

УДК 547.963.1

## ВЛИЯНИЕ ГЛИКОЗИДОВ МУРАМОИЛДИПЕПТИДА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ

*Земляков А. Е., Цикалов В. В., Цикалова В. Н.*

*Таврическая академия (структурное подразделение)  
ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым  
E-mail: alex\_z56@mail.ru*

Изучена стимуляция продукции ряда важнейших цитокинов мононуклеарными клетками крови (МНК) при прямом действии  $\beta$ -гликозидов мурамоилдипептида. Для исследуемых гликопептидов не выявлено интерферогенной активности. При тестировании продукции фактора некроза опухоли и интерлейкинов-1 $\beta$  и -4 найдены соединения-лидеры. Установлена индукция синтеза интерлейкина-6 всеми гликозидами мурамоилдипептида.

**Ключевые слова:** мурамоилдипептиды; гликозиды мурамоилдипептида, цитокины, интерферон, фактор некроза опухоли, интерлейкин.

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из факторов регуляции иммунного процесса *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамином (мурамоилдипептид, MDP) и его производными является индуцирование продукции широкого спектра цитокинов [1, 2]. Проведенные нами ранее исследования показали, что  $\beta$ -гликозиды мурамоилдипептида эффективно стимулируют синтез фактора некроза опухоли (TNF) и интерлейкина-1 (IL-1) перитонеальными макрофагами мышей [3] и интерлейкина-2 (IL-2) – спленоцитами мышей [4]. Для широкой группы гликозидов была установлена интерферогенная активность в экспериментах *in vitro* [5].

Ряд  $\beta$ -гликозидов MDP с липофильными алифатическими агликонами, а также *O*- и *S*-арилгликозидов мурамоилдипептида был исследован в тесте прямого цитотоксического действия на клетки эритробластного лейкоза человека K-562 и мононуклеарные клетки крови (МНК) [6–8]. В данном сообщении приводятся результаты изучения влияния данных гликозидов мурамоилдипептида на продукцию цитокинов МНК.

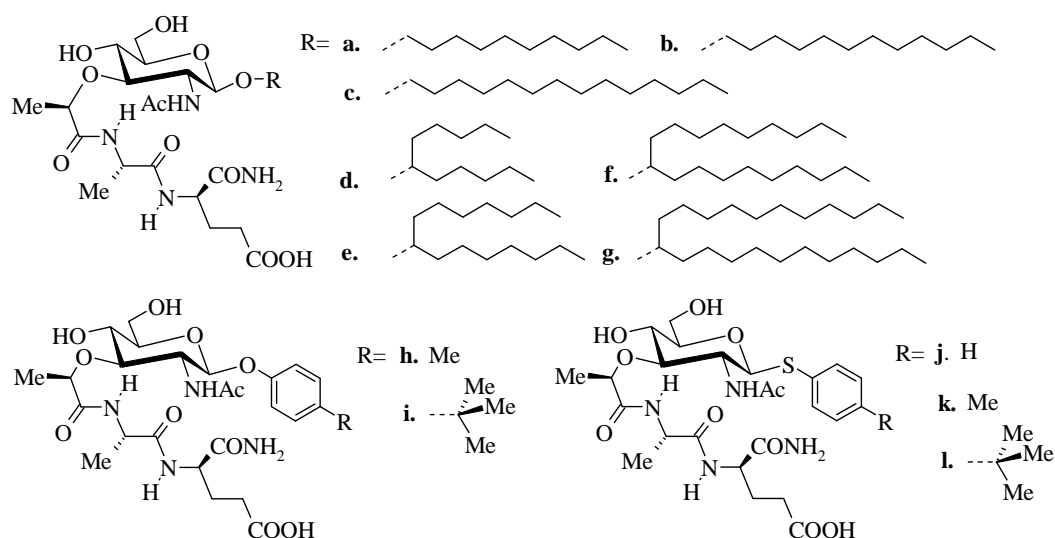
### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез  $\beta$ -децил-,  $\beta$ -додецил- и  $\beta$ -тетрадецил-гликозидов MDP **2a-c** описан в [9, 10]; получение  $\beta$ -(ундекан-6-ил)-,  $\beta$ -(пентадекан-8-ил)-,  $\beta$ -(нонадекан-10-ил)- и  $\beta$ -(трикозан-12-ил)-гликозидов MDP **2d-g** приведено в [6, 9]; методики синтеза  $\beta$ -*n*-толил- и  $\beta$ -*n*-трет-бутилфенил-гликозидов MDP **2h,i** даны в сообщении [11]; описание получения  $\beta$ -фенилтио-,  $\beta$ -*n*-толилтио- и  $\beta$ -*n*-трет-бутилфенилтио-

