

На правах рукописи

Пашкина Екатерина Александровна

**ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА  
ТАФТСИНА С КУКУРБИТ[7]УРИЛОМ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)**

**Научный руководитель:**

академик РАН, доктор медицинских наук,  
профессор

**Козлов Владимир Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Меньщикова Елена Брониславовна** доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», руководитель лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов.

**Толстикова Татьяна Генриховна** доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова», руководитель лаборатории фармакологических исследований.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Защита состоится «28» апреля 2016 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» и на сайте <http://www.niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

**Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г.**

**Ученый секретарь диссертационного совета**

кандидат медицинских наук

**Белгородцев Сергей Николаевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы.**

На сегодняшний день известно большое количество пептидов, обладающих иммуномодулирующим действием (Ярилин А.А. 2004; под ред. Смирнова, 2003; Edvards *et al.*, 1999). Иммуномодулирующие пептиды используются для коррекции нарушений при вторичных иммунодефицитах, а также как сопутствующее лечение инфекционных и онкологических заболеваний. Для пептидных препаратов наиболее распространенным методом использования остается инъекционное введение. Необходимость инъекирования делает проблематичным амбулаторное лечение пациента, затрудняет применение препарата у детей младшего возраста, а в некоторых случаях запрещает применение лекарства, например, у пациентов с сахарным диабетом из-за большого числа осложнений. Наряду с этим, были сделаны попытки перорального, буккального, интраназального, легочного, глазного и ректального введения (Sayani and Chien, 1996; Lee *et al.*, 1999; Torres and Peppas, 2000). Наиболее удобным в применении является пероральный способ приема, который, вместе с тем, имеет существенные недостатки, в частности, при пероральном введении белковые и пептидные молекулы подвергаются биодegradации в ЖКТ. Чтобы избежать этого, разработаны различные способы защиты белковых препаратов, включая химическую модификацию аминокислот, повышение их гидрофобности, использование ферментных ингибиторов, применение усилителей абсорбции, использование различных переносчиков, таких как микросферы, наночастицы, липосомы (Sela *et al.*, 1997; Goyal *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2007; Shaji and Patole, 2008; Pandey *et al.*, 2009). Все эти способы защиты не дают стопроцентно эффективного результата, поэтому поиск новых методов защиты пептидов от биодegradации остается насущной проблемой.

В качестве одного из таких методов и может быть предложено комплексообразование целевых молекул по типу «гость-хозяин» с биоинертными молекулами, способными помещать в себя пептиды посредством нехимического взаимодействия. К подобным молекулам-хозяевам относятся кукурбитурилы (Hennig *et al.*, 2007). Комплекс между кукурбитурилами и пептидами образуется за счет связывания боковых радикалов аминокислотных остатков полипептидной цепи положительно заряженных аминокислот (аргинин, лизин), а также гидрофобных аминокислот, содержащих ароматическое кольцо (фенилаланин, тирозин, триптофан) (Buschmann *et al.*, 2005; Cong *et al.*, 2006; Zhang, 2006; Hennig *et al.*, 2007; Rajgariah and Urbach, 2008). Образование комплексов кукурбитурилов с пептидами не обеспечивает полную защиту для крупных пептидов, поэтому целесообразно использовать небольшие пептиды, имеющие всего несколько остатков аминокислот. Механизм образования и условия поддержания устойчивых комплексов пептидов с кукурбит[*n*]урилами по типу гость-хозяин необходимо изучать и подбирать в каждом индивидуальном случае. Селективность связывания кукурбитурилов с аминокислотами обусловлена электростатическим зарядом. Показано, что для тирозина наблюдается более тесное связывание

с кукурбит[8]урилом по сравнению с фенилаланином, так как ароматическое кольцо в молекуле тирозина более богато электронами, нежели ароматическое кольцо фенилаланина. Аффинность между кукурбитурилом и аминокислотным остатком зависит от положения аминокислоты в пептиде (Bush *et al.*, 2005). Это связано с перераспределением заряда в молекуле в водном растворителе.

В работе Hennig *et al.* (2007) показано, что образование комплексов пептидов с кукурбит[7]урилом препятствует гидролизу субстратов лейцинаминопептидазой, трипсином и другими ферментами, распознающим положительно заряженные аминокислотные остатки. В связи с этим представляет интерес исследование иммуномодулирующих пептидов, способных образовывать комплексы с кукурбитурилами. К одному из таких пептидов относится стимулятор фагоцитоза тафтсин (Перельмутер и др., 2004; Клодт и др., 2005; Babcock *et al.*, 1983; Khan *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007). В настоящее время данный пептид применяется в клинике в инъекционной форме (Павлов, Самонина, 2004). Тафтсин состоит из четырех аминокислотных остатков (Thr-Lys-Pro-Arg), комплексообразование с которым может происходить за счет связывания с положительно заряженными остатками аргинина и лизина.

#### **Цель работы:**

Изучить свойства комплекса кукурбит[7]урила с иммуномодулирующим пептидом тафтсином в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*.

#### **Задачи исследования:**

1. Получить соединение включения по типу «гость-хозяин» кукурбитурила с тафтсином, исследовать его свойства. и подобрать оптимальные условия для комплексообразования.
2. Исследовать влияние кукурбит[7]урила на иммуннокомпетентные клетки.
3. Исследовать иммуномодулирующие свойства комплекса кукурбит[7]урила с тафтсином *in vitro*: влияние комплекса на фагоцитоз и продукцию супероксидного радикала перитонеальными макрофагами и нейтрофилами, а также на продукцию провоспалительных и противовоспалительных гуморальных факторов МНК ПК.
4. Исследовать иммуномодулирующие свойства комплекса на лабораторных животных *in vivo*.

#### **Научная новизна работы.**

Впервые получен комплекс кукурбит[7]урила с пептидом тафтсином и получена константа комплексообразования  $((2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1})$  данного соединения.

Впервые исследованы иммуномодулирующие свойства макроциклического кавитанда кукурбит[7]урила.

Впервые исследовано влияние комплексообразования с кукурбит[7]урилом на биологические свойства иммуномодулирующего пептида тафтсина *in vitro*, в том числе впервые получены данные о влиянии комплекса на цитокинпродуцирующую способность МНК ПК: по сравнению со свободным пептидом, активирующим продукцию только ФНО $\alpha$ , комплекс повышал уровень спонтанной продукции всех исследуемых цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2, ИНФ- $\gamma$  и ИЛ-10). При

стимулировании цитокинпродуцирующей способности МНК ПК при помощи Кона свободный пептид повышал продукцию только ФНО- $\alpha$  и не влиял на остальные цитокины, в то время как комплекс оказывал действие на все цитокины, повышая уровень ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2, и снижая уровень ИНФ- $\gamma$  и ИЛ-10.

