

<https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2020.070>

ISSN 2070-4909 (print)

ISSN 2070-4933 (online)

Пептиды в составе препарата Лаеннек, способствующие устранению гиперферритинемии и перегрузки железом

Громова О.А.^{1,2}, Торшин И.Ю.^{1,2}, Максимов В.А.³, Чучалин А.Г.⁴,
Згода В.Г.⁵, Тихонова О.В.⁵

¹ Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН (ФИЦ ИУ РАН) (ул. Вавилова, д. 44, корп. 2, Москва 119333, Россия)

² Центр хранения и анализа больших данных, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (Ленинские горы, д. 1, Москва 119991, Россия)

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» (ул. Баррикадная, д. 2, стр. 1, Москва 123995, Россия)

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ул. Островитянова, д. 1, Москва 117997, Россия)

⁵ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) (ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, Москва 119121, Россия)

Для контактов: Громова Ольга Алексеевна, e-mail: unesco.gromova@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Введение. Гемосидероз – патологическое состояние, сопровождающее патологии печени, легких и других органов. Полипептидный препарат Лаеннек способствует элиминации избыточных отложений железа в тканях.

Цель. Идентификация в составе препарата пептидов, участвующих в регуляции гомеостаза железа, устранении гемосидероза и гиперферритинемии.

Материалы и методы. Исследование пептидного состава препарата с использованием гибридной масс-спектрометрии и современных методов анализа больших данных, основанных на топологической теории распознавания.

Результаты. В составе препарата идентифицированы 19 пептидов, потенциально важных для регуляции гомеостаза железа. Регулируя уровни гепцидина, основного гормона гомеостаза железа, снижая синтез ферритина, а также проявляя противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты, эти пептиды способствуют устранению нарушений обмена железа.

Заключение. Идентифицированные пептиды позволили описать молекулярные механизмы устранения перегрузки тканей железом, известные из экспериментальных и клинических исследований рассматриваемого полипептидного препарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Гомеостаз железа, пептиды, Лаеннек, гемосидероз, гемохроматоз, новая коронавирусная инфекция, COVID-19.

Статья поступила: 20.11.2020 г.; в доработанном виде: 10.12.2020 г.; принята к печати: 23.12.2020 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии необходимости раскрытия финансовой поддержки или конфликта интересов в отношении данной публикации.

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-07-00356.

Для цитирования

Громова О.А., Торшин И.Ю., Максимов В.А., Чучалин А.Г., Згода В.Г., Тихонова О.В. Пептиды в составе препарата Лаеннек, способствующие устранению гиперферритинемии и перегрузки железом. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная Фармакоэкономика и Фармакоэпидемиология*. 2020; 13 (4): 413-425 <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2020.070>

Peptides contained in the composition of Laennec that contribute to the treatment of hyperferritinemia and iron overload disorders

Gromova O.A.^{1,2}, Torshin I.Yu.^{1,2}, Maksimov V.A.³, Chuchalin A.G.⁴, Zgoda V.G.⁵, Tikhonova O.V.⁵

¹ Federal Research Center "Informatics and Management of the Russian Academy of Sciences" (44-2 Vavilova Str., Moscow 119333, Russia)

² Moscow State University (1 Leninskie gory, Moscow 119991, Russia)

³ Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow (2-1 Barrikadnaya Str., 123995 Moscow, Russia)

⁴ Russian National Research Medical University (1 Ostrovityanova Str., Moscow 117997, Russia)

⁵ Institute of Biomedical Chemistry (IBMC) (10 Pogodinskaya Str., Moscow 119121, Russia)

Corresponding author: Olga A. Gromova, e-mail: unesco.gromova@gmail.com

SUMMARY

Introduction. Hemosiderosis is a pathologic condition that accompanies liver, lung, and other organ diseases. Polypeptide-containing drug Laennec contributes to the elimination of excessive iron deposits in tissues.

Aim. The study was aimed to identify peptides contained in the composition of the drug that take part in the regulation of iron homeostasis and correction of hemosiderosis and hyperferritinemia.

