

УДК 616.24–002.5:615.1

DOI: 10.14427/jipai.2015.4.27

Оценка связывания базофилами синтетического пептида – фрагмента активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина E

В.В. Янченко^{1,2}

¹ Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь

² ОДО «Научно-исследовательское предприятие Ресан», г. Витебск, Беларусь

Evaluation of binding by basophils the synthetic peptide – a fragment of the active center of high affinity receptor of IgE

U. Yanchanka^{1,2}

¹ Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

² JSC “Scientific-research enterprise Resan”, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Синтетический пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, меченный ФИТЦ, идентифицировал иммуноглобулин E на лейкоцитах методом проточной цитометрии.

Ключевые слова

Пептид, связывающий IgE, высокоаффинный рецептор иммуноглобулина ε, FcεRIα, аллерген, крапивница, базофилы

Summary

A synthetic peptide p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, labeled with FITC, identified IgE on leukocytes and basophils by flow cytometry. Confirming the ability of the peptide p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα to cause desensitization of blood basophils in studies in vitro.

Keywords

Peptide, IgE high-affinity receptor, FcεRIα, test-system, allergen, urticaria, basophils

С каждым годом в мире отмечается неуклонный рост аллергических заболеваний, увеличивается число тяжёлых случаев аллергии и расширяется спектр причинно-значимых аллергенов [1, 2]. Приоритетным направлением является разработка новых методов диагностики и коррекции иммунитета у больных с IgE-зависимой аллергией. Больные IgE-зависимой аллергией отличаются от здоровых людей сенсibilизацией клеток, то есть значительным увеличением количества клеток, несущих на своей поверхности высокоаффинные рецепторы для иммуноглобулина E (FcεRI), к которым присоединены IgE антитела. Как только такой больной контактирует с причинно значимым аллергеном его сенсibilизированные базофилы и тучные клетки немедленно

ответят дегрануляцией и выбросом медиаторов и в течение от нескольких секунд до 15-20 минут возникнут клинические проявления болезни. Отсутствие на клетках высокоаффинного рецептора иммуноглобулина E предотвращает возникновение кожной или системной анафилаксии [3]. Для блокирования связывания иммуноглобулина E с его высокоаффинным рецептором у пациентов с аллергической бронхиальной астмой средней и тяжёлой степени применяют рекомбинантные мышинные гуманизированные моноклональные антитела E25 (rhu-Mab-E25 - омализумаб) [4].

Для решения проблемы диагностики, профилактики и лечения IgE-зависимой аллергии мы предлагаем использовать новый класс веществ – синтетические пептиды, связывающие IgE [5, 6].

Ранее в тестах *in vitro* нами было показано, что синтетические пептидные фрагменты активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина E, предотвращают развитие экспериментальной бронхиальной астмы у мышей [7-14].

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлась оценка IgE-связывающей способности синтетического пептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα - фрагмента активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина E лейкоцитами крови человека.

Материалы и методы

Пептид

Используя компьютерную программу Биоскан 9.14 ОДО «НИКП Ресан», базу данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) – локус NM_002001, базу данных известных структур протеинов и нуклеиновых кислот Великобритании (PDB) - файл 1f6a (авторы: S.C.Garman, B.A.Wurzburg, S.S.Tarchevskaya, J.P.Kinet, T.S.Jardetzky) был произведен анализ структуры альфа цепи высокоаффинного рецептора иммуноглобулина E (FcεRIα). Выбран, установленный в результате компьютерного анализа, активный пептидный фрагмент D2 домена FcεRIα рецептора, принимающий участие в лиганд-рецепторном взаимодействии с IgE. Для выбора потенциально активных пептидных фрагментов нами была выдвинута гипотеза о том, что фермент триптаза, содержащийся в базофилах крови и выделяющийся при их активации может ауторасщеплять FcεRIα и приводить к образованию пептидов регуляторов IgE опосредованной аллергической реакции. Результат виртуального ферментативного расщепления FcεRIα триптазой, выполненный компьютерной программой Биоскан 9.14 представлен ниже.

