

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-0024;547.458;547.995;612.112

@Коллектив авторов

### ИНГИБИТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОМЕРНЫХ И ПОЛИМЕРНЫХ ЛИГАНДОВ СЕЛЕКТИНОВ

Н.А.УШАКОВА, М.Е.ПРЕОБРАЖЕНСКАЯ, Н.Э.НИФАНТЬЕВ\*, А.И. УСОВ\*,  
Т.В.ПОЧЕЧУЕВА\*\*, О.Е.ГАЛАНИНА\*\*, Н.В.БОВИН\*\*.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН, 119832,  
Москва, ул. Погодинская, д.10; факс (095)245-08-57; \*- Институт органической химии  
им. Н.Д.Зелинского РАН, 117913, Москва, Ленинский проспект, 47;

\*\* - Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова  
РАН, 117871 ГСП-7, Москва, ул.Миклухо-Маклая, 16/10

Изучена ингибирующая активность тетрасахаридов SiaLex, SiaLea, трисахаридов HSO<sub>3</sub>Lex, HSO<sub>3</sub>Lea, их конъюгатов с полиакриламидом (40 kDa), а также некоторых других мономерных и полимерных веществ в сравнении с полисахаридом фукоиданом. Применили две экспериментальные системы: 1. Система, основанная на использовании рекомбинантных E-, P- и L-селективных; 2. Модель перитонеального воспаления на крысах. Для рекомбинантных E-, P- и L-селективных величины IC<sub>50</sub> неогликоконъюгата SiaLea-PAA составили 6, 40 и 85 мкМ соответственно; все мономерные ингибиторы были примерно на два порядка слабее. Наиболее сильными синтетическими ингибиторами были PAA-гликоконъюгаты, содержащие кроме одного из перечисленных олигосахаридов дополнительный лиганд sTyr. По сравнению с наиболее мощным из известных ингибиторов P- и L-селективных - фукоиданом билигандный гликоконъюгат HSO<sub>3</sub>Lea-PAA-sTyr показал близкую активность в блокировании L-селектина и примерно в 10 раз меньшую по отношению к P-селектину в системе *in vitro*. По способности ингибировать выход нейтрофилов в область воспаления у крыс все изученные синтетические полимеры были близки, действуя в концентрации порядка 10 мг на кг. Это показывает, что мономер SiaLex значительно активнее *in vivo*, чем *in vitro*, а сильно заряженные фукоидан и билигандный неогликоконъюгат - наоборот.

**Ключевые слова:** воспаление, селектины, лиганды селективных, фукоидан, неогликоконъюгаты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Выход нейтрофилов из кровяного русла в участки воспаления представляет собой сложный многоступенчатый процесс, одним из первых этапов которого является роллинг (перекатывание) лейкоцитов вдоль эндотелиальных клеток сосудов. Роллинг происходит путем кратковременной адгезии лейкоцитов

*Сокращения:* SiaLex - сиаилл-Льюис-х, Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc; SiaLea - сиаилл-Льюис-а, Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc; HSO<sub>3</sub>Lex - 3'-сульфо-Льюис-х, HSO<sub>3</sub>Lea - 3'-сульфо-Льюис-а, sTyr - тирозин-О-сульфат; PAA - полиакриламид; ZZ - IgG-связывающий фрагмент протеина А; IC<sub>50</sub> - концентрация ингибитора, дающая 50% ингибирования.

через молекулы лектинов С-типа: L-, E- и P-селектины. L-селектин конститутивно экспрессирован на поверхности циркулирующих лейкоцитов, E-селектин образуется в эндотелиальных клетках путем синтеза *de novo* в результате индукции цитокинами, тогда как P-селектин находится в мембранах внутриклеточных гранул тромбоцитов и эндотелиальных клеток и быстро переносится на клеточную поверхность при активации клеток [1-5]. Селектины обладают способностью связывать тетрасахарид SiaLex, однако связывающее средство очень слабое - от микро- до миллимолярных величин. Существует очень мало информации об истинных лигандах селективов, реально опосредующих роллинг. Показано, что некоторые гликопротеины нейтрофилов, такие как лейкосиалин, LAMP-ы, CEA-подобные белки, LFA-1 действуют как лиганды P-селектина (и/или E-селектина). Только один гликопротеин нейтрофилов PSGL-1 обладает высоким сродством к P-селектину и предположительно является его природным лигандом; основной особенностью его молекулы является связь SiaLex с остатком тирозинсульфата [6]. L-селектин способен с высоким сродством взаимодействовать с гликопротеином муцинового типа GlyCAM-1, несущим сульфат на углеводной цепи SiaLex-гликана [7]. Кандидатом на роль эндотелиального лиганда L-селектина является другой гликопротеин муцинового типа CD34 [7], а также Mad-CAM-1 [8]. Лиганд для E-селектина, ESL-1, представляет собой гликопротеин, имеющий тетрасахарид SiaLex на разветвленной N-цепи [9]. Поскольку ни для одного из селективов не обнаружена мультимеризация на клеточной мембране, неясно, каким образом происходит их высокоаффинное связывание [10].

