

К 100-летию со дня рождения
А. С. Данилевского

ИММУННАЯ СИСТЕМА ЛИЧИНОК *CALLIPHORA VICINA* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) КАК ИСТОЧНИК ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

© С. И. Черныш, Н. А. Гордя

Санкт-Петербургский государственный университет,
Лаборатория биофармакологии и иммунологии насекомых, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: sichernysh@yahoo.com

Резюме

Изучение механизмов клеточного и гуморального иммунитета личинок синей мясной мухи *Calliphora vicina* выявило три группы фармакологически активных веществ, перспективных для использования в медицине, — аллофероны, аллостатины и антимикробные пептиды. Аллофероны — семейство пептидов *C. vicina*, избирательно стимулирующих цитотоксическую активность естественных киллеров, эволюционно древней группы иммунокомпетентных клеток, играющих ключевую роль в системе антивирусного и противоопухолевого иммунитета млекопитающих. Аллофероны применяются в медицине для лечения герпесвирусных инфекций и вирусного гепатита В. Аллостатины — синтетические пептиды, совмещающие структурные характеристики аллоферонов и некоторые иммунологически активные белки млекопитающих. Как и аллофероны, аллостатины оказывают стимулирующее действие на цитотоксическую активность естественных киллеров и продукцию интерферона, однако отличаются от них выраженными адьювантными свойствами — способностью усиливать иммунное распознавание чужеродных антигенов. В настоящее время аллостатины используются для повышения сопротивляемости кожи и слизистых оболочек вирусным инфекциям; в будущем они могут найти применение также в иммунотерапии рака и других заболеваний. Еще одной перспективной для использования в медицине группой белков и пептидов иммунного ответа личинок *C. vicina* служат антимикробные пептиды. Исследования препарата, в состав которого входят дефензины, цекропины, диптерицины и пролин-богатые пептиды *C. vicina*, показывают, что лекарства этого типа представляют большой интерес в качестве средства для лечения и профилактики инфекций, вызываемых резистентными к антибиотикам бактериями.

Ключевые слова: *Calliphora vicina*, иммунная система, антимикробные пептиды, аллофероны, аллостатины.

Введение

Насекомые и продукты их жизнедеятельности с древнейших времен используются в традиционной медицине [1, 2]. Этнофармакопеи Китая, Тибета, Индии, Южной Америки и других регионов описывают применение в лечебных целях сотен видов насекомых, однако опыт традиционной медицины остается, за редким исключением, невостребованным научной медициной. К таким исключениям относится применение личинок мух-каллифорид для лечения инфицированных ран и язв, известное в научной литературе под названием «maggot debridement therapy» (MDT) или «bio-surgery». Лечебным средством в данном случае служат живые личинки *Lucilia sericata* и, реже, других представителей мясных мух, которые лизируют некротизированные ткани, стерилизуют рану и ускоряют ее за-

живление. Терапевтическая эффективность и безопасность MDT доказана клиническими исследованиями [3, 4]. Этот метод получил официальное признание в США, Великобритании и многих других странах.

Введение в арсенал современной медицины новых лекарственных веществ требует выполнения ряда условий и процедур, имеющих мало общего с практикой традиционной энтомотерапии. Прежде всего действующее вещество препарата должно быть получено в химически чистом виде, структурно охарактеризовано и, как правило, воспроизведено путем химического или биологического синтеза. Далее полученное вещество должно пройти доклинические исследования с целью выяснения спектра его биологической активности, механизма действия, токсичности, стабильности в составе предполагаемой лекарственной формы. Подавляющее большинство кандидатов на звание лекар-

ственного вещества отсеиваются на этом этапе. Оставшиеся должны пройти проверку в ходе многоэтапных клинических испытаний терапевтической эффективности и безопасности и показать преимущества по сравнению с существующими лекарствами того же назначения. Пересечь финишную черту в среднем имеет шанс лишь одна из многих тысяч молекул-кандидатов. Лишь единицы веществ, синтезируемых насекомыми, такие как пептид мелиттин — действующее вещество яда медоносной пчелы [4], получили официальный статус лекарственного средства.

Развитие иммунологии насекомых открывает новые возможности поиска потенциальных лекарственных веществ, соответствующих критериям научной медицины [5, 6]. Механизмы, при помощи которых насекомые распознают и инактивируют патогенные микроорганизмы, рассмотрены в обзорах, основанных главным образом на исследованиях иммунитета *Drosophila melanogaster* [7—10]. Особенности организации иммунной системы других насекомых изучены более фрагментарно или остаются неисследованными. Тем не менее накопленная сумма знаний позволяет выявить общие закономерности, характерные для класса насекомых. Общеизвестно, что основу инфекционного иммунитета насекомых составляют фагоцитоз и механическая изоляция патогенов, осуществляемые специализированными клетками гемолимфы [11], феноксидазная система гемолимфы [12] и антимикробные пептиды [13—15]. В контексте темы настоящей статьи важно отметить, что в процессе эволюции насекомых сформировалась система естественного иммунитета, объединяющая древние, консервативные элементы, общие для различных типов многоклеточных животных, и механизмы, характерные для отдельных отрядов, семейств или даже видов [16—19]. Мозаика эволюционно консервативных и переменных клеточно-молекулярных компонентов создает практически бесконечное разнообразие вариантов организации иммунной системы насекомых.

В задачу настоящей статьи входит обобщение результатов многолетних исследований иммунной системы личинок *C. vicina* как источника лекарственных веществ.

Иммунная система личинок *C. vicina*

Гемоциты. Иммунная система личинок *C. vicina* включает сложно организованную сеть регуляторных и эффекторных механизмов, направленных на распознавание и элиминацию патогенов. Основными эффекторными клеточно-тканевыми образованиями иммунной системы являются гемоциты и жировое тело. Существует несколько классификаций гемоцитов *C. vicina* [20—23]. По одной из общепринятых классификаций в состав гемоцитов входят клетки четырех морфологических типов: прогемоциты, плазматоциты, тромбоциты и энциты [21]. Плазматоциты (гистиоциты по терминологии [23]) составляют основную часть гемоцитов в конце личиночного развития и в период диапаузы личинок [22].

