

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ИЛ-6 В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Рябцева Т. В.

*аспирант, кафедра биологической химии, УО «Белорусский
государственный медицинский университет»,
ta-yana@mail.ru*

Таганович А. Д.

*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии, УО
«Белорусский государственный медицинский университет»,
г.Минск, Беларусь*

*В данной статье рассмотрен вопрос использования интерлейкина-6 в качестве мишени для разработки противовоспалительной терапии. Авторами исследования обосновано использование иммобилизованных синтетических олигопептидов в качестве лигандов для снижения концентрации ИЛ-6 в плазме крови человека. В статье приведены результаты анализа трёхмерной модели молекулярно-рецепторного комплекса ИЛ-6 с gp80 и gp130. На основании данного анализа были предложены аминокислотные последовательности, соответствующие локусам взаимодействия цитокина с рецепторами. Результаты расчёта и сравнительный анализ свободной энергии связывания позволил определить наиболее перспективные олигопептиды. Авторы статьи *in vitro* подтвердили эффективность использования иммобилизованных олигопептидов для снижения концентрации ИЛ-6 в плазме крови человека.*

Ключевые слова: *интерлейкин-6; цитокины; цитокиновый шторм; олигопептиды.*

THE APPLICATION OF IMMOBILIZED OLIGOPEPTIDES TO REDUCE IL-6 CONCENTRATION IN HUMAN BLOOD PLASMA

Ryabceva T. V.

*The post-graduate student, the Department of Biological Chemistry, the Belarusian
State Medical University, Minsk, Belarus
ta-yana@mail.ru*

Tahanovich A. D.

*The Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Biological Chemistry,
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

In this article discusses the use of interleukin-6 as a target for the development of anti-inflammatory therapy. The authors have substantiated the use of immobilized synthetic oligopeptides as ligands to reduce the IL-6 concentration in human plasma. The article presents the analysis of the three-dimensional model of the molecular receptor complex of IL-6 with gp80 and gp130. Based on this analysis, were proposed the amino acid sequences of oligopeptides corresponding to the loci of the IL-6 interaction with receptors. The calculation results and comparative analysis of the free binding energy made it possible to determine the most promising oligopeptides. The

authors of the article in vitro confirmed the effectiveness of the immobilized oligopeptides to reduce the concentration of IL-6 in human plasma.

Key words: *interleukin-6; cytokines, cytokine storm; oligopeptides.*

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) считается ключевым молекулярным фактором развития цитокинового шторма. Цитокиновый шторм - как особая форма системной воспалительной реакции является распространенной проблемой современной медицины. Основой патогенеза данного состояния является чрезмерно высокие концентрации в крови провоспалительных цитокинов [1]. Гиперпродукция этих цитокинов приводит к повреждению тканей и органов собственной иммунной системой [2]. Основными клиническими проявлениями являются подъем температуры тела, снижение кровяного давления и тромбоз сосудов [3,4]. Одним из терапевтических подходов для лечения цитокинового шторма является использование экстракорпоральных методов, в частности гемосорбции [5]. Однако существующие гемосорбенты не обладают достаточной специфичностью и при их применении происходит удаление всех цитокинов, как про- так и противовоспалительных. Для повышения специфичности сорбции необходима разработка аффинных лигандов, способных к избирательному удалению цитокинов [6].

Анализ научной литературы показал, что олигопептиды могут быть использованы в качестве аффинных лигандов для гемосорбентов, так как они обладают высокой селективностью, низкой токсичностью, химическим и биологическим разнообразием [7]. С помощью методов молекулярного докинга существует возможность предварительного анализа взаимодействия большого числа пептидов с молекулой-мишенью для выбора наиболее эффективных. Для оценки возможности использования найденных пептидов для производства гемосорбентов необходим анализ их эффективности после иммобилизации на полимерном носителе, а именно на полиакриламидном геле (ПААГ). Так как именно ПААГ используется в качестве полимерного носителя в зарегистрированных к применению в Беларуси и России гемосорбентах.

Целью исследования являлось изучение олигопептидов методом молекулярного докинга и в экспериментах *in vitro* связываться с ИЛ-6.

Материалы и методы исследования.

