

ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Актанова А.А.¹, Коваленко Е.А.^{1,2}, Пашкина Е.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГБУН «Институт неорганической химии имени А.В. Николаева» Сибирского отделения Российской
академии наук, г. Новосибирск, Россия

Резюме. В настоящее время ведется большое число разработок, основанных на наноразмерных системах, для доставки лекарственных средств. Одной из таких систем могут служить наноразмерные кавитанды кукурбитурилы, которые благодаря наличию полости способны включать в себя молекулы лекарственного средства. Поскольку иммунная система довольно чувствительна к влиянию наноматериалов и иных повреждающих факторов, необходимо исследование иммунобезопасности новых систем доставки.

Целью данного исследования было исследование влияния наноразмерных кавитандов кукурбитурилов на цитокинпродуцирующую способность моноклеарных клеток периферической крови условно здоровых доноров.

Моноклеарные клетки (1 млн/мл) культивировали в присутствии кукурбитурилов в следующих концентрациях: 0,3 мМ кукурбит[6]урилы, 0,3 мМ кукурбит[7]урилы и 0,01 мМ кукурбит[8]урилы в течение 72 ч с дополнительной стимуляцией с помощью аCD3-антител (1 мкг/мл) и без стимуляции. Уровень цитокинов в супернатантах определялся с помощью иммуноферментного анализа.

Было показано, что кукурбит[6]урил в 1,5 раза повышал уровень спонтанной продукции ИЛ-4 ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. В случае оценки стимулированной продукции нами было обнаружено, что кукурбит[6]урил снижает уровень продукции ИЛ-6, а также демонстрирует тенденцию ($p = 0,09$) к повышению уровня ИЛ-4.

При культивировании клеток с кукурбит[7]урилом была обнаружена тенденция по увеличению продукции провоспалительного TNF. Также было обнаружено, что кукурбит[7]урил способен подавлять продукцию ИЛ-10 в стимулированной аCD3-антителами культуре МНК в 1,5 раза.

В то же время кукурбит[8]урил снижал уровень IFN γ и ИЛ-10 по сравнению с продукцией данных цитокинов в контрольной культуре. В случае оценки влияния кукурбит[8]урилы на продукцию IFN γ стимулированными анти-CD3 антителами МНК, достоверных различий не было обнаружено, но также имеется тенденция по снижению концентрации данного цитокина по сравнению с контролем.

Адрес для переписки:

Актанова Алина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
E-mail: aktanova_al@mail.ru

Address for correspondence:

Aktanova Alina A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 227-01-35.
E-mail: aktanova_al@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Актанова, Е.А. Коваленко, Е.А. Пашкина
«Влияние кукурбитурилов на цитокинпродуцирующую
способность моноклеарных клеток периферической
крови здоровых доноров» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 369-374.
doi: 10.46235/1028-7221-1183-EOC

© Актанова А.А. и соавт., 2022

For citation:

A.A. Aktanova, E.A. Kovalenko, E.A. Pashkina "Effect
of cucurbiturils on cytokine production by peripheral blood
mononuclear cells of healthy donors", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 4, pp. 369-374.
doi: 10.46235/1028-7221-1183-EOC

DOI: 10.46235/1028-7221-1183-EOC

Следовательно, кукурбитурилы способны влиять как на спонтанную, так и на стимулированную продукцию цитокинов мононуклеарными клетками крови, и направленность действия на цитокин-продуцирующую способность клеток зависит от рассматриваемого гомолога.

Ключевые слова: кукурбитурилы, цитокины, лекарственная доставка, иммунобезопасность, интерлейкины, клетки крови

EFFECT OF CUCURBITURILS ON CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS

Aktanova A.A.^a, Kovalenko E.A.^b, Pashkina E.A.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b A. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Many drug delivery systems are currently under study, e.g., nanosized cavitands cucurbiturils, which, due to the presence of a cavity, can incorporate drug molecules. Since the immune system is quite sensitive to influence of nanomaterials and other cell-damaging factors, it is necessary to study immunosafety of the new delivery systems, i.e., immunotoxicity and immunomodulatory properties. The aim of this study was to investigate the effect of nanosized cucurbituril cavitands on the cytokine-producing ability of peripheral blood mononuclear cells in apparently healthy donors.

Blood mononuclear cells ($10^6/\text{mL}$) were cultured in the presence of cucurbiturils at the following concentrations: 0.3 mM cucurbit[6]uril, 0.3 mM cucurbit[7]uril, and 0.01 mM cucurbit[8]uril for 72 h, under additional stimulation with aCD3 antibodies ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$), or without it. The level of cytokines in the supernatants was determined using enzyme immunoassay.

