

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ОЛИГОПЕПТИДА TRP-ASP-PHE-ASP СВЯЗЫВАТЬ ИНТЕРЛЕЙКИН-8

Т. В. Рябцева, А. Д. Таганович, Д. А. Макаревич

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь



Введение. Одно из перспективных направлений антицитокиновой терапии – разработка синтетических олигопептидов, способных связывать и ингибировать активность цитокинов. Пептид, который является структурным аналогом цитокинсвязывающей области хемокинового рецептора, представляет интерес в качестве лиганда для взаимодействия с интерлейкином-8 (ИЛ-8).

Цель исследования. Экспериментальная оценка взаимодействия олигопептида Trp-Asp-Phe-Asp с ИЛ-8.

Материал и методы. О взаимодействии пептида с цитокином судили по изменению концентрации ИЛ-8, на основании иммуноферментного анализа. Для оценки эффективности связывания использовали свободную форму олигопептида, адсорбированную на дне лунки планшета и иммобилизованную в полиакриламидный гель в концентрации 1 $\mu\text{M}/\text{мл}$.

Результаты. Анализ результатов показал, что свободная форма пептида связывает 22,13 (14,09; 30,17) пМ/мл ИЛ-8. При адсорбции пептида на дне лунки планшета его связывающая способность сохраняется, однако количество связанного ИЛ-8 снижается и составляет 4,22 (3,69; 4,75) пМ/мл. Иммобилизованный в гель олигопептид уменьшает концентрацию ИЛ-8 в плазме крови на 25,39 (21,34; 29,44) пМ/мл.

Выводы. Исследования показали, что Trp-Asp-Phe-Asp как в свободной, так и в адсорбированной форме обладает способностью связывать ИЛ-8. Полученные результаты могут быть использованы в разработке изделий медицинского назначения для гемосорбции и извлечения ИЛ-8 из плазмы крови человека.

Ключевые слова: интерлейкин-8, олигопептид, системное воспаление, антицитокиновая терапия.

Для цитирования: Рябцева, Т. В. Экспериментальное исследование способности олигопептида TRP-ASP-PHE-ASP связывать интерлейкин-8 / Т. В. Рябцева, А. Д. Таганович, Д. А. Макаревич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2022. Т. 20, № 4. С. 429-432. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2022-20-4-429-432>

Введение

Интерлейкин-8 (ИЛ-8) – провоспалительный цитокин [1]. Рецепторы к ИЛ-8, CXCR1 и CXCR2, образуются в нейтрофилах, моноцитах, базофилах и эозинофилах [2]. Основная биологическая роль ИЛ-8 заключается в привлечении в очаг воспаления иммунокомпетентных клеток. Высокие концентрации ИЛ-8 сопровождают развитие системного воспалительного ответа и служат прогностическим признаком неблагоприятного исхода заболевания [3]. Современная антицитокиновая терапия включает препараты на основе моноклональных антител (МАТ) и рекомбинантных белков. Однако высокая скорость метаболизма, иммуногенность и развитие побочных реакций (онкологические заболевания, герпес, гепатиты, туберкулез) ограничивают их широкое применение в клинической практике [4].

Все большую популярность приобретает разработка низкомолекулярных пептидов с антицитокиновой активностью. Основные преимущества олигопептидов по сравнению с МАТ следующие: недорогой метод получения (химический синтез) низкая иммуногенность и возможность их модификации [5, 6]. Иммобилизация олигопептидов на полимерном носителе открывает возможность их использования в гемосорбции для снижения концентрации цитокинов в крови человека [7, 8].

Методами молекулярного моделирования нами установлено, что тетрапептид Trp-Asp-Phe-Asp, являющийся структурным аналогом цитокинсвязывающей области хемокинового рецептора, характеризуется максимальным

по модулю значением свободной энергии связывания с ИЛ-8 [9]. Поэтому **цель** данного исследования – экспериментальная оценка взаимодействия олигопептида Trp-Asp-Phe-Asp с ИЛ-8.

Материал и методы

Для экспериментов использовали: Trp-Asp-Phe-Asp (WDFD), синтезированный Changzhou Xuanming Chemical Co. Ltd., (Чанчжоу, Цзянсу, Китай); рекомбинантный ИЛ-8 (Fine test, Китай); карбонатный буфер (15 мМ Na_2CO_3 , 35 мМ NaHCO_3 , 0,2 г/л NaN_3 , pH9,3). Раствор пептида (1 μM) в карбонатном буфере. Концентрация фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ-10X). Раствор для промывки – ФСБ-1X с 0,05% Tween20 (ФСБ-Т). Раствор для блокировки – ФСБ-Т с 10 мг/мл бычьим сывороточным альбумином (ФСБ-Т-БСА). Раствор ИЛ-8 в концентрациях: 0; 0,42; 1,25; 3,33; 8,33; 20,83 пМ/мл. Набор реагентов для иммуноферментного определения ИЛ-8 (Вектор-Бест, Россия).