Плазматоциты *C. vicina* обладают цитотоксической активностью, аналогичной активностью естественных киллеров (natural killer cells) млекопитающих [19]. Как и естественные киллеры млекопитающих, плазматоциты личинок *C. vicina* распознают клетки-мишени (в данном случае клетки лейкемии человека K562) как «чужое», образуют с ними временный конъюгат и индуцируют процесс апоптоза, приводящий к гибели атакованной мишени. Естественные киллеры обнаружены не только у позвоночных, но и во многих группах беспозвоночных и, по-видимому, представляют один из древнейших механизмов естественного иммунитета многоклеточных животных [24]. Хотя у других насекомых естественные киллеры до сих пор не были описаны, у личинок *C. vicina* в период подготовки к метаморфозу цитотоксическая активность гемоцитов достигает очень высокого уровня и превышает на порядок аналогичную активность спленоцитов мыши или мононуклеаров крови человека. В этот период естественные киллеры (цитотоксические плазматоциты), по-видимому, составляют основную массу гемоцитов в гемолимфе личинок. Обнаружение естественных киллеров ставит целый ряд вопросов фундаментального характера относительно организации и функций иммунной системы насекомых [19]. Прежде всего возникает вопрос о механизме распознавания «свое-чужое», который позволяет цитотоксическим гемоцитам атаковать клетки млекопитающих. Известные механизмы распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (липополисахариды или пептидогликаны клеточных оболочек бактерий) при фагоцитозе, скорее всего, в данном случае не работают, поскольку клетки животных таких структур не содержат. В то же время известно, что естественные киллеры млекопитающих располагают уникальной системой негативного распознавания, которая позволяет им атаковать любые клетки, не снабженные специфическими маркерами «своего», белками главного комплекса гистосовместимости I типа. «Находка» естественных киллеров у личинок *C. vicina* позволило предположить, что цитотоксические гемоциты насекомых также располагают системой негативного распознавания «свое-чужое» и, следовательно, маркерами «своего», аналогичными белками главного комплекса млекопитающих [19]. Функции цитотоксических гемоцитов насекомых остаются неизученными. По аналогии с известными функциями естественных киллеров млекопитающих можно предположить, что цитотоксические гемоциты каллифоры обеспечивают элиминацию инфицированных вирусами клеток. Однако обращает на себя внимание тот факт, что плазматоциты появляются в большом количестве в гемолимфе личинок в период подготовки к метаморфозу. Этот факт позволяет предположить, что плазматоциты в процессе метаморфоза инициируют апоптоз клеток личиночных тканей, используя те же цитотоксические механизмы, при помощи которых они вызывают апоптоз чужеродных клеток [19]. В этом случае предназначенные к самоуничтожению клетки, вероятно, сбрасывают с поверхности маркеры «своего» и становятся доступными атаке со стороны цитотоксических гемоцитов.

**Структура и функциональные характеристики пептидов,
входящих в состав комплекса антимикробных пептидов *C. vicina***

Пептиды	Аминокислотная последовательность	Антибактериальная активность
Дефензин	Ala-Thr-Cys-Asp-Leu-Ser-Gly-Thr-Gly-Ala-Asn-Hys-Ser-Ala-Cys-Ala-Ala-Hys-Cys-Leu-Leu-Arg-Gly-Asn-Gly-Gly-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Ala-Val-Cys-Val-Cys-Arg-Asn	Грам-положительные бактерии
Пролин-богатый пептид	Phe-Val-Asp-Arg-Asn-Arg-Ile-Pro-Arg-Ser-Asn-Asn-Gly-Pro-Lys-Ile-Pro-Ile-Ile-Ser-Asn-Pro-... (N-терминальный сиквенс)	Грам-отрицательные бактерии
Цекропин	Gly-Trp-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Lys-Ile-Glu-Arg-Val-Gly-Gln-Hys-Thr-Arg-Asp-Ala-Thr-Ile-Gln-Gly-Leu-Ala-Val-Ala-Gln-Gln-Ala-Ala-Asn-Val-Ala-Ala-Thr-Ala-Arg	
Диптерицин	Asp-Ser-Lys-Pro-Leu-Asn-Leu-Val-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Pro-Pro-Asn-Asn-Pro-Gln-Thr-Tyr-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Arg-Lys-Asp-Asp-Phe-Asp-Val-Val-Leu-Gln-Gly-Ala-Gln-... (N-терминальный сиквенс)	

Естественные киллеры играют ключевую роль в противовирусном и противоопухолевом иммунитете человека и считаются одной из наиболее перспективных фармакологических мишеней с борьбой с вирусными инфекциями и онкологическими заболеваниями [25]. Обнаружение аналогичной системы у насекомых открывает новые источники для поиска фармакологически активных веществ, способных повысить функциональную активность естественных киллеров. К таким веществам относятся аллофероны, стимуляторы естественных киллеров человека, выделенные из гемолимфы личинок *C. vicina* и используемые в медицине для лечения ряда вирусных инфекций (см. раздел «Аллофероны»).

Жировое тело. Жировое тело насекомых выполняет множество функций, связанных с синтезом разнообразных белковых соединений, включая антимикробные пептиды [26, 27]. В норме синтез антимикробных пептидов у интактных личинок *C. vicina* поддерживается на минимальном уровне, однако резко нарастает после введения в полость тела бактерий [28, 29]. Участие жирового тела в синтезе антимикробных пептидов определяет ряд особенностей иммунного ответа личинок, важных с точки зрения перспектив фармакологического использования этих веществ. Прежде всего антимикробные пептиды жирового тела выступают в качестве внеклеточных факторов и выполняют защитные функции в прямом контакте с тканями организма-хозяина. Такой механизм предполагает высокую избирательность цитотоксического действия по отношению к микроорганизмам и соответственно отсутствие токсичности для клеток хозяина. У млекопитающих сходные антимикробные пептиды (α -дефензины) локализованы в клетках крови и оказывают антимикробное действие в составе специализированных внутриклеточных органелл [30, 31]. Попадая в нехарактерную для них среду, межклеточное пространство или плазму крови, α -дефензины подлежат быстрой инактивации специализированными белками плазмы. С этой точки зрения внеклеточные антимикробные пептиды *C. vicina* более подходят кандидатами на роль лекарства.

