

УДК 577.175.82.05+57.083.3

Костномозговые иммунорегуляторы миелопептиды

Р. В. Петров, А. А. Михайлова, Л. А. Фонина

РЭМ ВИКТОРОВИЧ ПЕТРОВ — академик РАН, профессор, заведующий отделом иммунологии Института биохимической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН). Область научных интересов: иммунология, иммуногенетика, аллергология.

АВГУСТА АЛЕКСЕЕВНА МИХАЙЛОВА — доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией ИБХ РАН. Область научных интересов: иммунорегуляция, биологическая активность и механизм действия эндогенных иммунорегуляторов.

ЛАРИСА АЛЕКСЕЕВНА ФОНИНА — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ИБХ РАН. Область научных интересов: биологически активные пептиды, структура, синтез, взаимосвязь между структурой и функцией.

117871 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН, тел./факс (095) 330-72-10, E-mail stas@ibch.ru

Введение

Сложная и высоко рациональная система биорегуляции включает в себя множество регуляторных молекул, среди которых белки и пептиды занимают ведущее место в реализации межклеточных и межсистемных связей. Безусловно доказана тесная взаимосвязь между нейроэндокринной и иммунной системами, которая осуществляется также с помощью пептидных медиаторов. Многие эндогенные регуляторные соединения, такие как цитокины, некоторые гормоны, ферменты имеют полипептидную или белковую природу. Особое положение среди пептидных регуляторов занимают пептиды центральных органов иммунитета — тимуса и костного мозга. Эти два органа ответственны за развитие и нормальное функционирование Т- и В-систем иммунитета, контролируя созревание, дифференцировку, миграцию лимфоцитов, что опосредуется множеством молекул пептидной природы. Тимусные пептиды или гормоны тимуса, как их иногда называют, были обнаружены американскими учеными в середине 1960-х гг. [1]. Их структура и функция хорошо изучены, синтезированы активные фрагменты их молекул и аналоги, на основе которых разработан целый ряд иммуностропных препаратов, используемых в клинике [2, 3]. Иммунорегуляторные пептиды второго центрального органа иммунитета, костного мозга, выявлены российскими исследователями в начале 1970-х гг. Было установлено, что клетки костного мозга различных видов животных и человека продуцируют гуморальный(е) фактор(ы), стимулирующий(е) антителообразование на пике иммунного ответа [4–7]. Исследование биологической активности фракции, выделенной из надосадочной жидкости культуры клеток костного мозга мышей, показало наличие в ней соединений пептидной природы, проявляющих различные регуляторные эффекты: иммунокорректирующий, дифференцировочный, эндорфиноподобный [8–10]. Регуляторные пептиды костномозгового происхождения получили название миелопептидов (МП) [11].

МП не имеют видовой специфичности: фракция, выделенная из надосадочной жидкости культуры клеток костного мозга мышей, проявляла свою активность на клетках других видов животных и наоборот. На основе активной фракции, выделенной из надосадочной жидкости культуры клеток костного мозга свиней, был разработан иммуномодулятор Миелопид, эффективно используемый в клинической практике для лечения многих заболеваний, сопровождаемых вторичными иммунодефицитными состояниями [12].

В середине 1990-х гг. из супернатанта культуры клеток костного мозга свиней были выделены, идентифицированы и синтезированы индивидуальные пептиды, что открыло принципиально новые возможности в изучении биологических свойств и механизма действия МП и выявления их роли в системе биорегуляции.

В настоящем обзоре представлены данные, характеризующие биологические свойства МП и проанализированы особенности их иммунорегуляторного действия, указывающие на участие этих пептидных биорегуляторов в сложной системе сохранения иммунного гомеостаза.

Выделение, идентификация и синтез миелопептидов

Выделение новых биологически активных соединений пептидной природы связано с целым рядом проблем и является достаточно редким событием. Крайне низкие концентрации, в которых эти соединения вырабатываются в организме, требуют переработки большого объема исходного материала для получения эндогенных пептидов в количествах, необходимых для их структурного изучения. Другая проблема, осложняющая идентификацию новых пептидных медиаторов, заключается в неизбежном образовании большого количества побочных продуктов белкового происхождения при гомогенизации ткани, что не позволяет однозначно определить, являются ли выделенные вещества истинными эндогенными медиаторами, или это продукты неспецифической деградации

белков. Следует также отметить, что эндогенные пептидные биорегуляторы представляют собой довольно лабильные соединения, которые могут подвергаться деградации в процессе их выделения.

При получении индивидуальных эндогенных пептидов используются, в основном, два альтернативных подхода: «от структуры к функции» или «от функции к структуре». Первый заключается в тотальном выделении и секвенировании всех имеющихся в гомогенате пептидов и последующем их биологическом тестировании. Второй подход предусматривает избирательное выделение только биологически активных соединений на основе их биологического тестирования и затем определение их структуры.

К недостаткам тотального выделения следует отнести необходимость секвенирования всех выделенных пептидов, многие из которых являются продуктами неспецифического расщепления белков. Достоинство данного подхода заключается в том, что он позволяет не пропустить биологически активные пептиды, которые могут быть утеряны при втором подходе из-за сложности тестирования большого количества соединений с использованием широкого набора биологических тест-систем, среди которых могут быть неадекватные тест-системы. Характерным примером тотального выделения и секвенирования пептидов может служить выделение пептидов из фракции 5 тимозина [13].

Альтернативный подход основан на выявлении в разделяемой смеси только биологически активных пептидов. Такой подход целесообразно использовать при разделении хорошо охарактеризованных с биологической точки зрения смесей, содержащих искомые пептиды, и при наличии адекватных тест-систем, позволяющих выявлять пептиды с определенной биологической активностью. Примерами такого направленного выделения биологически активных пептидов являются тафцин [14] и тимический сывороточный фактор [15].

Поскольку функциональная активность медиаторов, входящих в супернатант культуры клеток костного мозга, ранее была детально изучена в отработанных скрининговых тест-системах *in vitro* и *in vivo* [12], именно подход «от функции к структуре» был использован нами при выделении МП.

