

НЕИЗВЕСТНЫЕ ПЕПТИДЫ

Исключительная значимость белковых молекул для существования жизни давно не вызывает сомнения. А их «младшие братья», пептиды, долгое время незаслуженно оставались в тени. Конечно, никто не забывает о важнейшей роли пептидов как агентов эндокринной системы и антибактериальной защиты. Но ещё двадцать лет назад учёные и не догадывались, что множество пептидов, присутствующих во всех тканях, — так называемый пептидный фон — тоже выполняют важные функции.

Кандидат физико-математических наук Антон ЧУГУНОВ
(Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук).

Первые белки описали ещё в XVIII веке — это альбумин (яичный белок), фибрин (один из белков крови) и глютен (запасающий* белок пшеницы). Центральную роль белков во всей биологии осознали к концу первой четверти XX века, и с тех пор ни у кого не вызывает сомнения, что все жизненные процессы протекают с участием этих универсальных «молекул жизни».

Пептиды по химической природе идентичны белкам — отличаются эти два класса молекул лишь размером (длиной полипептидной цепи). Если молекула состоит более чем из 50 аминокислотных остатков — это белок, а если менее — то пептид. Основные функции белков — каталитическая, структурная, защитная, регуляторная, сигнальная, транспортная, запасующая, рецепторная и двига-

тельная. Пептидам традиционно отводилась роль в эндокринной регуляции: большинство известных биологических пептидов (а их не так уж много) являются нейрогормонами и нейрорегуляторами. Кроме того, важную биологическую роль играют антимикробные пептиды, секретируемые как животными, так и растениями (встречаются, например, в семенах многих растений или в слизи лягушек), а также антибиотики пептидной природы, о которых будет сказано ниже.

Не так давно, но более тридцати лет назад, обнаружилось, что кроме пептидов, обладающих вполне определёнными функциями, ткани живых организмов содержат довольно мощный пептидный фон, который состоит в основном из фрагментов более крупных молекул функциональных белков. Долгое время считалось, что пептидный фон не играет заметной биохимической роли, но в последнее время становится понятно, что это совсем не так.

Однако давайте разбираться по порядку, и начнём с краткого экскурса в историю изучения пептидных веществ в нашей стране.

* Запасающий белок аккумулирует аминокислоты и заодно энергию. При запуске активного метаболизма такой белок расщепляется, а энергия и «строительные блоки» (аминокислоты) идут в ход.

◀ Молекула основного «дыхательного» белка крови — гемоглобина, отвечающего за перенос кислорода по организму, состоит из четырёх субъединиц (отдельных молекул): двух альфа и двух бета (на рисунке показано по одной субъединице каждого типа — голубая и розовая соответственно). В составе каждой субъединицы присутствует молекула гема (синего цвета), «охватывающая» центральный атом железа (оранжевая сфера), способный связывать молекулу кислорода (красные сферы). Пептидные пулы в организме человека на 30—90% состоят из фрагментов гемоглобина, зачастую обладающих биологической активностью, никак не связанной с функциями «дыхательного» белка.

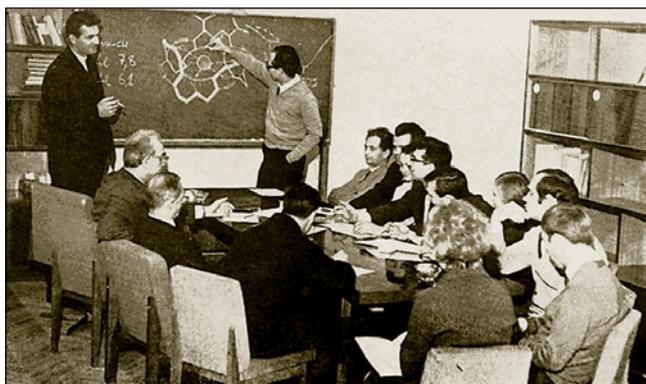
ПЕПТИДНАЯ ШКОЛА В СССР

В 1959 году в Академии наук СССР был создан Институт химии природных соединений (ИХПС), во главе которого встал академик Михаил Михайлович Шемякин (1908—1970). Сотрудники института с самого начала были ориентированы на изучение природных биорегуляторов, таких как витамины и антибиотики. Большую работу по синтезу пептидных антибиотиков вёл молодой инициативный учёный, будущий директор института и вице-президент АН СССР Юрий Анатольевич Овчинников (1934—1988).