В настоящей работе мы изучали, с одной стороны, способность ингибировать селектины как мономерными олигосахаридами, так и их полимерными формами, включая полимер, содержащий SiaLex и sTug. С другой стороны, мы сравнивали ингибирующую активность этих блокаторов в системах *in vivo* и *in vitro* с целью выяснения роли мультивалентности в селектин-лигандном взаимодействии.

**МЕТОДИКА.** Tween 20, иммуноглобулин человека, бычий сывороточный альбумин (БСА) получены от Sigma (USA); фукоиданы - от (Sigma) и выделенный д-ром А.И.Усовым (Ин-т органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН) из *Laminaria saccharina* (содержит 40,5% L-фукозы и 26,7% сульфата) [11]; пептон - от Реахим (Россия), конъюгат стрептавидин-пероксидаза - от Boehringer Mannheim (Germany). Все остальные препараты получены от Fluka (Switzerland). 96-луночные иммуноплаты "MaxiSorb"-от Nunc (Denmark).

Мономерные SiaLea, SiaLex, HSO<sub>3</sub>Lea и HSO<sub>3</sub>Lex в виде 3-аминопропилгликозидов были синтезированы ранее [12,13]. Полимерные неогликоконъюгаты, содержащие 20 мол.% углевода, а именно SiaLea-PAA, SiaLex-PAA, HSO<sub>3</sub>Lea-PAA и HSO<sub>3</sub>Lex-PAA, получены от Syntesome GmbH (Germany). Другие неогликоконъюгаты были получены согласно методу [14]. Рекомбинантные белки, ZZ-селектины (моновалентные), лишенные трансмембранного и цитозольного доменов, были получены Bernard Allen (Glaxo Institute for Molecular Biology) и Nicholas Smithers (Glaxo Wellcome, Stevenage, UK) как C-концевые химеры с ZZ-доменом протеина А, который способен связываться с IgG человека и кролика. IgG-очищенные белки были охарактеризованы с помощью SDS-PAA-электрофореза и метода клеточной адгезии [15,16].

**ZZ-селективный тест.** Связывание ингибитора определяли двумя способами. Для прямого связывания 96-луночные платы обрабатывали IgG человека в концентрации 10 мкг/мл в 0,05 М Na-карбонатном буфере, pH 9,6, инкубировали 1 час при 37°C, и блокировали 3% БСА в буфере А (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>) в течение 1 часа при 37°C. Платы отмывали трижды буфером А, содержащим 0,1% Твин-20, и добавляли 100 мкл ZZ-селектина в концентрации 30 (для E-) и 60 (для P- или L-селективов) нг/мл буфера А, содержащего 0,3% БСА. Платы инкубировали в течение 1 часа при 37°C, далее в течение ночи при 40°C, и затем трижды отмывали буфером А, содержащим 0,1% Твин-20. Затем платы



инкубировали с  $\text{HSO}_3\text{Lea-PAA-biot}$  (10 мкг/мл буфера А, содержащего 0,3% БСА) 2 часа при 37°C, отмывали и инкубировали с конъюгатом стрептавидин-пероксидазы (разведение 1/1000). Для развития окраски пробы инкубировали 30 минут в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере, содержащем 0,04% о-фенилендиамин и 0,03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Измеряли оптическую плотность при 492 нм. В качестве контроля использовали пробы, в которых отсутствовал биотинилированный гликоконъюгат. Величины оптической плотности контрольных проб вычитали из величин опытных проб. При другом способе использовали протокол, описанный выше для прямого связывания ингибитора, но при этом ингибитор добавляли одновременно с  $\text{HSO}_3\text{Lea-PAA-biot}$ . Процент ингибирования рассчитан как  $(\text{OD}_A - \text{OD}_I) \times 100 / \text{OD}_A$ , где  $\text{OD}_A$  представляет собой среднее значение оптической плотности в отсутствие ингибитора, а  $\text{OD}_I$  - то же в присутствии ингибитора.

