

Рис. 2. Пространственная структура ГРЧ.

Цифрами указаны номера основных альфа-спиральных участков. Сайт 1 и сайт 2 — соответствующие сайты взаимодействия ГРЧ с рецепторами

ческим данным [4, 5] (рис. 2) альфа-спиральные участки молекулы ГРЧ собраны в пучок, расположены в топологии «вверх—вверх—вниз—вниз» и включают в себя аминокислотные остатки 9—34, 72—92, 106—128 и 155—184, соответственно. Дисульфидные связи образованы между остатками 35—165 и 182—189. Из других особенностей структуры молекулы ГРЧ можно отметить наличие гидрофобного ядра, включающего около 20 аминокислотных остатков, и трех дополнительных альфа-спиральных участков, связывающих основные альфа-спирали — двух между основными альфа-спиралями 1 и 2 и одного между 2 и 3.

Изучение гена ГРЧ *GH-1* (в ряде работ — *GH-N*) показало, что его продукт экспрессируется в двух основных изоформах вследствие альтернативного сплайсинга мРНК ($M = 20$ кДа и 22 кДа). Посттрансляционные модификации основной формы ($M = 22$ кДа) включают ацетилирование N-концевой аминокислоты, дезамидирование, олигомеризацию [6], гликозилирование и распад на протеолитические фрагменты: ГРЧ 1—43 и ГРЧ 44—191 [7].

Химический синтез гормона роста человека и его аналогов

Поскольку биосинтез полноразмерного ГРЧ стал возможен только в 1980-х гг., а химический синтез столь длинного полипептида экономически нецелесообразен, предпринимались попытки синтезировать его фрагменты, сохраняющие способность связывать его рецептор — ГРЧР. Были получены 8-членный пептидный фрагмент ГРЧ [8], более длинные фрагменты 95—136 [9], 1—54 [10] и 177—191 [11], не обладавшие медицинской значимой активностью. После появления кристаллографических данных о пространственной структуре ГРЧ и структуре комплекса ГРЧ с рецепторами (рассмотрена ниже в разделе «Биологические

свойства гормона роста человека») были предприняты более рациональные попытки выявить небольшой участок ГРЧ, ответственный за связывание рецептора, суммированные в обзоре Д. Копчика [12]. Эти опыты привели к обратному результату — созданию антагониста ГРЧ полипептида В-2036 (рассмотрен ниже).

Большой прогресс был достигнут в области синтеза аналогов гипоталамических факторов, высвобождающих ГРЧ в гипофизе. Был синтезирован 29-членный пептид, соответствующий N-концевой части GHRH (соматолиберина; гормона, высвобождающего ГРЧ; growth hormone releasing hormone; подробно рассмотрен в разделе «Биологические свойства гормона роста человека»). Этот синтетический пептид применили для коррекции роста в группе из 18 детей допубертатного возраста, страдающих дефицитом ГРЧ. У 12 пациентов наблюдалось увеличение линейного роста, у 8 из них — клинически значимое ускорение роста [13].

При замене части аминокислот этого пептида их аналогами — агматинном (29), т.е. в позиции 29, дезаминотиозином (1), норлейцином (27) и *L*- α -аминобутиратом (15) были получены соединения, обладающие увеличенной в 6—300 раз биологической активностью [14]. В то же время, производное пептида GHRH 1—29, содержащее аналогичные замены в положениях 15, 27 и 29 и новые замены: PhAc-тирозин (1), *D*-аргинин (2), *n*-хлорфенилаланин (6), является выраженным антагонистом GHRH [15].

Синтетические агонисты рецептора гормона грелина (см. ниже) — пептиды GHRP (growth hormone releasing peptides) также высвобождают ГРЧ и могут применяться в некоторых, но не во всех, случаях дефицита ГРЧ [16]. В настоящее время известны следующие синтетические пептиды GHRP: GHRP-1 — модифицированный гексапептид состава Ala-His-*D*-бета-Nal-Ala-Trp-*D*-Phe-Lys-NH₂ [17]; GHRP-2 (Prlmorelin, альтернативные названия GPA 748, KP 102D, KP 102LN) — аналогичная молекула со структурой *D*-Ala-*D*-бета-Nal-Ala-Trp-*D*-Phe-Lys-NH₂, может быть использован при определении уровня выброса ГРЧ в диагностике и проходит клинические испытания в Японии при недостатке роста [18]; GHRP-6 (Hexarelin, МК-0677) — пептид состава His-*D*-2-метил-Trp-Ala-Trp-*D*-Phe-Lys-NH₂. В случае МК-0677, вводимого перорально и действующего около 24 ч, удается восстановить природную пульсацию секреции ГРЧ [19]. В целом пептиды GHRP более эффективны, чем GHRH, для стимуляции секреции ГРЧ при анорексии на нервной почве и инсулинонезависимом диабете [20]. GHRP можно считать хорошей альтернативой введению ГРЧ у пожилых пациентов с целью предотвращения ослабления мускулов [21].

Биосинтетический гормон роста человека

Трансгенные системы

Ген ГРЧ был популярной моделью для опытов с имплантацией трансформированных гетерологичной ДНК фибробластов [22] или миобластов [23] мышам. Экспрессию ГРЧ наблюдали не более 3-х месяцев, что очевидно делает такой способ введения ГРЧ непригодным.

Получение рГРЧ в молоке трансгенных животных не встретило явных затруднений — уже в 1995 г. были получены трансгенные кролики, молоко которых со-

держало 50 мкг/мл рГРЧ [24]. Дальнейший прогресс в этой области сдерживается текущими административными ограничениями в области контроля безопасности лекарственных препаратов.

Линии клеток млекопитающих

Биотехнологически значимые работы по биосинтезу рГРЧ в линиях клеток млекопитающих, опубликованные в рецензируемой печати, ограничены описанием создания линий клеток почек обезьяны, инфицированных рекомбинантным вирусом SV40, несущим участок гена ГРЧ [25], и трансформацией линии клеток мыши С127 геном ГРЧ в составе вектора на основе вируса папилломы быка BPV [26].

