

ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОГО СПЕКТРА ПЛАЗМЫ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С, ПОЛУЧАЮЩИХ МОДИФИЦИРОВАННУЮ АУТОГЕМОТЕРАПИЮ

Амбалов Ю.М., Донцов Д.В., Романова Е.Б., Карташев В.В.

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, e-mail: d_dontcov@mail.ru

Цель работы: изучить у больных хроническим гепатитом С (ХГС) механизмы гемопоэтической активности биохимических компонентов гемолизата аутокрови (ГАК). **Материалы и методы:** проведена непрямая MALD-TOF-масс-спектрометрия плазмы крови у 37 больных ХГС, получавших ГАК. **Исследование** было выполнено дважды: непосредственно перед назначением аутогемотерапии и спустя 10 дней ежедневного внутривенного введения 20,0 мл ГАК. **Результаты:** удалось выделить в плазме крови более 300 полипептидных последовательностей. При этом в результате внутривенного введения 20,0 мл ГАК частота встречаемости ИЛ-1 β , ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-11 и эритроферрона достоверно повысилась, а ИЛ-10 и ИЛ-13, наоборот, снизилась. **Выводы:** выявленные изменения протеомного профиля плазмы крови в сторону преобладания белков, стимулирующих гемопоэз, по всей вероятности, и обуславливают клиническую эффективность ГАК.

Ключевые слова: хронический гепатит С, противовирусная терапия, гематологические осложнения, гемолиз.

CHANGES PROTEIN SPECTRUM OF BLOOD PLASMA IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C, THE MODIFIED AUTOHAEMOTHERAPY

Ambalov I.M., Dontsov D.V., Romanova E.B., Kartashev V.V.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, e-mail: d_dontcov@mail.ru

Purpose: To study in patients with chronic hepatitis C the pathogenesis hematopoietic activities of autologous blood hemolysate. **Materials and methods:** We made an indirect MALD-TOF-mass spectrometry of blood plasma in 37 patients with chronic hepatitis C who received the autologous blood hemolysate. The study was performed twice: before autohemotherapy and after 10 days of daily intravenous injections of 20.0 ml of the autologous blood hemolysate. **Results:** succeeded in isolating a blood plasma over 300 polypeptide sequence. Thus, as a result of intravenous administration of 20.0 ml autologous blood hemolysate frequency of IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-9, IL-11 and erythropherron significantly increased and the IL-10 and IL-13, by contrast, dropped. **Summary:** Identification of proteomic changes in the profile of blood plasma in the predominance of proteins that stimulate hematopoiesis probably accounts for the clinical effectiveness of the autologous blood hemolysate.

Keywords: chronic hepatitis C antiviral therapy, hematologic complications, hemolysis.

Хронический гепатит С (ХГС) относится к числу наиболее распространенных инфекционных заболеваний человека и характеризуется высокой частотой развития цирроза и первичного рака печени [7; 8]. Обладая, в первую очередь, гепатотропным действием, вирус гепатита С (HCV) способен, тем не менее, персистировать и в клетках кроветворного микроокружения костного мозга, что способствует их ускоренному апоптозу, снижению пролиферативной активности и развитию ряда цитопенических синдромов системы крови [1; 3]. Вышеуказанные изменения у лиц, страдающих ХГС, вполне возможно, могут иметь определяющее значение и в развитии гематологических осложнений комбинированной противовирусной терапии (КПТ) хронической HCV-инфекции [6].

В настоящее время на кафедре инфекционных болезней РостГМУ выполнен ряд исследований, направленных на разработку эффективного способа предупреждения и снижения тяжести КПТ-ассоциированных анемии, нейтро- и тромбоцитопении у больных

ХГС (Патенты РФ на изобретения № 2568593, 2568894, 2578409). В основу вышеуказанного способа легло использование модифицированной аутогемотерапии, предусматривающей внутривенное введение пациентам 20,0 мл гемолизата аутокрови (ГАК).

В процессе обзора научной литературы по интересующей нас тематике было обнаружено, что во второй половине XX века сотрудниками Центрального института гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения СССР было доказано, что внутривенное введение гемолизата неизменно сопровождается повышением гемопоэтической активности сыворотки крови [4; 5]. Однако механизм действия этого феномена изучен, к сожалению, далеко не полностью.

Получив и в нашей работе вполне убедительные данные клинической эффективности ГАК, мы, конечно же, заинтересовались патогенетическим аспектом его влияния на систему крови, что и явилось побудительным мотивом к выполнению настоящего исследования.