Впервые изучено влияние комплекса кукурбит[7]урилла с тафтсином на способность клеток продуцировать супероксидный радикал, в частности, комплексообразование тафтсина с кукурбит[7]урилом не изменяет способности пептида стимулировать продукцию супероксидного радикала нейтрофилами и макрофагами, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Впервые показано, что при коротком сроке культивации свободный тафтсин и комплексированный с кукурбит[7]урилом обладают схожим действием на фагоцитоз перитонеальных макрофагов, при увеличении же срока культивирования - более существенно, чем свободный пептид увеличивает фагоцитарную активность.

Впервые продемонстрировано, что комплексообразование с кукурбит[7]урилом не изменяет способность тафтсина повышать интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Впервые показано, что комплекс кукурбит[7]урилла с тафтсином способен статистически значимо усиливать реакции гуморального иммунитета, повышая количество антителообразующих клеток в селезенке у лабораторных животных, по сравнению со свободным пептидом.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Полученные результаты вносят новый вклад в изучение защиты пептидных и белковых препаратов от биodeградации, основанной на образовании комплексов типа «гость-хозяин» с супрамолекулярными соединениями.

Результаты исследования расширяют представления о стабилизации пептидных препаратов путем использования различных систем модификации и доставки лекарственных средств при помощи супрамолекулярных соединений, в частности, кукурбит[7]урилла.

Предлагаемый подход по модификации пептида тафтсина посредством комплексирования с кукурбит[7]урилом с целью защиты от биodeградации может быть использован для создания препарата для клинического применения. Кроме того, разработанный подход может быть использован и для других пептидов, содержащих положительно заряженные аминокислотные остатки.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Кукурбит[7]урил образует комплекс «гость-хозяин» с пептидом тафтсином, константа комплексообразования, характеризующая стабильность комплекса, составляет  $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

2. Комплекс кукурбит[7]урилла с тафтсином обладает иммуномодулирующим действием как *in vitro*, так и *in vivo*.

#### **Апробация материалов диссертации.**

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: XXII зимней молодежной научной конференции «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 2010), XIV Всероссийском научном Форуме с международным участием имени

академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2011), 8-й отчётной конференции НИИКИ СО РАМН. «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике» (г. Новосибирск, 2011), на Объединенном иммунологическом форуме 2013 (г. Нижний Новгород, 2013), XV Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2015). Апробация состоялась 24 июня 2015 года на семинаре НИИФКИ.

#### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов работ соискателей ученой степени.

#### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 116 страницах машинописного текста, включающего 7 таблиц и 6 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 185 литературных источников, в том числе 148 зарубежных.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Конкурентное флуоресцентное титрование** проводилось на флуориметре Varian Eclipse spectrofluorimeter (США) при температуре 25°C с использованием кварцевой кюветы объемом 100 мкл. Исследования проводились в 10мМ ацетатном буфере при pH 6.0.

Метод основан на использовании свойств комплекса кукурбит[7]урилы (CB[7]) (синтезирован в Институте неорганической химии им. А.В. Николаева, СО РАН, Новосибирск) и флуоресцентного красителя дапоксила («Invitrogen», США) (Koner *et al.*, 2007; Nau *et al.*, 2009). При комплексообразовании с CB[7] спектр флуоресценции дапоксила изменяется, что позволяет различить в растворе свободный краситель и его комплекс. При вытеснении дапоксила из полости CB[7] конкурирующим веществом, в данном случае тафтсином («НПФ Верта», Санкт-Петербург)) происходит обратное смещение спектра до характерного для свободного дапоксила. Зная исходные концентрации веществ,  $K_a$  CB[7] с дапоксилом и определив интенсивность флуоресценции, рассчитывали равновесные концентрации и  $K_a$  CB[7] с тафтсином. Расчеты проводили с помощью компьютерной программы Origin 7.0.

### **Выделение МНК ПК из периферической крови человека.**

Для исследований использовали гепаринизированную венозную кровь (50 Ед на 1 мл крови) условно здоровых доноров. МНК выделяли стандартно, путем центрифугирования венозной крови в градиенте плотности фиколюрографина ( $\rho=1,082$  г/л) (Вюит, 1968). Клетки культивировались в полной культуральной среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург) 24, 48 либо 96 часов во влажной атмосфере с 5 %  $\text{CO}_2$  при 37 °С.

Культивирование МНК ПК проводили в присутствии комплекса СВ[7] с тетрапептидом тафтсином (1 мкг/мл тафтсина в 0,5 мМ СВ[7]). В качестве контроля использовались интактные МНК ПК, а также МНК ПК, культивированные в присутствии 1 мкг/мл тафтсина, МНК ПК, культивированные в присутствии 0,5 мМ СВ[7] и также клетки, активированные КоНА.

### **Оценка пролиферативной активности клеток.**

Пролиферацию клеток оценивали через 96 ч по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, вносимого за 6 ч. до окончания культивирования в дозе 1 мКи (37 кБк). Подсчет радиоактивности в кислотонерастворимой фракции производили в жидкостном сцинтиляционном счетчике SL - 30 (Intertechnic, Франция). Результаты представляли в виде среднего счета (импульс/мин) из трех идентичных культур.

### **Оценка показателей клеточного цикла.**

Показатели клеточного цикла оценивали после 48 часов инкубации у интактных клеток и клеток, культивированных в присутствии 0,5 мМ СВ[7]. Клетки фиксировались 1% раствором параформальдегида в пермеабиллизировались 0,02% Твин-20 и инкубировании в течение 10 минут при 20°C. Затем к клеткам добавляли ФСБ-ЭДТА, содержащий ДНК-интеркалирующий краситель 7-ААД в конечной концентрации 20 мкг/мл.

Уровень апоптоза анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur (Becton Dickinson). Относительное содержание клеток с гипердиплоидным (клетки в S-M фазах клеточного цикла) и гиподиплоидным (апоптотические клетки) набором ДНК определяли по степени флуоресценции внутриядерного красителя 7-ААД. Результат выражали в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству клеток (Fruehauf *et al.*, 1998).

### **Определение продукции цитокинов МНК ПК.**

Продукцию ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2 оценивали в супернатантах 24-часовых культур МНК ПК, ИНФ- $\gamma$  и ИЛ-4 – в 48-часовых супернатантах. Концентрацию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы производства «Вектор-Бест».

### **Характеристика и условия содержания лабораторных животных.**

В работе были использованы мыши-самцы гибриды F1 (СВА×С57В1/6) в возрасте 2 мес, полученные из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей (Кополадзе, 1998).

В экспериментах *in vivo* для внутрибрюшинного введения использовались растворы СВ[7] и тафтсина в PBS. Животные были разделены на группы по 8-10 мышей, которым внутрибрюшинно трехкратно в течение недели проводили инъекции: первой группе – комплекс тафтсина с СВ[7] (25 мкг тафтсина в 0,25 мл 4М раствора СВ[7]), второй – 25 мкг тафтсина, третьей – 0,25 мл 4М раствора СВ[7], четвертой – 0,25 мл PBS.