Протокол компьютерного моделирования пептидазного расщепления FcεRIα

Исследуемый образец: Homo sapiens Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide (FCER1A), mRNA.

Фермент: Homo sapiens tryptase alpha/beta 1 (TPSAB1), mRNA.

Тип фермента: эндопептидаза

Позиции расщепления:

1 r|x

2 k|x

mapamesptllcvallffapdgvlavpqr|pk|vslnppwnr|fk|genvtltcngnnffevsstk|wfhngslseetnsslnivnak|fedsgyeyk|cqhqqvnesepvylevfdswlllqasaevvmegqplflr|chgw|nwdvyk|viyyk|dgealk|ywyenhnisitnatvedsgtyuc

tgk|vwqldyeseplnitvik|apr|ek|ywlqffipllvilfavdtglfis
tqqvtfllk|ik|r|tr|k|gfr|llnphpk|pnpk|nn

Пептидные фрагменты расщепленного образца (по порядку, и их длина – количество аминокислотных остатков, указана в скобках на схеме ниже), всего фрагментов – 25.

1-29 mapamesptllcvallffapdgvlavpqr (29)

30-31 pk (2)

32-40 vslnppwnr (9)

41-43 ifk (3)

44-63 genvtltcngnnffevsstk (20)

64-84 wfhngslseetnsslnivnak (21)

85-92 fedsgyeyk (8)

93-131 cqhqqqvnesepvylevfdswlllqasaevvmegqplflr (39)

132-136 chgwr (5)

137-142 nwdvyk (6)

143-147 viyyk (5)

148-153 dgealk (6)

154-179 ywyenhnisitnatvedsgtyuctgk (26)

180-196 vwqldyeseplnitvik (17)

197-199 apr (3)

200-201 ek (2)

202-235 ywlqffipllvilfavdtglfistqqvtfllk (34)

236-237 ik (2)

238-238 r (1)

239-240 tr (2)

241-241 k (1)

242-244 gfr (3)

245-251 llnphpk (7)

252-255 pnpk (4)

256-257 nn (2)

В результате выполненного анализа из 25 фрагментов был выбран пептид D2 домена рецептора, состоящий из 6 аминокислот (последовательность 137–142), принимающий участие в лиганд-рецепторном взаимодействии с Fc-участком IgE. Расположение этого пептидного фрагмента на молекуле FcεRIα представлено ниже на изображении компьютерной модели рецептора (Рис.1).

Пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα (nwdvyk) может быть естественным пептидным метаболитом FcεRIα, возникающим в результате ферментативного расщепления рецептора ферментом Homo sapiens tryptase alpha/beta 1 (TPSAB1).

Пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα по нашей заявке был синтезирован под руководством В.П. Мартинович и В.П. Голубович в лаборатории прикладной биохимии ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь и любезно предоставлен нам для исследований. Чистота и структура синтезированного пептида подтверждена методами масс-спектрометрии, ТСХ, ВЭЖХ. Оптическое вращение пептида измеряли

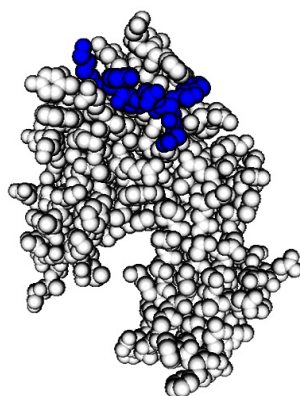


Рис. 1. Пространственная локализация пептидного фрагмента $p_{137-142}$ FcεRIα на молекуле FcεRIα

на спектрополяриметре J-20 («Jasco», Япония). Для определения молекулярной массы полученного пептида использовали масспектрометрию. Масс-спектры FAV записаны с использованием масс-спектрометра LCQ FLEET (химическая ионизация в атмосфере азота). Для типирования клеток крови на проточном цитометре в пептид вводили флуоресцентную метку - FITC (5,6-флуоресцеин изотиоцианат) стандартным методом.

