

Выявление IgE-позитивных лейкоцитов крови синтетическим пептидом и моноклональными антителами

Н.С. Аляхнович¹, В.В. Янченко^{1,3}, Е.Г. Асирян¹, В.П. Мартинович², В.П. Голубович²

¹ Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь

² ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь

³ ОДО «Научно-исследовательское предприятие Ресан», г. Витебск, Беларусь

Detection of IgE-positive leukocytes by synthetic peptide and monoclonal antibodies

N.S. Aliakhnovich¹, W. Janchenko^{1,2}, V.P. Martinovich³, V.P. Golubovich³

¹ Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

² ODO "The Research company RESAN", Vitebsk, Belarus

³ SSI "Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Belarus

Аннотация

Цель: Оценить возможность использования синтетического пептида p₁₃₇₋₁₄₂-FcεRIα, фрагмента активного центра FcεRI, для выявления клеток, связавших IgE, в сравнении с моноклональными антителами.

Материалы и методы. Обследовано 39 детей, средний возраст - 11 [10,0; 12,8] лет. Получено 105 образцов крови. Для фенотипирования клеток крови использовали синтетический гексапептид p₁₃₇₋₁₄₂-FcεRIα, меченный FITC (ОДО «НИКП Ресан» (Беларусь)) и моноклональные антитела к IgE, Mouse Anti-Human (FITC), производства Thermo Fisher Scientific Inc. США. Для подсчета количества эозинофилов проводился общий анализ крови.

Результаты. Достоверных различий между количеством IgE+ клеток, выявленных мАТ и синтетическим пептидом, не обнаружено (p=0,2), установлена корреляция высокой степени между значениями, полученными двумя методами (0,8). Из 105 проб в 51 (49%) обнаружен нормальный уровень эозинофилов, в 54 пробах (51%) - повышенный (≥6%). Количество IgE+ клеток было выше у детей с эозинофилией, чем при нормальном содержании эозинофилов (p=0,00). При эозинофилии повышалась корреляция между количеством эозинофилов и IgE+ клеток. В 68% образцов крови с эозинофилами 0-3%, уровень IgE+ клеток был выше половины среднего: 3-3,5% на 30000 клеток.

Выводы. Определение количества клеток, связавших IgE, с помощью синтетического пептида p₁₃₇₋₁₄₂-FcεRIα, фрагмента активного центра высокоаффинного рецептора к иммуноглобулину E, не уступает стандартному методу определения с помощью моноклональных антител. Количество эозинофилов в периферической крови коррелирует с количеством IgE+ клеток. У детей с эозинофилией количество IgE+ клеток выше, чем у детей с нормальным уровнем эозинофилов, и сильнее коррелирует с количеством эозинофильных лейкоцитов.

Summary

The aim: to assess the use of the synthetic peptide p₁₃₇₋₁₄₂-FcεRIα, the fragment of the FcεRI active site, in identifying the IgE+ cells, compared to monoclonal antibodies to IgE.

Materials and methods. The study involved 39 children, mean age of 11 [10.0; 12.8] years. 105 blood samples were received. For phenotyping blood cells we used a synthetic hexapeptide p₁₃₇₋₁₄₂-FcεRIα, FITC-labeled (NIKP "Resan" Belarus), and monoclonal antibodies to IgE, Mouse Anti-Human (FITC), the production of Thermo Fisher Scientific Inc. USA. To count the eosinophils number general blood analysis was conducted. Results. No significant differences between the number of cells identified with the synthetic peptide and mAb were found (p = 0,2), the correlation between the IgE+ cells number identified by both methods was high (0.8). From the 105 samples in 51 (49%) - normal and in 54 (51%) - increased level of eosinophils (≥6%) was found. IgE+ cells number was higher in children with an increased level of eosinophils, than with normal eosinophils (p = 0,00). Correlation between IgE+ cells and eosinophils increased in samples with eosinophilia. In 68% of cases with a low level of eosinophils (0-3%), the level of IgE+ cells was above half of the medium: 3-3.5% at 30,000 cells.

Conclusions. Determining the cells bound IgE by a synthetic peptide p₁₃₇₋₁₄₂-FcεRIα, fragment of the active center of the high affinity receptor for immunoglobulin E, is not worse than standard method of determining, using monoclonal antibodies to IgE. Number of eosinophils in peripheral blood correlates with the amount of IgE+ cells. In children with eosinophilia IgE+ cell number is higher than in children with normal eosinophils level. There is a higher correlation IgE+ cell number with the eosinophils number in case of eosinophilia. In 14% of cases the other IgE+ cells (except eosinophils) were dominant.

