

Пептидный состав препарата плаценты человека Лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека

1 ВВЕДЕНИЕ

И. Торшин, кандидат химических наук, доцент Московского физико-технического института, научный консультант Российского спутникового центра (РСЦ) Института микроэлементов ЮНЕСКО,
А. Волков, кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры клинической и лабораторной практики РНИМУ им. Н.И. Пирогова,
А. Гилельс, научный сотрудник клиники эстетической косметологии RHANA,
Н. Керимкулова, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой акушерства, гинекологии и перинатологии Ивановской государственной медицинской академии,
О. Лиманова, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии Ивановской государственной медицинской академии,
Л. Федотова, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии Ивановской государственной медицинской академии,
В. Носиков, доктор химических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ВНИИ агрохимии им. Д.Н. Прянишникова,
О. Громова, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии Ивановской государственной медицинской академии, заместитель директора по научной работе РСЦ Института микроэлементов ЮНЕСКО, Иваново, Москва, Россия

Препараты на основе экстрактов плаценты человека (ЭПЧ) используются в современной клинической медицине начиная с первой четверти XX века, т.е. уже более 80 лет. Еще в 1920-х годах известнейший российский офтальмолог и хирург профессор В.П. Филатов (1875–1956) обосновал метод тканевой терапии. В применении к экстракту плаценты этот метод основан на предположении, что экстракт содержит значительные количества так называемых «биогенных стимуляторов» (пептидов, гормонов, аминокислот и др.), которые активируют обмен веществ.

Проведенный нами ранее систематический анализ более 3500 публикаций по клинической и экспериментальной фармакологии ЭПЧ позволил установить репрезентативный набор исследований, описывающих практически все документированные применения экстрактов плаценты, такие, как иммунорегуляция, ранозаживление, нейротрофическое действие, нормализация пигментации кожи, гепатопротекция [1].

Разносторонние клинические эффекты, возникающие при применении экстрактов плаценты, являются следствием их сложнейшего молекулярного состава. К настоящему времени данные о точном составе экстрактов плаценты разрознены в тысячах публикаций по биохимии, молекулярной биологии и фармакологии, а также в многочисленных базах данных белков и ДНК. В составе плаценты найдено более 4000 различных белков, включая факторы роста, гормоны, цитохромы, факторы фибринолиза, ферменты энергетического метаболизма

Пептидный состав препарата плаценты человека Лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека

и др. [2], идентифицированы эстрадиол [3], простагландины [4], энкефалины и другие нейропептиды [5, 6], ряд микроэлементов (прежде всего, значительные количества органического цинка) [7].

Анализ состава экстрактов ЭПЧ является одним из важнейших направлений исследований в отношении данной группы препаратов, он позволяет не только установить и понять реальные механизмы воздействия препаратов, но и указать перспективные направления их терапевтического применения. Недостаток информации о механизмах воздействия обусловлен, в свою очередь, неполнотой данных о составе препаратов.

Изготавливаемый на основе ЭПЧ препарат Лаеннек хорошо зарекомендовал себя в эстетической медицине, гепатологии, лечении атопического дерматита. Хотя высокая терапевтическая эффективность препарата очевидна, данные о фундаментальных молекулярных механизмах его воздействия крайне ограничены. В настоящем исследовании мы впервые провели экспериментально-теоретическое исследование пептидного состава «легких» пептидных фракций (диапазон молекулярных масс до 2000 Да) препарата Лаеннек с последующим биоинформационным анализом функций обнаруженных пептидов. Исследование проводилось с использованием современных методов молекулярной биологии, биохимии и биофизики – масс-спектрометрии, пептидного секвенирования и биоинформационного анализа полученных последовательностей пептидов.

Для решения задач молекулярной фармакологии пептидных препаратов использован универсальный метод исследования, включающий 4 основные стадии:

- выделение пептидов, сбор экспериментальных данных о масс-спектрах и секвенирование выделенных пептидов;
- реконструкция аминокислотных последовательностей пептидов на основе экспериментальных данных и баз данных известных белковых последовательностей;
- идентификация пептидов и фрагментов белков в составе препарата;

– прогнозирование биологических функций установленных последовательностей пептидов на основе интегрированного метода функционального анализа [8].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

А. Приборная база

Масс-спектрометры MALDI-TOF REFLEX IV (BRUKER) и ESI-MS/MS с аппаратом капиллярного электрофореза и высокоэффективным жидкостным хроматографом (AGILENT); роботизированный комплекс для нанесения образцов – робот-дозатор Biomek 2000 0,5–1,5 ml (Beckman Coulter).

Б. Методика экспериментального исследования

Экспериментальное исследование состояло из 4 частей: очистки препарата, определения масс-спектра пептидной фракции, хроматографического разделения компонентов, установления аминокислотной последовательности пептидов.

Очистка препарата заключалась в отделении липидной фракции и обессоливании. Для отделения липидной фракции использовался модифицированный метод Брокерхоффа–Дэусона–Хюбшера [9]. Сначала проводили мягкое щелочное дезацилирование фосфолипидов. Методику обрабатывали на смеси протеолипосом (объемом 1 мл), состоящей из 1–20 мг фосфатидилхолина и 0,05–0,2 мг бацитрацина или грамицидина А.

Один миллилитр образца очищенного Лаеннека лиофилизировали, добавляли смесь гексан:метанол (1:1, v/v) и разводили в 2 раза 0,25 М раствором NaOH в метаноле. Затем 30 мин инкубировали при встряхивании при комнатной температуре и 15 мин – при 75° С. Последовательно добавляли метанол, гексан и воду (1:4:4, v/v), перемешивали и центрифугировали 1 мин при 1000 g. Фракцию с гексаном отбирали, водно-метанольную нейтрализовали HCl до pH 4–6. К нейтрализованной водно-метанольной фракции добавляли гексан, перемешивали, центрифугировали 1 мин при 1000 g, осторожно отбирали фракцию с гекса-

ном, не затрагивая осадок на границе раздела фаз. Повторяли процедуру 4 раза.

Водно-метанольную фракцию объединяли, лиофилизировали, осадок ресуспендировали в смеси метанол:вода (1:1), центрифугировали (1 мин при 1000 оборотах), супернатант сливали, затем ресуспендировали в смеси хлороформ:метанол (1:1) с 0,2%-ной трифторуксусной кислотой (ТФУ), снова центрифугировали (1 мин при 1000 оборотах), супернатанты объединяли, высушивали от хлороформа и обессоливали.

