

УДК 577.322.53+577.152.193+577.112.6+57.083.3

©Коллектив авторов

## **НОВЫЕ БИОАФФИННЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ ЭЛИМИНАЦИИ АУТОАНТИТЕЛ К ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЕ ЧЕЛОВЕКА ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

***О.В. Грибовская\*, И.В. Шутова, О.В. Цыганова,  
В.П. Мартинович, В.П. Голубович***

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 2200141, Минск,  
ул. Ак. Купревича, 5/2; тел.: +375-(17)2678263; факс: +375-(17)2678761;  
эл. почта: olgamel@iboch.bas-net.by

Получены новые биоаффинные сорбенты, содержащие в качестве биоселективного лиганда тетрапептид H-Glu-Gln- $\beta$ Ala-Lys-OMe, иммобилизованный на двух полимерных матрицах – полиакриламидном геле и CNBr активированной сефарозе 4B. Показано, что предложенные иммуносорбенты обладают высокой селективностью по отношению к антителам против тиреоидной пероксидазы человека и могут найти применение в медицине и экспериментальной биохимии для избирательной элиминации патогенных аутоантител из сыворотки или плазмы крови человека при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы.

**Ключевые слова:** пептидный синтез; биоаффинные сорбенты; аутоантитела к тиреоидной пероксидазе; аутоиммунные заболевания щитовидной железы.

**ВВЕДЕНИЕ.** Более 30% всех органоспецифических аутоиммунных патологий составляют аутоиммунные заболевания щитовидной железы (АЗЩЖ), которые, кроме того, являются наиболее распространёнными нарушениями функции этого органа. Установлено, что данные заболевания развиваются в результате реакции иммунной системы на собственные белки щитовидной железы (тиреопероксидазу (ТПО), тиреоглобулин и рецептор тиреотропного гормона [1]), которая характеризуется появлением высоких концентраций специфических аутоантител к указанным тиреоидным аутоантигенам в сыворотке крови больных. Так, аутоантитела (ААТ) к ТПО присутствуют в сыворотке у большинства пациентов с болезнью Грейвса, тиреоидитом Хашимото, послеродовым тиреоидитом и являются диагностическим маркером аутоиммунных заболеваний щитовидной железы [2–6].

ТПО человека является мембраносвязанным гликозилированным гемопротеином, который играет ключевую роль в синтезе тиреоидных гормонов, катализируя йодирование тирозильных остатков тиреоглобулина и их последующую конденсацию с образованием  $T_3$  и  $T_4$ . При аутокринных патологиях щитовидной железы аутоантитела к ТПО индуцируют комплементзависимую цитотоксичность и вызывают цитотоксические изменения в структурных элементах фолликулов щитовидной железы, играя важную роль в патогенезе заболеваний данного органа. Выявлена прямая корреляция между титром этих антител и гистологическими изменениями в щитовидной железе, которые наблюдаются при аутоиммунных

---

\* - адресат для переписки

заболеваниях этого органа [7]. В этой связи чрезвычайно актуальной является проблема создания новых способов профилактики и лечения аутоиммунных патологий щитовидной железы, основанных на избирательной элиминации специфических ААТ к тиреоантигенам из сыворотки крови больных с АЗЩЖ.

В настоящее время в клинической практике применяются сорбенты с иммобилизованными поликлональными антителами к иммуноглобулинам человека ("Ig Адсопак"<sup>®</sup>, НПФ "Покард", Россия; "Ig Therasorb"<sup>®</sup>, "Miltenyi Biotec"<sup>®</sup>, Германия) [8, 9], а также колонки с иммобилизованным белком А ("Immunosorba"<sup>®</sup> и "Prosorba"<sup>®</sup>, Fresenius HemoCare, Германия) [10, 11]. Однако указанные сорбенты не являются специфическими по отношению к ААТ против ТПО (связывают общие иммуноглобулины классов G, A и M), сложны в получении и дорогостоящи. В некоторых случаях была отмечена утечка лиганда с носителя [12, 13]. Сорбенты, селективно элиминирующие ААТ к ТПО из сыворотки крови человека, на данный момент неизвестны.

Целью данного исследования было создание новых сорбентов для избирательной сорбции аутоантител против ТПО из плазмы или сыворотки крови человека. Лигандом в новых сорбентах служил тетрапептид H-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe, который, как было показано нами ранее, обладает высокой способностью к специфическому связыванию с ААТ к ТПО человека [14].

