

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-0024;547.458;547.995;612.112

©Коллектив авторов 1997 г.

СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ КАК ИНГИБИТОРЫ РЕЦЕПТОРНОЙ АКТИВНОСТИ Р-СЕЛЕКТИНА И Р-СЕЛЕКТИНЗАВИСИМОГО ВОСПАЛЕНИЯ

А.В.СЕМЕНОВ⁺, А.В.МАЗУРОВ⁺, М.Е.ПРЕОБРАЖЕНСКАЯ*, Н.А. УШАКОВА*,
В.И.МИХАЙЛОВ*, А.Е.БЕРМАН*, А.И.УСОВ^x, Н.Э.НИФАНТЬЕВ^x, Н.В.БОВИН#

⁺ Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ, 3-я Черепковская ул., 15а, Москва 121552;

*Институт биомедицинской химии РАМН, Погодинская ул. 10, Москва 119832;

^xИнститут органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Ленинский проспект, 47, Москва 117913; # Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва 117871 ГСП-7

Изучены ингибирующее влияние сульфатированных полисахаридов - фукоидана и гепарина на взаимодействие Р-селектина с модельным углеводным легандом *in vitro* и способность фукоидана ингибировать экстравазацию лейкоцитов при экспериментальном перитоните у крыс. Рецепторную активность Р-селектина *in vitro* оценивали по его способности связывать меченый биотином синтетический лиганд - Sialyl-Lea/x, конъюгированный с полиакриламидом (РАА). Фукоидан и гепарин ингибировали связывание меченого лиганда как с очищенным Р-селектином, так и с активированными тромбоцитами, экспрессирующими Р-селектин на поверхности. Активность фукоидана на два порядка величин превышала ингибирующую активность гепарина. Поскольку Р-селектин играет важную роль в развитии ранней фазы воспаления, изучено также противовоспалительное действие фукоидана при Р-селектинзависимом перитоните у крыс. Перитонит вызывали внутрибрюшинным введением раствора пептона и характеризовали как по увеличению общего числа клеток в перитонеальном экссудате, так и по процентному содержанию нейтрофилов. Внутривенное введение фукоидана вызывало зависимое от дозы и времени ингибирование выхода нейтрофилов в брюшную полость. Минимальная доза фукоидана, ингибирующая выход нейтрофилов на $96,8 \pm 2,9\%$, составила 0,8 мг на крысу. Наилучший ингибирующий эффект достигался при инъекции фукоидана в первые 15 мин после введения пептона. Значительный эффект (около 80% ингибирования) наблюдался также при введении через 1,5 часа. Введение фукоидана через 2,5 часа после введения пептона не оказывало заметного ингибирующего действия. Можно предположить, что фукоидан блокирует воспаление на ранней стадии его развития за счет взаимодействия с Р-селектином.

Ключевые слова: воспаление, селектины, Р-селектин, сульфатированные полисахариды, фукоидан, гепарин, клеточная адгезия.

ВВЕДЕНИЕ. Выход лейкоцитов из кровяного русла в область воспаления представляет собой сложный многоступенчатый процесс, первым этапом которого является снижение скорости движения лейкоцитов вдоль стенки сосудов (т.н. "роллинг"). Процесс роллинга осуществляется путем взаимодействия лейкоцитов с клетками эндотелия через группу лектиноподобных рецепторов - селектинов. Существует три типа

селективных: L-, P- и E-селектины. L-селектин экспрессирован на мембране почти всех лейкоцитов. На лимфоцитах L-селектин играет особую роль так называемого Homing-рецептора, регулирующего их направление в лимфоидные органы. Роль L-селектина в процессе воспаления не ясна. P-селектин экспрессируется и сохраняется в тельцах Вейбеля-Паладе эндотелиальных клеток и α -гранулах тромбоцитов и перераспределяется на плазматическую мембрану клеток в течение нескольких минут после индукции активаторами - гистамином, тромбином, компонентами комплемента, нейропептидами. E-селектин в неактивированных эндотелиальных клетках отсутствует. Он появляется на поверхности клеток после синтеза *de novo* под влиянием воспалительных цитокинов - интерлейкина-1 β , фактора некроза опухолей или нейропептидов. Экспрессия E-селектина на клеточной поверхности происходит через 4-6 часов после индукции воспаления [1-5]. Точная структура природных лигандов отдельных селективных не ясна. Известно, что все три селективных связывают сialiрированные и фукозилированные олигосахариды, в частности тетрасахарид Sialyl-Lex и его изомер Sialyl-Lea [2]. Кроме того, все селективные связывают сульфатированные соединения: природные и синтетические сульфатиды [6], сульфатированные полисахариды, такие как гепарансульфат, декстрансульфат, гепарин [7,8], а также фукоидан [9-12]. В настоящей работе мы исследовали взаимодействие фукоидана и гепарина с P-селективом в двух типах опытов *in vitro*: связывание с очищенным P-селективом и с P-селективом мембраны тромбоцитов. Кроме того, используя модель острого асептического перитонита у крыс, мы попытались выяснить, играет ли роль взаимодействие фукоидана с P-селективом при торможении выхода нейтрофилов в область воспаления.

