



Н. О. НЕГРИЧ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ser-Pro-Cys-пептид як біологічний маркер розсіяного склерозу та його активності

Мета — дослідити взаємозв'язок між рівнем Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові хворих на розсіяний склероз (РС) та особливостями клінічного перебігу цього захворювання в контексті сучасного уявлення про роль ретровірусів у розвитку патологічного процесу при РС.

Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 61 хворий на РС та 20 практично здорових осіб віком від 19 до 57 років. Проведено аналіз скарг, анамнезу захворювання та життя, загальний і неврологічний огляди. Ідентифікували Ser-Pro-Cys-пептид у сироватці крові за допомогою двовимірної тонкошарової хроматографії та мас-спектрометрії.

Результати. У всіх хворих на РС виділили Ser-Pro-Cys-пептид, тоді як в жодного обстеженого з контрольної групи його не виявлено. Рівень Ser-Pro-Cys-пептиду був високим при всіх типах перебігу захворювання і навіть у дебюті захворювання. Що більшою була загальна кількість загострень захворювання, то більшою була концентрація Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові.

Висновки. Виявлення Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові є високоспецифічною діагностичною ознакою РС. Висока активність захворювання у хворих з великим вмістом досліджуваного пептиду узгоджується з інформацією про прозапальну та мієлінотоксичну дію білка ендогенного ретровірусу людини типу W, ймовірним фрагментом якого є виділений нами Ser-Pro-Cys-пептид.

Ключові слова: розсіяний склероз, біомаркери, клінічний перебіг, ретровірус, Ser-Pro-Cys-пептид.

Розсіяний склероз (РС) — автоімунне запальне захворювання центральної нервової системи (ЦНС), яке характеризується ушкодженням мієлінової оболонки та дегенерацією аксонів [3]. РС — одна з основних причин інвалідизації молодих людей у світі [1]. РС призводить до значних матеріальних витрат і належить до соціальних захворювань [3].

Етіологія РС залишається невідомою. Загальноприйнятою думкою є те, що це мультифакторне, полігенне захворювання, виникнення якого, ймовірно, пов'язане з поєднанням генетичного та вірусного чинників і певних чинників довкілля [2].

Хоча роль вірусів у розвитку РС не доведено, вони становлять певний інтерес для науковців. Це пов'язано із частішим виявленням певних вірусів у хворих на РС порівняно із загальною популяцією [4] і встановленням наявності кореляційного

зв'язку між їх виявленням та агресивнішим перебігом захворювання [15].

Герпесвіруси — найбільш досліджені ймовірні учасники етіопатогенезу РС [15]. Триває пошук нових чинників, які б змогли заповнити прогалини в розумінні етіології, патогенезу та клінічного перебігу цього захворювання.

За результатами дослідження сироватки хворих на РС нами було виділено та ідентифіковано Ser-Pro-Cys-пептид [8]. Аналіз доступних баз даних засвідчив відсутність даних про виділення цього олігопептиду з крові людей. Однак така послідовність амінокислот характерна для різних білків. Зокрема вона описана для СООН-терміналі білка, який кодується Hq22.3 геном ендогенного ретровірусу людини типу W (EPVЛ-W) [6]. Таким чином, виділений нами Ser-Pro-Cys-пептид, ймовірно, є продуктом розпаду поверхневого білка EPVЛ-W у вогнищах запалення в ЦНС у хворих на РС.

© Н. О. Негрич, 2017

Ендогенні ретровіруси людини належать до родини ретровірусів, які здатні вбудовувати власний геном у геном людини завдяки наявності ферменту РНК-залежної ДНК-полімерази (зворотної транскриптази) [14], тому близько 1% геному людини має вірусне походження [13]. Два представники цієї родини мають важливе значення при РС, а саме: РС-асоційований ретровірус (PCAPV) та ЕРВЛ-W. Деякі автори вважають, що PCAPV є позаклітинною вірусною часткою ЕРВЛ-W [11]. Цих представників родини ретровірусів статистично значущо частіше виділяли у хворих на РС: PCAPV — у 59,3—100,0% хворих на РС і 0—48,1% здорових добровольців, ЕРВЛ-W — у всіх хворих на РС, тоді як у здорових осіб його не було [9]. Виявлення великої кількості копій ДНК ендогенних ретровірусів методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) асоціювалося з наявністю прогресивних форм клінічного перебігу захворювання (первинно-прогресивного та вторинно-прогресивного РС) [14]. Установлено, що віріони PCAPV та ЕРВЛ-W, зокрема їх оболонкові білки, володіли вираженою прозапальною та суперантигенною імунною дією [11].