*Острое перитонеальное воспаление.* Индукцию перитонеального воспаления проводили по методу, описанному ранее [17]. Для этого крысам-самкам линии Wistar (около 200 г) внутрибрюшинно под эфирным наркозом вводили 5 мл 4% раствора пептона в 0,9% NaCl. Равный объем 0,9% NaCl (бланк) вводили крысам в качестве контроля на развитие воспаления. Через 3 часа животных усыпляли и обезглавливали. Брюшную полость промывали 30 мл среды, содержащей PBS, 60 ед/мл гепарина, 0,02% ЭДТА и 0,03% сыворотки быка при интенсивном массаже брюшины. В промывной жидкости подсчитывали общее число клеток в камере Горяева. Для подсчета количества нейтрофилов суспензию клеток центрифугировали при 400 g в течение 10 минут. Концентрированную суспензию разводили цельной сывороткой быка 1:1, делали мазки и окрашивали их по методу Паппенгейма. Количество нейтрофилов подсчитывали на двух параллельных мазках по 300-600 клеток на каждом. Общее число нейтрофилов в экссудате рассчитывали, исходя из процента нейтрофилов и общего числа клеток. Ингибиторы вводили крысам в бедренную вену под эфирным наркозом через 15 или 120 минут после инъекции пептона в 0,25 мл стерильного 0,9% NaCl. Контрольным животным вводили внутривенно по 0,25 мл стерильного 0,9% NaCl в те же сроки.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Для анализа на 96-луночных иммуноплатах использовали IgG человека как первичный покрывающий реагент для последующей иммобилизации рекомбинантных E-, P- или L- селектинов через ZZ-домен на связывающем белке. Рабочая концентрация E-селектина была избрана равной 3 нг (см. рисунок), для P- и L-селектинов оптимальная концентрация была 6 нг. Для выбора оптимальных концентраций всех селектинов использовали их концентрации от 20 нг до 20 мкг/мл, а для  $\text{HSO}_3\text{Lea-PAA-biot}$  от 1 до 50 мкг/мл. Биотинилированный PAA-гликоконъюгат с лигандом  $\text{HSO}_3\text{Lea-PAA}$  был выбран из ряда  $\text{HSO}_3\text{Lea-PAA-biot}$ ,  $\text{HSO}_3\text{Lex-PAA-biot}$ ,  $\text{SiaLea-PAA-biot}$  и  $\text{SiaLex-PAA-biot}$ , поскольку он давал более однородный уровень связывания для всех трех ZZ-селектинов (данные не приводятся). Мы заключили, что значение  $\text{IC}_{50}$  не зависит от лиганда в указанных условиях:  $\text{HSO}_3\text{Lea-PAA-biot}$  и  $\text{SiaLea-PAA-biot}$  давали приблизительно одинаковые результаты. Значение  $\text{IC}_{50}$ , равное 20 мкМ для  $\text{SiaLex-PAA}$  в пробе с E-селектином (табл. 1) коррелирует с данными, полученными ранее [16].

Результаты ингибирования ZZ-селектинов мономерными и полимерными соединениями представлены в таблице 1. Сродство три- и тетрасахаридов в виде мультимерных гликоконъюгатов было примерно в 100 раз выше, чем наиболее активного из мономеров  $\text{SiaLea}$ , что соответствует данным, полученным ранее [16,18]. 3'-сульфатированный Lex являлся плохим ингибитором для всех трех селектинов, а наиболее активным оказалось 3'-сиалированное производное Lea.

Наиболее активными синтетическими ингибиторами оказались билигандные гликоконъюгаты:  $\text{SiaLea-PAA-sTyr}$  и  $\text{HSO}_3\text{Lea-PAA-sTyr}$ , содержащие добавочно тирозин-О-сульфат. В отношении P-селектина  $\text{SiaLea-PAA-sTyr}$  был в 4 раза активнее, чем  $\text{SiaLea-PAA}$ , а  $\text{HSO}_3\text{Lea-PAA-sTyr}$  был на два порядка активнее, чем

HSO<sub>3</sub>Lea-PAA в отношении как Р-, так и L-селектинов. Подобное 4-х кратное повышение активности было показано ранее для SiaLex-PAA-sTyr [16]. Следует отметить, что введение остатка sTyr в ингибитор оказывало наибольшее влияние на его связывание с Р-селектином, что соответствует присутствию этого остатка в природном лиганде Р-селектина - PSGL-1. Контроли, сконструированные как PAA, несущий только sTyr или HSO<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, проявляли слабый ингибирующий эффект.