Больные

Для выявления причинно значимого аллергена больным проводилось аллергологическое обследование, включая кожные и *in vitro* тесты с аллергенами. В исследование включены 15 больных аллергологического отделения Витебской областной клинической больницы с верифицированным диагнозом аллергической крапивницы ((13 женщин, 2 мужчины), возраст 43 (24-52) года) с выявленной в результате тестирования сенсibilизацией к аллергену шерсти кошки. У 2 больных была пищевая аллергия. В группу контроля были включены 13 относительно здоровых добровольцев в возрасте 53 (39-54) года, давшие письменное добровольное согласие на участие в исследовании.

Аллерген

Для активации базофилов крови сенсibilизированных больных при проведении провокационных тестов использовали водно-солевой экстракт аллергена шерсти кошки, производства ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова (Россия). В 1 мл раствора аллергена содержалось 10 000 PNU. PNU - protein nitrogen unit – единица белкового азота, международная количественно-определения аллергенов, 1 PNU содержал 10 нг белкового азота. Для активации базофилов

использовали аллерген в разведении 10-2 (концентрация 100 PNU/мл) в 0,9% растворе изотонического натрия хлорида.

Фенотипирование клеток крови

Фенотипирование лейкоцитов крови человека проводили с помощью проточного цитометра Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., США) и моноклональных антител: CD203c Mouse Anti-Human PE conjugate (NP4D6), ThermoScientific/Pierce; FcεRI Mouse Anti-Human RPE conjugate (9E1), AbD Serotec; CD63 Mouse Anti-Human mAb (clone CLB-gran/12), FITC conjugate, Life Technologies; CD45 Mouse Anti-Human mAb (clone HI30), PE-Cy7 conjugate, Life Technologies. Для лизиса эритроцитов использовали лизирующий раствор OptiLyse C, каталожный №A11894 (Beckman Coulter Inc., США).

Для определения связывания пептида $p_{137-142}$ FcεRIα с клетками крови к 100 мкл цельной гепаринизированной крови добавляли 1,5 мкл пептида $p_{137-142}$ FcεRIα в концентрациях от 1 мг до 1 мкг в 1 мл.

Влияние на базофилы крови пептида

$p_{137-142}$ FcεRIα и аллергена шерсти кошки

Венозную гепаринизированную кровь каждого пациента делили на 4 пробы: первая - 100 мкл цельной гепаринизированной крови + 100 мкл 0,9% изотонического раствора хлорида натрия; вторая - 100 мкл цельной гепаринизированной крови к которой добавляли 1,5 мкл 0,004% раствора пептида $p_{137-142}$ FcεRIα; третья - 100 мкл цельной гепаринизированной крови к которой добавляли 1,5 мкл аллерген шерсти кошки в концентрации 100 PNU/мл; четвертая - 100 мкл цельной гепаринизированной крови к которой добавляли 1,5 мкл 0,004% раствора пептида $p_{137-142}$ FcεRIα.

¹⁴²FcεRIα и 1,5 мкл аллерген шерсти кошки в концентрации 100 PNU/мл. Через 10 минут после добавления пептида и аллергена путем проточной цитометрии определяли процент CD203c⁺CD63⁺ базофилов в исследуемой крови и изменение на их экспрессии CD203c⁺.

Результаты и обсуждение

Фенотипирование лейкоцитов крови человека FITC-меченым пептидом р₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα показало, что в высоких дозах (1 мг/мл) синтетический пептид как неспецифически, так и специфически

связываются со всеми лейкоцитами крови. Разные лейкоциты связывали не одинаковое количество пептида: на рис.2 показано распределение р₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα-FITC позитивных клеток по каналам флуоресценции. Самую сильную флуоресценцию имели базофилы крови, после них – эозинофилы.

