

УДК 616-0024;547.458:547.995;612.112

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ МАННОЗЫ НА РАЗВИТИЕ СЕЛЕКТИНЗАВИСИМОГО ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ У КРЫС И МЫШЕЙ

Н.А. УШАКОВА¹, М.Е. ПРЕОБРАЖЕНСКАЯ¹, Н.Э. НИФАНТЬЕВ²,
Я.В. ВОЗНЫЙ², Т.В. ПОЧЕЧУЕВА³, Н.В. БОВИН³

¹НИИ биомедицинской химии им. Ореховича В.Н. РАМН, 119992, Москва,
ул. Погодинская, д.10, факс (095)245-08-57;

²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 117913, Москва,
Ленинский проспект, 47;

³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, 117871 ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Исследовали ингибирующее действие ряда маннозосодержащих соединений на взаимодействие модельного углеводного лиганда с Е-, Р- и L-селектинами *in vitro*, а также способность этих соединений блокировать экстравазацию лейкоцитов при экспериментальном перитоните у крыс и мышей *in vivo*. Мономерные и полимерные соединения (4-нитрофенилтиоманнозид, фенилманнозид, конъюгированный с полиакриловой кислотой и α -манноза, конъюгированная с полиакриламидом) ингибировали связывание модельного лиганда с Р- и L- селектинами (но не с Е-селектином). При внутривенной инъекции крысам эти соединения вызвали зависимость от дозы снижения накопления нейтрофилов в брюшной полости при перитоните. Наиболее эффективным ингибитором как в опытах *in vitro*, так и *in vivo* был фенилманнозид, конъюгированный с полиакриловой кислотой. Полисахарид маннан не оказывал ингибирующего действия в обоих типах экспериментов. Обнаружено также ингибирующее влияние подкожного введения 4-нитрофенилтиоманнозида на развитие перитонита у мышей.

Ключевые слова: воспаление, селектины, Р-селектин, нейтрофилы, клеточная адгезия, производные маннозы, фукоидан.

Сокращения: β Man-SPhNO₂ - 4-нитрофенилтиоманнозид;
 α Man-O-Ph-pA - фенилманнозид, конъюгированный с полиакриловой кислотой;
 α Man-sp-PAA - α -манноза, конъюгированная с полиакриламидом; sp - OCH₂CH₂CH₂;
pA - полиакриловая кислота; SiaLe^x - сиаилЛьюис-х, Le^x - Льюис-х, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc; PAA - полиакриламид; ZZ-IgG - связывающий фрагмент протеина А; БСА – бычий сывороточный альбумин.

ВВЕДЕНИЕ. Миграция нейтрофилов во внесосудистое пространство к участку воспаления начинается со слабого связывания нейтрофилов с активированным эндотелием сосудов (роллинга). Роллинг осуществляется путем взаимодействия трех типов адгезивных молекул (так называемых селектинов E-, P- и L-) с их гликопротеиновыми лигандами. P- и E-селектины экспрессируются на клетках эндотелия, а P-селектин, кроме того, на тромбоцитах. L-селектин экспрессирован на поверхности всех типов лейкоцитов. Все три селектина узнают с различной степенью сродства общий природный эпитоп - тетрасахарид SiaLe^x [1-3]. Проведено большое число исследований, посвященных изучению ингибиторов селектин-лигандного взаимодействия, и обнаружено, что некоторые из них обладают противовоспалительным действием при острых и хронических типах воспаления, в частности при воспалении, сопровождающем ишемию и реперфузию [4-6]. Исследованные ингибиторы могут быть разделены на две основные группы: антитела к селектинам и их лигандам, а также соединения, содержащие фрагменты лигандов селектинов или их аналоги [7]. Изучение SiaLe^x как ингибитора селектин-лигандного взаимодействия в опытах *in vitro* и *in vivo* показало, что он обладает относительно малым сродством к селектинам и является слабым ингибитором воспаления. Присоединение его к ряду других соединений, в частности к полиакриламиду, позволяет несколько повысить его ингибиторную активность [8,9].

В последние годы появилось новое направление в поиске ингибиторов селектинов - получение так называемых гликомиметиков - соединений, не являющихся копиями фрагментов природных лигандов селектинов [10]. В частности, были синтезированы ингибиторы - производные маннозы: α-маннозил терпеноид - селективный ингибитор P-селектина [11] и аминоктил-С-α-D-маннозиды [12], которые предполагалось использовать в качестве основы для синтеза нового класса антагонистов селектинов.

