расстройств с нормализацией стула, чем в группе сравнения. Применение только лишь базисной местной терапии у больных НЯК через 6 недель терапии способствовало в большинстве случаев частичной ремиссии с компенсацией общего состояния больных. У больных клинической группы после 6 недель лечения отмечалось достоверное снижение абсолютного содержания всех изучаемых кислот и их изомеров, что свидетельствовало об улучшении утилизации данных кислот колоноцитами и другими видами резистентной микрофлоры. У пациентов группы сравнения изменений в содержании КЖК в просвете кишки не происходило. У больных клинической группы после лечения изменение относительного содержания КЖК заключалось в относительном повышении уксусной кислоты и уменьшении содержания пропионовой и масляной кислот. Кроме того, у пациентов клинической группы после лечения наблюдалась нормализация анаэробного индекса, а значит имело место уменьшение вклада в метаболизм анаэробной микрофлоры. Больший клинический эффект лечения у больных клинической группы можно объяснить активным участием КЖК и глутамина в метаболизме колоноцитов, нормализацией микрофлоры толстой кишки.

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН – НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

Молдогазиева Н.Т., Терентьев А.А.
ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет Росздрава

Альфа-фетопротеин (АФП) - наиболее известный эмбриоспецифический белок, характерный для эмбрионального периода развития всех представителей класса млекопитающих, и, возможно, всех позвоночных. Он является также наиболее известным опухолевым маркером, обнаруживаемым с высокой специфичностью у больных с первичным раком печени и тератокарциномой, а также в 15% случаев острого гепатита, в отдельных случаях рака желудка и панкреатобластомы, хронического гепатита и цирроза печени [1, 5]. Изменение уровня АФП в материнской сыворотке используется как диагностический тест для обнаружения некоторых нарушений развития плода. Так, существенные повышения уровня АФП происходят при дефектах развития нервной трубки у плода, а снижение его количества характерно для синдрома Дауна. В течение почти полувека, прошедшие со времени его открытия, он был объектом интенсивных исследований. К настоящему времени выделены и очищены разными способами, охарактеризованы физико-химически и иммунохимически альфа - фетопротеины человека и некоторых видов животных, в том числе мыши, крысы, кролика, морской свинки и др. Полностью расшифрованы первичные структуры АФП девяти видов млекопитающих: человека, шимпанзе, гориллы, лошади, собаки, свиньи, сурка, мыши и крысы (базы данных «Swiss-Prot», «TrEMBL»).

Альфа-фетопротеин принадлежит к семейству белков альбуминоидных генов, наряду с сывороточным альбумином, витамин Д-связывающим белком и, обнаруженным относительно недавно, альфа - альбумином (афамина). По химической структуре АФП является гликопротеином, содержащим до 3-5 % углеводов. Молекулярная масса этого белка колеблется в пределах 68-73 кДа, в зависимости от содержания углеводов и вида животного, из которого он был выделен. Первичная структура АФП установлена на основе анализа нуклеотидной последовательности его м-РНК, продукт трансляции которой у человека содержит 609 аминокислотных остатков (SwissProt P02771). В ходе процессинга отщепляется 18 аминокислотных остатков и в состав зрелой молекулы АФП человека входит 591 аминокислота. В составе АФП человека был также обнаружен один участок гликозилирования и 15 равномерно расположенных дисульфидных связей. Представители семейства белков альбуминоидных генов демонстрируют относительно высокую степень сходства первичной структуры (например, 39% идентичности наблюдается между аминокислотными последовательностями альфа - фетопротеина и сывороточного альбумина) с характерным расположением остатков цистеина. Они имеют также сходную α-спиральную вторичную структуру (так, до 65-67% α-спиральных участков характерно для АФП и около 50 % - для альбумина). Методом электронной микроскопии продемонстрировано существование U-образной структуры АФП с тремя областями плотности масс: одна на вершине и две по краям молекулы. На основании этих данных предложена трехдоменная пространственная организация его молекулы. Показано, что домены I и III имеют жесткую, компактно упакованную третичную структуру и связаны между собой протеолитически лабильным, гибким доменом II, конформация которого соответствует *форме расплавленной глобулы* (MGF-molten globule form). С-концевая часть домена II представляет собой гибкий шарнирный участок, который придает всем доменам подвижность и, тем самым, способствует взаимодействию АФП с лигандами или с другими белками. Несмотря на стабильность в растворе, АФП обладает достаточной конформационной подвижностью и изменяет конформацию под воздействием различных факторов, таких как высокие концентрации эстрогенов и жирных кислот, изменение pH среды и др. Изменение конформации молекулы сопровождается изменением антигенных и функциональных свойств АФП. Предполагается, что в нативной молекуле АФП часть биологически активных участков скрыты внутри белковой глобулы, которые выявляются, становясь доступными для взаимодействия, лишь при изменениях конформации молекулы.