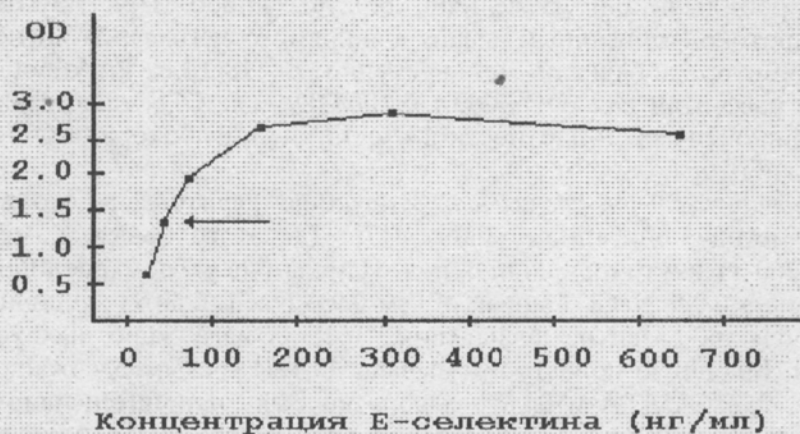


Рисунок.

Подбор оптимальных условий связывания Е-селектина твердофазным методом. Платы обрабатывали наиболее высокой концентрацией IgG (см. Методику) с последующим нанесением ZZ-селектина в интервале концентраций от 1 нг до 20 мкг на лунку (на рис. даны наиболее низкие концентрации). Концентрация Е-селектина, равная 3 нг на лунку (помечена стрелкой), соответствовала 1/2 максимального значения OD.

Таблица 1. Ингибирование мономерными и мультимерными соединениями связывания HSO<sub>3</sub>Lea-PAA-biot с ZZ-селектинами (концентрация, дающая 50%-ное ингибирование\*, мкМ).

Ингибитор	Е-селектин	Р-селектин	Л-селектин
<b>Мультимерные</b>			
SiaLex-PAA	20	40	40
SiaLea-PAA	6	40	85
HSO <sub>3</sub> Lex-PAA	120	250	НИ (250 мкМ)
HSO <sub>3</sub> Lea-PAA	60	120	250
SiaLea -PAA-sTyr (20/10)**	30	10	150
HSO <sub>3</sub> Lea -PAA-sTyr (15/10)**	25	2	2
HSO <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -PAA	НИ (600мкМ)	300	1200
sTyr-PAA (10)**	НИ (300мкМ)	300	НИ
Lea-PAA	НИ	НИ	НИ
Фукоидан ( <i>L.saccharina</i> )	НИ	0,1 ( 0,1 мкг/мл)***	0,8 (0,8 мкг/мл)***
<b>Мономерные</b>			
SiaLex	НИ	НИ	НИ
SiaLea	400	>1500	1500
HSO <sub>3</sub> Lex	НИ (1,5 мМ)	НИ (1,5 мМ)	НИ (1,5 мМ)
HSO <sub>3</sub> Lea	НИ (1,5 мМ)	НИ (1,5 мМ)	НИ (1,5 мМ)

\* - Величины ингибирования представляют собой среднее для 3-х определений. Стандартное отклонение менее 10% (данные не приводятся). \*\* - Значения в скобках – молярный % данных лигандов в составе конъюгата с PAA. Значения, разделенные косой линией, даны для билигандных конъюгатов. Если значения не приведены, молярная концентрация равна 20 моль%. \*\*\*- Молярная концентрация рассчитана на основании предположения, что активной единицей является гексасахарид. НИ- не ингибирует



Величины  $IC_{50}$  для препаратов фукоидана, (наиболее эффективного из известных ингибиторов Р- и L-селектинов), полученных из различных источников, в данной системе варьировали от 0,02 до 0,1 мкг/мл и от 0,004 до 0,8 мкг/мл, соответственно для Р- и L-селектинов (таблица 1). Исходя из предположения, что повторяющимся фрагментом этого полисахарида является гексасахарид (истинный размер повторяющегося фрагмента еще не известен), мы рассчитали молярные концентрации фукоидана как 0,1 и 0,8 мкМ соответственно. Это показывало, что  $HSO_3Lea-PAA-sTyr$  очень близок к фукоидану по его способности ингибировать L-селектин ( $IC_{50}$  составляют 2,0 и 0,8 мкМ соответственно). Сходные результаты с использованием Р-селектина из тромбоцитов человека в той же системе были получены нами ранее [17,19].\* Необходимо подчеркнуть, что величины  $IC_{50}$  практически не зависели ни от природы селектина (ZZ-селектин или селектин тромбоцитов), ни от валентности селектина (моно- или ди-), как показано ранее [16,20], а также от концентрации селектинового покрытия и способа представления (пластик или тромбоциты).