При уменьшении концентрации добавляемого FITC-меченого пептида р₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα в 1000 раз снижалось неспецифическое связывание, рис. 3.

Было изучено связывание пептида FcεRIα-FITC в концентрации 1 мкг/мл с клетками неспецифически высокоаффинный рецептор иммуно-

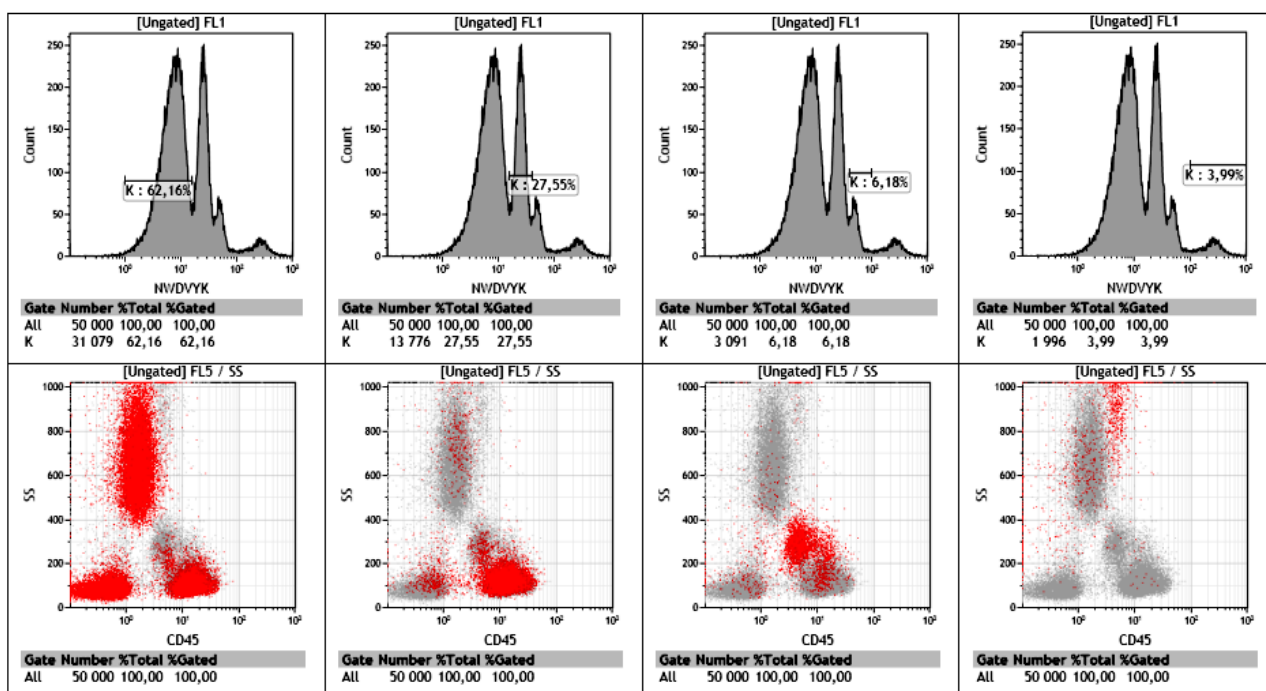


Рис.2. Распределение р₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα-FITC позитивных клеток по каналам флуоресценции и секторам клеточных популяций (1 мг/мл)

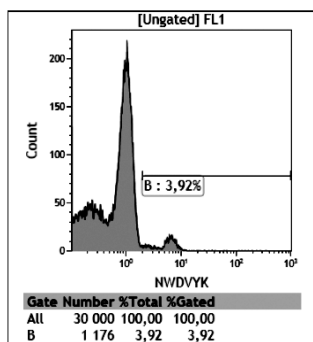


Рис.3. Гистограмма р₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα-FITC позитивных лейкоцитов (концентрация пептида 1 мкг/мл)

глобулина E, выявляемый мечеными моноклональными антителами. Среди $p_{137-142}$ FcεRIα и FcεRIα-позитивных клеток была выделена субпопуляция ярких - $p_{137-142}$ FcεRIαbright клеток, которые определялись в каналах выше 101. Оказалось, что 100% FcεRIα клеток имели иммуноглобулины E, детектируемые пептидом $p_{137-142}$ FcεRIα-FITC. На рис. 4 приведен типичный пример двух дот-плотов показывающих обнаружение иммуноглобулинов E связанных с высокоаффинным рецептором FcεRIα при помощи пептида $p_{137-142}$ FcεRIα-FITC.