Целью настоящей работы являлось изучение селектинсвязывающего и противовоспалительного действия новых антагонистов селектинов, синтезированных на основе маннозы.

МЕТОДИКА. Tween-20, иммуноглобулин человека, БСА получены от «Sigma» (США), конъюгат стрептавидин-пероксидаза - от «Boehringer Mannheim» (Германия). Все остальные препараты получены от «Fluka» (Швейцария). 96-луночные иммуноплаты «MaxiSorb» - от «Nunc» (Дания). Полимерный неогликоконъюгат HSO₃Le^a-PAA получен от «Syntesome GmbH» (Германия). βMan-SPhNO₂ получен как описано ранее [13]. Пептон был произведен Винницким заводом медпрепаратов, (Украина); тиогликолятная среда получена от Sigma; гликоген из устриц - от «Calbiochem» (США). Фукоидан из *Laminaria saccharina* любезно предоставлен д-ром А.И. Усовым (Ин-т органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН). Маннан из *Candida parapsilosis* любезно предоставлен д-ром В.Д. Щербухиным (Ин-т биохимии им. А.Н. Баха). Рекомбинантные белки, ZZ-селектины (моновалентные), лишенные трансмембранного и цитозольного доменов, синтезировали Bernard Allen (Glaxo Institute for Molecular Biology) и Nicholas Smithers (Glaxo Wellcome, Stevenage) как C-концевые химеры с ZZ-доменом протеина A. ZZ-домен прочно связывался с IgG человека и кролика. IgG-очищенные белки были охарактеризованы с помощью SDS-PAA-электрофореза и метода клеточной адгезии.

ZZ-селективный анализ. Изучение связывания ингибиторов с рекомбинантными селектинами проводили как описано ранее [14]. 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 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) 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 Е-) и 60 (для Р- или L-селектинов) нг/мл буфера А, содержащего 0,3% БСА. Платы инкубировали в течение 1 часа при 37°C, далее в течение ночи при 4°C, после чего трижды отмывали буфером А, содержащим 0,1% Твин-20. Затем платы инкубировали с HSO₃Le^a-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% *o*-фенилендиамин и 0,03% H₂O₂; реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М H₂SO₄. Адсорбцию измеряли 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 HSO₃Le^a-PAA-biot. Процент ингибирования рассчитан как (ODA-OD1) × 100/ODA, где ODA представляет собой значение оптической плотности в отсутствие ингибитора, а OD1 - то же в присутствии ингибитора.

Изучение ингибирования перитонеального воспаления проводили на крысах и мышах. Острое перитонеальное воспаление у крыс вызывали как описано ранее [15] с небольшими изменениями. Для создания воспаления крысам-самкам линии Wistar весом около 200 г под эфирным наркозом внутрибрюшинно вводили 10 мл раствора PBS, содержащего 10% пептон (первая группа опытов) или 0,5% гликоген (вторая группа опытов). Контрольным животным вместо пептона вводили внутрибрюшинно 10 мл 0,9% NaCl. Ингибиторы вводили под наркозом в бедренную вену через 15 мин после инъекции пептона в 0,3 мл стерильного 0,9% NaCl. Во 2-й группе опытов ингибиторы вводили через 15 мин или через 3 ч. после инъекции гликогена. Животным опытной группы вместо ингибитора вводили внутривенно по 0,3 мл стерильного 0,9% NaCl. Через 3 или 4 ч животных усыпляли и обезглавливали. Брюшную полость промывали раствором PBS, содержащим 60 ед/мл гепарина, 0,02% ЭДТА и 0,06% сыворотки быка при интенсивном массаже брюшины. В промывной жидкости подсчитывали общее число клеток, и клеточную суспензию центрифугировали при 400g в течение 10 мин. Концентрированную суспензию разводили цельной бычьей сывороткой в соотношении 1:1, делали мазки и окрашивали их по методу Паппенгейма. Количество нейтрофилов подсчитывали на двух параллельных мазках, а общее число нейтрофилов рассчитывали, исходя из процента нейтрофилов и общего числа клеток. При получении острого перитонита у мышей использовали животных (≈ 30г) линии MNRI. Перитонит вызывали внутрибрюшинной инъекцией 1 мл 3% раствора тиогликолятной среды. Ингибитор вводили подкожно в 0,3 мл стерильного 0,9% NaCl через 2 мин после инъекции среды. Животным опытной группы, вместо ингибитора вводили подкожно 0,3 мл 0,9% NaCl. Через 3 ч животных забивали, брюшную полость промывали 8 мл раствора и число нейтрофилов подсчитывали как описано выше. Полученные данные статистически обрабатывали с использованием критерия *t* Стьюдента; при этом