Обессоливание пептидов проводили на мини-колонке с помощью центрифугирования [10]. В мини-колонку 0,75x4,5 см (Raining Instrument, США) наливали 2 мл сефадекса G-10 (Pharmacia, Швеция) в смеси метанол:вода (85:15, v/v), по каплям добавляли 160 мкл той же смеси и центрифугировали 1 мин при ускорении 1000 g. Процедуру повторяли до тех пор, пока на выходе не оставалось 150 мкл раствора.

После этого 160 мкл образца по каплям наносили в подготовленную колонку и центрифугировали, как описано выше. Гель после однократного использования заменяли. После процедуры обессоливания потери белка составляли не более 35%.

Получение масс-спектров пептидной фракции

Масс-спектры получали на приборе Reflex IV MALDI-TOF (Bruker, Германия) в рефлекторном режиме, используя азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса 9 Hz в режиме положительных ионов. Время задержки анализатора – 200 нс, напряжение на электроде ускорителя – 20,0 kV, на накапливающем электроде – 16,5 kV, на фокусирующей линзе – 9,5 kV, на рефлекторе – 23,0 kV. Параметры масс-спектрометра были оптимизированы для диапазона m/z от 0 до 4000, для определения калибровочных констант использованы масс-спектры пептидов [11].

Полученные масс-спектры пептидов дополнительно калибровали по внутренним стандартам по известным массам. Каждый масс-спектр получали усреднением 300 накоплений с разных точек образца при мощности лазерного излучения на уровне порогового значения. Для всех образцов использовали в качестве матрицы 65 mM раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Fluka, Германия) в 20%-ном ацетонитриле с добавлением

0,1%-ной трифторуксусной кислоты (Merck, Германия).

Леофилизированные пептиды растворяли в 10 мкл 50%-ного ацетонитрила с добавлением 0,1%-ной трифторуксусной кислоты. После этого 0,3 мкл образца наносили на мишень *ground surface steel* (Bruker Daltonic, Германия), добавляли 0,3 мкл раствора матрицы и высушивали на воздухе. Для рекристаллизации добавляли 1–2 раза по 0,3 мкл раствора матрицы с промежуточной просушкой на воздухе до получения видимых при 10-кратном увеличении кристаллов. Все использованные растворители, включая воду (Merck, Германия), были только аналитической чистоты или специально предназначенные для масс-спектрометрии.

Подготовка проб проводилась смешиванием 200 мл препарата Лаеннек с 300 мл смеси этилацетат:хлористый метиленизопропанол (6:3:1), полученную смесь встряхивали на шейкере 20 мин при скорости 120 об./мин.

Образовавшуюся органическую фазу отбирали и переносили в виалу. Содержимое виалы упаривали в токе гелия до сухого остатка. К сухому остатку добавляли 15000 мкл этилацетата, тщательно смывали содержимое со стенки и переносили в прибор для проведения масс-спектрометрического анализа.

Хроматографическое разделение пептидной фракции проводили по методу, описанному П.Г. Лоховым и соавт. [12], с использованием ВЭЖХ-хроматографа AGILENT на колонке Диасорб С16Т (Элсико, Россия). Скорость потока – 0,8 мл/мин, объем образца 50–1000 мкл при температуре 20° С. Детекцию фракций проводили с помощью УФ-детектора на частоте волны 214 нм.

Выяснение аминокислотной последовательности пептидов (секвенирование)

Определение N-концевой аминокислотной последовательности проводили на приборе Protein/Peptide Sequencer (модель 477A) (Applied Biosystems, США). Идентификацию ФТТ-аминокислот проводили на анализаторе 120A PTH Analyzer (Applied Biosystems, США). В основе методики автоматического определения аминокислотной последовательности пептидов и белков лежит стандартный метод химической деградации полипептидной цепи по Эдману [13].

Пептидный состав препарата плаценты человека Лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования была получена масс-спектрограмма пептидных фрагментов церебролизина и набор аминокислотных последовательностей, полученных в результате секвенирования (рис. 1). Масс-спектрометрия (МС) и секвенирование являются независимыми методами исследования качественного и количественного состава сложных препаратов. В таблице 1 приведены результаты сравнительного анализа данных, полученных этими методами.

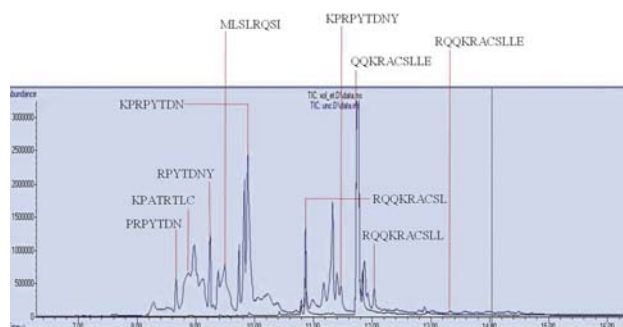


Рис. 1. Масс-спектрограмма пептидов «легкой» пептидной фракции Лаеннека

Сравнительный анализ показал хорошее соответствие между результатами секвенирования пептидов в составе препарата и пиками масс-спектрограммы – большинство пиков на масс-спектрограмме могут быть объяснены на основе результатов секвенирования пептидов.

Результаты идентификации секвенированных пептидов «легких» фракций Лаеннека при-

ТАБЛ. 1. АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ПОЛУЧЕННЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ СЕКВИНИРОВАНИЯ ПЕПТИДОВ «ЛЕГКОЙ» ФРАКЦИИ ЛАЕННЕКА И ДАННЫЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОБРАЗЦОВ «ЛЕГКОЙ» ПЕПТИДНОЙ ФРАКЦИИ

№	Последовательность	m , г/моль	Пик МС, $p=m/z$	Интерпретация
1	DEL	375	–	
2	KIPYI	632	–	
3	SSFGI	509	–	Пики находились в участке масс-спектра с высоким уровнем шума ($m/z < 700$)
4	DAVID	531	–	
5	SRLL	487	–	
6	MSLRQSI	947	950	
7	KPATRTLC	888	891	пептид, $z=+1$
8	KPRPYTDNY	1153	1150	пептид, $z=+1$
	KPRPYTDN	1088	1090	фрагмент
	RPYTDNY	928	925	фрагмент
	PRPYTDN	862	865	фрагмент
9	RQQRACSLLE	1331	1330	пептид, $z=+1$
	RQQRACSL	1201	1203	фрагмент
	QQRACSLLE	1174	1178	фрагмент
	RQQRACSL	1088	1091	фрагмент
10	LCSLEFYTKIVCL			
	CSEFDKIVCCLY CHLC	3391	–	Диапазон масс-спектра не исследовался

m – молекулярная масса, полученная в результате секвенирования;
 $p=m/z$ – отношение массы к заряду, полученное в ходе МС-эксперимента.