#### **Получение перитонеальных макрофагов и нейтрофилов.**

Перитонеальные макрофаги и нейтрофилы, получаемые для оценки клеточности после инъекций препаратами и исследования продукции супероксидного радикала выделяли вымыванием питательной средой из полости умерщвленных декапитацией животных без предварительного введения дополнительного препарата для получения резидентных макрофагов, либо после введения 1 мл 10%-го стерильного пептона для привлечения в брюшную полость элиситированных нейтрофилов и макрофагов. Культивирование элиситированных клеток проводили в присутствии комплекса (0,5 мМ СВ[7] и 1 мкг/мл тафтсина), в качестве контроля использовались клетки, культивированные со свободными СВ[7] и тафтсином в тех же концентрациях, а также интактные клетки.

**Оценка продукции супероксидного радикала перитонеальными нейтрофилами и макрофагами мыши** проводилась модифицированным нами спектрофотометрическим методом определения восстановления р-нитросинеготетразолия (НСТ) до формазана (Любимов и др., 1992; Amano et al., 1975). К монослою клеток добавляли 0,5 мл раствора фосфатно-солевого буфера с 0,1% содержанием глюкозы с добавлением 2 мг/мл зимозана, предварительно опсонизированного сывороткой мышей, и 1 мг/мл НСТ. Планшет с пробами термостатировали при 37°C в течение 30 минут, гранулы формазана растворяли в 0,5 мл диметилсульфоксида. Оптическую плотность измеряли на мультимодальном планшетном ридере («Berthold Technologies», США) при длине волны 540 нм. Результаты выражали в условных единицах оптической плотности.

**Оценка Fc-рецептор-опосредованного фагоцитоза** проводилась спектрофотометрически. К монослою макрофагов добавляли по 1 мл 1% суспензии опсонизированных эритроцитов барана, после чего пробы термостатировали при 37°C в течение 30 минут. Затем суспензия эритроцитов декантировалась, и лунки заполнялись 1 мл 0,09% гипотоническим раствором NaCl, после чего гемолизат удаляли. Далее лунки заполняли 250 мкл 1% раствора детергента (додецилсульфат натрия). Результат оценивали спектрофотометрически на мультимодальном планшетном ридере («Berthold Technologies», США) при длине волны 405 нм. Результат выражали в условных единицах оптической плотности.

**Гуморальный иммунный ответ** на Т-зависимый антиген – эритроциты барана (ЭБ)-оценивали на пике ответа, свойственного генотипу, по количеству локальных зон гемолиза в жидкой среде RPMI-1640 (Cunningham A.J., 1965).

**Клеточный иммунный ответ** оценивали по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ): измеряли величину отёка лапы после введения разрешающей дозы ЭБ

сенсibilизированным животным по стандартной методике (Yoshikai Y., 1979; Muracami M. *et al.*, 1995).

#### **Статистическая обработка полученных данных**

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя медиану (Me), 25-ю и 75-ю процентиль (LQ, HQ), и представляли в виде Me (LQ, HQ). Оценку различий между клетками, культивированными в различных условиях, проводили при помощи непараметрического критерия Вилкоксона, а различия между группами животных оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни, достоверными считали результаты при  $p < 0,05$ .

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **Исследование комплексообразования СВ[7] с тафтсином.**

В ходе конкурентного титрования тафтсин вытеснял из полости СВ[7] краситель дапоксил, интенсивность флуоресценции которого меняется в зависимости от того, образует ли он комплекс с СВ[7]. Поэтому сперва необходимо было исследовать в наших условиях комплексообразование СВ[7] с дапоксилом и подобрать условия для дальнейшего конкурентного титрования.

На первом этапе провели титрование дапоксила СВ[7] для определения константы комплексообразования СВ[7] с дапоксилом в наших условиях - в 10мМ ацетатном буфере при рН 6.0 при температуре 25°C. Полученное значение  $K_a = (1.8 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , практически совпадало с литературными данными ( $K_a = 2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) (Konerand, Naц, 2007). Кроме того, были подобраны оптимальные уровень напряжения (700V) и длины волн ( $\lambda_{exc} = 320\text{nm}$ ,  $\lambda_{em} = 380\text{nm}$ ) для последующего конкурентного титрования. Для конкурентного флуоресцентного титрования также было необходимо определить исходные концентрации дапоксила и СВ[7] таким образом, чтобы раствор не был насыщен до предела «молекулами- гостями» и оставалась возможность вытеснения таких молекул из полости «хозяина» конкурирующим веществом – пептидом. В ходе анализа полученных на первом этапе результатов были подобраны исходные концентрации веществ для следующего этапа: дапоксила – 2.5  $\mu\text{M}$ , СВ[7] – 10  $\mu\text{M}$ .

Конкурентное флуоресцентное титрование проводилось путем постепенного добавления определенных количеств конкурирующего вещества (пептида) к буферному раствору, содержащему СВ[7] и краситель. Интенсивность флуоресценции исходного раствора на определяемой нами длине волны при добавлении пептида снижалась вследствие вытеснения красителя из полости СВ[7] (рис. 1).

Исходя из концентрации исходных веществ и зависимости интенсивности флуоресценции от количества добавляемого тафтсина были проведены расчеты константы. В результате константа комплексообразования СВ[7] с пептидом тафтсином, характеризующая стабильность комплекса, составила  $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

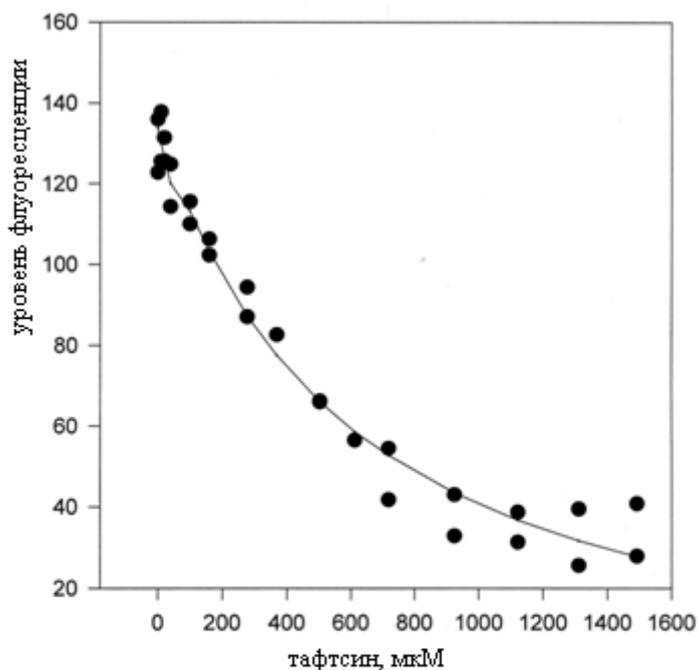


Рис. 1. Кривая конкурентного флуоресцентного титрования, демонстрирующая снижение флуоресценции красителя, вытесненного из полости кавитанда при помощи пептида.