*Ингибирование перитонеального воспаления.* Острый перитонит у крыс, вызванный пептоном, характеризовался повышением числа нейтрофилов в брюшной полости с  $0,5 \pm 0,6 \times 10^6$  ( $n=7$ , бланк) до  $46,0 \pm 24,0 \times 10^6$  ( $n=22$ , контрольная группа). Внутривенное введение ингибиторов приводило к значительному торможению выхода нейтрофилов в брюшную полость. В Таблице 2 представлены данные по действию ингибиторов в зависимости от их весовой концентрации. Введение синтетических ингибиторов как через 15 минут после инициации процесса воспаления, так и через 120 минут вызывало практически одинаковый ингибирующий эффект. Поэтому мы объединили данные, полученные при использовании этих сроков (таблица 2). Напротив, как было показано ранее [17], фукоидан оказывал действие только при введении через 15 минут после инициации воспаления, при введении через 120 минут он оказывал лишь слабое ингибирующее действие. Введение мономерного  $SiaLex$  (5-15 мг/кг) приводило к почти 40% ингибированию выхода нейтрофилов по сравнению с контролем. Мультивалентные ингибиторы были несколько активнее по сравнению с соответствующими моновалентными производными, однако различия были незначительны.  $HSO_3Lea-PAA$  не отличался от  $SiaLex-PAA$  по степени ингибирования экстравазации нейтрофилов. Ингибирующий эффект  $SiaLea-PAA-sTyr$  был немного выше всех остальных исследуемых синтетических препаратов, но на порядок ниже, чем эффект фукоидана. Другой билигандный гликоконъюгат  $HSO_3Lea-PAA-sTyr$ , напротив, в ситуации *in vivo* проявлял более низкую активность, чем  $SiaLea-PAA-sTyr$ .

Таблица 2. Ингибирование перитонеального воспаления у крыс салирированными и сульфатированными синтетическими ингибиторами по сравнению с фукоиданом.

Препарат	Доза, мг на крысу	Число крыс в группе	Ингибирование (% к контролю)*
$SiaLex$	1,0-3,0	12	$37 \pm 12$
$SiaLex-PAA$	1,0	9	$43 \pm 17$
$HSO_3Lea-PAA$	3,0	3	$46 \pm 12$
$SiaLea-PAA-sTyr$ (20/10)	1,5-3,0	8	$50 \pm 14$
$HSO_3Lea-PAA-sTyr$ (15/10)	1,5-3,0	5	$40 \pm 20$
Фукоидан ( <i>L. saccharina</i> )	0,1-0,3	9	$43 \pm 17$
	0,4-0,6	5	$82 \pm 10$
	0,7-1,0	10	$94 \pm 7$

\*Результаты представлены как средние значения  $\pm$  SD.

Нами было проведено сравнение активности моновалентных и мультивалентных блокаторов селектинов в двух типах тест-систем: *in vitro* и *in vivo*. Основное обнаруженное различие в действии ингибиторов в этих системах

заключалось в том, что активность мультивалентной формы SiaLex в опытах *in vivo* практически не превышала активность мономерного тетрасахарида. Все исследованные РАА-конъюгаты (см. табл. 2), в том числе содержащий одновременно лиганды SiaLex и sTyr, в опытах *in vivo* были близки по активности между собой. Сходный уровень активности *in vivo* двух производных SiaLex - мономерного и полимерного был описан ранее [18] на Е-селективной модели.

Хотя фукоидан в опытах *in vivo* оставался наиболее активным дозозависимым блокатором, довольно неожиданно выглядят результаты сравнения относительных эффективных концентраций его и трех других препаратов *in vitro* и *in vivo* (табл. 3). Для удобства сопоставления мы вводим показатель Ef (последний столбец табл. 3), являющийся отношением величин IC<sub>50</sub> в опытах *in vitro* и *in vivo*. Фактор Ef показывает разницу в эффективности данного препарата в рассматриваемых экспериментальных системах; например, величина Ef >> 1 свидетельствует о том, что препарат много более активен в опытах *in vivo*, чем *in vitro*. Довольно высокая (в микромолярном диапазоне) активность мономерного пентасахарида SiaLex как селективного блокатора *in vivo* описана ранее на модели воспаления легких [23], а также на некоторых других моделях [24]. В то же время его активность в опытах *in vitro* измерялась в миллимолярном диапазоне. Как видно из табл. 3, тетрасахарид SiaLex в использованной нами модели дает сходные результаты (Ef=100). Для высокомолекулярных блокаторов наблюдается совершенно иное; SiaLex-РАА действует примерно в одинаковых концентрациях как *in vitro*, так и *in vivo* (Ef=1). Введение в полимер дополнительно заряженного остатка sTyr дает резкое увеличение активности *in vitro*, но не *in vivo*, что приводит к уменьшению фактора Ef до 0,1. Наконец, наиболее низкое значение Ef, равное 0,01, выявлено для самого активного ингибитора - высокомолекулярного полисахарида фукоидана. То, что для достижения величины ингибирования выхода нейтрофилов примерно на 50% необходимы столь высокие (см. табл. 3) концентрации заряженных полимеров, можно объяснить рядом причин.

