

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2007

И. Е. Ковалев¹, В. Л. Ковалева²

МЕХАНИЗМЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

¹ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва;

² Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ, Купавна, Московская обл.

Проведен анализ установленной ранее терапевтической эффективности внутривенного введения высоких доз иммуноглобулинов у больных бронхиальной астмой. Показаны механизмы лечебного действия, обусловленные фрагментами иммуноглобулинов, взаимодействующих с системами цитохрома P-450 печени и NO-синтазы и влияющих на биоэнергетические процессы.

Бронхиальная астма является одним из самых распространенных тяжелых аллергических заболеваний респираторной системы, в основе которого лежит хронический воспалительный процесс в бронхах [1, 2]. Несмотря на огромный прогресс в медицине проблема лечения бронхиальной астмы остается крайне актуальной.

В настоящее время одним из важнейших направлений фармакотерапии бронхиальной астмы является ингаляционное применение кортикостероидов [3]. Однако кортикостероидная терапия, сама по себе, не решает полностью проблему терапии астмы и нередко сопровождается серьезными осложнениями, например разрушением костей [4]. Кроме того, существует кортикостероидрезистентная астма, для лечения которой требуется создание принципиально новой фармакологической основы.

Такой основой, как мы полагаем, может быть предложенная нами ранее «Концепция иммунохимической функциональной системы гомеостаза (ИФСГ)» [5 – 7], основными функциональными блоками которой являются эволюционно древнейшие сопряженные окислительно-восстановительные системы цитохрома P-450 и NO-синтазы, а также эволюционно существенно более молодая система иммуноглобулинов, обладающая способностью распознавать и связывать неограниченный круг чужеродных химических соединений (ксенобиотиков), попадающих в организм из окружающей среды. Ковалентно связывающиеся с белками организма химические соединения, вызывающие нарушение химического гомеостаза и создающие конъюгированные антигены, автоматически включают иммуноглобулиновую систему связывания и на долгое время запоминания чужеродных макромолекулярных и низкомолекулярных химических соединений. Это обеспечивает долговременную адаптацию организма к самым разнообразным химическим структурам, как к макромолекулярным, так и низкомолекулярным.

Таким образом, функционально сопряженные системы химического гомеостаза организма (системы цитохрома P-450 и иммунитета) способны сопряженно анализировать и контролировать внутреннюю среду организма, а также восстанавливать сдвиги метаболических процессов.

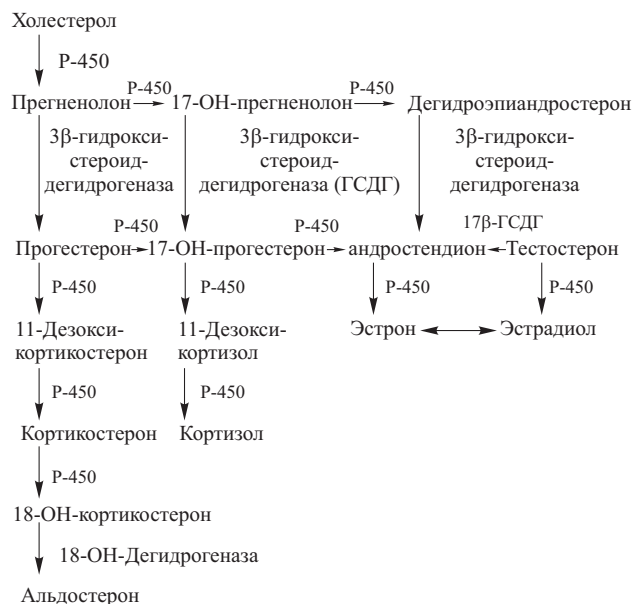
Важно отметить, что система цитохрома P-450, кроме других многочисленных функций, обеспечивает продукцию кортикостероидов (рисунок) и ряд других регуляторных веществ [8]. А уровень кортикостероидов в крови, как известно, определяет активность системы иммунитета.

