



УДК 577.175.82.05+57.083.3

ЭНДОГЕННЫЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ (МИЕЛОПЕПТИДЫ): СТРУКТУРА, ФУНКЦИЯ, МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

© 1999 г. Р. В. Петров, А. А. Михайлова, Л. А. Фоница[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 22.03.99 г. Принята к печати 24.05.99 г.

Выделены, идентифицированы и синтезированы неизвестные ранее медиаторы костно-мозговой природы – миелопептиды. Детально изучены их биологические свойства и механизм действия. МП-1 (Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr) обладает иммунокорректирующим эффектом, нормализуя антителный ответ у животных при иммунодефицитах различной этиологии. МП-2 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp) тормозит рост опухолей благодаря своей способности восстанавливать функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную продуктами опухолевых клеток. МП-3 (Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln) проявляет выраженный протективный эффект при заражении животных патогенными микроорганизмами, что обусловлено его стимулирующим действием на фагоцитоз макрофагов. МП-4 (Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro) – новый фактор клеточной дифференцировки. Он индуцирует терминальную дифференцировку лейкозных клеточных линий HL-60 и K-562.

Ключевые слова: костный мозг; миелопептиды; иммунорегуляция; стимуляция фагоцитоза; клеточная дифференцировка.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что функционирование иммунной системы, как и прочих систем в организме, контролируется сложной сетью взаимосвязанных информационно-сигналов, опосредуемых эндогенными регуляторными субстанциями. Продукция этих субстанций, их направленное действие на конкретные клетки-мишени определяется сложными молекулярно-клеточными механизмами, развивающимися в соответствии с законами биологической рациональности. Примером тому может служить цитокиновая сеть, обеспечивающая согласованное функционирование различных типов иммунокомпетентных клеток в процессе индукции и развития иммунных реакций.

Помимо цитокинов, представляющих собой сравнительно крупные полипептидные и белковые молекулы, в процессах иммунорегуляции задействованы и низкомолекулярные пептиды. Известна, например, роль пептидов тимуса, одного из центральных органов иммунной системы, в становлении Т-звена иммунитета [1]. Описаны иммунорегуляторные свойства ряда нейропептидов, в частности эндорфинов и энкефалинов, влияющих на функциональную активность лимфо-

цитов, экспрессирующих на своей поверхности специфические рецепторы к этим опиятам [2].

Нами были обнаружены, выделены и идентифицированы иммунорегуляторные пептиды второго центрального органа иммунной системы – костного мозга, получившие название миелопептидов (МП) [3, 4]. Каждый из выделенных МП обладает иммунорегуляторной активностью, отличаясь от других по механизму действия и конечному эффекту. В настоящем обзоре суммированы данные по изучению структуры и свойств МП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура и функция миелопептидов

В качестве исходного материала для выделения индивидуальных МП использовался супернатант культуры клеток костного мозга свиньи, из которого методом твердофазной экстракции с последующим разделением офВЭЖХ было выделено 6 новых биологически активных пептидов: МП-1–МП-6, структуры которых, определенные секвенированием на газофазном секвенаторе, представлены ниже:

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.

Сокращения: МП – миелопептиды; офВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ; F – флуоресценция.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-72-56; e-mail: laf@ibch.siobc.ras.ru).

