

АВТОРИТЕТНОЕ МНЕНИЕ



Среди иммуномодуляторов, нашедших широкое применение в лечебной практике, особое место занимает отечественный препарат «Ликопид» фирмы «Петтек». Этот препарат успешно используется при лечении заболеваний инфекционной природы и некоторых других. Однако до последнего времени механизм его иммуномодулирующего действия оставался неясным. В связи с этим, наше внимание привлекло выступление профессора Роберта Бомфорда (Великобритания) на 14-ом Национальном конгрессе по болезням органов дыхания в июне 2004 г., в Москве. Ученый согласился ответить на наши вопросы.

- Уважаемый профессор Р.Бомфорд, принимали ли Вы участие в создании препарата «Ликопид»?

В течение многих лет мы с Татьяной Михайловной Андроновой и ее коллегами по Институту биоорганической химии имени Шемякина и Овчинникова в Москве проводили совместные научные изыскания по фундаментальным и прикладным аспектам мурамилдипептидов. В моей лаборатории в Англии мы вместе работали над применением глюкозаминдипептид (ГМДП) в качестве адъюванта при приготовлении вакцин и сделали важные наблюдения по стимуляции Th2-лимфоцитов. После этого я стал Научным Директором английской компании, в сферу деятельности которой входила разработка мурамилдипептидов на Западе. Проводилась программа клинических испытаний этих веществ как в Англии, так и здесь в России. Многими из этих испытаний в России руководил профессор Б.В. Пинегин.

Мне хотелось бы рассказать о новых важных открытиях, сделанных в лабораториях Франции и Японии, которые дают нам представление о клеточном рецепторе к мурамилдипептидам и о внутриклеточных событиях, разворачивающихся после присоединения мурамилдипептида к рецептору. Эти наблюдения являются очень важными для дальнейшей научной разработки мурамилдипептидов и последующего применения их в клинической практике.

- А какова история открытия мурамилдипептидов?

Все началось в 1974 году в Институте Пастера во Франции, когда французский ученый Ledgerer успешно выделил активный адъювантный компонент микобактерии – мурамилдипептид MDP, состоящий из 1 молекулы сахара и двух аминокислот. Впоследствии здесь в Москве в Институте биоорганической химии группа ученых под руководством профессора Иванова и доктора Андроновой выделили из других бактерий - *Lactobacillus bulgaricus* - другой мурамилдипептид ГМДП, который был идентичен выделенному французами, за исключением одной характеристики: он содержит еще одну молекулу сахара – N-ацетилглюкозамин. ГМДП имел одно весомое преимущество: он обладал иммуностимулирующей активностью и при этом был гораздо менее токсичным и подходил для использования в клинической практике.

Ясно, что следующим шагом на пути к клиническому внедрению препарата было производство больших количеств данного вещества. И группа ученых под руководством доктора Андроновой успешно разработала новый метод синтеза. При этом дисахарид выделяют из клеточной стенки бактерий, следовательно, это - натуральный продукт. Дипептид получают методами химического синтеза, при этом соединяют две молекулы. Таким способом можно получить много килограммов высококачественного лекарства.

В настоящее время в России фирма «ПЕПТЕК» производит и продает лекарственную форму ГМДП под торговым названием «ЛИКОПИД». Препарат зарегистрирован в России и может применяться по различным показаниям, главным образом, при инфекционных заболеваниях, но также и при аутоиммунном заболевании кожи – псориазе. И особенно важно то, что этот препарат активен при приеме внутрь, его не нужно вводить парентерально.

- С какими трудностями Вы встретились в ходе дальнейшего продвижения препарата?

В ходе разработки мурамилдипептида для использования в клинической практике нам приходилось контактировать с органами, ответственными за регистрацию препаратов. В Англии это Комитет по безопасности лекарственных средств, здесь в России это Фармкомитет. Мы также контактировали с инвесторами. И всегда перед нами вставали одни и те же вопросы: «Как этот препарат работает на клеточном уровне? Каков его рецептор? И что происходит внутри клетки?» И всякий раз нам с сожалением приходилось признавать, что мы не знаем этого. В этом заключался серьезный недостаток.