#### МЕТОДИКА.

*Синтез тетрапептида H-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe.* В работе были использованы аминокислоты, реагенты, растворители – коммерческие препараты. Процессы синтеза соединений, удаления защитных групп контролировали методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля ("Sorbfil", Россия) в системах растворителей: хлороформ – метанол – 20%-ный аммиак, 6:4:1 (А); бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1, (Б); хлороформ – уксусная кислота – вода, 3:2:1 (В). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлор-бензидинового реагента.

Масс-спектры FAB записаны на приборе PE SCIEX API 150EX ("Perkin Elmer", США), ионизация осуществлялась пучком электронов с энергией 40 эВ.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе фирмы Waters (Millenium<sup>32</sup>, 966 фотодиодный детектор, колонка Vydac 201HS52 RP C18 (2,1×250 мм)), используя градиент концентраций от 10 до 40% ацетонитрила в 0,1% TFA. Скорость потока была 1 мл/мин.

Аминокислотный состав пептидов, гидролизованных 6 М HCl в запаянных ампулах при 110°C в течение 20 ч, проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе LMV (Швеция).

Температуры плавления (некорректируемые) определяли на приборе Кофлера. Удельное вращение соединений измеряли на спектрополяриметре J-20 ("Jasco", Япония).

*Вос-βAla-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe (I).* К раствору 1,20 г (4,2 ммоль) хлоргидрата метилового эфира Ne-карбобензоксипептида в 4,0 мл диметилформамида (DMF) прибавляли 0,60 мл триэтиламина (ТЕА) (4,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 15 мин и затем добавляли 0,75 г (4,0 ммоль) Вос-βAla-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд прибавляли последовательно 0,56 г (4,2 ммоль) N-гидрокситриазола (HOBt) и 0,90 г (4,4 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиамида (DCC). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 5 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 2,0 мл DMF. В фильтрат добавляли 15,0 мл этилацетата и полученный раствор промывали 9% раствором лимонной кислоты, 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, насыщенным раствором NaCl, водой, затем сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся маслообразный остаток переосаждали из эфира петролейным эфиром и сушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Получили 1,52 г (88%) маслообразного соединения (I), R<sub>f</sub> 0,85 (А), 0,62 (Б).

*HCl•H-βAla-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe (II)*. К раствору 1,50 г (3,4 ммоль) Вос-βAla-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe, где Z – бензилоксикарбонильная группа в 0,8 мл этилацетата добавляли 13,9 мл 4,4 М раствора HCl в этилацетате. Образовавшуюся взвесь перемешивали в течение 40 мин, осадок отделяли фильтрованием, промывали на фильтре этилацетатом, эфиром, сушили в эксикаторе над NaOH. Выход продукта (II) составил 1,23 г (99%).  $[\alpha]_D^{20} - 10,0^\circ$  (с 1, MeOH);  $R_f$  0,58 (A).

*Вос-Gln-βAla-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe(III)*. К раствору 1,19 г (3,2 ммоль) HCl•H-βAla-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe в 4,0 мл DMF добавляли 0,53 мл (3,8 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем вносили 0,79 г (3,2 ммоль) Вос-Gln-OH. Охладив реакционную колбу до 0°C, вносили последовательно 0,45 г (3,3 ммоль) HOBT и 0,78 г (3,8 ммоль) DCC. Время прохождения реакции ~ 4 ч. Обработку синтеза проводили по методике, описанной для соединения (I). Выход соединения (III) – 0,65 г (68%).  $[\alpha]_D^{20} - 14,5^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,88 (A).

*HCl•H-Gln-βAla-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe (IV)* получен в результате деблокирования 0,51 г (0,9 ммоль) соединения (III) 4,6 мл 4,4 М раствором HCl в этилацетате в течение 50 мин. Получено 0,43 г (выход 98%) соединения (IV).  $[\alpha]_D^{20} - 11,1^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,36 (B).