Дрожжи

При первых попытках получения ГРЧ в пивных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* использовали внутриклеточное накопление ГРЧ, что соответствовало очень низкой продуктивности — около 1 млн молекул на клетку, и потенциальному присутствию дополнительного N-концевого остатка метионина [27]. Для получения ГРЧ без дополнительных аминокислотных остатков был применен секреторный лидерный пептид, содержащий сайт процессинга специфической протеазой KEX2 [28]. Аналогичные результаты были ранее получены К.Г. Скрябиным и сотрудниками. Использование ими в качестве лидерного пептида препрофрагмента альфа-фактора (дрожжевого феромона) и промотора гена альфа-фактора (но не промотора гена щелочной фосфатазы *PHO5* и ее препрофрагмента) приводило к преимущественной секреции корректно процессированного рГРЧ в культуральную среду [29]. Позднее той же группой было показано, что эффективная секреция ГРЧ требует присутствия только профрагмента альфа-фактора и произвольного лидерного пептида [30]. В аналогичной системе экспрессии было показано, что при включении между лидерным пептидом и сайтом узнавания KEX2 N-концевого фрагмента интерлейкина-1 человека уровень секреции рГРЧ в культуральную среду возрастал до 1,3 г/л [31]. Это было вызвано тем, что в N-концевом фрагменте присутствовал сайт N-гликозилирования, необходимый для корректного процессинга секреторируемых белков в аппарате Гольджи.

Несмотря на высокий уровень биосинтеза в секреторной системе, промышленный процесс получения рГРЧ в дрожжах, использованный компанией LG Life Sciences, основан на внутриклеточном биосинтезе целевого белка с дополнительным остатком метионина, отделяемым в процессе очистки аминокептидазой [32].

Bacillus subtilis

Биосинтез ГРЧ был успешно проведен в *Bacillus subtilis* путем кодирования гибридных полипептидов, содержащих на N-конце дополнительные последовательности Met-Arg-Arg- или Met-Asp-Asp-Leu-Met-, которые увеличивали растворимость продуктов в цитоплазме, и последовательность Ile-Asp-Gly-Arg-, специфически отщепляемую от C-концевого интактного ГРЧ специфической протеазой — фактором Ха [33].

Введение секреторного лидерного пептида позволило направить рГРЧ в культуральную среду, но процессинг лидера был достаточно малоспецифичен, что приводило к получению рГРЧ с 1-4 дополнительными аминокислотными остатками с N-конца молекулы [34].

Escherichia coli

Первая успешная попытка экспрессии рГРЧ в кишечной палочке *E. coli* была предпринята компанией Genentech в конце 1979 г. [35]. Короткий вариант рГРЧ (M = 20 кДа) был синтезирован в *E. coli* в результате делеции участка ДНК в плазмиде, кодирующей полноразмерный ГРЧ [36].

Первый фармацевтический препарат рекомбинантного ГРЧ — соматрем (соматонорм) был получен в системе цитоплазматической экспрессии гена ГРЧ в *E. coli*. Образующийся ГРЧ содержал дополнительный N-концевой остаток метионина, что очевидным образом приводило к появлению у части пациентов антител к ГРЧ [37].

Получение потенциально более безопасного в применении полностью интактного рГРЧ в *E. coli* возможно двумя путями — протеолитическим расщеплением синтезированного предшественника ГРЧ *in vitro* или направлением рГРЧ во внешний компартмент кишечной палочки — периплазму, где происходит ко-трансляционное удаление дополнительных аминокислот специфическими эндопротеиназами *E. coli*. Накопление в периплазме позволяет также получать его с корректно образованными дисульфидными связями в правильно свернутом состоянии и защитить его от действия протеаз цитоплазмы *E. coli* [38]. Для направления рГРЧ в периплазму может быть использован как собственный лидерный пептид ГРЧ, так и лидерный пептид щелочной фосфатазы *E. coli* PhoA [39] или другие лидерные пептиды [40]. Основной проблемой при таком способе биосинтеза является невысокий выход — около 10–15 мг/л/A₆₀₀, т.е. при плотности бактерий в культуральной жидкости, дающей 1 оптическую единицу поглощения при 600 нм [40]. Следует отметить, что в этом случае параметры культивирования штамма-продуцента специально не оптимизировали. Повышение продуктивности секреторной системы до 25 мг/л/A₅₅₀ было достигнуто благодаря использованию лидерного пептида теплоустойчивого энтеротоксина II и триптофанового промотора [41]. Такая удельная продуктивность может соответствовать абсолютной продуктивности 500 мг/л при высокоэффективной ферментации. Дальнейшую оптимизацию вели подбором оптимальных условий культивирования — температуры, продолжительности ферментации, pH, концентрации ионов калия и состава среды. Полученный в такой системе рГРЧ не вызывал образования значительных титров антител к ГРЧ у пациентов [42]. Аналогичные клинические результаты были получены для другого, сходного с описанным, секреторируемого в периплазму *E. coli* препарата рГРЧ [43].

Высокопродуктивный цитоплазматический биосинтез рГРЧ в *E. coli* приводит к преципитации образующегося полипептида в микрокристаллах — тельцах включения. Уровень биосинтеза рГРЧ в такой системе достигает нескольких граммов в литре культуры [44, 45] и особенно высок при использовании синтетического кодирующего участка гена ГРЧ, оптимизированного для транскрипции и трансляции в *E. coli* [46]. Тельца включения нетрудно отделить от растворимых компонентов *E. coli* и содержащийся в них рГРЧ растворить и очистить до гомогенности [47] при помощи одной стадии жидкостной хроматографии. Для получения рГРЧ с полностью нативной структурой из телец

включения были успешно использованы N-концевые короткие последовательности, отделяемые в процессе очистки энтерокиназой (сайт-специфической эндопротеиназой) [48] или дипептидиламинопептидазой [49]. Другим эффективным методом является биосинтез метионил-рГРЧ и отделение N-концевого остатка метионина аминокпептидазой [46, 50].

Биологические свойства гормона роста человека

Ген гипофизарного ГРЧ *GH-1* находится в хромосоме 17 и входит в локус из пяти близкородственных генов, кодирующих, помимо ГРЧ, гормоны плаценты [51].