Безусловно, это был такой важный вопрос, что многие лаборатории пытались найти рецептор для мурамилдипептидов. Поначалу все полагали, что это может быть рецептор, находящийся на поверхности клетки. Было проведено множество экспериментов с использованием классического метода аффинного мечения для получения мурамилдипептида, содержащего радиоактивную метку. При применении данной методики можно определить количество и аффинность рецепторов на клеточной поверхности. Но эти эксперименты не дали хороших результатов.

Было установлено, что, по-видимому, имеется очень малое количество рецепторов на поверхности клетки и было трудно определить их специфичность. Одна группа американских ученых сообщила, что рецептор к мурамилдипептидам относится к группе серотониновых рецепторов, однако больше никому не удалось воспроизвести или развить эти результаты.

Следовательно, альтернативным вариантом было предположение, что рецептор может находиться внутри клетки, что это внутриклеточный рецептор. В 1991 году группа профессора В.А.Несмеянова в Институте биоорганической химии имени Шемякина и Овчинникова сделала важное наблюдение. Посредством разрушения клетки и дальнейшего поиска рецептора им удалось обнаружить рецептор с полной специфичностью к мурамилдипептидам внутри клетки.

Но природа этого рецептора оставалась неясной в течение одиннадцати лет до прошлого года, когда, как я уже сказал, одна группа ученых в Институте Пастера во Франции и одна группа ученых в Японии получили сходные результаты. Обе эти группы идентифицировали внутриклеточный рецептор к мурамилдипептидам как молекулу, называемую NOD2.

- Что такое NOD2?

Во-первых, NOD означает домен нуклеотидсвязывающей олигомеризации. Это белок, который можно обнаружить в цитоплазме. Это многочисленное семейство белков. В действительности, эти белки были впервые обнаружены не у человека, а у растений и червей - нематод. И всякий раз их наличие было связано с устойчивостью к инфекциям. У растений и нематод эти белки вызывали немедленный апоптоз и гибель инфицированной клетки.

После того, как удалось скринировать молекулярные последовательности гена человека, было открыто более 20 генов, кодирующих 4 гомологичных NOD-белка. Однако у них было одно общее свойство – все они состояли из трех участков, трех доменов. В центре располагается NOD-домен, домен нуклеотидсвязывающей олигомеризации. С-концевой участок отвечает за распознавание лиганда, в случае NOD2 лигандом является мурамилдипептид. N-терминальный домен передает информацию сигнальным молекулам и факторам транскрипции в ядре.

NOD2 экспрессируется фагоцитирующими клетками - моноцитами, гранулоцитами, дендритными и эпителиальными клетками. Все эти клетки участвуют в развитии иммунного ответа. Таким образом, месторасположение белка подчеркивает его непосредственное участие в иммунном ответе.

Можно добавить несколько слов об экспериментальной модели, в которой было показано, что NOD2 – это внутриклеточный рецептор. Обе группы начали свою работу с клетки-мишени или тестируемой клетки. Эта клетка не экспрессирует NOD2 и не отвечает на мурамилдипептиды. В эти клетки путем трансфекции была внесена плазмида, ответственная за экспрессию NOD2. После этой процедуры клетки начали экспрессировать NOD2. В то же время была произведена трансфекция плазми-

дой, содержащей ген люциферазы, которая вызывает испускание хемилюминесцентного свечения при активации ядерного фактора NF-κB. Таким образом, когда в этой экспериментальной системе на клетку воздействовал мурамилдипептид, он распознавался белком NOD2; сам NOD2 активировал NF-κB, и все это приводило к активации гена люциферазы и испусканию хемилюминесцентного сигнала. Следовательно, это очень быстрый и простой метод количественного исследования биологической активности мурамилдипептидов. К примеру, он гораздо проще, чем метод измерения уровня цитокинов, применявшийся ранее. Благодаря этой тест-системе появятся новые перспективы развития иммунофармакологии мурамилдипептидов и исследования различных аналогов для поиска новых агонистов и антагонистов.