До настоящего времени в связи трудностями, возникающими при кристаллизации альфа - фетопротеина, получение его трехмерной структуры (3D) с помощью экспериментальных методов (рентгеноструктурного анализа и ЯМР спектроскопии) представляет собой трудно разрешимую задачу. Наличие достаточно высокой степени сходства (39% идентичности) между аминокислотными последовательностями АФП и сывороточного альбумина, для которого трехмерная (3D) структура установлена с помощью рентгеноструктурного анализа, предоставляет возможность для компьютерного построения модели про-

странственной структуры АФП с помощью метода молекулярного моделирования на основе гомологии с альбумином. АФП и альбумин имеют общее происхождение и являются гомологичными белками. Для моделирования на основе гомологии важным является то обстоятельство, что трехмерная структура (способ укладки) гомологичных белков является в большей степени консервативной, чем их первичная структура.

Нами была предпринята попытка построения модели трехмерной организации молекулы АФП человека на основании гомологии с сывороточным альбумином, оптимизации полученной структуры с привлечением экспериментальных данных, оценки структуры и её анализа, включая расположение биологически активных участков. В международной базе данных PDB (protein data bank), содержащей все известные 3D структуры белков, было обнаружено 24 трехмерные структуры сывороточного альбумина человека. Из них для построения модели были отобраны шесть 3D структур (1AO6, 1BM0, 1E7A, 1GNI, 1HA2, 1UOR) которые были получены с высокой степенью разрешения (менее 3.0A) и отличались наличием или отсутствием в своем составе лиганда. Одна из них (1UOR) представляла собой кристаллическую структуру рекомбинантного сывороточного альбумина человека. Выравнивание аминокислотных последовательностей АФП и альбумина осуществляли с помощью компьютерной программы ClustalW. Для построения модели применяли программу MODELLER и использовали в качестве шаблона структуру 1GNI. Было построено пять моделей 3D структур АФП человека, из которых одна, с наименьшим objective function была отобрана для минимизации энергии. Расчет элементов вторичной структуры в полученной модели производили с использованием метода Кабаша-Сендера.

В настоящее время в составе альфа-фетопротеина разными группами авторов выявлен целый ряд участков с подтвержденной или предполагаемой биологической активностью. Одним из участков с изученной биологической активностью является гептапептид LDSYQCT в составе АФП человека (а.о. 14-20), обладающий иммуномодулирующими свойствами. Другим таким участком является пептид, ингибирующий рост (GIP – growth inhibitory peptide), включающий аминокислотные остатки 446-479, ответственный за способность АФП подавлять эстроген-зависимую пролиферацию клеток матки неполовозрелых самок мышей и рост эстроген-зависимых опухолей [Mizejewski G.J., MacColl R., 2003]. Срединный гидрофобный фрагмент пептида GIP, представляющий собой аминокислотную последовательность AADIIIGHLCIRHE (а.о.458-471), оказался способным связывать свободный 17-β-эстрадиол. Нами было выявлено, что в трехмерной структуре АФП гептапептид LDSYQCT располагается близко к поверхности молекулы, в то время как пептид GIP расположен внутри молекулы и занимает самый протяженный альфа-спиральный участок АФП человека.