Для прогнозирования структуры перспективных низкомолекулярных олигопептидов анализировали трехмерные модели из базы данных NCBI ProteinDataBank: 1I1R (комплекс цитокина с цитокинсвязывающей областью gp130) и 1P9M (комплекс ИЛ6/рецептор ИЛ6/gp130) в программе Chimera. Оценку свободной энергии взаимодействия олигопептидов с ИЛ-6 с помощью программного обеспечения AutodockVina [8].

Иммобилизацию олигопептидов проводили на полиакриламиде, путем введения в смесь раствора олигопептида на стадии полимеризации [9]. Для оценки эффективности иммобилизованных олигопептидов *in vitro* применяли шихтовый метод [10]. В качестве объекта исследования использовали плазму

крови, полученную после активации цельной крови здоровых доноров эндотоксином [11]. Активация клеток крови была необходима для обогащения крови провоспалительными цитокинами. Концентрация цитокинов после активации составляла для ФНО- α 1302,68 (1228,26÷1363,81) пг/мл, для ИЛ-8 357,76 (330,01÷385,90) пг/мл, для ИЛ-6 642,41 (619,00÷701,84) пг/мл.

Определение цитокинов проводили методом иммуноферментного анализа в плазме до и после контакта с иммобилизованными олигопептидами. По изменению концентрации ИЛ-6 в плазме крови человека судили об их эффективности.

Статистическую обработку и построение графиков проводили с помощью программы Statistica 10.0. Все значения представлены в виде Me (25%;75%).

Результаты и обсуждение.

В результате анализа трехмерной модели комплекса ИЛ-6 с рецепторами в полипептидной цепи молекулы gp80 было выделено семь участков, которые визуальным образом наиболее близко расположены к молекуле ИЛ-6: -Ser¹⁰⁶-Pro¹⁰⁷-Leu¹⁰⁸-Ser¹⁰⁹-Asn¹¹⁰-, -Phe¹³⁴-Gln¹³⁵-Asn¹³⁶-Ser¹³⁷-Pro¹³⁸-, -Val¹⁶¹-Pro¹⁶²-Glu¹⁶³-Gly¹⁶⁴-Asp¹⁶⁵-Ser¹⁶⁶-Ser¹⁶⁷-Phe¹⁶⁸-, -Thr¹⁸⁸-Phe¹⁸⁹-Gln¹⁹⁰-Gly¹⁹¹-Cys¹⁹²-, -Ser²²⁷-Ser²²⁸-Phe²²⁹-Tyr²³⁰-Arg²³¹-, -Lys²⁵²-Asp²⁵³-Leu²⁵⁴-Gln²⁵⁵-, -Gln²⁷⁶-Glu²⁷⁷-Glu²⁷⁸-Phe²⁷⁹-Gly²⁸⁰-Gln²⁸¹-Gly²⁸²-Glu²⁸³-. В молекуле gp130 были выделены следующие участки: -Asn¹¹⁵-Glu¹¹⁶-Gly¹¹⁷-Lys¹¹⁸-Lys¹¹⁹-Met¹²⁰-, -Glu¹⁴¹-Trp¹⁴²-Ala¹⁴³-Thr¹⁴⁴-His¹⁴⁵-Lys¹⁴⁶-Phe¹⁴⁷-, -Asp¹⁶³-Tyr¹⁶⁴-Ser¹⁶⁵-Thr¹⁶⁶-Val¹⁶⁷-Tyr¹⁶⁸-Phe¹⁶⁹-Val¹⁷⁰-Asn¹⁷¹-, -Phe¹⁹²-Asp¹⁹³-Pro¹⁹⁴-Val¹⁹⁵-Tyr¹⁹⁶-Lys¹⁹⁷-, -Lys²²⁸-Ser²²⁹-Val²³⁰-Ile²³¹-Ile²³²-Leu²³³-, -Ala²⁵⁶-Ser²⁵⁷-Thr²⁵⁸-Arg²⁵⁹-Ser²⁶⁰-, -Glu²⁸²-Asp²⁸³-Gly²⁸⁴-Lys²⁸⁵-Gly²⁸⁶-.