МЕТОДИКА. В работе использованы пептон фирмы Реахим (Россия). Фукоидан, содержащий 40,5% фукозы и 36,7% сульфата, выделен из бурых морских водорослей *Laminaria saccharina* по методу [13] и очищен по методу [14].

Мышинные моноклональные антитела CRC81, не блокирующие P-селектин - лигандное взаимодействие, получены методом, описанным в работе [15]. Аффинноочищенные кроличьи поликлональные антитела против P-селектина, блокирующие P-селектин - лигандное взаимодействие, и аффинноочищенные кроличьи поликлональные антитела против гликопротеина IIb-IIIa тромбоцитов любезно предоставлены Michael Berndt, Baker Medical Research Institute, Prahran (Австралия). P-селектин из тромбоцитов человека получен методом иммуноаффинной хроматографии на колонке с иммобилизованными антителами CRC81 [16]. Меченый биотином неогликоконъюгат Sialyl-Lea/x-PAA-biot (далее называемый "зонд"), содержащий Sialyl-Lea (10 мол.%), Sialyl-Lex (10 мол.%) и биотин (5 мол.%), получен, как описано в работах [17-20].

Тромбоциты человека выделяли из крови здоровых доноров с помощью последовательных отмывок, как было описано ранее [21]. Отмытые тромбоциты суспендировали в растворе Тироде/Hepes (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,36 мМ NaH₂PO₄, 0,1% глюкозы, 5 мМ Hepes, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, pH 7,35).

Связывание P-селектина с зондом изучали, используя очищенный P-селектин или тромбоциты, адгезированные и активированные на поверхности пластика и содержащие P-селектин в составе плазматической мембраны.

Очищенный P-селектин иммобилизовали на антителе CRC81, предварительно сорбированном на поверхности пластика. Антитело (100 мкл) добавляли в ячейки 96-луночного микроестета "Maxisorb" (Nunk, Дания) в концентрации 10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и инкубировали 1 час при 37°C. После отмывки несорбированных антител ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20, неспецифические места связывания блокировали 2% БСА (150 мкл) в ФСБ с Твином в течение 1 час. при 37°C и затем добавляли в лунки. P-селектин (100 мкл) в концентрации 5 мкг/мл в растворе

NaCl/Hepes/ Ca^{2+} (150 mM NaCl, 5 mM Hepes, pH 7,35, 1 mM CaCl_2) содержащим 0,2 % Тритон X-100, инкубировали с антителами 1 час при комнатной температуре и отмывали несвязавшийся белок NaCl/Hepes/ Ca^{2+} с 0,05 % Твин-20. Зонд (100 мкл) в растворе NaCl/Hepes/ Ca^{2+} добавляли к Р-селектину в концентрации 5-20 мкг/мл (обычно - 10 мкг/мл) в отсутствие или в присутствии различных добавок (антитела, полисахариды или ЭДТА вместо CaCl_2) и инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Несвязавшийся зонд отмывали NaCl/Hepes/ Ca^{2+} с Твином, добавляли в лунки стрептавидин-пероксидазу (ИМТЕК, Россия) в разведении 1/5000, инкубировали 40 мин при комнатной температуре и после отмывки оценивали связывание стрептавидин-пероксидазы и, соответственно, зонда по развитию окраски хромогенного субстрата (ортофенилендиамин/ H_2O_2) при длине волны 492 нм (A_{492}).