гликозидов MDP **2j-l** приведено в работе [7]. В качестве референс-контроля использовали MDP (**1**).

Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР получены на приборе Varian VXR-300 (300 МГц), растворитель – ДМСО- $d_6$ , внутренний стандарт –  $\text{Me}_4\text{Si}$ . Приведены химические сдвиги ( $\delta$ -шкала) и константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ , Гц).

Супернатант МНК при их инкубации с исследуемыми веществами в дозе 200 мкг/мл, полученный в результате определения прямого цитотоксического действия на клетки МНК (см. [6, 7]), собирали в криопробирки, замораживали с последующим определением содержания про- и противовоспалительных цитокинов. Результаты биологических исследований любезно предоставлены д. м. н., профессором О. В. Калюжиным (НИИ морфологии человека РАМН, Москва, РФ).



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Строение обсуждаемых в данной работе гликозидов MDP **2a-l** было подтверждено данными  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии (см. Табл. 1 и [7, 9, 10]). В спектрах были идентифицированы все основные характеристические сигналы, относящиеся к протонам агликона, остатка *N*-ацетилмурамовой кислоты и дипептидного фрагмента.

Таблица 1  
Характеристические сигналы  $^1\text{H}$  ЯМР-спектров соединений **2e-i**

Группа или атом	Химические сдвиги, м.д. (КССВ, Гц)				
	<b>2e</b>	<b>2f</b>	<b>2g</b>	<b>2h</b>	<b>2i</b>
OR: CH <sub>3</sub>	0,87т (6H)	0,87т (6H)	0,87т (6H)	2,25с	1,26с (9H)
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1,24м, 1,45м	1,24м, 1,46м	1,24м, 1,45м	-	-
<i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	-	-	-	6,84д, 7,05д	6,87д, 7,25д
Mur: HI ( <i>J</i> <sub>1,2</sub> )	4,29д (8,5)	4,29д (8)	4,30д (8,5)	4,86д (8)	4,89д (8)
NAc	1,74с	1,73с	1,74с	1,78с	1,79с
NH	7,77д	7,73д	7,74д	7,86д	7,90д
C4-OH	н. д.	5,12уд	5,12д	5,45д	5,46д
C6-OH	н. д.	4,35ут	4,35ут	4,56ут	4,40ут
CH <sub>3</sub> CH	1,24м	1,24м	1,24м	1,26д*	1,27д*
Ala: CH <sub>3</sub> CH	1,24м	1,24м	1,24м	1,27д*	1,28д*
NH	7,39д	7,36д	7,36д	7,47д	7,49д
iGln: γ-CH <sub>2</sub>	2,18т	2,18т	2,19т	2,19т	2,17т
β-CH <sub>2</sub>	1,72м, 1,90м	1,70м, 1,96м	1,71м, 1,95м	1,71м, 1,96м	1,75м, 1,95м
CONH <sub>2</sub>	6,99с, 7,25с	6,99с, 7,26с	6,99с, 7,26с	7,00с, 7,27с	6,99с, 7,26с
NH	8,10д	8,04д	8,02д	8,10д	8,20д

\* Неоднозначное отнесение; н. д. – не детектировано.