В 14% случаев преобладали другие (кроме эозинофилов) IgE⁺ клетки.

Ключевые слова

Синтетический пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, моноклональные антитела к IgE, эозинофилы, эозинофилия, IgE⁺ клетки.

Имуноглобулин (IgE) наиболее малочисленный (50 нг/мл) и короткоживущий (t_{1/2}=2,5 дня) сывороточный иммуноглобулин [1,2]. Низкая концентрация в цитоплазме является результатом как малого количества В-клеток, задействованных в его синтезе, так и в его быстрой абсорбции и прочной связи с клетками. Высокоаффинный рецептор для иммуноглобулина E, FcεRI, обычно полностью насыщен при физиологической концентрации IgE и имеет низкий коэффициент диссоциации после связывания IgE [3]. По этой причине IgE, связанный с клетками, может оставаться в организме в течение нескольких недель или месяцев [2]. FcεRI в виде тетрамера находится на базофилах и тучных клетках, в качестве тримера на многих других клетках, в частности на эозинофилах, нейтрофилах атопиков и антигенпредставляющих клетках [4]. Присоединение IgE приводит к стабилизации, предотвращению интернализации и протеазной деградации рецепторов FcεRI и их накоплению на поверхности клеток [5].

В настоящее время IgE широко известен как триггер аллергических реакций немедленного типа. Недавние исследования показали его важную роль в регуляции иммунного гомеостаза, в частности в регуляции экспрессии IgE-рецепторов на клетках, функции и выживаемости базофилов и тучных клеток, даже в отсутствии аллергена [3]. IgE признан важным участником развития пищевой аллергии [3]. Повышенный синтез IgE приводит к относительно высоким локальным концентрациям в кишечнике и вызывает увеличение количества экспрессии FcεRI на тучных клетках слизистой оболочки [6].

Присоединение аллергена к мембраносвязанному иммуноглобулину E стимулирует его интернализацию и протеолитическую деградацию на пептидные фрагменты, которые в комплексе с HLA II класса экспрессируются на поверхности для презентации Т-хелперам [3], что значительно стимулирует развитие иммунной реакции.

В нашем исследовании мы оценивали возможность выявления клеток, связавших IgE (IgE⁺ клеток), синтетическим пептидом p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα,

Keywords

Synthetic peptide p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, monoclonal antibodies to IgE, eosinophils, eosinophilia, IgE⁺ cells.

фрагментом активного центра FcεRI, в сравнении с моноклональными антителами. Ранее мы описали свойства этого пептида связывать и выявлять IgE на поверхности клеток [7,8,9].

Цель: оценить возможность использования синтетического пептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, фрагмента активного центра FcεRI, для выявления клеток, связавших IgE, в сравнении с моноклональными антителами.

Материалы и методы

Синтетический пептид. Синтетический гексапептид, фрагмент активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина E, синтезировали 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 карбодиимидный, в качестве противорацемической добавки использовали 1-оксисбензотриазол. 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 [10].

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%, [α]_D²⁰ -21,00 (с 1, уксусная кислота). Масс-спектр FAB: m/z: 838,9 [M+H]⁺, 860,9 [M+Na]⁺ [10].

Клетки крови фенотипировали с помощью синтетического гексапептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, ме-

ченного FITC (5,6-флуоресцеин изотиоцианат). Для введения флуоресцентной метки 4,6 мг (0,05 ммоль) Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys·2HCl растворяли в 0,4 мл ДМФ, прибавляли 0,1 мл 1% раствора диизопропилэтиламина в ДМФ, затем раствор 2,1 мг (0,10 ммоль) FITC в 0,2 мл ДМФ, перемешивали в течение 30 мин, прибавлением 4 мл эфира переводили меченый пептид в осадок. После отстаивания сливали надосадочную жидкость, пептид сушили до постоянного веса. Получили 4,1 мг (81%) FITC-производного Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys [9, 10].

Моноклональные антитела. Для фенотипирования клеток крови использовали моноклональные антитела IgE, клон 4H10, изотип mIgG1, Mouse Anti-Human (FITC), производства Thermo Fisher Scientific Inc. США.