Цель исследования: на основе данных, полученных в ходе непрямой MALD-TOF-масс-спектрометрии плазмы крови, установить механизмы гемопоэтической активности биохимических компонентов ГАК у больных ХГС.

Материалы и методы. У 37 больных ХГС, получающих внутривенно 20,0 мл ГАК по разработанной методике, была выполнена непрямая MALD-TOF-масс-спектрометрия плазмы крови. Необходимым условием при этом являлось письменное информированное согласие пациентов на участие в исследовании. Непрямая MALD-TOF-масс-спектрометрия проводилась дважды: непосредственно перед назначением аутогемотерапии и спустя 10 дней ежедневного внутривенного введения 20,0 мл ГАК.

Селективное выделение фракции белков из плазмы крови выполняли с помощью магнитных гранул, входящих в набор реактивов Profiling Kit MB-IMAC Cu (Bruker Daltonics, Германия). В качестве матрицы для выделенных белков использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту (Sigma, США). Работа проводилась на масс-спектрометре Autoflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия) с установленными параметрами: для ионного источника – 19 кВ и напряжение на рефлекторе – 20 кВ. Для каждой точки на мишени накапливалось 3000 спектров в ручном режиме. Для получения и анализа масс-спектров использовали программы FlexControl версии 2,4 (Bruker Daltonics, Германия) и FlexAnalysis версии 2,4 (Bruker Daltonics, Германия). Для идентификации белков использовали программу BioTools версии 3.0 (Bruker Daltonics, Германия). По масс-листу белков производился поиск по локальной швейцарской базе данных Swiss-prot с использованием локальной версии программы Mascot Search версии 2,2,06. Были использованы параметры поиска: точность определения массы 70 миллионных долей,

белковой базы данных NCBI, таксон «Homo sapiens», одно пропущенное расщепление и модификации окисления метионинов.

Результаты идентификации белков принимались как достоверные при $p < 0,05$ и показателе перекрытия последовательности $\geq 50\%$. При анализе пептидных паттернов (m/z-пики) учитывали особенности характеристик матрицы и разрешающую способность прибора и метода в целом. Статистическая обработка полученных данных была проведена в пакете STATISTICA 10.

Результаты. В ходе протеомного анализа плазмы крови у наблюдавшихся пациентов было выделено более 300 белков. Воспользовавшись единой международной базой данных полипептидных последовательностей – UniProt (<http://www.uniprot.org/>), мы сочли возможным все выявленные молекулярные профили дифференцировать в ряд функциональных групп:

1. Белки, регулирующие процессы кроветворения (интерлейкин (ИЛ) -1 β , ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, эритропоэтин (ЕРО), эритроферрон, колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF), гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), тромбопоэтин (ТНРО), фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), C-C motif chemokine-21, RhoB-2).

2. Белки, участвующие в воспалительных реакциях организма, обеспечивающие антигенспецифический и антигеннеспецифический иммунный ответ, а также белки, обладающие антимикробной активностью (ИФН- α , ИФН- β , ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-37, β 2-микроглобулин, β -дефензины 1-17, β -дефензины 25-76, β -дефензины 103-124, С-реактивный белок, Caspase-1, Complement factors C1-C9, Complement factor B, Complement factor D, Complement factor I, Complement factor P (пропердин), Complement factor H-related protein-3, C-C motif chemokine-21, Ficolin-1, Ficolin-2, HMW-kininogen 4E-3, Interleukin-1 R-associated kinase-1, Lysozyme C, Mannan-binding lectin serine protease-1, Mannan-binding lectin serine protease-2, C-C motif chemokine-4, C-C motif chemokine-21, C-X-C motif chemokine-11, Phagocytosis-stimulating peptide, Liver-expressed antimicrobial peptide-2, Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C, CDC42 small effector protein-2).

3. Белки, выполняющие роль специфических рецепторов (R) поверхностной мембраны форменных элементов крови (поверхностные гликопротеины (GP) CD1a, CD3, CD4, CD8, CD13, CD14, CD16, CD20, CD23, CD25, CD29, CD33, CD56, CD95, CD118-CD121, CD41a, CD42b; Platelet's GPIa, GPIb β -chain, GPIX; Complement component R-C1q, Complement R type 2, Transferrin R protein-1, Transferrin R protein-2).