различие расценивалось как статистически достоверное при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Первоначально исследовали взаимодействие четырех различных производных маннозы с рекомбинантными Е-, Р-, и L-селектинами в опытах *in vitro*. Как видно из табл. 1 ни одно из изученных соединений не ингибировало связывания $\text{HSO}_3\text{Le}^a\text{-PAA-biot}$ с Е-селектином. Наиболее активным ингибитором связывания с Р- и L-селектинами оказался конъюгат фенилманнозида с полиакриловой кислотой. Следует отметить, что сама полиакриловая кислота обладала очень слабым ингибиторным действием. Высокая активность конъюгата, возможно, объясняется его взаимодействием как с доменом селектиновой молекулы, ответственным за связывание углеводной части лиганда, так и с доменом, взаимодействующим с отрицательно заряженными молекулами. Присутствие таких доменов показано для Р-селектина [3]. В опытах с рекомбинантными селектинами ингибиторная активность $\alpha\text{Man-O-Ph-pA}$ приближалась к активности фукоидана - наиболее эффективного из изученных нами ингибиторов [8,14,15]. Низкомолекулярное соединение 4-нитрофенилтиоманнозид (м.м. 317 Да), а также нейтральный конъюгат маннозы с полиакриламидом оказались более слабыми ингибиторами селектин-лигандного взаимодействия. Нейтральный полисахарид маннан вообще не обладал селектинсвязывающей активностью.

Таблица 1. Ингибирование связывания различными производными маннозы и фукоиданом $\text{HSO}_3\text{Le}^a\text{-PAA-biot}$ с рекомбинантными Е-, Р- и L-селектинами.

Ингибитор	Е-селектин	Р-селектин	L-селектин
$\beta\text{Man-SPhNO}_2$	НИ	200	1500
$\alpha\text{Man-O-Ph-pA}$ (20) ^a	НИ	0,6	0,6
$\alpha\text{Man-sp-PAA}$ (20) ^a	НИ	100	800
РА	НД	1500	3000
Маннан	НД	НИ	НИ
Фукоидан	НИ	0,1 ^b	0,8 ^b

Примечание: Приведенные концентрации (мкМ), вызывающие 50%-ное ингибирование; величины IC_{50} представляют среднее из 3-х определений. Стандартное отклонение не превышало 10%. а) Значения в скобках - молярный % данных лигандов в составе конъюгата. б) Молярная концентрация рассчитана на основании предположения, что активной единицей является гексасахарид. НИ - не ингибирует; НД - не делали.

Для изучения *in vivo* противовоспалительного действия ингибиторов селектинов использовали две модели острого перитонита у крыс и мышей. Как видно из табл. 2 все изученные маннозосодержащие соединения ингибировали выход нейтрофилов в брюшную полость крыс после индукции воспаления. Это соответствовало данным, полученным в опытах *in vitro*, однако различия в активности препаратов были значительно менее существенны. Наиболее эффективным ингибитором оказался, как и в опытах *in vitro*, $\alpha\text{Man-O-Ph-pA}$. В дозе 1 мг на крысу этот препарат давал небольшое, но статистически достоверное ингибирование, тогда как в дозе 2 мг ингибирование достигало 60%. Следует отметить, что в отличие от опытов *in vitro* активность этого препарата была существенно ниже активности фукоидана. В той же дозе (2 мг на крысу) $\beta\text{Man-SPhNO}_2$ и конъюгат маннозы с РАА обладали более низкой активностью, чем $\alpha\text{Man-O-Ph-pA}$. Они ингибировали выход нейтрофилов примерно на 40%.