Работа по расшифровке структуры и синтезу пептидного антибиотика валиномицина (депсипептидного циклического антибиотика из бактерий *Streptomyces fulvissimus*) под руководством Овчинникова принесла команде учёных успех и признание (см. «Наука и жизнь» № 6, 2010 г.). Валиномицин оказался ионофором, то есть веществом, избирательно увеличивающим проницаемость биологической липидной мембраны клеток для определённого типа ионов, а именно ионов калия. Исследования валиномицина и его комплексов с ионами калия позволили сформулировать механизм действия антибиотика.

За огромную работу по исследованию валиномицина и других ионофоров, результаты которой суммированы в монографии «Мембрано-активные комплексоны», Ю. А. Овчинников и В. Т. Иванов в 1987 году удостоены Ленинской премии. (Подробнее о работах М. М. Шемякина, Ю. А. Овчинникова и В. Т. Иванова можно прочитать на сайте ИБХ РАН — <http://www.ibch.ru/about/history/personalia/740>; <http://www.ibch.ru/about/history/personalia/738>; <http://www.ibch.ru/about/history/personalia/1>).

На лабораторном коллоквиуме в Институте химии природных соединений. Структуру циклического антибиотика валиномицина на доске рисует В. Т. Иванов — будущий академик и директор института. 1965 год.



БОЛГАРСКАЯ ПРОСТОКВАША

Пептидные антибиотики, бесспорно, интересны, однако они по большей части вырабатываются микроорганизмами и действуют на микроорганизмы же. Учёные заинтересовались мурамилпептидами — компонентами клеточной стенки бактерий, способными стимулировать врождённый иммунитет у человека.

В 1970-е годы в Институте биоорганической химии обратился болгарский врач Иван Богданов с просьбой помочь проанализировать препарат, полученный им из продуктов ферментации кисломолочной бактерии *Lactobacillus bulgaricus*. Он хотел найти действующее начало «чудотворных» болгарских кисломолочных продуктов (в первую очередь простокваша), якобы способствующих знаменитому болгарскому долголетию. Препарат Богданова вызвал в ИБХ живой интерес, поскольку обладал существенной противоопухолевой активностью. По составу он представлял собой сложную смесь веществ бактериального происхождения.

В результате исследований обнаружилось, что действующее начало препарата Богданова — это элементарное звено клеточной стенки бактерий: глюкозаминил-мурамил-дипептид (ГМДП). Именно это вещество оказывает на организм человека иммуностимулирующее и противоопухолевое действие. Фактически этот элемент бактерии иммунная система и воспринимает как «врага», мгновенно запуская каскад поиска и удаления патогена из организма. На основе ГМДП в институте создали лекарственный препарат ликолипид, применяемый сейчас для широкого спектра показаний, связанных в основном с иммунодефицитами и инфекционными заражениями — сепсисом, перитонитом, синуситами, эндометритами, туберкулёзом, а также при различных видах лучевой и химиотерапии.

РОЖДЕНИЕ ПЕПТИДОМИКИ

История с простоквашей наряду с другими работами с веществами пептидной природы дала толчок рождению новой отрасли науки.