Обследовано 39 детей с аллергической бронхиальной астмой легкой степени тяжести, проходивших лечение в УЗ «Витебский областной детский клинический центр», с письменным информированным согласием каждого пациента и одного из его родителей. Средний возраст детей составил 11 [10,0; 12,8] лет. Кровь забиралась от 1 до 4 раз в течение проведения исследования. Фенотипирование клеток крови проводили на проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., США). К 100 мкл гепаринизированной цельной крови добавляли 2,5 мкл раствора реагента (синтетического пептида или моноклональных антител в параллельных пробах), аккуратно перемешивается на вортексе и инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем добавляли лизирующий эритроциты раствор и

инкубировали при температуре 37°C ещё 10 мин. После добавления 500 мкл буферного раствора, проводили фенотипирование. Расчет показателей проводился на 30000 клеток крови.

Всем детям также проводился общий анализ крови с подсчетом процента эозинофилов.

Статистический анализ данных проводился в программе Statistica 10,0. Данные обрабатывались с помощью критерия парного непараметрического критерия Wilcoxon Matched Pairs Test (WPT) и теста Mann-Whitney U Test с указанием величины критерия (T; U) и уровня достоверности расчета (p).

Корреляция показателей оценивалась с помощью непараметрического теста Spearman Rank Order Correlations (SpCorr) с указанием степени и уровня достоверности расчета (p).

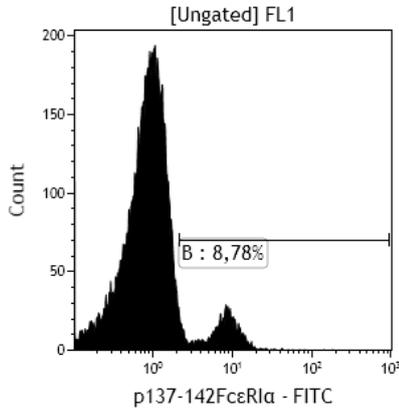
Результаты и обсуждение

Получено 105 образцов крови. Содержание клеток, связавших IgE, оценено двумя методами: с помощью моноклональных антител (мАТ) к IgE и с применением синтетического пептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεR1α. Примеры протоколов обследования (проточной цитометрии и общего анализа крови) представлены в таблицах 1, 2.

Среднее количество IgE+ клеток, выявленных двумя методами, а также среднее количество лейкоцитов и эозинофилов в образцах крови представлены в таблице 3.

Достоверных различий между количеством клеток, выявленных мАТ и синтетическим пептидом, не обнаружено (WPT: T=2328, p=0,2), что подтверждает значимость использования фраг-

Таблица 1. Анализ данных образца крови 31-2-к

Общий анализ крови		Проточная цитометрия										
Лейкоциты, количество клеток в 1 мкл крови	6500											
Лимфоциты, %	28											
Эозинофилы, %	10											
Базофилы, %	0											
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Gate Number</th> <th>%Total</th> <th>%Gated</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All</td> <td>30 000</td> <td>100,00</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>2 633</td> <td>8,78</td> </tr> </tbody> </table>		Gate Number	%Total	%Gated	All	30 000	100,00	B	2 633	8,78
Gate Number	%Total	%Gated										
All	30 000	100,00										
B	2 633	8,78										

мента активного центра FcεRI, в выявлении IgE⁺ клеток (Рис. 1). Установлена корреляция высокой степени между количеством клеток, выявленных двумя способами (0,8) (Рис. 1).

Учитывая, малочисленность базофилов в периферической крови и их отсутствие в большинстве образцов для постановки общего анализа крови, мы оценили количество эозинофилов (Таблица 1) и их корреляцию с уровнем клеток, связавших IgE.

Обнаружена достоверная (p<0,05) корреляция умеренной степени (0,6) между количеством эозинофилов и количеством клеток, детектированных с помощью пептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, и выявленных с помощью МАТ к IgE (0,5) (Рис. 2).

Полученные данные подтверждают то, что эозинофилы активно связывают IgE и являются одними из самых многочисленных IgE⁺ клеток периферической крови.

Построена достоверная регрессионная модель умеренной силы по зависимости между относи-

тельным количеством эозинофилов в периферической крови и относительным количеством IgE⁺клеток, выявленных пептидом p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα или моноклональными антителами к IgE:

$$Y=0,45 \cdot X+4,6,$$

где: X – относительное количество эозинофилов, Y – относительное количество IgE⁺клеток.