В качестве исходного материала для выделения МП был выбран супернатант 24-х часовой культуры клеток костного мозга свиньи. Это позволило нам выделить вещества, которые живые клетки вырабатывают в процессе естественного метаболизма, и избежать наличия в супернатанте продуктов неспецифического протеолиза белков, образующихся в больших количествах при гомогенизации ткани. Оценка содержания пептидов в активных фракциях, полученных из различных партий супернатанта (5 партий по 25 л каждая), показала, что количество отдельных МП в супернатанте меняется от партии к партии в достаточно широких пределах (от 10 до 50 пмоль). Для получения необходимых для секвенирования количеств индивидуальных МП нами был наработан большой объем супернатанта (500 л).

Клетки культивировали в многокомпонентной безсывороточной среде 199, содержащей неорганические соли (~10 г/л), аминокислоты (~1,3 г/л), углево-

ды, нуклеиновые основания, витамины и др. Данная среда обеспечивала для клеток костного мозга условия, максимально приближенные к физиологическим. С целью упрощения контроля за выделением МП клетки культивировали в среде 199, не содержащей краситель феноловый красный.

Наличие в супернатанте большого количества соединений различной химической природы, содержание которых на порядки превышало содержание продуцируемых клетками медиаторов (1 л супернатанта содержит ~14 г компонентов среды и пикомоли пептидов), существенно затрудняло выделение индивидуальных МП. Обычно используемые на первых стадиях выделения эндогенных пептидов методы (экстракция, гель-хроматография, ультрафильтрация и др.) в данном случае оказались неэффективными. Поэтому стоящая перед нами задача выделения индивидуальных МП требовала разработки новых методических подходов, позволяющих выделять ничтожно малые количества пептидов из большого объема супернатанта с минимальными потерями.

Нами была разработана новая схема выделения пептидов из супернатанта культуры клеток костного мозга, в основу которой был положен принцип твердофазной экстракции [16]. В соответствии с этой схемой супернатант непосредственно после культивирования клеток пропускать через колонку с сорбентом, представляющим собой макропористое стекло, модифицированное перфторэтиленом (фторосорб). Серия модельных экспериментов позволила определить оптимальное соотношение полимер—супернатант и подобрать условия для раздельной элюции смеси МП и компонентов среды. С помощью ОФ ВЭЖХ было установлено, что промывание фторосорба 0,1% трифторуксусной кислотой позволяет практически полностью отделить компоненты среды 199, а дальнейшая элюция 80%-ным раствором ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте приводит к получению смеси биологически активных МП. Данные хроматографического анализа компонентов среды 199 и полученной смеси МП показали, что выделенная таким образом смесь МП практически не содержит компонентов культуральной среды. Содержащиеся в супернатанте белки, липиды и другие жирорастворимые соединения, прочно сорбированные на фторосорбе, удалялись с колонки лишь при регенерации сорбента.

Таким образом, разработанная нами схема выделения МП существенно упростила процесс и сократила время выделения пептидов. Предложенная схема позволила всего за одну стадию сконцентрировать супернатант, отделить компоненты среды и получить биологически активный материал, который по данным аналитической ОФ ВЭЖХ был пригоден для дальнейшего разделения на колонках с обращенной фазой. Согласно результатам биологического тестирования, полученная таким образом смесь сохраняла все типы биологической активности, выявленные ранее для супернатанта культуры клеток костного мозга.

Следующим этапом выделения индивидуальных соединений было фракционирование полученной смеси МП на полупрепаративной колонке (10×250 мм) Ультрасфера С18 в линейном градиенте ацетонитрила (0-100%) в 0,1%-ной трифторуксусной кислоте; отбирали как отдельные пики, так и группы пиков. Все

отобранные фракции тестировали на наличие в них выявленных ранее активностей. Фракции, проявляющие биологическую активность и содержащие по данным N-концевого аминокислотного анализа не менее 200 пмоль пептидов, подвергали дальнейшему разделению. Выделение пептидов из этих фракций и их очистку проводили методом ОФ ВЭЖХ с использованием аналитических колонок.

Строение выделенных и очищенных биологически активных веществ далее анализировали при помощи газо-фазного секвенатора. В результате проведенной работы из супернатанта культуры клеток костного мозга было выделено шесть новых биологически активных пептидов [16]:

Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr	МП-1
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp	МП-2
Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln	МП-3
Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro	МП-4
Val-Val-Tyr-Pro-Asp	МП-5
Val-Asp-Pro-Pro	МП-6

Выделенные нами из супернатанта кратковременной культуры клеток костного мозга свиньи пептиды — продукты естественного метаболизма клеток. При их выделении не применялись деструктурирующие методы, и идентифицированные нами пептиды постоянно присутствовали в различных партиях супернатанта.

Поиск гомологий по банку данных известных белковых последовательностей (версия 410, 1994 г.) показал, что аминокислотные последовательности пептидов МП-1 и МП-2 гомологичны консервативным фрагментам альфа- и бета-цепи гемоглобина {(33—38) и (31—36) соответственно}, а пептиды МП-3—МП-6 не имеют гомологичных последовательностей в банке данных, и, по-видимому, являются фрагментами неизвестных ранее белков-предшественников. Следует отметить, что пептиды МП-1 и МП-2 не ограничены парами основных аминокислот в белковой цепи гемоглобина и, следовательно, не могут быть продуктами обычного процессинга, как, например, нейропептиды. Можно предположить, что данные пептиды являются либо продуктами протеолиза неизвестного ранее белка-предшественника, либо продуктами специфического расщепления гемоглобина. О возможной роли гемоглобина как белка-предшественника для целого ряда биологически активных пептидов, выделенных из гомогенатов костного и головного мозга различных животных, свидетельствуют и данные работ В.Т. Иванова и соавторов [17].

Для подтверждения структуры и детального изучения свойств выделенных пептидов был проведен их химический синтез. Аминокислотный анализ гидролизатов (6 н. HCl, 48 ч) синтетических пептидов и их секвенирование показало полную идентичность синтетических и выделенных пептидов. Методом масс-спектрографии с ионизацией быстрыми атомами было установлено, что молекулярные массы синтетических пептидов соответствуют их аминокислотным составам. По своим физико-химическим характеристикам и биологической активности все синтезированные пептиды были идентичны природным.

Выделение и идентификация неизвестных ранее биологически активных пептидов костномозговой природы открыли новые перспективы в изучении проблемы МП: стали возможны работы по структурно-функциональному изучению МП и их аналогов, исследование молекулярных механизмов их биологического действия, а также создание на их основе новых лекарственных препаратов.