В начале 1980-х годов стало понятно, что роль пептидов в биологии сильно не-

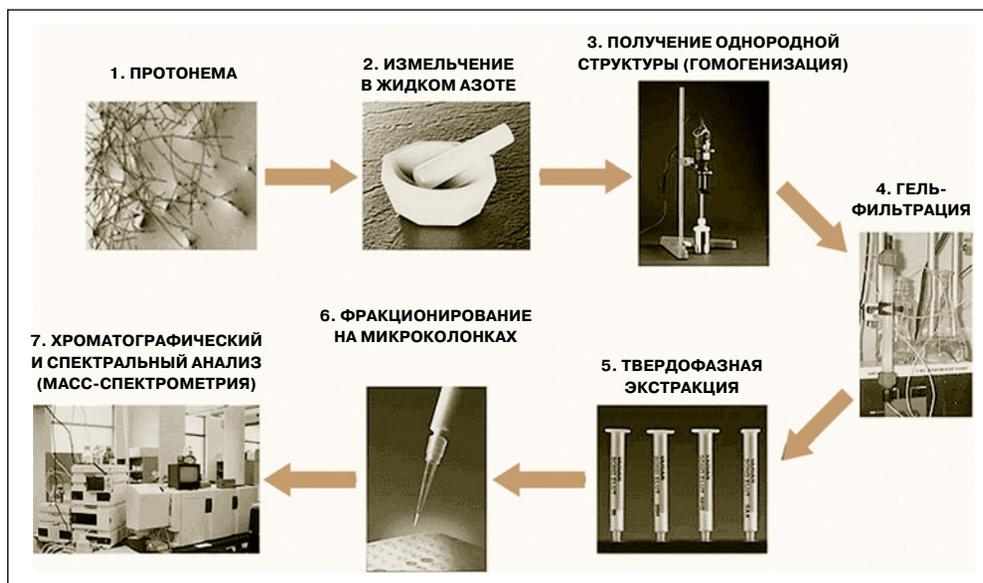


Схема экспериментального анализа пептидов мха *Physcomitrella patens* (стадия развития — протонема). Биологический образец (1) измельчают после замораживания в жидком азоте (2) и полученный порошок растворяют в буфере для дальнейшего анализа (3). Раствор разделяют на фракции (4—6), которые изучают с помощью методов масс-спектрометрии, чтобы установить точный пептидный состав той или иной фракции (7).

дооценена. Прежде всего, обнаружилось, что пептидов в цитоплазме, межклеточной жидкости и тканевых экстрактах много больше, чем считалось ранее, — как по массе, так и по числу разновидностей. Более того, состав пептидного пула (или фона) в разных тканях и органах существенно различается. К этому времени число «свеженайденных» в тканях человека и животных пептидов в десятки раз превысило количество «классических» пептидов с хорошо изученными функциями. Однако эти «теньевые» пептиды считались просто биохимическим мусором,

образовавшимся при деградации более крупных молекул функциональных белков, и лишь с начала 1990-х представления начали меняться.

Изучением роли пептидных пулов стала заниматься новая дисциплина — пептидомика, становление которой происходило не в последнюю очередь и в ИБХ. Пептидомика — наука, изучающая состав и функции пептидных пулов (по аналогии с геномом и протеомом пептидные пулы ещё называют пептидомом), существующих в разных тканях и органах, а также механизмов их образования и разрушения.

К настоящему моменту экспериментальная пептидомика позволила сформулировать три главные закономерности, описывающие поведение совокупности «теньевых» пептидов в живых организмах.

Прежде всего, биологические ткани, жидкости и органы содержат большое число пептидов, образующих пептидные пулы. Эти пулы формируются из различных

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, СОЗДАННЫЕ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДНЫХ ПУЛОВ

Препарат	Источник	Показания
Солкосерил (Швейцария)	Депротеинизированный гемодериват из телячьей крови	Заживление ран, трансплантация, ишемия
Актовегин (Дания)	Пептиды плазмы крови	Заживление ран, трансплантация, ишемия
Вирулизин (Канада)	Экстракт желчного пузыря крупного рогатого скота	Иммунодефициты, онкология
Тимулин (Россия)	Экстракт тимуса крупного рогатого скота	Иммунодефициты
Церебролизин (Австрия), Кортексин (Россия)	Экстракт головного мозга крупного рогатого скота, свиньи	Инсульт, болезнь Альцгеймера
Раверон (Швейцария) Простатилен (Россия)	Экстракт предстательной железы крупного рогатого скота	Простатит, аденома предстательной железы

белков-предшественников, в том числе обладающих своими собственными функциями (ферментов, структурных и транспортных белков и др.).

Во-вторых, состав пептидных пулов устойчиво воспроизводится у разных особей и не обнаруживает индивидуальных отличий. Это значит, что у разных особей пептидомы (пептидные пулы) мозга, сердца, лёгких, селезёнки и других органов примерно совпадают, но друг от друга эти пулы отличаются. У разных видов (по крайней мере у млекопитающих) состав аналогичных пулов также весьма схож.

И, наконец, в-третьих, при развитии патологических процессов (в частности, такие данные есть для болезни Ходжкина и Альцгеймера), а также при стрессах (в том числе при длительном лишении сна) или применении фармакологических препаратов состав пептидных пулов меняется, и иногда довольно сильно. Эту особенность пептидных пулов можно использовать для диагностики различных патологических состояний.