Антимикробные пептиды. В ответ на введение бактерий личинки *C. vicina* синтезируют и накапливают

в гемолимфе комплекс антимикробных пептидов [29], в состав которого входят дефензины, цекропины, диптерицины и пролин-богатые пептиды (см. таблицу).

Дефензины представлены как минимум тремя изоформами с мол. массами 4032.0, 4091.3 и 4114.3 Да. Полная аминокислотная последовательность установлена для пептида с массой 4032.0 Да. Дефензины *C. vicina*, как и дефензины других насекомых, характеризуются наличием 6 остатков цистеина, образующих три дисульфидных мостика, и избирательно токсичны для грам-положительных бактерий. Дефензины широко распространены среди представителей большинства отрядов крылатых насекомых и, по-видимому, возникли еще у общих предков членистоногих и моллюсков [17].

Цекропины у *C. vicina* представлены линейным пептидом с мол. массой 4256.0 Да, состоящим из двух амфипатических α -спиральных участков и избирательно токсичным для грам-отрицательных бактерий. Цекропины распространены среди представителей отрядов *Diptera* и *Lepidoptera* и неизвестны у других насекомых. Семейство диптерицинов *C. vicina* представлено 4 изоформами с мол. массами 8886.2, 8913.9, 8999.7 и 9029.1 Да. N-терминальный участок диптерицина *C. vicina* состоящий из 43 аминокислот, включая повтор из 5 остатков глицина, гомологичен известным диптерицинам двукрылых и не имеет близких аналогов среди антимикробных пептидов других животных. Диптерицины избирательно токсичны для грам-отрицательных бактерий.

Пролин-богатые пептиды *C. vicina* включают 4 формы с мол. массами 2987.0, 3025.7, 3040.0 и 3048.5 Да. В настоящее время секвенирован N-концевой участок, содержащий 23 аминокислоты, включая 4 остатка пролина. По формальному признаку (высокое содержание пролина) они могут быть отнесены к семейству пролин-богатых пептидов, однако их аминокислотная последовательность не имеет гомологии с пролин-богатыми пептидами других насекомых. Функционально они также резко отличаются от известных представителей этой сборной группы. В отличие от последних, преимущественно действующих на грам-отрицательные бактерии, пролин-богатые пепти-

ды *C. vicina* избирательно токсичны для грам-положительных бактерий.

Таким образом, комплекс антимикробных пептидов *C. vicina* формировался на протяжении длительного периода, составлявшего, по-видимому, не менее полумиллиарда лет (времени обособления предков членистоногих и моллюсков). Древнейший элемент этого комплекса, дефензины, постепенно пополнялся другими семействами антимикробных пептидов — цекропинами, характерными для чешуекрылых и двукрылых, диптерицинами, известными у мускоидных двукрылых, и, наконец, оригинальным вариантом пролин-богатых пептидов, не имеющих явных эволюционных аналогов.

Комплекс пептидов иммунного ответа личинок *C. vicina* как основа для создания антибактериальных лекарственных средств

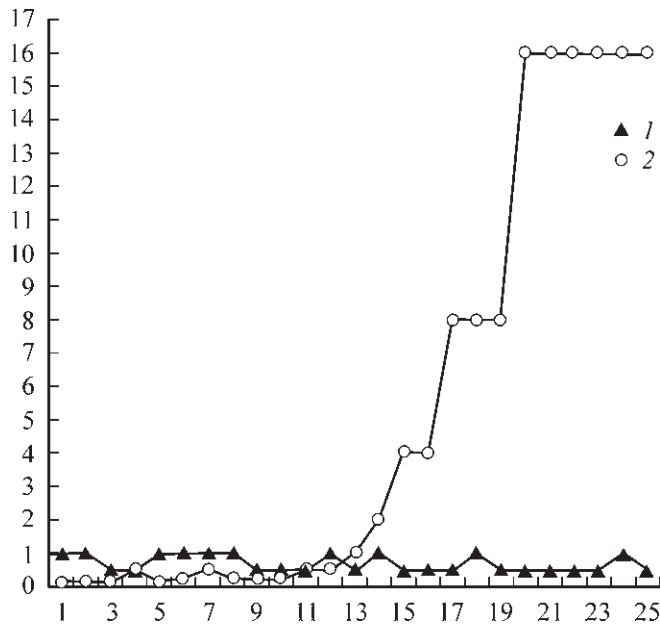
Современная медицина переживает сложный период, который нередко называют «концом эры антибиотиков». Действительно, положение в области терапии бактериальных инфекций становится все более тревожным в связи с распространением «супербактерий», устойчивых к большинству или всем известным антибиотикам [32, 33]. Особую опасность представляет повсеместное распространение резистентных к антибиотикам бактерий в лечебных учреждениях, где они составляют главную причину инфекционных осложнений и связанной с этим смертности.

Основным способом преодоления лекарственной устойчивости в настоящее время служит применение эмпирически найденной комбинации двух и более антибиотиков различной структуры и механизма действия. Предполагается, что сочетание антибиотиков увеличивает эффективность терапии и препятствует развитию устойчивости бактерий. Однако такое усложнение схемы лечения далеко не всегда дает положительный эффект. Зачастую суммируются отрицательные свойства каждого из антибиотиков (токсичность и другие побочные эффекты), нередко один компонент комбинации подавляет, а не усиливает действие другого компонента. Экспериментально показано, что использование комбинации антибиотиков может провоцировать развитие резистентности даже в большей степени, чем применение каждого из них по отдельности и способствует формированию наиболее опасных мультирезистентных форм бактерий [34, 35].

