

ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА КОЛИЧЕСТВО И КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ *IN VIVO*

Пашкина Е.А.¹, Актанова А.А.¹, Коваленко Е.А.², Козлов В.А.¹

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

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

Резюме. Одной из актуальных проблем при разработке систем лекарственной доставки является иммунологическая безопасность наночастиц, применяемых в качестве основы для создания данных систем. Кукурбит[*n*]урилы (СВ[*n*]) – молекулярные наноконтейнеры, способные инкапсулировать различные лекарственные препараты и служить основой для систем доставки. Кукурбитурилы являются малотоксичными соединениями, в условиях *in vitro* проявляют слабые иммуномодулирующие свойства, не обладая при этом иммунотоксичностью.

Целью данного исследования была оценка действия кукурбитурилов в условиях *in vivo* на количество и субпопуляционный состав лейкоцитов периферической крови.

В работе были использованы мыши линии BALB/с в возрасте 2-4 мес. Для проведения данного исследования кукурбитурилы разводились в фосфатно-солевом буфере и вводились лабораторным животным внутрибрюшинно (трехкратно в течение недели).

При оценке влияния кукурбит[7]урилы на показатели крови после трехкратного введения в течение недели внутрибрюшинно лабораторным животным статистически значимых изменений обнаружено не было. Однако при первом введении у лабораторных животных отмечалось небольшое увеличение относительного количества лимфоцитов после первого введения СВ[6] и увеличение доли нейтрофилов после первого введения СВ[8]. В то же время после второго и третьего введения кукурбитурилов доли лимфоцитов и нейтрофилов находились в пределах нормы и не имели статистически значимых различий по сравнению с контролем. Далее проводилась оценка влияния на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови лабораторных животных. Было обнаружено, что после введения СВ[6] в периферической крови наблюдалось снижение Т-лимфоцитов, и одновременно увеличение доли CD19⁺В-лимфоцитов по сравнению с контролем. СВ[7] и СВ[8] не влияли на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови.

Было обнаружено, что введение СВ[*n*] не влияло на показатели крови лабораторных животных, что может свидетельствовать о безопасности данных соединений в условиях *in vivo*. При этом СВ[6] способен оказывать стимулирующее воздействие на гуморальный иммунитет, повышая относительное количество В-лимфоцитов.

Ключевые слова: кукурбитурилы, лекарственная доставка, иммунобезопасность, клетки крови, общий анализ крови

Адрес для переписки:

Пашкина Екатерина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Address for correspondence:

Ekaterina A. Pashkina
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 227-01-35.
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Пашкина, А.А. Актанова, Е.А. Коваленко, В.А. Козлов «Влияние кукурбитурилов на количество и клеточный состав лейкоцитов периферической крови лабораторных животных при парентеральном введении *in vivo*» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 377-380.
doi: 10.46235/1028-7221-9970-EOC

© Пашкина Е.А. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Pashkina, A.A. Aktanova, E.A. Kovalenko, V.A. Kozlov
“Effect of cucurbiturils on the numbers and differential
counts of peripheral blood leukocytes in laboratory animals
after *in vivo* parenteral administration”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 3, pp. 377-380.
doi: 10.46235/1028-7221-9970-EOC

© Pashkina E.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-9970-EOC

EFFECT OF CUCURBITURILS ON THE NUMBERS AND DIFFERENTIAL COUNTS OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN LABORATORY ANIMALS AFTER *IN VIVO* PARENTERAL ADMINISTRATION

Pashkina E.A.^a, Aktanova A.A.^a, Kovalenko E.A.^b, Kozlov V.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. Immunological safety of nanoparticles is an urgent problem for development of drug delivery systems used as the basis for creating these systems. Cucurbit[n]urils (CB[n]) are molecular nanocontainers that can encapsulate various drugs and serve as the basis for delivery systems. Cucurbiturils are low-toxic compounds: under *in vitro* conditions, they exhibit weak immunomodulatory properties, without sufficient immunotoxicity. The aim of the present study was to evaluate the *in vivo* effects of cucurbiturils on the number and differential leukocyte counts in peripheral blood.