Биологическая активность миелопептидов

Исследование биологической активности МП показало, что в основе их биологических эффектов лежит иммунорегуляторное действие, которое определяет конечный биологический эффект каждого из этих пептидов. МП-1 восстанавливает сдвинутый под влиянием неблагоприятных условий регуляторный индекс (баланс CD4 / CD8 клеток), повышая тем самым иммунный ответ в организме, подавленный воздействием радиации, цитостатиков, стрессом и др. [18, 19]. МП-2 обладает способностью восстанавливать функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную продуктами опухоли, что обуславливает значительное подавление ее роста при введении пептида в организм опухоленосителя [20—22]. На рис. 1 представлено торможение роста меланомы В-16 у мышей при двукратном введении МП-2 в дозе 1 мг/кг. Торможение роста опухоли под влиянием МП-2 было получено также у мышей с аденокарциномой молочной железы Ca-755, саркомой S-180, аденокарциномой легкого Lewis, лимфолейкозом Р-388 [23]. Столь широкий спектр опухолей, чувствительных к действию МП-2, объясняется тем, что, не оказывая прямого действия на опухолевую клетку, пептид восстанавливает подавленную в организме опухоленосителя иммунную систему, обеспечивая тем самым ее подключение к борьбе с развивающейся опухолью. Ключевое значение корректирующего действия МП-2 на Т-лимфоциты в противоопухолевом эффекте данного пептида доказано экспериментально. Пептид МП-2 не влияет на рост меланомы В-16, развивающейся в ор-

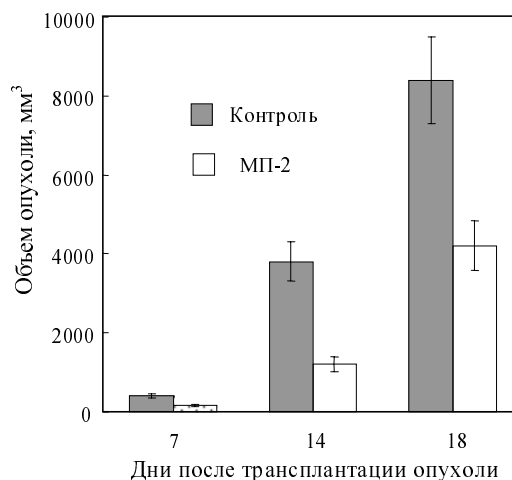


Рис. 1. Влияние МП-2 на рост трансплантируемой мышам меланомы В-16

ганизме бестимусных мышей nude, у которых отсутствует Т-система иммунитета [12]. Установлено также, что добавление супернатанта лейкозной клеточной линии HL-60 к Т-лимфоцитам периферической крови человека нарушает фенотип CD3⁺- и CD4⁺-клеток, не изменяя при этом CD8⁺-клетки. Добавление МП-2 к этой культуре полностью восстанавливает фенотипические сдвиги, возникшие под влиянием продуктов опухолевых клеток [21, 22]. И, наконец, в прямых экспериментах с использованием методов иммуноферментного анализа и цитофлуориметрии показано, что продукты опухолевых клеток подавляют синтез в Т-лимфоцитах эндогенного ИЛ-2, необходимого для нормальной пролиферации цитотоксических Т-клеток, основных опухолевых киллеров. Параллельно с продукцией ИЛ-2 ингибируется и экспрессия рецептора к этому цитокину. МП-2 восстанавливает эти процессы, подавленные в организме опухоленосителя, что, очевидно, и является ключевым звеном в противоопухолевом эффекте этого МП [24].

Иммунорегуляторное действие МП-3 направлено на макрофагальное звено иммунитета. Данный пептид стимулирует фагоцитоз макрофагов, усиливает экспрессию Ia-антигенов на поверхности этих клеток, увеличивает антиген-представляющую активность и цитотоксический эффект макрофагов [25, 26]. Макрофаги — первое звено защиты организма от инфекционных агентов, поэтому стимулирующее влияние МП-3 на основные функции этих клеток приводит к выраженному протективному эффекту МП-3 при бактериальном заражении животных. На рис. 2 показано влияние МП-3 на выживаемость мышей, зараженных патогенным штаммом *Salmonella typhimurium*. Можно видеть, что введение пептида МП-3 мышам за 24 часа до их заражения различными дозами *Salmonella typhimurium* сопровождается значительным увеличением выживаемости животных. При высоких дозах патогена (10⁴—10⁵ кл/мышь), вызывающих 100%-ную гибель в контроле, введение МП-3 обеспечивает 70—

90%-ную выживаемость животных. При меньших инфекционных дозах (10²—10³ кл/мышь), при которых в контроле гибнет 30—70% животных, введение МП-3 обеспечивает 100%-ную выживаемость [27]. Противобактериальный эффект МП-3 проявляется также и в скорости выведения патогена из внутренних органов зараженных животных. Так, при заражении мышей *Pseudomonas aeruginosa* патогенные организмы определялись во внутренних органах вплоть до 5-х суток, в то время как в органах животных, которым вводился МП-3 через 24 часа после заражения, патоген полностью отсутствовал уже на 2-е сутки [27].

В состав гексапептида МП-3 входит остаток цистеина со свободной SH-группой, что крайне редко встречается в эндогенных биорегуляторных пептидах [28, 29]. SH-группа играет, как правило, решающую роль в проявлении функциональной активности содержащих ее молекул. Для выявления влияния SH-группы на проявление специфической активности пептида МП-3 были синтезированы два аналога, в которых остаток цистеина в третьем положении был замещен на остаток валина (I) или остаток серина (II), а также димерный аналог МП-3 (III):

Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln	МП-3
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Gln	I
Leu-Val-Ser-Tyr-Pro-Gln	II
Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln	III
Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln	

Оценка влияния исходного пептида МП-3 и трех его аналогов, не содержащих SH-группу, на фагоцитоз эритроцитов барана перитонеальными макрофагами мыши показала, что только исходный МП-3 проявляет стимулирующий эффект [30]. Таким образом, наличие в структуре МП-3 остатка цистеина со свободной SH-группой играет существенную роль в проявлении функциональной активности данного пептидного регулятора.