4. Белки - участники реакций внутриклеточного метаболизма (аннексин А1, аннексин А4, глутатион-S-трансфераза, кальпаин-11, матриксная металлопротеиназа-9, матриксная металлопротеиназа-14, ADP-ribosylation factor-like protein-1, Aspartate aminotransferase cytoplasmic, Aspartate aminotransferase mitochondrial, ATP-synthase proteins 1-8, α -2-macroglobulin, CDC42 small effector protein-2, Ceruloplasmin, Cystatin-B, Cytochrome b-c1 complex subunit-10, Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske mitochondrial, Cytochrome c oxidase subunit 6C, Cytochrome c1 heme protein mitochondrial, Group IID secretory phospholipase A2, Fructose-bisphosphate aldolase A, Fructose-bisphosphate aldolase C, Growth factor R-bound protein-7, Hemoglobin subunit- α , Hemoglobin subunit- β , Mitochondrial enolase superfamily member-1, Peroxiredoxin-1, Peroxiredoxin-4, Peroxiredoxin-5 mitochondrial, Peroxiredoxin-6, Serine protease hepsin, TP53-regulated inhibitor of apoptosis, 4-aminobutyrate aminotransferase mitochondrial, 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase mitochondrial, 40S ribosomal protein S27, 60S ribosomal proteins L34-L38).

5. Белки - транскрипционные факторы, регулирующие активность ядра и митотическое деление клетки (Anaphase-promoting complex subunit-11, AT-rich interactive domain-containing protein 4B, Centrosomal protein of 55 kDa, Centrosomal protein of 192 kDa, Chromodomain-helicase-DNA-binding protein-5, Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 β , Erythroid transcription factors GATA1 and GATA2, Fer3-like protein, General transcription factor III subunit-2, RecQ-mediated genome instability protein-2, Ribonuclease-8, Ribonuclease-like protein-12, Small nuclear ribonucleoprotein G-like protein, Transcription initiation factor IIA subunit-1, Transcription factor 7-like 2).

6. Белки свертывающей и антисвертывающей систем крови (α -, β - и γ -цепи фибриногена, протромбин, Coagulation factor III (тканевой тромбопластин), Coagulation factor VII (проконвертин), Coagulation factor VIII (антигемофильный глобулин А), Coagulation factor IX (антигемофильный фактор В, фактор Кристмаса), Coagulation factor XI (антигемофильный фактор С), Coagulation factor XII (фактор Хагемана), Coagulation factor XIII (фибринстабилизирующий фактор), Anoctamin-6, Fibronectin-1, HMW-kininogen-2, HMW-kininogen-5, Hyaluronan-binding protein-2, Kallikrein-5, von Willebrand factor, аннексин А5, аннексин А7-А9, плазминоген, тромбомодулин, Antithrombin-III, Vitamin K-dependent protein C, Plasma protease C1 inhibitor, Plasma serine protease inhibitor).

7. Транспортные белки плазмы крови (сывороточный альбумин, афамин, серотрансферрин, транскортин, транстиретин, транскобаламин-2, аполипопротенины А-I, А-II, С-I, С-II, D, E).

8. Белки, регулирующие процессы свободнорадикального окисления, детоксикации и элиминации (глутатионпероксидаза-3, глутатион-S-трансфераза, супероксиддисмутаза-3,

Metallothionein-1A, Peroxiredoxin-1, Peroxiredoxin-5 mitochondrial, Peroxiredoxin-6, Putative metallothionein MT1DP).

9. Белки, регулирующие ангиогенез, активность рецепторных структур эндотелия и тонус сосудов (Adiponectin, Angiopoietin-1, Angiopoietin-related protein-4, Angiopoietin-related protein-6, B1 bradykinin R, B2 bradykinin R, Cadherin-1, CUB and EGF-like domain-containing protein-1, HMW-kininogen 4A, HMW-kininogen 4B, Kallikrein-5, Platelet-derived growth factor R- β , Relaxin-3 R-2 и др.).