BALB/c mice aged 2–4 months were used in the work. For this study, cucurbiturils were diluted in phosphate-buffered saline and administered to laboratory animals intraperitoneally (three times a week).

When evaluating the effect of cucurbit[7]uril on blood parameters of the animals after three intraperitoneal injections weekly, no statistically significant changes were registered. However, at first administration, the animals showed a slight increase in relative number of lymphocytes after the first injection of CB[6], and an increased proportion of neutrophils after the first administration of CB[8]. Meanwhile, the proportions of lymphocytes and neutrophils were within normal ranges after the 2nd and 3rd injections of cucurbiturils, and did not show any significant differences against the controls. Moreover, the impact upon the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in laboratory animals was assessed. After injection of CB[6], there was a decrease in T lymphocytes in the peripheral blood, along with increased proportion of CD19⁺B lymphocytes compared with the controls. CB[7] and CB[8] injections did not affect the subpopulation profile of peripheral blood lymphocytes.

We have found that intraperitoneal administration of CB[n] did not affect the blood parameters of laboratory animals, thus, probably suggesting the *in vivo* safety of these compounds. At the same time, CB[6] is able to exert a stimulating effect on humoral immunity by increasing relative contents of B lymphocytes.

Keywords: cucurbiturils, drug delivery, immunosafety, blood cells, blood test

Выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта РНФ № 19-15-00192.

Введение

Кукурбитурилы – это наноразмерные кавитанды, имеющие форму тыквы, способные к включению в свою полость различных гидрофобных молекул или их фрагментов, а также связыванию положительно заряженных групп в области порталов [3]. Благодаря подобным свойствам кукурбитурилы способны инкапсулировать различные лекарственные препараты и служить основой для систем доставки. В связи с этим актуальной является оценка биологической безопасности кукурбитурилов. В настоящее время известно, что кукурбитурилы в ряде исследований *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали низкую токсичность [4, 5, 6, 7, 8, 10, 12]. При применении кукурбитурилов в очень высоких дозах возможны проявления миотоксичности и нейротоксичности, однако в стандартных концентрациях, используемых при комплексобразовании с лекарственными препаратами, признаков токсичности нет. Однако кроме иммунотоксичности необходимо также исследовать и возможные иммуномодулирующие

свойства систем доставки, так как иммуностимулирующие либо иммуносупрессирующие эффекты системы могут как усиливать, так и ослаблять действие доставляемого лекарственного средства.

Поскольку кукурбит[n]урилы – это ряд гомологов, отличающихся числом гликольурильных фрагментов, формирующих данную молекулу, а значит, и размером полости, нами для исследования были выбраны кукурбит[6]урил, кукурбит[7]урил и кукурбит[8]урил (CB[6], CB[7] и CB[8] соответственно), как обладающие наиболее подходящими для комплексобразования размерами и чаще других применяемые для создания систем лекарственной доставки.

В предыдущих исследованиях мы оценили возможное иммуномодулирующее действие кукурбитурилов [1, 2, 9], было показано, что при культивировании в присутствии CB[n] усиливалась пролиферативную активность клеток и повышалась экспрессию HLA-DR на лимфоцитах, что говорит о иммуностимулирующем действии. Важно отметить, что кукурбитурилы в условиях *in vitro* практически не оказывали иммуносупрессивного действия, за исключением незначительного снижения экспрессии HLA-DR и продукции активных форм кислорода Т-хелперами в сти-

мулированных культурах [2, 9]. Следовательно, представляется актуальным изучение иммунобезопасности и возможного иммуномодулирующего действия кукурбитурилов в условиях *in vivo*.