Регуляторное действие кортикостероидов на иммунные процессы общеизвестно. Однако до настоящего времени недостаточно изучено влияние иммуноглобулинов на активность системы цитохрома P-450 и NO-синтазы.

Сравнительно недавно установлено [9], что внутривенные введения большим бронхиальной астмой иммуноглобулинов в высоких дозах приводят к выраженному терапевтическому эффекту.

Для выяснения возможных механизмов влияния иммуноглобулинов на течение бронхиальной астмы следует, прежде всего, напомнить о том, что сами легкие участвуют в образовании иммуноглобулинов [10, 11]. Основную массу иммуноглобулинов составляют IgG (γ G).

Показано, что легкие участвуют не только в продукции иммуноглобулинов, но и в их катаболизме. В плазме крови здоровых людей и животных наряду с целыми молекулами иммуноглобулинов обнаруживаются и субъединицы этих белков. В моче здоровых людей содержится 5 – 10 мг/л иммуноглобулинов, из которых на долю целых молекул IgG приходится около 10 %. Известно также, что полупериод биологической активности IgG у млекопитающих и человека доходит до 10 – 30 дней [11].



Главные пути стероидогенеза [9].

Таким образом, уже из этих данных следует, что в организме иммуноглобулины играют важную роль не только как антитела, но и как регуляторы различных биохимических процессов.

Анализ биологической активности иммуноглобулинов и их фрагментов, а также терапевтического действия иммуноглобулинов при бронхиальной астме приводит к выводу о том, что этот терапевтический эффект вызывают не иммуноглобулины, как таковые, а их низкомолекулярные фрагменты, обладающие способностью взаимодействовать с активным центром цитохрома P-450 и изменять тем самым биотрансформацию различных эндогенных веществ и ксенобиотиков.

В ряде исследований было установлено, что при иммуностимуляции наблюдается интенсивное появление в крови L-аргинин-содержащих фрагментов иммуноглобулинов (L-Thr-Lys-Pro-L-Arg), выделяющихся в кровь из IgG. Этот фрагмент иммуноглобулинов получил название Tuftsin [12].

Данный фрагмент иммуноглобулина, как нами было показано ранее [13, 14], обладает способностью взаимодействовать с системой цитохрома P-450 печени и изменять как содержание цитохромов P-450, b₅, так и цитохром P-450-зависимую монооксигеназную актив-

ность в микросомах печени (таблица). Однако, в отличие от гексенала, окисление L-arg-пептида не происходит (скорость поглощения кислорода в присутствии NADPH не возрастает). Имеются данные о том, что указанный пептид способен защищать цитохром P-450 от повреждающего действия NO благодаря тому, что он связывается с пептидной частью активного центра цитохрома P-450. При этом, вероятно, осуществляется и прямое участие естественного L-arg-пептида в синтезе NO. L-аргинин, как известно, используется NO-синтазной системой в качестве субстрата для синтеза NO. Известно также и то, что различные аналоги L-аргинина могут быть и ингибиторами образования NO из L-аргинина. Следует отметить, что явление защиты цитохрома P-450 от естественного катаболизма его же субстратами (определенными низкомолекулярными химическими соединениями) — своеобразное “консервирование” — уже известно [14]. Ранее было показано, что определенные ксенобиотики способны, благодаря связыванию с активным центром цитохрома P-450, задерживать его катаболизм и повышать, тем самым, его концентрацию в клетках.

Однако до настоящего времени не была сделана попытка изучить действие естественных L-аргинин-содержащих пептидов, образующихся в организме из иммуноглобулинов, на патологические процессы при бронхиальной астме.

Необходимо отметить, что печень, снабженную мощной системой цитохрома P-450, участвующей в биотрансформации широкого круга химических соединений (как эндогенных, так и ксенобиотиков), следует рассматривать как орган, активно участвующий в регуляции иммунных процессов. Давно известно, что печень играет важнейшую роль в катаболизме иммуноглобулинов. Показано, что радиоактивно меченый иммуноглобулин (IgG), введенный животным, выделяется из печени с желчью как в неизмененном виде, так и в виде его метаболитов (40 %).