Таблица 3. Сравнение IC<sub>50</sub> для 4-х ингибиторов в системах *in vitro* и *in vivo*. Для опытов *in vitro* порядок величин взят из данных, полученных разными методами в данной работе, а также из обзоров литературы [21, 22]. Концентрация *in vivo* рассчитывалась, исходя из равномерного распределения препарата в крови объемом 20 мл/крысу.

Ингибитор	IC <i>in vitro</i> , мкг/мл*	IC <i>in vivo</i> , мкг/мл*	Эффективность, Ef=IC <i>in vitro</i> / IC <i>in vivo</i>
SiaLex	10000	100	100
SiaLex-РАА	100	100	1
SiaLex-РАА-sTyr	10	100	0,1
Фукоидан ( <i>L. saccharina</i> )	0,1	10	0,01

\* Данные приведены в весовых, а не в молярных концентрациях, т.к. величина повторяющейся единицы фукоидана неизвестна.

Одной из причин может быть неспецифическое связывание полимеров с другими клетками крови, а также сывороточными белками, что снижает эффективную концентрацию полимеров в крови и затрудняет достижение ими целевых эндотелиальных клеток. Движущей силой этих неспецифических взаимодействий может быть как ионное взаимодействие с положительно заряженными партнерами, так и Ca<sup>2+</sup>-опосредованное взаимодействие с отрицательно заряженными. Данные табл. 3 демонстрируют, что увеличение суммарного заряда ингибитора в ряду SiaLex-РАА//SiaLex-РАА-sTyr//фукоидан сопровождается изменением Ef в противоположном направлении. Другой причиной пониженной активности полимерных молекул *in vivo* может быть быстрое выведение препарата из крови, в результате которого реальная концентрация вещества в крови уменьшается. Однако экспериментальная проверка (данные не приведены) показала, что ингибирующая активность фукоидана не меняется, если он вводится за 2 часа до инициации воспаления. Следовательно, в течение эксперимента активная



концентрация фукоидана в крови сохраняется. Причиной низкой активности полимерных молекул по сравнению с мономерными может быть также провокация ими процесса ареста нейтрофилов (следующего за роллингом): взаимодействуя с несколькими молекулами селектина на поверхности клетки, поливалентный SiaLex-конъюгат вызывает кластеризацию селектинов, передачу сигнала внутрь клетки и последующую инициацию интегрин-опосредованной адгезии - то есть мультимерные блокаторы в принципе могут способствовать адгезии лейкоцитов на клетках эндотелия. Если это верно (а для L-селектина показан шеддинг, вызванный мультимерными, но не мономерными лигандами [25]), то полимерный лиганд может приводить к двум противоположным действиям - ингибированию роллинга нейтрофилов, с одной стороны, и иницированию их ареста, с другой стороны, с трудно предсказуемой суммой эффектов. Еще одна возможная причина низкого значения параметра  $E_f$  мультивалентных соединений вытекает из известного свойства нейтрофилов агрегировать между собой за счет взаимодействия PSGL-1 одной клетки с селектином другой [26]. Образующиеся агрегаты должны испытывать затруднения в роллинге сравнительно с единичными клетками. Поэтому ингибирование агрегации нейтрофилов может приводить в конечном итоге к усилению выхода нейтрофилов. Возможно, полимерный SiaLex ингибирует многоточечную агрегацию нейтрофилов лучше, чем мономерный. Пока еще мало понятно функциональное значение циркулирующих растворимых форм селектинов, уровень которых изменяется в зависимости от развития воспаления и может регулировать селектин-зависимую адгезию *in vivo* [24]. Поэтому причиной низкого значения  $E_f$  мультимерных соединений может быть также и то, что они связывают секретлируемый Р-селектин, тем самым влияя на его регулирующий эффект на воспаление, в то время как мономер недостаточно аффинен для этого.