Поскольку комплексообразование происходит за счет положительно заряженных аминокислотных групп, константа может изменяться в зависимости от pH раствора. Тафтсин имеет изоэлектрическую точку  $pI=11,64$ , которая находится в щелочной среде. Соответственно, при нейтральных и слабощелочных значениях pH пептид будет заряжен положительно. Более того, стабильный положительный заряд пептида, равный 2, будет сохраняться в широком

диапазоне значений pH - от 3 до 9. Следовательно, в этом диапазоне аминокислотные остатки аргинина и лизина будут сохранять протонирование, а значит будут способны на связывание с карбонильными группами в области порталов кавитанда при образовании комплекса «гость-хозяин». Таким образом, при широком спектре значений pH от 3 до 9 раствора, в котором находится комплекс, константа комплексообразования будет сохраняться на том же уровне, что позволяет комплексу оставаться стабильным в различных физиологических средах организма, обладающих различным уровнем pH.

Исходя из константы комплексообразования, растворимости и литературных данных по исследованию биологической активности составляющих комплекса были подобраны оптимальные концентрации исходных веществ для экспериментов *in vitro* – 0,5 мМ СВ[7] и 1 мкг/мл тафтсина.

#### **Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на пролиферацию МНК ПК**

Влияние комплекса на функциональные свойства лимфоцитов оценивалось нами по спонтанной и КонА индуцированной пролиферативной активности МНК ПК (Табл. 1). Было показано, что комплекс тафтсина с СВ[7] не влияет на пролиферативную активность МНК ПК здоровых доноров при спонтанной пролиферации. В случае стимулирования пролиферации митогеном КонА при добавлении комплекса наблюдается схожая ситуация – добавление в культуру комплекса тафтсина с СВ[7] не приводит к изменению пролиферативной активности стимулированных митогеном клеток. Свободные пептид и СВ[7] также не влияют на пролиферацию мононуклеаров как в случае спонтанной пролиферативной активности, так и при стимулировании митогеном. Таким образом, в используемых дозах ни комплекс тафтсина с

СВ[7], ни свободный пептид, ни кавитанд по отдельности не влияют на пролиферацию МНК ПК как в случае спонтанной, так и в случае митоген-индуцированной пролиферативной активности.

**Таблица 1.**

Влияние комплекса СВ[7] с тафтсином, а также свободных тафтсина и СВ[7] на пролиферативный ответ МНК ПК.

Условия инкубации	Скорость включения Н <sup>3</sup> -тимидина в ДНК, имп./мин на лунку	
	Спонтанная пролиферация, n=12	КонА- – стимулированная пролиферация, n=16
контроль	163 (105-387)	6243 (3648-16427)
СВ[7]	244 (167-397)	5369 (3404-15359)
Тафтсин	253 (118-371)	5568 (3275-14765)
Комплекс	240 (108-334)	7478 (3794-14339)

Примечание: n – число доноров. Данные оценены с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей)

Согласно литературным данным, возможность действия тафтсина как фактора роста на иммунокомпетентные клетки исследовалось в основном при помощи Н<sup>3</sup>-тимидин пролиферации. Как было показано, тафтсин обладает слабой митогенной активностью в отношении спонтанной пролиферации лейкоцитов периферической крови человека, а также мононуклеарных клеток селезенки и клеток костного мозга мыши, наибольший эффект был получен при концентрации пептида 1 мкг/мл (Nishioka *et al.*, 1980; Nishioka *et al.*, 1990). Согласно полученным нами данным, тафтсин не влияет на спонтанную пролиферацию МНК ПК, что несколько противоречит литературным данным, однако, возможно, в данном случае небольшой размер выборки (n=12) не позволил воспроизвести данный слабый эффект. Литературные данные по поводу влияния тафтсина на митоген-индуцированную пролиферацию различаются, что вероятно связано с различными условиями проведения экспериментов. Так, тафтсин стимулирует пролиферацию спленоцитов, стимулированную ФГА или ЛПС, однако подавляет КонА-индуцированную пролиферацию лимфоцитов, выделенных у животных после инъекций пептида, что связывают со стимуляцией регуляторных клеток (Florentin *et al.*, 1978; Florentin *et al.*, 1986). Присутствие СВ[7] в исследуемой дозе не влияет на клеточную пролиферацию, клеточный цикл и апоптоз МНК ПК, следовательно, в данном исследовании СВ[7] в используемой концентрации проявил себя как биоинертная молекула, не обладающая иммуномодулирующим действием. Поскольку полученный нами комплекс СВ[7] с тафтсином, так же, как и свободный тафтсин, не влиял на спонтанную либо стимулированную пролиферацию, полученные нами данные свидетельствуют о том, что комплексообразование не влияет на пролиферативную активность клеток.

Также с целью оценки влияния макроциклического кавитанда СВ[7] на функциональную активность МНК ПК были исследованы показатели фаз клеточного цикла и спонтанного апоптоза. Данные показатели были практически идентичны в контроле и у клеток, культивированных в

присутствии СВ[7] (Табл. 2). Следовательно, присутствие СВ[7] в исследуемой дозе не подавляет клеточную пролиферацию и не индуцирует апоптоз МНК ПК.

**Таблица 2.**

Относительное количество МНК в разных фазах клеточного цикла, %.

	СВ[7], 0,5 мМ	Контроль
G1/G0	91,69 (88,26-93,55)	91,69 (88,72-92,41)
SM	8,59 (6,64-11,93)	8,59 (7,8-11,45)
Апоптоз	0,14 (0,08-0,2)	0,12 (0,06-0,15)

Примечание: Данные оценены с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей)

### **Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на цитокинпродуцирующую способность МНК ПК**

Проведенные *in vitro* исследования по изучению спонтанной цитокинпродуцирующей способности МНК ПК здоровых доноров представлены в таблице 3.

**Таблица 3.**

Влияние комплекса тафтсина с СВ[7], а также свободных тафтсина и СВ[7] на спонтанную продукцию цитокинов МНК ПК.

	ФНО $\alpha$	ИНФ $\gamma$	ИЛ-2	ИЛ-10
контроль	39,03 (8,43-65,05)	7,61 (2,12-14,90)	4,66 (0,86-5,69)	152,67 (132,67-253,14)
СВ[7]	60,65 (14,25-109,00)	19,33 * (12,56-26,56)	1,98 (0-8,10)	196,48 (139,33-256,00)
тафтсин	46,77 * (21,41-145,80)	13,78 (9,47-28,49)	3,28 (1,55-8,45)	212,19 (146,48-321,71)
комплекс	63,40 * (14,38-160,42)	20,17 * (15,67-39,34)	7,93* (5,69-16,72)	203,38 * (144,57-330,76)

Примечания:\* достоверные различия по сравнению с контролем. Данные оценены с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей)

Было обнаружено, что свободный пептид активировал продукцию только ФНО $\alpha$ , однако концентрация ИНФ $\gamma$  также имела тенденцию к повышению по сравнению с контролем, но различия были не достоверны. СВ[7] повышал продукцию ИНФ $\gamma$  по сравнению с контролем. Таким образом, СВ[7], изначально предполагаемый нами как биоинертная молекула, используемая только для защиты от пептидаз, сам обладает определенным иммуностимулирующим действием. Добавление комплекса тафтсина с СВ[7] обуславливало повышение уровня всех исследуемых цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИНФ $\gamma$ , ИЛ-2 и ИЛ-10) по сравнению с контролем - нестимулированными МНК ПК.