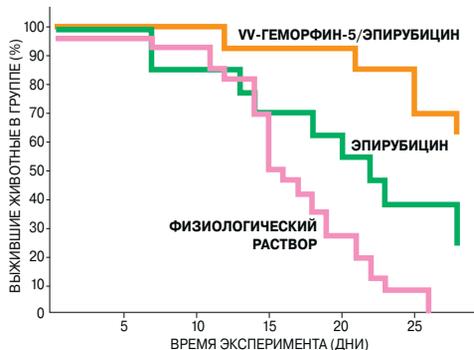
Точный состав пептидных пулов определить сложно, прежде всего, потому, что число его «участников» существенным образом зависит от того, какую концентрацию пептида считать значимой. Если значимыми считать концентрации порядка единиц и десятых долей наномоля на литр ($1 \text{ нмоль} = 10^{-9} \text{ моль}$), то это пул в несколько сотен пептидов, однако если речь идёт о пикомолях (10^{-12} моля), число «участников» пула будет зашкаливать за десятки тысяч. Считать ли такие минорные компоненты самостоятельными «игроками» или же принять, что они представляют лишь биохимический шум, — вопрос открытый.

ПЕПТИДЫ: «ТЕНЕВАЯ» СИСТЕМА БИОРЕГУЛЯЦИИ

Большинство пионерских работ по пептидомике проведены на тканях животных, и во всех случаях были выявлены пептидные пулы определённого и характерного состава — у человека, быка, крысы, мыши, свиньи, суслика, гидры, дрозофилы, саранчи. Но есть ли пептидные пулы у растений и прокариот — одноклеточных организмов, не обладающих оформленным клеточным ядром? В случае простейших или бактерий выяснить ситуацию ещё предстоит, а для растений, видимо, уже можно дать положительный ответ. В частности, для модельного растения мха *Physcomitrella patens*, геном которого недавно расшифрован, было показано, что на всех стадиях развития в растении присутствует большое число эндогенных пептидов — фрагментов клеточных белков, набор которых индивидуален для каждой жизненной формы растения.

Даже если у прокариот не обнаружится ничего похожего, уже сейчас можно сделать вывод, что большое число многоклеточных организмов культивирует внутри себя пептидные пулы. Но для чего они служат и как образуются?

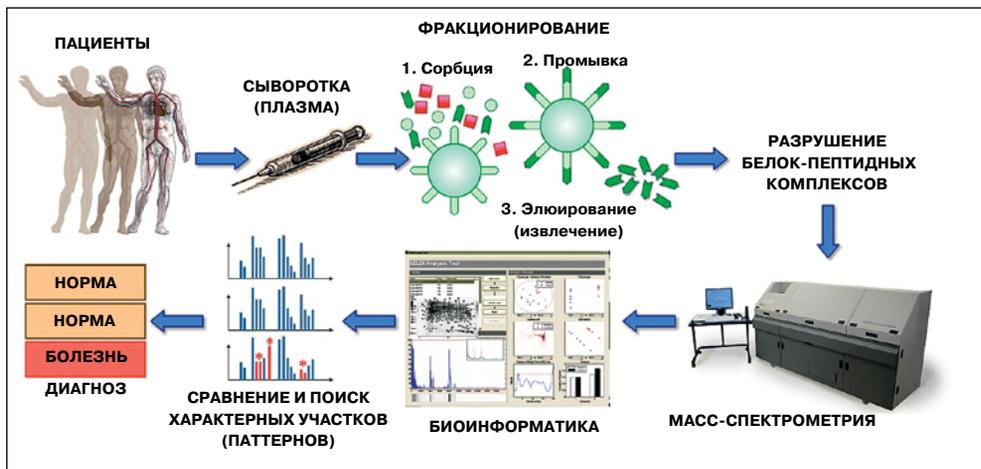
Механизм образования пептидных пулов проще всего выяснить на культурах клеток,



Средняя продолжительность жизни мышей с карциномой молочной железы при стандартной терапии эпирубицином и при комбинированной терапии эпирубицином с VV-геморфин-5 — одним из фрагментов гемоглобина. Как видно из рисунка, выживаемость во втором случае была в два раза выше.

