

УДК 547.963.1

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ГЛИКОЗИДОВ МУРАМОИЛДИПЕПТИДА С АЛИФАТИЧЕСКИМИ АГЛИКОНАМИ C₁₀-C₁₄

Земляков А.Е., Цикалова В.Н.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: alex_z56@mail.ru

Изучена стимуляция β -алкилгликозидами мурамоилдипептида антиинфекционной резистентности мышей к заражению *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Исследовано прямое цитотоксическое действие этих гликопептидов на клетки эритробластного лейкоза человека К-562 и мононуклеарные клетки крови (МНК), а также их влияние на продукцию МНК естественных киллеров и пролиферативную активность.

Ключевые слова: мурамоилдипептиды; гликозиды мурамоилдипептида, антиинфекционная резистентность, цитотоксичность, пролиферация.

ВВЕДЕНИЕ

На иммуностимулирующую активность липофильных производных *N*-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (мурамоилдипептида, MDP) существенное влияние оказывает структура липофильной компоненты и реализующееся при этом определенное соотношение гидрофильно-липофильных свойств. β -Гликозиды MDP с линейными алифатическими агликонами C₄-C₈ [1, 2], обладающие амфифильными свойствами, показали высокую иммуностимулирующую активность в различных тестах *in vitro* и *in vivo*, превышающую действие самого мурамоилдипептида [2]. В частности, β -гептилгликозид MDP проявил себя как эффективный адъювант [3], стимулятор антиинфекционной резистентности [4] и препарат для иммунотерапии опухолей [5].

Другую группу составили более липофильные алкил-*O*-гликозиды мурамоилдипептида с агликонами C₁₀-C₁₈. Установлено, что β -децил-MDP обладает умеренным протективным эффектом в отношении зараженных гриппом мышей, β -децил- и β -додецил-MDP ингибируют бактериальную биолюминесценцию [6], а β -гексадецил-MDP [1] стимулирует продукцию ряда монокинов [7].

В данном сообщении приводятся результаты изучения иммуномодулирующей активности β -децил- (**2a**), β -додецил- (**2b**), β -тетрадецил- (**2c**) гликозидов мурамоилдипептида в ряде экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез гликозидов MDP **2a-c** описан в [6]. В качестве референс-контроля в ряде тестов использовали MDP (**1**). Спектры ¹H ЯМР получены на приборе Varian VXR-

300 (300 МГц), спектры COSY на спектрометре Varian Mercury 400, растворитель – ДМСО- d_6 , внутренний стандарт – Me_4Si . Приведены химические сдвиги (δ -шкала) и константы спин-спинового взаимодействия (J , Гц).

Тестирование протективной активности производных MDP, а также их влияния на ЕК-активность МНК и прямое цитотоксическое действие проводили по методикам, приведенных в [8, 9]. Результаты биологических исследований любезно предоставлены д.м.н., профессором О.В. Калюжиным (НИИ морфологии человека РАМН, Москва, РФ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура β -алкилгликозидов MDP **2a-c** была подтверждена данными 1H ЯМР-спектроскопии (см. Табл.). С целью более точного отнесения ряда сигналов, в т. ч. аномерного протона и амидных протонов, был поучен спектр COSY для γ -бензилового эфира производного **2b** (Рис. 1).