Крайне интересные биологические свойства проявляют пептиды МП-4 и МП-6. Значительно различаясь по своей химической структуре, оба пептида проявляют способность индуцировать терминальную дифференцировку лейкозных blastов, что показано на миелоидных клеточных линиях HL-60 (миелобластный лейкоз человека) и К-562 (эритробластный лейкоз человека), а также на клетках костного мозга больных острым миелобластным лейкозом [31, 32]. Дифференцировочная активность МП-4 и МП-6 регистрировалась по изменению различных клеточных параметров: метаболических сдвигов, характерных для начальных этапов клеточной дифференцировки (снижение синтеза ДНК при одновременном усилении синтеза белка), морфологии клеток (появление зрелых форм), экспрессии дифференцировочных антигенов на клеточной поверхности, проявлению функциональной активности, характерной только для зрелой клетки.

Таким образом, выделенные и охарактеризованные нами МП обладают выраженными регуляторными свойствами, проявление которых приводит к весьма значимым конечным эффектам, таким как противоопухолевый, противобактериальный, противовирусный, противолейкозный.

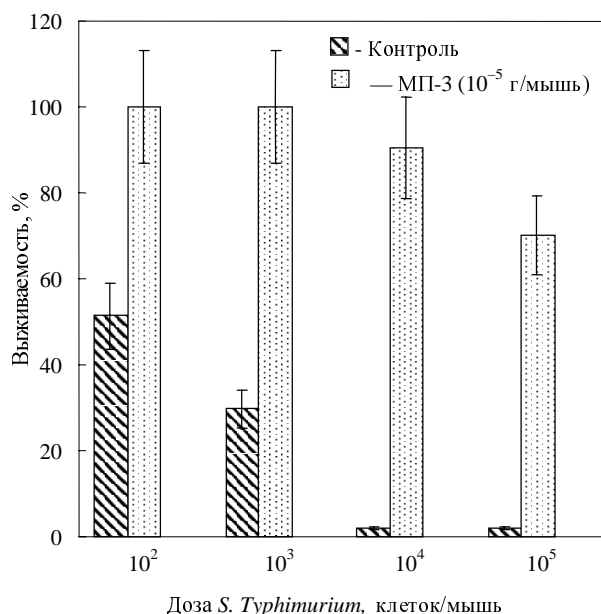


Рис. 2. Протективный эффект МП-3 при заражении мышей патогенным штаммом *S. typhimurium*

Особенности проявления биологической активности миелопептидов

Изучение особенностей проявления биологической активности выделенных МП показало, что эти эндогенные регуляторы направленно действуют на поврежденные звенья иммунитета или кроветворения, реализуя свои корригирующие эффекты по природным механизмам [33].

Как следует из представленного выше описания биологической активности различных МП, основной функцией этих эндогенных регуляторов является исправление сдвигов, происшедших по тем или иным причинам в определенных звеньях иммунной или кроветворной систем. Одной из особенностей их действия является способность проявлять выраженную биологическую активность только в случае каких-либо иммунологических нарушений и отсутствия таковой или очень слабое ее проявление при нормальном состоянии иммунитета и кроветворения. Данное положение неоднократно подтверждалось во множестве проведенных экспериментов. Так, МП-1 значительно повышает сниженный под влиянием циклофосамида или радиации уровень образования антител иммунизированных животных. В то же время данный пептид, введенный в том же режиме иммунизированным мышам, не получавшим вредного воздействия, не оказывает никакого влияния на число антителообразующих клеток в селезенке этих животных (рис. 3). Были проведены эксперименты и по влиянию МП-1 на пролиферативный ответ клеток селезенки к митогену Кон А у молодых и старых мышей. Установлено, что данный пептид достоверно усиливает Кон А-ответ только на клетках старых животных, у которых реакция на митоген в 4–5 раз снижена по сравнению с реакцией клеток молодых мышей [34].

Иммунорегуляторное и, как следствие, противоопухолевое действие МП-2 также проявляется при наличии значимой иммуносупрессии, возникающей в организме опухоленосителя под влиянием опухоли. Наибольшее торможение роста опухоли под влиянием МП-2 наблюдается при сравнительно больших ее

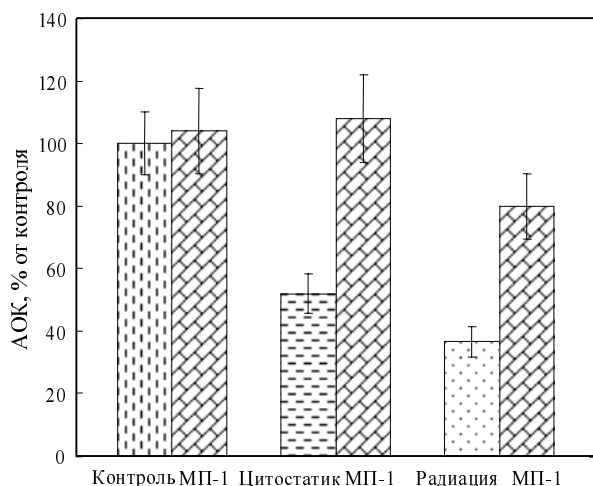


Рис. 3. Влияние МП-1 на количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенках иммунизированных мышей в норме и при воздействии повреждающих факторов

размерах, т.е. когда опухолевые клетки вызывают заметные повреждения в функциональной активности Т-лимфоцитов, и имеется достаточное количество точек приложения для действия МП-2 [12].

Ярким примером проявления регуляторных эффектов МП-3 при наличии сдвигов в иммунной системе являются эксперименты по оценке цитотоксического действия макрофагов *in vitro* при различных соотношениях эффектор—мишень [26]. В качестве клеточных мишеней в данных экспериментах использовалась мышьяная опухолевая клеточная линия L-929, эффекторами были перитонеальные макрофаги мыши. Из данных, представленных на рисунке 4, видно, что при оптимальном соотношении эффектор—мишень (20:1), которое обеспечивает высокую цитотоксичность (более 50%), добавление МП-3 не дало статистически значимого увеличения эффекта. В случае же сдвига этого соотношения в сторону уменьшения количества эффекторов (10:1 и 5:1), присутствие МП-3 в культуре приводило к статистически достоверному усилению цитотоксического действия макрофагов (рис. 4).

