

## СПЕЦИФИЧНОСТЬ СОРБЦИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ОЛИГОПЕПТИДАМИ

**Т.В. Рябцева, А.Д. Таганович**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, ta-yana@yandex.ru*

**Актуальность.** Цитокиновый шторм как особая форма системной воспалительной реакции является распространенной проблемой современной медицины. Основой патогенеза данного состояния является чрезмерно высокие концентрации в крови таких провоспалительных цитокинов как фактор некроза опухолей альфа (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и интерлейкин-8 (ИЛ-8) [1,2]. Гиперпродукция этих цитокинов говорит о том, что интенсивность иммунного ответа в несколько раз превышает резервные возможности организма. При этом происходит повреждение тканей и органов собственной иммунной системой [3]. Основными клиническими проявлениями являются подъем температуры тела, снижение кровяного давления и тромбоз сосудов [4,5]. Одним из терапевтических подходов для лечения цитокинового шторма является использование экстракорпоральных методов, в частности гемосорбции [3]. 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.

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 [6,7]. С помощью методов молекулярного докинга существует возможность предварительного анализа взаимодействия большого числа пептидов с молекулой-мишенью для выбора наиболее эффективных. Именно таким образом, нами ранее был проведен анализ олигопептидов, являющихся аналогами цитокинсвязывающего участка рецепторов к ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8. Были отобраны олигопептиды с минимальными энергиями связывания, что косвенно свидетельствовало о максимальной силе взаимодействия. 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 специфичности связывания отобранных ранее олигопептидов с ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8. Для этого был проведен перекрестный анализ взаимодействия всех отобранных олигопептидов с каждым из исследуемых цитокинов с помощью молекулярного докинга и в экспериментах *in vitro*.

**Материалы и методы исследования.** В работе исследовали олигопептиды, аминокислотная последовательность которых была составлена на основе анализа цитокинсвязывающих участков рецепторов к ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8. С помощью молекулярного докинга были определены наиболее эффективные для каждого цитокина олигопептиды. Первую группу составили олигопептиды, являющиеся структурными аналогами цитокинсвязывающей области рецептора к ФНО- $\alpha$ , Trp-Val-Pro (WVP, M=400,00 Да), Trp-Asn-Trp-Val (WNWV, M=604,00 Да) и Trp-Asn-Trp (WNW, M=505,00 Да). Во вторую группу объединили пептиды, аминокислотная последовательность которых была составлена на основе анализа цитокинсвязывающей области рецептора ИЛ-8. Это пептиды Trp-Asp-Phe-Asp (WDFD, M=582,25Да) и Trp-Asp-Phe-Phe (WDFP, M=613,66Да). В третью группу включили пептиды-аналоги рецептора для ИЛ-6: Tyr-Phe-Val (YFV, M=428,20 Да) и Ser-Phe-Tyr-Arg (SFYR, M=571,62 Да). Синтез данных олигопептидов был заказан на производстве Changzhou Xuanming Chemical Co. Ltd., Чанчжоу, Цзянсу, Китай.

Химическую иммобилизацию олигопептидов проводили с помощью реакции радикальной полимеризации акриламида и метилен-бис-акриламида (общий объем реакционной смеси 10 мл) с раствором олигопептида (10  $\mu$ M). Для экспериментов *in vitro* использовали плазму крови с высокой концентрацией ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8. Плазму получали путем активирования крови практически здоровых доноров липополисахаридом *E.coli*. Концентрация цитокинов после активации составляла для ФНО- $\alpha$  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.

Об эффективности удаления цитокинов иммобилизованными олигопептидами судили по разнице концентрации цитокина до и после взаимодействия плазмы с иммобилизованными на ПААГ пептидами [Blood purification, 2004]. Статистический анализ проводили методами непараметрической статистики, результаты описывали в виде медианы, 25 и 75 перцентилей.

**Результаты и обсуждение.** Результаты молекулярного докинга показали, что наиболее эффективное связывание всех исследуемых олигопептидов наблюдали с тримером ФНО- $\alpha$  (табл.1). Визуализация данных комплексов показала, что олигопептиды, располагаются между субъединицами молекулы. Этим можно объяснить более выгодное термодинамически эффективное состояние и наименьшую свободную энергию связывания.