ведены в таблице 2. Считается, что для «легких» фракций (с молекулярной массой пептидов менее 2000 Да) длина пептидной цепи не может превышать 20–30 аминокислотных остатков. Длина всех установленных последовательностей пептидов (кроме 29-аминокислотного пептида LCSLE...) не превышала 11 аминокислотных остатков. Сравнительно небольшая длина некоторых пептидных фрагментов (у DEL – 3 аминокислотных остатка, у KPYI – 5 и др.) затрудняла их идентификацию. Например, при поиске по базам данных пептида с аминокислотной последовательностью DEL (аспартат-глутамат-лейцин) было найдено более 4000 белков, в которые входит данный пептидный фрагмент. Поэтому для каждого из пептидов в таблице 2 приведены альтернативные интерпретации.

По своей функциональной значимости пептидные фрагменты, выделенные из «легкой» фракции Лаеннека, подразделяются на 3 группы:

- фрагменты внутриклеточных белков, участие которых в воздействии Лаеннека на организм заведомо исключено;
- фрагменты белков, которые могут вносить определенный вклад в действие препарата, но сами не имеют известного функционального значения;
- фрагменты активных пептидов, способные играть существенную роль в том влиянии, которое оказывает на организм препарат Лаеннек.

1. Фрагменты внутриклеточных белков, участие которых в воздействии Лаеннека на организм заведомо исключено. Очевидно, что пептиды

ТАБЛ. 2. РЕЗУЛЬТАТЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПЕПТИДОВ «ЛЕГКИХ» (ДО 2000 ДА) ФРАКЦИЙ ПРЕПАРАТА ЛАЕННЕК И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

№	Пептид	Идентификация
	DEL	Более 4000 белков
	KPYI	Активный пептид нейромедина N; фрагмент 44–47 (PYI) белка плюрипотентности 5 (DPPA5)
1	SSFGI	Фрагмент 30–34 иммуноглобулина G (сайт связывания антигена); фрагмент 318–322 ГДФ-D-глюкоза фосфорилазы 1, 9–13 ВагН-подобного белка, 615–619 экзофилин-5 и т.д.
	DAVID	Белок с неизвестной функцией CXorf30; фрагмент 330–334 e3 убиквитин лигазы
	SRLI	Более 700 белков, среди них: фрагмент 17–20 инсулиноподобного фактора роста (сигнальный пептид, 1–20), фрагмент 69–72 натриуретического пептида C (пропептид, 24–73)
2	MLSLRQSI	Фрагмент 86–92 пропептида ИЛ-1, фрагмент 1295–1300 белка с доменом фибронектина III
	KPATRTLK	Фрагмент 32–38 белка «цинковый палец-135»
	KPRPYTDNY	Фрагмент 3–8 гистон-лизин метилтрансферазы SETD2; фрагменты белков с неизвестной функцией KIAA1211 и Ctorf173
3	RQQKRACSLLE	Фрагмент 183–192 малого G-белка Rac2, взаимодействующий с рецептором Raf; активный фрагмент 79–83 пептида, связанного с геном кальцитонина (кокальцитогенин 1); Са-связывающий фрагмент 198–205 тестикана-3
	LCSLEFYTKIVCLCSEFDKIVCCLYCHLC	Не найдено белка, в который этот пептид входит целиком; проведена идентификация фрагментов: LCSLEFY – фрагмент 257–263 гомолога лизилоксидазы 3; KIVCLC – фрагмент 264–269 калиевый канал средней проводимости 4; SEFDK – фрагмент 66–70 пролактинина; LYCH – Zn-связывающий пептид 83–87 Са-связывающего белка S100A3

№ – номер хроматографической фракции, в которой был найден соответствующий пептид.

Пептидный состав препарата плаценты человека Лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека

этой группы наименее интересны. Фрагменты таких внутриклеточных ферментов, как ГДФ-Д-глюкоза фосфорилазы 1, e3 убиквитин лигазы, гистон-лизин метилтрансферазы и др., даже если и оказывали бы влияние на активность этих ферментов, заведомо не имеют определенных молекулярных механизмов такого воздействия при внутривенном или подкожном введении и в принципе не могут быть использованы для объяснения терапевтического действия Лаеннека. Это соображение еще в большей степени касается пептидных фрагментов белков с неизвестной функцией – CXORF30, KIAA1211 и Clorf173. Поэтому, далее рассматриваются только пептиды второй и третьей групп.

2. Ко второй группе пептидов, идентифицированных в «легких» фракциях Лаеннека, мы отнесли *фрагменты тех белков, которые могут вносить определенный вклад в действие препарата, но сами не имеют известного функционального значения* и могут только указывать на присутствие в составе препарата других, функционально значимых фрагментов соответствующих белков или целых белков. К таким пептидам относятся SRLL (который, в частности, соответствует фрагменту сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста и фрагменту пропептида натрийуретического пептида С), SSFGI (соответствующий фрагменту 30–34 иммуноглобулина G), MLSLRQSI (представляющий собой фрагмент 86–92 пропептида интерлейкина-1 α) и фрагмент SEFDK (который соответствует, в частности, фрагменту 66–70 пролактина). Активные пептиды этих белков (которые, скорее всего, присутствуют в более тяжелых пептидных фракциях Лаеннека) могут вызывать гепатопротекторное действие препарата, способствовать регуляции веса, повышению чувствительности клеток к инсулину. Эти терапевтические эффекты составляют основу так называемой «геронтопротекции».

Инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1, соматомедин С) осуществляет эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки

клеток и тканей организма. ИФР-1 производится гепатоцитами печени в ответ на стимуляцию их соматотропных рецепторов и способствует осуществлению физиологического воздействия соматотропного гормона. Уровень содержания в крови ИФР-1 зависит от действия на печень не только соматотропного гормона, но и половых стероидов и тиреоидных гормонов, глюкокортикоидов, инсулина.

ИФР-1 синергичен с инсулином и соматотропином по отношению к процессам роста и развития тканей. ИФР-1 связывается с одноименным рецептором IGF1R, который был найден во многих тканях. При связывании ИФР-1 тирозинкиназный домен ИФР-1-рецептора активируется и, в свою очередь, инициирует передачу внутриклеточного сигнала по каскаду АКТ, стимулирующему рост и воспроизводство тканей, в частности, скелетных мышц, соединительной ткани, печени, почек, нервов, кожи и легких.

Натрийуретический пептид С (НП-С, аминокислотная последовательность пептида – GLSKGCFGLKLDRIQSMSGGLGC) был найден практически во всех типах клеток. Натрийуретические пептиды А, В, С обладают выраженными диуретическими (в том числе натрийуретическими) и вазодилаторными свойствами, играя важную роль в поддержке гомеостаза жидкости и артериального давления (АД) [14, 15].