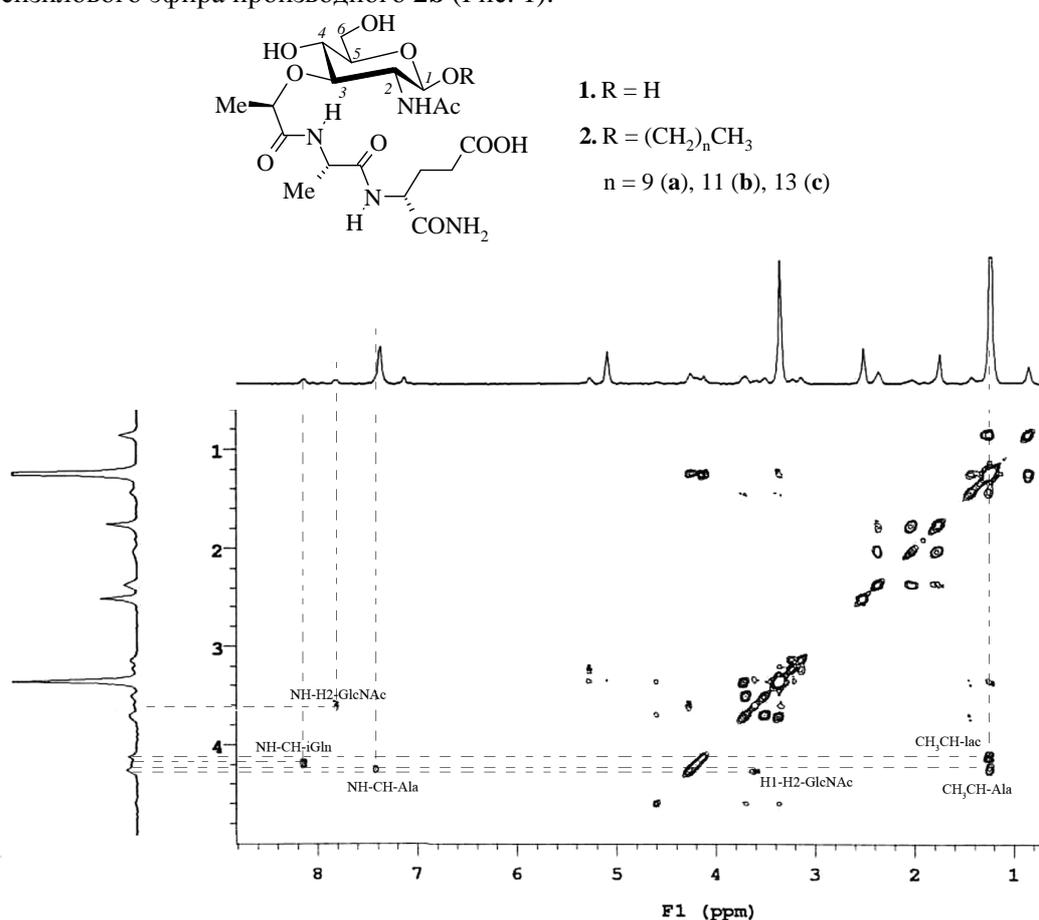


Рис. 1. Фрагмент спектра COSY β -додецилгликозида **2b**.

Первоначальное исследование способности гликозидов мурамоилдипептида **2a-c** в диапазоне доз 2 – 200 мкг/мышь стимулировать резистентность мышей к бактериальному поражению, проведенное на модели сепсиса, вызываемого внутрибрюшинным введением летальной дозы *Staphylococcus aureus*, не позволило выявить каких-либо закономерностей. Все соединения проявили 100% защитный эффект. Поэтому повторный эксперимент проводили с использованием доз 0,1, 2 и 40 мкг/мышь. Данные, приведенные на Рис. 2А, свидетельствуют о том, что наибольшее протективное действие оказывали β -децил- и β -додецилгликозиды MDP **2a,b** в дозе 40 мкг/мышь. Для этих соединений наблюдается четкий дозозависимый эффект.

Таблица

Характеристические сигналы ^1H ЯМР-спектров соединений **2a-c**

Группа или атом	Химические сдвиги, м.д. (КССВ, Гц)		
	2a	2b	2c
OR: CH_2CH_3	0,87т	0,85т	0,87т
(CH_2) _n	1,24м, 1,45м	1,24м, 1,43м	1,24м, 1,44м, 1,56м
Mur: Н1 ($J_{1,2}$)	4,25д (8,5)	4,26д (8,5)	4,25д (8,5)
NAc	1,76с	1,75с	1,76с
NH	7,73д	7,79д	7,76д
C4-OH	5,18уд	5,25уд	5,16уд
C6-OH	4,55ут	4,54ут	4,53ут
CH_3CHCO	1,24м	1,23м	1,23м
Ala: CH_3CH	1,24м	1,23м	1,23м
NH	7,38д	7,39д	7,41д
iGln: $\gamma\text{-CH}_2$	2,19т	2,19т	2,17т
$\beta\text{-CH}_2$	1,73м, 1,97м	1,73м, 1,97м	1,71м, 1,96м
CONH_2	6,99с, 7,26с	7,05с, 7,30с	6,98с, 7,25с
NH	8,04д	8,10д	8,13д

Изучение протективного эффекта гликозидов **2a-c** к заражению мышей *Escherichia coli* показало оппозитные результаты (см. Рис. 2Б). Наиболее активным был β -тетрадецил-MDP **2c** в дозе 1 мкг/мышь.