Пептид $p_{137-142}$ FcεRIα-FITC в концентрации 1 мкг/мл использовали для выявления IgE-несущих базофилов крови человека, рис. 5.

Из всех клеток крови самое высокое связывание пептида $p_{137-142}$ FcεRIα-FITC обнаруживалось в местах локализации анти-IgE антител (FcεR1 Mouse Anti-Human RPE conjugate (9E1)), связанных с высокоаффинным рецептором иммуноглобулина E базофилов.

Была проверена способность пептида $p_{137-142}$ FcεRIα вызывать «десенсибилизацию» базофилов крови на аллерген. Проценты базофилов

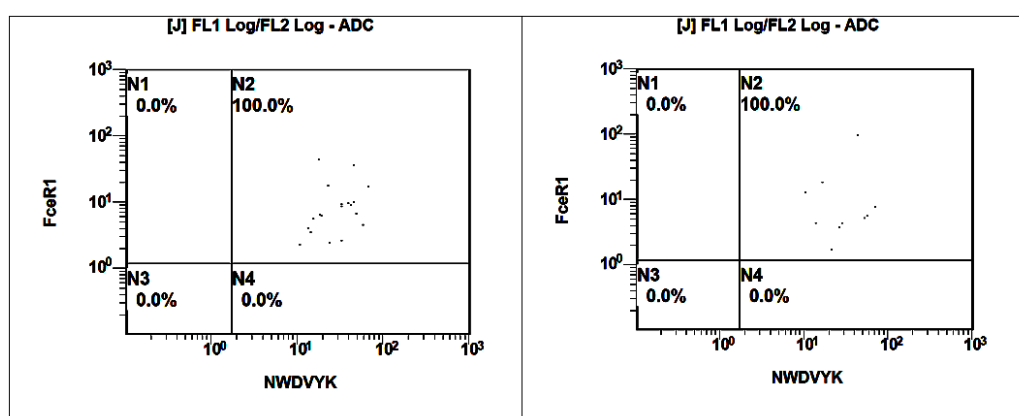


Рис. 4. Дот-плот ярких $p_{137-142}$ FcεRIα-FITC клеток (концентрация пептида 1 мкг/мл)