Чем же обусловлена столь выраженная направленность действия этих эндогенных регуляторных пептидов на поврежденные звенья иммунитета и отсутствие эффектов при нормальном состоянии иммунной системы или кроветворения? Очевидно, что в основе этого явления лежит главный принцип биорегуляции — лиганд-рецепторное взаимодействие.

Для выяснения возможности специфического связывания МП с клетками-мишенями использовалось мечение МП флуоресцентными или радиоактивной метками, цитофлуориметрия и конкурентное вытеснение метки немечеными пептидами. Работа проводилась на клеточных популяциях, на которых исходно была выявлена биологическая активность того или

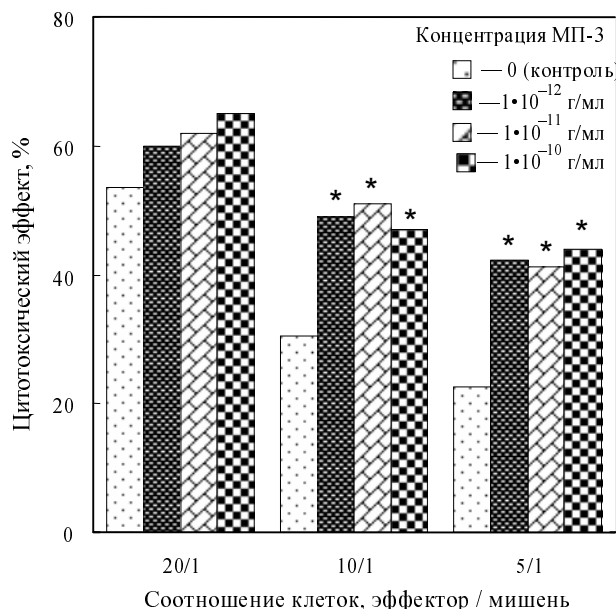


Рис. 4. Влияние МП-3 на цитотоксическую активность перитонеальных макрофагов мыши.

* Минимальная степень достоверности по критерию Стьюдента — $p < 0,05$

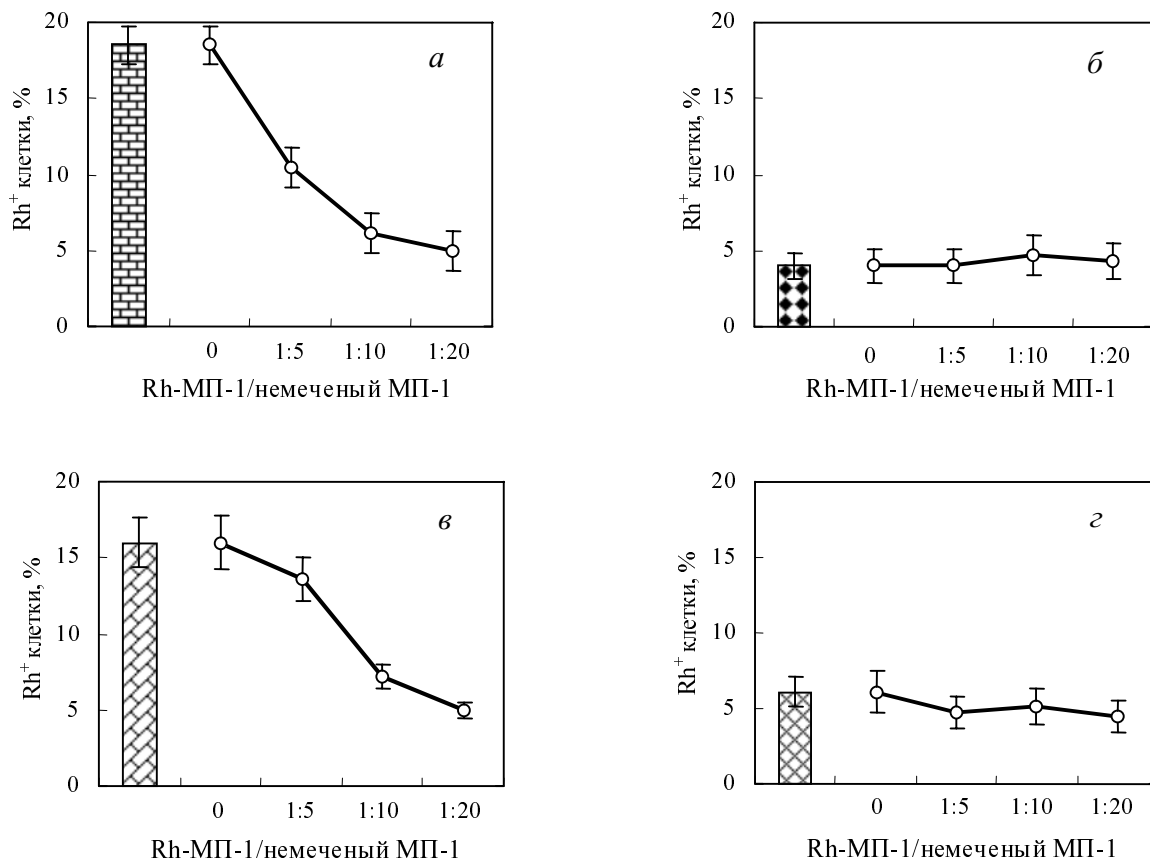


Рис. 5. Связывание родамин-меченого МП-1 с различными субпопуляциями клеток селезенки мыши.

Столбики — начальный процент родамин-положительных клеток; *а* — специфическое связывание МП-1 с Thy2⁺ клетками (Т-лимфоциты); *б* — неспецифическое связывание МП-1 с Ig⁺ клетками (В-лимфоциты); *в* — специфическое связывание МП-1 с L3T4⁺ клетками (CD4⁺ Т-лимфоциты); *г* — неспецифическое связывание МП-1 с Lyt2⁺ клетками (CD8⁺ Т-лимфоциты)

иноного пептида. Было установлено, что ФИТЦ-меченый МП-1 окрашивает 18% клеток в суспензии мышинных спленоцитов. Это соединение МП-1 с клетками было специфическим, поскольку метка дозозависимо вытеснялась избытком немеченого МП-1, но не вытеснялась немеченым МП-2, имеющим иную аминокислотную последовательность. Методом двойного флуоресцентного окрашивания (использовали родамин-меченый МП-1 и ФИТЦ-меченые моноклональные антитела к поверхностным маркерам Т- и В-клеток и Т-клеточным субпопуляциям, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам) была определена клетка-мишень для МП-1. Данные представлены на рисунке 5. Можно видеть, что специфическое связывание МП-1 происходит с Т-, но не В-лимфоцитами (дозозависимое вытеснение метки избытком немеченого МП-1) (рис. 5*а,б*), а среди Т-лимфоцитов МП-1 специфически связывается с CD4⁺-, но не с CD8⁺-клетками (рис. 5*в,г*). Таким образом, мишенью действия МП-1 является CD4⁺ Т-лимфоцит, т.е. Т-хелпер.