При изучении продукции α- и γ-интерферонов МНК при их инкубировании с β-гликозидами мурамоилдипептида не было выявлено индуктивного действия гликопептидов (см. Рис. 1). Более того, если уровень секретирования α-интерферона при действии гликозидов MDP практически не отличался от спонтанной продукции этого цитокина МНК, то подавляющее количество использованных гликопептидов (за исключением β-додецил-MDP **2b**) явно ингибировали выработку γ-интерферона мононуклеарными клетками крови. Такие данные контрастируют с полученными нами результатами [5]. Возможно, это связано с тем, что интерферогенное действие производных MDP наблюдалось на клетках, предварительно индуцированных или вирусом, или фитогемагглютинином.

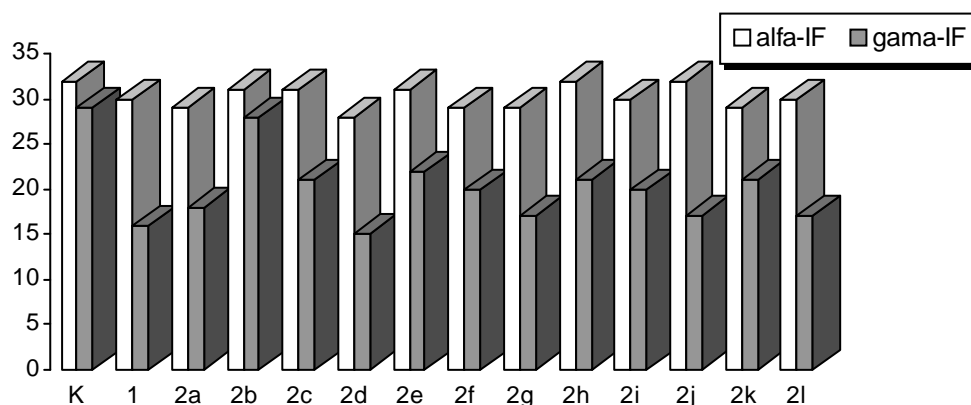


Рис. 1. Влияние гликозидов MDP **2a-i** на продукцию  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферона (IF) МНК; К – спонтанная продукция.

Одним из важнейших показателей иммуномодулирующего действия мурамоилдипептидов является их способность влиять на продукцию таких цитокинов как TNF и IL-1. В случае МНК индуцирующее действие гликопептидов на секрецию TNF наблюдалось только для  $\beta$ -тетрадецил-MDP **2c** и  $\beta$ -(пентадекан-8-ил)-MDP **2e** (см. Рис. 2). Причем действие этих близких по липофильности соединений сравнимо со стимулирующим действием сильного индуктора продукции цитокинов – фитогемагглютинаина.

В случае  $\beta$ -IL-1 активация продукции зарегистрирована для более широкого круга производных. Из линейных алкилгликозидов мурамоилдипептида максимальным действием обладает  $\beta$ -додецил-MDP **2b**, а в случае диалкилметилгликозидов пик активности приходится на  $\beta$ -(пентадекан-8-ил)-MDP **2e**. В группах *O*- и *S*-арилгликозидов мурамоилдипептида больший индуцирующий эффект был присущ менее гидрофобным соединениям, при этом более гидрофобные *S*-гликозиды с *n*-толил- и *n*-*трет*-бутилфенильным агликонами уступали по активности соответствующим *O*-арилгликозидам. Максимальное индуцирующее действие, близкое по значению к активности фитогемагглютинаина, показал  $\beta$ -фенилтио-MDP **2j**. Полученные данные согласуются с ранее выявленным эффектом проявления иммуностимулирующего действия гликозидами мурамоилдипептида с определенным гидрофильно-липофильным балансом [3, 6, 7].