Таким чином, унаслідок неправильної активації вродженої імунної системи ендогенними ретровірусами, ймовірно, виникають сприятливі умови для розвитку низки нейрозапальних захворювань, опосередкованих взаємодією цих вірусів з Toll-подібним рецептором 4 (TLR4) і CD14-корцептором [12]. TLR4 — один із основних образ-розпізнавальних рецепторів, які відіграють центральну роль в ініціації вродженого імунітету проти мікробних патогенів. TLR4 активуються в гліальних клітинах та лімфоцитах, які проникли в ЦНС, у відповідь на запалення, спричинене інфекційними агентами, травмою тканин або автоімунним процесом. Активований TLR4 здійснює виражений інгібувальний вплив на ріст клітин-попередників олігодендроцитів (головних продуцентів мієліну) [12].

Тривають два міжнародних рандомізованих клінічних дослідження ефективності застосування моноклональних антитіл проти компонентів PCAPV у хворих на РС [7].

Мета роботи — вивчити зв'язок між рівнем Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові хворих на розсіяний склероз та особливостями клінічного перебігу цього захворювання в контексті сучасного уявлення про роль ретровірусів у розвитку патологічного процесу при розсіяному склерозі.

Матеріали і методи

Роботу виконано на кафедрі неврології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та у Львівському обласному науковому центрі з вивчення проблем РС та інших демієлінізувальних захворювань, розташованому на базі Львівської обласної клінічної лікарні.

Дослідження ґрунтувалося на положеннях Гельсінкської декларації. Комісією з питань біомедич-

ної етики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 2 від 15 лютого 2016 р.) встановлено, що наукова робота відповідає етичним та морально-правовим вимогам згідно з наказом МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. Від усіх учасників дослідження було отримано письмову інформовану згоду на участь у ньому.

Критерії залучення пацієнтів: вік від 18 до 60 років, верифікований діагноз РС згідно з критеріями МакДональда (2010) [10], відсутність застосування препаратів хіміотерапії чи цитостатиків за останні 6 міс, згода хворого на участь у дослідженні. Критерії вилучення: вік менше 18 років та понад 60 років, наявність супутніх захворювань, прийом препаратів хіміотерапії /цитостатиків протягом останніх 6 міс, вагітність.

У дослідженні взяв участь 61 хворий на РС віком від 19 до 57 років (середній вік — $(36,6 \pm 1,4)$ року). Співвідношення жінок до чоловіків — 2,4 : 1,0. Жінок було 43 (70,5%) віком від 19 до 57 років (середній вік — $(37,0 \pm 1,6)$ року), чоловіків — 18 (29,5%) віком від 20 до 52 років (середній вік — $(35,8 \pm 2,6)$ року).

Проведено аналіз скарг, анамнезу захворювання та життя, детальний соматичний та неврологічний огляди з оцінкою ступеня інвалідизації за шкалою EDSS Куртцке [5].

Білки сироватки крові послідовно осаджували трихлороцтовою кислотою [8]. Утворену розчинну фракцію піддавали високоефективній рідинній хроматографії при довжині хвилі 280 нм. Ідентифікували хроматографічний пік, який містив компоненти низької молекулярної маси (300—500 Да). Використання двовимірної тонкошарової хроматографії та мас-спектрометрії дало змогу визначити, що отримана речовина є олігопептидом з характерною послідовністю амінокислот, яка відповідає Ser-Pro-Cys-пептиду.

Застосовували також інструментальні методи обстеження — магнітно-резонансну томографію головного та/або спинного мозку (лише для діагностики РС).

Статистичну обробку отриманих результатів проведено за допомогою програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc.). Характер розподілу варіаційних рядів було перевірено за допомогою критерію Шапіро — Франсія. Установлено правильний характер розподілу даних.

Розраховували середнє арифметичне та його похибку ($M \pm m$), оцінювали статистичну значущість різниці результатів у порівнюваних групах (за критерієм Стьюдента). Різницю визнавали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Визначили рівень Ser-Pro-Cys-пептиду у сироватці крові хворих на РС та порівняли результати з показниками контрольної групи. Порівняння груп об-

стежених показало, що середній рівень Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові виявився статистично значущо ($p < 0,01$) вищим у хворих на РС порівняно з контрольною групою (відповідно $(0,33 \pm 0,03)$ та $(0,00 \pm 0,00)$ мкг/мл). З огляду на те, що виділення Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові ймовірно, пов'язане із виявленням продуктів деградації поверхневого ЕРВЛ-W, а також те, що в жодної особи із контрольної групи не виділено цей олігопептид, можна припустити, що Ser-Pro-Cys-пептид, а, відповідно, і зазначений вірус, є високоспецифічним для РС. Факт виявлення ЕРВЛ-W винятково у хворих на РС узгоджується з даними літератури [9].