*Вос-Glu(γ-OBzl)-Gln-βAla-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe (V)*. К раствору 0,40 г (0,8 ммоль) соединения (IV) в 2,5 мл DMF добавляли 0,41 г (0,8 ммоль) дициклогексиламмонийной соли Вос-Glu(γ-OBzl)-OH•(DCHA), где Bzl – бензильная группа. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и, охладив реакционную колбу до 0°C, вносили последовательно 0,12 г (0,9 ммоль) HOBT и 0,21 г (1,0 ммоль) DCC. Время прохождения реакции ~ 6 ч. После окончания реакции осадок отфильтровывали, промывали небольшим количеством DMF, а к фильтрату добавляли 20,0 мл этилацетата и полученный раствор промывали 9% раствором лимонной кислоты, 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, насыщенным раствором NaCl, водой, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Этилацетат упаривали, образовавшийся остаток переосаждали из метанола эфиром. После сушки в эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> получили 0,42 г (68%) соединения (V) с т. пл. 86–89°C,  $[\alpha]_D^{20} - 13,6^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,79 (A).

*Вос-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe (VI)*. Через раствор 0,35 г (0,4 ммоль) соединения Вос-Glu(γ-OBzl)-Gln-βAla-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe (V) в смеси 0,5 мл уксусной кислоты и 4,0 мл метанола пропускали в течение 2 ч ток водорода в присутствии катализатора – 0,0025 г палладиевой черни – при постоянном перемешивании. После деблокирования пептида (контроль ТСХ) катализатор отделяли фильтрованием, фильтрат упаривали, осадок переосаждали из метанола эфиром, сушили в эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Получили 0,22 г (94%) соединения Вос-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe.  $[\alpha]_D^{20} - 20,8^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,39 (A). По данным ВЭЖХ, содержание целевого пептида (VI) – 94%. Масс-спектр FAB,  $m/z$ : 589,3  $[M+H]^+$ , 611,3  $[M+Na]^+$ , 489,3  $[M-100+H]^+$ .

*HCl•H-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe (VII)* получен в результате деблокирования 0,15 г (2,5 ммоль) соединения (VI) 1,3 мл 4,4 М раствором HCl в этилацетате в течение 1 ч. Получили 0,13 г (выход 99%) соединения (VII).  $[\alpha]_D^{20} - 18,0^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,66 (B). По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (VII) – 95%. Масс-спектр FAB,  $m/z$ : 489,3  $[M+H]^+$ , 511,3  $[M+Na]^+$ . Данные аминокислотного анализа: Glu 1,00 (1), Gln 1,05 (1), βAla 0,90 (1), Lys 1,05 (1).

*Синтез сорбента полиакриламид–Glu-Gln-βAla-Lys-OMe*. К раствору 0,13 г (0,26 ммоль) хлоргидрата метилового эфира глутамил-глутаминил-β-аланил-лизина в 50 мл 2,0% раствора бикарбоната натрия по каплям прибавляли 0,04 мл (0,54 ммоль) акрилоилхлорида и перемешивали реакционную смесь в течение 45 мин, затем вносили 4,42 г акриламида и 0,46 г N,N'-метиленисакриламида. После растворения компонентов к реакционной смеси прибавляли 0,23 г персульфата аммония и 0,15 мл N,N,N',N'-тетраметиленамина. Через 2 мин образовывался гель белого цвета. Гель оставляли на 1 ч, затем измельчали

## СОРБЕНТЫ ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИИ ТИРЕОПЕРОКСИДАЗНЫХ АУТОАНТИТЕЛ

с использованием шприца с диаметром выходного отверстия 2 мм. Образовавшиеся гранулы геля сначала многократно промывали дистиллированной водой (общий объем 1,0 л), а затем 0,9% раствором NaCl (общий объем 0,5 л). Содержание метилового эфира глутамил-глутаминил-β-аланил-лизина в набухшем геле составило 0,8–1,1 мг/мл. Отмытый гель хранили в 0,9% растворе NaCl, содержащем 0,1% NaN<sub>3</sub> при 4°C.