Отмытые тромбоциты иммобилизовали на поверхности пластика по методу подробно описанному ранее [21]. Тромбоциты (10^7 в 100 мкл раствора Тироде/Hepes) добавляли в ячейки 96-луночного микротеста, осаждали центрифугированием (1000 g, 5 мин) и инкубировали 30 мин при 37°C. После отмывки неадгезированных тромбоцитов места неспецифического связывания блокировали 2% БСА в течение 1 час при 37°C. Адгезия тромбоцитов на пластик сопровождается их активацией и перераспределением Р-селектина из мембран α -гранул на поверхность тромбоцитов, что было ранее продемонстрировано по способности адгезированных тромбоцитов к связыванию моАТ против Р-селектина [15]. Адгезированные тромбоциты инкубировали с зондом в течение 40 мин при комнатной температуре и регистрировали связывание биотинилированного зонда, используя стрептавидин-пероксидазу, также как и в экспериментах с очищенным Р-селектином. В экспериментах с тромбоцитами для всех инкубаций и отмывок использовали раствор Тироде/Hepes, содержащий Ca^{2+} и Mg^{2+} (см. выше).

Для создания модели перитонеального воспаления крысам-самкам линии Wistar (180-220 г) под эфирным наркозом внутрибрюшинно вводили 5 мл 4% раствора пептона в 0,9% NaCl или равный объем 0,9% NaCl (контроль 1). Через 3 часа животных усыпляли эфиром и обезглавливали. В брюшную полость вводили 30 мл среды, содержащей PBS, 60 ед/мл гепарина, 0,02% ЭДТА и 0,03% сыворотки быка. Брюшную полость массировали 1 мин., экссудат собирали и общее число клеток подсчитывали в камере для счета клеток. Для подсчета количества нейтрофилов суспензию клеток концентрировали осаждением при 400g в течение 10 мин. Концентрированную суспензию разводили цельной сывороткой быка 1:1, делали мазки и окрашивали по методу Паппенгейма. Количество нейтрофилов подсчитывали на двух параллельных мазках по 300-400 клеток на каждой мазке. Общее количество нейтрофилов в экссудате рассчитывали, исходя из процента нейтрофилов и общего числа клеток. Препарат фукоидана вводили крысам под эфирным наркозом внутривенно по двум схемам. Согласно первой схемы фукоидан вводили однократно в 0,25 мл стерильного 0,9% NaCl в различные сроки после инъекции пептона. По второй схеме то же количество препарата вводили в виде двух равных доз через 15 и 120 мин после инъекции пептона. Контрольным животным (контроль 2) вводили внутривенно по 0,25 мл стерильного 0,9% NaCl в те же сроки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. С целью изучения взаимодействия фукоидана и гепарина с Р-селектином исследовали подавление связывания зонда с очищенным Р-селектином в присутствии этих полисахаридов. В предварительных экспериментах было установлено, что связывание зонда с Р-селектином носило концентрационно-зависимый характер и ингибировалось ЭДТА, т.е. зависело от присутствия двухвалентных катионов (рис.1).

Установлено, что зонд специфически связывался как с очищенным Р-селектином, так и с Р-селектином на поверхности активированных тромбоцитов. Как видно из рис. 2

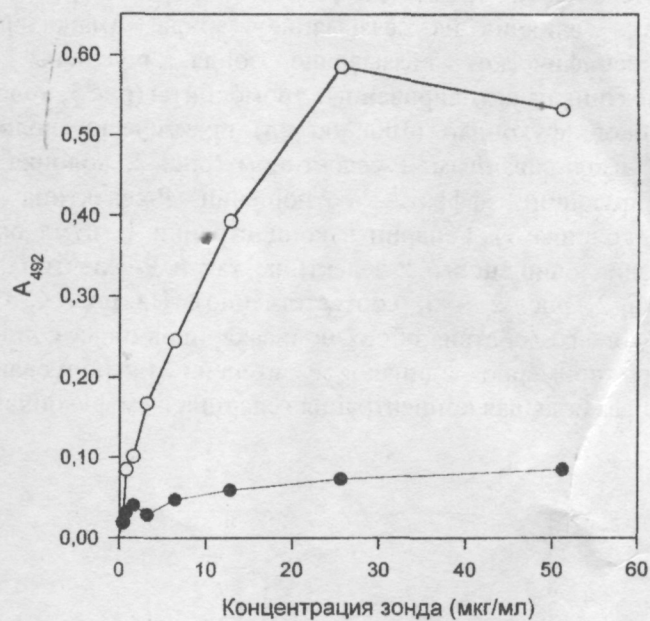


Рисунок 1

Связывание зонда с Р-селектином. Зависимость от концентрации зонда и влияние ЭДТА.
 (○-) в присутствии 1 мМ CaCl₂; (●-) в присутствии 2 мМ EDTA