Materials and Methods. The study of the drug composition was conducted with hybrid mass-spectrometry and modern methods of analysis of Big Data based on the topological approach to recognition.

Results. The preparation contains 19 peptides that are potentially important for the regulation of iron homeostasis. These peptides help to treat the disorders of iron metabolism by regulating the levels of the main hormone of iron homeostasis hepcidin by reducing the synthesis of ferritin and by exhibiting anti-inflammatory and immunomodulatory effects.

Conclusion. The identified peptides allowed the authors to describe the molecular mechanisms of the iron overload elimination that are known from experimental and clinical studies of the analyzed polypeptide drug.

KEY WORDS

Iron homeostasis, peptides, Laennec, hemosiderosis, hemochromatosis, novel coronavirus infection, COVID-19.

Received: 20.11.2020; **in the revised form:** 10.12.2020; **accepted:** 23.12.2020

Conflict of interests

The authors declare they have nothing to disclosure regarding the funding or conflict of interests with respect to this manuscript.

The authors contributed equally to this article.

Funding

The study was supported by the grant provided by the Russian Foundation for Basic Research 19-07-00356.

For citation

Gromova O.A., Torshin I.Yu., Maksimov V.A., Chuchalin A.G., Zgoda V.G., Tikhonova O.V. Peptides contained in the composition of Laennec that contribute to the treatment of hyperferritinemia and iron overload disorders. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2020; 13 (4): 413-425 (in Russ.) <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2020.070>.

Основные моменты

Что уже известно об этой теме?

- ▶ Нарушения обмена железа сопровождаются заболеваниями печени, нейродегенеративные патологии, болезни суставов и легких (включая инфекцию COVID-19). Гемосидероз тканей стимулирует развитие хронического воспаления, вызывая гибель паренхиматозной ткани и замещение ее фибротической
- ▶ Таргетных препаратов для лечения гемосидероза нет (т.н. фармакологическое сиротство)
- ▶ Полипептидный препарат Лаеннек тормозит развитие гемосидероза, но молекулярные механизмы действия препарата не изучены

Что нового дает статья?

- ▶ В составе препарата идентифицированы 19 потенциально важных для регуляции гомеостаза железа пептидов, которые можно разделить на три группы: 1) пептиды-хелаторы ионов железа; 2) гормоно-подобные пептиды геморфин, спинорфин и 3) пептиды-ингибиторы специфических таргетных белков TMPRSS6, FURIN, FKBP1A, CUL1, SKP1
- ▶ Регулируя уровни гепцидина, основного гормона гомеостаза железа, снижая синтез ферритина, проявляя противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты, эти пептиды способствуют устранению нарушений обмена железа

Highlights

What is already known about this subject?

- ▶ Iron metabolism disorders accompany liver diseases, neurodegenerative pathologies, diseases of the joints and lungs (including COVID-19 infection). Hemosiderosis of tissues stimulates the development of chronic inflammation causing the death of parenchymal tissue and its replacement by fibrotic tissue
- ▶ There are no targeted drugs for the treatment of hemosiderosis so-called pharmacological orphanhood
- ▶ The polypeptide drug Laennec inhibits the development of hemosiderosis but the molecular mechanisms of the drug's action are understudied

What are the new findings?

- ▶ The preparation contains 19 peptides that are potentially important for the regulation of iron homeostasis that can be divided into three groups: 1) peptides-chelators of iron ions; 2) hormone-like peptides hemorfin, spinorphin, and 3) peptides-inhibitors of specific target proteins TMPRSS6, FURIN, FKBP1A, CUL1, SKP1
- ▶ These peptides help to treat the disorders of iron metabolism by regulating the levels of the main hormone of iron homeostasis hepcidin by reducing the synthesis of ferritin and by exhibiting anti-inflammatory and immunomodulatory effects

Основные моменты

Как это может повлиять на клиническую практику в обозримом будущем?

