Ткачук Т. Г., Макаревич Д. А., Мартинович В. П., Ермола Е. М., Голубович В. П.

ПЕПТИДНЫЕ АНАЛОГИ БЕЛКОВОГО ЛИГАНДА TNF-α КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ TNF-α

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск

TNF-α — внеклеточный белок, многофункциональный провоспалительный цитокин, продуцируемый в основном моноцитами и макрофагами. Влияет на липидный метаболизм, коагуляцию, устойчивость к инсулину и функционирование эндотелия. TNF-α обладает цитотоксическим действием, иммуномодулирующим и провоспалительным эффектом, участвует в противовирусном, противоопухолевом и трансплантационном иммунитете [1]. В высокой концентрации TNF-α способен повреждать клетки эндотелия и увеличивать микроваскулярную проницаемость, он вызывает активацию системы гемостаза и комплемента, за которым следует аккумуляция нейтрофилов и внутрисосудистое микротромбообразование [2]. Гиперпродукция цитокина TNF-α служит причиной развития ряда патологических состояний, в частности, септического шока [3]. Появление TNF-α в системном кровотоке сразу приводит повышению концентрации острофазовых белков и компонентов комплемента, снижению синтеза альбумина, а также наблюдается усиление свёртываемости и изменение ионного состава крови. Поэтому целесообразно снижение концентрации этого метаболита в крови пациентов.

В настоящее время в клинической практике широко применяют препараты на основе моноклональных антител к TNF-α. Однако получение моноклональных антител является процессом дорогостоящим и длительным. Не следует забывать о том, что на моноклональные антитела, являющиеся чужеродным белком, также может развиваться собственный иммунный ответ.

Целью работы являлся отбор пептидных структур потенциальных аналогов белковых ингибиторов TNF-α, их синтез и определение связывания с TNF-α.

Репозиторий

В Protein Data Bank был осуществлен поиск пространственных структур белка TNF-α и его комплексов с лигандами различной природы. Далее из найденных была отобрана структура, которая по своим свойствам наилучшим образом подходила для расчетов и прогноза потенциальных участков связывания белка-лиганда с TNF-α. С помощью программного комплекса, разработанного сотрудниками лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси, были рассчитаны предполагаемые участки связывания белка-лиганда poxvirus L2 protein с TNF-α, также была разработана схема и проведен химический синтез спрогнозированных олигопептидных аналогов центров связывания этого белка с TNF-α. В структуре poxvirus L2 protein имеются 3 участка (рис. 1), которые принимают участие в образовании комплекса с TNF-α, поэтому были синтезированы 3 пептида — аналоги связывающих центров белка.

Биологические исследования по ингибированию TNF-α проводили в модельных растворах, при помощи иммуноферментного набора «DRG TNF-α (human) EIA». Такие наборы используются для количественного определения человеческого TNF-α в биологических жидкостях. Растворы пептидов были приготовлены в концентрациях — 25 мкг/мл и 100 мкг/мл объемом 100 мкл, модельные растворы TNF-α 100 мкг/мл объемом 100 мкл. Смешивали, инкубировали при 37 °С, в течение 60 минут, отбирали 50 мкл для дальнейших исследований.

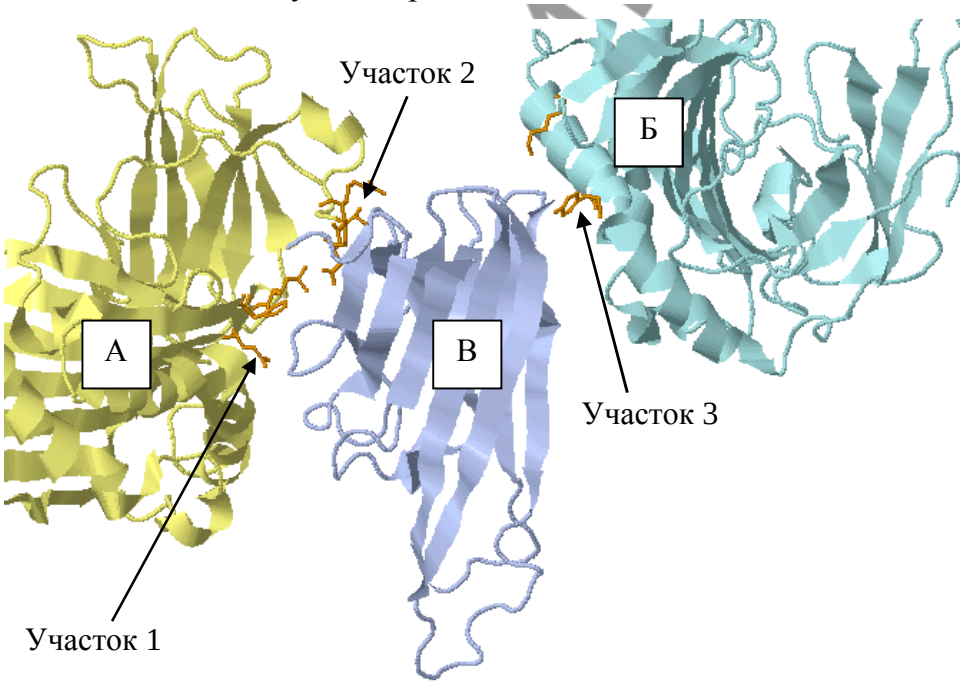

Рис. 1. Домены poxvirus L2 protein (А и Б) и домен TNF-α (В) с выделенными участками связывания poxvirus L2 protein