It was shown that cucurbit[6]uril increased the level of spontaneous IL-4 production by 1.5 times ($p < 0.01$) compared with the control. In the case of stimulated cytokine production, we found that cucurbit[6]uril reduced the level of IL-6, and also shows a tendency ($p = 0.09$) towards an increase in the IL-4 level. When cells were cultured with cucurbit[7]uril, we gave revealed a trend for increased production of pro-inflammatory TNF. It was also found that cucurbit[7]uril is able to suppress the production of IL-10 in aCD3-stimulated cell culture by 1.5 times. Cucurbit[8]uril was shown to inhibit production of cytokines in non-stimulated cell cultures. A significant decrease in the level of $\text{IFN}\gamma$ and IL-10 was revealed as compared with the production of these cytokines in control cultures. When assessing the effect of cucurbit[8]uril on the $\text{IFN}\gamma$ production upon stimulation with aCD3 antibodies, no significant differences were found, but there is also a trend for a decreased concentration of this cytokine against control levels.

Cucurbiturils can influence both spontaneous and stimulated production of cytokines by the blood mononuclear cells. The effect on cytokine-producing ability of the cells depends on the tested homologue compound.

Keywords: cucurbiturils, cytokines, drug delivery, immunosafety, interleukins, blood cells

Введение

Использование наноразмерных систем доставки лекарственных средств является одним из перспективных направлений, стоящих перед современной наукой. Системы доставки лекарств предполагается применять для достижения определенных преимуществ, а именно: с целью контроля клиренса, защиты препарата от био-

деградации, адресной доставки к определенным органам, тканям или клеткам, снижения токсичности, повышения растворимости и т. д. [7] Однако перед применением в клинике различных наноструктур и наноматериалов, используемых при создании систем доставки лекарственных препаратов, требуется всестороннее тщательное изучение новых материалов, в том числе и исследование иммунотропных свойств данных

веществ, поскольку клетки иммунной системы являются наиболее чувствительными к повреждающему действию наноматериалов или иных факторов.

Кукурбитурилы – класс наноразмерных макроциклических соединений, способных инкапсулировать молекулу или фрагмент молекулы лекарственного соединения путем образования комплексов «гость – хозяин». Данные соединения состоят из гликольурильных фрагментов, число которых варьирует в зависимости от гомолога. Так, у кукурбит[6]урилы шесть гликольурильных фрагментов, а у кукурбит[8]урилы – восемь [4]. Несмотря на схожее строение, различные гомологи обладают разными физико-химическими свойствами.

Исследования, посвященные биологической безопасности кукурбитурилов *in vitro* и *in vivo* показали, что кукурбитурилы и их производные являются инертными и нетоксичными. При концентрации до 1 мМ кукурбит[7]урил не проявляет цитотоксическую активность по отношению к различным клеточным линиям человека и животных [5, 6]. При введении *in vivo* кукурбит[7]урилы показано, что максимально переносимая доза составляет 250 мг/кг; внутривенное введение кукурбитурилов ограничено из-за низкой растворимости, а не из-за развития побочных эффектов. При пероральном введении смеси кукурбит[6]урилы с кукурбит[8]урилом максимально переносимая доза была увеличена до 600 мг/кг, что говорит о низкой токсичности данной смеси [10]. Кукурбитурилы в экспериментах *in vivo* не показывают никаких признаков острой системной токсичности. При применении кукурбит[7]урилы в очень высоких дозах возможны проявления миотоксичности и нейротоксичности, однако в стандартных концентрациях, используемых при комплексобразовании с лекарственными препаратами, признаков токсичности нет [2, 8]. При исследовании влияния на клетки крови было показано, что кукурбитурилы практически не обладают иммунотоксичностью, за исключением возможной индукции апоптоза в культурах иммунокомпетентных клеток, культивируемых в присутствии кукурбит[8]урилы [1]. Однако кроме иммунотоксичности необходимо также исследовать и возможные иммуномодулирующие свойства систем доставки. Так, к примеру, известно, что РАММ дендримеры второго и третьего поколения могут усиливать продукцию противовоспалительных цитокинов, что ограничивает возможность применения данных си-

стем доставки [3]. Следовательно, для оценки иммунологической безопасности кукурбитурилов представляется актуальной оценка влияния на цитокинпродуцирующую активность клеток.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования служили мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) здоровых доноров ($n = 7$). После подписания информированного согласия у каждого донора кровь из кубитальной вены собиралась в пробирку с гепарином. Выделение МНК осуществлялось стандартным способом, а именно центрифугированием с использованием раствора фиколла с урографинном для создания градиента плотности. Выделенные клетки (1 млн/мл) культивировали в присутствии кукурбитурилов в следующих концентрациях: 0,3 мМ СВ[6], 0,3 мМ СВ[7] и 0,01 мМ СВ[8] в течение 72 ч с дополнительной стимуляцией с помощью аCD3-антител (1 мкг/мл) и без стимуляции. Выбор концентраций объясняется использованием нетоксичной дозы для СВ[6] и СВ[7] и максимально возможной концентрации СВ[8] из-за его низкой растворимости. Далее клеточные культуры центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин, после чего аккуратно собирали супернатант и замораживали при -20°C до использования. Уровень цитокинов в супернатантах определялся с помощью иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Вектор-Бест», Россия (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ , TNF).