Материалы и методы

В работе были использованы мыши линии BALB/c в возрасте 2-4 мес. Для проведения данного исследования кукурбитурилы разводились в фосфатно-солевом буфере и вводились лабораторным животным внутривенно.

Животные были разделены на группы по 6-7 мышей, которым внутривенно трехкратно в течение недели проводили инъекции: первой группе – 0,25 мл фосфатно-солевого буфера, второй группе 4М раствора СВ[6], третьей – второй группе 4М раствора СВ[7], четвертой – второй группе 4М раствора СВ[8]. После каждого введения на следующий день лабораторным животным проводился анализ образцов крови в микропробирки с гепарином. Забор крови проводился через сутки после очередной инъекции. Кровь в количестве 10 мкл получали после надреза кончика хвоста, после проведения манипуляций рану прижигали раствором йода. Мазки крови фиксировали, окрашивали азур-эозином, после чего проводили подсчет количества лейкоцитов.

На следующие сутки после третьего введения животные умерщвлялись декапитацией, после чего проводился набор проб периферической крови объемом 1 мл. Выделение мононуклеарных клеток крови проводили с помощью центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографина. Мононуклеарные клетки окрашивали с помощью моноклональных антител с флуоресцентной меткой (CD45-FITC, CD3-APC, CD16-PE/Cy7 и CD19-PE, BioLegend, США), после чего проводили цитометрический анализ с помощью FACS CANTO II.

Результаты и обсуждение

При оценке влияния кукурбит[7]урилы на показатели крови после трехкратного введения в течение недели внутривенно лабораторным животным статистически значимых изменений обнаружено не было. Однако при первом введении у лабораторных животных отмечалось небольшое увеличение относительного количества лимфоцитов после первого введения СВ[6] и уве-

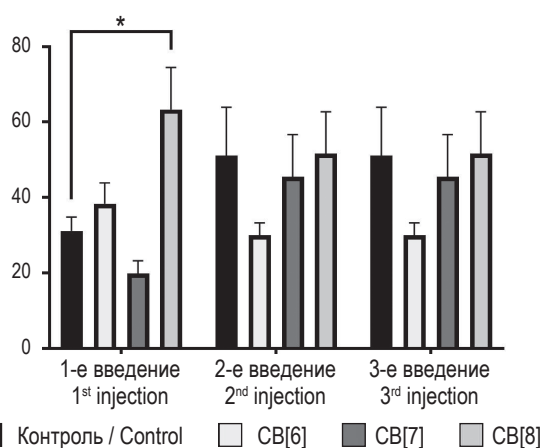


Рисунок 1. Влияние кукурбитурилов на относительное количество нейтрофилов в периферической крови лабораторных животных

Figure 1. The effect of cucurbiturils on relative number of neutrophils in the peripheral blood of laboratory animals

личение доли нейтрофилов после первого введения СВ[8] (рис. 1). В то же время после второго и третьего введения кукурбитурилов доли лимфоцитов и нейтрофилов находились в пределах нормы и не имели статистически значимых различий по сравнению с контролем.

Далее нами проводилась оценка влияния на субпопуляционный состав лимфоцитов. Было показано, что СВ[7] и СВ[8] не влияли на соотношение Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток в крови лабораторных животных (табл. 1). При этом СВ[6] приводил к увеличению относительного количества В-лимфоцитов и пропорционально снижал долю Т-клеток. Поскольку при проведении оценки общего числа лимфоцитов СВ[6] не снижал данный показатель у лабораторных мышей, а, напротив, приводил к повышению содержания лимфоцитов в периферической крови после первого введения, подобные изменения в субпопуляционном составе могут быть связаны прежде всего с увеличением доли В-клеток, а не снижением абсолютного количества Т-лимфоцитов.