Сложнее объяснить, почему для мономера SiaLex  $E_f > 1$ , то есть причину, почему его действующая концентрация на порядок ниже *in vivo*, чем *in vitro*. Главной причиной может быть резкая разница между статической системой (*in vitro*) и динамической (*in vivo*, роллинг). Роллинг является стадией, определяющей скорость развития воспаления в целом. Показано, что процесс роллинга ингибируется фукоиданом на 50% в концентрации 10 мкг/мл [27], то есть при той же концентрации, какую мы нашли для ингибирования воспалительного процесса в целом в опытах *in vivo*. При Р-селектин-опосредованном роллинге [28] образуются моно- и дивалентные связи между природным лигандом PSGL-1 на нейтрофилах и Р-селектином, в то время как в статических условиях в экспериментах *in vitro* связывание безусловно многоточечно. Ограниченный всего лишь единичными контактами процесс роллинга легко ингибируется мономерным SiaLex, что может быть объяснением его высокой активности *in vivo*. Полимерный SiaLex в ситуации моновалентного взаимодействия теряет преимущества как ингибитор. Более того, с точки зрения ингибирования через моновалентное взаимодействие, 1 моль SiaLex эквивалентен 1 молю SiaLex-PAA; но, так как мол. вес полимера в 100 раз выше, то при расчете на лиганд SiaLex, эффективная концентрация ингибитора оказывается в 100 раз ниже, т.е. в конъюгате SiaLex-PAA с селектином реально связывается только один из многих остатков SiaLex, а остальные "бездействуют". Следует заметить также, что в статических условиях, когда связывание многоточечно, полимер активнее мономера благодаря проявлению так называемого кластерного эффекта - локальная концентрация лиганда, связанного с полимером, выше, чем средняя концентрация, а разрыв одной связи не приводит к распаду комплекса, так как из-за близости партнеров сразу же формируется новая связь и т.д. Однако в потоке и при непременном условии моновалентного связывания полимера с рецептором, разрыв единственной связи рецептор-SiaLex приводит к удалению макромолекулы движущимся потоком от рецептора, и, следовательно, кластерный эффект не имеет места. Это приводит к более высокой активности мономера по сравнению с полимером. Надо заметить, что слабая зависимость роллинга от

макромолекулярных ингибиторов вполне физиологична, в противном случае роллинг ингибировался бы эндогенными гликопротеинами. Действительно, благодаря одному только  $\alpha_1$ -кислотному гликопротеину (AGP) концентрация остатков SiaLex в крови должна быть около 10 мкМ, а ингибирующая воспаление концентрация мономера SiaLex в десять раз ниже, то есть если бы AGP был в такой же степени активным *in vivo*, как и SiaLex, процесс роллинга был бы невозможен. Основываясь на этом, можно предполагать, что отщепление SiaLex-содержащих углеводных цепей от гликопротеинов под действием эндогликаназ может быть еще одним физиологическим путем ингибирования роллинга.

Авторы выражают благодарность д-ру А. В. Тузикову, Т. В. Овчинниковой и М. А. Саблиной за синтез неогликоконъюгатов; д-ру М. I. Bird за предоставление препаратов селективных.

Настоящая работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант N 98-04-48738) и программы ХТРС.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Paulson J. C. (1992) In Adhesion: Its Role in Inflammatory Disease; Harlan J., Lui D. Eds.; W.H. Freeman: New York, 19-42.
- 2 McEver R. P., Moore K. L., Cummings R. D. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 11025-11028.
- 3 Bevilacqua M. P., Nelson R. M. J. (1993) J. Clin. Invest., **91**, 379-387.
- 4 Lasky L. A. (1992) Science, **258**, 964-969.
- 5 Springer T. A. (1990) Nature, **346**, 425-434.
- 6 Sako D., Comess K. M., Barone K. M., Camphausen R. T., Cummings D. A., Shaw G. D. (1995) Cell, **83**, 323-331.
- 7 Rosen S. D., Bertozzi C. R. (1994) Curr. Opin. Cell Biol., **6**, 663-673.
- 8 Butcher E. C., Picker L. J. (1996) Science (Wash DC), **272**, 60-66.
- 9 Vestweber D. (1996) J. Cell. Biochem., **61**, 585-591.
- 10 Varki A. (1997) J. Clin. Invest., **99**, 158-162.
- 11 Усов А.И., Смирнова Г.П., Билан М.И., Шапков А.С. (1998) Биоорган. химия, **24**, 437-445.
- 12 Zemlyanukhina T. V., Nifant'ev N. E., Shashkov A. S., Tsvetkov Y. E., Bovin N. V. (1995) Carbohydrate Lett., **1**, 277-284.
- 13 Nifant'ev N. E., Tsvetkov Y. E., Shashkov A. S., Kononov L. O., Menshov V. M., Tuzikov A. B., Bovin N. V. (1996) J. Carbohydr. Chem., **15**, 939-953.
- 14 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.
- 15 Priest R., Nawas S., Green P. M., Bird M. I. (1996) Biochem. Soc. Trans., **23**, 162S.
- 16 Game S. M., Rajapurohit P. K., Clifford M., Bird M. I., Priest R., Bovin N. V., Nifant'ev N. E., O'Bierne G., Cook N. D. (1998) Anal. Biochem., **258**, 127-135.
- 17 Преображенская М. Е., Берман А. Е., Михайлов В. И., Ушакова Н. А., Мазуров А. В., Семенов А. В., Усов А. И., Нифантьев Н. Э., Бовин Н. В. (1997) Biochem. Mol. Biol. Int., **43**, 443-451.
- 18 Miyauchi H., Tanaka T. M., Koike H., Kawamura N., Hayashi M. (1997) Bioorg. Med. Chem. Lett., **7**, 985-988.
- 19 Семенов А. В., Мазуров А. В., Преображенская М. Е., Ушакова Н. А., Михайлов В. И., Берман А. Е., Усов А. И., Нифантьев Н. Э., Бовин Н. В. (1998) Вopr. мед. химии, **44**, № 2, 135-144.



