

УДК 575.113:578.23:616.832-004.2:57.082.13

DOI: 10.22141/2224-0713.1.95.2018.127409

Негрич Н.О.¹, Негрич Т.І.¹, Паєнок А.В.¹, Волошина Н.П.², Мироновський С.Л.³, Кіт Ю.Я.³, Стойка Р.С.³¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна²Інститут неврології, психіатрії і наркології НАМН України, м. Харків, Україна³Інститут біології клітини НАН України, м. Львів, Україна

Клінічна характеристика нового сироваткового біомаркера як потенційного продукту розпаду білка ендогенного ретровірусу людини у хворих на розсіяний склероз

Резюме. Метою роботи було дослідити взаємозв'язок між рівнем Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові хворих на розсіяний склероз (РС) та демографічними особливостями обстежених осіб, а також окремими властивостями перебігу цього захворювання. **Матеріали та методи.** У дослідженні брали участь 61 хворий на РС та 20 практично здорових осіб віком від 19 до 57 років. Методи дослідження: клінічні — аналіз скарг, анамнезу захворювання та життя, загальний та неврологічний огляди; лабораторні — білки сироватки крові послідовно осаджували трихлороцтовою (ТХО) кислотою. Утворену ТХО-розчинну фракцію піддали високоефективній рідинній хроматографії при довжині хвилі 280 нм. За допомогою двовимірної тонкошарової хроматографії та мас-спектрометрії було ідентифіковано Ser-Pro-Cys олігопептид. **Результати.** Виявлено вірогідну відмінність між середніми значеннями рівня Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові хворих на РС різних вікових і гендерних груп порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$). Натомість не встановлено вірогідних відмінностей у показниках рівня Ser-Pro-Cys пептиду між хворими на РС чоловіками і жінками. Незалежно від характеристики неврологічних проявів та віку дебюту захворювання в усіх групах хворих на РС концентрація Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові була вищою порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$). Середні значення рівня Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові хворих на РС із різною тривалістю захворювання та різним ступенем інвалідності виявилися значущо вищими порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$). **Висновки.** Рівень Ser-Pro-Cys пептиду був вірогідно вищим у хворих на РС вже навіть у дебюті захворювання порівняно із здоровими добровольцями. Вірогідно вищі значення цього олігопептиду в сироватці крові хворих на РС утримувались протягом усієї тривалості розвитку захворювання, а також при всіх рівнях інвалідизації хворих, порівнюючи з результатами контрольної групи. Виявлені закономірності узгоджуються з даними літератури на користь прозапальної та мієлінотоксичної функцій білка ендогенного вірусу людини типу W, ймовірним фрагментом якого є виділений нами Ser-Pro-Cys пептид.

Ключові слова: розсіяний склероз; ендогенний ретровірус; біомаркер; Ser-Pro-Cys пептид

Вступ

Розсіяний склероз (РС) є автоімунним запальним захворюванням центральної нервової системи (ЦНС), що характеризується ушкодженням мієлінової оболонки та дегенерацією аксонів [1]. РС — одна з основних причин інвалідизації молодих людей у цілому світі

[2, 3]. У глобальному плані РС призводить до значних матеріальних затрат і відноситься до соціальних захворювань [4].

Хоча етіологія РС залишається невідомою, вважається, що виникнення захворювання пов'язане з особливим поєднанням генетичних факторів із факторами

зовнішнього середовища та інфекційними чинниками [5]. Більшість даних, що пов'язують РС з вірусами, генеруються шляхом виявлення частинки вірусу (ДНК, РНК, білків) у рідинах або тканинах організму чи детекції імунної відповіді організму на вірус. Імунна відповідь на віруси включає в основному дослідження антитіл у сироватці крові або лікворі пацієнтів, хворих на РС, та порівняння отриманих результатів з даними відповідних контрольних груп [6].

З-поміж усіх вірусів родина герпесвірусів є найкраще дослідженою як фактори, що впливають на розвиток патологічного процесу при РС [6]. Численні дослідження відкрили значну кількість асоціацій окремих компонентів цих вірусів з РС. Однак мало відомо про те, як ці віруси могли б реально викликати або модулювати процес захворювання.