С помощью построенной модели можно вычислять абсолютное количество IgE⁺ клеток крови у пациентов с бронхиальной астмой по абсолютному количеству лейкоцитов и относительному количеству эозинофилов периферической крови.

$$A=B/100 \cdot (0,45 \cdot X+4,6),$$

где: B – абсолютное количество лейкоцитов в 1 мкл крови; X – относительное количество эозинофилов; A – абсолютное количество IgE⁺ клеток.

После этого, по уровню эозинофилов все обследуемые были поделены на две группы: (0) с нормальным уровнем эозинофилов (0-5%) и (1) повышенным уровнем эозинофилов (от

Таблица 2. Анализ данных образца крови 8-5-к

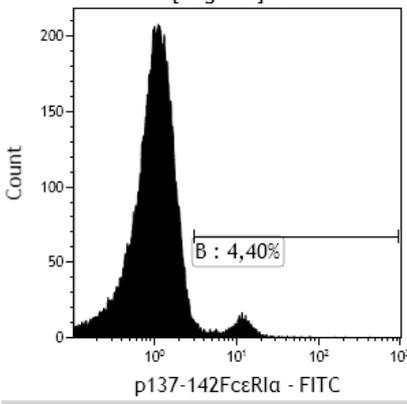
Общий анализ крови		Проточная цитометрия										
Лейкоциты, количество клеток в 1 мкл крови	8300	[Ungated] FL1										
Лимфоциты, %	51											
Эозинофилы, %	4	p137-142FcεRIα - FITC										
Базофилы, %	0	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Gate Number</th> <th>%Total</th> <th>%Gated</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All</td> <td>30 000</td> <td>100,00</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>1 321</td> <td>4,40</td> </tr> </tbody> </table>		Gate Number	%Total	%Gated	All	30 000	100,00	B	1 321	4,40
Gate Number	%Total	%Gated										
All	30 000	100,00										
B	1 321	4,40										

Таблица 3. Средние значения лейкоцитарных показателей обследованных детей

Показатели	Клетки, среднее значение и доверительный интервал
Клетки, выявленные моноклональными антителами к IgE	7,5 [6,8; 8,2]
Процент	
Клетки, выявленные синтетическим пептидом p137-142FcεRIα	7,3 [6,6; 8,0]
Процент	
Лейкоциты	7,5 [7,0; 7,9]
Количество на 10 ⁹ в литре	
Эозинофилы	6,3 [5,5; 7,2]
Процент	

6% и выше). Из 105 проб в 51 (49%) обнаружен нормальный уровень эозинофилов, в 54 пробах (51%) – повышенный. Средние значения показателей у детей двух подгрупп представлены в таблице 4.

При сравнении количества IgE⁺ клеток в подгруппах, оказалось, что оно выше у детей с повышенным уровнем эозинофилов, как при выявлении пептидом р₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, так и при использовании моноклональных антител к IgE (M-U: U₁=482, p₁=0,00; U₂=680, p₂=0,00) (Рис. 3).

В подгруппе детей с эозинофилией корреляция между количеством эозинофилов и IgE⁺ клеток была выше (0,34-0,46), чем в подгруппе с нормальным уровнем эозинофилов (0,29), в кото-

рой достоверная корреляция наблюдалась только при использовании синтетического пептида.

В подгруппе детей с нормальным уровнем эозинофилов количество IgE⁺ клеток, выявленных моноклональными антителами, было достоверно выше, чем при выявлении синтетическим пептидом (WPT: T=422, p=0,02), в то время как в подгруппе детей с повышенным уровнем эозинофилов оба метода не различались (WPT: T=681, p=0,8).

Корреляция между количеством IgE⁺ клеток, выявленных двумя способами, в подгруппах детей с нормальным и повышенным уровнями эозинофилов сохранялась на высоком уровне (0,64-0,67).