Специфическое связывание с клетками-мишенями было показано и для других МП. ФИТЦ-меченый МП-4 специфически связывается с клетками HL-60, метка вытесняется только избытком холодного МП-4 и не вытесняется МП с другой аминокислотной последовательностью [35].

Поскольку введение флуоресцентной метки в МП-2 приводило к потере его биологической активности, наличие специфического связывания данного пептида с Т-лимфоцитами периферической крови человека было доказано с помощью МП-2, меченого тритием. Установлено, что связывание ³H-МП-2 имеет дозозависимый характер с выходом на плато, добавление избытка холодного МП-2 приводит к вытеснению метки, в то время как добавление других немеченых МП не сопровождается вытеснением ³H-МП-2 из мест специфического связывания на Т-лимфоцитах [35]. Эксперименты по изучению специфического связывания других МП с их клетками-мишенями в настоящее время продолжают.

Наличие специфического связывания МП с определенными клетками-мишенями объясняет направленность их действия в «нужный» момент на «нужную» клетку. Не исключено, что сигналом для действия каждого из МП может быть дополнительная экспрессия его специфических рецепторов на соответствующей клетке-мишени. Было проанализировано связывание родамин-меченого МП-1 с CD4⁺ и CD8⁺ клетками селезенки, полученными от нормальных мышей и от мышей со сдвинутым с помощью Кона балансом CD4 / CD8 в сторону избытка CD8⁺ клеток [36]. Данные представлены на рисунке 6. Можно ви-

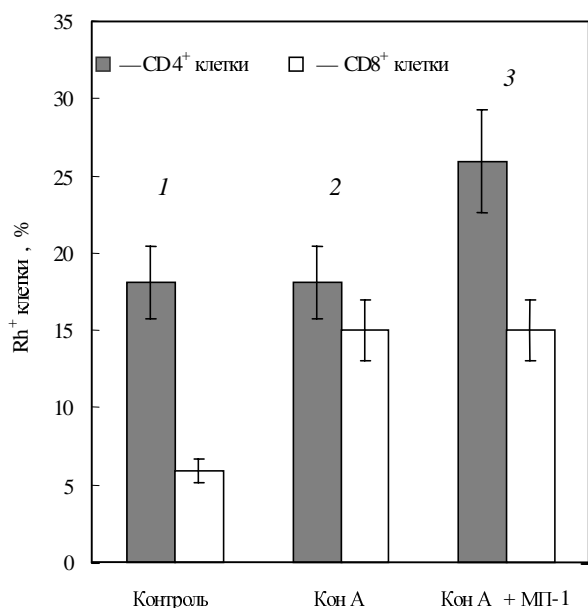


Рис. 6. Связывание родами-меченого МП-1 с CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами в суспензии клеток селезенки:

1 — для нормальных мышей; 2 — для мышей со сдвинутым балансом CD4⁺/CD8⁺ клеток в сторону избытка CD8⁺ клеток; 3 — после инкубации дефектной суспензии клеток с МП-1

доть, что 18% CD4⁺ клеток и 5% CD8⁺ клеток в суспензии спленоцитов в контроле связывает меченый МП-1. Связывание МП-1 с CD4⁺ клетками было специфическим, в отличие от неспецифического связывания данного пептида с CD8⁺ клетками (рис. 5*в,г*). В суспензии спленоцитов со сдвинутым балансом CD4/CD8 клеток специфическое связывание МП-1 с клетками мишенями (CD4⁺) не изменилось. Увеличение неспецифического связывания МП-1 с CD8⁺ клетками увеличилось, очевидно, за счет увеличения их абсолютного количества под влиянием КонА. После инкубации дефектной суспензии спленоцитов с МП-1 в течение 30 мин специфическое связывание CD4⁺ клеток с этим пептидом значительно возросло, при этом неспецифическое связывание с CD8⁺ клетками осталось тем же. Таким образом, сигналом для вступления соответствующего пептида в регуляторный процесс может быть экспрессия специфических МП-рецепторов на поверхности клеток-мишеней.

Прикладной аспект проблемы миелопептидов

Гормоны, цитокины, ферменты, являясь эндогенными регуляторами, часто становятся полезными, а порой и незаменимыми лекарственными средствами, используемыми для лечения различных заболеваний, связанных с недостатком или дефектом этих веществ в организме. Например, благодаря инсулину, который производится сейчас во многих странах генноинженерным способом, спасено множество людей, страдающих диабетом. Рекombинантные цитокины, такие как ИЛ-1, ИЛ-2, ИНФ(ы), КСФ(ы), эффективно используются для лечения онкологических заболеваний, а также болезней системы кроветворения. Применяются в клинике и гормоны тимуса. Разработка тимус-

ных препаратов прошла путь от создания нативных пептидных смесей, выделенных из тимуса животных: тимозин (фракция 5), тималин, тактивин, до синтеза структурно охарактеризованных пептидов и их аналогов: альфа-1-тимозин, тимопентин, тимоген, иммунофан и др.

Миелопептиды как эндогенные пептидные регуляторы, действие которых направлено на сохранение иммунного статуса организма, чрезвычайно перспективны для использования в клинической практике. Отсутствие барьера гистосовместимости при реализации их эффектов, низкая молекулярная масса, избирательное влияние на поврежденное звено иммунитета или кроветворения, природные механизмы действия — все эти свойства МП обеспечивают мягкую направленную коррекцию сдвигов в иммунной системе при их введении в организм без каких-либо побочных эффектов.