Розроблено ряд моделей РС на тваринах, зокрема експериментальний алергічний енцефаломієліт та модель вірус-індукованої демієлінізації, викликаной вірусом мишачого енцефаломієліту Тейлера [6]. Моделі на тваринах допомогли зрозуміти деякі механізми, такі як молекулярна мімікрія та побічна активація імунних клітин, у патофізіології РС. На жаль, такі моделі не є універсальними, оскільки вони непридатні для дослідження суто людських вірусів, зокрема герпесвірусів.

Останніми роками особливий інтерес при РС становить група ендемічних ретровірусів людини (ЕРВЛ). Вони належать до родини ретровірусів — вірусів, що здатні «вбудовувати» власний геном у людський завдяки наявності ферменту РНК-залежної ДНК-полімерази (зворотної транскриптази) [7]. Як наслідок, близько 1–8 % від усього генома людини має вірусне походження [8, 9]. ЕРВЛ класифікуються у 31 сім'ю на основі специфічності тРНК ділянки зв'язування праймера, що відповідає амінокислоті, яка додається до ЕРВЛ під час трансляції вірусних білків (ЕРВЛ-W, -K, -H тощо) [10].

Перший опис ЕРВЛ у хворих на РС датується 1980 роком, коли у хворих на цю недугу виявили РС-асоційований ретровірус (РСАРВ), що належить до родини ЕРВЛ-W [11]. Деякі автори вважають, що РСАРВ є позаклітинною вірусною часткою ЕРВЛ-W [12]. ЕРВЛ мають загалом таку ж генетичну структуру, як екзогенні ретровіруси, а саме: дві ділянки довгих кінцевих повторів, що пов'язують геном з чотирма основними вірусними генами: gag (кодуюча матриця та ретровірусне ядро), pol (зворотна транскриптаза та інтеграза), pro (протеаза) і env (оболонка) [9].

Нещодавно проведений метааналіз щодо виявлення окремих білків ендемічних ретровірусів у різних тканинах організму вказує на вірогідно частішу детекцію РСАРВ/ЕРВЛ-W у хворих на РС порівняно із практично здоровими добровольцями [9, 13, 14]. На додаток, виявлення високого числа копій ДНК ендемічних ретровірусів методом полімеразної ланцюгової реакції асоціювалось із прогресуючими формами клінічного перебігу захворювання (первинно-прогресуючим та вторинно-прогресуючим РС) [7]. У той же час встанов-

лено, що віріони РСАРВ та ЕРВЛ-W, зокрема їх білки оболонки (env), мали виражену прозапальну та суперантигенну імунну дію [12].

Внаслідок неправильної активації ланок вродженого імунітету ендемічними ретровірусами, ймовірно, виникають сприятливі умови для розвитку ряду нейрозапальних захворювань. Це опосередковано взаємодією ендемічних ретровірусів з Толл-подібним рецептором 4 (TLR4) і CD14-корцептором [15]. TLR4 є одним із основних образ-розпізнавальних рецепторів, що відіграють центральну роль в ініціації вродженого імунітету проти мікробних патогенів. TLR4 активуються в гліальних клітинах і лімфоцитах, які проникли в ЦНС у відповідь на запалення, що викликане інфекційними агентами, травмою тканин або автоімунним процесом [16]. Окрім того, активований TLR4 здійснює виражений інгібуєчий вплив на ріст клітин-попередників олігодендроцитів (основних продуцентів мієліну) [15].

Беручи до уваги, що на даний момент ендемічні ретровіруси досліджуються як етіологічний, а також патогенетичний фактор РС, розроблено експериментальні засоби хворобо-модифікуючої терапії (ХМТ), мішенню яких є певні компоненти цих вірусів [17, 18]. У даний час продовжуються два міжнародні рандомізовані клінічні дослідження з оцінки ефективності застосування моноклональних антитіл проти РСАРВ у хворих на РС [17, 19].