Поиска подходов к рациональной терапии бактериальных инфекций остаются одной из глобальных задач фармакологии и системы здравоохранения в целом. В настоящем разделе предлагается вариант решения проблемы, основанный на изучении механизмов антибактериального иммунитета насекомых. Как и известные методы комбинированной антибиотикотерапии, предлагаемый подход включает одновременное воздействие на бактериальную клетку двух и более компонентов, различающихся по структуре и механизму действия. Главное отличие состоит в том, что

предлагаемый подход предусматривает использование эволюционно коадаптированного комплекса действующих веществ. Под коадаптированным комплексом в данном случае понимается комбинация двух и более антимикробных пептидов, сформированная в процессе биологической эволюции и оптимизированная естественным отбором в отношении совместимости ее компонентов. Анализ антимикробных пептидов *C. vicina*, результаты которого рассмотрены в предыдущем разделе, показывает, что формирование такого комплекса происходило на протяжении сотен миллионов поколений путем включения в его состав новых активных компонентов при сохранении эволюционно старых. Эволюционно старые компоненты при этом оставались практически неизменными в структурном и функциональном отношении. Например, фиксация точечных мутаций в первичной структуре дефензинов происходила в среднем один раз в 10 миллионов лет и не затрагивала функционально важные особенности их молекулярной организации [17]. Мы полагаем, что в процессе эволюции предков современных насекомых были найдены такие варианты организации комплекса, которые делают процесс адаптации бактерий крайне медленными или даже невозможным. Соответственно лекарственные средства на основе коадаптированного комплекса антимикробных пептидов насекомых в отличие от известных в настоящее время антибиотиков могут сохранять антибактериальную активность на протяжении неограниченно долгого периода времени.

Для проверки этой гипотезы нами была проведена серия экспериментов, в ходе которых различные бактерии подвергались отбору на устойчивость к комплексу антимикробных пептидов *C. vicina*. В состав комплекса входят гидрофобные компоненты гемолимфы личинок, находящиеся в фазе активного иммунного ответа. Основными антибактериальными компонентами комплекса служат дефензины, цекропины, диптерицины и пролин-богатые пептиды, описанные в таблице [29]. В качестве положительного контроля в этих экспериментах использовались обычные антибиотики. Результат во всех случаях был однозначным: все исследованные бактерии легко вырабатывали устойчивость к действию обычных антибиотиков, в то время как устойчивость к препарату, содержащему комплекс антимикробных пептидов *C. vicina*, сохранялась на исходном уровне. В качестве примера на рисунке приведены результаты одного из экспериментов, в котором мультирезистентный штамм бактерии *Klebsiella pneumonia* (устойчив к амикацину, нетилмицину, гентамицину, ципрофлоксацину, цефоперазону, цефоперазон/сульбактаму, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму, левомецетину и амоксиклаву, чувствителен к имипенему, меропенему, полимиксину), отбирался на устойчивость к антибиотику меропенему или антимикробному комплексу личинок *C. vicina*. Культивирование *K. pneumonia* в среде с меропенемом вызывает активный рост резистентности к этому антибиотику. Устойчивость штамма, полученного после 25 пассажей с меропенемом, в 128 раз превышала устойчивость к нему исходной формы. В то же время, никаких изменений устойчивости бактерий к антимикроб-



Изменения устойчивости к антимикробному комплексу *C. viscina* (1 мг/мл) и антибиотику меропенем (2 мкг/мл), в ряду поколений бактерий *Klebsiella pneumonia*.

По оси абсцисс — номер пассажа, по оси ординат — минимальная ингибирующая концентрация.

Для получения антимикробного комплекса иммунный ответ диапаузирующих личинок *C. viscina* активировали введением бактерий, как описано ранее [29], полученную гемолимфу подкисляли 0.05%-ной трифторуксусной кислотой (ТФУ, конечная концентрация) и центрифугировали в течение 5 мин при 5000 g. Супернатант наносили на картридж Ser-Pak C₁₈ classic (Waters), промывали 0.05%-ной ТФУ и элюировали 50%-ным ацетонитрилом в 0.05%-ной ТФУ. Элюат подвергали лиофильной сушке и использовали в качестве антимикробного комплекса. В исследовании использовали мультирезистентный госпитальный штамм *S. pneumonia* дикого типа (устойчив к амикацину, нетилмицину, гентамицину, ципрофлоксацину, цефоперазону, цефоперазон/сульбактаму, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму, левомицетину и амоксиклаву, чувствителен к имипенему, меропенему, полимиксину). Критерием устойчивости служила величина минимальной ингибирующей концентрации (МИК), определяемая методом серийных разведений препарата в жидкой питательной среде Luria-Bertany (Invitrogen). Бактерий инкубировали в присутствии тестируемого препарата при температуре 37 °С в течение 24 ч. Бактерий из лунки с подпороговой концентрацией антибиотика ежедневно переносили в свежую питательную среду, содержащую последовательные двукратные разведения антимикробного комплекса *C. viscina* или антибиотика меропенема (*Astrazeneca*). После выполнения каждого пассажа определяли величину МИК.

ному комплексу *C. viscina* отмечено не было. Эти результаты подтверждают изложенную выше гипотезу и одновременно демонстрируют тот факт, что антимикробный комплекс *C. viscina* эффективно подавляет развитие устойчивого к известным антибиотикам штамма *K. pneumonia* и, вероятно, может быть использован для лечения инфекций, вызываемых такими бактериями. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с мультирезистентными формами кишечной палочки *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii* [36—38]. В целом спектр антибактериальной активности комплекса включает представителей многих групп грам-положительных и грам-отрицательных бактерий, включая семейства *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Soc-*

caceae, *Enterococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* и *Corynebacteriaceae*.