Использование методов биоинформатики является ещё одним перспективным подходом для исследования АФП. С использованием программы ClustalW (версия 1.82) и баз данных первичных структур белков Swiss-Prot и TrEMBL нами проведено попарное и множественное выравнивание последовательностей белков семейства альбуминоидных генов, к которому, наряду с СА, афамином и витамин Д-связывающим белком, принадлежит АФП. На основе полученных данных осуществлен анализ филогенетических взаимоотношений этих белков и консервативных аминокислотных остатков в функционально активных участках, что может оказаться важным для понимания взаимосвязи структуры и функции не только АФП, но и других белковых молекул.

В составе АФП выявлен ряд участков с подтвержденной или предполагаемой биологической активностью: участки связывания эстрогенов, жирных кислот и билирубина, пептид, ингибирующий рост (GIP), мотивы гетеро- и гомодимеризации и др. Выявленный нами методами биоинформатики в составе АФП человека гептапептид LDSYQCT ($АФП_{14-20}$) обладает иммуномодулирующими свойствами. Нами изучаются конформационно-динамические свойства данного пептида и его аналогов, методами молекулярной динамики (МД), а также сконструирована модельная система и изучается взаимодействие эстрогенсвязывающих пептидов АФП с 17β-эстрадиолом. Метод МД основан на расчете классических (ньютоновских) траекторий движения молекулы в фазовом пространстве координат и импульсов ее атомов, и позволяет провести детальный (микроскопический) анализ конформационно-динамических процессов, происходящих в макромолекуле. Результаты анализа (данные о структуре и межмолекулярных взаимодействиях) можно сравнивать с экспериментально измеряемыми величинами, а также получать информацию о параметрах, которые трудно определить экспериментальными способами. Метод МД обеспечивает новым подходом к пониманию архитектуры и динамических свойств АФП и его пептидов, а также механизма их функционирования.

Обнаружение в составе альфа-фетопротеина (АФП) множества функционально важных участков позволяет сделать предположение о том, что альфа-фетопротеин является резервуаром биологически активных пептидов, которыми он обеспечивает растущие эмбриональные ткани. В этом может заключаться основное биологическое значение АФП в эмбриогенезе. Биологически активные пептиды АФП могут участвовать в регуляции различных физиологических процессов, в том числе: пролиферации клеток и роста тканей, половой дифференцировки и развития репродуктивных органов плода, развития и функционирования иммунной системы, транспорта гидрофобных лигандов (например, эстрогенов, необходимых для развития мозга) и др.

В течение последних десяти лет методами биоинформатики – путем сравнения первичных структур альфа-фетопротеина и ряда других белков в составе АФП выявлено более двадцати функционально важных участков. Часть пептидных фрагментов АФП человека получена синтетическим путем, и биологическая активность для них подтверждена экспериментально. Биологическая активность другой части пептидов лишь предсказана и требует эскпериментального подтверждения. Проведено картирование первич-

ной структуры альфа-фетопротеина с указанием аминокислотных последовательностей и места в первичной структуре АФП, выявленных биологически активных участков [Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т., 2006].

Одним из пептидов с относительно изученной биологической активностью является гептапептид LDSYQCT (а.о. 14-20), выявленный в составе АФП человека методом сравнения аминокислотных последовательностей альфа-фетопротеина и ряда факторов роста, а также некоторых онкофетальных белков. Вышеназванный участок оказался сходен с последовательностью LDKYTC в составе ЭФР человека (а.о. 26-31), а также с последовательностью ENYCN (а.о. 17-21) в составе α-цепи инсулина. Пептидные фрагменты АФП и инсулина были получены синтетическим путем и изучены в различных тестах биологической активности. Гептапептид альфа-фетопротеина в концентрации 10^{-5} М достоверно повышал утилизацию глюкозы эритроцитами больных инсулинозависимым и инсулинонезависимым сахарным диабетом. Пептид LDSYQCT обладает также иммуномодулирующими свойствами. В реакции бласттрансформации в концентрациях 10^{-7}, 10^{-8} и 10^{-9} М гептапептид умеренно стимулировал пролиферацию неактивированных лимфоцитов и проявлял выраженное ингибирующее действие на пролиферацию лимфоцитов, активированных ФГА. Он дозозависимо стимулировал спонтанную пролиферацию лимфоцитов с максимальным эффектом (в 2,2 раза) при концентрации 10 мкг/мл. В культуре клеток К-562 гептапептид повышал в 1,5-2 раза цитотоксическую активность естественных киллеров (ЕК). Выяснилось также, что он обладает дозозависимым ингибирующим эффектом на пролиферативную активность лимфоцитов больных острым лимфолейкозом, а также спонтанную пролиферацию лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом с низкой чувствительностью к цитозару, т.е. пептид усиливает антипролиферативную активность этого препарата. В культуре клеток больных инфекционно-аллергическим миокардитом с естественно активированными лимфоцитами гептапептид достоверно понижает экспрессию позднего активационного антигена HLA-DR и индуцирует экспрессию рецептора Fas-опосредованного апоптоза (CD95). Увеличение количества CD95+ лимфоцитов свидетельствует в пользу предположения о том, что гептапептид LDSYQCT индуцирует апоптоз, так как этот процесс зависит от Fas/FasL клеточного взаимодействия.