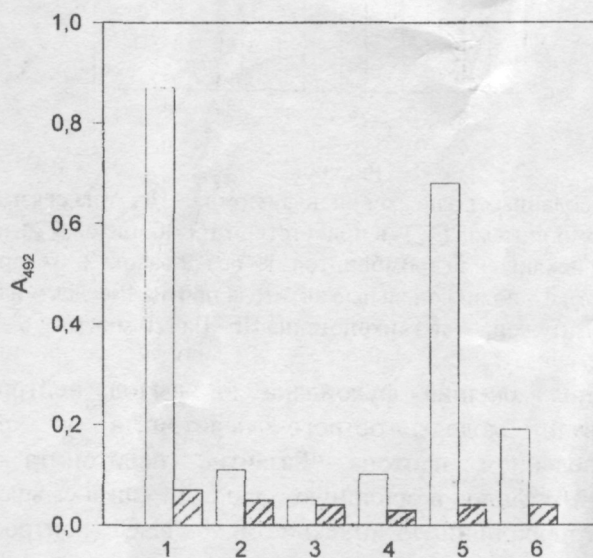


Рисунок 2

Влияние сульфатированных полисахаридов, антител и ЭДТА на связывание зонда с очищенным Р-селектином. □ - в присутствии Р-селектина; ▨ - неспецифическое связывание зонда при исключении Р-селектина. 1 - без добавок; 2 - гепарин (1 мг/мл); 3 - фукоидан (100 мкг/мл); 4 - поликлональные антитела против Р-селектина (20 мкг/мл); 5 - поликлональные антитела против гликопротеина IIb-IIIa (20 мкг/мл); 6 - ЭДТА (2 мМ)

(колонка 4) поликлональные антитела против Р-селектина практически полностью блокировали связывание зонда с Р-селектином, в то время как контрольные поликлональные антитела против тромбоцитарного гликопротеина IIb-IIIa (колонка 5) не оказывали заметного влияния на связывание зонда. Аналогичные результаты, демонстрирующие специфическое связывание зонда, получены и при замене изолированного Р-селектина на активированные тромбоциты (рис 3, колонки 4 и 5). Как видно из этих рисунков, фукоидан (100 мкг/мл) практически полностью подавлял связывание зонда с изолированным Р-селектином (рис. 2, колонка 3) и оказывал значительный ингибирующий эффект в отношении Р-селектина активированных тромбоцитов (рис. 3, колонка 3). Гепарин в концентрации 1 мг/мл оказывал сходный эффект как в отношении очищенного Р-селектина, так и Р-селектина активированных тромбоцитов (колонка 2, рис. 2 и 3, соответственно). На рис. 4, где представлена зависимость ингибирующего действия обоих полисахаридов от их концентрации, видно, что для достижения примерно одинаковой степени ингибирования требовалась приблизительно в 100 раз большая концентрация гепарина, чем фукоидана.

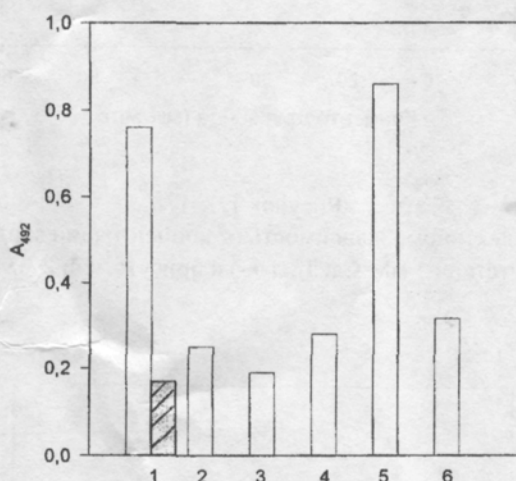


Рисунок 3

Влияние сульфатированных полисахаридов, антител и ЭДТА на связывание зонда с активированными тромбоцитами. □ - в присутствии тромбоцитов; ▨ - неспецифическое связывание зонда при исключении тромбоцитов 1 - без добавок; 2 - гепарин (1 мг/мл); 3 - фукоидан (100 мкг/мл); 4 - поликлональные антитела против Р-селектина (20 мкг/мл); 5 - поликлональные антитела против гликопротеина IIb-IIIa (20 мкг/мл); 6 - ЭДТА (2 мМ)