Иммобилизацию олигопептидов проводили радикальной полимеризацией смеси растворов мономеров (акриламида и бис-акриламида) с раствором олигопептида. Перед реакцией полимеризации проводили N-ацилирование олигопептидов хлорангидридом акриловой кислоты.

Первая серия экспериментов включала исследование взаимодействия свободной формы олигопептида с раствором ИЛ-8. Концентрацию ИЛ-8 определяли иммуноферментным методом, используя наборы реагентов. На основании изменения концентрации цитокина в опытной смеси (с пептидом) по сравнению с контрольной (без олигопептида) делали вывод о взаимодействии олигопептида с цитокином. Для про-

ведения второй серии экспериментов пептиды иммобилизовали путем адсорбции на дне 96-луночных планшетов. Используя реактивы набора для иммуноферментного анализа, определяли концентрацию ИЛ-8 в лунках с пептидом, без пептида и с адсорбированными моноклональными антителами к ИЛ-8.

Для третьей серии экспериментов олигопептид иммобилизовали путем введения на стадии полимеризации в полиакриламидный гель. Круглодонные пробирки заполняли полиакриламидным гелем с иммобилизованным пептидом (5 мл), вносили 5 мл плазмы крови с высоким содержанием провоспалительных цитокинов. Инкубировали 60 минут при комнатной температуре. Затем собирали плазму для определения концентрации ИЛ-8.

Результаты исследования обрабатывали с использованием пакетов статистического анализа данных Statistica 10.0 («StatSoft Inc.») и Prism 8 Statistics («GraphPad Software»). Для описания и анализа результатов применяли методы непараметрической статистики. Моделирование функции зависимости одной переменной от другой проводили методом нелинейной регрессии, оценивая величину коэффициента детерминации (R^2).

Результаты и обсуждение

После проведения иммуноферментного анализа определили, что концентрация ИЛ-8 в опытном растворе (смесь ИЛ-8 с олигопептидом) ниже, чем в контрольном (раствор ИЛ-8 в буфере). Это – следствие взаимодействия олигопептида с цитокином, которое препятствует связыванию детектирующих антител с ИЛ-8. Разница концентраций ИЛ-8 в опытном и контрольном растворах является концентрацией цитокина, связанного с олигопептидом. График зависимости концентрации связанного ИЛ-8 от его исходной концентрации представляет собой гиперболу (рис. 1, А). Анализ данной зависимости показал, что максимальная концентрация ИЛ-8, связанного с пептидом, составляет 22,13 (14,09; 30,17) пМ/мл, а равновесная концентрация ИЛ-8, при которой достигается $\frac{1}{2}$ от

максимального связывания, равна 36,44 (17,27; 55,62) пМ/мл.

Анализ зависимости степени связывания ИЛ-8 с WDFD от исходной концентрации цитокина показал, что результаты экспериментов с высоким коэффициентом детерминации ($R^2=0,7421$) описываются с помощью модели неспецифического связывания (рис. 1, Б). Максимальная степень связывания составила 84,3 (48,8; 119,7)%, а его равновесная концентрация ИЛ-8 – 2,58 (1,58; 5,83) пМ/мл. Степень соответствия результатов эксперимента модели специфического связывания ИЛ-8 с олигопептидом – низкая, коэффициент детерминации (R^2) был невысоким и составил 0,3882.

Для изучения способности иммобилизованной формы олигопептида WDFD связывать ИЛ-8 провели вторую серию экспериментов, в которых пептид был адсорбирован на дне 96-луночного планшета. Связанный с адсорбированным олигопептидом ИЛ-8 определяли методом иммуноферментного анализа. Степень окрашивания раствора после добавления биотинилированных антител к ИЛ-8, раствора стрептавидин-пероксидазы хрена, тетраметилбензидина и стоп-реагента была пропорциональной количеству связанного ИЛ-8.