Накопление ГРЧ в продуцирующих его клетках гипофиза — соматотрофах — происходит в секреторных везикулах предположительно в форме димера, в котором две молекулы ГРЧ координируют ион цинка остатками His18, His21 и Glu174 [53]. Выброс ГРЧ происходит импульсами под действием соматолиберина (гормона, высвобождающего ГРЧ, GHRH), который экспрессируется клетками гипоталамуса (рис. 3). Рецептор GHRH экспрессируется в гипоталамусе и клетках гипофиза; в условиях мышинной модели было показано, что карликовый фенотип обеспечивается мутацией в гене рецептора GHRH [54]. Не гомологичные гормону GHRH синтетические пептиды (GHRP's), высвобождающие ГРЧ, были открыты в начале 1980 гг. при синтезе производных энкефалина, не обладающих опиоидными свойствами, благодаря способности некоторых из них стимулировать гипофиз *in vitro* [19]. Пептиды GHRP действуют через специфические рецепторы (GHRP-R) на клетках гипофиза или гипоталамуса [16]. Природным лигандом этих рецепторов, открытым сравнительно недавно, является пептидный гормон грелин, вырабатываемый в желудке [55].

Угнетение экспрессии ГРЧ обеспечивается гормоном гипоталамуса соматостатином (соматотропинингибирующий фактор, СИФ), антагонистом соматолиберина. Показано, что GHRH и соматостатин

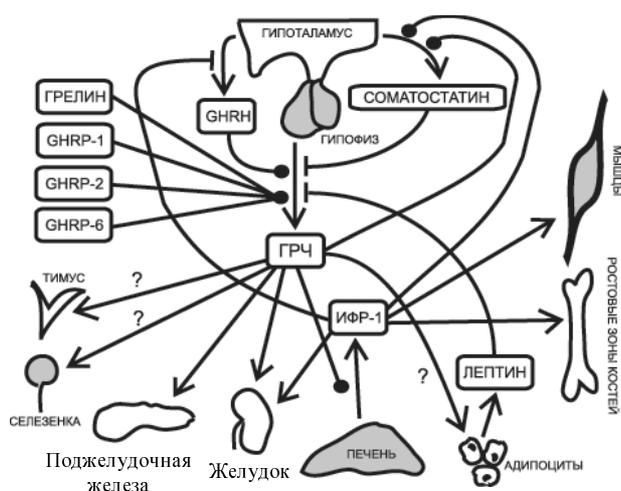


Рис. 3. Схема сети гормональной регуляции, связанной с ГРЧ.

Активация секреции соответствующих гормонов обозначена кружком, ингибирование — вертикальной чертой

используют цАМФ-зависимый путь передачи сигнала в клетке-мишени [56].

ГРЧ также инициирует петлю отрицательной обратной связи для контроля собственной экспрессии, воздействуя через рецептор ГРЧ (ГРЧР) на нейроны гипоталамуса, секретирующие соматостатин и нейропептид Y [57]. Пролиферация соматотрофов зависит от функционирования гена *Pit-1*, продукт которого участвует в активации транскрипции генов рецепторов GRF (фактора, высвобождающего ГРЧ, соматокрина), соматостатина и дофамина [58].

В норме уровень секреции ГРЧ пульсирует. Большая часть ГРЧ, до 70% у мужчин среднего возраста, выбрасывается в циркуляцию вскоре после засыпания во время первого периода медленного сна [59]. Стоит отметить, что введение GHRH усиливает медленный сон одновременно со стимуляцией секреции ГРЧ [60].

Выброшенный в циркуляцию ГРЧ воздействует на клетки-мишени через ГРЧР и рецептор пролактина. ГРЧР принадлежит к суперсемейству цитокиновых/эритропоэтиновых рецепторов типа I и состоит из одного иммуноглобулинподобного внеклеточного домена, содержащего консервативный мотив Tgr-Ser-X-Tgr-Ser, единственной трансмембранной альфа-спирали и внутриклеточной части, содержащей два функционально значимых консервативных участка Box I и Box II [61].

Структура комплексов ГРЧ с ГРЧР [5] (рис. 4) и рецептором пролактина [62] очень схожи; в обоих случаях детерминанты связывания на поверхности рецепторов близки, хотя их аминокислотная последовательность весьма различна. В составе продуктивных комплексов белки находятся в стехиометрическом соотношении ГРЧ : рецептор 1 : 2. Оба рецептора в комплексах со стехиометрией 1:1 контактируют с одним и тем же участком поверхности ГРЧ [63]. Две трети свободной энергии образования комплекса ГРЧ с ГРЧР обусловлены гидрофобным ядром в интерфейсе связывания, образованным двумя остатками триптофана в полипептидной цепи рецептора [64]. Было показано, что прочность комплекса ГРЧ с рецептором пролактина, но не с ГРЧР, зависит от присутствия ионов цинка [65]. Для активации ГРЧР при связывании лиганда необходимо последовательное связывание ГРЧ с первой молекулой рецептора (сайт 1) и последующее связывание со второй молекулой (сайт 2) [66]; такой способ взаимодействия лиганд—рецептор непосредственно диктует способ создания антагониста — аналога лиганда с разрушенным сайтом 2, что будет подробнее рассмотрено ниже.

Передача сигнала в клетке от активированного рецептора опосредуется протеинкиназой JAK-2 (Janus type kinase 2), которая связывается с цитоплазматической частью димеризованного ГРЧР и фосфорилирует собственные остатки тирозина и остатки тирозина внутриклеточного домена ГРЧР. С ними могут связываться белки, имеющие домены связывания фосфотиروزина, в том числе факторы активации транскрипции группы STAT, адапторный белок Shc и субстраты рецептора инсулина IRS 1 и 2. При участии этих молекул происходит активация таких ферментов, как MAP-киназа, фосфатидилинозитол-3'-киназа и фосфолипаза A2, и выброс вторичных посредников — диацилглицерина, ионов кальция и NO [67].



А



Б

Рис. 4. Пространственная структура комплекса ГРЧ—ГРЧР 1 : 2.

А — проекция, приближенная к рис. 2; С-концевые домены внеклеточных участков ГРЧР удалены. Обозначены N- и С-концы ГРЧ. Б — проекция вдоль оси пучка альфа-спиралей ГРЧ, N- и С-концы ГРЧ удалены от наблюдателя, сайт 1 находится справа

Отрицательную регуляцию передачи сигнала по наиболее значимому пути JAK2-STAT5 осуществляет тирозинфосфатаза SHP-2, которая связывается с фосфорилированным остатком Tyr595 ГРЧР [68].