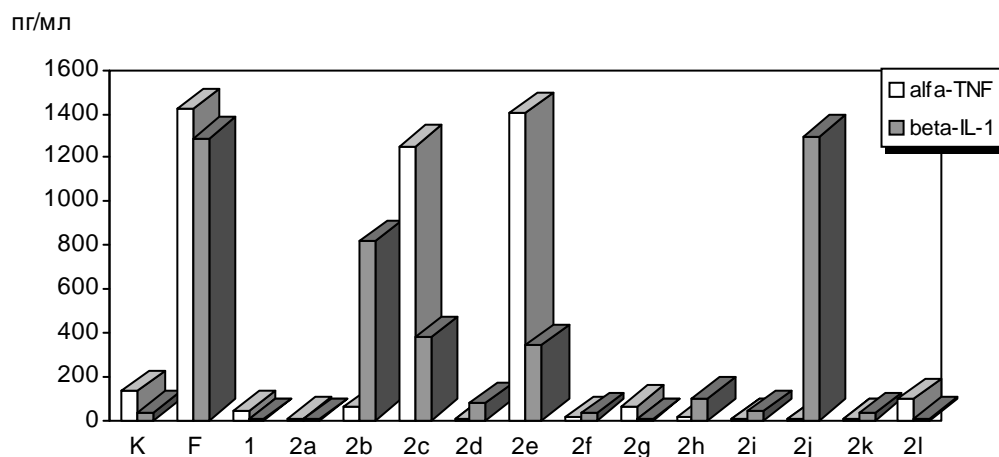


Рис. 2. Влияние гликозидов MDP **2a-i** на продукцию  $\alpha$ -TNF и  $\beta$ -IL-1 МНК; К – спонтанная продукция, F – продукция, индуцированная фитогемагглютинином.

IL-4 является одним из важнейших регуляторов иммунного процесса, а также реализации в организме противовоспалительных эффектов. В контрасте с индукцией синтеза  $\beta$ -IL-1 из группы исследуемых гликопептидов большим стимулирующим действием обладали гликозиды с достаточно высокой гидрофобностью (см. Рис. 3).

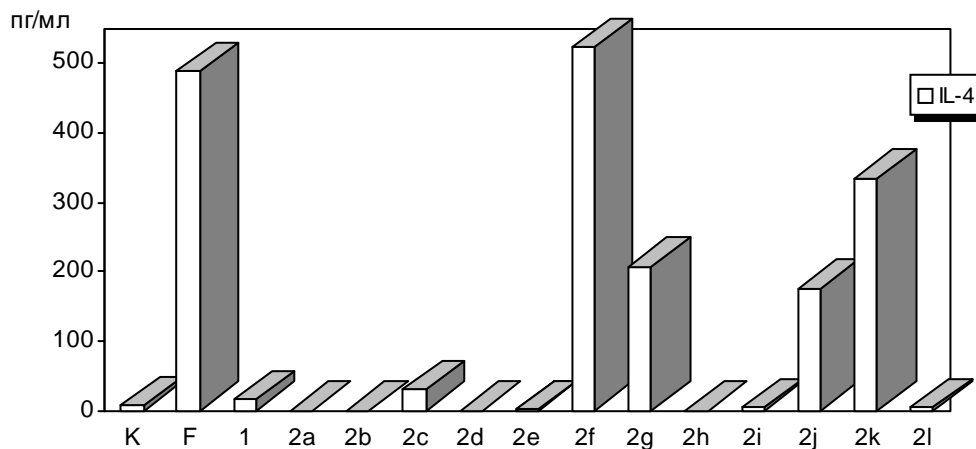


Рис. 3. Влияние гликозидов MDP **2a-i** на продукцию IL-4 МНК; К – спонтанная продукция, F – продукция, индуцированная фитогемагглютинином.