Для исследования влияния фукоидана на выход нейтрофилов в область воспаления использовали модель острого перитонита у крыс, вызываемого внутрибрюшинным введением пептона. Развитие перитонита характеризовалось усиленным выходом нейтрофилов в брюшную полость. Если в смыве брюшной полости крыс, получавших внутрибрюшинную инъекцию 0,9% NaCl (контроль 1), общее число клеток было $45,3 \pm 8,2 \times 10^6$ ($n=3$), а процент нейтрофилов в этих клетках составлял менее 0,2, то у крыс, получавших внутрибрюшинную инъекцию пептона, общее число клеток возрастало в среднем до $91,6 \pm 31,2 \times 10^6$ ($n=11$), а процент нейтрофилов в них увеличивался до $58,0 \pm 12$ (контроль 2). Следует отметить, что тиогликолат, обычно используемый как индуктор воспаления у разных животных, оказался в наших условиях менее эффективен, чем пептон, что и обусловило выбор пептона как индуктора воспаления. Внутривенное введение раствора фукоидана крысам вызывало уменьшение

выхода нейтрофилов в брюшную полость, причем степень ингибирования выхода зависела как от дозы препарата, так и от интервала времени между введением пептона и

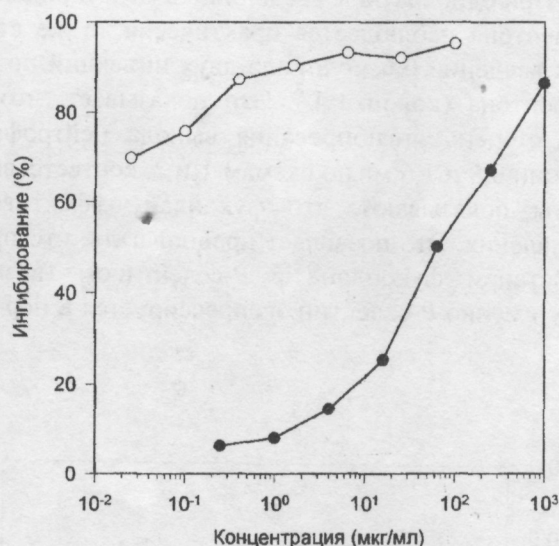


Рисунок 4.
Ингибирование связывания зонда с очищенным Р-селектином сульфатированными полисахаридами. (—○—) фукоидан; (—●—) гепарин

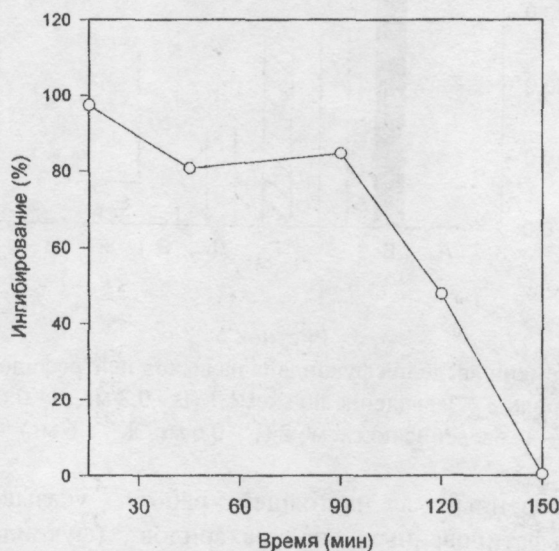


Рисунок 5
Влияние интервала времени между индукцией перитонита у крыс и введением фукоидана на ингибирование выхода нейтрофилов в брюшную полость.

фукоидана. Введение 0,8 мг фукоидана через 15 мин после инъекции пептона (по схеме 1) вызывало практически полное ингибирование выхода нейтрофилов в брюшную полость ($96,80 \pm 2,9\%$, $p < 0,001$; $n=3$) (рис.5). Несколько более низкий, но значительный эффект обнаруживался при использовании той же дозы фукоидана через 45 мин и 1,5

часа после инъекции пептона. Введение фукоидана через 2,5 часа практически не оказывало влияния на выход нейтрофилов. Зависимость ингибирующего действия от вводимой дозы фукоидана при однократной и двукратной инъекции (по схемам 1 и 2) представлена на рис. 6. При однократном введении 0,3 мг фукоидана (колонка в) через 15 мин после инъекции пептона наблюдается практически та же степень ингибирования (около 50%), что и при введении 0,6 мг в виде двух инъекций по 0,3 мг через 15 и 120 мин после введения пептона (колонка Г). Это показывает, что вторая инъекция не оказывает влияния на степень ингибирования выхода нейтрофилов. Та же картина наблюдается при введении 0,8 и 1,6 мг по схемам 1 и 2, соответственно (колонки Е и Ж). Полученные результаты показывают, что фукоидан эффективен только в первые моменты развития воспаления. Это позволяет предполагать, что процесс ингибирования обусловлен взаимодействием фукоидана с Р-селектином (возможно, наряду с L-селектином), поскольку именно Р-селектин экспрессируется в первые моменты развития воспаления.