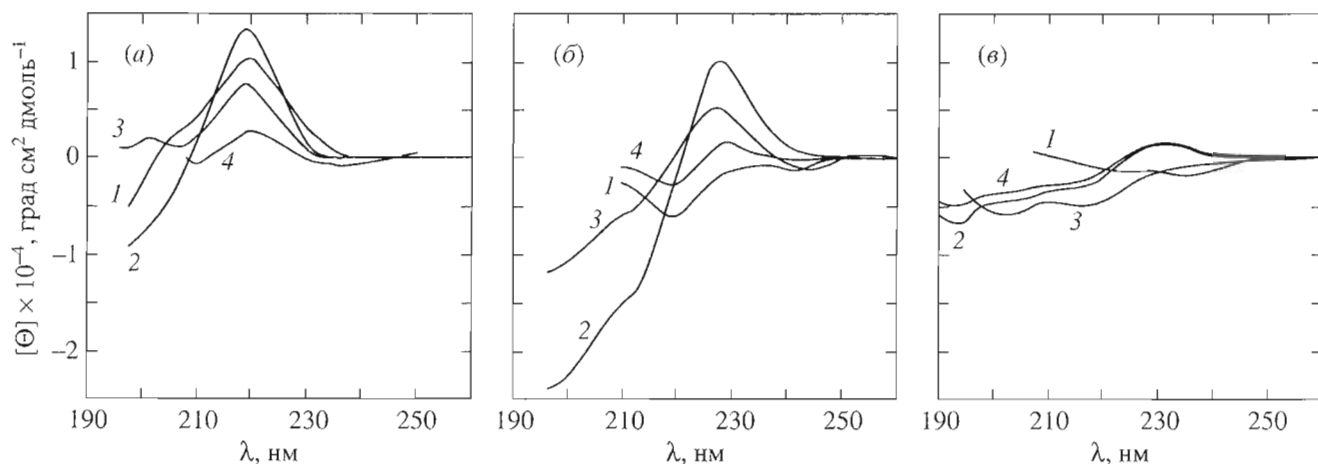


Рис. 1. Спектры КД гексапептидов МП-1 (а), МП-2 (б) и МП-3 (в) в диоксане (1), тетрагидрофуране (2), трифторэтаноле (3) и воде (4).

Поиск гомологий по банку данных белковых последовательностей (Protein Identification Resource, PIR, 1995) показал, что последовательности пептидов МП-1 и МП-2 идентичны консервативным фрагментам α -(33–38) и β -(31–36) цепей гемоглобинов позвоночных. Структуры пептидов МП-4–МП-6 не имеют гомологий с последовательностями известных белков и полипептидов. Для подтверждения структуры и детального изучения свойств выделенных пептидов был проведен их химический синтез*. По физико-химическим свойствам и биологической активности синтетические пептиды были полностью идентичны выделенным.

Тестирование пептидов МП-1–МП-6 в различных экспериментальных моделях показало, что каждый из них проявляет определенную выраженную регуляторную активность, воздействуя на соответствующую клетку-мишень. Так, МП-1 является иммунокорректором, который нормализует антительный ответ у животных при иммунодефицитах различной этиологии, влияя на соотношение регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов [5, 6]. МП-2 тормозит рост различных типов опухолей благодаря своей способности восстанавливать функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную опухолевыми клетками в организме опухоленосителя [7, 8]. МП-3 проявил выраженный протективный эффект при заражении животных патогенными микроорганизмами, что связано с его стимулирующим влиянием на фагоцитоз макрофагов [9]. МП-4 оказался новым фактором клеточной дифференцировки, что проявилось в его способности к индукции терминальной дифференцировки в лейкозных клеточных линиях

[10]. Биологическая активность МП-5 и МП-6 исследуется в настоящее время.

При анализе аминокислотных последовательностей пептидов МП-1, МП-2 и МП-3 обращает на себя внимание некоторое их сходство: все пептиды состоят из 6 а.о., в пятом положении каждой молекулы находится остаток пролина, ограничивающий подвижность С-концевого фрагмента пептидной цепи, в состав всех пептидов входят преимущественно гидрофобные аминокислотные остатки. В то же время эти пептиды проявляют принципиально разные биологические эффекты, что, очевидно, связано с существенными различиями как в пространственной организации пептидных цепей, так и в строении их активных центров.

Пептиды МП-2 и МП-3 отличаются лишь двумя аминокислотными остатками в положениях 3 и 6. Вместе с тем данные пептиды воздействуют на разные звенья иммунитета (Т-звено и макрофаги, соответственно) и вызывают принципиально разные биологические эффекты (противоопухолевый и противобактериальный).

Для выявления причин столь различного биологического поведения МП-1–МП-3 и получения данных об их конформационных возможностях мы провели анализ пространственного строения этих пептидов спектральными методами (КД-спектроскопия).

Следует отметить, что короткие линейные пептиды, как правило, не имеют в растворах фиксированной пространственной структуры и существуют в виде набора низкоэнергетических конформеров, относительное содержание которых определяется аминокислотной последовательностью пептида и физико-химическими свойствами растворителя. При взаимодействии биологически активного пептида с рецептором может происходить конформационная перестройка пептидной цепи, обеспечивающая эффективное взаимодей-

* Синтез пептидов выполнен твердофазным методом в Институте экспериментальной кардиологии РКНПК (данные не опубликованы).

стве активного центра молекулы с лигандсвязывающим центром рецептора. При этом так называемая “биологически активная” конформация, реализующаяся при взаимодействии с рецептором, может не входить в набор доминирующих низкоэнергетических конформеров, существующих в растворе.