Під час дослідження сироватки крові хворих на РС нами було виділено та ідентифіковано Ser-Pro-Cys пептид [20]. Встановили, що така послідовність амінокислот характерна для ряду білків, зокрема є типовою для СООН-терміналі білка, що кодується Hx22.3 геном ЕРВЛ-W [21]. Таким чином, виділений нами Ser-Pro-Cys пептид, ймовірно, є продуктом розпаду поверхневого (env) білка ЕРВЛ-W у вогнищах запалення ЦНС у хворих на РС. Було доведено, що у загальній групі хворих на РС рівень Ser-Pro-Cys пептиду виявлявся вірогідно вищим порівняно із групою клінічно здорових добровольців [20].

Метою цього дослідження стало вивчення взаємозв'язку між рівнем Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові хворих на РС та демографічними особливостями обстежених осіб, а також окремими властивостями клінічного перебігу цього захворювання.

Матеріали та методи

Наведена робота виконана на кафедрі неврології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та у Львівському обласному науковому центрі з вивчення проблем розсіяного склерозу та інших демієлінізуючих захворювань, що знаходиться на базі Львівської обласної клінічної лікарні.

Дослідження ґрунтувалось на положеннях Гельсінської декларації. Комісією з питань біомедичної етики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 2 від 15 лютого 2016 р.) встановлено, що ця наукова робота відповідає етичним і морально-правовим вимогам згідно

з наказом МОЗ України № 281 від 01.11.2000. Від усіх учасників дослідження було отримано письмову інформовану згоду на участь у ньому.

Критеріями включення пацієнтів були: вік від 18 до 60 років, вірогідний РС згідно з критеріями Макдональда (2010) [22], відсутність застосування препаратів ХМТ чи цитостатиків останні 6 місяців, згода хворого на участь у дослідженні. Критерії виключення: вік молодший за 18 років та понад 60 років, наявність супутніх захворювань, прийом препаратів ХМТ/цитостатиків останні 6 місяців, вагітність.

У дослідженні брав участь 61 хворий на РС віком від 19 до 57 років, середній вік яких становив $36,6 \pm 1,4$ року. Співвідношення жінок і чоловіків дорівнювало 2,4 : 1. Жінок — 43 особи (70,5 %), віком 19–57 років (середній вік — $37,0 \pm 1,6$ року). Чоловіків — 18 осіб (29,5 %), віком 20–52 роки (середній вік — $35,8 \pm 2,6$ року).

Використали наступні методи: клінічні — аналіз скарг, анамнезу захворювання та життя, детальний соматичний та неврологічний огляди з оцінкою ступеня інвалідизації за шкалою EDSS Куртцке [23]; лабораторні [20] — білки сироватки крові послідовно осаджували трихлороцтовою (ТХО) кислотою. Утворену

ТХО-розчинну фракцію піддавали високоефективній рідинній хроматографії при довжині хвилі 280 нм, у результаті чого ідентифікували хроматографічний пік, що містив компоненти низької молекулярної маси (300–500 Да). За допомогою двовимірної тонкошарової хроматографії та мас-спектрометрії було визначено, що дана речовина є олігопептидом з характерною послідовністю амінокислот, яка відповідала Ser-Pro-Cys пептиду. Використали також інструментальні методи обстеження — магнітно-резонансну томографію головного та/або спинного мозку (лише для діагностики кі РС).

Статистична обробка отриманих результатів була проведена за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Характер розподілу отриманих варіаційних рядів було перевірено за допомогою критерію Шапіро — Франсія, що засвідчив правильний характер розподілу даних. При виконанні статистичної обробки отриманих показників було застосовано наступні методи: розрахунок середнього арифметичного та його середньої похибки ($M \pm m$); проведення оцінки вірогідності різниці отриманих результатів у порівнюваних групах (критерій Стьюдента). Відмінності визнавалися вірогідними при $p < 0,05$.