Также было проведено исследование стимулированной КонаА продукции цитокинов МНК ПК при воздействии комплекса и свободных пептида и СВ[7] (Табл. 4). Показано, что свободный пептид повышал уровень стимулированной продукции только ФНО $\alpha$ , понижал - ИНФ $\gamma$ , на продукцию остальных цитокинов действия не оказывал. СВ[7] понижал уровень ИЛ-10 и ИНФ $\gamma$ , но при этом повышал уровень продукции ИЛ-2 стимулированными КонаА мононуклеарами. В то же время комплекс оказывал действие на все цитокины, продуцированные стимулированными КонаА клетками, повышая уровень ФНО $\alpha$  и ИЛ-2, и снижая уровень ИНФ $\gamma$  и ИЛ-10.

**Таблица 4.**

Влияние комплекса тафтсина с СВ[7]ом на КонаА-стимулированную продукцию цитокинов МНК ПК.

	ФНО $\alpha$	ИНФ $\gamma$	ИЛ-2	ИЛ-10
контроль	333,75 (242,50- 684,17)	752,00 (199,67- 1516,33)	230,86 (122,24- 434,31)	709,81 (561,24- 956,00),
СВ[7]	626,67 (367,50- 916,66)	171,60 * (58,33- 453,00)	270,86 * (182,24- 512,93)	437,67 * (388,38- 499,33)
тафтсин	855,00 * (570,80- 1375,83)	459,00 (153,67- 1186,33)	405,69 (202,58 585,68)	662,67 (525,05- 910,29)
комплекс	1415,42 * (980,83 1723,33)	205,67 * (82,33- 731,67)	335,34 * (250,86- 542,93)	547,43 * (484,10- 678,38)

Примечания:\* достоверные различия по сравнению с контролем. Данные оценены с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей)

К настоящему времени проведено множество исследований, свидетельствующих о том, что тафтсин и его аналоги влияют на цитокинпродуцирующую способность клеток, в том числе МНК ПК. Известно, что иммунокомпетентные клетки при поглощении тафтсина и его аналогов способны продуцировать ИНФ $\gamma$  и TNF $\alpha$  (Перельмутер и соав., 2004). В опытах *in vitro* на мононуклеарах периферической крови показано отсутствие эффекта при добавлении пептида и в то же время повышение уровня указанных цитокинов при стимуляции аналогами тафтсина, что связывают с более быстрой биодеградацией нативного пептида (Paulesu *et al.*, 1992). Поэтому нами было проведено сравнение продукции ИНФ $\gamma$  и TNF $\alpha$  при спонтанной индукции и при стимуляции комплексом и свободным пептидом.

Согласно нашим данным, свободный тафтсин слабо стимулирует продукцию TNF $\alpha$  как в случае спонтанной, так и в случае стимулированной продукции. Комплексообразование не влияло на спонтанную продукцию, но повышало стимулированную продукцию TNF $\alpha$  по сравнению с действием свободного тафтсина, что может быть следствием защиты

препарата от биодegradации, поскольку свободный СВ[7] не влиял на синтез данного цитокина МНК ПК.

В данном исследовании СВ[7] неожиданно проявил себя как иммуномодулятор, повышая уровень спонтанной продукции и понижая уровень Кона-стимулированной продукции ИНФ- $\gamma$ . Аналогичное воздействие оказывал и комплекс тафтсина с СВ[7]. Вполне возможно, что повышение уровня ИНФ $\gamma$  в присутствии комплекса по сравнению с контролем связано либо с действием на лимфоциты СВ[7], а не тафтсина, либо с синергетическим действием компонентов комплекса. Свободный тафтсин не влиял на спонтанную и понижал стимулированную продукцию ИНФ $\gamma$ . Следует отметить, что не все литературные источники свидетельствуют о стимулирующем либо нейтральном действии тафтсина и его аналогов на продукцию ИНФ $\gamma$ , есть данные о снижении продукции цитокина, вызванные, по предположению авторов исследования, активацией супрессорного действия лимфоцитов (Florentin *et al.*, 1986). Следовательно, вполне возможно, что действие тафтсина на лимфоциты может зависеть от различных факторов, к примеру, от наличия костимуляторных сигналов.

Поскольку IL-2 и IL-10 тоже в первую очередь синтезируются лимфоцитами, влияние тафтсина на продукцию данных цитокинов предположительно может варьировать в зависимости от условий эксперимента, что подтверждается литературными данными. В настоящее время показано, что свободный тафтсин понижает, а аналог тафтсина повышает Кона-стимулированную продукцию IL-2 спленocyтaми, свободный пептид понижает продукцию IL-10 *in vitro*, но также известно, что тафтсин и комплекс тафтсина с фосфорилхолином при применении *in vivo* могут повышать продукцию IL-10 (Ben-Ami Shor *et al.*, 2015; Florentin *et al.*, 1986; Wardowska *et al.*, 2009; Shakya *et al.*, 2012).

Так как в случае спонтанной продукции ни свободный тафтсин, ни СВ[7] не влияли на синтез IL-2 и IL-10, повышение уровня данных цитокинов под действием комплекса предположительно связано либо с синергетическим эффектом, вызванным одновременным действием на клетки тафтсина и СВ[7], либо с пролонгированием действия пептида, из-за чего пептид оказывается способным осуществить стимулирующее действие на клетки.

В случае Кона- стимуляции продукции IL-2 и IL-10 свободный тафтсин также не оказывал эффекта, как и в случае спонтанной стимуляции. А СВ[7] вновь продемонстрировал иммуномодулирующее действие, повышая продукцию IL-2 и понижая синтез IL-10 МНК ПК. В связи с этим можно предположить, что действие комплекса (повышение продукции IL-2 и понижение – IL-10) в данном случае прежде всего вызвано иммуномодулирующим эффектом СВ[7].

Способность понижать уровень IL-10 одновременно со стимуляцией продукции ФНО $\alpha$  делает комплекс тафтсина с СВ[7] перспективным средством для применения в противоопухолевой терапии. Известно, что сам тафтсин обладает противоопухолевым действием, вызывая торможение опухолевого роста и процессов метастазирования (RajaNaresh *et al.*, 1996). Противоопухолевый эффект полученного комплекса требует дополнительных исследований, выходящих за рамки данной работы.

**Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на продукцию супероксидного радикала *in vitro* и *in vivo*.**

Поскольку иммуномодулирующие свойства тафтсина проявляются в основном в стимуляции фагоцитирующих клеток, дальнейший интерес представляло исследование влияния комплекса на активацию данных клеток. В первую очередь было изучено влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами и макрофагами, определяемую в ходе НСТ-теста. (Табл. 5).

**Таблица 5.**

Показатели НСТ-теста после воздействия комплекса СВ[7] с тафтсином, либо свободных СВ[7] и тафтсина, добавляемых при культивировании либо вводимых лабораторным животным, выраженные в условных единицах оптической плотности.