Изучение конформационной подвижности МП-1–МП-3 в растворах с использованием растворителей с различными физико-химическими свойствами (вода, диоксан, тетрагидрофуран, трифторэтанол) показало, что для всех пептидов смена растворителей приводит к изменению спектров КД (рис. 1), что свидетельствует о конформационных перестройках пептидных цепей. Анализ спектров КД с учетом данных литературы для модельных линейных пептидов сходного строения [11] позволяет предположить наличие у всех исследованных пептидов β -изгибов I–III типов. Однако различный характер кривых КД в идентичных растворителях (рис. 1) свидетельствует о том, что конформационные возможности и пространственное строение пептидов МП-1 – МП-3 различны, что может объяснять различную биологическую активность данных пептидов и отсутствие конкурентного взаимодействия за связывание со специфическими рецепторами [5].

Направленное действие МП на соответствующие клетки-мишени

Изучение особенностей проявления биологических эффектов индивидуальных МП показало, что каждая из этих регуляторных молекул направленно действует на определенный тип иммунокомпетентных клеток, включая и/или повышая их активность при недостаточности соответствующей функции в процессе развития иммунной реакции. Так, заметное повышение уровня антителообразования под влиянием МП-1 наблюдается лишь в моделях иммунодефицитов, когда иммунный ответ у животных снижен в результате воздействия радиации, цитостатиков или антибиотиков [5, 12]. В то же время МП-1 слабо влияет на величину антителообразования при нормальном состоянии иммунной системы.

МП-2 восстанавливает функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную продуктами опухолевых клеток. Это было выявлено в опытах, в которых МП-2 восстанавливал пролиферативный ответ Т-лимфоцитов периферической крови человека к митогену (фитогемагглютинин, ФГА), сниженный после их инкубирования с кондиционной средой лейкозной клеточной линии HL-60 [7]. Связанное с этим свойством МП-2 торможение роста опухолей при введении пептида в организм опухоленосителя в наибольшей степени проявляется в случае разросшихся опухолей, т.е. когда наблюдается заметная супрессия

иммунной системы. Цитофлуориметрический анализ показал, что инкубация Т-лимфоцитов с кондиционной средой приводит к снижению экспрессии CD4+-антигена на поверхности клеток и появлению некой “дефектной” субпопуляции клеток с крайне низкой экспрессией этого антигена. Обработка “дефектных” клеток МП-2 восстанавливала нарушенный фенотип CD4+-клеток. Пептид действовал только на клетки CD4+, претерпевшие наибольшие фенотипические изменения и не влиял на клетки CD8+, не имевшие подобных повреждений [7].

Направленное воздействие на сниженную активность макрофагов в цитотоксическом тесте было показано для другого костно-мозгового пептида, МП-3. Этот пептид стимулировал цитотоксический эффект макрофагов в отношении опухолевой линии мышечных фибробластов L-929 *in vitro* лишь при малом количестве макрофагов по сравнению с количеством опухолевых клеток.

Все эти факты указывают на способность МП направленно влиять на клетки, ответственные за конкретные сдвиги в иммунной системе, исправлять возникшие нарушения и обеспечивать тем самым нормальное развитие иммунной реакции.

Какие же механизмы лежат в основе столь рациональной иммунокоррекции, характерной для эндогенных иммунорегуляторов? Прежде всего это взаимодействие регуляторного пептида со специфическим рецептором на поверхности клетки-мишени, экспрессия которого контролируется сетью взаимосвязанных биохимических реакций, обеспечивающих иммунорегуляторный процесс. Проиллюстрировать такое положение можно на примере иммунокорректирующего эффекта МП-1.

В различных экспериментальных моделях было показано, что МП-1 блокирует супрессорную активность Т-лимфоцитов [13]. Метод цитофлуориметрии с использованием флуоресцеинмеченного (FITC) МП-1 позволил установить факт связывания МП-1 с рецептором на поверхности клетки-мишени [5]. При двойном флуоресцентном окрашивании клеток (использовались роданинмеченый МП-1 и флуоресцеинмеченые моноклональные антитела к поверхностным маркерам Т-, В-лимфоцитов и их субпопуляций) была определена клетка-мишень для МП-1. Ею оказалась CD4+-клетка (Т-хелпер) [6]. Эти клетки составляют одну из регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов. Известно, что дисбаланс хелперов и супрессоров (CD4/CD8) приводит к нарушению величины иммунного ответа и характерен для многих иммунодефицитных состояний. На экспериментальной модели сдвинутого с помощью канавалина А в сторону CD8 соотношения клеток CD4/CD8 в суспензии клеток мышечной селезенки показано, что МП-1 восстанавливает нарушенный баланс, связываясь со специфическими рецептора-