*Синтез сорбента сефароза-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe.* 7,5 г CNBr-сефарозы 4В (“Fluka”, США) помещали в 75,0 мл 1 мМ HCl в течение 15 мин, затем переносили сорбент на фильтр и промывали 1,5 л 1 мМ HCl и 0,2 л 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>/0,5 М NaCl, pH 8,3. К раствору 0,07 г пептида в 10,0 мл 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>/0,5 М NaCl, pH 8,3, добавляли активированный сорбент и встряхивали реакционную смесь в течение 15 ч при 4°C. После окончания реакции сорбент отфильтровывали, добавляли к нему 50 мл 0,2 М раствора глицина, pH 8,0 и встряхивали образовавшуюся взвесь в течение 16 ч при 4°C, чтобы заблокировать CN-группы, оставшиеся свободными после присоединения тетрапептида. Последующие промывки сорбента бикарбонатным (pH 8,3) и ацетатным буферами (pH 4,0) способствовали избавлению от неспецифически адсорбированного тетрапептида и глицина [15]. Сорбент снова переносили на фильтр и промывали 20,0 мл 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>/0,5 М NaCl pH 8,3 и 20,0 мл 0,1 М H<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa, pH 4,0. Отмытый гель хранили в 0,02 М HФБ, pH 7,5, содержащем 0,2 М NaCl и 0,1% NaN<sub>3</sub> при 4°C.

*Биоспецифическое связывание ААТ против ТПО человека иммуносорбентами с иммобилизованным пептидом.* Для определения биоспецифического связывания ААТ к ТПО человека иммуносорбентами сефароза-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe и полиакриламид-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe элюаты с этих сорбентов и с полиакриламидного геля без лиганда исследовали методом аффинной хроматографии. Эксперименты по исследованию сорбентов проводили в режиме рециркуляции с использованием универсального перистальтического насоса при температуре 37°C со средней скоростью потока 3±0,1 мл/мин при условиях, указанных в таблице. В экспериментах использовали сыворотку крови человека с концентрацией ААТ 1000 МЕ/мл.

*Таблица.* Условия проведения экспериментов по биоспецифическому связыванию сорбентами ААТ к ТПО

Сорбент	Объем сорбента в колонке, мл	Объем аутоиммунной сыворотки, мл	Концентрация ААТ к ТПО в аутоиммунной сыворотке, МЕ/мл	Время сорбции, мин
Сефароза-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe	5	40	400	120
Полиакриламид-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe	20	40	980	240
Полиакриламидный гель без лиганда (контроль)	20	40	980	240
Сефароза-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe (повторная хроматография)	5	40	1150	720

После окончания сорбции каждый сорбент промывали 500 мл 0,9% раствора NaCl, а связавшийся белок элюировали 40 мл 0,2 М глицин-HCl буфера, pH 2,2 и доводили pH до 7,4 с помощью 1 М Трис-HCl, pH 8,0 и 1 М NaOH. Концентрацию ААТ к ТПО в элюатах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа [16]. Чистоту белков оценивали методом



диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), используя 5% формирующий и 12% разделительный гель с буферными системами по методу [17]. В отдельных случаях образцы восстанавливали 2,5%  $\beta$ -меркаптоэтанолом и прогревали в течение 5 мин в кипящей водяной бане. Гели окрашивали красителем Кумасси бриллиантовым голубым R-250.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** На первом этапе был осуществлён синтез тетрапептида H-Glu-Gln- $\beta$ Ala-Lys-OMe.

Синтез тетрапептида Boc-Glu-Gln- $\beta$ Ala-Lys-OMe осуществляли классическим методом в растворе, путем последовательного присоединения Boc-аминокислот к С-концевым фрагментам (рис. 1). Лизин вводили в реакцию в виде метилового эфира Ne-карбобензоксид-лизина, который конденсировали с Boc- $\beta$ Ala-OH. В качестве основного конденсирующего агента использовали DCC с добавлением HOBT в качестве противорацемической добавки. Деблокирование дипептида Boc- $\beta$ Ala-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe обработкой 4,4 М раствором HCl в этилацетате в течение 40 мин и конденсация соединения HCl•H- $\beta$ Ala-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe с Boc-Gln-OH приводили к получению трипептида Boc-Gln- $\beta$ Ala-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe. Последующее деблокирование этого трипептида и конденсация образовавшегося гидрохлорида с дициклогексиламмонийной (DCHA) солью  $\gamma$ -бензилового эфира третбутилоксикарбонил-глутаминовой кислоты приводили к защищённому тетрапептиду Boc-Glu( $\gamma$ -OBzl)-Gln- $\beta$ Ala-Lys(N<sup>ε</sup>-Z)-OMe. Удаление защитных групп с Ne-аминогруппы лизина и  $\gamma$ -карбоксильной группы глутаминовой кислоты осуществляли в одну стадию – каталитическим гидрогенолизом в присутствии катализатора палладиевая чернь. Идентификацию целевого тетрапептида проводили методами количественного аминокислотного анализа и масс-спектрометрии, гомогенность подтверждали методами ТСХ и аналитической ВЭЖХ.