- 20 Weitz-Schmidt G., Stokmaier D., Scheel G., Nifant'ev N. E., Tuzikov A. B., Bovin N. V. (1996) *Anal. Biochem.*, **238**, 184-190.
- 21 Simanec E.E., McGarvey G.J., Jablonowsky J.A., Wong C.-H (1998) *Chem. Rev.*, **98**, 833-862.
- 22 Jacob G.S., Kirmaier C., Abbas S.Z., Howard S.C., Setinger C.N., Welply J.K., Scuddler P. (1995) *Biochemistry*, **34**, 1210-1217.
- 23 Mulligan M. S., Paulson J. C., DeFrees S., Zheng Z.-L., Lowe J. W.B., Ward P. A. (1993) *Nature*, **364**, 149-151.
- 24 Lowe J.B., Ward P.A. (1997) *J. Clin. Invest.*, **99**, 822-826.
- 25 Gordon E. J., Strong L. E., Kiessling L. L. (1998) *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 1293-1299.
- 26 Walcheck B., Moore K. L., McEver R. P., Kishimoto T. K. (1996) *J. Clin. Invest.*, **98**, 1081-1087.
- 27 Ley K., Linnemann G., Meinen M., Stoolman L. M., Gaethgens P. (1993) *Blood*, **81**, 177-185.
- 28 Alon R., Hammer D. A., Springer T. A. (1995) *Nature*, **374**, 539-542.

Поступила 8. 06. 99 г.

#### INHIBITORY ACTIVITY OF MONOMERIC AND POLYMERIC SELECTIN LIGANDS

N.A.USHAKOVA, M.E.PREOBRAZHENSKAYA, N.E.NIFANT'EV\*, A.I.USOV\*  
T.V.POCHECHUEVA\*\*, O.E.GALANINA\*\*, N.V.BOVIN\*\*

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya 10, Moscow 119832, fax (095)245-08-57; \* - 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 ability of tetrasaccharides (SiaLex, SiaLea, HSO<sub>3</sub>Lex), their conjugates with polyacrylamide (40 kDa), and several other monomeric and polymeric substances to block selectins has been compared with that of polysaccharide fucoidan. Two assay systems were used: one was constructed on the base of recombinant E-, P-, and L-selectins; the other was a rat model of peritoneal inflammation. IC<sub>50</sub> values for the neoglycoconjugate SiaLea-PAA were 6, 40, and 85 μM with the recombinant E-, P-, and L-selectins, respectively; all monomeric inhibitors were about two orders of magnitude weaker. PAA-conjugates, containing as a ligand tyrosine-o-sulfate in addition to one of the above mentioned oligosaccharides, were the most potent synthetic blockers. Compared with the most potent of the known inhibitors, fucoidan, bi-ligand glycoconjugate HSO<sub>3</sub>Lea-PAA-sTyr, displayed *in vitro* similar activity in blocking L-selectin, while its activity towards P-selectin was ten times lower. All the synthetic polymers tested were able to inhibit neutrophil extravasation to inflammation site, acting in concentration about 10 mg/kg. Thus, the effect of SiaLex is considerably more effective *in vivo* than *in vitro*, whereas heavily charged fucoidan and bi-ligand neoglycoconjugate acted in converse manner.

**Key words:** inflammation, selectins, selectin ligands, fucoidan, neoglycoconjugates