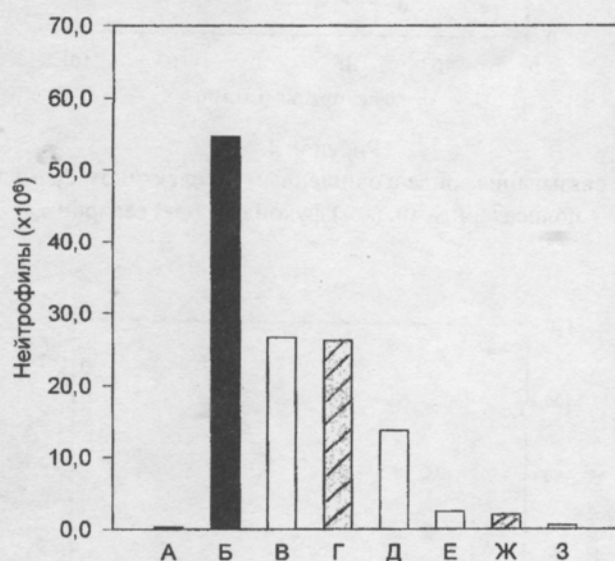


Рисунок 6

Влияние дозы и времени введения фукоидана на выход нейтрофилов в зону воспаления
 А - контроль 1; Б - контроль 2 - введение по схеме 1 (В - 0,3 мг, Д - 0,6 мг, Е - 0,8 мг, З - 1,0 мг)
 - введение по схеме 2 (Г - 0,6 мг, Ж - 1,6 мг)

Данные, приведенные в настоящей работе, указывают на эффективное взаимодействие сульфатированных полисахаридов (фукоидана и гепарина) с Р-селектином в экспериментах *in vitro*. В настоящее время описан ряд методов, применяемых для оценки сродства различных селектиновых лигандов *in vitro*. Значительная часть этих методов основана на оценке связывания лейкоцитов с клетками, экспрессирующими селектины или с изолированными селектинами (например, [22,23]). Бесклеточные системы *in vitro* включают использование природных гликоконъюгатов, содержащих Sialyl-Lex и (или) Sialyl-Lea детерминанты: гликолипиды [24], раково-эмбриональный антиген [25], или неогликоконъюгаты, в состав которых введены указанные выше углеводные детерминанты [26]. В настоящей работе в качестве зонда использован меченый биотином синтетический неогликоконъюгат - Sialyl-Lea/x-PAА-

biotin. На основе этого зонда нами разработан метод оценки связывания немеченых сульфатированных лигандов с Р-селектином поверхности активированных тромбоцитов и с изолированным тромбоцитарным Р-селектином. Эксперименты *in vitro* с использованием как изолированного Р-селектина, так и активированных тромбоцитов показали, что сульфатированные полисахариды: гепарин и фукоидан, эффективно и специфически связываются с Р-селектином. Поскольку известно, что отрицательный заряд ряда селектиновых лигандов играет важную роль в их связывании с селектинами различных типов [2], можно предполагать, что отрицательный заряд гепарина и фукоидана весьма существенен для связывания с Р-селектином. Это подтверждается и недавно полученными данными о том, что сульфатные группы в составе Р-селектинового лиганда лейкоцитов PSGL-1 играют ключевую роль в связывании с Р-селектином [27]. Однако, обнаруженный нами факт, что связывание фукоидана с Р-селектином по крайней мере в 100 раз эффективнее, чем связывание гепарина, указывает на то, что сродство полисахарида к Р-селектину зависит не только от отрицательного заряда, но и от структуры его углеводного компонента.