Результаты и обсуждение

Уровень продукции цитокинов оценивался в супернатантах от клеточных культур, в данном случае МНК условно здоровых доноров, культивируемых в присутствии кукурбит[n]урилов ($n = 6, 7, 8$). Оценивалась как спонтанная (табл. 1), так и стимулированная анти-CD3-антителами (табл. 2) продукция. Было показано, что кукурбит[6]урил в 1,5 раза повышал уровень спонтанной продукции IL-4 ($p < 0,01$) по сравнению с контролем.

В случае оценки стимулированной продукции нами было обнаружено, что кукурбит[6]урил снижает уровень продукции IL-6, а также демонстрирует тенденцию ($p = 0,09$) к повышению уровня IL-4. Предположительно, полученные данные о действии на спонтанную и стимулированную продукцию могут говорить о влиянии кукурбит[6]урилы на Th1/Th2 баланс со смещением в сторону гуморального иммун-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА СПОНТАННУЮ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. EFFECT OF CUCURBITURILS ON SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Контроль Control	СВ[6]	СВ[7]	СВ[8]
IL-2	10,19 (5,47-11,67)	7,87 (4,56-12,97)	5,57 (2,59-11,80)	6,54# (3,59-8,86)
IL-4	1,66 (1,39-2,17)	2,32* (1,78-3,87)	1,56 (1,34-1,77)	1,54 (1,36-4,29)
IL-6	44,72 (39,59-56,63)	56,51 (39,25-59,16)	57,02 (34,86-59,26)	40,77 (31,34-53,95)
IL-10	35,84 (27,12-53,75)	43,36 (27,39-75,13)	35,44 (16,36-89,38)	30,68* (22,46-45,94)
IFN γ	13,03 (3,83-26,08)	7,26 (3,17-9,02)	13,70 (4,50-29,67)	4,84* (1,66-9,35)
TNF	23,62 (10,79-38,12)	24,57 (10,43-43,28)	84,16# (23,26-95,67)	21,46 (16,30-42,56)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем; # – тенденция (p < 0,09) по сравнению с контролем. Данные оценены с помощью критерия Манна–Уитни.

Note. *, significant differences compared to control; #, trend (p < 0.09) compared to control. Data were assessed using the Mann–Whitney U test.

ного ответа. Ранее было продемонстрировано, что кукурбит[6]урил может способствовать увеличению экспрессии молекул HLA-DR на В-лимфоцитов [9], что также говорит о стимулирующем действии кукурбит[6]урила на гуморальное звено иммунитета.

Кукурбит[7]урил не приводил к статистически значимым изменениям в спонтанной продукции МНК исследуемых цитокинов, однако была замечена тенденция (p = 0,09) по увеличению продукции провоспалительного цитокина TNF. Также было обнаружено, что кукурбит[7]урил способен подавлять продукцию IL-10 в стимулированной анти-CD3 антителами культуре МНК в 1,5 раза. Подобные результаты могут свидетельствовать об иммуностимулирующем и провоспалительном действии кукурбит[7]урила.

В то же время кукурбит[8]урил подавлял продукцию цитокинов в неактивированных стимуляторами лимфоцитов культурах МНК. Так,

было показано достоверное снижение уровня IFN γ и IL-10 по сравнению с продукцией данных цитокинов в контрольной культуре. Кроме того, наблюдалась тенденция (p = 0,09) по снижению уровня IL-2 МНК ПК, культивированных в присутствии кукурбит[8]урила. Кроме того, кукурбит[8]урил приводил к снижению продукции IL-10 и стимулированными МНК ПК. В случае оценки влияния кукурбит[8]урила на продукцию IFN γ стимулированными анти-CD3 антителами МНК, достоверных различий не было обнаружено, но также имеется тенденция (p = 0,06) по снижению концентрации данного цитокина по сравнению с контролем. Наблюдаемое нами влияние кукурбит[8]урила на продукцию цитокинов может быть связано с индукцией апоптоза Т-хелперов, продуцирующих данные цитокины. Согласно ранее опубликованным нами данным, присутствие кукурбит[8]урила в культуре МНК в случае Т-хелперов способно повышать ранний

**ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА АСД3-ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ
МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

TABLE 2. EFFECT OF CUCURBITURILS ON ACD3-INDUCED CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD
MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS

	Контроль Control	СВ[6]	СВ[7]	СВ[8]
IL-2	46,74 (30,11-58,17)	43,03 (26,91-62,98)	50,97 (23,96-54,41)	36,37 (28,83-48,40)
IL-4	2,24 (1,68-2,64)	2,63 [#] (2,07-3,34)	2,39 (1,96-3,12)	3,06 [#] (2,33-3,93)
IL-6	5124,55 (2864,09-5460,91)	4594,76 [#] (2777,33-5214,76)	4892,89 (3147,74-5029,46)	4770,74 (2844,71-5170,56)
IL-10	501,01 (353,90-600,54)	462,48 (357,06-695,64)	322,78* (186,14-518,60)	368,14* (342,34-459,93)
IFN γ	1928,96 (1675,52-2147,64)	1908,72 (1698,32-2241,89)	2096,79 (1541,11-2320,40)	1804,19 [#] (1525,63-2102,81)
TNF	1260,24 (1089,82-1795,65)	1257,24 (825,77-1804,28)	1508,76 (1149,83-1908,82)	1470,40 (1182,43-1540,29)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

апоптоз в 2,5 раза по сравнению с уровнем «нативного» раннего апоптоза в периферической крови [1].

Заключение

Таким образом, при оценке иммуномодулирующего действия кукурбитурилов было продемон-

стрировано, что различные гомологи оказывают разное действие на иммунную систему. Следовательно, кукурбит[н]урилы способны влиять как на спонтанную, так и на стимулированную продукцию цитокинов мононуклеарными клетками крови, и направленность действия зависит от выбранного гомолога.

Список литературы / References

1. Aktanova A., Abramova T., Pashkina E., Boeva O., Grishina L., Kovalenko E., Kozlov V. Assessment of the biocompatibility of cucurbiturils in blood cells. *J. Nanomaterials*, 2021, Vol. 11, no. 6, 1356. doi: 10.3390/nano11061356.
2. Chen H., Chan J.Y.W., Yang X., Wyman I.W., Macartney D.H., Bardelang D., Lee S.M.Y., Wang R. Developmental and organspecific toxicity of cucurbit[7]uril: *In vivo* study on zebrafish models. *J. RSC Adv.*, 2015, Vol. 5, pp. 30067-30074.
3. Czarnomysy R., Bielawska A., Bielawski K. Effect of 2nd and 3rd generation PAMAM dendrimers on proliferation, differentiation, and pro-inflammatory cytokines in human keratinocytes and fibroblasts. *Int. J. Nanomedicine*, 2019, Vol. 14, pp. 7123-7139.
4. Das D., Assaf K.I., Nau W.M. Applications of cucurbiturils in medicinal chemistry and chemical biology. *J. Front. Chem.*, 2019, Vol. 7, pp. 619-631.
5. Hettiarachchi G., Nguyen D., Wu J., Lucas D., Ma D., Isaacs L., Briken V. Toxicology and drug delivery by cucurbit[n]uril type molecular containers. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 5, e10514. doi: 10.1371/journal.pone.0010514.

6. Jeon Y.J., Kim S.Y., Ko Y.H., Sakamoto S., Yamaguchi K., Kim K. Novel molecular drug carrier: Encapsulation of oxaliplatin in cucurbit[7]uril and its effects on stability and reactivity of the drug. *J. Org. Biomol. Chem*, 2005, Vol. 3, pp. 2122-2125.
7. Mazdaei M., Asare-Addo K. A mini-review of nanocarriers in drug delivery systems. *Br. J. Pharm.*, 2022, Vol. 7, iss. 1. doi: 10.5920/bjpharm.780.
8. Oun R., Floriano R.S., Isaacs L., Rowana E.G., Wheate N.J. The *ex vivo* neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbiturilbased macrocyclic drug delivery vehicles. *J. Toxicol. Res.*, 2014, Vol. 3, pp. 447-455.
9. Pashkina E., Aktanova A., Blinova E., Mirzaeva I., Kovalenko E., Knauer N., Ermakov A., Kozlov V. Evaluation of the immunosafety of cucurbit[n]uril on peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Molecules*, 2020, Vol. 25, no. 15, 3388. doi: 10.3390/molecules25153388.
10. Uzunova V.D., Cullinane C., Brix K., Nau W.M., Day A.I. Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: An exploratory *in vitro* and *in vivo* study. *J. Org. Biomol. Chem.*, 2010, Vol. 8, pp. 2037-2042.

Авторы:

Актанова А.А. — аспирант лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Коваленко Е.А. — к.х.н., научный сотрудник лаборатории химии кластерных и супрамолекулярных соединений ФГБНУ «Институт неорганической химии имени А.В. Николаева» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

Пашкина Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Aktanova A.A., Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kovalenko E.A., PhD (Chemistry), Research Associate, A. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Novosibirsk, Russian Federation

Pashkina E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 26.07.2022

Received 15.07.2022
Accepted 26.07.2022