Биологические функции НП-С осуществляются через взаимодействие пептида со специфическим рецептором. Взаимодействие с рецептором приводит к активации передачи сигнала посредством G-белков и Mg-зависимой гуанидилциклазы. Данный сигнальный каскад осуществляет регуляцию тонуса сосудов, клубочковой проницаемости, играет важную роль в ренопротекции за счет ингибирования ренин-ангиотензиновой системы и секреции альдостерона. Увеличение выброса НП-С у пациентов с хронической сердечной недостаточностью на фоне повышенного артериального давления способствует снятию пастозности, отеков, что в конечном итоге вносит важный вклад в нормализацию АД [16–18]. Терапия пастозности, отеков любого происхождения – важное направление эстетической медицины.

Иммуноглобулин G связывает многие виды патогенов, в том числе вирусов, бактерий и грибов, и защищает организм посредством иммобилизации, активации комплемента, опсонизации

ции фагоцитоза. IgG-антитела – единственный тип антител, которые могут проходить через плаценту человека, тем самым обеспечивая защиту плода в утробе матери. IgG всасывается через плаценту и обеспечивает плод гуморальным иммунитетом [19, 20]. Пептид SSFGI, найденный в составе Лаеннека, образует связывающий сайт антигена в молекуле IgG (рис. 2). IgG участвует в формировании противовирусного и противобактериального иммунитета. Исследования, проведенные в НИИ иммунологии РАМН, показали высокую эффективность препарата Лаеннек у пациентов с atopическим дерматитом, причем у пациентов не только улучшилось состояние по основному заболеванию, но они также стали реже болеть острыми респираторными заболеваниями [1].

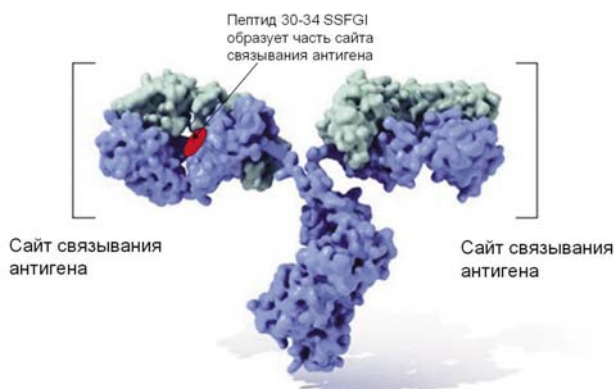


Рис. 2. Пространственная структура иммуноглобулина G [21]

Интерлейкин-1 α (ИЛ-1A) и другие интерлейкины играют ключевую роль в регуляции иммунных и воспалительных реакций. ИЛ-1A синтезируют макрофаги, моноциты, фибробласты и дендритные клетки для воспалительного ответа организма при инфекции [22], что поддерживает барьерную функцию эпидермиса [23]. Секретируемый интерлейкин-1 α активирует многие другие типы клеток – гранулоциты, эозинофилы, тучные клетки базофилов, эндотелиальные клетки, моноциты, Т- и В-лимфоциты, астроциты, мезангиальные клетки почек, клетки Лангерганса, дендритные клетки кожи и клетки плаценты. ИЛ-1A также важен для регуляции кроветворения. Активация многих этих типов клеток, в особенности поддержка барьерной функции кожи, важна для реализации иммуномодуляторных свойств препарата Лаеннек.

Пролактин. В составе «легкой» пептидной фракции Лаеннека обнаружен мотив SEFDK, который может входить в состав пролактина (фрагмент 66–70). Пролактин (рис. 3) наиболее известен как гормон, стимулирующий лактацию.



Рис. 3. Пространственная структура пролактина [24]

Однако лактация – далеко не единственный физиологический процесс, в регуляции которого участвует пролактин. В настоящее время известно более 300 биологических ролей пролактина, в том числе влияние на водно-солевой баланс, рост и развитие, обмен веществ, функцию нейронов, иммунитет, гемостаз, кроветворение, ангиогенез [25–27]. Пролактин обладает также рядом других свойств, в частности способствует синтезу сурфактанта легких плода в конце беременности и поддержанию иммуноtolерантности организма матери к плоду. Важно отметить положительное действие пролактина на клетки нервной системы: он стимулирует рост клеток-предшественников олигодендроцитов, необходимых для формирования миелиновых покрытий аксонов [28], и интенсифицирует нейрогенез у матери и плода [29, 30].

3. Наконец, к третьей группе пептидов, аминокислотная последовательность которых была установлена в ходе настоящего исследования, мы отнесли *фрагменты активных пептидов, способные играть существенную роль в том влиянии, которое оказывает на организм препарат Лаеннек.*

Активный пептид нейромедина N. В составе препарата Лаеннек достоверно установлено присутствие аминокислотной последовательности KIPYI (рис. 4), соответствующей биологически активному пептиду нейромедина N. Нейромедин и нейротензин – нейропептиды, ►

Пептидный состав препарата плаценты человека Лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека

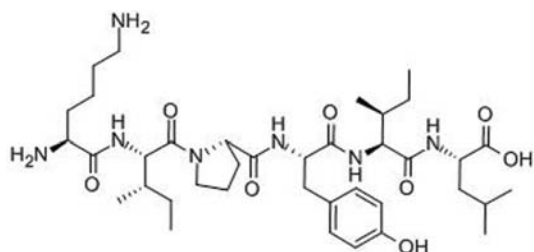


Рис. 4. Химическая структура нейромедина N (аминокислотная последовательность KIPYI)

синтезирующиеся из одного пробелка, кодируемого геном NTS. Данные пептиды характеризуются нейролептическим и анальгезическим действием, регулируют допаминовую и ГАМК-нейротрансмиссию в клетках головного мозга [31].

В эксперименте дополнение регулярного приема нейролептиков инъекциями нейротензина и нейромедина способствовало снижению негативных экстрапирамидальных эффектов [32]. Биологическое действие нейротензина и нейромедина осуществляется через одноименные NT-рецепторы, которые являются перспективными таргетными белками для синтеза новых антипсихотических лекарств. В частности, активация NT-рецепторов может быть весьма полезна в терапии психических расстройств [33].