В этой экспериментальной системе удалось продемонстрировать важную роль трансфекции клеток белком NOD2. При использовании генов других NOD белков, например, NOD1, ответ на мурамилдипептиды отсутствовал. И, в равной степени, те клетки, в которые путем трансфекции был введен NOD2, не отвечали на другие бактериальные компоненты, например, ЛПС. Чтобы заставить клетку отвечать на ЛПС, было необходимо произвести трансфекцию клетки геном, кодирующим другой рецептор – Toll-подобный рецептор 2, после чего клетка приобретает способность реагировать на ЛПС.

- А какова степень специфичности связывания Ликопада с этим рецептором?

Исследователям удалось продемонстрировать, что распознавание мурамилдипептидов белком NOD2 является строго стереоспецифичным. ГМДП, а именно Ликопад, является активным действующим началом, т.е. природный мурамилдипептид активен. Дисахарид, содержащий только две молекулы сахаров, не обладает активностью. Если происходят изменения в составе аминокислот, если L-изомер аланина заменить на D-изомер, то это отменяет активность. Таким же образом, если D-изомер изоглутамила заменить на L-изомер, то это тоже снижает активность препарата. Таким образом, очевидно, что распознавание мурамилдипептидов белком NOD2 крайне стереоспецифично. Это означает, что данная экспериментальная система может служить и для анализа дальнейших аналогов с различной специфичностью.

- А как работает этот рецептор в условиях инфекции?

Бактерии поглощаются фагоцитами и погружаются в фаголизосому, что ведет к их деградации. Так мурамилдипептид проникает в клетку. Он связывается с лиганд-связывающим доменом белка NOD2, затем происходит передача сигнала из эффекторного домена, что вызывает активацию фактора транскрипции NF-κB, который проникает в ядро и включает гены, кодирующие цитокины. Вследствие этого клетка начинает секретировать те цитокины, которые, как нам известно, и стимулируются мурамилдипептидами – IL-1, TNFα, IL-12. Эти цитокины способны стимулировать T-лимфоциты или вызывать активацию макрофагов.

- Можно ли считать вопрос о рецепторах Ликопада окончательно выясненным?

Некоторые аспекты до сих пор остаются неясными. Например, мы не знаем, как пептидогликан или мурамилдипептид проникает внутрь клетки, как он проходит через клеточную мембрану или мембраны внутриклеточных органелл. Возможно, существуют какие-то другие молекулы, участвующие в данном процессе, но до сих пор не описанные.

Значит, еще окончательно не доказано, что мурамилдипептиды вступают во взаимодействие только с лиганд-связывающим доменом белка NOD2. Возможно, в этом процессе участвуют и другие молекулы. Следовательно, нам еще предстоит многое открыть.

Тем не менее важно, что был установлен главный принцип, свидетельствующий о том, что рецептор внутриклеточный, что это белок NOD2, и он активирует транскрипционный фактор NF-κB.

Кроме того, существуют Toll-подобные рецепторы, которые играют крайне важную роль в механизмах врожденного иммунитета. Они связываются с такими бактериальными компонентами, как ЛПС, флагеллин, СРG-последовательность (мотив) бактериальной ДНК. Они также передают сигнал посредством активации фактора NF-κB. Таким образом, эти два компонента действуют синергично. Это

помогает нам осмыслить, например, тот факт, что мурамилдипептиды и ЛПС очень хорошо работают вместе как иммуностимуляторы.

- Какова роль NOD2 рецепторов при патологии?