По результатам экспериментов связывающая способность пептидов с TNF-α составила от 13 до 36 %, в зависимости от концентрации и химической формулы пептидов (рис. 2, 3). Смесь пептидов показала большую связывающую с TNF-α. На рис. 2 и 3 можно отметить, что для смеси 2 пептидов процент ингибирования составил от 32 до 59 %, а для смеси из 3 пептидов — от 38 до 61 %. Это может говорить о том, что исследуемые пептиды в модельном растворе могут

связываться с несколькими активными центрами в молекуле TNF-α и тем самым увеличивать степень ингибирования TNF-α.

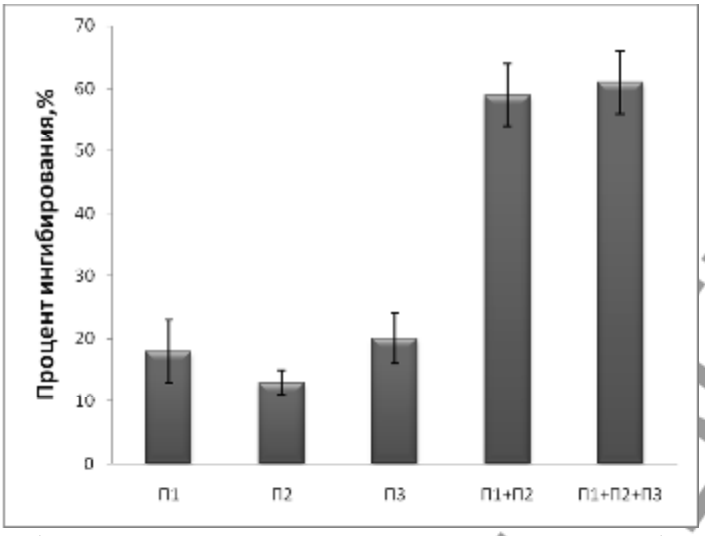

Рис. 2. Степень ингибирования TNF-α с олигопептидными аналогами белка-лиганда TNF-α с концентрацией пептида 100 мкг/мл

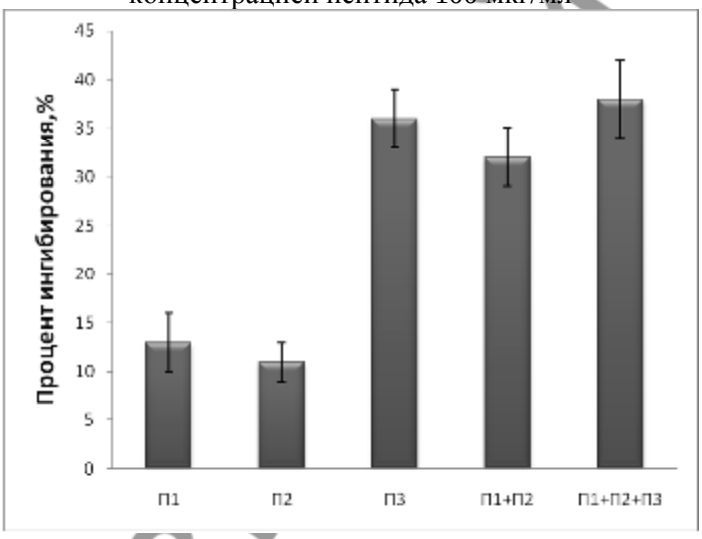

Рис. 3. Степень ингибирования TNF-α с олигопептидными аналогами белка-лиганда TNF-α с концентрацией пептида 25 мкг/мл

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования синтезированного экспериментального пептида в качестве лиганда для синтеза сорбента, обладающего антицитокиновой активностью. В качестве перспективы намечены эксперименты *in vitro* по изучению специфической активности по связыванию TNF-α в плазме пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kriegler, M.* [et al.] // Cell. 1988. Vol. 53(1). P. 45–53.
2. *Al-Lamki, R. S.* [et al.] // J. FASEB. 2005. Vol. 19(12). P. 1637–1645.
3. *Bradley, J. R.* // J. Pathol. 2008. Vol. 214(2). P. 149–160.

Чураков А. В.