Низкоаффинные рецепторы типа NTS2 играют важную роль в осуществлении антиноцицептивных свойств нейромедина. В экспериментальном исследовании [34] было показано, что связывание NTS2-рецепторами активного пептида нейромедина приводит к интернализации рецептора внутри клетки с последующей активацией внутриклеточного сигнального каскада внеклеточно-регулируемых киназ 1/2 (ERK1/2), который, как известно, вовлечен в выживание клеток (нейронов, гепатоцитов, клеток эндотелия и др.). Интернализация рецептора (т.е. перемещение его внутрь клетки) и активация сигнальных путей ERK1/2 (рис. 5) служат также молекулярно-клеточными механизмами осуществления анальгезии. Стимуляция сигнального каскада ERK1/2 активным пептидом нейромедина N в составе

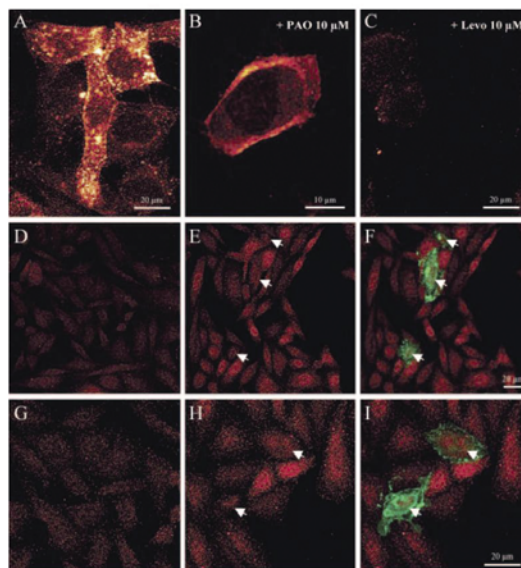


Рис. 5. Роль интернализации рецептора NTS2 в активации сигнального каскада ERK1/2 [34]. А–С – активация рецепторов различными лигандами: нейротензином/нейромедином (А), ингибитором PAO (В), левокабастинном (С). Яркость свечения точек отражает интенсивность активации рецепторов. D–I – прокрашивание для установления активации каскада ERK1/2 нейротензином/нейромедином: D и G – базальный уровень активации каскада, E и H – появление активных форм рецепторов; F и I – активация всего каскада ERK1/2. Зеленые точки – фосфорилированная форма ERK1/2

препарата Лаеннек является одним из возможных механизмов его гепатопротекторного, нефропротекторного, кардиопротекторного и, возможно, нейропротекторного действия.

Фрагмент активного пептида кокальцигенина. В составе аминокислотной последовательности RQQKRACSLLE присутствует пептид QKRAC, соответствующий фрагменту 79–83 активного пептида кокальцигенина. Хотя пептид QKRAC находится в составе более длинной последовательности RQQK... он все же может оказывать кросс-реактивное положительное воздействие, являясь пептидом-миметиком кокальцигенина.

Кокальцигенин, известный также как «относящийся к гену кальцитонина пептид» (calcitonin gene-related peptide, CGRP), является сильным вазодилататором, участвует в процессах ноцицепции и в организме человека синтезируется в нейронах центральной и периферической нервной системы. Рецепторы

CGRP осуществляют биологическое действие пептида посредством активации G-белков и аденилатциклаз. CGRP-рецепторы найдены в респираторной, эндокринной, иммунной и сердечно-сосудистой системах, что указывает на возможность регуляции кальцигенином многочисленных физиологических процессов [35, 36].

В частности, кокальцигенин способствует ускорению регенерации, более полноценному и быстрому заживлению ран и переломов. Клинические и экспериментальные исследования показывают, что более высокая скорость зарастания перелома (например, при черепно-мозговой травме) ассоциирована с более высоким уровнем содержания пептида CGRP в сыворотке крови [37, 38]. Он также способствует ускорению заживления интестинального анастомоза путем снижения уровня содержания провоспалительного белка ФНО-альфа [39]. В эксперименте делеции гена CGRP приводили к подавлению ангиогенеза при заживлении ран, а также к снижению скорости заживления ран и качества образующегося рубца. Низкое содержание пептида сопровождалось снижением уровней экспрессии фактора роста васкулярного эндотелия VEGF [40].

Фрагмент малого G-белка Rac2. В составе препарата Лаеннек установлено присутствие пептида RQQKRACSLLE, соответствующего фрагменту 183–192 малого G-белка Rac2 – белка внутриклеточной сигнализации, взаимодействующего со многими другими сигнальными белками в рамках многочисленных сигнальных каскадов. Пептид RQQ... являет-

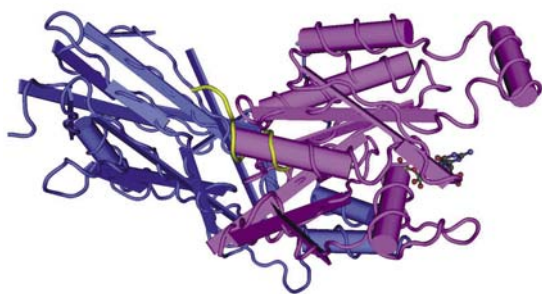


Рис. 6. Пространственная структура малого G-белка Rac2 (справа) в комплексе с одним из белков-рецепторов RAf (слева). Желтым цветом выделен пептид RQQKRACSLLE, найденный в составе препарата Лаеннек. Данный пептид образует часть рецепторсвязывающего участка белка Rac2. Модель создана на основе PDB-файлов 1DS6, 1CIY

ся, с большой долей вероятности, функциональным пептидом, так как в пространственной структуре с белком-рецептором данный пептид находится в непосредственной близости от белок-белкового интерфейса «белок-рецептор» (рис. 6).

Малый G-белок Rac2 участвует более чем в 20 сигнальных каскадах, обеспечивающих процессы физиологического роста, дифференцировки и выживания клеток, нейротрофическое действие, углеводный метаболизм и др. Рассмотрим более подробно некоторые из этих сигнальных каскадов, активность которых может быть важна для осуществления терапевтического воздействия препарата Лаеннек, – каскады нетринов, фактора роста нервов и рецептора инсулина.

Каскады нетринов. Нетрины (от санскр. «нетр» – «тот, кто ведет») – сигнальные белковые молекулы, вовлеченные в стимулирование роста аксонов в определенном направлении. Нетрины являются хемотропами, что означает, что растущий аксон будет направляться в сторону повышенной концентрации нетрина одного типа или же, наоборот, избегать роста в направлении повышенной концентрации нетрина другого типа. Нетрины также действуют как факторы роста других клеток (гепатоцитов, миокардиоцитов и др). Кроме того, нетрины играют важную роль в ангиогенезе сетчатки.

Можно предположить, что препарат Лаеннек, содержащий участвующий в каскадах нетринов малый G-белок Rac2, окажется перспективен в офтальмологии (в частности, при лечении патологии сосудов сетчатки) так же, как и использованные в работах проф. В.П. Филатова препараты плаценты.