Препараты на основе антимикробного комплекса *C. viscina* или родственных видов мух-калифорид могли бы существенно пополнить арсенал препаратов для лечения инфекционных заболеваний, вызываемых устойчивыми к антибиотикам и обычными бактериями. Первым в мировой практике препаратом такого рода стал очищенный комплекс пептидов личинок *C. viscina*, получивший название FLIP7 (сокращение от Fly Larvae Immune Peptides), содержащий сумму дефензинов, цекропина, диптерицинов, пролин-богатых пептидов и других биологически активных соединений, синтезируемых личинками в процессе иммунного ответа. FLIP7 используется, в частности, в качестве активного компонента гидрогеля, предназначенного для защиты кожи от патогенных бактерий, включая резистентные к антибиотикам формы. Исследования клинической эффективности гидрогеля показали, в частности, что его применение оказывает выраженное антибактериальное и противовоспалительное действие при гнойных стрептококко-стафилококковых инфекциях кожи.

Аллофероны

Другим примером фармакологически активных веществ, выделенных из гемолимфы личинок *C. viscina*, служат аллофероны, семейство олигопептидов с противовирусной и противоопухолевой активностью [39]. Механизм действия аллоферонов связан с активацией цитотоксической активности естественных киллеров, субпопуляцией лимфоцитов, ответственной за распознавание и элиминацию опухолевых или пораженных вирусом клеток [39, 40], а также с усилением продукции лейкоцитарного интерферона [39, 41], активацией транскрипционного фактора NF-κB [42], снижением активности протеинкиназы p38 MAP, ответственной за синтез провоспалительных цитокинов [43]. Для аллоферона-1 характерно также ростмодулирующее действие на опухолевые клетки [44]. Аллофероны образуют новую группу иммуностропных фармакологических средств, синтезируемых насекомыми и проявляющих цитокиноподобную активность в отношении естественных киллеров и других клеток иммунной системы млекопитающих, включая человека [45, 46]. В настоящее время аллоферон-1 производится путем химического синтеза [47]. На основе синтетического аллоферона-1 разработана инъекционная лекарственная форма, которую выпускают под названием Аллокин-альфа и предназначена для лечения рецидивирующего генитального герпеса и гепатита В (Федеральное руководство по использованию лекарственных средств, вып. V, М., 2004, раздел 20.1.2.2.3.2). Аллокин-альфа прошел всесторонние клинические исследования в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Институте иммунологии и Институте вирусологии РАМН, Московской медицинской академии им. Сеченова, Центральном научно-исследовательском кожно-венерологическом институте. В ча-

стности, аллокин-альфа продемонстрировал высокую терапевтическую эффективность при лечении рецидивов хронического генитального герпеса [41, 48, 49]. По сравнению с ацикловиром, «золотым стандартом» противогерпетических лекарственных средств, аллокин-альфа значительно быстрее устраняет герпетические высыпания и, что особенно важно, обеспечивает увеличение периода ремиссии. Изучение иммунного статуса пациентов, получавших лечение аллокин-ом-альфа, подтвердило, что механизм терапевтического действия препарата включает активацию естественных киллеров и системы интерферона [41]. Потенциальная сфера применения аллокина-альфа включает и другие вирусные заболевания, в частности вызываемые онкогенными формами вируса папилломы человека [50, 51].

Аллостатины

Аллофероны, помимо непосредственного использования в медицине, представляют интерес в качестве молекул-прототипа для разработки новых лекарственных веществ с улучшенными по сравнению с природным пептидом фармакологическими свойствами. Существенным результатом исследований в этом направлении стала разработка аллостатинов — синтетических олигопептидов совмещающих структурные особенности аллоферонов и функционально важных участков некоторых белков, участвующих в регуляции активности клеток иммунной системы млекопитающих [6, 46]. Аллостатины, как и аллофероны, обладают выраженным противовирусным и противоопухолевым действием, основанным на усилении цитотоксической активности естественных киллеров. Сравнительные исследования противоопухолевой активности аллоферона-1 и аллостатина-1 показали, в частности, что последний обладает более выраженными адьювантными свойствами, обеспечивая эффективное распознавание и элиминацию опухолевых клеток цитотоксическими лимфоцитами млекопитающих. Аллостатин-1 обладает также более высоким антипролиферативным и антиклоногенным действием на популяцию опухолевых клеток, особенно в сочетании с цитостатиками [52]. В настоящее время аллостатин-1 применяется для защиты кожи и слизистых оболочек от поражения вирусом простого герпеса (ВПГ) и вирусом папилломы человека (ВПЧ) в качестве действующего вещества препарата Алломедин [46, 50, 51, 53—55]. ВПГ и ВПЧ инфекции кожи и слизистых оболочек являются наиболее распространенными инфекционными заболеваниями, поражающими в клинически выраженной или, чаще, скрытой форме практически все взрослое население Земли. Для ВПГ характерно пожизненное вирусоносительство и периодические рецидивы заболевания, обусловленные дефектами системы противовирусного иммунитета. Применение Алломедина препятствует развитию рецидива или снижает его продолжительность и интенсивность [46, 53, 54]. Для ВПЧ инфекции также характерно хроническое течение заболевания. Особую опас-

ность представляют онкогенные формы ВПЧ, связь которых с развитием рака шейки матки и других органов хорошо известна. В этом контексте особый интерес представляет опыт применения Алломедина при лечении папилломавирусных инфекций высокого онкогенного риска. В частности, показана высокая эффективность препарата при лечении поражений шейки матки ВПЧ наиболее онкологически опасных 16 и 18 типов [50, 51]. Важно отметить, что применение Алломедина обеспечивало не только устранение клинических симптомов заболевания, но и приводило, по данным ПЦР-анализа, к элиминации вируса у абсолютного большинства больных. Эти результаты позволяют надеяться, что препараты на основе аллостатинов в перспективе откроют также путь к профилактике и лечению вирус-зависимых онкологических заболеваний.

Заключение

Изучение иммунной системы личинок *C. vicina*, результаты которого обобщены в настоящей статье, позволило обнаружить две группы фармакологически активных веществ — аллофероны и комплекс антимикробных пептидов.