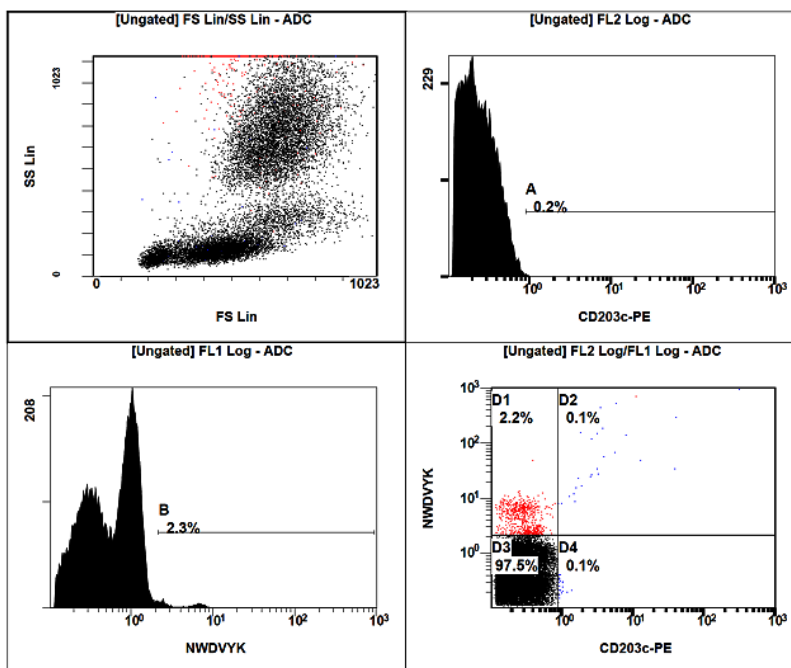


Рис. 5. Дот-плоты и гистограммы $p_{137-142}$ FcεRIα-FITC клеток, в том числе базофилов (концентрация пептида 1 мкг/мл)

CD203c⁺CD63⁺, несущих активационные молекулы, в виде Me [LQ-UQ] представлены на рис. 6. Исходно у больных с аллергической крапивницей 20,85% [18,1-25,3] базофилов крови экспрессировали CD203c⁺CD63⁺ молекулы. Инкубация с пептидом увеличивала процент CD203c⁺CD63⁺-несущих базофилов до 34,05 [25,2-55] (p=0,027), по сравнению с исходным. В то же время добавление к лейкоцитам аллергена шерсти кошки увеличивало процент CD203c⁺CD63⁺ базофилов до 44,1 [28,7-48,9] (p=0,004) по сравнению с исходным, что указывало на усиление экспрессии этих молекул на некоторых базофилах. При совместном одномоментном добавлении к клеткам крови

1,5 мкл 0,004% раствора пептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα и 1,5 мкл аллергена шерсти кошки в разведении 10-2 процент CD203c⁺CD63⁺ базофилов не отличался от исходного и составлял 23,6 [20,1-35]. Это указывало на конкурирующие механизмы стимуляции экспрессии активационных молекул базофилов пептидом и аллергеном.

Однако пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα угнетал на экспрессию CD203c^{bright} молекул базофилов не сенсibilизированных аллергеном кошки доноров и сенсibilизированных к аллергену шерсти кошки больных с крапивницей после 10 минутной инкубации. Примеры представлены ниже (рис. 7 и 8), сектор J на гистограммах отражает % CD203c^{bright}

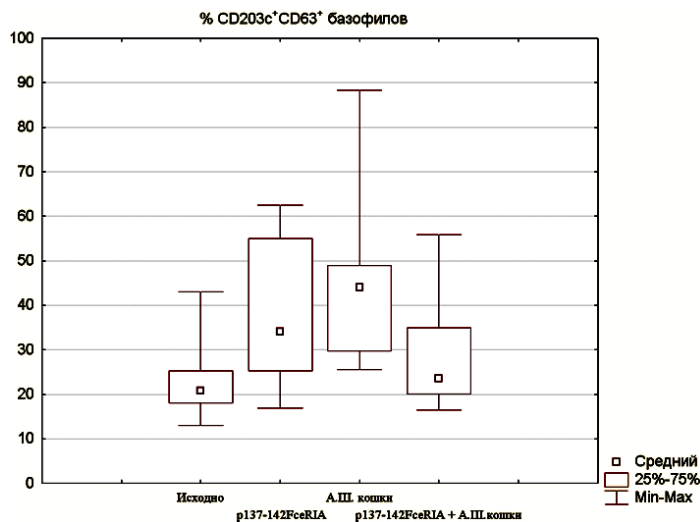


Рис. 6. Влияние пептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα и аллергена шерсти кошки на активационные рецепторы базофилов больных с аллергической крапивницей, сенсibilизированных к аллергену шерсти кошки