10. Белки, обладающие системным действием, либо реализующие свои основные биологические эффекты в различных органах и тканях (Adipolin, ADP-ribosylation factor-like protein 13B, Anoctamin-6, Antileukoproteinase, α -1-antitrypsin, Cardiac phospholamban, Claudin-15, Cystatin-A, Cystatin-SN, α -enolase, β -enolase, γ -enolase, Epidermal growth factor R kinase substrate 8-like protein-2, Fibroblast growth factor-binding protein-1, Fibronectin-1, Follitropin subunit- β , FXYD domain-containing ion transport regulator-3, Fructose-bisphosphate aldolase C, Haptoglobin, Keratin-associated protein 22-1, Late cornified envelope protein 5A and 6A, Ly-6/neurotoxin-like protein-1, Myotonin-protein kinase, Neuropeptide FF, Oxytocin-neurophysin-1, Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase, Phospholemman, Plasma protease C1 inhibitor, Plasma serine protease inhibitor, Probetacellulin, Prokineticin-2, Prostate and testis expressed protein-2, Prostate stem cell antigen, Putative keratin-associated protein20-4, Putative keratinocyte growth factor-like protein-1, Ras-related protein Rap-2a, Serine protease inhibitor Kazal-type-4, Sperm acrosome membrane-associated protein-4, Tachykinin-3, Tollid-like protein-1, Tollid-like protein-2, Trefoil factors-1-3, Tyrosine-protein kinase ABL1 и др.).

11. Белки, функция которых является пока малоизученной (Uncharacterized protein C4orf3, Uncharacterized protein C7orf66, Uncharacterized protein C9orf57, Uncharacterized protein C9orf78, Uncharacterized protein KIAA0195, Uncharacterized protein KIAA1109, U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4, CP protein, Cysteine-rich tail protein-1, DC-STAMP domain-containing protein-1, FXYD domain-containing ion transport regulator-7, GLIPR1-like protein-2, Glycoprotein hormones α -chain, GLIPR1-like protein-2, IQ domain-containing protein F6, MORN repeat-containing protein-2, Protein FAM19A1, Protein HIDE1, Protein WFDC10B, Putative cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-like protein, Putative phosphoserine phosphatase-like protein, Putative uncharacterized protein C1orf180, Putative uncharacterized protein FLJ42147, Putative uncharacterized protein MLLT4-AS1, Ret finger protein-like 1, Ret finger protein-like 3, Signal peptide CUB and EGF-like domain-containing protein-2, TOMM20-like protein-1, WAP four-disulfide core domain protein 10A, Zinc finger protein-706 и др.).

Учитывая поставленную задачу: расшифровать у больных ХГС основные механизмы гемопэтической активности ГАК, было вполне естественным, что среди всего многообразия обнаруженных белковых последовательностей нас прежде всего интересовали те, которые оказывают регулирующее влияние на процессы кроветворения. В связи с этим мы изучили частоту встречаемости ИЛ-1 β , ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ЕРО, эритроферрона, G-CSF, GM-CSF, ТНРО, ФНО- α , С-С motif chemokine-21 и Rhombotin-2, выделенных в плазме крови наблюдавшихся пациентов непосредственно перед проведением аутогемотерапии и спустя 10 дней ежедневного внутривенного введения 20,0 мл ГАК (таблица).

Частота встречаемости белков-регуляторов гемопэза в плазме крови больных ХГС перед началом и через 10 дней проведения аутогемотерапии

Исследуемый показатель	Частота признака, n (%)		p
	перед началом аутогемотерапии (n=37)	через 10 дней проведения аутогемотерапии (n=37)	
ИЛ-1 β	21 (56,8 \pm 8,1)	35 (94,6 \pm 3,7)	<0,001
ИЛ-3	14 (37,8 \pm 8,0)	31 (83,8 \pm 6,1)	<0,001
ИЛ-4	17 (45,9 \pm 8,2)	13 (35,2 \pm 7,9)	>0,05
ИЛ-5	15 (40,5 \pm 8,1)	14 (37,8 \pm 8,0)	>0,05
ИЛ-6	13 (35,2 \pm 7,9)	28 (75,7 \pm 7,1)	<0,001
ИЛ-7	19 (51,4 \pm 8,2)	23 (62,2 \pm 8,0)	>0,05
ИЛ-9	17 (45,9 \pm 8,2)	29 (78,4 \pm 6,8)	<0,01
ИЛ-10	24 (64,9 \pm 7,8)	11 (29,7 \pm 7,5)	<0,01
ИЛ-11	16 (43,2 \pm 8,1)	31 (83,8 \pm 6,1)	<0,001
ИЛ-12	10 (27,0 \pm 7,3)	11 (29,7 \pm 7,5)	>0,05
ИЛ-13	18 (48,6 \pm 8,2)	9 (24,3 \pm 7,1)	<0,05
ИЛ-14	7 (18,9 \pm 6,4)	8 (21,6 \pm 6,8)	>0,05
ЕРО	23 (62,2 \pm 8,0)	30 (81,1 \pm 6,4)	>0,05
Эритроферрон	19 (51,4 \pm 8,2)	29 (78,4 \pm 6,8)	<0,05
G-CSF	25 (67,6 \pm 7,7)	31 (83,8 \pm 6,1)	>0,05
GM-CSF	24 (64,9 \pm 7,8)	27 (73,0 \pm 7,3)	>0,05
ТНРО	21 (56,8 \pm 8,1)	25 (67,6 \pm 7,7)	>0,05