Для молекулярного докинга сконструировали 13 дипептидов, из которых дипептид Phe-Val обладал максимальной по модулю энергией связывания, которая составила |5,70 (5,60;5,95)| ккал/моль. Из 17 трипептидов наиболее прочное взаимодействие с ИЛ-6 было у Tyr-Phe-Val с энергией связывания |6,60 (6,40;6,80)| ккал/моль. Из 15 тетрапептидов наибольшей по модулю энергией связывания с ИЛ-6 обладал Ser-Phe-Tyr-Arg |6,35 (6,14;6,47)| ккал/моль и Trp-Ala-Thr-His |6,35 (6,02;6,67)| ккал/моль. Изучение 15 пентапептидов показало, что связывания с ИЛ-6 пентапептида Val-Tyr-Phe-Val-Asn будет максимально прочным, так как модуль энергии связывания равен |6,40 (6,30;5,45)| ккал/моль.

Анализ закономерности изменения свободной энергии связывания с ИЛ-6 олигопептидов в зависимости от количества аминокислот показал статистически значимое увеличение энергии связывания при увеличении количества аминокислот с двух до четырех (рис 1). Статистической значимости разницы между медианой свободной энергии связывания пентапептидов и медианой свободной энергии связывания тетрапептидов не было, поэтому для дальнейшего изучения отбирали олигопептиды среди три и тетрапептидов.

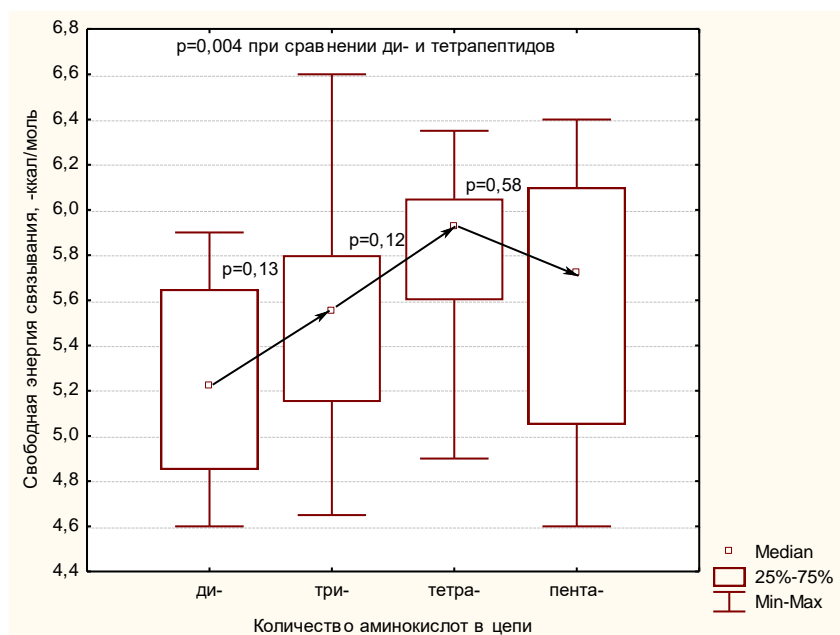


Рисунок 1. – Энергия связывания олигопептидов с ИЛ-6 в зависимости от количества аминокислот в цепи

Сравнительный анализ свободной энергии связывания с ИЛ-6 олигопептидов-аналогов gp80 и олигопептидов-аналогов gp130 не выявил статистически значимых различий (табл. 1). Поэтому данный критерий не использовали при выборе перспективных пептидов.

Таблица 1. – Свободная энергия связывания пептидов-аналогов gp80 и пептидов-аналогов gp130 с ИЛ-6

Олигопептиды	Аналоги gp80	Аналоги gp130	p
Ди-	5,15 (4,80;5,45)	5,32 (4,85;5,77)	0,61
Три-	5,60 (5,30;5,97)	5,30 (5,00;5,90)	0,56
Тетра-	5,80 (5,40;5,95)	6,02 (5,60;6,25)	0,15
Пента-	5,72 (5,52;5,95)	5,62 (5,00;6,20)	0,75

В экспериментах *in vitro* участвовали олигопептиды Tyr-Phe-Val и Ser-Phe-Tyr-Arg. После контакта плазмы крови с данными пептидами, иммобилизованными на полиакриламидном геле, наблюдали снижение концентрации ИЛ-6 (табл.2).

