

СИНТЕЗ ПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА 137-142 FcεRIα И ОЦЕНКА ЕГО ВЛИЯНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

^{2,3}Янченко В.В., ²Выхристенко Л.Р., ²Величинская О.Г., ¹Мартинovich В.П., ¹Голубович В.П.

1. *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, ул. Купревича, 5/2*
2. *Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 273.*
3. *ОДО «Научно-исследовательское предприятие Ресан», г. Витебск
vermar@iboch.bas-net.by*

IgE-зависимые аллергические реакции протекают при участии высокоспецифичной рецепторной сети, представленной на мембранных поверхностях многих клеток организма. Рецепторы к Fc-участкам иммуноглобулинов (Fc-рецепторы) являются основными компонентами этой структуры, избирательно связываясь с антителами, появившимися при контакте с антигенами [1]. Растворимые фрагменты высокоаффинного рецептора FcεRI – CD-23 действуют как отрицательный компонент обратной связи IgE-регулируемого и являются важными биологически активными соединениями, играющими определенную роль в этиологии IgE-зависимых заболеваний. Установлено, что синтез антител E класса зависит от количества циркулирующих в крови В-лимфоцитов, несущих мембраносвязанный IgE, и от растворимой формы CD-23 [2]. При взаимодействии IgE антител с причинно значимым аллергеном сенсibilизированные тучные клетки и базофилы немедленно дегранулируют с выбросом медиаторов, которые через несколько минут (15-20) индуцируют клинические проявления болезни. Блокирование иммуноглобулина E предотвращает возникновение IgE-зависимой аллергопатологии.

Приоритетным направлением является разработка новых методов коррекции иммунитета у больных с IgE зависимой аллергией. Предметом наших исследований является регуляция аллергопатологий с использованием синтетических пептидов – аналогов активных центров рецепторов иммуноглобулина E. Ранее мы показали, что пептидные фрагменты FcεRI - тетрапептид Arg-Asn-Trp-Asp и гептапептид Arg-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys способны связываться с IgE и влиять на течение аллергических реакций [3]. Целью данного исследования являлся синтез гексапептида последовательности 137-142 FcεRIα (Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys), оценка его влияния на тучные клетки мышей с экспериментальной аллергической бронхиальной астмой.

Материалы и методы исследования. Синтетический гексапептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, аналог активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина E, синтезировали в лаборатории прикладной биохимии ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск. Гексапептид был получен классическими методами пептидного синтеза, согласно схеме, включающей 10 синтетических стадий. При синтезе гексапептида боковые функциональные группы блокировали водородолабильными защитами. Основным методом образования пептидной связи был выбран карбодимидный, в качестве противорацемической добавки использовали 1-оксибензотриазол. Для блокирования α-аминогрупп использовали трет.бутилоксикарбонильную защиту. Её отщепление проводили обработкой пептидов 3,5 – 5,0 н. раствором HCl в этилацетате. Карбоксильные группы блокировали путем образования метиловых эфиров, для их удаления использовали щелочной гидролиз. Водородолабильные группы удаляли гидрированием пептида над катализатором – палладиевой чернью, в растворе уксусной кислоты.

Чистота и структура синтезированного гексапептида подтверждены методами масс-спектрометрии, ТСХ, ВЭЖХ. Оптическое вращение гексапептида измеряли на спектрополяриметре J-20 («Jasco», Япония). Масс-спектры FAB записаны с использованием масс-спектрометра LCQ FLEET (химическая ионизация в атмосфере азота). Суммарный выход H-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys-OMe составил 14%, $[\alpha]_D^{20}$ -21,0° (с 1, уксусная кислота). Масс-спектр FAB: m/z: 838,9 [M+H]⁺, 860,9 [M+Na]⁺.

Доклинические исследования синтетического пептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα проведены на базе научно-исследовательской лаборатории Витебского государственного медицинского университета. Лабораторными животными являлись линейные мыши СВА обоего пола, массой 20±2 г (7 в опытной группе и 7 в контрольной) с экспериментальной бронхиальной астмой.

Сенсибилизацию животных осуществляли путем внутрибрюшинного введения микста стандартизованных водно-солевых экстрактов аллергенов (ОАО «Биомед», Россия) следующего состава: домашняя пыль, перо подушки, пылевой клещ, библиотечная пыль в соотношении 2:1:1:1. Раствор, содержащий 1000 PNU микст-аллергенов в объеме 0,1 мл смешивали с 0,1 мл адьюванта Фрейнда и вводили внутрибрюшинно, соблюдая правила асептики. Выполняли 7 инъекций с интервалом 1 день. На 15-27 сутки сенсибилизированным животным вводили: опытным (n=7) – синтетический пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα подкожно – 30 нг/0,1 мл/мышь, 5 раз с интервалом в 2 дня; контрольным-плацебо NaCl (n=7) – подкожно 0,9% раствор изотонического натрия хлорида (растворитель синтетического пептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα) – 0,1 мл/мышь, 5 раз с интервалом в 2 дня.