Таблиця 1. Зміни рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС залежно від віку обстежених і порівняно з контрольною групою

Показник	Середні значення досліджуваного показника та його середня похибка ($M \pm m$)				
	Контрольна група (n = 20)	Групи хворих на РС залежно від віку			
		1-ша група (n = 3)	2-га група (n = 16)	3-тя група (n = 20)	4-та група (n = 22)
Концентрація Ser-Pro-Cys пептиду, мг/мл	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,08*	0,27 ± 0,00*	0,27 ± 0,03*	0,43 ± 0,10*

Примітка: тут та у табл. 2–6: * — вірогідна відмінність показників між контрольною і досліджуваними групами при $p < 0,01$.

Таблиця 2. Зміни рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС залежно від статі та порівняно з контрольною групою

Показник	Середні значення досліджуваного показника та його середня похибка ($M \pm m$)		
	Контрольна група (n = 20)	Групи хворих на РС залежно від статі	
		Чоловіки (n = 18)	Жінки (n = 43)
Концентрація Ser-Pro-Cys пептиду, мг/мл	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,10*	0,31 ± 0,03*

Таблиця 3. Зміни рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС залежно від віку дебюту захворювання та порівняно з контрольною групою

Показник	Середні значення досліджуваного показника та його середня похибка ($M \pm m$)				
	Контрольна група (n = 20)	Групи хворих на РС залежно від віку дебюту захворювання			
		1-ша група (n = 13)	2-га група (n = 26)	3-тя група (n = 12)	4-та група (n = 10)
Концентрація Ser-Pro-Cys пептиду, мг/мл	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,05*	0,29 ± 0,00*	0,41 ± 0,15*	0,38 ± 0,10*

Примітка: * — вірогідна відмінність між показниками рівня Ser-Pro-Cys пептиду у досліджуваній та контрольній групі при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Первинно проаналізували коливання рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС залежно від віку (табл. 1). За віком усіх обстежених розділили на чотири групи: 1-ша група — до 20 років, 2-га — 20–30 років, 3-тя — 30–40 років, 4-та група — старше 40 років.

Виявили вірогідну відмінність між середніми значеннями рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС різних вікових груп порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$), хоча між різними віковими групами жодних відмінностей виявлено не було.

Дослідили зміни рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові обстежених пацієнтів із РС залежно від статі (табл. 2).

У групі хворих на РС чоловіків і жінок значення досліджуваного показника виявились вірогідно вищими порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$). Натомість не встановлено вірогідних гендерних відмінностей у показниках рівня Ser-Pro-Cys пептиду між хворими на РС чоловіками та жінками.

Виявлення статистично вірогідної гендерної та вікової різниці у концентрації досліджуваного пептиду узгоджується з даними літератури за вірогідно рівну

уразливість обох статей різного віку ЕРВЛ-W, ймовірним фрагментом якого є виділений нами Ser-Pro-Cys пептид [9, 24].

Оцінка результатів коливання середніх значень концентрації Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові залежно від віку дебюту РС подана в табл. 3. Усіх хворих розподілили на чотири групи залежно від віку виникнення перших симптомів захворювання: 1-ша група — до 20 років, 2-га — 20–30 років, 3-тя — 30–40 років і 4-та група — старше 40 років.

Встановили, що незалежно від віку дебюту РС у всіх групах хворих концентрація Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові була вищою порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$).

Визначили рівень Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС залежно від клінічних проявів перших симптомів захворювання (табл. 4).

Аналізуючи наведені у табл. 4 дані, виявили, що рівень Ser-Pro-Cys пептиду виявився вірогідно вищим у пацієнтів з усіма виділеними характеристиками дебюту захворювання порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$). Водночас концентрація досліджуваного показника не залежала від особливостей дебюту РС.

Таблиця 4. Зміни рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС залежно від характеристики дебюту захворювання та порівняно з контрольною групою

Перші симптоми захворювання у хворих на РС	Кількість обстежених осіб у групі	Середні значення рівня Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові обстежених та його середня похибка ($M \pm m$), мг/мл
Атаксія	14	$0,26 \pm 0,04^*$
Розлади чутливості	16	$0,35 \pm 0,03^*$
Рухові розлади	18	$0,41 \pm 0,10^*$
Ретробульбарний неврит	19	$0,30 \pm 0,03^*$
Окорухові розлади	5	$0,29 \pm 0,07^*$
Контрольна група	20	$0,00 \pm 0,00$