Так, из  $\beta$ -алкилмурамоилдипептидов стимулирующее действие зарегистрировано только для самого липофильного  $\beta$ -тетрадецил-MDP **2c**. В случае

гликозидов со вторичным алифатическим агликоном максимальный эффект, превышающий действие фитогемагглютинаина, наблюдался для  $\beta$ -(нонадекан-10-ил)-MDP **2f**. Дальнейшее повышение липофильности, как в случае  $\beta$ -(трикозан-12-ил)-MDP **2g**, приводит к снижению индукции синтеза ИЛ-4. Более гидрофобные арилтиогликозиды мурамоилдипептида значительно превышают по активности свои фенольные аналоги. И в этом случае для гликозида **2l** с максимальной гидрофобностью наблюдается резкое снижение эффекта.

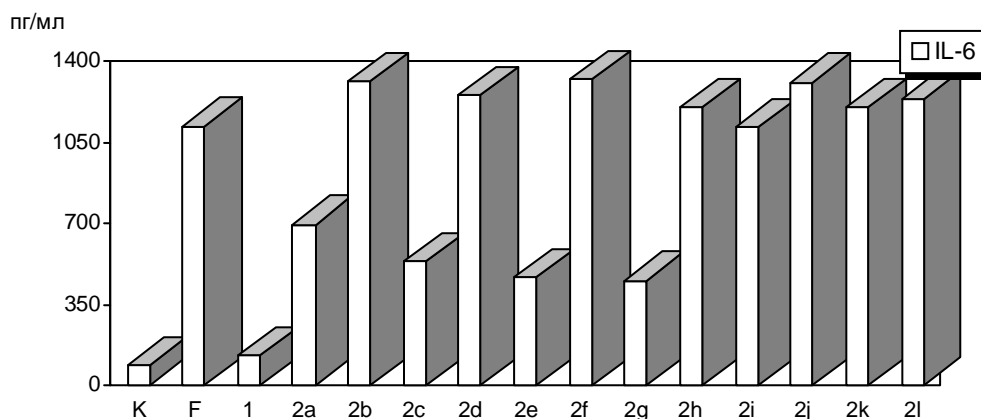


Рис. 4. Влияние гликозидов MDP **2a-i** на продукцию ИЛ-6 МНК; К – спонтанная продукция, F – продукция, индуцированная фитогемагглютинином.

При изучении влияния мурамоилпептидов на продукцию провоспалительного цитокина ИЛ-6 установлено стимулирующее действие для всех изучаемых соединений (см. Рис. 4). Причем большая часть гликозидов MDP превышала по активности фитогемагглютинин. В этом тесте не выявлено однозначных корреляций между липофильностью гликопептидов и индукцией синтеза цитокина. Например, все *O*- и *S*-арилгликозиды мурамоилдипептида **2h-l** со значительными различиями в гидрофобности проявили практически близкий стимулирующий эффект. Также следует отметить, что ряд соединений, например,  $\beta$ -(нонадекан-10-ил)-MDP **2f** и  $\beta$ -*l*-толилтио-MDP **2k**, являются сильными индукторами продукции как ИЛ-4, так и ИЛ-6, обычно действующих в иммунных процессах антагонистически.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При исследовании прямого действия группы  $\beta$ -гликозидов на МНК не выявлено индукции продукции  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферонов.
2. Установлено высокое стимулирующее действие  $\beta$ -тетрадецил-MDP и  $\beta$ -(пентадекан-8-ил)-MDP на секрецию TNF,  $\beta$ -фенилтио-MDP – на продукцию  $\beta$ -ИЛ-1,  $\beta$ -(нонадекан-10-ил)-MDP – на синтез ИЛ-4.
3. Выявлена высокая индуцирующая активность продукции ИЛ-6 для всей группы изученных  $\beta$ -гликозидов мурамоилдипептида.