группы	нейтрофилы ( <i>in vitro</i> )	макрофаги ( <i>in vitro</i> )	макрофаги ( <i>in vivo</i> )
контроль	0,269 (0,209-0,282) (n=8)	0,450 (0,409-0,524) (n=14)	0,204 (0,150-0,240) (n=16)
СВ[7]	0,258 (0,238-0,285) (n=8)	0,496 (0,451-0,558) (n=14)	0,251 (0,167 - 0,291) (n=11)
тафтсин	0,363 (0,349-0,415)* (n=8)	0,649 (0,636-0,679) (n=14)*	0,285 (0,257-0,305) * (n=18)
комплекс	0,388 (0,377-0,416)* (n=8)	0,611 (0,605-0,677) (n=14)*	0,241 (0,208-0,305) * (n=18)

Примечания: Данные представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей); n – размер выборки;\* достоверные различия по сравнению с контролем.

Было выявлено, что комплекс тафтсина с СВ[7], так же, как и свободный пептид, достоверно повышает продукцию супероксидного радикала в реакции восстановления НСТ в экспериментах *in vitro* как у нейтрофилов, так и у перитонеальных макрофагов. Статистически значимых различий между продукцией супероксидного радикала клетками, инкубированными в присутствии комплекса и клетками, активированными свободным тафтсином, обнаружено не было. Важно, что сам СВ[7] не вызывает достоверных изменений в продукции супероксидного радикала.

Сходная картина наблюдалась и при действии комплекса СВ[7] с тафтсином в экспериментах *in vivo*, когда его внутрибрюшинно вводили лабораторным животным. В данном случае у мышей наблюдалась повышенная продукция супероксидного радикала резидентными перитонеальными макрофагами относительно контрольной группы. Введение свободного тафтсина также повышало уровень восстановления НСТ относительно контроля, что соответствовало уже известным данным о влиянии тафтсина на макрофаги *in vivo* (Chu *et al.*, 1990). Достоверных различий в продукции супероксидного радикала после введения комплекса и свободного пептида не наблюдалось. СВ[7] при внутрибрюшинном введении также, как и в исследовании *in vitro*, не влиял на способность клеток восстанавливать НСТ.

Следовательно, тафтсин в комплексе с СВ[7], как и свободный пептид, способен оказывать влияние на функциональную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов, увеличивая уровень продукции супероксидного радикала. Таким образом было показано, что полученный комплекс обладает действием *in vivo*, и связывание тафтсина с СВ[7] не снижает его биологической эффективности. СВ[7] в данном исследовании проявил себя как биологически инертная молекула, не влияя на синтез супероксидного радикала нейтрофилами и макрофагами.

**Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на показатели клеточности перитонеального экссудата мышей при перитонеальном введении.**

В отдельной серии экспериментов мы исследовали влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на показатели клеточности перитонеального экссудата мышей с целью изучить возможность тафтсина дополнительно привлекать клетки макрофагального ряда в очаг воспаления дополнительно к резидентным макрофагам (Табл. 6).

**Таблица 6.**

Количество резидентных перитонеальных макрофагов, выделенных у групп животных после внутрибрюшного введения комплекса тафтсина с СВ[7], свободного тафтсина, свободного СВ[7] и PBS.

	Количество, млн Ме (LQ; HQ)
контроль (n=16)	1,39 (1,22; 2,18)
СВ[7] (n=11)	2,40 (2,10; 3,22)
тафтсин (n=18)	2,40 (2,00; 3,90) *
комплекс (n=18)*	2,97 (1,96; 3,45) *

Примечание: n – размер выборки (число животных в каждой группе); \* достоверные различия по сравнению с контролем.

При воспалении или стимуляции иммунитета в очаг воспаления дополнительно мигрируют моноциты с фенотипом, отличным от фенотипа резидентных макрофагов (Onoprienko *et al.*, 2011). На сегодняшний день считается, что основная функция резидентных макрофагов – гомеостатическая и регуляторная, в противовес к макрофагам воспаления, играющих роль эффекторных клеток в воспалительных процессах. Полученные результаты говорят о том, что комплекс, как и свободный тафтсин, увеличивает число привлекаемых воспалительных клеток, преимущественно состоящих из макрофагов и нейтрофилов, в брюшной полости, что соответствует литературным данным о влиянии иммуностимулирующего пептида тафтсина на миграцию и хемотаксис (Vabcock *et al.*, 1983). Соответственно, усиление *in vivo* продукции активных форм кислорода выделенными нами перитонеальными макрофагами может быть вызвано усиленной тафтсином миграцией воспалительных макрофагов, обладающей более выраженной фагоцитарной активностью по сравнению с резидентными макрофагами.

Однако результаты *in vitro* показывают, что при условиях, когда препараты вносятся после выделения клеток, а значит нет гетерогенности клеточного пула, вызванной разными условиями для миграции, все же

наблюдаются достоверные различия по продукции супероксидного радикала между интактными клетками и клетками, инкубированными в присутствии тафтсина либо комплекса тафтсина с СВ[7]. Соответственно, полученные *in vivo* результаты по продукции супероксидного радикала отражают оба явления, происходящим вследствие влияния свободного пептида либо его комплекса – и повышение гетерогенности клеточного пула, и стимуляцию внутриклеточных процессов данными препаратами.

### **Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов.**

Влияние комплекса на фагоцитоз оценивалось по поглощению эритроцитов барана (ЭБ) элиситированными перитонеальными макрофагами. Для оценки возможности пролонгированного действия комплекса исследование проводилось после 4 и 48-часового культивирования клеток (рис. 2) в различных условиях: в присутствии комплекса тафтсина с СВ[7], в присутствии свободного тафтсина, в присутствии свободного СВ[7], а также без дополнительного добавления каких-либо реагентов (рис. 3).

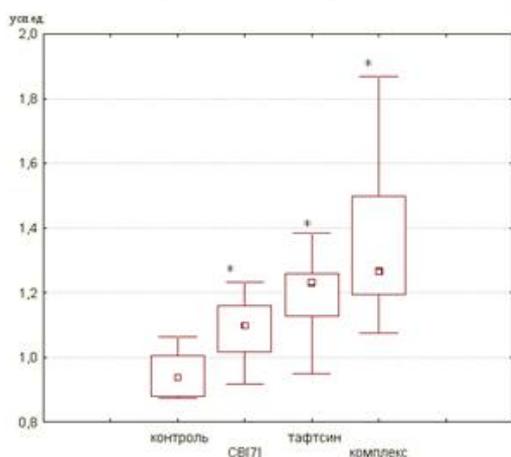


Рис. 2. Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на фагоцитоз *in vitro* перитонеальными макрофагами мыши (4 часа). \* Достоверные различия по сравнению с контролем.