Основная анаболическая функция ГРЧ опосредована гормоном соматомедином (инсулиноподобный фактор роста 1, ИФР-1) и сводится к усилению общего синтеза белка и замедлению окисления, но не к уменьшению скорости распада белка [69]. ИФР-1 представляет собой полипептидный гормон размером в 70 аминокислотных остатков, синтезирующийся в печени и антагонистичный ГРЧ в регуляции метаболизма липидов и секреции инсулина [70].

Было показано, что ГРЧР экспрессируются в почках; и ГРЧ, и ИФР-1 определенно играют роль в развитии почек и некоторых их патологиях [71].

ГРЧ стимулирует бета-клетки поджелудочной железы, производящие инсулин. В опытах с использованием линии инсулинсекретирующих клеток крысы INS-1 было показано, что ГРЧ ускоряет пролиферацию и увеличивает содержание инсулина; в передаче сигнала участвует только путь JAK-STAT, но не MAP-киназы [72]. Были найдены и описаны участки цитоплазматической части ГРЧР, фосфорилирование которых необходимо для пролиферации бета-клеток и синтеза инсулина [73].

ГРЧ и ИФР-1 возможно играют значительную роль в функционировании иммунной системы. ГРЧ экспрессируется в тимусе и селезенке, влияет на пролиферацию тимоцитов и стимулирует цитотоксическую активность натуральных киллеров и пролиферацию лимфоцитов [74]. При помощи мышинной модели дефицита ГР было показано, что ГР, так же как и пролактин, и ИФР-1, не является обязательным иммунорегулятором [75]. Непосредственное участие ГРЧ в работе иммунной системы, описанное к настоящему моменту, сводится к увеличению уровня белка системы комплемента MBL — маннансвязывающего лектина — при введении экзогенного ГРЧ [76] и к увеличению выброса гамма-интерферона, интерлейкинов

1бета, 2, 12 и ФНОальфа при кратковременном введении ГРЧ пациентам [77].

Плацентарный ГРЧ, продукт гена *GH-V*, отличающийся на 13 аминокислот от гипофизарного ГРЧ, появляется в кровотоке матери на 15—20 неделе беременности, замещая гипофизарный ГРЧ. Уровень его секреции не подвержен дневным циклам, что, по всей видимости, необходимо для тонкого контроля уровня ИФР-1 в ходе беременности. Плацентарный ГРЧ не оказывает прямого влияния на плод и не обнаруживается в кровотоке плода, но может управлять развитием плаценты, поскольку его рецепторы экспрессируются в плаценте [78]. Дефицит плацентарного ГРЧ коррелирует с внутриутробной задержкой роста плода [79].

Патологии, связанные с нарушением уровня гормона роста человека

Причины, приводящие к дефициту ГРЧ и к малорослости, довольно разнообразны, и только в 5—30% случаев можно говорить о явных генетических нарушениях [80].

Изолированный дефицит ГРЧ — диагноз с наиболее ясной этиологией, в абсолютном большинстве случаев вызван мутациями в кодирующей области гена *GH-1* и иногда в гене рецептора GHRH [81] или в гене *Pit-1*, кодирующем фактор активации транскрипции POU1F1, необходимый для экспрессии гена *GH-1*.

Гомозиготная мутация гена рецептора лептина (гормона, контролирующего жировую ткань) у людей приводит к уменьшению секреции ГРЧ и тиреотропина [82]; полагают, что лептин оказывает негативное влияние на уровень секреции ГРЧ.

Среди других известных причин дефицита ГРЧ можно выделить облучение головного мозга при различных онкологических заболеваниях, приводящее к повреждению гипофиза и, как следствие, дефициту ГРЧ в 50—100% случаев [83]. Стоит также отметить, что выявляемое магнитно-резонансной томографией уменьшение размеров гипофиза (вне зависимости от

причин такого уменьшения) коррелирует с дефицитом ГРЧ и дефицитом ИФР-1 [84].

В ряде клинических ситуаций наблюдается резистентность пациента к эндогенному или экзогенному гормону роста, виды которой были систематизированы Ларон и соавторами [85]:

- семейная карликовость, при которой выявляется высокий уровень ГРЧ в плазме [86] и пониженный уровень ИФР-1;

- занятость рецепторов ГРЧ, обычно наблюдающаяся при высоком уровне ГРЧ в плазме, например, при акромегалии и у новорожденных;

- резистентность органов (endorgan resistance) к ГРЧ и ИФР-1, наблюдающаяся у пигмеев;

- присутствие антител к ГРЧ, возникших как вследствие введения загрязненных или измененных препаратов ГРЧ, так и вследствие отсутствия иммуно-толерантности к ГРЧ;

- усиление активности ингибиторов ИФР-1, возникающее при хронической почечной недостаточности или при передозировке кортикостероидов.

Основные причины семейной карликовости, сегодня известной как синдром Ларон — это мутации в гене ГРЧР, приводящие к появлению растворимой формы внеклеточного домена ГРЧР (белок, связывающий ГРЧ; hGNbp), которая связывает ГРЧ в кровотоке [87] и препятствует образованию комплекса с рецепторами. В остальных случаях резистентность к ГРЧ возникает вследствие генетических нарушений компонентов внутриклеточной передачи сигнала от ГРЧР, компонентов системы биосинтеза ИФР-1, рецептора ИФР-1, компонентов системы передачи сигнала от рецептора ИФР-1; мутаций в генах белков, связывающих ИФР-1 в плазме, или дефектов собственно ростовых зон [88].

При хронической почечной недостаточности у детей, одном из основных диагнозов для применения экзогенного ГРЧ, уровень ГРЧ в плазме не отличим от нормального. Малорослость в данном случае коррелирует с увеличенной концентрацией белков, связывающих ИФР-1 (IGFBP 1 и 2) [89].

Избыток ГРЧ приводит к акромегалии; наиболее частой причиной избытка ГРЧ являются аденомы гипофиза. Такие экспрессирующие ГРЧ опухоли гипофиза в 30—40% случаев несут точечную мутацию в гене *Gs альфа*, и в большом числе случаев наблюдается неправильная экспрессия фактора высвобождения ГРЧ (GRF), что может приводить к усилению секреции ГРЧ и замыканию петли положительной обратной связи в таких опухолевых клетках [90].

Применение гормона роста человека

Исходно область применения ГРЧ в медицине ограничивалась терапией карликовости, связанной с дефицитом ГРЧ, и была лимитирована небольшим количеством сырья для производства ГРЧ — трупного материала. Появление больших количеств рекомбинантного ГРЧ (рГРЧ, биосинтетический соматотропин) позволило уже в 1987 г. рассмотреть расширение числа патологий, корректируемых заместительной терапией ГРЧ [91].