Катаболизм иммуноглобулинов в организме и некоторые биологические свойства продуктов этого катаболизма были рассмотрены в [15, 16]. Установлено, что скорость катаболизма иммуноглобулинов непосредственно зависит от их концентрации в крови: внутривенное введение животным или человеку иммуноглобулинов приводит к индукции распада собственных иммуноглобулинов. Это следует считать обыч-

Влияние внутрибрюшинного введения мышам фрагмента иммуноглобулина (IgG) L-Thr-L-Lys-L-Pro-L-Arg на содержание цитохромов P-450, b₅ и бензо[а]пиренгидроксилазную активность в микросомальной фракции печени

Тест	Контроль	Введение фрагмента иммуноглобулина (20 мг/кг × 3 дня)
Микросомальный белок (мг на 1 г массы печени)	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,1
Цитохром P-450 (нмоль на 1 мг белка)	0,65 ± 0,2	0,85 ± 0,09 p > 0,05
Цитохром b ₅ (нмоль на 1 мг белка)	0,96 ± 0,14	0,99 ± 0,04 p > 0,05
Бензо[а]пиренгидроксилаза (нмоль/мин на 1 мг белка)	0,66 ± 0,08	1,3 ± 0,05 p < 0,01

Примечание. Представлены результаты трех опытов, в каждом из которых было использовано 6 – 7 мышей.

ным явлением, так как фрагменты из Fc-участка иммуноглобулина G (IgG) обнаружены в моче здоровых людей.

Приведены доказательства того, что Fab-фрагменты образуются при распаде как гомологичных, так и аутологичных иммуноглобулинов [17, 18].

Известно участие продуктов катаболизма иммуноглобулинов в регуляции иммунного процесса. Фрагменты иммуноглобулина обладают рядом биологических свойств, отличающихся от свойств интактных молекул иммуноглобулинов: хемотаксической активностью, способностью усиливать фагоцитоз и стимулировать иммунный ответ *in vivo* и *in vitro*.

Следует отметить, что данный фрагмент иммуноглобулина образуется в организме в относительно больших количествах (его содержание в плазме крови у здоровых людей около 250 нг/мл) и является одним из самых распространенных пептидов крови.

В 80-е годы прошлого века мы выявили принципиально новое взаимодействие между системами иммунитета и цитохрома P-450 печени. Было впервые установлено, что иммуноглобулины могут быть прямыми регуляторами системы цитохрома P-450 [19–21]. Нами было показано, что L-аргинин-содержащий фрагмент IgG (тетрапептид тафцин), образующийся при естественных процессах деградации IgG в печени и появляющийся в сыворотке крови, непосредственно взаимодействует с активным центром цитохрома P-450 и является прямым регулятором активности системы цитохрома P-450 печени [13–14]. Это взаимодействие, естественно, отражается на активности NO-синтазной системы и на различных физиологических процессах.

Мы полагаем, что разнообразие физиологического действия фрагмента иммуноглобулина тафцина обусловлено его способностью влиять на окислительно-восстановительные процессы в сопряженной системе цитохрома P-450 и NO-синтазы.

Влияние этого фрагмента иммуноглобулина на сопряженную систему цитохрома P-450 и NO-синтазы в легких должно быть весьма важным, так как известно, что продукция NO в легких является определяющим фактором функции легких. Динамика метаболизма NO во время астматического ответа показывает мультифункциональную роль NO в дыхательных путях [1].

По сравнению со здоровыми людьми в контрольной группе у больных астмой имеется тенденция к повышенной продукции NO, NO₃⁻ и нитротирозина [1, 2].