Как и препараты тимусного происхождения, лекарственные средства на основе МП прошли несколько стадий своей разработки. Препарат первого поколения, Миелопид, разработан еще в 80-е годы прошлого столетия, когда не была известна структура индивидуальных МП. Он представляет собой высокоочищенную смесь низкомолекулярных пептидов, выделенных из супернатанта культуры клеток костного мозга свиной методом твердофазной экстракции. Миелопид используется в клинической практике с 1994 г. в комплексной терапии различных заболеваний, сопровождаемых вторичными иммунодефицитными состояниями [12].

Последующее выделение и структурно-функциональная характеристика индивидуальных МП, позволили глубже понять механизм действия Миелопида: активность каждого из исследованных МП проявляется при введении этого препарата в организм, если в нем имеются соответствующие иммунологические сдвиги. Содержание в Миелопиде смеси эндогенных регуляторных пептидов обеспечивает широкий спектр его иммунокорригирующих эффектов, следствием чего является его клиническая эффективность. В то же время стандартизация препаратов, содержащих смеси эндогенных биологически активных веществ, практически невозможна. Соотношение пептидов, входящих в состав смеси, неизбежно колеблется в различных партиях препарата. Оценка эффективной дозы проводится, как правило, по активности основного, входящего в его состав пептида, а точное соотношение всех остальных пептидных компонентов в конкретной партии остается неизвестным.

Выделение индивидуальных МП, входящих в состав Миелопида, и синтез МП, точно соответствующих по физико-химическим и биологическим свойствам природным молекулам, позволили приступить к созданию миелопептидных препаратов второго поколения с известной структурой и механизмом действия. Наиболее продвинуты работы по препаратам на основе двух пептидов — МП-2 и МП-3. На основе МП-2 разрабатывается препарат Бивален — иммуномодулятор с противоопухолевым действием. Лекарственная форма Бивалена инъекционная, она представляет собой водный раствор 0,5 мг синтетического пептида МП-2. Доклиническое изучение специфической активности Бивалена показало его способность на

70—90% тормозить рост различных типов трансплантированных мышечных опухолей. Поскольку в основе противоопухолевой активности Бивалена лежит его способность восстанавливать подавленный в организме опухоленосителя синтез эндогенного ИЛ-2, препарат может с успехом заменить в клинике рекомбинантный ИЛ-2, введение которого больным вызывает тяжелые побочные эффекты. Экзогенный ИЛ-2 вводится больному неоднократно и в высоких дозах, к этой сравнительно крупной молекуле в организме вырабатываются антитела, что снижает дозу вводимого цитокина и усугубляет побочные эффекты. Восстанавливая биосинтез ИЛ-2, подавленный в организме больного, Бивален обеспечивает нормальную пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов — основных киллеров опухолевых клеток. Экспериментально показано, что комбинированное применение Бивалена и Цисплатина при лечении мышей с трансплантированным лимфолейкозом Р-388 позволило в 10 раз снизить эффективную дозу Цисплатина, чрезвычайно токсичного цитостатика [12]. Следует подчеркнуть, что МП являются низкомолекулярными пептидами, вырабатываемыми в организме в процессе нормального метаболизма, что обуславливает полное отсутствие токсичности при их введении. Токсикологическое изучение Бивалена показало его полную безвредность для организма. Летальность животных не была достигнута даже при максимально растворимой дозе Бивалена, в 10000 раз превышающей терапевтическую. Он, как и другие МП, будет крайне полезным для больных, проходящих курс химио- и радиотерапии, резко снижающих функциональную активность различных звеньев иммунитета.

Другой миелопептидный препарат, Серамил, разработан на основе пептида МП-3. Он является иммуномодулятором с противобактериальным эффектом.

Его лекарственная форма также инъекционная и представляет собой лиофилизированный порошок, содержащий 0,5 мг МП-3 и 0,5 мг глицина, используемого в качестве наполнителя. Как и Бивален, Серамил нетоксичен для организма. По данному препарату завершена вторая стадия его клинических испытаний, в процессе которых показана полная безвредность препарата для организма человека и его эффективность в комплексном лечении хронических бактериальных инфекций, таких как хронический бронхит, фурункулез и др.

По другим выделенным МП также проводится работа по их использованию в клинике. Особенно перспективными в этом отношении представляются МП-4 и МП-6, которые являются потенциальными противолейкозными средствами. Препаратов, индуцирующих дифференцировку лейкозных бластов в настоящее время чрезвычайно мало, и эндогенные дифференцировочные факторы могут стать ценными лекарствами для использования в противолейкозной терапии. В таблице суммированы результаты работы и перспективы по применению МП в клинической практике.

Заключение

Представленная в настоящем обзоре новая группа регуляторных пептидов костномозговой природы является одним из элементов сложнейшей системы биорегуляции. Механизм действия МП обеспечивает проявление их функциональной активности при возникновении сдвигов в иммунной системе, при этом каждый МП воздействует на соответствующую клетку-мишень. Данный принцип лежит в основе скоординированной работы множества регуляторных веществ в организме в соответствии с законами биологической рациональности.

Таблица

Клиническое применение миелопептидов и его перспективы

Пептид	Область возможного клинического применения	Стадия разработки препарата	Название препарата
Препарат первого поколения			
Смесь мелопептидов, выделенных из супернатанта культуры клеток костного мозга свиньи	Применяется у пациентов с различными патологическими процессами, сопровождаемыми вторичным иммунодефицитным состоянием	Используется в клинической практике с 1994 г.	Миелолипид
Препараты второго поколения			
МП-1 Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr	Иммунокоррекция у пациентов после операций, травм, ожогов, радио- и химиотерапии и т.п.	Доклиническое изучение	—
МП-2 Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp	Противоопухолевая и противовирусная терапия	Первая стадия клинических испытаний	Бивален
МП-3 Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln	Противобактериальная терапия. Повышение эффективности вакцинации	Завершена вторая стадия клинических испытаний	Серамил
МП-4 Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro	Противолейкозная терапия	Доклиническое изучение	—
МП-6 Val-Asp-Pro-Pro	То же	То же	—

Описанные в обзоре функциональные свойства МП имеют общебиологическую значимость. Вступление в действие того или иного из МП определяется характером сдвигов в системе иммунитета или кроветворения, которые происходят в организме под влиянием различных воздействий: радиации, цитостатиков, антибиотиков, опухолей, вирусных или бактериальных заболеваний и т. д. МП-2, например, восстанавливает синтез эндогенного ИЛ-2, подавленный как продуктами опухоли, так и вирусом кори [24], и тем самым обладает не только противоопухолевым, но и противовирусным эффектом при его введении соответствующим больным. МП направленно корректируют нарушения иммунного статуса организма, что и определяет их конечные клинические эффекты. Поэтому для правильного выбора миелопептидного препарата при лечении конкретного больного важно знать, какие иммунологические сдвиги характерны для данного заболевания.