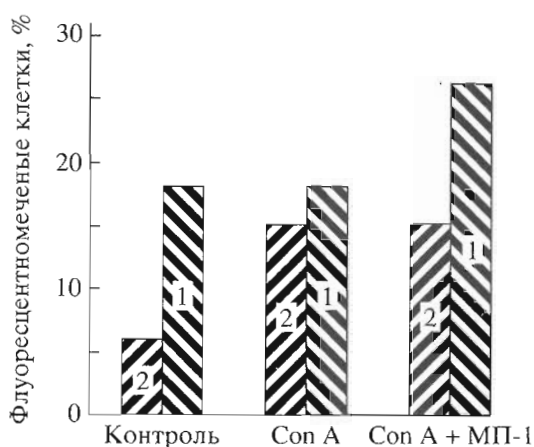


Рис. 2. Влияние МП-1 на соотношение Т-хелперов (1) и Т-супрессоров (2) (CD4/CD8) в суспензии клеток мышинной селезенки [6].

ми на поверхности Т-хелперов [6, 13]. В случае избытка супрессоров МП-1 повышает число хелперных клеток, нормализуя тем самым соотношение хелперов и супрессоров (рис. 2). Результатом этого является восстановление уровня антителообразования в суспензии клеток мышинной селезенки [6].

Таким образом, МП, продуцируемые в организме клетками костного мозга в норме (при отсутствии какой-либо стимуляции) участвуют, очевидно, в регуляторных процессах. Они обеспечивают оптимальное развитие иммунных реакций, направленно воздействуя на соответствующие клетки-мишени.

МП – эндогенные иммунорегуляторы, перспективные для использования в клинической практике

Описанное выше избирательное действие индивидуальных МП на определенные клетки-мишени, обеспечивающее своевременное включение их регуляторных или эффекторных функций, характерно для большинства иммунорегуляторов эндогенной природы. Их эффекты, как правило, проявляются в коррекции нарушенных регуляторных процессов, в создании сбалансированных оптимальных условий для нормального протекания тех или иных иммунологических реакций.

Другая характерная черта МП как эндогенных иммунорегуляторов – их сравнительно низкие эффективные концентрации. В экспериментах *in vitro* получены строгие дозовые зависимости проявления специфических эффектов каждого из МП. Максимальное усиление антителообразования в суспензии мышинных клеток иммунных лимфатических узлов под влиянием МП-1 наблюдалось в диапазоне концентраций 0.5–50 пМ [5]. Дозовая кривая стимуляции макрофагального фагоцитоза под влиянием МП-3 носит бимодальный характер с максимальным эффектом в диапазоне концентраций пептида 10^{-8} – 10^{-9} г/мл [9], а наибольший дифференцировочный эффект МП-4 на клетках HL-60 наблюдался при его концентрации 10^{-6} г/мл, а на клетках К-562 – 10^{-9} г/мл [10]. В экспериментах *in vivo* иммунокорректирующий эффект МП-1 и протективный эффект МП-3 проявлялись при введении этих пептидов мышам в дозе 0.05 мг/кг [9, 12], а противоопухолевый эффект МП-2 при

Миелопептиды: структура, функция, область возможного клинического применения

Пептид	Структура	Биологическая активность	Механизм действия	Область возможного клинического использования
МП-1	Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr	Иммунокоррекция	Нормализует CD4/CD8 баланс, специфически связываясь с CD4 + -клеткой	Иммунокоррекция при химио- или радиотерапии, при лечении больных антибиотиками, цитостатиками, у пациентов с травмами, ожогами, после операций
МП-2	Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp	Торможение роста опухолей	Восстанавливает функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную опухолевыми клетками	Противоопухолевая терапия
МП-3	Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln	Антибактериальный эффект	Стимулирует фагоцитоз макрофагов	Противобактериальная терапия, сепсис, усиление эффективности вакцинации
МП-4	Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro	Дифференцировочный фактор	Индукция терминальной дифференцировки в лейкозных бластах	Противолейкозная терапия
МП-5	Val-Val-Tyr-Pro-Asp			
МП-6	Val-Asp-Pro-Pro			

Проводится исследование

его введении мышам-опухоленосителям в дозах 0.5–1.0 мг/кг [8].