К 1990 г. было показано, что применение рГРЧ приводит к существенному увеличению роста при

идиопатической задержке роста, синдроме Шерешевского—Тернера (трисомия X-хромосомы), низком весе новорожденных, нарушении формирования скелета и почечной недостаточности, сопровождаемой недостатком роста [92]. В случае хронической почечной недостаточности терапия рГРЧ может быть продолжена и после трансплантации почки [93], хотя некоторые данные указывают на повышенный риск иммунологических осложнений [94].

Терапия рГРЧ детей в целом не приводит к повышенному риску развития лейкозов [95], некоторые имеющиеся опасения увеличения уровня лейкозов основаны на корреляции акромегалии и рака и ряде случаев появления лейкозов у японцев при терапии рГРЧ [96].

Доза рГРЧ при дефиците ГРЧ составляет 0,06—0,1 ед/кг 3 раза в неделю до прекращения роста и сопровождается заместительной терапией связанных с ГРЧ гормонов [97]. При терапии синдрома Шерешевского—Тернера и идиопатической задержке роста рГРЧ применяют в дозировке 0,05 мг/кг/день; доза до 0,2 мг/кг/день используется при истощении, вызванном СПИД, и тяжелых ожогах [98].

Кроме вышеуказанных случаев, обсуждаются и другие области для применения рГРЧ. Дефицит ГРЧ в пожилом возрасте может приводить к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе кардиомиопатии; заместительная терапия рГРЧ позволяет улучшить функцию миокарда и ряд других показателей сердечно-сосудистой системы [99]. При идиопатической кардиомиопатии введение рГРЧ позволяет увеличить массу миокарда и уменьшить размер левого желудочка [100]. Для особенно пожилых людей ослабление силы мускулов приводит к патологической слабости и ограничивает продолжительность их самостоятельной жизни. По крайней мере часть изменений организма при старении связана с падением уровня ГРЧ и ИФР-1 [101] и может быть в некоторой степени скорректирована заместительной терапией. ГРЧ в малых дозах улучшает состояние костей при остеопорозе у пожилых женщин [102], хотя медицинская эффективность его применения в этих условиях не вполне очевидна [103].

В ситуации обратной дефициту ГРЧ — при акромегалии — также успешно используется биосинтетический аналог ГРЧ — антагонист рецептора ГРЧ B2036. Он представляет собой генноинженерно измененную молекулу ГРЧ, в которую введена одна замена в сайт 2 связывания рецептора, понижающая сродство, и 8 замен в сайт 1 связывания рецептора, повышающих сродство к рецептору [104]. Этот полипептид образует неактивный комплекс с димером рецептора ГРЧ, не взаимодействует с рецептором пролактина [105] и в форме конъюгата с полиэтиленгликолем (B2036-PEG) применяется для контроля уровня ИФР-1 при акромегалии [106].

Гормоны роста в ветеринарии

Поскольку ГР является анаболиком, повышенная экспрессия собственного или гетерологичного ГР у сельскохозяйственных животных может потенциально улучшить их свойства. Действительно, трансгенные по гормону роста крупного рогатого скота (bovine somatotropin, BST) свиньи росли на 11—14% быстрее,

чем в контроле, и усваивали пищу на 18% лучше. Одновременно с этим наблюдалось перераспределение массы с подкожных жировых тканей в пользу мышц, кожи, костей и внутренних органов [107]. Кроме этого, общее состояние здоровья трансгенных свиней было ухудшено, основные патологии включали в себя хромоту, летаргию и язву желудка. Более позитивные результаты были достигнуты при введении молочным коровам рекомбинантного гормона BST, синтезируемого в *E. coli*. Рекомбинантный BST увеличивал продукцию молока, но был относительно неэффективен при лечении мастита [108].

В настоящее время рекомбинантный BST, производимый компанией Monsanto, широко используется в США для усиления лактации коров. Безопасность рекомбинантного BST для человека была обоснована следующими выкладками: BST не взаимодействует с ГРЧР человека; ГРЧ неактивен при введении перорально; концентрация BST в мясе и молоке очень низка и сравнима с эндогенным уровнем; концентрация ИФР-1, выделяющегося при применении BST, также достаточно низка, и ИФР-1 не оказывает биологического действия при пероральном введении [109].

Спорные области применения гормона роста человека

Поскольку было показано, что инъекции ГРЧ лягушкам, головастикам и крысам приводят к усилению роста мозга и увеличению отношения числа нейронов к клеткам глии, и, кроме того, в мозговой ткани многих млекопитающих был обнаружен гормон роста, связанные с ним гормоны и их рецепторы, предположили, что ГРЧ играет важную роль в развитии мозга [110]. Эти предположения не получили в дальнейшем ясного клинического подтверждения.

Клиническое использование ГРЧ при остеопорозе не показало заметных преимуществ; отмечалось, что рГРЧ в дозе 2 ед/день подкожно не приводит к изменению концентрации в плазме липидов и холестерина, хотя наблюдается набухание жировых тканей [111].

Применение рГРЧ у взрослых пациентов с дефицитом ГРЧ или без дефицита приводит к увеличению мышечной массы, уменьшению количества жира и общему улучшению качества жира [112]. Общая масса тела у взрослых пациентов с дефицитом ГРЧ, тем не менее, не уменьшается при терапии рГРЧ [113]. Терапия ГРЧ признана неэффективной при ожирении [114], несмотря на пониженный уровень ГРЧ у страдающих ожирением.

Уже в 1990 г. дискутировался вопрос о возможном злоупотреблении рекомбинантным ГРЧ в качестве допинга для подростков-спортсменов [115]. Применение рГРЧ в качестве допинга контролируется Олимпийским Комитетом с 1989 г. [116]. Детекция экзогенного ГРЧ практически невозможна, однако уровень некоторых цитокинов остается значительно повышенным в течение 4-х дней после прекращения приема ГРЧ [117], что позволяет в некоторой мере контролировать его использование спортсменами.

Необходимо отметить, что эффективность рГРЧ в качестве анаболического средства совершенно не очевидна. Исследования спортсменов-тяжеловесов показали, что прием ГРЧ не приводил к увеличению силы мускулов по сравнению с контрольной группой, хотя уровень ИФР-1 был увеличен вдвое [118].