Таблица 1. – Перекрестный анализ свободной энергии связывания пептидов с ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8

Олигопептиды, группа	ФНО- $\alpha$ (тример, M=52,5 кДа)	ФНО- $\alpha$ (мономер, M=17,5 кДа)	ИЛ-6 (M=21кДа)	ИЛ-8 (мономер, M=8,8 кДа)	Статистическая значимость различий
1-я (N=60)	7,20 (7,00;7,70)	6,50 (5,80;6,70)	6,80 (6,20;7,20)	6,10 (5,80;6,35)	p=0,001
2-я (N=60)	6,70 (6,50;7,10)	6,00 (5,75;6,10)	6,30 (6,00;6,50)	5,40 (5,20;5,85)	p=0,001
3-я (N=60)	7,35 (6,45;8,10)	6,00 (5,50;6,30)	6,45 (5,95;6,75)	6,70 (6,30;6,85)	p=0,001

Как показали расчеты, олигопептиды первой группы (аналоги рецептора к ФНО- $\alpha$ ) кроме ФНО- $\alpha$  эффективно также связывают ИЛ-6. Олигопептиды 3-й группы (аналоги рецептора к ИЛ-8), как и ожидалось, соединяются с мономером ИЛ-8 с максимальной свободной энергией.

Теоретические расчеты показали, что отобранные пептиды 1-й группы обладают специфичностью к ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6. Пептиды 3-й группы наиболее специфичны к ИЛ-8.

Исследования *in vitro* подтвердили результаты расчетов *in silico*. Так олигопептиды 1-й группы наиболее эффективно на 886,86 (762,99;986,37) пг/мл снижали концентрацию ФНО- $\alpha$ . Взаимодействие с другими олигопептидами также приводило к снижению концентрации данного цитокина, однако менее выраженному (табл.2).

Максимальное изменение концентрации ИЛ-8 на 645,72 (533,31;784,05) пг/мл наблюдали после взаимодействия плазмы с иммобилизованными олигопептидами 3-й группы. Следует отметить, что для 3-й группы олигопептидов была характерна высокая эффективность относительно всех исследуемых цитокинов. Вторая группа пептидов (аналоги рецептора к ИЛ-6) была наименее эффективной. Однако, если анализировать все три группы по эффективности сорбции ИЛ-6, то данную группу пептидов можно считать наиболее эффективной по отношению к данному цитокину.

Таблица 2. – Изменение концентрации ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8 в плазме крови до и после взаимодействия с иммобилизованными пептидами

Олигопептиды, группа	ФНО- $\alpha$ , пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	ИЛ-8, пг/мл	Статистическая значимость различий
1-я (N=60)	886,86 (762,99;986,37)	79,38 (37,18;110,21)	467,55 (354,09;581,83)	p=0,001
2-я (N=60)	432,46 (312,94;582,14)	159,11 (141,18;281,43)	358,35 (254,09;485,91)	p=0,001
3-я (N=60)	632,46 (512,82;716,88)	128,83 (94,15;175,77)	645,72 (533,31;784,05)	p=0,001

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. Однако высокой специфичности для исследованных олигопептидов относительно отдельных цитокинов обнаружено не было. Все пептиды в большей степени удаляли ФНО- $\alpha$ , в меньшей степени – ИЛ-6. Однако, учитывая синергизм функциональной активности исследуемых цитокинов, можно ожидать, что в организме человека снижение концентрации одного из цитокинов, например ФНО- $\alpha$ , будет приводить к снижению концентрации других провоспалительных цитокинов и в целом к снижению воспалительной реакции.

#### Список использованных источников

1. Tisoncik, J.R. Into the eye of the cytokine storm / J.R.Tisoncik, M.J.Korth, C.P.Simmons etc. // *MMBR*. – 2012. – V.76. – N1. – p.16-32
2. Fajgenbaum, D. Cytokine storm / D.Fajgenbaum, C.H.June // *N Eng J Med*. – 2020. – V.23. – p.2255-2273
3. Ye, Q. The pathogenesis and treatment of the “Cytokine storm” in COVID-19 / Q.Ye, B.Wang, J.Mao // *Journal of infection*. – 2020. – V.13. – p.17-24
4. Потапнев, М.П. Цитокиновый шторм: причины и последствия / М.П. потапнев // *Иммунология*. – 2021. – Т.42. - №2. – с.175-188
5. Shimizu, M. Clinical features of cytokine storm syndrome / M.Shimizu // doi:10.1007/978-3-030-22094-5\_3
6. Lau, J.L. Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions / J.L. Lau, M.K. Dunn // *Bioorganic&Medicinal Chemistry*. – 2018. – V.26. – p.2700-2707

7. Menegatti, S. The hidden potential of small synthetic molecules and peptides as affinity ligands for bioseparations / S. Menegatti, A.D. Naik, R.G. Carbonell // Pharm.Bioprocess. – 2013. – V.1(5). – p.467-485.