потому что в отличие от работы с тканями и органами здесь есть уверенность, что пептиды генерируются именно этим типом клеток, а не каким-то другим. Наиболее подробно в этом смысле изучены эритроциты человека — клетки тем более интересные, что они лишены ядра, а следовательно, большинство биохимических процессов в них сильно заторможено (то есть клетки стационарны — не претерпевают изменений и не превращаются во что-нибудь другое). Исследования показали, что внутри эритроцитов происходит «нарезание» гемоглобиновых α - и β -цепей (молекула гемоглобина — тетрамер: две α - и две β -цепи) на серию крупных пептидных фрагментов. Всего выделено 37 фрагментов α -глобина и 15 — β -глобина. Кроме того, эритроциты выделяют в окружающую среду множество более коротких пептидов. Пептидные пулы образуются и в других культурах клеток (трансформированных миеломоноцитах, клетках эритролейкемии человека и др.), то есть продуцирование пептидов культурами клеток — широко распространённое явление. В большинстве тканей 30—90% всех идентифицированных пептидов являются фрагментами гемоглобина, однако идентифицированы и другие белки, порождающие каскады пептидов, — альбумин, миелин, иммуноглобулины и др. Для части «теневых» пептидов предшественников пока не найдено.

Несмотря на множество разрозненных данных об активности отдельных компонентов пептидных пулов, ключевой вопрос о биологической роли пептидных пулов в целом оставался без ответа. Чтобы понять, играют ли пептиды в пулах самостоятельную биологическую роль, изучили действие более 300 компонентов пептидных пулов тканей млекопитающих на набор культур опухолевых и нормальных клеток. В результате оказалось, что более 75% этих пептидов ускоряют или замедляют деление клеток хотя бы одной



Медицинская диагностика на основе пептидного профилирования образцов крови. Сочетание масс-спектрометрических и биоинформатических методов позволяет выявить различия между пептидным составом крови больных и здоровых пациентов. Сначала образцы сыворотки крови разделяют на фракции с помощью инструментария иммунохимии, потом отдельные фракции изучают на масс-спектрометре. Биоинформатический анализ масс-спектров позволяет установить пептидный состав фракций сыворотки, а также выявить значимые отличия образцов крови больных и здоровых пациентов.

культуры. Кроме того, на основе этих исследований был сделан вывод, что компоненты пептидома участвуют в регуляции нервной, иммунной и эндокринной систем организма, причём их действие можно рассматривать как комплексное, то есть осуществляемое сразу всем «ансамблем». При этом пептидный пул в целом регулирует долговременные процессы («долго» для биохимии — это часы, дни и недели) и отвечает за поддержание гомеостаза — тканевого биохимического равновесия.

По-видимому, один из главных механизмов действия коротких биологических пептидов — работа через рецепторы хорошо известных пептидных нейрогормонов. В качестве примера пептидов, действующих через «чужие» рецепторы, можно привести геморфины — фрагменты гемоглобина, которые связываются с опиоидными рецепторами аналогично эндогенным (то есть синтезируемым самим организмом) опиатам — энкефалину и эндорфину.

В то же время мишени действия большинства «теневых» пептидов неизвестны. По предварительным данным, некоторые из них могут влиять на работу рецепторных «каскадов» и даже участвовать в «управляемой гибели» клетки — апоптозе.

Кстати, фрагменты более крупных белковых молекул, обладающие собственной функцией, никак не связанной с функцией «родителя», получили название криптеинов («спрятанные» белки). Криптеины сейчас до-

вольно активно изучают и выявляют в последовательностях «обычных» белков в надежде обнаружить у них особые биологические (например, лекарственные) свойства.

Биохимический «буфер», который образует пептидный пул, «смягчая» метаболические колебания в клетке или ткани, позволяет говорить о новой, ранее неизвестной системе регуляции. Последняя дополняет нервную и эндокринную системы, поддерживая в организме гомеостаз и устанавливая равновесие между ростом, дифференцировкой, восстановлением и гибелью клеток. Восстанавливающее и стимулирующее действие многих пептидных веществ, видимо, можно объяснить как раз восстановлением нарушенного равновесия.

Предполагают, что пептидная биорегуляторная система — эволюционный предшественник более совершенной нервной и эндокринной систем. Эффекты, оказываемые пептидным фоном, могут проявляться уже на уровне отдельной клетки, в то время как невозможно себе представить работу нервной или эндокринной системы в одноклеточном организме.