Перспективы применения рГРЧ у пожилых пациентов для устранения симптомов «соматопаузы» также не представляется очевидными. В обзоре Клауса фон Вердера [119] суммированы следующие сомнения, далекие на настоящий момент от разрешения.

1. рГРЧ вводится подкожно, что технически трудно в случае пожилых пациентов.

2. Трудно подобрать правильную дозировку ГРЧ, поскольку пожилые пациенты могут обладать повышенной (по сравнению с детьми) чувствительностью к рГРЧ или же могут быть резистентны к ГРЧ.

3. У пожилых пациентов могут быть более выражены симптомы диабета.

4. Подъем уровня ИФР-1 может усиливать развитие некоторых видов малигнизующих опухолей; было показано, что уровень циркулирующего ИФР-1 коррелирует с частотой рака простаты. Более того, при акромегалии (повышенный уровень ГРЧ) отмечается высокая частота кишечных полипов и злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта.

5. Даже если вопросы дозировки, способа введения и безопасности применения ГРЧ будут решены, высокая стоимость терапии ГРЧ не позволит рекомендовать ее для всех пожилых пациентов с низким уровнем ИФР-1.

Заключение

Гормон роста человека привлекает внимание исследователей уже более 80 лет. Он занимает одно из центральных мест в эндокринной регуляции роста и метаболизма и участвует в регуляции различных систем организма. Многие патологии гормона роста человека и связанных с ним белков, ранее приводившие к карликовости и другим тяжелым нарушениям, успешно корректируются биосинтетическим гормоном роста человека. Исследования структуры и функций гормона роста человека позволили сформулировать ряд общих представлений о взаимодействии цитокинов и их рецепторов, передаче сигнала внутри клеток, регуляции транскрипции, гормональной регуляции метаболизма и молекулярной организации биологических ритмов. Вместе с тем проблема замещения дорогих биоинженерных препаратов гормона роста небольшими синтетическими молекулами далека от разрешения.

Список сокращений:

ГРЧ — гормон роста человека

ГРЧР — рецептор ГРЧ

рГРЧ — рекомбинантный ГРЧ

ИФР-1 — инсулиноподобный фактор роста 1

Фактор Ха — фактор свертываемости крови X, активированная форма

ФНО — фактор некроза опухолей

BST (Bovine SomatoTropin) — гормон роста быка

GH-1 (growth hormone-1) — ген 1 гормона роста

GHRH (growth hormone releasing hormone) — гормон, высвобождающий ГРЧ

GHRP (growth hormone releasing peptides) — пептиды, высвобождающие гормон роста

GHS-R (growth hormone secretagogue receptor) — рецептор грелина

GRF (GH Releasing Factor) — фактор, высвобождающий ГРЧ
 hGHbp (human Growth Hormone binding protein) — белок, связывающий ГРЧ
 IGFBP (IGF Binding Proteins) — белки, связывающие ИФР-1
 IRS (Insulin Receptor Substrate) — субстрат рецептора инсулина
 JAK-2 (Janus type kinase 2) — тирозиновая протеинкиназа типа Янус
 KEX2 (Killing EXpression 2) — сигнальная протеаза *S.cerevisiae*, ген которой определяет фенотип killing
 MAP (Mitogen Activated Protein) — белок, активируемый митогеном
 MBL (Mannan Binding Lectin) — лектин, связывающий маннан
 PHO5 (PHOspatase 5) — щелочная фосфатаза 5 *E. coli*
 POU1F1 (Pou domain 1 transcription Factor 1) — фактор активации транскрипции, содержащий домен Pou (домен связывания ДНК)
 Shc (Src homology 2 domain-containing) — белок, содержащий домен, гомологичный киназам Src
 SHP-2 (Src Homology 2 domain containing Phosphatase 2) — тирозинфосфатаза 2, содержащая домен, гомологичный киназам Src
 STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) — семейство белков передачи сигнала и активации транскрипции