В сигнальном каскаде фактора роста нервов (ФРН) белок Rac2 является адаптором, т.е. белком, передающим сигнал активированного рецептора фактора роста нервов (тирозинкиназы TRKA) на систему, активирующую процесс полимеризации внутриклеточного актина (рис. 7). Полимеризация актина необходима для роста и дифференциации нейрита. Поэтому найденный в составе Лаеннека пептид RQQKRACSLLE, являющийся функционально важным участком белка Rac2, может проявлять нейротрофические свойства, обусловленные активацией каскада ФРН.

Белок Rac2 служит также существенно важным передатчиком внутриклеточного

Пептидный состав препарата плаценты человека Лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека

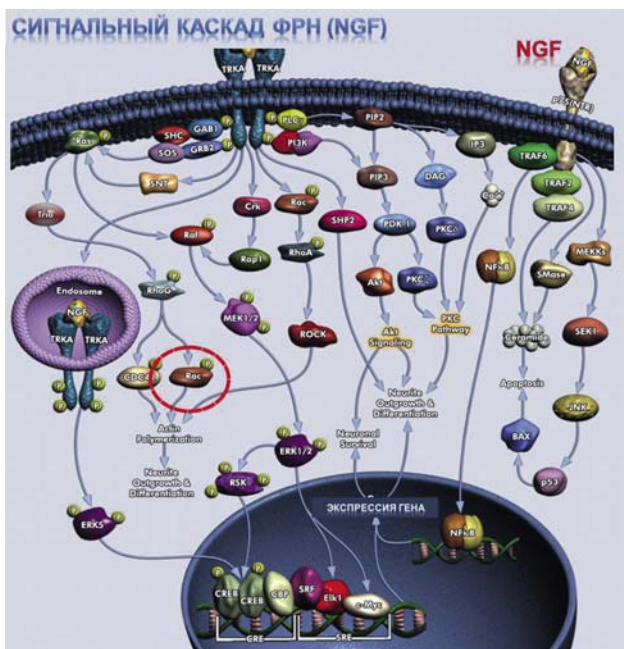


Рис. 7. Сигнальный каскад фактора роста нервов. Отмечено расположение на диаграмме белка Rac2 [41]

сигнала в каскаде инсулинового рецептора (рис. 8). Инсулин, связанный с одноименным рецептором, приводит к активации сигнального фермента фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). Последний, взаимодействуя с белком Rac2, активирует факторы транскрипции ДНК JNK/c-JUN и факторы трансляции РНК р70S6K, EEF2K, EEF2, которые, собственно, и являются внутриклеточными исполнительными механизмами рецептора инсулина, стимулирующими метаболизм углеводов и активное поглощение глюкозы клетками тканей.

Активность этих и других сигнальных путей, в которые вовлечен белок Rac2, важна для процессов репарации тканей. Пептид RQQKRACSLLE в составе Лаеннека может имитировать связывание Rac2 с соответствующими белками сигнальных каскадов, активируя восстановление тканей и клеток. В частности, сигнальный путь стромального фактора-1/рецептора хемокинов-4 необходим для ангиогенеза

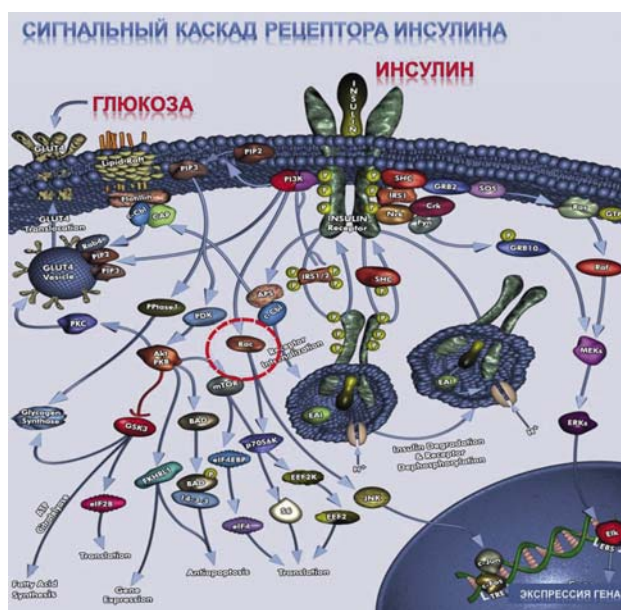


Рис. 8. Сигнальный каскад рецептора инсулина и белка Rac2 [42]

неза и восстановления пораженного эпителия. Этот сигнальный путь регулирует морфологию клетки в процессе дифференциации клеток-предшественников эндотелия [43].

Активность белка RAC2 в клетках эндотелия принципиально важна для ангиогенеза [44]. Эксперимент показал, что у животных без соответствующего гена (RAC2^{-/-}) значительно замедлена направляемая интегринными $\alpha v\beta 3/\alpha 4\beta 1/\alpha 5\beta 1$ миграция клеток-предшественников эндотелиоцитов. Отсутствие активности RAC2 у животных линии RAC2^{-/-} приводило к значительной эндотелиальной дисфункции (рис. 9) и существенно снижало ангиогенез (рис. 10).

У животных моделей с ишемией при перевязке задней конечности делеция гена приводила к значительному снижению кровотока (рис. 11).

Активность белка Rac2 имеет большое значение для ранозаживления. Одним из путей воздействия на заживление ран является регулирование миграции секретирующих перекись водорода нейтрофилов и макрофагов к месту повреждения эндотелия [45]. Rac2 регулирует активацию индуцируемых НАДФ оксидаз и другие функциональные реакции нейтрофилов. У животных с делецией гена наблюдалось 3-кратное снижение синтеза перекиси водорода по сравнению с его син-

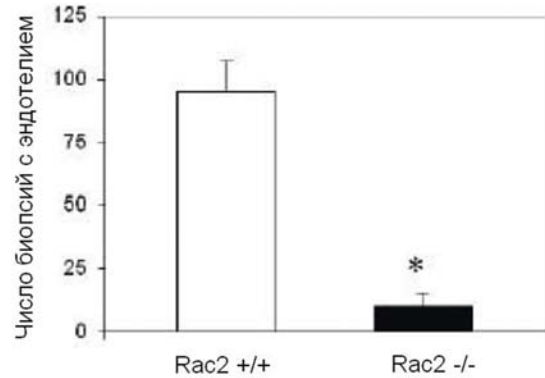
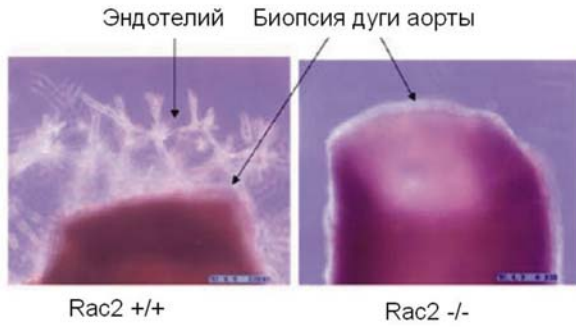