Таблица 2. Влияние производных маннозы на развитие перитонеального воспаления у крыс, вызванного внутривенным введением пептона.

Группа животных	Доза, мг на крысу	n	Число нф на крысу ($\times 10^6$) ^б	Ингибирование (%)
Контроль		9	0,4 \pm 0,2	
Воспаление ^а		22	45,7 \pm 4,5	
+ β Man-SPhNO ₂	2,0	7	26,9 \pm 5,9	41,1*
	5,0	5	26,6 \pm 6,8	41,8*
+ α Man-O-Ph-pA (20)	1,0	4	31,2 \pm 2,0	31,7**
	2,0	6	18,8 \pm 3,1	58,9***
+ α Man-sp-PAA (20)	2,0	7	24,5 \pm 5,0	46,4**
+Маннан	2,5	5	42,5 \pm 11,6	7,0
	5,0	3	38,9 \pm 13,4	14,9
+Фукоидан	1,0	10	2,5 \pm 0,5	94,5***

Примечание: ^а Животным этой группы вместо ингибиторов вводили 0,3 мл 0,9 % стерильного NaCl; ^б Среднее число нейтрофилов \pm средняя стандартная ошибка (SEM); n – число животных в каждой группе. Звездочками указана статистическая значимость различий по сравнению с опытной группой животных, не получавших ингибитор.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$.

Таблица 3. Влияние 4-нитрофенилтиоманнозида на развитие перитонеального воспаления у крыс, вызванного внутривенным введением гликогена из устриц.

Эксперимент	Группа животных	n	Число нф на крысу ($\times 10^6$) ^б	Ингибирование (%)
А	Воспаление ^а	9	35,1 \pm 7,3	
	+ β man-SphNO ₂	6	11,0 \pm 2,4	68,7*
Б	Воспаление ^а	3	32,5 \pm 7,9	
	+ β man-SphNO ₂	4	27,0 \pm 2,5	16,9

Примечание: В эксперименте А ингибитор (2 мг на крысу) вводили через 15 мин., а в эксперименте Б – через 3 часа после развития воспаления. Число нейтрофилов определяли через 3 часа (эксперимент А) и через 4 часа (эксперимент Б). Обозначения см. табл. 2. * $p < 0,02$

Помимо воспаления, вызванного пептоном, исследовали влияние β Man-SPhNO₂ на развитие воспаления, вызванного гликогеном из устриц (табл.3). При этом типе воспаления по данным Muliigan и др. выход нейтрофилов обусловлен экспрессией только Е-селектина [16]. В наших опытах β Man-SPhNO₂ оказывал значительное ингибирующее действие на выход нейтрофилов при введении через 15 мин после индукции воспаления, т.е. в период экспрессии Р-селектина, и не оказывал действия при введении через 3 ч в период экспрессии Е-селектина. Таким образом, ингибирование выхода нейтрофилов на этой модели воспаления, возможно, обусловлено взаимодействием с Р- и L-селектинами, что соответствует данным, полученным *in vitro*. Следует отметить, что β Man-SPhNO₂ несколько лучше тормозил воспаление, индуцированное гликогеном, чем воспаление, вызванное пептоном. Выяснение причин такого несоответствия полученных нами данных при воспалении, индуцированном гликогеном из устриц, и данным других авторов [16] требует дополнительных экспериментов.

В случае перитонита у мышей, вызванного введением тиогликолятной среды, подкожная инъекция β Man-SPhNO₂ оказывала выраженное ингибирующее

дозо-зависимое действие на выход нейтрофилов в область воспаления; при дозе 30 мг на кг веса ингибирующий эффект составил 70% (табл.4).

На основании приведенных данных можно заключить, что некоторые производные маннозы оказывают блокирующее действие на развитие перитонеального воспаления вне зависимости от вида использованных животных и способа введения препарата. Особенно интересными представляются данные, полученные при подкожном введении низкомолекулярного препарата β Man-SphNO₂ как более перспективного для получения противовоспалительных лекарственных средств.

Таблица 4. Влияние 4-нитрофенилтиоманнозида на развитие перитонеального воспаления у мышей, вызванного подкожным введением тиогликолятной среды.