- ▶ Молекулярные механизмы устранения перегрузки тканей железом важны для обоснованного применения препарата Лаеннек при гемосидерозе и других болезнях перегрузки железом
- ▶ Результаты клинических наблюдений у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени, гемохроматозом и вирусными инфекциями (включая COVID-19) подтверждают эффективность использования препарата Лаеннек для лечения гемосидероза печени и гиперферритинемии

Highlights

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ Molecular mechanisms of eliminating tissue iron overload are important for the reasonable use of the polypeptide drug Laennec in patients with hemosiderosis and other diseases of iron overload
- ▶ The results of clinical observations of patients with non-alcoholic fatty liver disease, hemochromatosis, and viral infections (including COVID-19) confirm the effectiveness of using Laennec for the treatment of liver hemosiderosis and hyperferritinemia

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

В норме печень является депо, в котором железо сохраняется в форме плотно упакованных ферритиновых гранул. Эти гранулы, сформированные субъединицами белка ферритина, исключают непосредственный контакт ионов железа с окисляющими агентами. В то же время следует отличать физиологическое депонирование железа в виде ферритиновых гранул от патологического процесса гемосидероза – избыточного отложения гемосидерина (темно-желтого пигмента на основе оксида железа) в тканях организма. Гемосидероз стимулирует хроническое воспаление и проокислительные реакции и, как результат, фиброз и повреждения паренхимы [1]. Чрезмерное накопление гемосидерина в тканях существенно замедляет процесс их регенерации, провоцируя развитие цирроза печени, т.н. «железного сердца» (ассоциированного с сердечной недостаточностью), артрита и т.д. [2]. Гемосидероз является достаточно тяжелым поражением органов (печени, мозга, легких и др.), особенно принимая во внимание отсутствие специальных препаратов для элиминации гемосидерина.

Гемосидероз и другие нарушения обмена железа особенно актуальны при новой коронавирусной инфекции COVID-19, которая, как известно, ассоциирована не только с нарушениями дыхательной системы, но и с полиорганной патологией. Для COVID-19 в ряде сообщений продемонстрировано повышение уровней маркеров дисфункции печени АСТ, АЛТ, билирубина [1], нарушения профиля свертываемости крови, резкое повышение концентраций маркеров воспаления ИЛ-1 β , ИЛ-6, С-реактивного белка, ФНО- α , ИФН- γ , ферритина и др. Эти осложнения ассоциированы с тяжелым течением COVID-19, цитокиновым штормом и высоким риском летального исхода [3].

В частности, гиперферритинемия является важным прогностическим маркером состояния пациентов с COVID-19. Ферритин – не только белок-переносчик железа, но и белок острой фазы воспаления. Повышенные уровни ферритина при COVID-19 могут быть обусловлены цитолизом эритроцитов и других форменных элементов крови, а также формированием цитокинового шторма [4]. Таким образом, ферритин является своего рода «двойным маркером», так как повышение уровней ферритина может указывать и на воспаление, и на нарушение гомеостаза железа.

Подчеркнем, что гиперферритинемия и другие нарушения обмена железа характеризуются своего рода «фармакологическим сиротством», так как не существует эффективных и безопасных схем лечения этих патологических состояний. Перспективным направлением лечения этих патологий является использование полипептидного препарата Лаеннек (АТХ А05ВА Препараты для лечения заболеваний печени), который проявляет комплекс гепатопротекторных, противовирусных, противовоспалительных и регенераторных свойств [5]. В эксперименте и в клинической практике показано, что препарат устраняет хроническую перегрузку

железом, снижает повреждения гепатоцитов и предотвращает формирование гемосидероза в печени, в мозге и в других органах. Применение препарата способствовало снижению гиперферритинемии у пациентов со средним и тяжелым течением COVID-19 [6].

В настоящей работе представлены результаты систематического исследования пептидного состава препарата с целью установления молекулярных механизмов воздействия на гомеостаз железа, в т.ч. на устранение гемосидероза и гиперферритинемии. Исследование было проведено с использованием одной из передовых технологий современной протеомики (гибридной масс-спектрометрии) и современных методов анализа больших данных (www.bigdata-mining.ru).