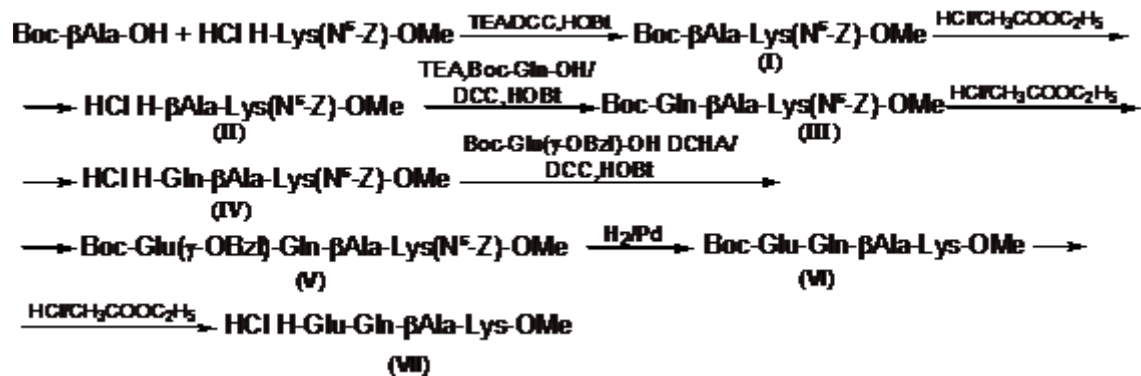


Рисунок 1.

Синтез тетрапептида H-Glu-Gln- $\beta$ Ala-Lys-OMe.

Методом иммуноферментного анализа было показано, что тетрапептид Boc-Glu-Gln- $\beta$ Ala-Lys-OMe является ингибитором связывания ТПО-специфических ААТ (рис. 2). Так, при инкубировании полученного тетрапептида с образцами предварительно разбавленной в 100 раз сыворотки крови человека указанное соединение в концентрации 0,1 мМ снижает концентрацию ААТ в сыворотке крови с 1000 МЕ/мл до 210±10 МЕ/мл, то есть на 79% [14]. Полученные результаты позволили нам использовать тетрапептид Boc-Glu-Gln- $\beta$ Ala-Lys-OMe в качестве лиганда в новых иммуносорбентах, предназначенных для избирательной сорбции аутоантител против ТПО из плазмы или сыворотки крови человека.

## СОРБЕНТЫ ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИИ ТИРЕОПЕРОКСИДАЗНЫХ АУТОАНТИТЕЛ

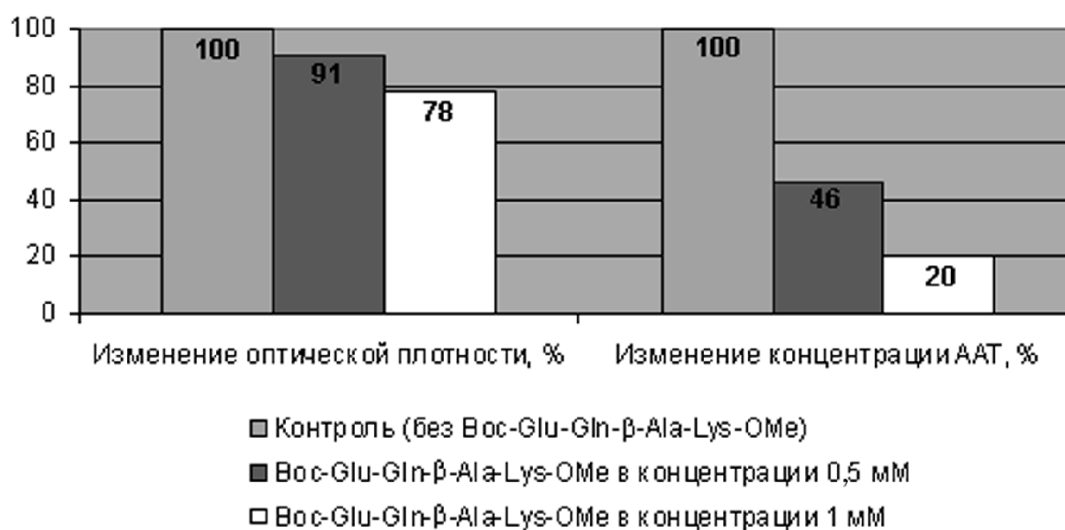


Рисунок 2.