Список литературы

1. Adam A. Synthetic adjuvants / A. Adam. –N.-Y. : John Wiley & Sons, 1985. – 239 p.
2. Baschang G. Muramylpeptides and lipopeptides: studies towards immunostimulants / G. Baschang // Tetrahedron. – 1989. – Vol. 45, № 20. – P. 6331–6360.
3. Земляков А. Е. Гликозиды *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина. Синтез и исследование влияния конфигурации гликозидной связи и природы агликона на биологическую активность / А. Е. Земляков, В. В. Цикалов, О. В. Калюжин [и др.] // Биоорган. химия. – 2003. – Т. 29, № 3. – С. 316–322.
4. Калюжин О. В. Действие гликозидов мурамоилдипептида на пролиферацию лимфоцитов и выработку ими интерлейкина-2 / О. В. Калюжин, А. Е. Земляков, Е. В. Калюжина [и др.] // Бюл. exper. биол. – 2002. – Т. 134, № 8. – С. 186–190.
5. Жолобак Н. М. Интерферонстимулирующая активность гликозидов мурамоилдипептида / Н. М. Жолобак, Н. Я. Спивак, А. Е. Земляков [и др.] // Мікробіол. журн. – 2007. – Т. 69, № 4. – С. 33–39.
6. Земляков А. Е.  $\beta$ -Диалкилметилгликозиды *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина: синтез, протективное антиинфекционное и цитотоксическое действие / А. Е. Земляков, В. Н. Цикалова, В. В. Цикалов [и др.] // Биоорган. химия. – 2008. – Т. 34, № 1. – С. 114–120.
7. Земляков А. Е. Синтез и биологическая активность *S*- $\beta$ -арилгликозидов 1-тио-*N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина / А. Е. Земляков, В. Н. Цикалова, Л. Р. Азизова [и др.] // Биоорган. химия. – 2008. – Т. 34, № 2. – С. 245–251.
8. Земляков А. Е. Иммуномодулирующие свойства гликозидов мурамоилдипептида с алифатическими агликонами  $C_{10}$ - $C_{14}$  / А. Е. Земляков, В. Н. Цикалова // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Биология, химия. – 2013. – Т. 26 (65), № 2. – С. 216–221.
9. Земляков А. Е. Синтез и протективное антиинфекционное действие аномеров липофильных гликозидов *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина / А. Е. Земляков, В. Н. Цикалова, В. В. Цикалов [и др.] // Биоорган. химия. – 2006. – Т. 32, № 4. – С. 424–431.
10. Земляков А. Е. Синтез и биологическое действие липофильных  $\beta$ -алкилгликозидов мурамоилдипептида / А. Е. Земляков, В. Н. Цикалова, В. В. Цикалов [и др.] // Журн. орг. фарм. хімії. – 2005. – Т. 3, вып. 3(11). – С. 52–57.
11. Земляков А. Е. Синтез  $\beta$ -*n*-алкилфенилгликозидов *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина / А. Е. Земляков, В. Н. Цикалова, В. В. Цикалов, В. Я. Чирва // Журн. орг. фарм. хімії. – 2004. – Т. 2. – вып. 3(7). – С. 17–20.

**INFLUENCE OF THE MURAMYL DIPEPTIDE GLYCOSIDES ON THE CYTOKINES PRODUCTION OF BLOOD MONONUCLEAR CELLS**

*Zemlyakov A. E., Tsikalov V. V., Tsikalova V. N.*

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea  
E-mail: alex\_z56@mail.ru*

Stimulation of production of a number of important cytokines of blood mononuclear cells (MNCs) in direct action of muramyl dipeptide  $\beta$ -glycosides was studied. Interferonegenical activity for the studied glycopeptides was not revealed. The compounds leaders:  $\beta$ -tetradecyl-MDP and  $\beta$ -(pentadecane-8-yl)-MDP in test of induction production of tumor necrosis factor were found. Maximum stimulation of production of interleukin- $1\beta$  from alkylglycosides of muramyl dipeptide were registered for  $\beta$ -dodecyl-MDP and  $\beta$ -(pentadecane-8-yl)-MDP. For glycopeptides from group of *O*- and *S*-arylglycosides of muramyl dipeptide more inducing effect was inherent less hydrophobic compounds. The

maximum induction effect showed  $\beta$ -phenylthio-MDP.