Высокое сродство фукоидана к Р-селектину, выявленное нами в опытах *in vitro*, позволило предположить, что этот полисахарид окажется эффективным ингибитором ранней стадии Р-селектинзависимого перитонеального воспаления у крыс. Сравнение действия фукоидана с другими потенциальными ингибиторами селектинов, в частности, с олигосахаридами Sialyl-Lea и Sialyl-Lex, конъюгированными с РАА, показало, что фукоидан примерно втрое более эффективен, чем указанные препараты (данные не приводятся). Фукоидан также существенно более эффективен, чем олигосахариды, выделенные из гепарина [8]. Последние, в условиях практически аналогичных нашим, ингибировали выход нейтрофилов лишь на 30-40%. Высокая ингибирующая активность фукоидана может быть объяснена как высоким молекулярным весом, так и особенностями структуры. Тот факт, что мы наблюдали практически полное ингибирование фукоиданом выхода нейтрофилов в перитонеальную полость, позволяет предполагать, что этот полисахарид, возможно, взаимодействует и с другими факторами, участвующими в экстравазации нейтрофилов, в частности с L-селектином. Взаимодействие фукоидана с L-селектином *in vitro* было описано ранее [28]. Полученные нами данные показали, что фукоидан взаимодействует также с Р-селектином. Используя различные сроки инъекции фукоидана после индукции воспаления мы обнаружили, что он наиболее эффективно ингибирует выход нейтрофилов в течение первых 15 мин после индукции воспаления, что совпадает со временем экспрессии Р-селектина на клетках эндотелия [3]. Введение фукоидана в более поздние сроки (2,5 ч), соответствующие времени экспрессии Е-селектина, было неэффективно. Это подтверждало предположение о том, что фукоидан блокирует процесс воспаления путем взаимодействия с Р-, но не с Е-селектином.

Полученные результаты показывают, что фукоидан обладает сильным противовоспалительным действием, что может являться основанием для разработки новых противовоспалительных средств на основе сульфатированных полисахаридов.

Работа поддержана грантами РФФИ 95-04-11786а, 96-03-32453а и 97-04-48054

ЛИТЕРАТУРА

1. Bevilacqua M.P., Nelson R.M. (1993) J. Clin. Invest. **91**. 379-387.
2. Varki A. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**. 7390-7397.
3. Imhof B.A., Dunon D. (1995) Advances in Immunology., **58**. 345-416.
4. McEver R.P., Moore K.L., Cummings R.D. (1995) J. Biol. Chem.- **19**, 11025-11028
5. Kansas G.S. (1996) Blood.,- **88**, 3259-3287.
6. Mulligan M.S., Miyasaka M., Suzuki M., Kawashima H., Iizuka M., Hasegawa A., Kiso M., Warner R.L., Ward P.A. (1995) Int. Immunol. **7**. 1107-1113.
7. Ley K., Cerrito O., Arfors K.E. (1991) Amer. J. Physiol.- **260**. H1667-H1673.
8. Nelson R.M., Cecconi O., Roberts W.G., Aruffo A., Linhardt R.J., Bevilacqua M.P. (1993) Blood.,- **82**, 3253-3258.
9. Stoolman L.M. (1987) Blood. **70**. 1842-1850.
10. Skinner M.P., Lucas C.M., Burns G.F., Chesterman C.N., Berndt M.E. (1991) J. Biol. Chem.- **266**, 5371-5374.
11. Shimaoka M., Ikeda M., Iida T., Taenaka N., Yoshiya I., Honda T. (1996) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **153**. 307-311.
12. Kubes P., Jutila M., Payne D. (1995) J. Clin. Invest.- **95**. 2510-2519.
13. Усов А.И., Кирьянов А.В. (1994). Биоорг. химия.- **20**. 1342-1348.
14. DeAngelis P.L., Glabe C.G. (1987) J. Biol. Chem.- **262**. 13946-13952.
15. Бызова Т.В., Романов Ю.А., Власик Т.Н., Мазуров А.В. (1995). Биохимия **60**. 979-985.
16. Skinner M.P., Fournier D.J., Andrews R.K., Gorman J.J. Chestermann C.N., Berndt M.C. (1989).-Biochem. Biophys. Res. Commun. **164**. 1373-1379.
17. Nifant'ev N.E., Tsvetkov Y.E., Shakhov A.B., Kononov L.O., Menshov V.M., Tuzikov A.B., Bovin N.Y. (1996) J. Carbohydr. Chem. **15**. 939-953.
18. Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., Byramova N.E., Galanina O.E., Zemlyakov A.E., Ivanov A.E., Zubov V.P., Mochalova L.V. (1993) Glycoconj. J. **10**. 142-151.
19. Нуфантаев Н.Э., Цветков Е.Е., Шапков А.С., Тузинов А.Б., Масленников И.В., Попова И.С., Бовин Н.В. (1994) Биоорг. химия. **20**. 551-555.
20. Nifant'ev N.E., Shashkov A.S., Tsvetkov Y.E., Abramenko I.V., Gluzman D.F., Bovin N.V. (1994). in Synthetic Oligosaccharides: Indispensable Probes for Life Sciences, ACS Symp. V.560, Ed. P. Kovac, ASC, Washington, DC. **15**. 267-275.
21. Mazurov A.V., Vinogradov D.V., Kabaeva N.V., Antonova G.N., Romanov Yu.A., Vlasik T.N., Antonov A.S., Smirnov V.N. (1991) Thromb. Haemost. **66**. 494-499.
22. Bevilacqua M.P., Pober J.S., Mendrick D.L., Cotran R.S., Gimbrone M.A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**. 9238-9242.
23. De Frees A.S., Gaeta F.C.A., Lin Y.-C., Ichikawa Y., Wong C.-H. (1993) J. Am. Chem. Soc. **115**. 7549-7550.
24. Brandley B.K., Kiso M., Abbas S., Nikrad P., Srivastava O., Foxall C., Oda Y., Hasegawa A. (1993.) Glycobiology. **3**. 633-639.
25. Anostario M., Li S.H., Huang K.S. (1994) Anal. Biochem. **221**. 633-639.
26. Nelson M.R., Dolich S., Aruffo A., Cecconi O., Bevilacqua M.P. (1993) J. Clin. Invest. **91**. 1157-1166.
27. Wilkins P.P., Moore K.L., McEver R.P., Cummings R.D. (1995) J. Biol. Chem. **270**. 22677-22680.
28. Ley K., Linnemann G., Meinen M., Stoolman L.M., and Gaetgens P. (1993) Blood.- **81** 177-185.