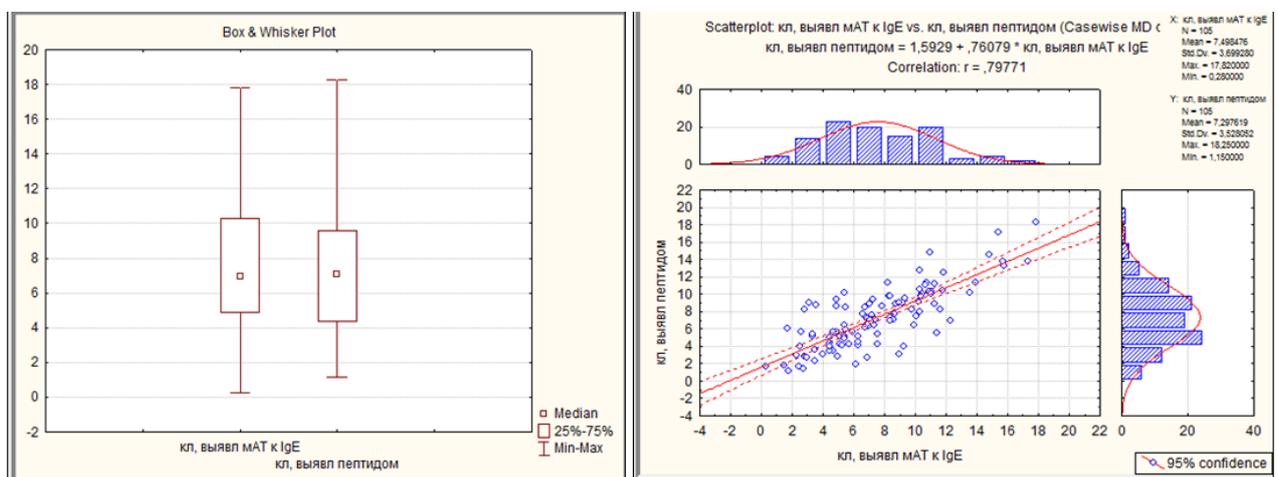


Рис. 1. Отсутствие различий (слева) и корреляция (справа) между количеством клеток, выявленных двумя методами.

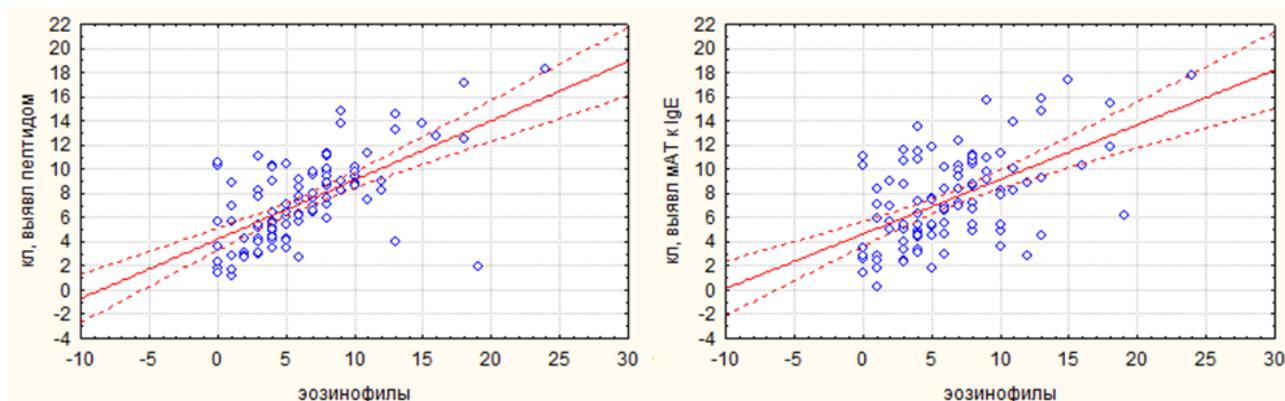


Рис. 2. Корреляция между количеством эозинофилов и IgE⁺ клетками, выявленными двумя методами.

Таблица 4. Средние значения лейкоцитарных показателей в подгруппах с нормальным и повышенным количеством эозинофилов

Показатели	Подгруппа 0 (Эозинофилы 0-5%), n=51	Подгруппа 1 (Эозинофилы >6%), n=54
	Среднее значение и доверительный интервал	
IgE ⁺ клетки, выявленные моноклональными антителами к IgE, %	5,8 [5,0; 6,7]	9,1 [8,1; 10,0]
IgE ⁺ клетки, выявленные пептидом p ₁₃₇₋₁₄₂ FcεRIα, %	5,3 [4,6; 6,0]	9,2 [8,3; 10,1]
Лейкоциты, к-во на 10 ⁹ в литре	7,1 [6,5; 7,6]	7,8 [7,2; 8,5]
Эозинофилы, %	2,8 [2,4; 3,3]	9,6 [8,6; 10,7]