Для гликозидных производных **2a-c** также было изучено прямое действие на клетки эритробластного лейкоза человека К-562 и мононуклеарные клетки крови (МНК) (Рис. 3). Тетрадецилгликозид MDP **2c** продемонстрировал достоверное цитотоксическое действие на опухолевые клетки только в концентрации 200 мкг/мл. Два других гликозида мурамоилдипептида не влияли на жизнеспособность лейкозных клеток. Повышение цитотоксической активности гликозидов MDP с ростом липофильности ранее отмечалось для β -диалкилметилгликозидов мурамоилдипептида [9]. Все три исследуемых гликозида практически не влияли на МНК здоровых клеток.

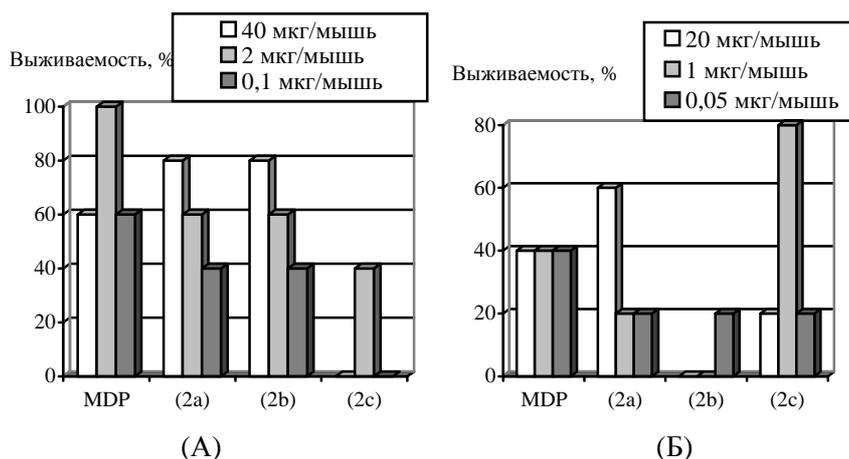


Рис. 2 Влияние гликозидов MDP **2a-c** на протективный эффект к заражению мышей культурой *S. aureus* (10^9 клеток/мышь) (А) и *E. coli* ($2 \cdot 10^7$ клеток/мышь) (Б).

При совместной инкубации клеток К-562, чувствительных к естественным киллерам (ЕК), и МНК, обработанных тестируемыми веществами, существенные цитотоксические эффекты отмечались только для концентраций 20 и 200 мкг/мл (Рис. 3). При этом для тетрадецилгликозида MDP **2c** характерна собственная высокая цитотоксичность. В тоже время эффекты β -децил- и β -додецилгликозидов MDP **2a,b** в основном связаны со способностью индуцировать ЕК-активность МНК.

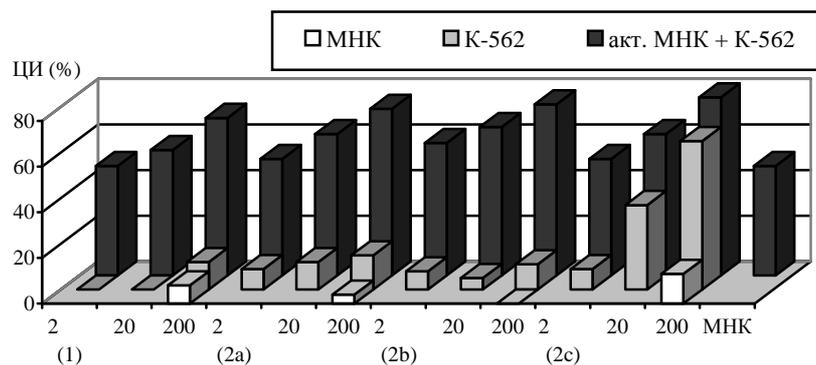


Рис. 3. Влияние гликозидов MDP **2a-c** на ЕК-активность МНК и прямое цитотоксическое действие на клетки К-562 и МНК; ЦИ – цитотоксический индекс.