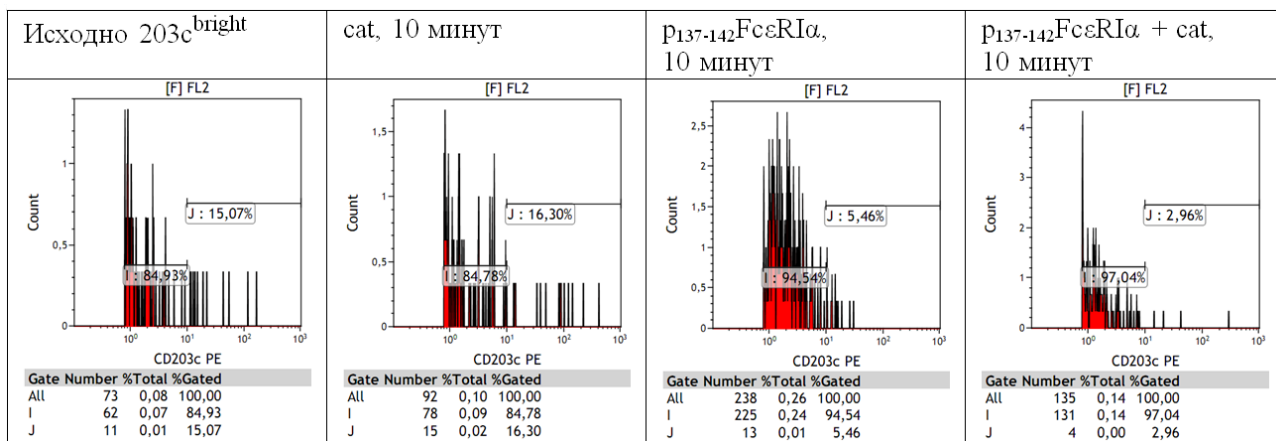


Рис. 7. Гистограмма базофилов не сенсibilизированного донора

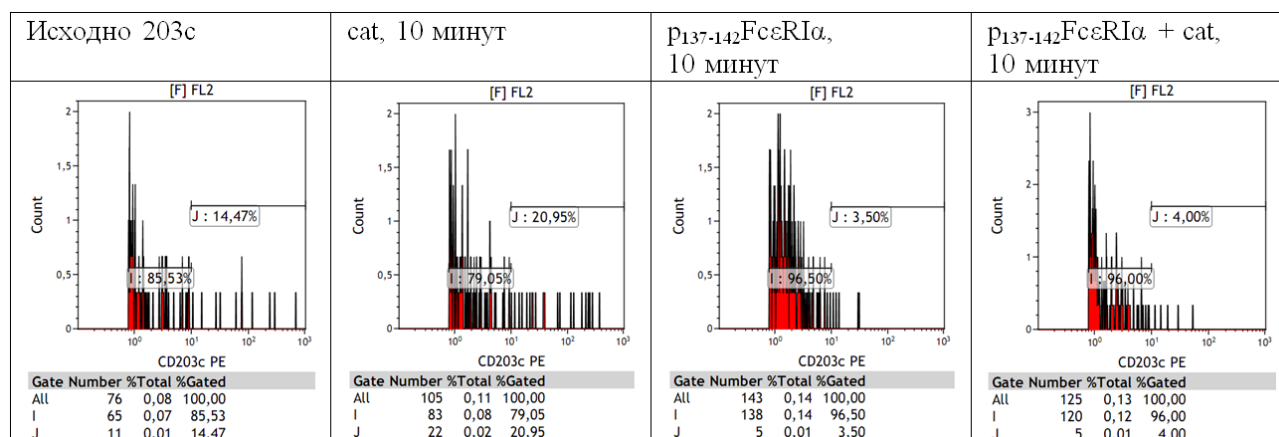


Рис.8. Гистограмма базофилов больного, сенсibilизированного к аллергену шерсти кошки

базофилов. Следовательно, пептид мог угнетать экспрессию CD203c молекул на высокоэкспрессирующих базофилах, тогда как увеличивал количество активационных молекул CD203c⁺CD63⁺ на не экспрессировавших их базофилах.