С точки зрения классификации лекарственных веществ, аллофероны относятся к обширному классу иммуномодуляторов, но отличаются от известных иммуностропных препаратов (цитокины, хемокины, интерфероны, индукторы интерферона и так далее) структурой, происхождением, механизмом действия. Основной фармакологической мишенью аллоферонов в системе противовирусного и противоопухолевого иммунитета человека служат естественные киллеры — одна из древнейших групп иммунокомпетентных клеток многоклеточных животных. Возможно, именно эволюционная древность естественных киллеров объясняет тот факт, что среди пептидов иммунного ответа насекомого обнаружилось вещество, способное регулировать активность этого звена иммунной системы млекопитающих. Другой мишенью аллоферонов служит система интерферона, играющая ключевую роль в противовирусном иммунитете позвоночных, но неизвестная у насекомых. В настоящее время аллофероны применяются в медицине для лечения некоторых хронических вирусных инфекций, однако результаты доклинических исследований показывают, что в будущем аллофероны могут найти более широкое применение, включая лечение онкологических заболеваний.

Обнаружение аллоферонов послужило толчком к разработке новой группы иммуностропных веществ — аллостатинов. Аллостатины — синтетические пептиды, структура которых была «вычислена» путем сравнительного анализа аминокислотных последовательностей аллоферонов и иммунологически активных белков и пептидов млекопитающих. Полученная в итоге гибридная молекула, как и аллофероны, оказывает стимулирующее действие на цитотоксическую активность естественных киллеров и продукцию интерферона, однако отличается от них выраженными адъ-

ювантными свойствами — способностью усиливать иммунное распознавание чужеродных антигенов, например в процессе противоопухолевой вакцинации. Это свойство делает особенно перспективным применение аллостатинов в онкологии, например, для лечения и профилактики вирус-зависимых форм рака. В настоящее время аллостатины применяются для повышения сопротивляемости кожи и слизистых оболочек вирусным инфекциям, вызываемым вирусами простого герпеса и папилломы человека.

Другой перспективной для использования в медицине группой белков и пептидов иммунного ответа личинок *C. vicina* и других представителей мух-каллифорид служат антимикробные пептиды. Изучение антимикробных пептидов насекомых и других животных, в том числе возможностей использования этих веществ в медицине, насчитывает уже более чем тридцатилетнюю историю. Тем не менее ни один из известных антимикробных пептидов животных до сих пор не нашел применения в медицине. Предварительные исследования препарата FLIP7, в состав которого входят дефензины, цекропины, диптерицины и пролин-богатые пептиды личинок *C. vicina*, позволяют надеяться, что лекарства этого типа пополнят арсенал антимикробных лекарственных средств, предназначенных для лечения и профилактики бактериальных инфекций, в том числе вызываемых резистентными к антибиотикам «супербактериями».

Авторы выражают глубокую благодарность за участие в исследованиях, послуживших основой для написания настоящей статьи, коллегам по лаборатории биофармакологии и иммунологии насекомых Санкт-Петербургского университета Т. В. Кинд, А. А. Кругликовой, А. П. Несину, Н. П. Симоненко, Д. В. Тулину, А. Ю. Яковлеву; сотрудникам института цитологии РАН И. В. Арцыбашевой, И. В. Кожухаровой, В. А. Плескачу, Н. А. Филатовой; Института гриппа РАМН В. Б. Аникину, В. В. Зарубаеву, В. Г. Платонову; Института онкологии им. Петрова Н. Р. Сафронниковой; Медицинской академии последипломного образования В. Г. Корнишевой, Н. Б. Серебряной; Военно-медицинской академии Т. Н. Суборовой; Института молекулярной и клеточной биологии (Франция) Ф. Бюле и Ж. Хоффманну; компании Аллофарм Ю. В. Аспелю и Н. С. Черныш.

Работа выполнена в рамках НИР 1.37.125.2011 при поддержке гранта НШ-3332.2010.4.