Таблица 2. – Изменение концентрации ИЛ-8 после контакта с иммобилизованными специфическими синтетическими олигопептидами

Образец	Концентрация ИЛ-6, пг/мл	Эффективность сорбции ИЛ-6, пг на 1 мл геля
Исходная плазма	556,82 (508,30-570,16)	-
ПААГ- YFV	475,38 (416,89-491,80)	78,73 (68,95-108,10)*
ПААГ- SFYR	419,60 (402,06-457,20)*	100,23 (81,18-153,62)*
ПААГ	536,87 (449,99-545,06)	29,23 (23,89-46,20)

Примечание: ПААГ-полиакриламидный гель, * - статистически значимая разница при сравнении с ПААГ без лиганда ($p < 0,05$); ** - статистически значимая разница при сравнении ПААГ-YFV и ПААГ-SFYR ($p < 0,05$), тест Мана-Уитни

Эффективность сорбции цитокина тетрапептидом Ser-Phe-Tyr-Arg и трипептидом Tyr-Phe-Val одинаковая, с тенденцией к увеличению при увеличении количества аминокислотных остатков в олигопептиде.

Результаты данного исследования свидетельствовали о том, что молекулярный докинг может быть использован в качестве предварительного этапа поиска специфических олигопептидов для связывания молекул-мишеней. Было показано, что иммобилизованные олигопептиды, являющиеся структурными короткоцепочечными аналогами цитокинсвязывающей области рецепторов провоспалительных цитокинов, могут быть использованы для снижения их концентрации в плазме крови.

Это может рассматриваться как перспективное направление в разработке отечественных изделий медицинского назначения для экстракорпорального удаления цитокинов из плазмы крови. Необходимы дополнительные исследования для определения эффективной концентрации олигопептида и безопасного объема гемосорбционной колонки.

Литература

1. Chen, L. Confronting the controversy: Interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome / Chen LYC, Hoiland RL, Stukas S, et al. // Eur Respir J. – 2020. - in press. - <https://doi.org/10.1183/13993003.03006-2020>
2. Tisoncik, J.R. Into the eye the cytokine storm / J.R. Tisoncik, M.J.Korth, C.P.Simmons etc. // Microbiology and molecular biology reviews. – 2012. – V.16. – N.1. – p.16-32
3. Fajgenbaum, D.C. Cytokine storm / D.C.Fajgenbaum, C.J.June // N Engl J Med. – 2020. – V.23. – N383. – p.2255-2273

4. Потапнев, М.П. Цитокиновый шторм: причины и последствия / М.П. Потапнев // Иммунология. – 2021. – Т.42. - №2. – с.175-188
5. Nakada, T. Blood purification for hypercytokinemia / T.Nakada, H.Hirasawa, S.Oda etc. // Transfusion and apheresis science. – 2006. – V.35. – p.253-264
6. Harm,S. Cytokine removal in extracorporeal blood purification: an in vitro study / S.Harm, C.Schildbock, J.Hartmann // Blood Purif., 2019. – doi:10.1159/000502680
7. Acquah,C. Aptamers: an emerging class of bioaffinity ligands in bioactive peptide applications / C.Acquah, D.Agyei, E.M.Obeng etc. // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2019. - doi: 10.1080/10408398.2018.1564234
8. Sottriffer C.A., Flader W., Winger R.H. et al. Automated docking of ligands to antibodies: method and applications / Methods, 2000, V.20, p.280-291
9. Грибовская О.В., Шутова И.В., Цыганова О.В., Мартинович В.П., Голубович В.П. Новые биоаффинные сорбенты для избирательной элиминации аутоантител к тиреопероксидазе человека при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы // Биомедицинская химия. – 2012. - том.58. - вып.2. - с.211-219
10. Oda, S. Cytokine adsorptive property of various adsorbents in immunoadsorption columns and a newly developed adsorbent: an in vitro study / S.Oda, H.Hirasawa, H.Shiga etc. // Blood purification. - 2004. – V.22. – p.530-536.
11. Wang, J.E. Cytokine modulation in experimental endotoxemia: characterization of an ex vivo whole blood model / J.E. Wang, R.Solberg, C.Okkenhaug etc. // Eur Surg Res. – 2000. – V.32. – p.65-73