Цель – идентификация в составе препарата Лаеннек пептидов, участвующих в регуляции гомеостаза железа, устранении гемосидероза и гиперферритинемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Процесс экспериментального исследования пептидного состава препарата состоял из четырех основных этапов: очистки препарата (отделение липидов, обессоливание), хроматографического разделения пептидов и определения масс-спектра пептидной фракции и *de novo* секвенирования пептидов.

Очистка препарата

Очистка препарата состояла в отделении липидной фракции и обессоливании. Для очистки препарата от липидной фракции использовался модифицированный метод Брокерхоффа-Даусона-Хьюшера [7]. Сначала проводили мягкое щелочное дезацилирование фосфолипидов, последовательно приливали метанол, гексан и воду (1:4:4, v/v), перемешивали и центрифугировали 1 мин. при 1000 g, супернатант сливали, высушивали от хлороформа.

Обессоливание пептидной фракции проводили на мини-колонке при помощи центрифугирования. В мини-колонку 0,75×4,5 см ("Raining Instrument", США) наливали 2 мл сефадекса G-10 ("Pharmacia", Швеция), декантированного в смеси метанол: вода (85:15, v/v). После процедуры обессоливания потери белка составляли не более 35%.

Хроматографическое разделение пептидов

Пептиды в составе выделенной пептидной фракции разделялись с использованием параллельной системы хроматографического разделения пептидов Dionex Ultimate 3000 RSLCnano-system ("Thermo Fisher Scientific", США). Исследуемые образцы пептидной фракции в хроматографическую «колонку-ловушку» Acclaim PepMap (2 см, внутренний диаметр – 75 мкм, C18, 3 μ m, 100 Å, производство ("Thermo Fisher Scientific", США)) со скоростью 2 мкл/мин. в сочетании с 0,1% раствором муравьиной кислоты в воде.

Масс-спектрометрия с параллельной идентификацией пептидов

Масс-спектрометрический (МС) анализ осуществляли с использованием масс-спектрометра Q-Exactive ("Thermo Fisher Scientific", США). Был использован наноаэрозольный источник ионов "Flex" с напряжением ионизации 1800 V и температурой капилляра 200°C. Данные масс-спектра собирались в соответствии с количеством имеющегося в МС камере количеством пептида-прекурсора, затем проводилась диссоциация, вызванная столкновением (CID). При проведении процедуры CID исследуемые ионы пептидов ускоряются в электростатическом поле и сталкиваются с нейтральными частицами (аргон). Получаемые фрагменты анализируются посредством тандемной масс-спектрометрии, в результате чего получается CID-масс-спектр молекулярных фрагментов пептида.

De novo секвенирование пептидов

De novo секвенирование пептидов проводилось на основании данных CID [8]. Для получения аминокислотных последовательностей пептидов нами был разработан комплекс программ DNVSEQP, основанный на применении теории топологического, метрического [9,10], комбинаторного [11] подходов к анализу «больших данных» [12,13] и на теории анализа хемографов [14,15]. Программный пакет применялся ранее для анализа пептидных препаратов и показал соответствие между результатами *de novo* секвенирования и результатов применения стандартных процедур секвенирования пептидов [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ / RESULTS AND DISCUSSION

В ходе исследования был изучен состав образцов пептидной фракции Лаеннека при различных условиях эксперимента; всего было проведено семь параллельных протеомных экспериментов. Идентифицированные пептиды, важные для регуляции гомеостаза железа и уровней ферритина, приведены в **таблице 1**. Эти пептиды можно разделить на три группы: 1) хелаторы ионов железа; 2) гормоно-подобные пептиды; 3) пептиды-ингибиторы специфических таргетных белков.

Хелаторы ионов железа

В составе препарата идентифицированы не менее семи пептидных фрагментов, которые могут являться специфичными хелаторами ионов железа. Хелатирование, то есть связывание ионов железа, и их удаление из раствора является одним из подходов к снижению избыточных концентраций ионного железа, наблюдаемых при перегрузке железом (например, при гемохроматозе). Важно отметить, что специфичность хелатирующего действия обсуждаемых ниже пептидов обусловлена тем, что непосредственно эти пептиды являются компонентами железо-связывающих сайтов соответствующих белков протеома человека.