Список литературы

- [1] *Feng Ying, Min Zhao, Zhao He, Zhiyong Chen, Long Sun.* Research and utilization of medicinal insect in China // *Entomol. Res.* 2009. V. 39. P. 313—316.
- [2] *Dossey A. T.* Insects and their chemical weaponry: New potential for drug discovery // *Nat. Prod. Rep.* 2010. V. 27. P. 1737—1757.
- [3] *Sherman R. A., Hall M. J. R., Thomas S.* Medicinal Maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions // *Annu. Rev. Entomol.* 2000. V. 45. P. 55—81.
- [4] *Cherniack E. P.* Bugs as drugs, Part 1: Insects. The «new» alternative Medicine for the 21st century? // *Altern. Med. Rev.* 2010. V. 15. P. 124—135.
- [5] *Chernysh S., Gordja N., Chernysh N., Tulin D., Anikin V., Pleskach V., Ryu M. J., Lee C.* Maggot immunity and drug development // *Proceedings of VII International conference on biotherapy.* Seoul. 2007. P. 82—83.
- [6] *Черныш С. И., Гордя Н. А., Несин А. П., Симоненко Н. П., Тулин Д. В., Яковлев А. Ю.* Иммунная система насекомых как источник новых лекарственных веществ // *Труды БиНИИ.* 2008. Вып. 54. С. 119—126.
- [7] *Hoffmann J. A., Reichart J. O. A.* Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective // *Nature immunology.* 2002. V. 3. P. 121—126.
- [8] *Haltmark D.* Drosophila immunity: paths and patterns // *Curr. Opin. Immunol.* 2003. V. 15. P. 12—19.
- [9] *Hoffmann J. A.* The immune response of Drosophila // *Nature.* 2003. V. 426. P. 33—38.
- [10] *Lemaitre B., Hoffmann J.* The host defense of Drosophila melanogaster // *Annu. Rev. Immunol.* 2007. V. 25. P. 697—743.
- [11] *Leips J.* Insect Models of Immunosenescence / Eds T. Fulop et al. 2009. P. 87—105.
- [12] *Lavine M. D., Strand M. R.* Insect hemocytes and their role in immunity // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002. V. 32. P. 1295—1309.
- [13] *Cerenius L., Soderhall K.* The prophenoloxidase-activating system in invertebrates // *Immunol. Rev.* 2004. V. 198. P. 116—126.
- [14] *Chernysh S. I.* Antimicrobial substances from insects // *Bioresources and Biotechnology, Proceedings of the I Korea/Russia joint symposium.* Taejon, 1996. P. 281—296.
- [15] *Bulet P., Hetru C., Dimarcq J. L., Hoffmann D.* Antimicrobial peptides in insects: structure and function // *Dev. Comp. Immunol.* 1999. V. 23. P. 329—344.
- [16] *Bulet Stoklin R., Menin L.* Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates // *Immunol. Rev.* 2004. V. 198. P. 169—184.
- [17] *Chernysh S. I.* Diversity of insect peptide antibiotics with reference to *Heteroptera* // *XX International Congress of Entomology, Florence, Aug. 25—31, 1996.* P. 217.
- [18] *Черныш С. И., Гордя Н. А., Филатова Н. А.* Протекторные механизмы насекомых: темпы молекулярной и фенотипической эволюции // *Исследования по генетике.* 1999. Т. 12. С. 52—59.
- [19] *Черныш С. И.* Насекомые защищаются: молекулы и клетки иммунного ответа // *Санкт-Петербургский университет.* 2000. Т. 20. С. 11—12.
- [20] *Chernysh S. I., Filatova N. A., Chernysh N. S.* Cytotoxic activity of blow fly *Calliphora vicina* hemocytes // *J. Insect Physiol.* 2004. V. 50. P. 777—781.
- [21] *Crossley A. C. S.* An experimental analysis of the origins and physiology of haemocytes in the blowfly *Calliphora erythrocephala* (Meig.) // *J. Exp. Zool.* 1964. V. 157. P. 375—398.
- [22] *Zachary D., Hoffmann J. A.* The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Meig.) (Diptera) // *Zeitschrift fur Zellforschung.* 1973. V. 141. P. 55—73.
- [23] *Кинд Т. В.* Гемоциты мясной мухи *Calliphora vicina* и их динамика при развитии личинок и индукции метаморфоза // *Цитология.* 2003. Т. 45. Вып. 10. С. 14—25.
- [24] *Тулин Д. В., Чага О. Ю.* Гемоциты личинки *Calliphora vicina* I. Гистологический анализ // *Цитология.* 2003. Т. 45. Вып. 10. С. 976—985.
- [25] *Savary C. A., Lotzova E.* Phylogeny and ontogeny of NK cells / Eds E. Lotzova, R. B. Herberman *Immunobiology of Natural Killer Cells.* V. I. Boca Raton, 1986. P. 45—61.