Таблиця 5. Зміни рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС залежно від тривалості захворювання та порівняно з контрольною групою

Показник	Середні значення досліджуваного показника та його середня похибка ($M \pm m$)				
	Контрольна група (n = 20)	Групи хворих на РС залежно від тривалості захворювання			
		1-ша група (n = 13)	2-га група (n = 26)	3-тя група (n = 12)	4-та група (n = 10)
Концентрація Ser-Pro-Cys пептиду, мг/мл	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,06^*$	$0,28 \pm 0,03^*$	$0,49 \pm 0,13^*$	$0,30 \pm 0,03^*$

Таблиця 6. Зміни рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС залежно від ступеня інвалідизації та порівняно з контрольною групою

Показник	Середні значення досліджуваного показника та його середня похибка ($M \pm m$)			
	Контрольна група (n = 20)	Групи хворих залежно від ступеня інвалідизації за шкалою EDSS		
		1-ша група (n = 22)	2-га група (n = 32)	3-тя група (n = 7)
Концентрація Ser-Pro-Cys пептиду, мг/мл	$0,00 \pm 0,00$	$0,30 \pm 0,04^*$	$0,35 \pm 0,10^*$	$0,32 \pm 0,07^*$

Звернули увагу на зміни рівня Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові пацієнтів із РС залежно від тривалості патологічного процесу (табл. 5). За тривалістю перебігу РС всіх хворих поділили на чотири групи: 1-ша група — до 1 року, 2-га — 1–5 років, 3-тя — 5–10 років та 4-та група — понад 10 років.

Середні значення концентрації Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС із різною тривалістю захворювання виявилися значущо вищими порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$). Навіть при тривалості хвороби до 1 року показники вірогідно відрізнялися від таких у контрольній групі. Виявлену закономірність можна пояснити тим, що ендегенний ретровірус людини типу W має виражену прозапальну та мієлінотоксичну дію, що може чинити кофакторний вплив на розвиток РС [15, 25].

Результати змін рівня Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові хворих на РС залежно від ступеня їх інвалідизації за шкалою EDSS наведені у табл. 6. Усіх обстежених нами пацієнтів із РС розподілили на три групи залежно від ступеня їх інвалідизації. До легкого ступеня інвалідизації зарахували пацієнтів з 0–3 балами за шкалою EDSS (1-ша група), до середнього — з 3,5–5,5 бала (2-га група), а до важкого — з 6 та більше балами (3-тя група).

Встановили, що значення досліджуваного показника виявилось вірогідно вищим у пацієнтів з усіма виділеними ступенями інвалідизації порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$). Поміж груп хворих на РС рівень Ser-Pro-Cys пептиду коливався у статистично незначимій кількості.

Отже, рівень Ser-Pro-Cys пептиду у сироватці крові хворих на РС не залежав від гендерних і вікових особливостей обстежених осіб. Концентрація досліджуваного олігопептиду не визначала клінічні характеристики дебюту захворювання. Натомість рівень цього пептиду вірогідно диференціював хворих на РС вже в дебюті захворювання від клінічно здорових добровольців. На додаток, рівень Ser-Pro-Cys пептиду в хворих на РС був статистично значущо вищим, порівнюючи з результатами контрольної групи, при мінімальній неврологічній симптоматиці пацієнтів, за якої діагностика РС є дуже складною та найменш точною, а пошук додаткових діагностичних ознак захворювання (біомаркерів) особливо актуальним.

Висновки

Ендегенні ретровіруси відіграють важливу роль у патогенезі РС, зокрема здатні визначати клінічний перебіг захворювання.

Встановлено, що до складу оболонкового білка ендегенного ретровірусу людини типу W входить Ser-Pro-Cys пептид.

Рівень Ser-Pro-Cys пептиду виявився вірогідно вищим у хворих на РС вже навіть в дебюті захворювання порівняно із практично здоровими особами. Вірогідно вищі значення цього олігопептиду в сироватці крові хворих на РС утримувалися при різній тривалості патологічного процесу, а також при всіх рівнях інвалідизації хворих, порівнюючи з результатами контрольної групи.