Следует отметить, что тетрапептид тафцин, образующийся при деградации иммуноглобулинов, способен регулировать активность системы цитохрома P-450 в печени и, следовательно, сопряженную с ней систему NO-синтазы. Он непосредственно взаимодействует с активным центром цитохрома P-450 как субстрат, образуя фермент-субстратный комплекс типа I [13, 14].

Использование полярографического метода позволило нам установить, что цитохром P-450-зависимая монооксигеназная реакция при этом не индуцируется. Скорость поглощения кислорода при добавлении тет-

рапептида тафцина в систему микросом печени в присутствии NADPH не возрастает. Следовательно, этот фрагмент иммуноглобулина не является реальным субстратом цитохрома P-450. Он, по нашему мнению, является естественным, прямым регулятором активности системы цитохрома P-450, защищающим гем в активном центре цитохрома P-450 от взаимодействия с оксидом азота (NO), который, как известно, ингибирует активность цитохрома P-450. Эти механизмы обуславливают реципрокные отношения между системами цитохрома P-450 и иммунитета.

Таким образом, нами впервые была обнаружена прямая регуляция активности системы цитохрома P-450 печени иммуноглобулинами. Стало ясным, что система иммуноглобулинов является важным регулятором окислительно-восстановительной системы организма.

Из изложенного выше следует, что введение большим бронхиальной астмой иммуноглобулинов, которые подвергаются распаду в печени, в селезенке, приводит к появлению в крови соответственного количества фрагментов иммуноглобулинов, обладающих способностью изменять окислительно-восстановительные процессы в системе цитохрома P-450 в печени и в других органах, в том числе в легких.

В этой связи очевидно, что внутривенное введение больным бронхиальной астмой иммуноглобулинов с целью терапии этого заболевания, предложенное ранее [9], полностью обосновано.

Судя по терапевтическим эффектам, применение иммуноглобулинов при астме — это, как мы полагаем, чрезвычайно перспективный, новый (дополнительный к другим средствам терапии) путь лечения бронхиальной астмы.

Дополнительно следует отметить, что еще в 60-е годы прошлого века в [22, 23] было показано, что у больных злокачественными опухолями появляется IgG, характерный для рака, который активизирует гликолиз в гомогенатах скелетных мышц.

Отсюда, по нашему мнению следует, что иммуноглобулины, являющиеся модуляторами окислительно-восстановительных процессов, выполняют в организме не только общеизвестную роль антител, но и являются интересными, важными средствами регуляции биоэнергетических процессов в организме.

Таким образом, получены данные, позволяющие предполагать, что природа “заложила” в структуру иммуноглобулина пептид, который способен выделяться в естественных условиях из иммуноглобулина и активировать NO-зависимые иммунологические адаптивные процессы, и в то же время, “предусмотрительно” защищает цитохром P-450 от NO-зависимого разрушения, связываясь с пептидной частью его активного центра.

Исходя из изложенного выше, мы пришли к выводу о том, что фрагменты иммуноглобулинов (кроме прочего) являются важными регуляторами биоэнергетических процессов при стрессорных ситуациях.

При анализе этих процессов особое внимание следует обратить на то, что содержание иммуноглобулинов в крови может существенно изменяться при физических перегрузках. Установлено, что при интенсивных физических нагрузках у спортсменов наблюдается существенные сдвиги в содержании иммуноглобулинов в крови и слюне. Описан феномен “исчезновения иммуноглобулинов” в крови у спортсменов в условиях спортивных перегрузок [24 – 26]. Еще в 1987 г. в Государственном комитете СССР по делам изобретений и открытий было зарегистрировано открытие в области иммунологии: “Явление исчезновения иммуноглобулинов в организме человека” [26]. Его авторами были Б. Б. Першин, С. Н. Кузьмин, В. А. Левандо и Р. С. Суздальский. Они показали, что при максимальных физических и психо-эмоциональных нагрузках из сыворотки крови и биологических секретов человека полностью исчезают отдельные классы иммуноглобулинов. Нормальные концентрации иммуноглобулинов восстанавливались только через 2 – 4 недели после прекращения стрессовых воздействий.