Известно, что мыши линии BALB/c более склонны к развитию гуморального иммунного ответа [11], поэтому подобное увеличение доли В-лимфоцитов также может быть связано с особенностью реагирования данной линии живот-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 1. EFFECT OF CUCURBITURILS ON THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF LABORATORY ANIMALS

	PBS	CB[6]	CB[7]	CB[8]
CD3 ⁺	54,50±4,67%	42,90±5,25%*	54,50±3,33	58,20±3,87%
CD19 ⁺	32,80±3,58%	50,10±5,86%*	37,60±3,34%	30,10±3,04%
CD16 ⁺	4,70±0,91%	5,00±0,67%	4,18±0,76%	4,80±1,77%

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с PBS.

Note. *, significant differences compared to PBS.

ных. Однако поскольку СВ[7] и СВ[8] подобного эффекта в виде увеличения доли В-лимфоцитов не оказывали, можно предположить, что СВ[6] способен активировать гуморальный иммунитет в условиях *in vivo*. Ранее в условиях *in vitro* было продемонстрировано, что СВ[6] способен влиять на гуморальный иммунный ответ, усиливая антигенпрезентирующие свойства В-лимфоцитов [9]. Следовательно, кукурбитурилы при парентеральном введении не приводят к снижению количества иммунных клеток у лабораторных животных, но способны влиять на иммунологический баланс.

Подобные результаты могут свидетельствовать о безопасности использования кукурбитурилов в

качестве систем доставки *in vivo* и возможности применения данных наноразмерных кавитандов для модуляции иммунного ответа при лекарственной доставке.

Выводы

Было обнаружено, что введение СВ[n] не влияло на показатели крови лабораторных животных, что может свидетельствовать о безопасности данных соединений в условиях *in vivo*. При этом СВ[6] способен оказывать стимулирующее воздействие на гуморальный иммунитет, повышая относительное количество В-лимфоцитов.

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. *Nanomaterials (Basel)*, 2021, Vol. 11, no. 6, 1356. doi: 10.3390/nano11061356.
2. Aktanova A.A., Boeva O.S., Barkovskaya M.S., Kovalenko E.A., Pashkina E.A. Influence of cucurbiturils on the production of reactive oxygen species by T and B lymphocytes, platelets and red blood cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 2, 1441. doi: 10.3390/ijms24021441.
3. Barooah N., Mohanty J., Bhasikuttan A.C. Cucurbituril-based supramolecular assemblies: prospective on drug delivery, sensing, separation, and catalytic applications. *Langmuir*, 2022, Vol. 38, no. 20, pp. 6249-6264.
4. 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. *RSC Adv.*, 2015, Vol. 5, pp. 30067-30074.
5. Das D., Assaf K.I., Nau W.M. Applications of cucurbiturils in medicinal chemistry and chemical biology. *Front. Chem.*, 2019, Vol. 7, 619. doi: 10.3389/fchem.2019.00619.
6. 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.
7. 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. *Org. Biomol. Chem.*, 2005, Vol. 3, pp. 2122-2125.
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. *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. Pejchal J., Jošt P., Múčková L., Andrýs R., Lísa M., Zdarova Karasova J. A systematic evaluation of the cucurbit[7]uril pharmacokinetics and toxicity after a single dose and short-term repeated administration in mice. *Arch. Toxicol.*, 2022, Vol. 96, no. 5, pp. 1411-1421.
11. Pinchuk L.M., Filipov N.M. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immun. Ageing*, 2008, Vol. 5, 1. doi: 10.1186/1742-4933-5-1.
12. 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. *Org. Biomol. Chem.*, 2010, Vol. 8, pp. 2037-2042.

Авторы:

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

Актанова А.А. — младший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Коваленко Е.А. — к.х.н., научный сотрудник ФГБНУ «Институт неорганической химии им. А.В. Николаева» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

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

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

Kovalenko E.A., PhD (Chemistry), Research Associate, Laboratory of Chemistry of Cluster and Supramolecular Compounds, A. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Supervisor, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 15.05.2023
Принята к печати 29.06.2023

Received 15.05.2023
Accepted 29.06.2023