ЛИТЕРАТУРА

1. Meisinger M.A., Cirillo V.J., Davis G.E., Reisfeld R.A. Nature, 1964, v. 201, p. 820–821.
2. Fiddes J.C., Seeburg P.H., DeNoto F.M. e. a. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 4294–4298.
3. Dalton R., Schiermeier Q. Nature, 1999, v. 402, p. 335.
4. Abdel-Meguid S.S., Shieh H.S., Smith W.W. e. a. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1987, v. 84, p. 6434–6437.
5. de Vos A.M., Ulsch M., Kossiakoff A.A. Science, 1992, v. 255, p. 306–312.
6. Baumann G. Horm. Res., 1999, v. 51, Suppl 1, p. 2–6.
7. Lewis U.J., Sinha Y.N., Lewis G.P. Endocr. J., 2000, v. 47, Suppl, p. S1–S8.
8. Yamashiro D., Li C.H. Int. J. Pept. Protein Res., 1972, v. 4, p. 181–185.
9. Blake J., Li C.H. Ibid., 1973, v. 5, p. 123–125.
10. Noble R.L., Yamashiro D., Li C.H. Ibid., 1977, v. 10, p. 385–393.
11. Wade J.D., Ng F.M., Bornstein J. Ibid., 1979, v. 13, p. 195–200.
12. Kopchick J.J. Horm. Res. 2003, v. 60, Suppl 3, p. 103–112.
13. Ross R.J., Grossma A., Preece M.A. e. a. Acta paediat. scand. suppl., 1987, v. 331, p. 42–47.
14. Izdebski J., Pinski J., Horvath J.E. e. a. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1995, v. 92, p. 4872–4876.
15. Zarandi M., Kovacs M., Horvath J.E. e. a. Peptides, 1997, v. 18, p. 423–430.
16. Ghigo E., Arvat E., Muccioli G., Camanni F. Eur. J. Endocrinol., 1997, v. 136, p. 445–460.
17. Akman M.S., Girard M., O'Brien L.F. e. a. Endocrinology, 1993, v. 132, p. 1286–1291.
18. Редакционная статья, Drugs in R&D, 2004, v. 5, p. 236–239.
19. Locatelli V., Torsello A. Pharmacol. Res., 1997, v. 36, p. 415.
20. Popovic V., Micic D., Damjanovic S. e. a. Acta paediat. scand. suppl., 1997, v. 423, p. 97–101.
21. Fuh V.L., Bach M.A. Growth Horm. IGF Res., 1998, v. 8, p. 13–20.
22. Selden R.F., Skoskiewicz M.J., Howie K.B. e. a. Science, 1987, v. 236, p. 714–718.
23. Barr E., Leiden J.M. Ibid., 1991, v. 254, p. 1507–1509.
24. Limonta J.M., Castro F.O., Martinez R. e. a. Biotechnol., 1995, v. 40, p. 49–58.
25. Pavlakis G.N., Hizuka N., Gorden P. e. a. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 7398–7402.
26. Carter M.J., Facklam T.J., Long P.C., Scotland R.A. Dev. Biol. Stand., 1989, v. 70, p. 101–107.
27. Tokunaga T., Iwai S., Gomi H. e. a. Gene, 1985, v. 39, p. 117–120.
28. Hiramatsu R., Horinouchi S., Uchida E. e. a. Appl. Environ. Microbiol., 1991, v. 57, p. 2052–2056.
29. Циоменко А.Б., Лупахин В.В., Морзунов С.А. и др. Молекуляр. биология, 1990, т. 24, с. 1126–1233.
30. Циоменко А.Б., Туиметова Г.П., Эльдаров М.А. и др. Биохимия, 1994, т. 59, с. 1675–1688.
31. Lee J., Choi S.I., Jang J.S. e. a. Biotechnol. Prog., 1999, v. 15, p. 884–890.
32. Jung C., Lee Y.P., Jeong Y.R. e. a. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2005, v. 814, p. 53–59.
33. Franchi E., Maisano F., Testori S.A. e. a. J. Biotechnol., 1991, v. 18, p. 41–54.
34. Nakayama A., Shimada H., Furutani Y., Honjo M. Ibid., 1992, v. 23, p. 55–69.
35. Cronin M.J. J. Pediatr., 1997, v. 131, p. S5–S7.
36. Adelman J.P., Hayflick J.S., Vasser M., Seeburg P.H. DNA, 1983, v. 2, p. 183–193.
37. Kaplan S.L., Underwood L.E., August G.P. e. a. Lancet, 1986, v. 1, p. 697–700.
38. Le H.V., Trotta P.P. Bioprocess Technol., 1991, v. 12, p. 163–181.
39. Gray G.L., Baldrige J.S., McKeown K.S. e. a. Gene, 1985, v. 39, p. 247–254.
40. Becker G.W., Hsiung H.M. FEBS Lett., 1986, v. 204, p. 145–150.
41. Chang C.N., Rey M., Bochner B. e. a. Gene, 1987, v. 55, p. 189–196.
42. Gellerfors P., Eketorp G., Fohlenhag K. e. a. J. Pharm. Biomed. Anal., 1989, v. 7, p. 173–183.
43. Rasmussen L.H., Zachmann M., Nilsson P. Helv. paediatr. acta, 1989, v. 43, p. 443–448.
44. Patra A.K., Mukhopadhyay R., Mukhija R. e. a. Protein Expr. Purif., 2000, v. 18, p. 182–192.
45. Tabandeh F., Shojaosadati S.A., Zomorodipour A. e. a. Biotechnol. Lett., 2004, v. 26, p. 245–250.
46. Габитов А.Г., Пономаренко Н.А., Воробьев И.И., Демин А.В., Мартыанов В.А., Шустер А.М., Байрамашвили Д.И., Мирошников А.И. Патент РФ № 2233879, 2004.
47. Mukhija R., Rupa P., Pillai D., Garg L.C. Gene, 1995, v. 165, p. 303–306.
48. Shin N.K., Kim D.Y., Shin C.S. e. a. J. Biotechnol., 1998, v. 62, p. 143–151.
49. Lauritzen C., Pedersen J., Madsen M.T. e. a. Protein Expr. Purif., 1998, v. 14, p. 434–442.
50. Пономаренко Н.А., Воробьев И.И., Александрова Е.С., А. М., Демин А.В., Шустер А.М., Мартыанов В.А., Костромин Т.И., Байрамашвили Д.И., Габитов А.Г., Мирошников А.И. Докл. АН, 2005, в печати.
51. Ho Y., Liebhaber S.A., Cooke N.E. Trends, Endocrinol. Metab., 2004, v. 15, p. 40–45.
52. Balatskii V.N., Lisovskii I.L. Tsitol. Genet., 1998, v. 32, p. 92–104.
53. Cunningham B.C., Mulkerrin M.G., Wells J.A. Science, 1991, v. 253, p. 545–548.
54. Mayo K.E., Miller T.L., DeAlmeida V. e. a. Ann. NY Acad. Sci., 1996, v. 805, p. 184–203.
55. Kojima M., Hosoda H., Date Y. e. a. Nature, 1999, v. 402, p. 656–660.
56. Bertherat J. Horm. Res., 1997, v. 47, p. 245–250.