Отже, визначення підвищеного рівня Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові є раннім і чутливим біомаркером РС, що може використовуватись вже в дебюті захворювання та при мініальному ступені інвалідизації хворих, коли діагностика РС є найважчою.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Інформація про внесок кожного автора

Негріч Н.О. — збирання й обробка матеріалів, аналіз отриманих даних, написання тексту.

Негріч Т.І. — концепція і дизайн дослідження, написання тексту.

Паєнок А.В. — концепція і дизайн дослідження, написання тексту.

Волошина Н.П. — концепція і дизайн дослідження, написання тексту.

Мироновський С.Л. — обробка матеріалів, написання тексту.

Кіт Ю.Я. — концепція і дизайн дослідження, написання тексту.

Стойка Р.С. — концепція і дизайн дослідження, написання тексту.

Список літератури

1. Волошин П.В., Волошина Н.П., Тайцлин В.И. и др. *Рассеянный склероз в Украине: распространенность, течение, прогноз, лечение, фармакоэкономика* // *Український вісник психоневрології*. — 2007. — № 15(1). — С. 6–21.
2. Соколова Л.И. *К вопросу о современных методах диагностики и лечения рассеянного склероза* // *Мед. вестник*. — 2008. — № 1. — С. 28–32.
3. Евтушенко С.К., Москаленко М.А. *Рассеянный склероз у детей*. — К., 2009. — 385 с.
4. Волошина Н.П., Левченко І.Л. *Фармакоеконімічне обґрунтування патогенетичного лікування розсіяного склерозу* // *Міжнародний неврологічний журнал*. — 2006. — № 4. — С. 91–98.
5. Orynychak L.B., Nehrych T.I. *Influence of body mass index and smoking on the course of multiple sclerosis in the population of Prykarpattia (Ukr)* // *Ukrainian Neurological Journal*. — 2014. — Vol. 3–4. — P. 36–41.
6. Virtanen J.O., Jacobson S. *Viruses and Multiple Sclerosis // CNS and neurological disorders drug targets*. — 2012. — Vol. 11(5). — P. 528–544. — PMID: 22583435.
7. Sotgiu S., Mameli G., Serra C. et al. *Multiple sclerosis-associated retrovirus and progressive disability of multiple sclerosis* // *Mult. Scler.* — 2010. — Vol. 16 — P. 1248–1251. — doi: 10.1177/1352458510376956.
8. Ryan F. *Human Endogenous Retroviruses in Multiple Sclerosis: Potential for Novel Neuro-Pharmacological Research* // *Current Neuropharmacology*. — 2011. — Vol. 9(2). — P. 360–369. — doi: 10.2174/157015911795596568.
9. Morandi E., Tanasescu R., Tarlinton R.E., Constantinescu C.S., Zhang W., Tench C., Gran B. *The association between human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis* // *PloS one*. — 2017. — Vol. 12(2). — P. e0172415. — doi: 10.1371/journal.pone.0172415.