Ингибирование связывания ААТ с иммобилизованной ТПО человека тетрапептидом Boc-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe в концентрации 0,5 мМ и 1,0 мМ.

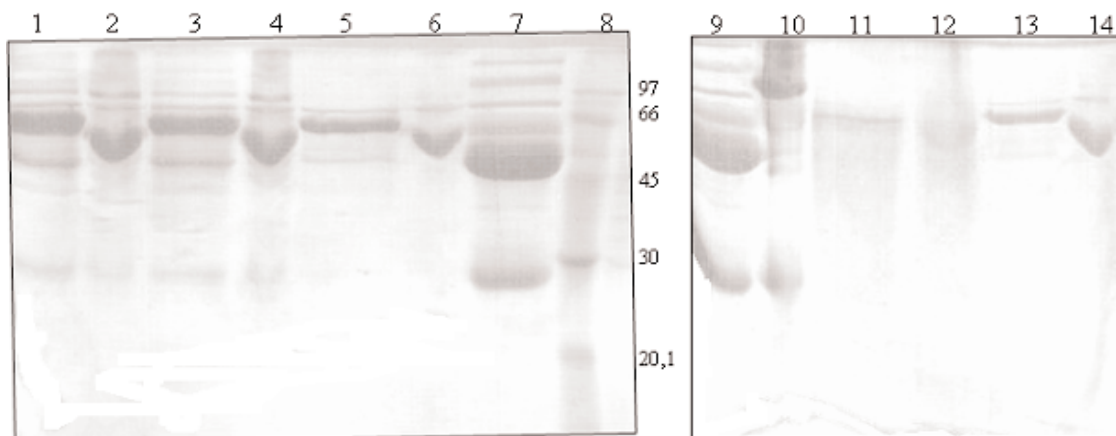
Второй этап работы включал получение новых иммуносорбентов и исследование их способности специфически связывать ААТ из сыворотки крови человека. В ходе выполнения работы было получено два вида иммуносорбентов, которые содержали в качестве биоселективного лиганда тетрапептид H-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe, иммобилизованный на разных полимерных матрицах.

В первом случае в качестве матрицы нами была выбрана CNBr-сефароза 4В. Использование сефарозы обусловлено возможностью специфической иммобилизации лиганда на её поверхности за счет ковалентного взаимодействия, что делает все молекулы лиганда потенциально доступными для связывания с молекулами ААТ против ТПО и повышает сорбционную ёмкость иммуносорбента.

В качестве полимера-матрицы для второго иммуносорбента был выбран полиакриламидный гель. Выбор полиакриламидной матрицы обусловлен её стабильностью, биологической инертностью, возможностью введения лиганда на стадии полимеризации. Для превращения вводимого в качестве лиганда пептида H-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe в мономер проводили его ацилирование акрилоилхлоридом. Полученное производное использовали в качестве мономера при сополимеризации акриламида, N,N'-метиленабисакриламида в присутствии персульфата аммония и N,N,N',N'-тетраметиленадиамина в качестве инициаторов полимеризации.