57. Minami S., Kamegai J., Sugihara H. e. a. *Endocr. J.*, 1998, v. 45, Suppl, p. S19–S26.
58. Pellegrini-Bouiller I., Morange-Ramos I., Barlier A. e. a. *Horm. Res.*, 1997, v. 47, p. 251–258.
59. Van Cauter E., Plat L., Copinschi G. *Sleep*, 1998, v. 21, p. 553–566.
60. Obal F.Jr., Krueger J.M. *Rev. Neurol. (Paris)*, 2001, v. 157, p. S12–S15.
61. Carter-Su C., Schwartz J., Smit L.S. *Annu. Rev. Physiol.*, 1996, v. 58, p. 187–207.
62. Somers W., Utsch M., De Vos A.M., Kossiakoff A.A. *Nature*, 1994, v. 372, p. 478–481.
63. Kossiakoff A.A., Somers W., Utsch M. e. a. *Protein Sci.*, 1994, v. 3, p. 1697–1705.
64. Clackson T., Wells J.A. *Science*, 1995, v. 267, p. 383–386.
65. Cunningham B.C., Bass S., Fuh G., Wells J.A. *Science*, 1990, v. 250, p. 1709–1712.
66. Fuh G., Cunningham B.C., Fukunaga R. e. a. *Ibid.*, 1992, v. 256, p. 1677–1680.
67. Campbell G.S. *J. Pediatr.*, 1997, v. 131, p. S42–S44.
68. Stofega M.R., Herrington J., Billestrup N., Carter-Su C. *Mol. Endocrinol.*, 2000, v. 14, p. 1338–1350.
69. Ho K.K., O'Sullivan A.J., Hoffman D.M. *Endocr. J.*, 1996, v. 43, Suppl, p. S57–S63.
70. Laron Z. *Paediatr. Drugs*, 1999, v. 1, p. 155–159.
71. Feld S., Hirschberg R. *Endocr. Rev.*, 1996, v. 17, p. 423–480.
72. Sekine N., Wollheim C.B., Fujita T. *Endocr. J.*, 1998, v. 45, p. S33–S40.
73. Nielsen J.H., Svensson C., Galsgaard E.D. e. a. *J. Mol. Med.*, 1999, v. 77, p. 62–66.
74. Geffner M. *Acta Paediatr. Suppl.*, 1997, v. 423, p. 76–79.
75. Dorshkind K., Horseman N.D. *Endocr. Rev.*, 2000, v. 21, p. 292–312.
76. Hansen T.K., Thiel S., Dall R. e. a. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, v. 86, p. 5383–5388.
77. Bozzola M., De Benedetti F., De Amici M. e. a. *J. Endocrinol.*, 2003, v. 149, p. 397–401.
78. Alsat E., Guibourdenche J., Luton D. e. a. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1997, v. 177, p. 1526–1534.
79. Alsat E., Guibourdenche J., Couturier A., Evain-Brion D. *Mol. Cell Endocrinol.*, 1998, v. 140, p. 121–127.
80. Procter A.M., Phillips J.A., 3rd, Cooper D.N. *Hum. Genet.*, 1998, v. 103, p. 255–272.
81. Binder G. *Horm. Res.*, 2002, v. 58, Suppl 3, p. 2–6.
82. Clement K., Vaisse C., Lahlou N. e. a. *Nature*, 1998, v. 392, p. 398–401.
83. Rappaport R., Brauner R. *Pediatr. Res.*, 1989, v. 25, p. 561–567.
84. Nagel B.H., Palmbach M., Petersen D., Ranke M.B. *Eur. J. Pediatr.*, 1997, v. 156, p. 758–763.
85. Laron Z., Kowadlo-Silbergeld A., Eshet R., Pertzalan A. *Ann. Clin. Res.*, 1980, v. 12, p. 269–277.
86. Laron Z. *Birth Defects: Orig. Artic. Ser.*, 1974, v. 10, p. 231–238.
87. Parks J.S., Brown M.R., Faase M.E. *J. Pediatr.*, 1997, v. 131, p. S45–S50.
88. Rosenfeld R.G., Hwa V. *Eur. J. Endocrinol.*, 2004, v. 151, Suppl 1, p. S11–S15.
89. Powell D.R. *J. Pediatr.*, 1997, v. 131, p. S13–S16.
90. Adams E.F., Buchfelder M., Lei T., Petersen B., Fahlbusch R. *Acta Neurochir. Suppl.*, 1996, v. 65, p. 7–10.
91. Ranke M.B. *Pediatrician.*, 1987, v. 14, p. 178–182.
92. Darendeliler F., Hindmarsh P.C., Brook C.G. *Horm. Res.*, 1990, v. 33, p. 128–136.
93. Benfield M.R., Kohaut E.C. *J. Pediatr.*, 1997, v. 131, p. S28–S231.
94. Friedman A.L. *Ibid.*, 1997, v. 131, p. S25–S27.
95. Allen D.B., Rundle A.C., Graves D.A., Blethen S.L. *J. Pediatr.*, 1997, v. 131, p. S32–S36.
96. Shalet S.M., Brennan B.M., Reddingius R.E. *Horm. Res.*, 1997, v. 48, Suppl. 4, p. 29–32.
97. Frasier S.D. *Endocr. Rev.*, 1983, v. 4, p. 155–170.
98. Van Loon K. *Horm. Res.*, 1998, v. 49, Suppl 2, p. 78–81.
99. Gombert-Maitland M., Frishman W.H. *Am. Heart. J.*, 1996, v. 132, p. 1244–1262.
100. Lombardi G., Colao A., Ferone D. e. a. *Horm. Res.*, 1997, v. 48, Suppl 4, p. 38–42.
101. Lamberts S.W., van den Beld A.W., van der Lely A.J. *Science*, 1997, v. 278, p. 419–424.
102. Sugimoto T., Nakaoka D., Nasu M. e. a. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 1999, v. 51, p. 715–724.
103. Saaf M., Hilding A., Thoren M. e. a. *Eur. J. Endocrinol.*, 1999, v. 140, p. 390–399.
104. Goffin V., Bernichtein S., Carriere O. e. a. *Endocrinology*, 1999, v. 140, p. 3853–3856.
105. Ross R.J., Leung K.C., Maamra M. e. a. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, v. 86, p. 1716–1723.
106. Parkinson C., Scarlett J.A., Trainer P.J. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, v. 55, p. 1303–1314.
107. Pursel V.G., Hammer R.E., Bolt D.J. e. a. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1990, v. 41, p. 77–87.
108. Vandepute-Van Messom G.V., Burvenich C. *J. Dairy Sci.*, 1993, v. 76, p. 3727–3741.
109. Hammond B.G., Collier R.J., Miller M.A. e. a. *Ann Rech. Vet.*, 1990, v. 21, Suppl 1, p. 107S-120S.
110. Laron Z., Galatzer A. *Brain Dev.*, 1985, v. 7, p. 559–567.
111. Aloia J.F., Zanzi I., Cohn S.H. *Metabolism*, 1975, v. 24, p. 795–798.
112. Neely E.K., Rosenfeld R.G. *Annu Rev. Med.*, 1994, v. 45, p. 407–420.
113. Clark W., Kendall M.J. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 1996, v. 21, p. 367–372.
114. Shadid S., Jensen M.D. *Obes. Res.*, 2003, v. 11, p. 170–175.
115. Bradley C.A., Sodeman T.M. *Clin. Lab. Med.*, 1990, v. 10, p. 473–477.
116. Kicman A.T., Cowan D.A. *Brit. Med. Bull.*, 1992, v. 48, p. 496–517.
117. Minuto F., Barreca A., Melioli G. *J. Endocrinol. Invest.*, 2003, v. 26, p. 919–923.
118. Frisch H. *Ibid.*, 1999, v. 22, p. 106–109.
119. von Werder K. *Ibid.*, 1999, v. 22, p. 137–141.