В результате эксперимента определили, что оптическая плотность раствора в лунках, на дне которых адсорбировали олигопептид, изменялась пропорционально концентрации ИЛ-8, вносимого в лунки. В лунках, на дне которых не были адсорбированы ни пептиды, ни моноклональные антитела, окрашивания не наблюдали. В лунках, на дне которых были адсорбированы моноклональные антитела к ИЛ-8 (МАТ, Вектор Бест, Россия), интенсивность окрашивания была более выраженной, чем в лунках с адсорбированным пептидом.

Максимальная концентрация ИЛ-8 в лунках с адсорбированным пептидом составила 3,57 (3,51; 3,80) пМ/мл. По всей видимости, при данной концентрации достигается предел для связывания цитокина с пептидом. На это указывает то обстоятельство, что при увеличении концентрации вносимого ИЛ-8 с 8,33 пМ/мл до

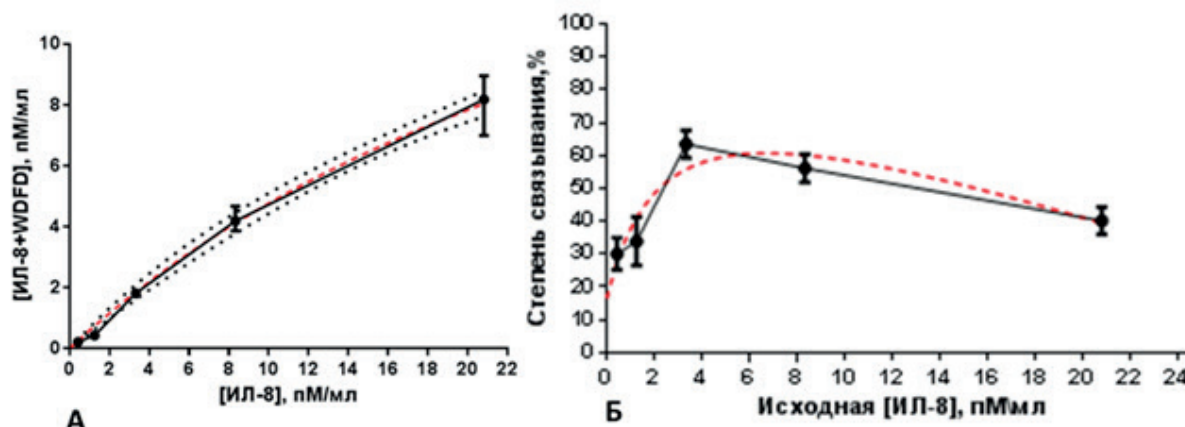


Рисунок – Анализ зависимости связывания ИЛ-8 со свободной формой олигопептида Trp-Asp-Phe-Asp (описание в тексте)

Figure – Analysis of the dependence of IL-8 binding with the free form of the Trp-Asp-Phe-Asp oligopeptide (description in text)

20,83 пМ/мл концентрация ИЛ-8, связанного с WDFD, в опытных лунках больше не нарастала (табл. 1).

Степень связывания рассчитывали относительно концентрации ИЛ-8 в лунках с адсорбированными моноклональными антителами. При увеличении концентрации ИЛ-8, добавляемого в лунку, степень его связывания адсорбированными пептидами снижалась с 80,0 (74,5; 85,4)% до 17,9 (17,2; 18,2)% (таблица).

Таблица – Результаты оценки связывания ИЛ-8 с Trp-Asp-Phe-Asp, Me (25%; 75%), пМ/мл
Table – The results of the IL-8 binding to Trp-Asp-Phe-Asp, Me (25%; 75%), pM/ml

[ИЛ-8], пМ/мл	[WDFD+ИЛ-8], пМ/мл	Связывание ИЛ-8, %
0,42	0,60 (0,56; 0,63)	80,0 (74,5; 85,4)
1,25	0,91 (0,86; 0,95)*	70,7 (62,9; 72,1)
3,33	1,78 (1,75; 1,84)*	59,8 (58,6; 61,1)*
8,33	3,57 (3,51; 3,80)*	44,9 (42,5; 47,5)*
20,83	3,33 (3,26; 3,49)	17,9 (17,2; 18,2)*

Примечание – [ИЛ-8] – концентрация ИЛ-8, вносимая в лунку; [WDFD+ИЛ-8] – концентрация ИЛ-8, связанного с адсорбированным в лунке Trp-Asp-Phe-Asp; * – $p \leq 0,05$ при попарном сравнении с предыдущим значением в списке (тест Манна-Уитни)

Анализ графика зависимости концентрации ИЛ-8, связанного с пептидом, от исходной концентрации цитокина показал, что максимальная концентрация ИЛ-8, связанного с адсорбированным на дне лунки планшета олигопептидом WDFD, составляет 4,22 (3,69; 4,75) пМ/мл, а равновесная концентрация ИЛ-8 равна 3,47 (2,14; 4,80) пМ/мл. Результаты эксперимента с олигопептидом, иммобилизованным в гель, показали, что максимальная концентрация ИЛ-8, задер-

жанного гелем с WDFD, составила 23,25 (20,08; 26,42) пМ/мл.