When testing the induction of synthesis of interleukin-4 was established, that the larger stimulating effect had glycopeptides glycosides with a sufficiently high hydrophobicity. The maximum effect was observed for  $\beta$ -(nonadecane-10-yl)-MDP. More hydrophobic arylglycosides of muramyl dipeptide significantly exceed the activity their phenolic analogues.

The induction of synthesis of interleukin-6 all glycosides of muramyl dipeptide was installed. In this test revealed no definite correlations between lipophilicity of glycopeptides and stimulation of cytokine synthesis.

**Keywords:** muramyl dipeptides, glycosides of muramyl dipeptide, cytokines, interferon, tumor necrosis factor, interleukin.

#### Reference

1. Adam A., *Synthetic adjuvants*, 239 p. (John Wiley & Sons, 1985)
2. Baschang G., Muramylpeptides and lipopeptides: studies towards immunostimulants, *Tetrahedron*, **45**, 6331 (1989).
3. Zemlyakov A. E., Tsikalov V. V., Kalyuzhin O. V., Kur'yanov V. O., and Chirva V. Ya., N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine glycosides. effect of glycoside bond configuration and aglycone on biological activity, *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **29**, 286 (2003).
4. Kalyuzhin O. V., Zemlyakov A. E., Kalyuzhina E. V., Shkalev M. V., and Nelyubov M. V., Effects of muramyl dipeptide glycosides on lymphocyte proliferation and production of interleukin-2, *Bull Exp Biol Med.*, **134**, 161(2002)
5. Zholobak N. M., Spivak N. Ya., Zemlyakov A. E., Zykalov V. V., Chupahina T. A., Kurianov V. O., and Chirva V. Ya., Interferon-stimulating activity of muramoyl dipeptide glycosides, *Microbiol. Zh.*, **69**, 33 (2007).
6. Zemlyakov A. E., Tsikalova V. N., Tsikalov V. V., Chirva V. Ya., Mulik E. L., Kuzovlev F. N., Kalyuzhin O. V., and Kiselevsky M. V., Dialkylmethyl  $\beta$ -glycosides of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine: synthesis and protective antiinfection and cytotoxic activities, *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **34**, 103 (2008).
7. Zemlyakov A. E., Tsikalova V. N., Azizova L. R., Chirva V. Ya., Mulik E. L., Shkalev M. V., Kalyuzhin O. V., and Kiselevsky M. V., Synthesis and biological activity of aryl S- $\beta$ -glycosides of 1-thio-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **34**, 223 (2008).
8. Zemlyakov A. E., and Tsikalova V. N., The immunomodulatory properties of muramyl dipeptide glycosides with aliphatic aglycones C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>, *Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. Series: Biology, chemistry*, **26**, 216 (2013).
9. Zemlyakov A. E., Tsikalova V. N., Tsikalov V. V., Chirva V. Ya., Mulik E. L., and Kalyuzhin O. V., Synthesis and protective anti-infective action of anomeric lipophilic glycosides of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **32**, 382 (2006).
10. Zemlyakov A. E., Tsikalova V. N., Tsikalov V. V., Chirva V. Ya., Maligina V. Yu., Katsev A. M., and Krivorutchenko Yu., Synthesis and biological activity of lipophilic  $\beta$ -alkylglycosides of muramyl dipeptide, *Zh. Org. Farm. Khim.*, **3**, 52 (2005).
11. Zemlyakov A. E., Tsikalova V. N., Tsikalov V. V., and Chirva V. Ya., The synthesis of  $\beta$ -p-alkylphenylglycosides of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, *Zh. Org. Farm. Khim.*, **2**, 17 (2004).

Поступила в редакцию 27.11.2015 г.