10. Gifford R., Tristem M. *The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses* // *Virus genes*. — 2003. — Vol. 26. — P. 291-315. — PMID: 12876457.
11. Perron H., Garson J.A., Bedin F., Beseme F., Paranhos-Baccala G., Komurian-Pradel F. et al. *Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1997. — Vol. 94. — P. 7583-8. — PMID: 9207135.
12. Rolland A., Jouvin-Marche E., Saresella M. et al. *Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSRV (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis* // *J. Neuroimmunol.* — 2005. — Vol. 160. — P. 195-203. — doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.10.019.
13. Hon G.M., Erasmus R.T., Matsha T. *Multiple sclerosis-associated retrovirus and related human endogenous retrovirus-W in patients with multiple sclerosis: a literature review* // *Journal of neuroimmunology*. — 2013. — Vol. 263(1). — P. 8-12. — doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.08.005.
14. Dolei A., Garson J.A., Arru G., Clerici M., Germi R., Marche P.N., Perron H. *Multiple sclerosis-associated retrovirus and related human endogenous retrovirus-W in patients with multiple sclerosis* // *J. Neuroimmunol.* — 2014. — Vol. 266(1-2). — P. 87-88. — doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.11.009.
15. Rolland A., Jouvin-Marche E., Viret C. et al. *The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses* // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 176. — P. 7636-7644. — PMID: 16751411.
16. Perron H., Germi R., Bernard C. et al. *Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease* // *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. — 2012. — Vol. 18(12). — P. 1721-1736. — doi: 10.1177/1352458512441381.
17. Madeira A., Burgelin I., Perron H., Curtin F., Lang A.B. et al. *MSRV envelope protein is a potent, endogenous and pathogenic agonist of human toll-like receptor 4: relevance of GNBAC1 in multiple sclerosis treatment* // *Journal of neuroimmunology*. — 2016. — Vol. 291. — P. 29-38. — doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.12.006.
18. Antony J.M., Des Lauriers A.M., Bhat R.K., Ellestad K.K., Power C. *Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants?* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. — 2011. — Vol. 1812(2). — P. 162-176. — doi: 10.1016/j.bbadis.2010.07.016.
19. Curtin F., Lang A.B., Perron H., Laumonier M., Vidal V., Porchet H.C., Hartung H.P. *GNBAC1, a Humanized Monoclonal Antibody Against the Envelope Protein of Multiple Sclerosis-Associated Endogenous Retrovirus: A First-in-Humans Randomized Clinical Study* // *Clinical therapeutics*. — 2012. — Vol. 34(12). — P. 2268-2278. — doi: 10.1016/j.clinthera.2012.11.006.
20. Myronovkij S., Negrych N., Nehrych T., Tkachenko V., Souchelnyskiy S., Stoika R., Kit Y. *Identification of SER-PRO-CYS Peptide in Blood Serum of Multiple Sclerosis Patients* // *Protein and peptide letters*. — 2016. — Vol. 23(9). — P. 808-811. — doi: 10.2174/0929866523666160622215628.
21. Laufer G., Mayer J., Mueller B.F., Mueller-Lantzsch N. et al. *Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences* // *Retrovirology*. — 2009. — Vol. 6(1). — P. 37. — doi: 10.1186/1742-4690-6-37.
22. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B. et al. *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria* // *Ann. Neurol.* — 2011. — Vol. 69(2). — P. 292-302. — doi: 10.1002/ana.22366.
23. Kurtzke J.F. *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)* // *Neurology*. — 1983. — № 33(11). — P. 1444-52. — doi: 10.1212/WNL.33.11.1444.
24. Van Horsen J., Van der Pol S., Nijland P., Amor S., Perron H. *Human endogenous retrovirus W in brain lesions: Rationale for targeted therapy in multiple sclerosis* // *Multiple sclerosis and related disorders*. — 2016. — Vol. 8. — P. 11-18. — doi: 10.1016/j.msard.2016.04.006.
25. Duperray A., Barbe D., Raguene G., Weksler B.B., Romero I.A., Couraud P.O., Marche P.N. *Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4* // *International immunology*. — 2015. — Vol. 27(11). — P. 545-553. — doi: 10.1093/intimm/dxv025.

Отримано 02.01.2018 ■

Негрнич Н.О.¹, Негрнич Т.И.¹, Паенок А.В.¹, Волошина Н.П.², Мироновский С.Л.³, Кит Ю.Я.³, Стойка Р.С.³¹Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г. Львов, Украина²Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины, г. Харьков, Украина³Институт биологии клетки НАН Украины, г. Львов, Украина

Клиническая характеристика нового сывороточного биомаркера как потенциального продукта распада белка эндогенного ретровируса человека у больных рассеянным склерозом

Резюме. Целью работы было исследовать взаимосвязь между уровнем Ser-Pro-Cys пептида в сыворотке крови больных рассеянным склерозом (РС) и демографическими особенностями обследованных лиц, а также отдельными свойствами течения этого заболевания. **Материалы и методы.** В исследовании приняли участие 61 больной РС и 20 практически здоровых лиц в возрасте от 19 до 57 лет. Методы исследования: клинические — анализ жалоб, анамнеза заболевания и жизни, общий и неврологический осмотры; лабораторные — белки сыворотки крови последовательно осаждали трихлоруксусной (ТХУ) кислотой. Образовавшуюся ТХУ-растворимую фракцию подвергли высокоэффективной жидкостной хроматографии при длине волны 280 нм. С помощью двумерной