Таким образом, максимальная концентрация ИЛ-8, связанного свободной формой олигопептида WDFD, в 5 раз выше максимальной концентрации цитокина, связанного олигопептидом, адсорбированным на дне лунки планшета. Но при иммобилизации в гель пептид способен связать такое же количество ИЛ-8 и даже немного больше, чем свободная форма пептида. Такая разница объясняется стерической доступностью цитокина для взаимодействия с адсорбированным олигопептидом [10]. В растворе и в геле пептид более доступен для взаимодействия с ИЛ-8. А при адсорбции пептида на дне лунки планшета количество ИЛ-8, связанного с пептидом, ограничивается площадью поверхности на дне лунки.

Выводы

Олигопептид WDFD в свободной и в иммобилизованной форме способен эффективно связывать ИЛ-8. Зависимость количества связанного с олигопептидом цитокина от его исходной концентрации описывается гиперболой. Для пептида, адсорбированного на дне лунки планшета, предел связывания ИЛ-8 равен 4,22 (3,69; 4,75) пМ/мл. В свободной форме и в иммобилизованной в гель олигопептид наиболее эффективно связывается с ИЛ-8. Максимальная концентрация ИЛ-8, связанного свободной формой пептида, составляет 22,13 (14,09; 30,17) пМ/мл, с иммобилизованным в гель пептидом – 23,25 (20,08; 26,42) пМ/мл. Пептид WDFD может быть рекомендован для использования в качестве лиганда при разработке изделий медицинского назначения для гемосорбции с целью извлечения ИЛ-8 из плазмы крови человека.

Литература

1. Hebert, C. Interleukin-8: a review / C. Hebert, J. Baker // *Cancer Investigation*. – 1993. – Vol. 11 (6). – P. 743-750. – doi: 10.3109/07357909309046949.
2. Тотолян, А. Роль хемокинов и их рецепторов в иммунорегуляции / А. Тотолян // *Иммунология*. – 2001. – Т. 22, № 5. – С. 7-15.
3. Baggiolini, M. Chemokines in pathology and medicine / M. Baggiolini // *Journal of Internal Medicine*. – 2001. – Vol. 250 (2). – P. 91-104. – doi: 10.1046/j.1365-2796.2001.00867.x.
4. Palomino, D. C. T. Chemokines and immunity / D. C. T. Palomino, L. C. Marti // *Einstein*. – 2015. – Vol. 13 (3). – P. 469-473. – doi: 10.1590/S1679-45082015RB3438.
5. Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: a review / M. Boshtam [et al.] // *Inflammation*. – 2016. – Vol. 40, № 1. – P. 340-349. – doi: 10.1007/s10753-016-0477-1.
6. Van Regenmortel, M. H. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides / M. H. Van Regenmortel // *Biologicals*. – 2001. – Vol. 29 (3-4). – P. 209-213. – doi: 10.1006/biol.2001.0308.
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 // *Pharmaceutical Bioprocessing*. – 2013. – Vol. 1, № 5. – P. 467-485. – doi: 10.4155/pbp.13.54.
8. Синтез аффинных сорбентов с иммобилизованными синтетическими лигандами для процедур терапевтического афереза / П. А. Левашов [и др.] // *Биомедицинская химия*. – 2010. – Т. 56, № 6. – С. 739-746. – doi: 10.18097/pbmc20105606739. – EDN: MWPGVN.
9. Рябцева, Т. В. Молекулярное моделирование и анализ взаимодействия олигопептидов с интерлейкином-8 / Т. В. Рябцева, Д. А. Макаревич, А. Д. Таганович // *Новости медико-биологических наук*. – 2021. – Т. 21, № 3. – С. 179-187.
10. Competition between bound and free peptides in an ELISA-based procedure that assays peptides derived from protein digests / O. Braitbard [et al.] // *Proteome Science*. – 2006. – № 4. – P. 12. – doi: 10.1186/1477-5956-4-1.