SULFATED POLYSACCHARIDES AS INHIBITORS OF P-SELECTIN-LIGAND INTERACTION AND P-SELECTIN-DEPENDENT INFLAMMATION

A.V. SEMENOV⁺, A.V. MAZUROV⁺, M.E. PREOBRAZHENSKAYA*, N.A. USHAKOVA*,
V.I. MIKHAILOV*, A.E. BERMAN*, A.I. USOV^x, N.E. NIFANTEV^x, N.V. BOVIN[#]

⁺ Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center,
3rd Cherepkovskaya, 15a, Moscow 121552; *Institute of Biomedical Chemistry, Russian
Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya 10, Moscow 119832; ^x Zelinsky Institute of
Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospekt 47, Moscow 117913;
[#]Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow 117871 GSP-7

The inhibitory effects of sulfated polysaccharides-fucoidan and heparin on P-selectin-ligand interaction *in vitro* and on the ability of fucoidan to inhibit the leukocyte extravasation in rat peritonitis were studied. The lectin activity of P-selectin *in vitro* was based on its ability to bind lectin-labeled synthetic ligand, Sialyl-Lea/x, conjugated with polyacrylamide (PAA). Fucoidan and heparin inhibited binding of labeled ligand to both purified P-selectin and the activated platelets expressing P-selectin on their surface. The inhibitory effect of fucoidan 100- fold higher than that of heparin. As P-selectin plays an important role at an earlier stage of the inflammation process, the antiinflammatory action of fucoidan on P-selectin-dependent peritonitis in rats was studied. Peritonitis was induced by intraperitoneal injection of the peptone solution and was characterized by an increase in total cell number and neutrophil percentage in rat peritone exudate. Intravenous injection of fucoidan was found to cause a dose- and time-dependent reduction of neutrophil extravasation into inflamed peritoneum. The minimal dose of fucoidan, that was able to produce $96.8 \pm 2.9\%$ inhibition of neutrophil extravasation-if administered within the first 15 min after peptone- B was 0.8mg per rat. Significant effect of fucoidan injection (about 80% inhibition) was also obtained 1.5 h after the induction of inflammation. Fucoidan administered 2.5 h after peptone had virtually no effect on neutrophil extravasation. The data obtained show that fucoidan blocks the inflammation process at its earlier stages - most probably at the expense of its interaction with P-selectin.

Key words: inflammation, selectins P-selectin, sulfated polysaccharides, fucoidan, heparin, cell adhesion.