ФНО- α	31 (83,8 \pm 6,1)	26 (70,3 \pm 7,5)	>0,05
C-C motif chemokine-21	28 (75,7 \pm 7,1)	26 (70,3 \pm 7,5)	>0,05
Rhombotin-2	20 (54,1 \pm 8,2)	18 (48,6 \pm 8,2)	>0,05

Проведенный статистический анализ смог показать, что в результате внутривенного введения в течение 10 дней 20,0 мл ГАК частота встречаемости в плазме крови больных ХГС ИЛ-1 β , ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-11 и эритроферрона достоверно повысилась, а ИЛ-10 и ИЛ-13, наоборот, существенно снизилась. Удельный вес пациентов, с выделенными в плазме крови ИЛ-7, ЕРО, G-CSF, GM-CSF и ТНРО, имел при этом статистически незначимую тенденцию к повышению, а ИЛ-4, ФНО- α , C-C motif chemokine-21 и Rhombotin-2 – к снижению своего уровня (во всех случаях $p > 0,05$).

Заключение. Согласно общебиологическому закону регенерации, сформулированному академиком А.А. Богомольцем, «...возрождению предшествует частичное умирание, сопровождающееся образованием веществ-аутокатализаторов, стимулирующих возрождение» (1930 г.). В случае же гемолиза происходит, как известно, протеолитическая деградация гемоглобина (Hb) – белка, составляющего более 90% всей клеточной массы эритроцита. В настоящее время выделено уже около 200 эндогенных фрагментов Hb, причем более 50 из них обладают доказанной биологической активностью [2]. Однако, несмотря на то что биохимический состав большинства этих полипептидных цепей расшифрован, точный механизм их действия на гемопоэз не установлен.

Полученные в нашем исследовании данные свидетельствуют о том, что под действием биологически активных фрагментов Hb, образующихся в результате гемолиза, происходят существенные изменения протеомного профиля плазмы крови в сторону преобладания белков, оказывающих стимулирующее влияние на гемопоэз. Выявленные сдвиги, по всей вероятности, и обуславливают клиническую эффективность ГАК у больных ХГС, получающих аутогемотерапию.

Список литературы

1. Амбалов Ю.М., Донцов Д.В., Мамедова Н.И. Современные представления о проблеме гематологических осложнений комбинированной противовирусной терапии хронического гепатита С // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5.; URL: www.science-education.ru/119-14961.
2. Карелин А.А., Филиппова М.М., Яцкин О.Н. и др. Протеолитическая деградация гемоглобина в эритроцитах приводит к образованию биологически активных пептидов //

Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 4. – С. 271-281.

3. Лукина Е.А., Сысоева Е.П., Луговская С.А. и др. Гематологические синдромы у больных хроническим гепатитом С // Терапевтический архив. – 2000. – № 7. – С. 60-62.
4. Серебряная Б.А., Москалева Г.П., Корецкая Т.И., Гудим В.И. Влияние продуктов гемолиза на образование эритропоэтина // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1969. – Т. 13, № 6. – С. 49-51.
5. Федоров Н.А., Москалева Г.П., Гудим В.И., Иванова В.С. К вопросу о механизмах действия продуктов гемолиза на гемопоэз // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1975. – Т. 20, № 12. – С. 36-39.
6. Berry L., Irving W. Predictors of hepatitis C treatment response: what's new? // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2014. – Vol. 12, № 2. – P. 183-191.
7. Kartashev V., Doring M., Nieto L. et al. New findings in HCV genotype distribution in selected West European, Russian and Israeli regions // Journal of Clinical Virology. – 2016. – Vol. 81. – P. 82-89.
8. Suarez A., Redmond D. Desired Social Distance From People Who Have Hepatitis C Virus: An Exploration Among Staff in Health Care, Dentistry, Drug Treatment, and Tattoo/Body Piercing // Substance Use & Misuse. – 2014. – Vol. 49, № 4. – P. 466-474.