Например, пептид VTLDGGL соответствует пептидному фрагменту 79-85 VTLDAGL белка серотрансферрина, в котором остаток D-82 взаимодействует с железом в пространственной структуре серотрансферрина. Хелатором железа также является и пептид VTLDGG, соответствующий пептидным фрагментам 76-81 VTLDGG лактоферрина и меланотрансферрина, в которых остаток D-79 специфически взаимодействует с железом [16].

Другими примерами пептидов-хелаторов ионов железа, идентифицированных в составе препарата, являются пептид

PAGAPQV (соответствует фрагменту 1244-1251 PAGAPHQV лизин-специфической деметилазы), пептид VCTNLG (соответствует фрагменту 216-221 VCTHLG цитохрома b-c1) и пептид ALHAQY (соответствует фрагменту 314-319 ALHALY металлоредуктазы STEAP3).

Заметим, что исследуемый препарат содержит следовые количества железа (12 ± 3 мкг/кг) [17], что соответствует всего 0,3 нмоль железа в 1 мл препарата. Поэтому можно сделать вывод, что перечисленные выше пептиды-хелаторы не «нагружены» ионами железа в составе препарата и, следовательно, могут выполнять свои хелатирующие функции при введении в организм.

Пептидные фрагменты, участвующие в регуляции гомеостаза железа

В составе препарата найдены несколько гормоно-подобных пептидных фрагментов, которые участвуют в регуляции гомеостаза железа. Эти пептиды соответствуют различным фрагментам последовательности гемоглобина. Например, пептид VVYPWTE соответствует пептиду VVYPWTQ 34–40 бета-субъединицы гемоглобина, а пептид VVYPWT – фрагменту VVYPWT 34–39 того же белка. Пептидный фрагмент гемоглобина 33–42 называется «LVV-геморфин-7», а пептидный фрагмент 33–39 называется «спинорфин».

Геморфины и спинорфины – эндогенные опиоидные пептиды, оказывающие антиноцицептивное действие, регулирующие АД через ингибирование ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), а также проявляющие комплекс противовоспалительных, антипролиферативных и иммуномодулирующих эффектов [18]. Снижение концентрации LVV-геморфина-7 в сыворотке крови ассоциировано с прогрессией ожирения. Геморфины и спинорфины также вовлечены в регуляцию гомеостаза железа. При участии рецептора CD163+ макрофаги перерабатывают гемовое железо из стареющих эритроцитов и из внеклеточного гемоглобина из разрушенных эритроцитов, параллельно синтезируя LVV-геморфин-7 [19], который ускоряет процесс переработки гемоглобина.

Ингибиторы и активаторы таргетных белков

В составе препарата были идентифицированы пептиды-ингибиторы и пептиды-активаторы специфических таргетных белков, важных для регуляции гомеостаза железа (**табл. 2**). Модулирование активности этих таргетных белков способствует, в частности, повышению уровней гепцидина (основного гормона гомеостаза железа) и снижению синтеза ферритина.

Анализ информации о таргетных белках (см. табл. 2), на активность которых воздействуют пептиды препарата, указал на несколько взаимосвязанных механизмов регуляции гомеостаза железа. Прежде всего, следует упомянуть повышение уровней гепцидина и снижение уровней ферритина.

Гепцидин

Пептид гепцидин связывает белок гемопоэтин на мембранах энтероцитов, макрофагов и гепатоцитов. Комплекс «гепцидин – гемопоэтин» всасывается внутрь клетки, что приводит к сокращению экспорта железа из клеток и, следовательно, к более низкому уровню железа в плазме крови. Уровни гепцидина, регулируемые гемоувелином, иммунофилином и рядом протеаз, повышаются при перегрузке железом (в связи с необходимостью увеличивать выведение железа из тканей) и, наоборот, снижаются при дефиците железа [20] (с целью сохранения железа в организме).

Таблица 1. Пептиды препарата Лаеннек, ассоциированные с регуляцией гомеостаза железа.