Таким образом, вполне закономерно, что у людей в период стресса значительно ослабевает функция системы иммунитета и, как следствие, повышается риск различных заболеваний [27 – 28].

Среди наиболее вероятных причин, обуславливающих указанную дисфункцию иммунной системы при интенсивных физических нагрузках, называют следующие:

- 1) нарушение нейроэндокринной функции (основанной на секреции нейромедиаторов и гормонов);
- 2) нарушение иммунной регуляции (основанной на секреции нейромедиаторов иммунного ответа);
- 3) глубокие метаболические изменения внутренней среды (изменения pH, повышение концентрации лактата, липопротеинов низкой и очень низкой плотности, проникновение в сосудистое русло нормальных компонентов и аномальных метаболитов в интенсивно функционирующих органах);
- 4) относительная или абсолютная алиментарная недостаточность (дефицит глюкозы, незаменимых аминокислот, полиненасыщенных жирных кислот, витаминов и микроэлементов);
- 5) хронодезадаптация, необходимость приспособления к новым географическим и климатическим зонам.

Таким образом, иммунный статус организма спортсмена теснейшим образом связан с его физическим состоянием и уровнем специальной физической работоспособности. Степень тренированности организма, способности переносить тренировочные и соревновательные нагрузки, полнота и скорость восстановления и успешность лечения и профилактики состояния напряжения, характерного для высококвалифицированных спортсменов, — все это, как считают специалисты, занимающиеся проблемой спорта, определяется уровнем его иммунологической реактивности [24 – 25].

Этот уровень зависит, как мы полагаем, не только от системы иммунитета, но и от функционального состояния печени, являющейся органом, снабженным мощной системой цитохрома P-450, обеспечивающей биотрансформацию как различных эндогенных веществ, так и неограниченного круга чужеродных химических соединений.

Таким образом, нами показана необходимость развития нового направления в биохимической иммунофармакологии, целью которого является исследование механизмов регуляции функционального состояния системы легких пептидами, образующимися в организме из иммуноглобулинов, обладающими способностью регулировать активность системы цитохрома P-450 и сопряженной с нею NO-зависимой регуляторной системы легких.

В завершение следует отметить, что выявленная высокая эффективность внутривенного введения больших доз иммуноглобулинов в качестве средства терапии бронхиальной астмы [5] является научно обоснованной.

На основании изложенного выше становится ясным, что дальнейшее развитие проблемы терапии бронхиальной астмы требует комплексного системного подхода, включающего в себя применение как известных средств терапии этого заболевания, так и иммуноглобулинов, фрагменты которых обладают способностью регулировать цитохром P-450-зависимые и NO-зависимые окислительно-восстановительные процессы в иммунохимической функциональной системе гомеостаза.

Таким образом, есть все основания считать внутривенное введение иммуноглобулинов обоснованным и весьма эффективным средством терапии бронхиальной астмы, дополняющим применяемые в настоящее время лекарственные препараты.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Г. Чучалин, *Пульмонология. Бронхиальная астма. Глобальная стратегия. Совместный доклад Национального института сердце, легкие, кровь и Всемирной организации здравоохранения* (1996).
2. И. С. Гуштин, *Аллергическое воспаление и его контроль*, Фармарус Принт, Москва (1998).
3. P. J. Barnes, S. Pederson, W. W. Busse, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, p. 157 (1998).
4. J. Herrala, N. Puolijoki, K. Lippo, et al., *Bone*, **22**(5), 577 – 582 (1998).
5. И. Е. Ковалев, О. Ю. Полевая, *Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям*, Наука, Москва (1985).
6. И. Е. Ковалев, Э. Мусабаев, М. Д. Ахмедова, *Имунохимическая функциональная система гомеостаза при инфекционной и неинфекционной патологии*, Навруз, Ташкент (1994).
7. И. Е. Ковалев, *Имунохимическая функциональная система гомеостаза*, в кн.: Регуляторная метасистема иммуноэндокринная регуляция гомеостаза, часть II, Медицина, Москва (2002), сс. 103 – 167.
8. M. Lang, Ch. Batzl-Hartmann, P. Furet, et al., *Perspectives in Medical Chemistry*, B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer, R. Giger (eds.), Basel (1993), p. 89.