Группа животных	Доза, мг на мышь	n	Число нф ($\times 10^6$) ^б	Ингибирование (%)
Контроль		10	0,6 \pm 0,3	
Воспаление ^а		29	6,0 \pm 0,4	
+ β Man-SphNO ₂	0,1	6	6,3 \pm 1,7	-
	0,25	7	3,7 \pm 0,5	38,3*
	0,5	7	3,4 \pm 1,2	43,3*
	1,0	6	1,8 \pm 0,4	70,0**

Примечание: Обозначения см. табл. 2. * $p < 0,02$; ** $p < 0,001$.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты NN 98-04-48738 и 01-04-48401).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kansas G.S. (1996) Blood, **88**, 3259-3287.
2. Vestweber D., Blanks J.E. (1999) Physiol. Rev., **79**, 181-213.
3. Somers W.S., Tang J., Shaw G.D., Camphausen R.T. (2000) Cell, **103**, 467-479.
4. Lefer D.J. (2000) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **40**, 283-294.
5. Schermerhorn M.L., Nelson D.P., Blume E.D., Phillips L., Mayer J.E. (2000) Ann. Thorac. Surgery, **70**, 890-894.
6. Hayashi H., Imanishi N., Ohnishi M., Tojo S.J. (2001) Nephron, **87**, 352-360.
7. Lowe J.B., Ward P.A. (1997) J. Clin. Invest., **99**, 822-826.
8. 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**, 135-144.
9. Miyauchi H., Tanaka M., Koike H., Kawamura N., Hayashi M. (1997) Bioorg. Med. Chem. Lett., **7**, 985-988.
10. Simanek E.E., McGarvey G.J., Jablonowski J.A., Wong C.-H. (1998) Chem. Rev., **98**, 833-862.
11. Ikeda T., Kajimoto T., Kondo H., Wong C.H. (1997) Bioorg. Med. Chem. Lett., **7**, 2485-2490.
12. Roche D., Banteli R., Winkler T., Casset F., Ernst B. (1998) Tetrahedron Lett., **39**, 2545-2548.

13. Возный А.Я., Каличева И.С., Галоян А.А., Мамян С.С. (1989) Биорг. химия, **15**, N 13, 405-409.
14. Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Нифантьев Н.Э., Усов А.И., Почечуева Т.В., Галанина О.Е., Бовин Н.В. (1999) Вопр. мед химии, **45**, 375-383.
15. Preobrazhenskaya M.E., Berman A.E., Mikhailov V.I., Ushakova N.A., Mazurov A.V., Semenov A.V., Usov A.I., Nifant'ev N.E., Bovin N.V. (1997) Biochem. Mol. Biol. Int., **43**, 443-451.
16. Mulligan M.S., Lentsch A.B., Miyasaka M., Ward P.A. (1998) Inflammation Res., **47**, N 6, 251-255.

Поступила 5.02.01.

EFFECT OF MANNOSE DERIVATIVES ON RAT AND MOUSE SELECTIN-DEPENDENT INFLAMMATION

N.A. USHAKOVA¹, M.E. PREOBRAZHENSKAYA¹,
N.E. NIFANT'EV², Ya. V. VOZNYI², T.V. POCHUEVA³, N.V. BOVIN³

¹ Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya 10, Moscow 119992, fax (095) 245-08-57;

² - Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospekt 47, Moscow 117913;

³ - Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow 117871 GSP-7

The inhibitory effect of mannose-containing oligosaccharides on model carbohydrate ligand interaction with E-, P- and L-selectins *in vitro*, as well as on the ability of these compounds to block the leukocyte extravasation in rat and mouse peritonitis *in vivo* was studied. The monomeric and polymeric compounds, 4-nitrophenylthiomannoside, phenylmannoside, conjugated with polyacrylic acid, and α -mannose, conjugated with polyacrylamide, inhibited the binding of the model ligand to P- and L-selectins (but not to E-selectin). Intravenous injection of these compounds was found to cause a dose-dependent reduction of neutrophil accumulation in rat peritoneum. The polysaccharide mannan was inactive in both types of experiments. The conjugate of phenylmannoside with polyacrylic acid was the most effective blocker as *in vitro* experiments, as well as *in vivo*. The inhibitory effect of subcutaneous injection of 4-nitrophenylthiomannoside on mouse peritonitis was demonstrated.

Key words: inflammation, selectins, P-selectin, neutrophils, cell adhesion, mannose derivatives, fucoidan