Будучи низкомолекулярными пептидами, не обладающими видовой специфичностью, МП чрезвычайно перспективны для разработки на их основе лекарственных средств с направленными корректирующими эффектами. Правомерность такого утверждения подтверждается эффективным использованием в клинике препарата “Миелопид” [14, 15], действующую основу которого составляет неразделенная смесь МП, выделенная из супернатанта культуры клеток костного мозга свиньи. Обладая иммуностимулирующим, иммунокорректирующим и дифференцировочным эффектами, миелопид с успехом применяется при лечении многих заболеваний, сопровождаемых иммунодефицитным состоянием. Он предотвращает развитие постхирургических и посттравматических осложнений, эффективен при сепсисе, при лечении ожогов и некоторых форм лейкозов.

Знание структуры, функции и механизма действия индивидуальных МП позволяет создать новые, структурно охарактеризованные пептидные препараты направленного действия, производящие естественную коррекцию поврежденного звена иммуно- или гемопозеза и не вызывающие побочных эффектов. Основные свойства выделенных МП и области их возможного клинического применения суммированы в таблице.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller J.F.A.P. // *Lancet*. 1961. V. 2. P. 748–749.
2. Михайлова А.А. // *Иммунология*. 1992. Т. 4. С. 4–8.
3. Petrov R.V., Mikhailova A.A., Fonina L.A. // *Bioscience Reports*. 1995. V. 15. P. 1–14.
4. Petrov R.V., Mikhailova A.A., Fonina L.A. // *Biopolymers*. 1997. V. 43. P. 139–146.
5. Mikhailova A., Fonina L., Kirilina E., Shanurin S., Gur'yanov S., Malakhov A., Nesmeyanov V., Petrov R. // *Reg. Peptides*. 1994. V. 53. P. 203–209.
6. Кирилина Е.А., Михайлова А.А., Малахов А.В., Гурьянов С.А., Ефремов М.А. // *Иммунология*. 1998. Т. 4. С. 26–29.
7. Strelkov L.A., Mikhailova A.A., Sapozhnikov A.M., Fonina L.A., Petrov R.V. // *Immunol. Letters*. 1996. V. 50. P. 143–147.
8. Михайлова А.А., Герасимова Г.К., Трещалина Е.М., Стрелков Л.А., Фоница Л.А., Гурьянов С.А. // *Российский хим. журн.* 1998. Т. XLII. С. 176–178.
9. Белевская Р.Г., Михайлова А.А., Фоница Л.А., Ефремов М.А., Петров Р.В. // *Докл. РАН*. 1998. Т. 358. С. 1–3.
10. Стрелков Л.А., Михайлова А.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А., Петров Р.В. // *Докл. РАН*. 1998. Т. 358. С. 134–136.
11. Hollosi M., Majer Z.S., Ronai A.Z., Magyar A., Medzihradsky K., Holly S., Perczel A., Fasman G.D. // *Biopolymers*. 1994. V. 34. P. 177–185.
12. Mikhailova A.A., Shanurin S.Yu., Petrov R.V. // *Immunol. Letters*. 1995. V. 47. P. 199–203.
13. Petrov R.V., Mikhailova A.A., Kirilina E.A. // *Folia Biologica (Praha)*. 1994. V. 40. P. 455–461.
14. Petrov R.V. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1993. V. 685. P. 351–361.
15. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Андропова Т.М. // *Лечащий врач*. 1998. № 4. С. 46–51.

Endogenic Immunoregulatory Myelopeptides: Structure, Function, and Mechanism of Action

R. V. Petrov, A. A. Mikhailova, and L. A. Fonina[#]

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Previously unknown bioregulators from bone marrow, myelopeptides, were isolated, identified, and synthesized, and their biological properties and mechanism of action were studied in detail. Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr (MP-1) manifests an immunocorrecting effect by restoring the level of antibody production in animals suffering from immunodeficiencies of various etiologies; Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp (MP-2) manifests an antitumor effect by abolishing the inhibitory action of tumor cells on the functional activity of T-lymphocytes; Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln (MP-3) stimulates phagocytosis by macrophages and, in this way, protects animals from infections caused by pathogenic microorganisms; and Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro (MP-4) is a new factor of cell differentiation inducing terminal cell differentiation in the HL-60 and K-562 leukemic cell lines.

Key words: bone marrow, myelopeptides, immunoregulation, phagocytosis stimulation, cell differentiation

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7256; e-mail: laf@ibch.siobc.ras.ru.