Важность определенного гидрофильно-липофильного баланса для проявления биологической активности гликозидных производных мурамоилдипептида еще раз подчеркивают результаты изучения пролиферативной активности МНК (Рис. 4). Только β -додецилгликозид MDP **2b** достоверно стимулировал пролиферацию.

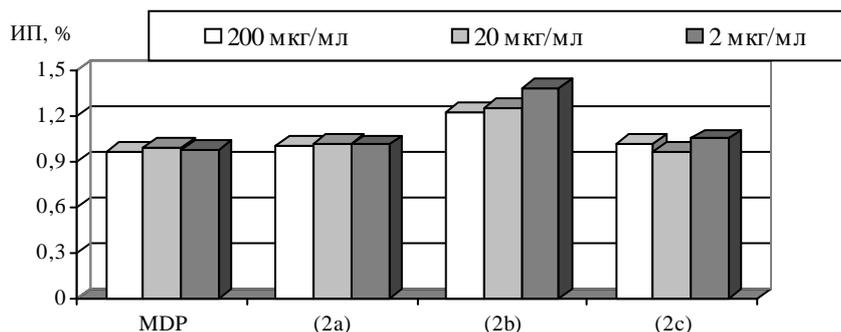


Рис. 4. Влияние гликозидов MDP 2а-с на пролиферативную активность МНК; ИП – индекс пролиферации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлен протективный эффект при заражении мышей культурой *S. aureus* для β -децил- и β -додецил-MDP в дозе 40 мкг/мышь и в случае *E. coli* – для β -тетрадецил-MDP в дозе 1 мкг/мышь.
2. Выявлено цитотоксическое действие β -тетрадецил-MDP на клетки эритробластного лейкоза человека К-562 и стимуляцию ЕК-активности МНК β -децил- и β -додецил-MDP.
3. Из исследуемой группы гликопептидов только β -додецил-MDP достоверно стимулировал пролиферативную активность МНК.

Список литературы

1. Земляков А.Е. Синтез гликозидных аналогов N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина / А.Е. Земляков, В.Я. Чирва // Химия природн. соедин. – 1987. – № 5. – С.714–718.
2. 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.
3. Калюжин О.В. Иммуномодулирующая активность β -гептилгликозид-мурамоилдипептида in vivo / О.В. Калюжин, Н.С. Захарова, М.В. Брицина [и др.] // Бюл. exper. биол. – 1999. – № 11. – С. 553–554.
4. Калюжин О.В. Стимуляция неспецифической резистентности мышей β -гептилгликозид-мурамоилдипептидом / О.В. Калюжин, В.В. Калюжин, А.Е. Земляков [и др.] // Бюл. exper. биол. – 1999. – № 5. – С. 543–545.
5. Калюжин О.В. Амфифильный дериват мурамилдипептида в терапии мышинной лимфомы EL-4 / О.В. Калюжин, М.В. Нелюбов, Ф.Н. Кузовлев [и др.] // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. – 2001. – № 1. – С. 45–46.
6. Земляков А.Е. Синтез и биологическое действие липофильных β -алкилгликозидов мурамоилдипептида / А.Е. Земляков, В.Н. Цикалова, В.В. Цикалов [и др.] // Журн. орг. фарм. химії. – 2005. – Т. 3, вип. 3(11). – С. 52–57.
7. Медведев А.Э. Изучение иммуномодуляторной активности новых производных мурамоилдипептида in vitro / А.Э. Медведев, Б.Б. Фукс, Н.В. Бовин [и др.] // Бюл. exper. биол. – 1992. – № 12. – С. 626–628.
8. 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.