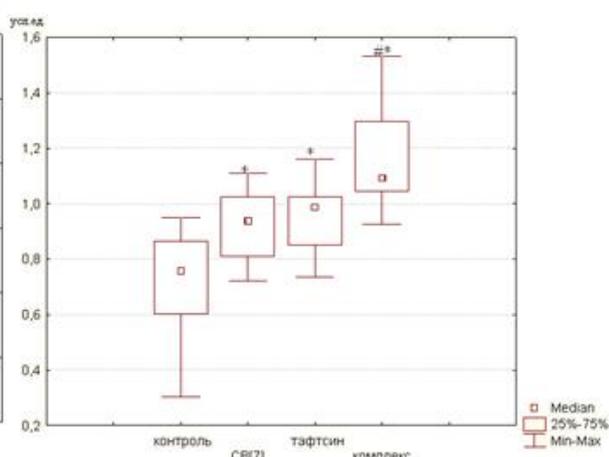


Рис. 3. Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на фагоцитоз *in vitro* перитонеальными макрофагами мыши (48 часов). \* Достоверные различия с контролем. # Достоверные различия по сравнению со свободным тафтсином.

Было показано, что при культивировании в течение 4 часов комплекс, как и тафтсин, повышали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов *in vitro* по сравнению с контролем. Различий между действием свободного и комплексированного пептида не наблюдалось. СВ[7] так же повышал фагоцитарную активность клеток, однако достоверно слабее, чем тафтсин. Следовательно, при 4-часовом культивировании тафтсин и комплекс тафтсина с СВ[7] обладают схожим действием на фагоцитоз перитонеальных макрофагов. Иммуностимулирующее действие СВ[7] на фагоцитарную активность клеток слабо выражено.

После 48-часовой инкубации (рис. 4) наблюдалось повышение фагоцитарной активности у клеток, культивированных с комплексом, относительно макрофагов, стимулированных свободным тафтсином. Влияние тафтсина и СВ[7] на фагоцитоз при данном сроке культивирования было практически идентично – слабо повышено относительно контроля.

Предположительно повышение активности обусловлено прежде всего пролонгированием действия комплекса, связанным с защитой от биодegradации, кроме того, данный эффект можно объяснить синергетическим эффектом из-за совместного действия компонентов комплекса.

Таким образом, комплекс обладает более выраженным эффектом на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мыши при увеличении времени культивирования, что, возможно, свидетельствует о более длительном действии комплексированной формы тафтсина вследствие протективного влияния СВ[7]. Данный эффект предположительно связан с защитой пептида тафтсина от биодegradации в условиях *in vitro*.

#### **Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на реакции гуморального и клеточного иммунитета *in vivo*.**

Следующим этапом работы была оценка иммуномодулирующего действия комплекса на показатели иммунитета *in vivo*: количество АОК в селезенке и выраженность реакции ГЗТ у лабораторных животных. Поскольку тафтсин главным образом стимулирует врожденный иммунитет, повышая продукцию прежде всего провоспалительных цитокинов, данный пептид и его аналоги могут усиливать как Th1, так и Th2 тип иммунного ответа (Jiang *et al.*, 2014).

Показано, что и введение комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом, и введение свободного пептида тафтсина повышает выраженность реакции ГЗТ (рис.4). Достоверных различий между действием комплекса и свободного пептида не обнаружено. Стимулирующее действие свободного и комплексированного пептида, возможно, связано с несколькими фактами. Во-первых, тафтсин стимулирует наработку цитокинов, способствующих усилению клеточного иммунного ответа, во-вторых, активируя макрофаги, пептид способствует улучшению клеточной кооперации антигенпрезентирующих клеток и Т-лимфоцитов (Tzehoval *et al.*, 1978).

Из литературных источников следует, что пептид тафтсин усиливает реакцию ГЗТ в дозе 25 мкг/мышь, следовательно, полученные результаты соответствуют данным из литературных источников (Florentin *et al.*, 1986).

Известно, что тафтсин способен усиливать реакции гуморального иммунитета, повышая количество АОК в селезенке у лабораторных животных. Усиление приобретенного гуморального иммунитета может быть связано с улучшением клеточной кооперации АПК и Т-хелперов с последующим развитием Th2-клеток, либо с усилением продукции Th2-цитокинов.

После введения лабораторным животным комплекса пептида тафтсина с СВ[7] наблюдалось увеличение количества АОК в селезенке при развитии первичного иммунного ответа на тимусзависимый антиген (эритроциты барана) по сравнению с контролем (рис. 5). Свободный пептид не оказывал влияние на количество АОК. СВ[7] без иммуномодулирующего пептида не влиял на количество антителообразующих клеток. Согласно литературным данным, тафтсин повышает количество АОК при введении в дозе 20мг/кг (Florentin *et al.*, 1978), в то время как в данном исследовании доза препарата на одну мышь гораздо ниже – 1,25 мг/кг. В данной дозе свободный тафтсин

не оказывал влияния на количество АОК, а комплексированный пептид статистически достоверно повышал количество АОК. Поскольку СВ[7] не влиял на образование АОК в селезенке, эффект комплекса тафтсина с СВ[7] скорее всего связан с пролонгированием и усилением действия пептида. Соответственно, в эксперименте с АОК комплексообразование позволяет снизить дозу препарата более чем в 10 раз.

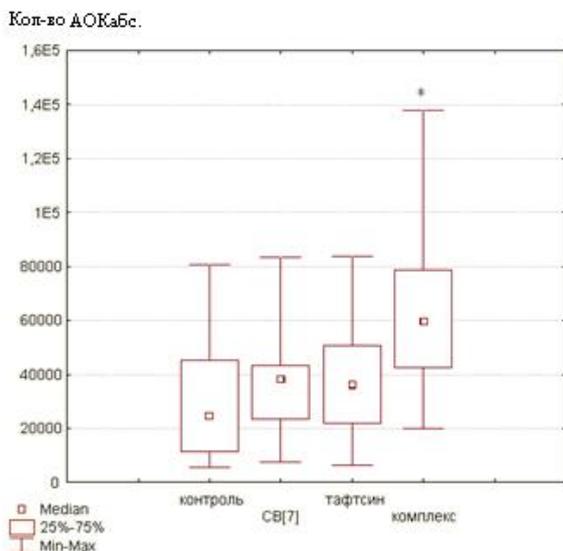


Рис. 4. Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на количество АОК в селезенке у лабораторных животных.  
\* Достоверные различия по сравнению с контролем (критерий Вилкоксона).

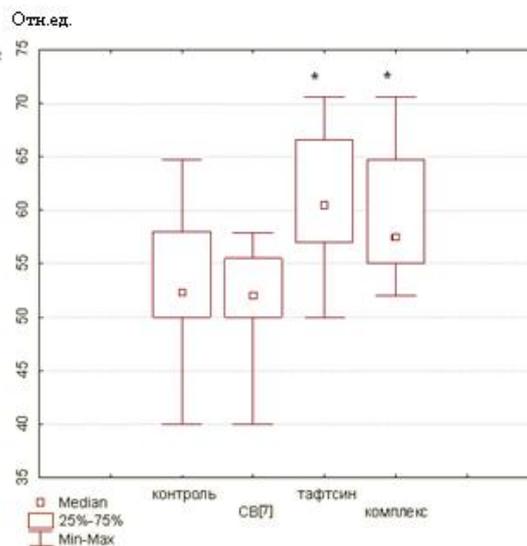


Рис. 5. Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на клеточный иммунитет  
Примечания: \* Достоверные различия по сравнению с контролем (критерий Вилкоксона).