- [26] Terme M., Ullrich E., Delahaye N. F., Chaput N., Zitvogel L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies — Nature Immunol. 2008. V. 9. P. 486—494.
- [27] Trenczek T., Faye I. Synthesis of immune proteins in primary cultures of fat body from *Hyalophora cecropia* // Insect Biochem. 1988. V. 18. P. 299—312.
- [28] Reichhart J. M., Meister M., Dimarcq J. L., Zachary D., Hoffmann D., Ruiz C., Richards G., Hoffmann J. A. Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipterin promoter // EMBO J. 1992. V. 11. P. 1469—1477.
- [29] Chernysh S. I., Simonenko N. P., Braun A., Meister M. Developmental variability of the antibacterial response in larvae and pupae of *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) and *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) // Eur. J. Entomol. 1995. V. 93. P. 203—209.
- [30] Chernysh S. I., Gordja N. A., Simonenko N. P. Diapause and immune response: Induction of antimicrobial peptides synthesis in the blowfly, *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae) // Entomol. Sci. 2000. V. 3. P. 139—144.
- [31] Lehrer R. I., Lichtenstein A. K., Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells // Annu. Rev. Immunol. 1993. V. 11. P. 105—128.
- [32] Кокряков В. Н. Биология антибиотиков животного происхождения. Санкт-Петербург, 1999.
- [33] Alanis A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? // Arch. of Med. Res. 2005. V. 36. P. 697—705.
- [34] Arias C. A., Murray M. D. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century — a clinical super-challenge // New England J. Med. 2009. V. 360. P. 439—443.
- [35] Michel J.-B., Yeh P. J., Chait R., Moellering R. C., Kishony R. Drug interactions modulate the potential for evolution of resistance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 14 918—14 923.
- [36] Hegreness M., Shores N., Damian D., Hartl D., Kishony R. Accelerated evolution of resistance in multidrug environments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 13 977—13 981.
- [37] Черныш С. И., Гордя Н. А., Суборова Т. Н. Антибактериальная активность комплекса антимикробных пептидов иммунной системы хирургических личинок *Calliphora vicina* в отношении госпитальных штаммов грам-отрицательных бактерий // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения больных в многопрофильных лечебных учреждениях». СПб., 1 апреля 2010. Вестник российской военно-медицинской академии. № 1 (25), приложение. С. 478—479.
- [38] Черныш С. И., Гордя Н. А., Кругликова А. А., Суборова Т. Н. Чувствительность грам-отрицательных бактерий к комплексу пептидов, продуцируемых хирургическими личинками *Calliphora vicina* // Тезисы VIII Всероссийской конференции российской ассоциации специалистов по хирургическим инфекциям (РАСХИ). СПб., 12—13 ноября 2009 г. Инфекции в хирургии. 2010. Т. 8. № 1. С. 47.
- [39] Гордя Н. А., Черныш С. И., Суборова Т. Н. Чувствительность полирезистентных госпитальных штаммов *Acinetobacter baumannii* к антимикробным пептидам хирургических личинок *Calliphora vicina* // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Инфекционные осложнения при иммунных депрессиях». СПб., 11—12 февраля, 2010 г. Вестник гематологии. 2010. Т. 6. № 1. С. 26.
- [40] Chernysh S. I., Kim S. I., Bekker G., Pleskach V. A., Filatova N. A., Anikin V. B. et al. Antiviral and antitumor peptides from insects // PNAS. 2002. V. 99. P. 12 628—12 632.
- [41] Lee N., Bae S., Kim H., Kong J. M., Kim H.-R., Chj B. J. et al. Inhibition of lytic reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by alloferon // Antiviral Therapy. 2011. V. 16. P. 17—26.
- [42] Ершов Ф. И., Кубанова А. А., Пинегин Б. В., Шульженко А. Е., Беккер Г. П., Черныш С. И., Бугаев Л. В. Влияние аллокина-альфа на течение рецидивов хронического генитального герпеса // Materia Medica. 2003. № 4. С. 103—111.
- [43] Ryu M. J., Anikin V., Hong S. H., Hyesung J., Yu Y. G., Yu M.-H. et al. Activation of NF- κ B by alloferon through down-regulation of antioxidant proteins and I κ B α // Mol. Cell Biochem. 2008. V. 313. P. 91—102.
- [44] Lee S. K., Kang J. S., Kim J. E., Jung D. J., Bae S., Lee N. E. et al. The anti-inflammatory effect of Alloferon on UVB irradiated human skin keratinocyte cell line, HaCaT via the regulation of pro-inflammatory cytokine production // Faseb J. 2008. V. 22. P. 1072.
- [45] Плескач В. А., Кожухарова И. В., Арцыбашева И. В., Алексеенко Л. Л., Черныш С. И. Ростмодулирующее и цитотоксическое действие пептидов из гемолимфы личинок мухи *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) in vitro // Цитология. 2010. V. 52. P. 1005—1011.
- [46] Черныш С. И. Аллокины (цитокиноподобные пептиды насекомых) как модуляторы иммунного ответа человека и других млекопитающих // Russian J. Immunol. 2004. V. 9. P. 36.
- [47] Черныш С. И. Аллокины, противовирусные и противоопухолевые препараты нового типа // XII национальный конгресс «Человек и лекарство». М., 2005. С. 723.
- [48] Сидорова М. В., Молокоедов А. С., Кудрявцева Е. В., Балдин М. И., Фрид Д. А., Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Бушув В. Н. Синтез иммуномодулирующего пептида аллоферона — действующего вещества противовирусного препарата аллокин-альфа // Биоорг. химия. 2006. Т. 32. С. 151—160.
- [49] Исаков В. А., Азовцева О. В., Кутуева Ф. Р., Архипов Е. И., Черныш С. И., Семенов А. Е. Аллокин-альфа в комплексной терапии рецидивирующей герпетической инфекции // Terra Medica Nova. 2006. № 3. С. 14—17.
- [50] Тищенко М. С., Серебряков М. Я., Воронов А. В. Лечение пациентов с герпетической инфекцией // Terra Medica Nova. 2006. № 4. С. 40—44.
- [51] Сафронникова Н. Р., Черныш С. И., Серебряная Н. Б. Современные методы лечения папилломавирусной инфекции // Превентивная онкогинекология. Санкт-Петербург. 2007. С. 142—159.
- [52] Иващенко М. Д., Меженкина М. А., Тищенко М. С., Федорова Н. В. Клиническая эффективность препаратов аллоферона в лечении папилломавирусной инфекции у женщин репродуктивного возраста // Terra Medica Nova. V. 1. P. 24—26.
- [53] Плескач В. А., Кожухарова И. В., Алексеенко Л. Л., Плескач Н. М., Аникин В. Б., Черныш С. И. Регуляция пролиферации и жизнеспособности опухолевых клеток in vitro аллофероном-1 и аллостатином-1 // Цитология. 2011. Т. 53. С. 250—258.
- [54] Черныш С. И., Сафронникова Н. Р., Серебряная Н. Б. Аллоферон-3 в иммунотерапии папилломавирусных инфекций // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8. С. 469.
- [55] Корнишева В. Г., Черныш С. И., Фомин Ю. А., Макарова Ю. К. Гель Алломедин — новый препарат в лечении вирусных дерматозов // Актуальные вопросы ин-

- фекционной патологии в урологии и гинекологии. СПб., 2007. С. 30—31.
- [56] Сафронникова Н. Р., Черныш С. И., Фомин Ю. А., Ермоленко Д. К. Гель Алломедин: новые подходы к лечению герпесвирусных и папилломавирусных инфекций

урогенитальной сферы // Актуальные вопросы инфекционной патологии в урологии и гинекологии. СПб., 2007. С. 71—73.

Поступила 20 VI 2011

To the 100th Anniversary from Birth of A. S. Danilevskii

IMMUNE SYSTEM OF THE BLOWWORM *CALLIPHORA VICINA* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)
AS A SOURCE OF MEDICINES

© S. I. Chernysh and N. A. Gordya

Laboratory of Insect Biopharmacology and Immunology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia
E-mail: sichernysh@yahoo.com, 2ng@list.ru

ABSTRACT

Study of mechanisms of cellular and humoral immunity of larvae of the blowworm *Calliphora vicina* has revealed three groups of pharmacologically active substances perspective for use in medicine — alloferons, allostatis, and antimicrobial peptides. Alloferons — the family of peptides of *C. vicina* stimulating selectively the cytotoxic activity of natural killers of the evolutionary ancient group of immunocompetent cells playing the key role in the system of mammalian antiviral and antitumor immunity. Alloferons are used in medicine for treatment of herpes-viral infections and viral hepatitis B. Allostatis — synthetic peptides combining structural characteristics of alloferons and some mammalian immunologically active proteins. Allostatis, like alloferons, produce stimulating effects on cytotoxic activity of natural killers and interferon production, but differ from them by pronounced adjuvant properties — the ability to enhance immune recognition of alien antigens. At present, allostatis are used to increase resistance of skin and mucosae to viral infections; in future, they might also find use in immunotherapy of cancer and other diseases. Another protein and peptide group perspective for use in medicine serve as antimicrobial peptides in immune response of larvae *C. vicina*. The study of the agent containing defensins, cecropins, dipterocins, and praline-enriched *C. vicina* peptides shows the drugs of this type to be of great interest as the tool for treatment and prevention of infections caused by antibiotic-resistant bacteria.

Key words: *Calliphora vicina*, immune system, antimicrobial peptides, alloferons, allostatis.