9. Земляков А. Е. β-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.

References

1. Zemlyakov A. E. and Chirva V. Ya. *Chem. Nat. Comp.*, 595 (1987).
2. Zemlyakov A. E., Tsikalov V. V., Kalyuzhin O. V., Kur'yanov V. O., and Chirva V. Ya. *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **29**, 286 (2003).
3. Kalyuzhin O. V., Zaharova N. S., Britsina M. V., Zemlyakov A. E., and Kalyuzhin V. V. *Byull. Eksp. Biol.*, 553 (1999).
4. Kalyuzhin O. V., Kalyuzhin V. V., Zemlyakov A. E., Elkina S. I., Shkalev M. V., and Sergeev V. V. *Byull. Eksp. Biol.*, 543 (1999).
5. Kalyuzhin O. V., Nelyubov M. V., Kuzovlev F. N., Kalyuzhina M. I., Zemlyakov A. E., Shkalev M. V., Mulik E. L., and Karaulov A. V. *Vopr. Biol. Med. Farm. Khim.*, 45 (2001).
6. Zemlyakov A. E., Tsikalova V. N., Tsikalov V. V., Chirva V. Ya., Maligina V. Yu., Katsev A. M., and Krivorutchenko Yu. *Zh. Org. Farm. Khim.*, **3**, 52 (2005).
7. Medvedev A. E., Fucks B. B., Bovin N. V., and Zemlyakov A. E. *Byull. Eksp. Biol.*, 626 (1992).
8. Zemlyakov A. E., Tsikalova V. N., Tsikalov V. V., Chirva V. Ya., Mulik E. L., and Kalyuzhin O. V. *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **32**, 382 (2006).
9. 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. *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **34**, 103 (2008).

Земляков О.С. Імуномодуючи властивості глікозидів мурамоїлдипептиду з аліфатичними агліконами C₁₀-C₁₄ / О.С. Земляков, В.М. Цикалова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 2. – С. 216-221.

Вивчено стимуляція β-алкілглікозидами мурамоїлдипептиду антиінфекційної резистентності мишей до зараження *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli*. Досліджено пряма цитотоксична дія цих глікопептидів на клітини еритробластного лейкозу людини К-562 і мононуклеарні клітини крові (МНК), а також їх вплив на продукцію МНК природних кілерів і проліферативну активність

Ключові слова: мурамоїлдипептиди; глікозиди мурамоїлдипептиду, антиінфекційна резистентність, цитотоксичність, проліферація.

Zemlyakov A.E. The immunomodulatory properties of muramyl dipeptide glycosides with aliphatic aglycones C₁₀-C₁₄ / A.E. Zemlyakov, V.N. Tsikalova // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 2. – P. 216-221.

Immunomodulatory activity of β-decyl-, β-dodecyl- and β-tetradecylglycosides of muramyl dipeptide in a series of experiments *in vitro* and *in vivo* was studied. The structure of glycopeptides were confirmed by ¹H NMR spectroscopy and COSY experiments.

The ability of muramyl dipeptide glycosides stimulate antibacterial resistance of mice by intraperitoneal introduction of lethal dose of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was investigated. The maximum protective action provided β-decyl- and β-dodecylglycosides MDP in the dose of 40 μg/mouse (*S. aureus*) and β-tetradecyl- MDP in a dose of 1 μg/mouse (*E. coli*).

Direct action of glycoside derivatives were studied on the human erythroleukemia cells and blood mononuclear cells (BMC). Significant cytotoxic effect on tumor cells was showed β-tetradecyl-MDP at a concentration of 200 g/ml only.

Joint incubation of cells K-562, which are sensitive to natural killer (NK), and activated BMC were revealed the ability of the β-decyl- and β-dodecylglycosides MDP induce the spontaneous NK activity in BMC population.

From the study group glycopeptides reliably stimulated the proliferative activity of BMC β-dodecyl-MDP only.

Keywords: muramyl dipeptides, glycosides of muramyl dipeptide, anti-infections resistance, cytotoxicity, proliferation.

Поступила в редакцію 16.05.2013 г.