О значительной роли альфа-фетопротеина в торможении канцерогенеза свидетельствует его способность индуцировать апоптоз и ингибировать рост эстроген-зависимых опухолей. Это подтверждается также обнаружением в его первичной структуре пептида, ингибирующего рост (GIP- growth inhibitory peptide), включающего аминокислотные остатки 446-479 и ответственного за способность АФП подавлять эстроген-зависимую пролиферацию клеток матки неполовозрелых самок мышей и рост эстроген-зависимых опухолей [Mizejewski G.J., MacColl R., 2003]. Было показано, что фрагмент пептида GIP, представляющий собой октапептид EMTPVNPG (а.о. 471-478), обладает максимальной биологической активностью. Его эффективность в тесте ингибирования эстроген-зависимой пролиферации клеток матки у мышей составляет 49%, в то время как этот показатель для целого пептида P447 равен 45%, а для интактного АФП - 35%. Также, в модели *in vivo* было показано, что этот пептид, как и интактная молекула АФП, снижает фетотоксичность эстрогенов и инсулина. Под воздействием альфа-фетопротеина и пептида GIP дефекты развития плода уменьшаются на 50%, а гибель плода во время внутриутробного развития – на 63-73%.

В составе альфа-фетопротеина обнаружены также аминокислотные последовательности, сходные с участками ряда цитокинов и белков индукции апоптоза (рецептора фактора некроза опухолей TNFRα, белка Bcl-2 и др.). Обнаружены также участки антигенов главного комплекса гистосоместимости II класса, белков экстрацеллюлярного матрикса, мотивы гомо- и гетеродимеризации, характерные для ядерных стероидных и тиреоидных рецепторов. Локализован также основной участок связывания полиненасыщенных жирных кислот, участки связывания эстрогенов и билирубина. Осуществлено эпитопное картирование АФП.

Однако и в норме в организме взрослых особей роль альфа-фетопротеина может оказаться значимой, в том числе в качестве предшественника биологически активных пептидов. В пользу этого предположения свидетельствует то обстоятельство, что содержание многих факторов роста и полипептидных гормонов, в частности инсулина, в организме взрослого человека находится в пределах тех концентраций, которые характерны и для АФП. В норме в сыворотке крови взрослых особей АФП обнаруживается лишь в небольших количествах – до 5-10 нг/мл (~10^{-10}М). Однако эта концентрация может оказаться достаточной и функционально значимой.

Таким образом, можно констатировать, что применение новых подходов к изучению структуры и функции АФП, связанных с сочетанием методов компьютерного моделирования, молекулярной динамики и биоинформатики, с выявлением возможных биологически активных участков молекулы АФП, с последующим их химическим синтезом и проверкой их биологической активности, позволяет значительно глубже понять взаимосвязи структуры и функции этого белка.

Работа представлена на научную конференцию с международным участием «Фундаментальные исследования», Доминиканская республика, 5-16 апреля 2006г. Поступила в редакцию 14.03.2006г.

АЛКОГОЛЬ КАК ФАКТОР КРАНИО - ФАЦИАЛЬНОГО ТРАВМАТИЗМА

Петров В.В., Молдавская А.А., Нестеров В.В.
Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань

Статья посвящена актуальной проблеме – черепно-мозговому и лицевому травматизму, а также алкоголизму как фактору, приводящему к данным повреждениям. Отмечена тенденция к росту указанных