Молекула NOD2 участвует в качестве эффектора в патогенезе такого воспалительного заболевания кишечника, как болезнь Крона. Было идентифицировано три мутации белка NOD2. Все они повышают риск развития болезни Крона. В той экспериментальной системе, которую я только что вам описал, после трансфекции в клетки рецепторов к NOD2, претерпевших мутации, эти клетки не отвечают на мурамилдипептиды. В данном случае имеют место факторы, существенно повышающие риск развития болезни Крона, и в то же время существует неспособность (недостаточность) распознавания мурамилдипептидов.

До сих пор мы точно не знаем, что же это за механизм и каким образом нарушение распознавания мурамилдипептидов повышает риск развития болезни Крона. Тем не менее, специалистами по болезни Крона было выдвинуто несколько гипотез, одна из которых состоит в следующем.

Внутренняя поверхность кишечника заселена бактериальной микрофлорой. Бактериальные пептидогликаны и мурамилдипептиды постоянно проникают через эпителий и поступают к антигенпредставляющим клеткам в стенке кишечника. В физиологических условиях эти вещества взаимодействуют с NOD2, в результате чего образуются предварительно подготовленные, кондиционированные антигенпредставляющие клетки, оказывающие гомеостатическое действие и способствующие пролиферации регуляторных CD4⁺ лимфоцитов, контролирующих процесс воспаления.

В случае возникновения мутаций белка NOD2 мурамилдипептиды не могут связаться с ним. Вероятно, в таком случае антигенпредставляющие клетки получают стимулирующий сигнал от других молекул, что вызывает стимуляцию патологических клонов Т-лимфоцитов, ответственных за развитие аутоиммунного заболевания, болезни Крона.

Я должен подчеркнуть, что это только гипотеза, но она отражает главные и самые важные идеи. Первая из них заключается в постоянной стимуляции иммунной системы мурамилдипептидами из кишечника.

- Как же действует принятый через рот Ликопид?

Ликопид назначается перорально, внутрь. Таким образом, Ликопид может вносить свой вклад в стимуляцию на уровне кишечника. Вышеизложенный материал ясно показывает, что мурамилдипептиды могут иметь регуляторный эффект при аутоиммунных заболеваниях. Хотя в то время, когда мы разрабатывали мурамилдипептиды для лечения псориаза, мы не имели ясного представления, каковы регуляторные механизмы действия иммуностимулятора при воспалительном заболевании и как иммуностимулятор может уменьшать воспаление.

Возможно, данные представления помогут нам понять, что иммуномодулятор связывается с NOD-белком определенного типа клеток, которые затем вызывают развитие регуляторных Т-клеток в большей степени, чем Т-лимфоцитов, стимулирующих воспаление.

- Как бы Вы охарактеризовали современный уровень наших знаний о механизме действия Ликопада?

Теперь мы знаем, что представляет собой рецептор для мурамилдипептидов. Возможно, существуют и другие рецепторы, но хотя бы один из них четко охарактеризован. Он является внутриклеточным. Он представляет семейство молекул, каждая из которых отвечает за различные механизмы противомикробной защиты. Разработана хорошая тест-система для исследования мурамилдипептидов. Она будет очень полезна для рационального развития и изучения новых веществ – агонистов и антагонистов. Нам известны мутации NOD2, при которых мурамилдипептид не может связаться с этим белком, что вызывает болезнь Крона. Я буду очень удивлен, если мы в будущем не обнаружим и других мутаций белков NOD2, играющих роль в патогенезе других заболеваний. Я не являюсь экспертом в области туберкулеза, я могу только предполагать, что высвобождение пептидогликана и мурамилдипептидов из микобактерий в очаге туберкулезного повреждения и их взаимодействие с белком NOD2 является крайне важным для иммунорегуляции роста микобактерий при туберкулезе.

Материалы беседы с профессором Р.Бомфордом подготовлены И.С.Фрейдлин