Проведено аналіз середніх значень рівня Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові обстежених залежно від типу перебігу захворювання: при рецидивно-ремітивному типі ($n = 50$) досліджуваний показник становив $(0,30 \pm 0,03)$ мкг/мл ($p < 0,01$ порівняно з контрольною групою), при вторинно-прогресивному ($n = 7$) — $(0,55 \pm 0,20)$ мкг/мл ($p < 0,05$ порівняно з контрольною групою), у дебюті захворювання ($n = 3$) — $(0,21 \pm 0,10)$ мкг/мл. Навіть у дебюті РС спостерігали статистично значущо вищий рівень Ser-Pro-Cys пептиду порівняно з практично здоровими особами ($p < 0,01$). Протягом подальшого перебігу захворювання (на стадії рецидивно-ремітивного та вторинно-прогресивного перебігу) концентрація Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові хворих залишалася вищою порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$). Ця залежність узгоджується з припущенням про ймовірний тригерний/кофакторний вплив ЕРВЛ-W на патолофізіологію РС [9].

Дослідження залежності концентрації Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові хворих на РС від клінічних ознак активності захворювання (фази загострення чи ремісії) показало, що при загостренні ($n = 38$) цей показник у середньому становив $(0,37 \pm 0,05)$ мкг/мл, при ремісії ($n = 23$) — $(0,26 \pm 0,04)$ мкг/мл. Концентрація Ser-Pro-Cys пептиду в сироватці крові хворих на РС в стадії як загострення, так і ремісії, була статистично значущо більшою порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$), при загостренні РС рівень досліджувано-

го білка, хоча і був вищим порівняно з таким при неактивній стадії розвитку, але відмінність не досягала статистичної значущості.

Проаналізували залежність концентрації Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові хворих на РС від загальної кількості загострень цього захворювання. За кількістю загострень хворих розподілили на три групи: до 5 ($n = 44$), 5—9 ($n = 3$), 10 та більше ($n = 14$) загострень в анамнезі. Отримано такі дані — $(0,26 \pm 0,02)$, $(0,41 \pm 0,10)$ і $(0,51 \pm 0,12)$ мкг/мл відповідно. Навіть при малій загальній кількості загострень РС (≤ 5) концентрація досліджуваного пептиду в сироватці крові обстежених виявилася статистично значущо більшою порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$). Зі збільшенням кількості загострень захворювання спостерігали збільшення вмісту Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові. Так, у групі з найбільшою кількістю загострень (≥ 10) концентрація цього пептиду була значущо більшою порівняно з групою, де кількість загострень РС була найменшою ($p < 0,05$). Отже, що активнішим є клінічний перебіг РС, то вищим є рівень Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові хворих, що вказує на важливе діагностично-прогностичне значення цього показника як біомаркера активності РС. Це узгоджується з даними літератури [10] про прозапальні та мієлінотоксичні властивості білка ЕРВЛ-W, ймовірним фрагментом якого є виділений нами Ser-Pro-Cys-пептид.

Висновки

Установлено, що виявлення Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові обстежених осіб — високоспецифічна рання діагностична ознака РС. Характерно, що в усіх обстежених нами хворих виділено цей олігопептид, тоді як у жодного обстеженого з контрольної групи його не виявлено. Рівень досліджуваного олігопептиду був статистично значущо вищим у хворих на РС навіть у дебюті захворювання та при всіх типах його перебігу порівняно з результатами контрольної групи. Що вищою була активність захворювання, то більшою була концентрація Ser-Pro-Cys-пептиду в сироватці крові.

Конфлікту інтересів немає.