9. N. Rabinovich, E. W. Gelfand, *Medical respiratore care*, **4**(1), 11 (2000).
10. J. Humphrey, B. Sulitzeanu, *Biochem. J.*, № 1, 146 (1958).
11. Л. Г. Прокопенко, М. И. Равич-Щербо, *Обмен иммуноглобулинов*, Медицина, Москва (1974), с. 42.
12. V. A. Najar and K. Nishioka, *Nature*, **228**, 72 – 73 (1970).
13. Н. В. Шипулина, И. Е. Ковалев, *Хим.-фарм. журн.*, **24**(11), 4 – 7 (1991).
14. И. Е. Ковалев, Н. В. Шипулина, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(1), 3 – 5 (2001).
15. А. Я. Кульберг, *Молекулярная иммунология*, Высшая школа, Москва (1985).
16. А. Я. Кульберг, *Регуляция иммунного ответа*, Медицина, Москва (1986).
17. V. A. Najjar and K. Nashiorka, *Nature*, **228**, 72 – 673 (1970).
18. V. Najjar, *Exp. Cell. Biol.*, **46**, 114 (1978).
19. И. Е. Ковалев, Н. В. Шипулина, *Хим.-фарм. журн.*, **22**(1), 5 – 20 (1988).
20. Н. В. Шипулина, И. Е. Ковалев, *Хим.-фарм. журн.*, **25**(11), 4 – 7 (1991).
21. И. Е. Ковалев, Н. В. Шипулина, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(1), 3 – 11 (2001).
22. В. П. Короткорученко, в сб.: *Опухоли и организм*, Киев (1973), сс. 175 – 176.
23. В. П. Короткорученко, *Украинский биохимический журн.*, **47**(5), 593 – 600 (1973).
24. Р. С. Суздальницкий, В. А. Левандо, *Иммунологические аспекты спортивной деятельности человека. Теория и практика физической культуры*, № 10, 43 – 46 (1998).
25. Р. Д. Сейфулла, *Лекарства и БАД в спорте. Практическое руководство для спортивных врачей, тренеров и спортсменов*, Р. Д. Сейфулла и З. Г. Орджоникидзе (ред.), Литтерра, Москва (2003).
26. Б. Б. Першин, С. Н. Кузьмин, В. А. Левандо, Р. С. Суздальницкий, “Явление исчезновения иммуноглобулинов в организме человека”, Открытие, зарегистрированное в Государственном комитете СССР по делам изобретений и открытий в области иммунологии, Москва, 18 декабря (1987).
27. Е. А. Корнева, Э. К. Шхинек, *Успехи физиологических наук*, **20**(3), 3 – 19 (1989).
28. Г. Н. Кассиль, В. А. Левандо, Р. С. Суздальницкий, *Докл. АН СССР*, **275**(2), 506 – (1984).
29. Г. Н. Крыжановский, *Вестник АМН СССР*, № 3, 3 (1985).

Поступила 03.10.05

MECHANISMS OF IMMUNOGLOBULIN ACTION IN BRONCHIAL ASTHMA THERAPY

I. E. Kovalev¹ and V. L. Kovaleva²

¹ Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

² All-Russia Scientific Center for Safety Testing of Biologically Active Substances, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Staraya Kupavna, Moscow oblast, Russia

Therapeutic efficacy of intravenous administration of immunoglobulins in high doses in patients with bronchial asthma has been established. Some possible mechanisms of the therapeutic effect are analyzed, which are based on the interaction of immunoglobulin fragments with cytochrome P-450 and NO-synthase systems in liver and the resulting regulation of bioenergetic processes.