БУДУЩЕЕ ПРИЛОЖЕНИЯ ПЕПТИДОМИКИ

Лекарственные препараты — вариации на тему пептидных пулов различных тканей животных уже достаточно широко представлены на фармацевтическом рынке. Основная область их применения — лечение патологических состояний, связанных с дегенерацией или трансформацией клеток и тканей, а также регенерация (заживление ран). Однако такие препараты — не чистые химические вещества. Это значит, что они не удовлетворяют требованиям современной доказательной молекулярной медицины. (Современные международные фармакологические стандарты, такие как «Good Clinical Practice», подразумевают проведение клинических испытаний, в которых совершенно чётко было бы доказано действие того или иного лекарственного компонента — химически чистого соединения.)

VII Всероссийская научно-практическая конференция -
выставка с международным участием

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2010

МОЛЕКУЛЯРНАЯ
ДИАГНОСТИКА

2010

www.md2010.org

24-26 ноября 2010 г.
ГК «Космос», г. Москва

ОРГАНИЗАТОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ:
Минздравсоцразвития РФ,
Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека,
ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора,
Некоммерческое партнерство
«Национальное научное общество инфекционистов»

ОРГАНИЗАТОР ВЫСТАВКИ и ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР:
ООО «ИнтерЛабСервис»

www.md2010.org

Основные темы конференции:

- Современное состояние и перспективы молекулярной диагностики
- Молекулярные технологии в диагностике инфекционных болезней
- Современные технологии медицинской генетики
- Новые молекулярно-биологические методы лабораторной диагностики
- Биобезопасность
- Инфекционные болезни животных и птиц
- Безопасность продуктов питания и кормов для животных
- Молекулярно-биологические технологии в судебной медицине и криминалистике
- Алгоритмы использования современных лабораторных методов в клинической практике

Одно из перспективных направлений — использование уже упоминавшейся антипролиферативной активности пептидов (способности замедлять деление клеток). Так, в опытах на карциноме молочной железы мышей один из фрагментов гемоглобина (так называемый VV-геморфин-5) удваивал выживаемость животных при совместном применении со стандартным цитостатиком эпурибуцином по сравнению с применением одного только эпурибуцина. Этот эксперимент даёт основания полагать, что на основе природных пептидных пулов возможно создание вспомогательных и поддерживающих препаратов для онкологической терапии.

Однако разработка и тестирование новых лекарств — чрезвычайно долгий и затратный процесс, осложняемый конкурентной борьбой фармацевтических гигантов. Более близкая перспектива использования пептидных пулов — это диагностика заболеваний или других патологических состояний. Пептидный состав образца (крови, ткани и т. д.) сильно зависит от состояния, в котором находился организм-донор. Уже есть примеры использования пептидомного подхода для выявления маркеров тех или иных заболеваний, в том числе онкологических. В частности, в ИБХ разработана методика масс-спектрометрического анализа пептидного профиля образцов крови и выявлены статистически достоверные его различия, по которым можно диагностировать рак яичников, колоректальный рак или

сифилис. Масс-спектр совокупности пептидов, отражающий состав пептидного пула образца тканей, у больного человека имеет характерные отличия, по которым можно поставить точный диагноз.

Этот пример наглядно показывает, что «теневые» пептиды из тканевых пулов хранят массу практически полезной информации для диагностики и лечения различных заболеваний.

Статья написана на основе лекции о роли пептидов в качестве универсальных биорегуляторов, которую Вадим Тихонович Иванов, директор Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, прочёл в мае 2010 года на общем собрании Российской академии наук. В начале этого года академик В. Т. Иванов награждён Большой золотой медалью Российской академии наук имени М. В. Ломоносова «за выдающийся вклад в развитие биоорганической химии».

ЛИТЕРАТУРА

Чирков Ю. **Молекулярные контейнеры** // Наука и жизнь, 2010, № 6.

Иванов В. Т., Андропова Т. М., Несмеянов В. А., Пинегин Б. В., Леджер Р., Бомфорд Р., Хаитов Р. М. **Механизм действия и клиническая эффективность иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида (ликопида)** // Клиническая медицина, 1997, № 3, с. 11—15.