тонкослойной хроматографии и масс-спектрометрии был идентифицирован Ser-Pro-Cys олигопептид. **Результаты.** Выявлено достоверное отличие между средними значениями уровня Ser-Pro-Cys пептида в сыворотке крови больных РС различных возрастных и гендерных групп по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$). Однако не установлено достоверных различий в показателях уровня Ser-Pro-Cys пептида между больными РС мужчинами и женщинами. Независимо от характеристики неврологических проявлений и возраста дебюта заболевания во всех группах больных РС концентрация Ser-Pro-Cys пептида в сыворотке крови была выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Средние значения уровня Ser-Pro-Cys пептида в сыворотке крови

больных РС с разной длительностью заболевания и разной степенью инвалидности оказались значимо выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$). **Выводы.** Уровень Ser-Pro-Cys пептида был достоверно выше у больных РС уже даже в дебюте заболевания по сравнению со здоровыми добровольцами. Вероятно, высокие значения этого олигопептида в сыворотке крови больных РС сохранялись в течение всей продолжительности развития заболевания, а также при

всех уровнях инвалидизации больных по сравнению с результатами контрольной группы. Выявленные закономерности согласуются с данными литературы в пользу провоспалительной и миелинотоксичной функций белка эндогенного вируса человека типа W, вероятным фрагментом которого является выделенный нами Ser-Pro-Cys пептид.

Ключевые слова: рассеянный склероз; эндогенный ретровирус; биомаркер; Ser-Pro-Cys пептид

N.O. Negrych¹, T.I. Nehrych¹, A.V. Payenok¹, N.P. Valoshyn², S.L. Myronovskij³, Yu.Ya. Kit³, R.S. Stoika³

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

²Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

³Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, Ukraine

Clinical profile of a new serum biomarker as a potential product of endogenous human retroviral protein degradation in patients with multiple sclerosis

Abstract. Background. The purpose of the study was to investigate the relationship between the level of Ser-Pro-Cys peptide in the blood serum of patients with multiple sclerosis (MS) and the demographic characteristics of the examined patients, as well as the features of the disease. **Materials and methods.** 61 patients with multiple sclerosis and 20 healthy individuals aged 19–57 years participated in the research. Methods of investigation: clinical — analysis of complaints, history of disease and life, general and neurological examinations; laboratory — the serum proteins were successively precipitated with trichloroacetic acid (TCA). The generated TCA-extracted fraction was subjected to high-performance liquid chromatography at a wavelength of 280 nm. Using the two-dimensional thin-layer chromatography and mass spectrometry, Ser-Pro-Cys oligopeptide was identified. **Results.** A significant difference was found between the mean Ser-Pro-Cys peptide serum level in patients with MS of various age and gender groups compared to the control group ($p < 0.01$). Instead, there were no significant differences in Ser-Pro-Cys peptide serum level between males and

females with MS. Regardless of the characteristics of the neurological manifestations and the age of disease onset, in all groups of patients with MS, Ser-Pro-Cys peptide serum concentration was higher compared to the control group ($p < 0.05$). The mean Ser-Pro-Cys peptide serum level in MS patients with different duration of the disease and with varying degrees of disability was significantly higher compared to the control group ($p < 0.01$). **Conclusions.** Ser-Pro-Cys peptide level was significantly higher in patients with MS even at the disease onset, compared to the healthy volunteers. Significantly higher values of this oligopeptide in thy blood serum of MS patients were maintained throughout the all duration of the disease, as well as at all levels of patients' disability, compared to the results of the control group. The revealed patterns correlate with the literature data in favor of the pro-inflammatory and myelinotoxic functions of the human endogenous retrovirus W, the probable fragment of which is the Ser-Pro-Cys peptide that we have isolated.

Keywords: multiple sclerosis; endogenous retrovirus; biomarker; Ser-Pro-Cys peptide