Рис. 9. Рост дуги аорты у животных «дикого» типа (RAC2 +/+) и с делецией гена (RAC2 -/-) [44]. Слева – репрезентативная фотография, сравнивающая миграцию эпителия к зоне роста дуги аорты. Ув. 1:600. Справа – результаты численной оценки интенсивности роста дуги аорты. Разница статистически достоверна (*, $p < 0,0001$)

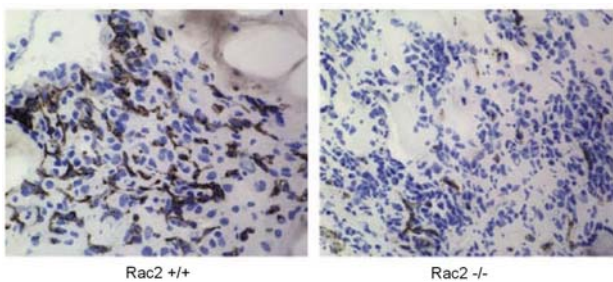


Рис. 10. Прокраска на маркер эндотелия аорты CD31 указывает на существенное снижение интенсивности образования микрососудов при делеции гена RAC 2. Ув. 1:400, окраска фуксином

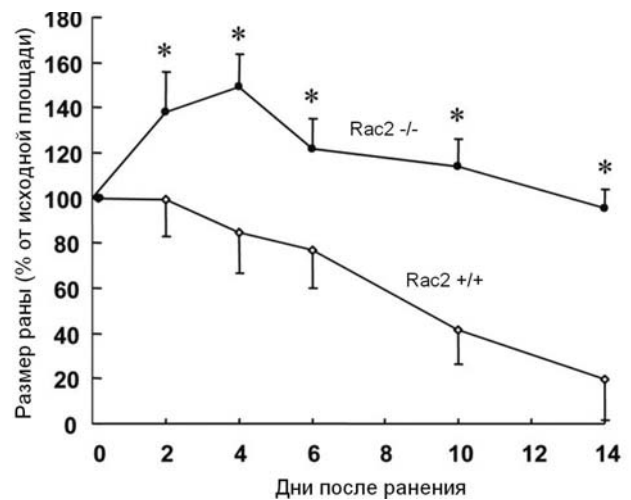


Рис. 12. Медленное заживление ран при делеции гена RAC 2 (RAC 2 -/-) (* – $p < 0,05$)

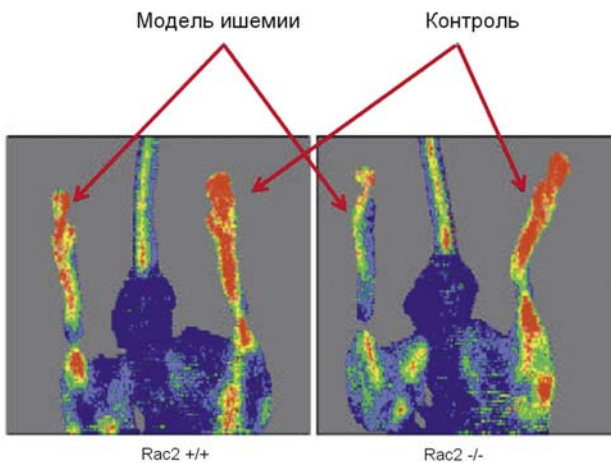


Рис. 11. Исследование перфузии конечностей методом лазерной доплерографии показало значительное снижение перфузии при делеции гена RAC2 у моделей с ишемией при перевязке задней конечности. На 7 день после перевязки у животных в группе RAC2 +/+ наблюдалось улучшение кровотока, тогда как в группе RAC2 -/- (с делецией гена) ишемические поражения сохранялись. Ув. 1:2000, компьютерная цифровая программа распознавания лазерной доплерометрии

тезом у животных контрольной группы. Это приводило к значительному увеличению времени ранозаживления (рис. 12).

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракты плаценты человека способствуют ускорению регенерации, заживлению ран и устранению дефектов кожи [46, 47], особенно в послеоперационном периоде [48, 49]. По данным экспериментальных и клинических исследований плацентарные экстракты могут использоваться для иммунорегуляции, ранозаживления, нейротрофической терапии, нормализации пигментации кожи, восстановления

Пептидный состав препарата плаценты человека Лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека

▶ волосяного покрова, гепатопротекции и в терапии климактерия.

В настоящем исследовании впервые проведено изучение «легких» пептидных фракций препарата Лаеннек, хорошо зарекомендовавшего себя в клинической практике (в иммунологии, аллергологии, гастроэнтерологии, эстетической медицине). Работы позволили установить наличие в составе препарата активного пептида нейромедина N, сигнального белка Ras 2, фрагмента активного пептида кокальцигенина, указать на наличие в составе препарата активных пептидов инсулиноподобного фактора роста, натрийуретического пептида C, иммуноглобулина G, интерлейкина-1α. Данные пептиды могут в значительной мере обуславливать высокую терапевтическую эффективность препарата Лаеннек, наблюдаемую в клинической практике и экспериментальных исследованиях.

Использование Лаеннека – экстракта плаценты, стандартизированного по определенным показателям состава (аминокислотам, пептидам, микроэлементам, витаминам и др.), – позволяет достигать высокой эффективности коррекции. Препарат безопасен в применении.