Выводы

1. Синтетический пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, меченый ФИТЦ, выявляет иммуноглобулины E класса, связанные лейкоцитами. В низких концентра-

циях (1 мкг/мл) он избирательно связывается с базофилами, экспрессирующими CD203c.

2. В условиях *in vitro* пептид и причинно значимый аллерген увеличивал и количество базофилов, экспрессирующих CD203c⁺CD63⁺.

3. Синтетический пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα уменьшал экспрессию активационных молекул на базофилах больных с крапивницей, индуцированную причинно значимым аллергеном шерсти кошки при их совместном добавлении к лейкоцитам.

Литература

1. WAO White Book on Allergy 2011, p. 36.
2. WAO White Book on Allergy 2013, p. 27-80.
3. Dombrowicz, D. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell*, 1993; Vol.75, № 5: 969-976.
4. Bisberg D. A phase 1, single-blind study to determine the safety, tolerance, pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody E25 (rhu-Mab-E25) in adolescents and children with moderate to severe allergic asthma. *Pediatr. Res.*, 1996; Vol.39, № 4: 9A
5. Янченко В.В. Выявление специфических IgE антител октапептидом, аналогом Fcε рецептора. Вестник Витебского государственного медицинского университета 2009; Т. 8, №1: 75-80.
6. Янченко В.В., Грибовская О.В., Янченко Л.К. и др. Синтетический RNWDVYK пептид, связывающий антитела E класса. Вестник фармации 2009; №2 (44): 48-55.
7. Янченко В.В., Выхристенко Л.Р., Новиков Д.К. и др. Оценка биологического действия синтетического гексапептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα на мышцах с экспериментальной моделью аллергической бронхиальной астмы. Вести НАН Беларуси. Серия медицинских наук 2011; №1: 34-44.
8. Янченко В.В., Выхристенко Л.Р., Новиков Д.К. и др. Десенсибилизирующая эффективность синтетического гек-

сапептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα и пероральной аллерговакцины АВ-1П на мышцах с экспериментальной моделью аллергической бронхиальной астмы. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2011; №3: 73-86.

9. Gribovskaya O.V., Martinovich V.P., Golubovich V.P. et al. The synthesis of peptide fragments of high affinity receptor FcεRI and their binding to allergen-specific immunoglobulins E. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2012; Т. 38, №3: 253-260.

10. Янченко В.В., Новиков Д.К., Выхристенко Л.Р. Оценка эффективности и безопасности синтетического гексапептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα при экспериментальной аллергической бронхиальной астме. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2013; №2: 55-65.

11. Янченко В.В. Фенотипирование базофилов крови IgE-связывающим пептидом при хронической крапивнице. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2014; №2: 19-23.

12. Янченко В.В., Выхристенко Л.Р., Величинская О.Г. и др. Синтез пептидного фрагмента 137-142 FcεRIα и оценка его влияния на некоторые аллергические реакции. Международная научно-практическая конференция. Белорусские лекарства. 27-28 ноября 2014 г., Минск, Беларусь, Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, сборник материалов: 248-250.

13. Yanchanka U.V., Smirnova A.U., Velichynskaya V.G. et al. Detection of the sensitized basophils by IgE-binding peptide. EUROBAT, European Consortium on Application of Flow Cytometry in Allergy, 12-13 Desember, 2014, Munich, Germany. [O5.3]. [http://www5.shocklogic.com/](http://www5.shocklogic.com/scripts/jmevent/programme.php?client_Id=EAACI&project_Id=EUROBAT3)

scripts/jmevent/programme.php?client_Id=EAACI&project_Id=EUROBAT3.

14. Новиков Д.К., Янченко В.В. Пептиды – аналоги активного центра FcεR1α: перспективы применения. Аллергология и иммунология 2014; Т. 15, №4: 262-265.

Сведения об авторах:

Янченко В.В. – к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ»

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК. Тел.8 0212 57 53 80 – Янченко Владимир Вилиянинович.

Поступила 26.10.2016 г.