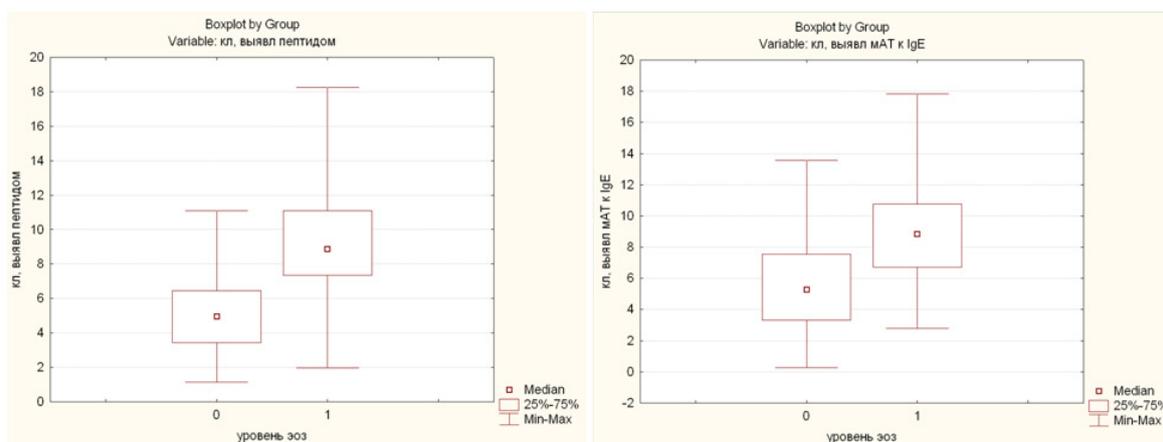


Рис. 3. Различия между количеством IgE⁺клеток в группах детей с нормальным уровнем эозинофилов (0) и повышенным уровнем эозинофилов (1), выявленных с помощью пептида (слева) и с помощью моноклональных антител (справа).

В 28 пробах (27% от всех образцов) установлен низкий уровень эозинофилов (0-3%), при этом уровень IgE⁺ клеток в 68% из них (14% всех образцов) был выше половины среднего: 3-3,5% на 30000 клеток (Табл.3). Учитывая этот факт, можно предположить, что у этих детей IgE связывали другие клетки, несущие рецепторы к IgE, в частности нейтрофилы и моноциты.

Выводы

1. Определение количества клеток, связавших IgE, с помощью синтетического пептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, фрагмента активного центра высокоаффинного рецептора к иммуноглобулину E, не уступает стандартному методу определения с помощью моноклональных антител.
2. Между количеством эозинофилов в периферической крови и количеством IgE⁺ клеток существует достоверная корреляция средней степени. Сила корреляции количества эозинофилов с количеством клеток, выявленных синтетическим пептидом p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, была выше, чем с клетками, выявленными моноклональными антителами.
3. У детей с эозинофилией количество IgE⁺ клеток больше, чем у детей с нормальным уровнем эозинофилов, и оно сильнее коррелирует с количеством эозинофильных лейкоцитов.
4. Эозинофилы являются большой, но не единственной популяцией клеток, связывающих IgE в крови. В 14% случаев преобладали другие (кроме эозинофилов) IgE⁺ клетки.

Литература

1. Kubo S, Nakayama T, Matsuoka K, Yonekawa H, Karasuyama H. Long term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE. *J Immunol.* 2003;170:775–780.
2. Gould HJ, et al. The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2003.21:579-628.
3. Burton OT, Oettgen HC. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunological reviews.* 2011;242(1):128-143.
4. Kita H. Eosinophils: Multifaceted Biologic Properties And Roles In Health And Disease. *Immunological reviews.* 2011;242(1):161-177.
5. Borkowski TA, Jouvin MH, Lin SY et al. Minimal requirements for IgE-mediated regulation of surface Fc epsilon RI. *J Immunol.* 2001;167:1290–1296.
6. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews.* 2008;8:205–217.
7. Янченко В.В. Оценка связывания базофилами синтетического пептида – фрагмента активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина E. *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 2015; 4: С. 27-34.
8. Янченко В.В. Фенотипирование базофилов крови IgE-связывающим пептидом при хронической крапивнице. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2014; №2: 19-23.
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; T. 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. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2013; №2: 55-65.

Сведения об авторах:

Аляхнович Наталья Сергеевна – ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.

Янченко Владимир Вилиянович – к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии Витебского государственного медицинского университета. 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, E-mail: all-vgmu@mail.ru

Поступила 20.04.2016 г.