References

1. Hebert C, Baker J. Interleukin-8: a review. *Cancer Investigation*. 1993;11(6):743-750. doi: 10.3109/07357909309046949.
2. Totoljan A. Rol hemokinov i ih receptorov v immunoreguljacii [Role of chemokines and their receptors

- in immunoregulation]. *Immunologija* [Immunology]. 2001;22(5):7-15. (Russian).
3. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *Journal of Internal Medicine*. 2001;250(2):91-104. doi: 10.1046/j.1365-2796.2001.00867.x.
 4. Palomino DCT, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein*. 2015;13(3):469-473. doi: 10.1590/S1679-45082015RB3438.
 5. Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, Shariati L, Khanahmad H. Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: a review. *Inflammation*. 2016;40(1):340-349. doi: 10.1007/s10753-016-0477-1.
 6. Van Regenmortel MH. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. *Biologicals*. 2001;29(3-4):209-213. doi: 10.1006/biol.2001.0308.
 7. Menegatti S, Naik AD, Carbonell RG. The hidden potential of small synthetic molecules and peptides as affinity ligands for bioseparations. *Pharmaceutical Bioprocessing*. 2013;1(5):467-485. doi: 10.4155/pbp.13.54.
 8. Levashov PA, Afanasieva OI, Dmitrieva OA, Klesareva EV, Adamova IYu, Afanasieva MI, Bespalova ZhD, Sidorova MV, Pokrovsky SN. Sintez affinyh sorbentov s immobilizovannymi sinteticheskimi ligandami dlja procedur terapevticheskogo afereza [Preparation of affinity sorbents with immobilized synthetic ligands for therapeutic apheresis]. *Biomedicinskaja himija* [Biomedical Chemistry]. 2010;56(6):739-746. doi: 10.18097/pbmc20105606739. edn: MWPGVN. (Russian).
 9. Ryabtseva TV, Makarevich DA, Taganovich AD. Molekuljarnoe modelirovanie i analiz vzaimodejstvija oligopeptidov s interlejkinom-8 [Molecular modeling and analysis of interactions of oligopeptides with interleukin-8]. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of biomedical sciences]. 2021;21(3):179-187. (Russian).
 10. Braitbard O, Braitbard O, Glickstein H, Bishara-Shieban J, Pace U, Stein WD. Competition between bound and free peptides in an ELISA-based procedure that assays peptides derived from protein digests. *Proteome Science*. 2006;4:12. doi: 10.1186/1477-5956-4-12.

EXPERIMENTAL STUDY OF THE ABILITY OF OLIGOPEPTIDE TRP-ASP-PHE-ASP TO BIND INTERLEUKIN-8

T. V. Ryabtseva, A. D. Taganovich, D. A. Makarevich

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Background. One of the perspectives of anticytokine therapy is the development of synthetic oligopeptides, which can bind and inhibit the activity of cytokines. The peptide, which is a structural analogue of the cytokine-binding region of the chemokine receptor, is of interest as a ligand for interaction with interleukin-8 (IL-8).

The aim of the research was to evaluate the interaction of the Trp-Asp-Phe-Asp with IL-8.

Material and methods. The interaction between the peptide and cytokine was evaluated by the change in the IL-8 concentration, which was assessed by enzyme immunoassay. Oligopeptide was used in free form adsorbed on the bottom of the plate well and immobilized in a polyacrylamide gel at a concentration of 1 μ M/ml.

Results. The results of the study showed that Trp-Asp-Phe-Asp, both in free and immobilized form, has the ability to bind IL-8. The maximum concentration of IL-8 bound by the free peptide is 22.13 (14.09; 30.17) pM/ml, for the adsorbed peptide – 4.22 (3.69; 4.75) pM/ml. Oligopeptide immobilized in the gel reduces the IL-8 concentration in blood plasma by 25.39 (21.34; 29.44) pM/ml.

Conclusions. The results obtained are the basis for the development of medical devices for hemosorption in order to extract IL-8 from human blood plasma.

Keywords: interleukin-8, oligopeptide, systemic inflammation, anticytokine therapy.

For citation: Ryabtseva TV, Taganovich AD, Makarevich DA. Experimental study of the ability of oligopeptide TRP-ASP-PHE-ASP bind interleukin-8. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2022;20(4):429-432. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2022-20-4-429-432>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах / About the authors

*Рябцева Татьяна Владимировна / Ryabtseva Tatiana, e-mail: ta-yana@yandex.ru

Таганович Анатолий Дмитриевич / Taganovich Anatoliy, e-mail: biochem@bsmu.by

Макаревич Денис Александрович / Makarevich Denis, e-mail: demkarevich@yandex.ru

* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 17.05.2022

Принята к публикации / Accepted for publication: 01.07.2022