Проблема миелопептидов за 30 лет своего развития прошла путь от открытия неизвестных ранее эндогенных регуляторных пептидов до их синтеза и создания на их основе новых лекарственных средств. Нет сомнений, что дальнейшее углубленное изучение этой проблемы принесет немало неизвестных ранее фактов, имеющих отношение к механизмам действия эндогенных иммунорегуляторов, а также приведет к новым достижениям в области практической медицины.

Словарь терминов

Га-Антигены — антигены главного комплекса гистосовместимости II класса

Перитонеальные макрофаги — макрофаги, выделенные из внутрибрюшинной жидкости

Список сокращений

ИЛ — интерлейкин

ИНФ — интерферон

Кон А — конканавалин А

КСФ — колониестимулирующий фактор

ФИТЦ-меченый — флуоресцеин-меченый

ЛИТЕРАТУРА

- Goldstein A.L., Slater F.D., White A. Natl. Acad. Sci., 1966, v. 69, p. 1800—1803.
- Paul S., Sodhi A. Immunol. Letters, 2002, v. 2, p. 171—182.
- Huff T., Muller C.S., Otto A.M. e. a. Int. J. Biochemistry, 2001, v. 33, p. 205—220.
- Михайлова А.А., Петров Р.В., Захарова Л.А. Докл. АН, 1971, т. 197, с. 209—211.
- Михайлова А.А., Захарова Л.А., Петров Р.В. Докл. АН, 1972, т. 203, с. 948—950.
- Petrov R.V., Mikhailova A.A. Cell Immunol., 1972, v. 5, p. 392—401.
- Petrov R.V., Mikhailova A.A., Stepanenko R.N., Zakharova L.A. Ibid., 1975, v. 27, p. 342.
- Petrov R.V., Mikhailova A.A., Zakharova L. e. a. Ann. Immunol., 1980, 131 D, p. 161—171.
- Petrov R.V., Михайлова А.А., Захарова Л.А. Иммунология, 1980, № 4, с. 48—50.
- Petrov R.V., Mikhailova A.A., Zakharova L. e. a. Scand. J. Immunol., 1986, v. 24, p. 237—243.
- Петров Р.В., Захарова Л.А., Михайлова А.А. Гематология и трансфузиология, 1984, № 2, с. 43—45.
- Петров Р.В., Михайлова А.А., Фонина Л.А., Степаненко Р.Н. Миелопептиды. М.: Наука, 2000, 181 с.
- Goldstein A., Low T.L., Thurman G.B., Zatz M.M. Recent progress in hormone research. Ed. F.O. Green. N.Y.: Acad. Pres., 1981.
- Bach J.F., Dardenne M., Pleau J.M., Bach M.A. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1975, v. 249, p. 186.
- Nashioka K., Constantopoulos A., Satoh S.P., Najjar V.A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1972, v. 47, p. 172.
- Фонина Л.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А., Смирнова О.В. Биоорг. хим., 1998, т. 24, с. 403—407.
- Ivanov V.T., Karelin A.A., Philippova M.M. e. a. Biopolym. Rep. Sci., 1997, v. 43, p. 171.
- Mikhailova A., Fonina L., Kirilina E. e. a. Reg. Peptides, 1994, v. 53, p. 203—209.
- Petrov R., Mikhailova A., Kirilina E. Folia Biologica, 1994, v. 40, p. 455—461.
- Strelkov L.A., Mikhailova A.A., Sapozhnikov A.M. e. a. Immunol. Letters, 1996, v. 50, p. 143—147.
- Стрелков Л.А., Михайлова А.А., Сапожников А.М. и др. Докл. АН, 1996, т. 347, с. 278—280.
- Хабаров С.В., Герасимова Г.К., Михайлова А.А., Петров Р.В. Там же, 2003, т. 390, с. 268—271.
- Михайлова А.А., Герасимова Г.К., Трещалина Е.М. и др. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 1998, т. 42, № 5, с. 176—178.
- Белевская Р.Г., Калюжная М.В., Ляшенко В.А. и др. Аллергия, астма и клин. иммунология, 2003, т. 9, с. 63—67.
- Белевская Р.Г., Михайлова А.А. и др. Докл. АН, 1998, т. 358, с. 847—849.
- Белевская Р.Г., Михайлова А.А., Ляшенко В.А. и др. Иммунология, 2000, № 3, с. 23—26.
- Белевская Р.Г., Елкина С.И., Калина Н.Г., Михайлова А.А. Там же, 2003, № 6, с. 324—327.
- Fetsch J., Maurer H.R. Exp. Nematol., 1990, v. 18, p. 322—327.
- Raukovits W.R., Laerum O.D. Naturforsch., 1982, v. 37C, p. 297—300.
- Фонина Л.А., Балдин М.И., Ефремов М.А. и др. Биоорг. химия, 2001, т. 27, с. 403—407.
- Стрелков Л.А., Михайлова А.А., Гурьянов С.А. и др. Докл. АН, 1998, т. 358, с. 134—136.
- Strelkov L.A., Mikhailova A.A., Fonina L.A., Petrov R.V. FEBS Letters, 2000, v. 470, p. 281—284.
- Mikhailova A., Fonina L., Kirilina E. e. a. Reg. Peptides, 2003, v. 114, p. 183—187.
- Молотковская И.М., Зеленова М.А., Михайлова А.А. Иммунология, 1998, № 4, с. 30—33.
- Фонина Л.А., Михайлова А.А., Кирилина Е.А. и др. Докл. АН, 2001, т. 381, с. 834—836.
- Кирилина Е.А., Михайлова А.А., Малахов А.А. и др. Иммунология, 1998, № 4, с. 26—29.