*, v. 8, no. 9, pp. 2037–2042.
4. Chen H., Chan J.Y.W., Yang X., Ian W. (2015). Developmental and organ-specific toxicity of cucurbit[7]uril: in vivo study on zebrafish models. *Journal of RSC Adv.*, v. 5, pp. 30067-30074.
5. Oun R., Floriano R.S., Isaacs L., Rowana E.G., Wheate N.J. (2014). The ex vivo neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbituril-based macrocyclic drug delivery vehicles. *Toxicol Res (Camb.)*, v. 3, no. 6, pp. 447-455.