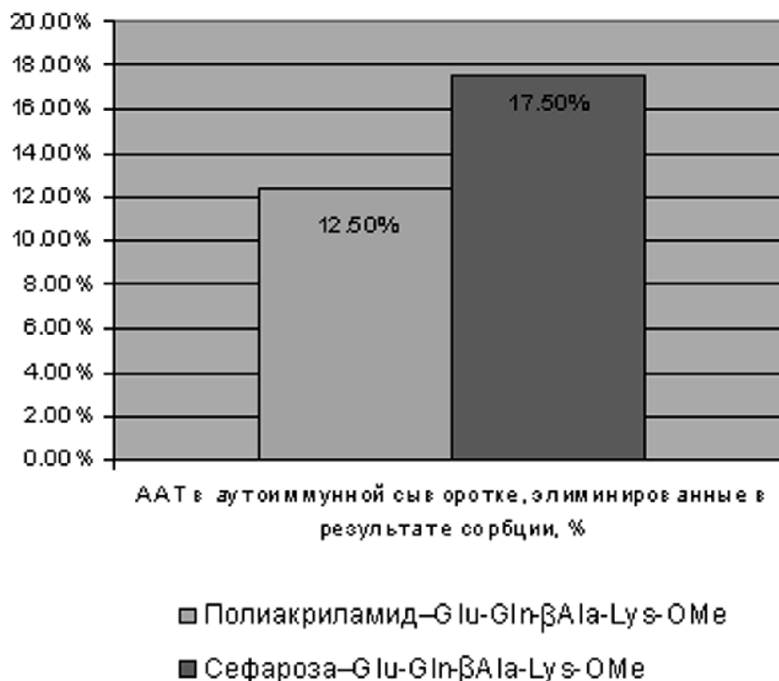
Способность сорбентов полиакриламид-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe и сефароза-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe специфически связывать ААТ против ТПО из сыворотки крови человека была подтверждена тестированием элюатов с полученных иммуносорбентов и с сорбента полиакриламид без лиганда. Методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН показано, что элюаты с иммуносорбентов, содержащих в качестве лиганда тетрапептид Glu-Gln-βAla-Lys-OMe, содержат иммуноглобулины (рис. 3). Методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием микропланшетов с иммобилизованной ТПО определено, что концентрация специфических ААТ в данных элюатах составляет ~480 МЕ/мл для сорбента сефароза-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe и ~350 МЕ/мл для сорбента полиакриламид-Glu-Gln-βAla-Lys-OMe (из расчёта на 1 мл хроматографического сорбента). В элюате с полиакриламидного геля без лиганда иммуноглобулины не обнаружены ни электрофорезом, ни методом иммуноферментного анализа.

Во всех исследованных элюатах обнаружено незначительное количество сывороточного альбумина (60000 Да), присутствие других белков крови не выявлено. Биоспецифическое связывание ТПО-специфических ААТ иммуносорбентами сефароза–Glu-Gln- $\beta$ Ala-Lys-OMe и полиакриламид–Glu-Gln- $\beta$ Ala-Lys-OMe (рис. 4) свидетельствует о том, что они обладают избирательной сорбцией по отношению к данным ААТ.



**Рисунок 3.**

Электрофоретическое разделение белков в 12% ПААГ в присутствии 0,2% ДДС-Na. Образцы 1, 3, 4, 7, 9, 11, 13 перед анализом обрабатывали 5%-м  $\beta$ -меркаптоэтанолом и 2%-м ДДС-Na. Окрашивание Кумасси R-250. 1-6, 11-14 - "специфические" элюаты, полученные в результате аффинной хроматографии образцов сыворотки крови, содержащих ААТ к ТПО (1-4) и контрольных образцов сыворотки крови, не содержащих ААТ к ТПО (5, 6, 11-14) с использованием сорбентов с иммобилизованным пептидом на основе CNBr-сефарозы 4В (3-6) и полиакриламида (1, 2, 11-14). 7, 9, 10 - Стандартные препараты Ig человека, выделенные из сыворотки крови по методу [18]. Стандартные белки с молекулярной массой 97, 66, 45, 30, 20,1 кДа (8).



**Рисунок 4.**

Количество ТПО-специфических ААТ, элиминированных из аутоиммунной сыворотки.