Література

1. Волошин П. В., Волошина Н. П., Тайцлин В. И., и др. Рассеянный склероз в Украине: распространенность, течение, прогноз, лечение, фармакоэкономика // Укр. вісн. психоневрол. — 2007. — № 15 (1). — С. 6—21.
2. Оринчак Л. Б., Негрич Т. І. Вплив індексу маси тіла та куріння на перебіг розсіяного склерозу у населення Прикарпаття // Укр. неврол. журн. — 2014. — № 3—4. — С. 36—41.
3. Соколова Л. И. К вопросу о современных методах диагностики и лечения рассеянного склероза // Мед. вестн. — 2008. — № 1. — С. 28—32.
4. Krone B., Grange J.M. Multiple Sclerosis: Are Protective Immune Mechanisms Compromised by a Complex Infectious Background? // Autoimmune Diseases. — 2011. — Vol. 2011. — P. 708—750.
5. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) // Neurol. — 1983. — Vol. 33 (11). — P. 1444—1452.
6. Laufer G., Mayer J., Mueller B. F., Mueller-Lantsch N. et al. Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences // Retroviro. — 2009. — Vol. 6 (1). — P. 37.
7. Madeira A., Burgelin I., Perron H. 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 // J. Neuroimmunol. — 2016. — Vol. 291. — P. 29—38.

8. Myronovkij S., Negrych N., Nehrych T. et al. Identification of SER-PRO-CYS Peptide in Blood Serum of Multiple Sclerosis Patients // Protein and Peptide Letters. — 2016. — Vol. 23 (9). — P. 808—811.
9. Perron H., Germe 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Ryan F. Human endogenous retroviruses in multiple sclerosis: potential for novel neuro-pharmacological research // Current Neuropharmacol. — 2011. — Vol. 9 (2). — P. 360—369.
14. 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.
15. Virtanen J. O., Jacobson S. Viruses and Multiple Sclerosis // CNS Neurol. Dis. Drug Targets. — 2012. — Vol. 11 (5). — P. 528—544.

Н. О. НЕГРИЧ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ser-Pro-Cys пептид как биологический маркер рассеянного склероза и его активности

Цель — исследовать взаимосвязь между уровнем Ser-Pro-Cys-пептида в сыворотке крови больных рассеянным склерозом (РС) и особенностями клинического течения этого заболевания в контексте современного представления о роли ретровирусов в развитии патологического процесса при РС.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 61 больной РС и 20 практически здоровых лиц в возрасте от 19 до 57 лет. Проведен анализ жалоб, анамнеза заболевания и жизни, общий и неврологический осмотры. Идентифицировали Ser-Pro-Cys-пептид в сыворотке крови с помощью двухмерной тонкослойной хроматографии и масс-спектрометрии.

Результаты. У всех больных РС выделили Ser-Pro-Cys-пептид, тогда как ни у одного из обследованных из контрольной группы его не обнаружили. Уровень Ser-Pro-Cys-пептида был высоким у больных РС при всех типах течения заболевания и даже в дебюте заболевания. Чем большим было общее количество обострений болезни, тем выше была концентрация Ser-Pro-Cys-пептида в сыворотке крови.

Выводы. Выявление Ser-Pro-Cys-пептида в сыворотке крови — высокоспецифический диагностический признак РС. Высокая активность заболевания у больных с большим содержанием исследуемого пептида согласуется с информацией о провоспалительном и миелинотоксическом действии белка эндогенного ретровируса человека типа W, вероятным фрагментом которого является выделенный нами Ser-Pro-Cys-пептид.

Ключевые слова: рассеянный склероз, биомаркеры, клиническое течение, ретровирус, Ser-Pro-Cys-пептид.

N. O. NEGRYCH

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

Ser-Pro-Cys peptide as a biological marker of multiple sclerosis and its activity

Objective — to investigate the correlation between the level of Ser-Pro-Cys peptide of patients with multiple sclerosis (MS) and the clinical course of this disease, in terms of modern perception of retroviruses impact on the development of the pathological process in MS.

Methods and subjects. The study involved 61 MS patients and 20 healthy individuals aged from 19 to 57 years. Methods of research: clinical — analysis of complains, history anamnesis, general and neurological examinations. Ser-Pro-Cys peptide was identified in the blood serum by using two-dimensional thin-layer chromatography and mass-spectrometry.

Results. Ser-Pro-Cys peptide was excreted in 100% of MS patients, while nobody from the control group had it. The level of the investigated peptide was significantly higher in MS patients even at the disease onset and was held high in all types of disease course, comparing with the results of the control group. At the same time, it has been established that the greater total number of disease relapses was, the higher the concentration of Ser-Pro-Cys peptide in the serum of MS patients was.

Conclusions. The detection of Ser-Pro-Cys peptide in the blood serum of examined individuals is a highly specific diagnostic sign of MS. High activity of the disease in patients with a significant level of this peptide correlates with the information about proinflammatory and myelintoxic activities of the human endogenous retrovirus-W protein, the probable fragment of which is identified as Ser-Pro-Cys peptide.

Key words: multiple sclerosis, biomarkers, clinical course, retrovirus, Ser-Pro-Cys peptide.