Таким образом было показано, что иммуномодулирующее действие свободного пептида тафтсина и комплекса тафтсина с СВ[7] различно. Предположительно, наблюдаемые различия в действии комплекса и свободного пептида могут быть связаны, во-первых, с предполагаемым нами пролонгированным действием комплекса, во-вторых, с иммуномодулирующим действием комплексообразующего вещества – СВ[7], и в-третьих, с синергическим эффектом компонентов комплекса. Важно отметить, что ни в одном из экспериментов комплексообразование не подавляло иммуномодулирующее действие пептида.

Следовательно, изучение свойств комплекса СВ[7] с тафтсином, а также возможно и с другими пептидами, требует дальнейших исследований. Комплексообразование с СВ[7] лекарственных пептидов, содержащих положительные аминокислотные остатки, является перспективным направлением, позволяющим не только пролонгировать и защитить препарат от биодegradации в организме, но и усилить или модифицировать биологическое действие пептида.

## ВЫВОДЫ

1. Тетрапептид тафтсин образует комплекс по типу «гость-хозяин» с СВ[7], константа связывания, характеризующая стабильность комплекса, составляет  $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

2. СВ[7] в концентрации 0,5мМ повышает спонтанную продукцию ИНФ- $\gamma$  МНК ПК и модулирует КонА-индуцированную продукцию цитокинов, понижая уровень ИНФ $\gamma$  и ИЛ-10 и повышая уровень ИЛ-2, а также стимулирует Fc-опосредованный фагоцитоз перитонеальными макрофагами мыши, что указывает на его иммуностимулирующее действие.

3. Комплекс СВ[7] с тафтсином повышает уровень спонтанной продукции ФНО $\alpha$ , ИНФ $\gamma$ , ИЛ-2 и ИЛ-10, в то время как свободный пептид активирует продукцию только ФНО- $\alpha$ . При стимуляции клеток КонА свободный пептид повышает уровень стимулированной продукции только ФНО $\alpha$ , не влияя на продукцию остальных цитокинов. Комплекс оказывает действие на цитокины, продуцированные стимулированными КонА клетками, повышая уровень ФНО $\alpha$  и ИЛ-2 и снижая уровень ИНФ $\gamma$  и ИЛ-10, что говорит о его более широком спектре действия комплекса на цитокинпродуцирующую активность МНК ПК по сравнению со свободным тафтсином.

4. При коротком сроке культивирования тафтсин и его комплекс с СВ[7] обладают схожим стимулирующим действием, одинаково усиливая Fc-опосредованный фагоцитоз перитонеальными макрофагами, в то время как при увеличении срока культивирования комплекс проявляет более выраженный стимулирующий эффект на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, чем свободный пептид.

5. Комплекс тафтсина с СВ[7], в отличие от свободного пептида, увеличивает число антителообразующих клеток в селезенке у мышей после внутрибрюшинного введения соединений, что свидетельствует о стимулирующем влиянии комплекса на продукцию антител.

6. Свободная форма тафтсина, так же как и комплекс тафтсина с СВ[7] стимулируют продукцию супероксидного радикала перитонеальными макрофагами и нейтрофилами мыши и повышают выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа у лабораторных животных. Следовательно, комплексообразование тафтсина с СВ[7] не влияет на способность пептида повышать продукцию супероксидного радикала нейтрофилами и макрофагами как *in vitro*, так и *in vivo*, а также стимулировать реакцию гиперчувствительности замедленного типа *in vivo*.

7. Комплексообразование тафтсина с СВ[7] расширяет спектр воздействия на цитокинпродуцирующую способность МНК ПК и усиливая стимулирующее влияние на фагоцитоз при длительном сроке культивирования и повышая продукцию антител *in vivo*.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пашкина Е.А., Щепотина Е.Г., Гришина Л.В., Канажевская Л.Ю., Герасько О.А., Козлов В.А. Иммуноактивные свойства тафтсина при

комплексообразовании его с кукурбит[7]урилом // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. - № 2/2 (35). – С. 50-51.

2. Щепотина Е.Г., Пашкина Е.А., Якушенко Е.В., Козлов В.А. Кукурбитурилы - контейнеры для лекарственных соединений // «Российские нанотехнологии» - 2011. – Т. 6. - N 11-12. – С. 97-101.

3. Щепотина Е.Г., Гришина Л.В., Пашкина К.А., Салех Н., Якушенко Е.В., Козлов В.А. Цитотоксическое действие албендазола и его комплекса с кукурбит[7]урилом *in vitro*. // Тезисы докладов и стендовых сообщений школы XXII зимней молодежной научной -конференции «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2010. С. 130.

4. Пашкина Е.А. Гришина Л.В., Щепотина Е.Г., Якушенко Е.В., Козлов В.А. Исследование влияния комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом на продукцию иммуноактивных цитокинов. // Материалы XIV всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». /- Медицинская иммунология – 2011. – Т. 13 - № 4-5 – С. 328.

5. Пашкина Е.А. Гришина Л.В., Щепотина Е.Г., Якушенко Е.В., Козлов В.А. Иммуноактивные свойства тафтсина при комплексообразовании его с кукурбит[7]урилом // Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике. Материалы 8-й отчётной конференции НИИКИ СО РАМН. Новосибирск – 2011. – С.87-89.

6. Пашкина Е.А., Гришина Л.В., Щепотина Е.Г., Якушенко Е.В., Козлов В.А. Создание комплекса иммуномодулирующего пептида тафтсина с наноразмерным кавитандом кукурбит[7]урилом и исследование его иммуномодулирующей активности // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири». Абакан – 2011. – С. 210.

7. Пашкина Е.А., Любимов Г.Ю., Гришина Л.В., Козлов В.А. Влияние комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом на фагоцитирующую активность перитонеальных макрофагов мыши // Объединенный иммунологический форум, Нижний Новгород 2013 – Российский иммунологический журнал. - 2013, - Т. 7(16), № 2-3, С. 133.

8. Пашкина Е. А., Гришина Л. В., Любимов Г. Ю., Козлов В. А. Влияние комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом на гуморальный и клеточный иммунный ответ *in vivo* // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8(17), № 3. – С. 367-369.

9. Пашкина Е. А., Любимов Г. Ю., Гришина Л. В., Герасько О.А., Якушенко Е.В., Козлов В. А. Влияние комплекса пептида тафтсина с кукурбит[7]урилом на продукцию супероксидного радикала *in vitro* и *in vivo* // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – Т.35, №1. – С. 14-18.

10. Пашкина Е.А., Гришина Л.В., Козлов В.А. Влияние комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом на цитокинпродуцирующую способность иммунокомпетентных клеток. Материалы XV всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге»./- Медицинская иммунология – 2015. – Т. 17 – С. 277-278.