Для подтверждения специфичности лиганда, иммобилизованного на сорбентах, были проведены три последовательных хроматографии аутоиммунной сыворотки крови человека и контрольной сыворотки крови человека. Содержание белков в полученных элюатах оценивали как указано ранее. По данным ИФА и электрофореза в элюатах не содержатся ААТ против ТПО или иммуноглобулины другой специфичности и присутствует сывороточный альбумин.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, полученные сорбенты позволяют за одну стадию аффинной хроматографии выделять специфические ААТ против ТПО, что свидетельствует об их селективности. Следует отметить, что ёмкость и специфичность сорбентов ограничены и обусловлены содержанием ААТ определенной специфичности в исследуемой сыворотке крови, поскольку при развитии аутоиммунной реакции происходит изменение спектра аутореактивных В-лимфоцитов и, соответственно, специфических ААТ. Полученные иммуносорбенты могут найти применение в медицине и экспериментальной биохимии для избирательной элиминации патогенных аутоантител при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Czarnocka B., Ruf J., Ferrand M. et al. (1985) C R Acad Sc (Paris), **300**, 577-580.
2. Kotani T., Umeki K., Matsunaga S., Kato E., Ohtaki S. (1986) J. Clin. Endocrinol. Metab., **62**, 928-933.
3. Mariotti S., Caturegli P., Piccolo P., Barbesino G., Pinchera A. (1990) J. Clin. Endocrinol. Metab., **71**, 661-669.
4. Doullay F., Ruf J., Codaccioni J.L., Carayon P. (1991) Autoimmunity, **9**, 237-244.
5. Prummel M.F., Wiersinga W.M. (2005) Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., **19**, 1-15.
6. Герасимов Г.А. (1998) Клинич. лабор. диагн., **6**, 25-32.
7. Blanchin S., Estienne V., Durand-Gorde J.-M., Carayon P., Ruf J. (2003) Endocrinology, **144**, 5422-5429.
8. Коновалов Г.А., Беленков Ю.Н., Звездин П.В., Чебышев А.Н., Семин С.Н., Кузнецова Ю.В., Адамова И.Ю., Купор С.Г., Покровский С.Н. (2002) Кардиология, №6, 92-96.
9. Koll R.A. (1998) Ther. Apher., **2**, 147-152.
10. Bygren P. (1985) Lancet, **2**, 1295-1296.
11. Snyder H.W. Jr., Henry D.H., Messerschmidt G.L., Mittelman A., Bertram J., Ambinder E., Kiprov D., Balint J.P. Jr., MacKintosh F.R., Hamburger M., Viola M.V., Fiore J., Louie J., Higby D.J., O'Brien P., Ainsworth S., Fisher L.D., Perkins W., Jones F.R. (1991) J. Clin. Apher., **6**, 1-10.
12. Ray P.K., Besa E., Idiculla A., Rhoads J.E. Jr., Bassett J.G., Cooper D.R. (1980) Cancer, **45**, 2633-2638.
13. Euler H.H., Schwab U.M., Schroeder J.O., Hasford J. (1996) Artif. Organs, **20**, 356-359.
14. Шутова И.В., Грибовская О.В., Цыганова О.В., Голубович В.П. (2009) Доклады НАН Беларуси, **53**, 79-84.
15. Северин С.Е., Соловьева Г.А. (1989) Практикум по биохимии. – 2-ое изд., МГУ, М.
16. Цыганова О.В., Киселева Е.П., Вашкевич И.И., Прядко А.Г., Свиридов О.В. (2006) Прикладная биохимия и микробиология, **42**, 236-246.
17. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, 680-685.
18. Wilson M.B., Nakane P.K. (1978) In: Immunofluorescence and Related Staining Technique (Kanpp W., Holubar K., Wick G., eds.), Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 215-224.

Поступила: 13. 05. 2010.



**NEW BIOAFFINE SORBENTS FOR SELECTIVE ELIMINATION OF AUTOANTIBODIES  
AGAINST HUMAN THYROPEROXIDASE IN AUTOIMMUNE THYROID DISEASES**

***O.V. Gribovskaya, I.V. Shutova, O.V. Tsyganova, V.P. Martinovich, V.P. Golubovich***

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,  
ul. Akademika Kuprevicha, 5/2, Minsk, 220141 Belarus; tel.: +375-(17)2678263;  
e-mail: olgamel@iboch.bas-net.by

New bioaffine sorbents containing bioselective ligand, synthetic analog of the human thyroperoxidase antigenic determinant – tetrapeptide H-Glu-Gln- $\beta$ Ala-Lys-OMe, immobilized on two polymeric matrixes – a polyacrylamide gel and CNBr-activated sepharose 4B were synthesized. The offered immunosorbents were shown have high selectivity in relation to autoantibodies against thyroperoxidase and can find an application for medicine and experimental biochemistry for selective elimination of autoantibodies from serum or plasma of the patients suffering from autoimmune thyroid diseases.

**Key words:** peptide synthesis; bioaffine sorbents; in silico design; autoantibodies against thyroperoxidase; autoimmune thyroid diseases.