Литература

1. Громова ОА, Торшин ИЮ, Диброва ЕА, Каримова ИМ, Гилельс АВ, Кустова ЕВ Мировой опыт применения препаратов из плаценты человека. *Пластическая хирургия и косметология*, 2011(2):63–67.
2. Voeckmann B, Vairoch A, Arweiler R, et al. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Research*, 2003;31(1):365–370.
3. Beysac I, Martini MC, Cotte J. Oestrogen identification and dosage in filatov human placenta extracts by high performance liquid chromatography. *Int J Cosmet Sci*, 1986;8(4):175–188.
4. Julliard JH, Shibasaki T, Ling N, Guillemin R. High-molecular-weight immunoreactive beta-endorphin in extracts of human placenta is a fragment of immunoglobulin G. *Science*, 1980;208(4440):183–185.
5. Sastry BV, Tayeb OS, Barnwell SL. Peptides from human placenta: methionine enkephalin and substance P. *Placenta Suppl*, 1981;3:327–337.
6. Sakura H, Aoki S, Ozawa T. The neuropeptide, head activator, in human placenta and serum from pregnant women. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1991;125(5):454–458.
7. Громова ОА, Торшин ИЮ, Волков АЮ, Назаренко ОА, Смартыгин АВ Анализ микроэлементного состава препарата Лаеннек как основа его фармакологического действия. *Пластическая хирургия и косметология*, 2010;(4):512–687.
8. Torshin IYu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. In: *Bioinformatics in the Post-Genomic Era. Series Nova Biomedical Books*. – NY, 2009.
9. Кейтс М. Техника липидологии. Пер. с англ. – М.: Мир, 1975.
10. Дарбфе А. Практическая химия белка. Пер. с англ. – М.: Мир, 1989. С. 621.
11. Nordhoff E, Schurenberg M, Thiele G. Sample preparation protocols for MALDI-MS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports. *Int J Mass Spectrom*, 2003;226:163–180.
12. Лохов ПГ, Ипатова ОМ, Прозоровский ВН Пептидный аналог аполинотропина E усиливает клиренс липопротеинов и снижает уровень сывороточного холестерина. *Вопр мед хим*, 2001;(2).
13. Niall HD. Automated Edman degradation: the protein sequenator. *Meth Enzymol*, 1973;27:942–1010.
14. Ogawa Y, Itoh H, Yoshitake Y. Molecular cloning and chromosomal assignment of the mouse C-type natriuretic peptide (CNP) gene (Nppc): comparison with the human CNP gene (NPPC). *Genomics*, 1994;24(2):383–387.
15. Barr CS, Rhodes P, Struthers AD. C-type natriuretic peptide. *Peptides*, 1996;17(7):1243–1251.
16. Evans JJ, Youssef AH, Yandle TG. Effects of endothelin-1 on release of adrenomedullin and C-type natriuretic peptide from individual human vascular endothelial cells. *J Endocrinol*, 2002;175(1):225–232.
17. Ono K, Mannami T, Baba S. A single-nucleotide polymorphism in C-type natriuretic peptide gene may be associated with hypertension. *Hypertens Res*, 2002;25(5):727–730.
18. Hirsch JR, Skutta N, Schlatter E. Signaling and distribution of NPR-Bi, the human splice form of the natriuretic peptide receptor type B. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003;285(2):F370.
19. Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(46):19985–19990.
20. Stadlmann J, Pabst M, Kolarich D. Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *Proteomics*, 2008;8(14):2858–2871.

21. <http://creationwiki.org/Antibody>
22. Dinarello CA. *The interleukin-1 family: 10 years of discovery*. *FASEB J*, 1994;8(15):1314–1325.
23. Hauser C, Saurat JH, Schmitt A, Jaunin F, Dayer JM. *Interleukin 1 is present in normal human epidermis*. *J Immunol*, 1986;136(9):3317–3323.
24. <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures-P/Prolactin.htm>
25. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M. *Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice*. *Endocr Rev*, 1998;19(3):225–268.
26. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL. *Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects*. *Endocr Rev*, 1996;17(6):639–669.
27. Marieb EN, Hoehn K. *Human Physiology and Anatomy*. 7th ed. – London: Benjamin Cummings, 2006. P 605.
28. Gregg C, Shikar V, Larsen P, Mak G. *White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CNS*. *J Neurosci*, 2007;27(8):1812–1823.
29. Weber G. *Preparation of a tightly fastened apparatus (I)*. *Quintessenz Zahntech*, 1976;2(3):63–73.
30. Larsen CM, Grattan DR. *Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors*. *Brain Behav Immun*, 2012;26(2):201–209.
31. Li XM, Ferraro L, Tanganelli S, O'Connor WT. *Neurotensin peptides antagonistically regulate postsynaptic dopamine D2 receptors in rat nucleus accumbens: a receptor binding and microdialysis study*. *J Neural Transm Gen Sect*, 1995;102(2):125–137.
32. Stoessl AJ, Szczytkowski E. *Neurotensin and neurotensin analogues modify the effects of chronic neuroleptic administration in the rat*. *Brain Res*, 1991;558(2):289–295.
33. Kinkead B, Nemeroff CB. *Novel treatments of schizophrenia: targeting the neurotensin system*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2006;5(2):205–218.
34. Gendron L, Perron A, Payet MD. *Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2*. *Mol Pharmacol*, 2004;66(6):1421–1430.
35. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I. *International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors*. *Pharmacol Rev*, 2002;54(2):233–246.
36. Arulmani U, Maassenvandenbrink A. *Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology*. *Eur J Pharmacol*, 2004;500(1–3):315–330.
37. Song Y, Bi L, Zhang Z. *Increased levels of calcitonin gene-related peptide in serum accelerate fracture healing following traumatic brain injury*. *Mol Med Report*. 2012;5(2):432–8 doi.
38. Sample SJ, Hao Z, Wilson AP. *Role of calcitonin gene-related peptide in bone repair after cyclic fatigue loading*. *PLoS One*, 2011;6(6):e20386.
39. Leventoglu S, Koksall H, Sancak B, Taneri F, Onuk E. *The effect of calcitonin gene-related peptide on healing of intestinal anastomosis in rats with experimental obstructive jaundice*. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2009;16(4):546–551.
40. Toda M, Suzuki T, Hosono K. *Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis*. *Biomed Pharmacother*, 2008;62(6):352–359.
41. <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=320>.
42. <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=253>.
43. Shen L, Gao Y, Qian J. *The role of SDF-1alpha/Rac pathway in the regulation of endothelial progenitor cell polarity; homing and expression of Rac1, Rac2 during endothelial repair*. *Mol Cell Biochem*, 2012;365(1–2):1–7.
44. De P, Peng Q, Traktuev DO, Li W. *Expression of RAC2 in endothelial cells is required for the postnatal neovascular response*. *Exp Cell Res*, 2009;315(2):248–263.
45. Ojha N, Roy S, He G, Biswas S. *Assessment of wound-site redox environment and the significance of Rac2 in cutaneous healing*. *Free Radic Biol Med*, 2008;44(4):682–91.
46. TIELSCH R. *Treatment of skin defects with a natural placental extract*. *Wien Med Wochenschr*, 1961;111:408–410.
47. MARINO H, BENAİM F. *Influence of placental extracts on skin homografts*. *Dia Med*, 1960;32:578–581.
48. BRIGUGLIO A. *On 100 cases of surgical diseases treated with a cold-sterilized placental extract*. *Minerva Med*, 1962;53:3118–3123.
49. MARTIN P. *Treatment of severe fractures and pseudarthrosis with the aid of concentrated placental extracts*. *Scalpel (Brux)*, 1958;111(41):971–981.