Результаты исследования

Внутрикожный тест с аллергеном. На 30 сутки эксперимента всем животным проводили внутрикожный тест с растворами микст-аллергенов, которые вводили внутрикожно в область внутренней поверхности правого бедра мыши в объеме 10 мкл (10 PNU/мышь). В качестве *отрицательного контроля* вводили 0,9% раствор изотонического натрия хлорида, в качестве *положительного* - 0,1% раствор гистамина (10 мкг/мл), который вводили внутрикожно в объеме 10 мкл в левую конечность мыши. Реакцию учитывали через 15-20 минут после внутрикожной инъекции аллергена, физиологического раствора и раствора гистамина. Оценивали размеры волдыря на месте введения аллергена в мм, сопоставляя результаты с отрицательным и положительным контролем. Выраженность внутрикожного теста оценивали путем расчета индекса реакции (ИР) как отношения местной реакции кожи на аллерген в мм к местной реакции кожи на гистамин в мм.

Таблица 1 – Результаты внутрикожного теста с раствором микст-аллергенов в дозе 1 мкг (10 PNU/мышь)

| № группы | Кол-во животных | Аллерген, мм, Me (25%-75%) | Гистамин, мм, Me (25%-75%) | Индекс реакции, Me (25%-75%) |
|--|-----------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 1, опытная, пептид p ₁₃₇₋₁₄₂ FcεRIα | 7 | 2,7 (2; 3) | 8,0 (7; 9) | 0,34 (0,25;0,43) |
| 2, контрольная-плацебо, 0,9% NaCl | 7 | 13,1 (12; 14) | 8,9 (8; 10) | 1,49 (1,4; 1,6) |

В результате проведенных исследований установлено, что предварительно введённый синтетический пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα в условиях *in vivo* при подкожном введении мышам в суммарной дозе 1,5 мкг/кг веса вызывал угнетение реакции тучных клеток животных на аллергены, которая проявлялась в подавлении специфической кожной реакции.

Прямой тест дегрануляции тучных клеток проводили на основе ранее разработанной методики [4]. В эксперименте использовали перитонеальные тучные клетки, которые выделяли из тканей брюшной полости декапированных животных, для подсчета клеток использовали камеру Горяева. Установлено, что у 6 из 7 животных, получавших пептид, подавлялась дегрануляция тучных клеток под действием микст-аллергенов, в то время как у 6 их 7 животных контрольной группы тучные клетки дегранулировали под действием микст-аллергенов, которыми были сенсибилизированы животные (p<0,05), результаты представлены в таблице.

Таблица 2 Прямой тест дегрануляции тучных клеток под действием раствора микст-аллергенов у мышей, получавших синтетический пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, в сравнении с контрольной группой плацебо, получавших 0,9% NaCl.

| Группа животных | Кол-во животных | Тест дегрануляции тучных клеток, число животных | |
|--|-----------------|---|-----------------------------|
| | | Положительный | Отрицательный |
| 1, опытная, пептид p ₁₃₇₋₁₄₂ FcεRIα | 7 | 1 p ₁₋₂ <0,05 | 6 p ₁₋₂ <0,05 |
| 2, контрольная-плацебо 0,9% NaCl | 7 | 6 p ₁₋₂ <0,05 | 1 p ₁₋₂ <0,05 |

Заключение. Синтетический пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, введённый подкожно лабораторным животным, обладал биологической эффективностью, индуцировал формирование иммунологической толерантности к аллергенам у сенсibilизированных животных, поскольку угнетал специфическую кожную реакцию на аллерген *in vivo* у сенсibilизированных животных и снижал специфическую дегрануляцию тучных клеток в прямом тесте под влиянием причинно-значимых аллергенов.

Литература

1. Kraft, S. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition / S. Kraft, J.P. Kinet // *Nat. Rev. Immunol.* –2007. – Vol. 7. – P. 365–378.
2. Gould, H.J. IgE in allergy and asthma today / H. J. Gould, B. J. Sutton // *Nat. Rev. Immunol.* –2008. – Vol. 3. – P. 205-217.
3. Martinovich, V.P. The synthesis of peptide fragments of high affinity receptor FcεRI and their binding to allergen-specific immunoglobulins E / V.P. Martinovich, O.V. Gribovskaya, V.P. Golubovich, V.V. Yanchenko, L.R. Vykhrstenko., D.K. Novikov // *Rus. J. Bioorg. Chem.* –2012. – Vol. 38. N 3. – P. 253-260.
4. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. М. – 1996. – 282 с.

SYNTHESIS OF PEPTIDE FRAGMENTS 137-142 FcεRIα AND ESTIMATION OF ITS IMPACT ON SOME ALLERGIC REACTIONS

^{2,3}Yanchanka Y.V., ²Vyhrstenka L.P., ²Velichynskaya V.G., ¹Martsinovich V.P.,
¹Golubovich V.P.

1 Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

2 Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

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

A synthetic analogue of the active site of a human high-affinity IgE receptor, peptide p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα added *in vitro* to mast cells enhanced the allergen-induced degranulation of mast cells, and injected into the body of sensitized animals significantly reduced skin sensitization to allergens and degranulation of mast cells induced by exposure of cause significant allergen.