Table 1. Peptides contained in the composition of Laennec associated with the regulation of iron homeostasis.

ММ / Molecular mass	Пептид / Peptide	Фрагмент белка протеома / Fragment of a protein proteome	Ген / Gen	Белок протеома / Proteome protein	Роль пептида / Role of peptide
690.68	PAGAPQV	PAGAPHQV	<i>KDM3A</i>	Лизин-специфическая деметилаза 3А	Хелатор Fe ³⁺
562.317	VCTNLG	VCTHLG	<i>UQCRRS1</i>	Цитохром b-c1, митохондриальный	Хелатор Fe ³⁺
570.34	ALHAQY	ALHALY	<i>STEAP3</i>	Металлоредуктаза STEAP3	Хелатор Fe ³⁺
561.779	NEGLPV	HEGLPV	<i>PLOD2</i>	Проколлаген-лизин-2- оксиглутарат 5-диоксигеназа	Хелатор Fe ³⁺
445.76	VTLDGG	ITLDGG	<i>MELTF</i>	Меланотрансферрин	Хелатор Fe ³⁺
445.76	VTLDGG	VTLDGG	<i>LTF</i>	Лактотрансферрин	Хелатор Fe ³⁺
445.76	VTLDGGL	VTLDAGL	<i>TF</i>	Серотрансферрин	Хелатор Fe ³⁺
598.81	VVYPWTE	VVYPWTQ	<i>HBB</i>	Бета-субъединица гемоглобина	Геморфин - переработка гемового железа
598.316	VVYPWT	VVYPWT	<i>HBB</i>	Бета-субъединица гемоглобина	Геморфин
506.811	NLTVLSLP	NLTILSLP	<i>CCNF</i>	Циклин-FOS	Ингибирование CUL1
598.809	VYPFGE	VYSFGE	<i>TMPRSS6</i>	Трансмембранная сериновая протеаза	Ингибирование синтеза растворимого HFE2
557.36	VAALNS	IAALNS	<i>TMPRSS6</i>	Трансмембранная сериновая протеаза	Ингибирование синтеза растворимого HFE2
556.28	SLLQLTG	SLLQITG	<i>MED1</i>	Транскрипционный медиатор РНК-полимеразы-1	Активация рецептора RXRA
572.33	LELDSSD	LELDDSD	<i>PPARA</i>	Рецептор альфа, активируемый пролифераторами пероксисом	Активация RXRA
750.84	GAGLPL	GSGLPL	<i>TGFBR1</i>	TGF-бета рецептор-1	Ингибирование FKBP1A
615.814	LPLLQV	LPLLQV	<i>TGFBR1</i>	TGF-бета рецептор-1	Ингибирование FKBP1A
506.811	NLTVLSLP	NLTILSLP	<i>CCNF</i>	Циклин-FOS	Ингибирование SKP1 и CUL1
507.8	MVGSVV	MVGGVV	<i>APP</i>	Белок-предшественник амилоида A4	Ингибирование гамма- секретазы
623.8	SLEHEP	SLEDEP	<i>ADGRG6</i>	G-белок рецептор-6 для адгезии	Ингибирование фурина

Примечание. ММ – молекулярная масса пептида (дальтон). Белки упорядочены по трем группам (хелаторы ионов железа, гормон-подобные пептиды, пептиды-ингибиторы целевых белков). Приведены аминокислотные последовательности пептидов, закодированные в общепринятом 20-буквенном формате. Названия целевых белков выделены жирным шрифтом и расшифрованы в таблице 2.

Note. MM – molecular mass of a peptide (Dalton). Proteins are divided into two groups (peptides-chelators of iron ions; hormone-like peptides, and peptides-inhibitors of specific target proteins). Amino acid sequences of peptides are coded in a generally-accepted 20-letter coding format. Names of target proteins are presented in bold and described in Table 2.

Таблица 2. Целевые белки протеома человека, участвующие в гомеостазе железа и модулируемые пептидами препарата.

Table 2. Target proteins of human proteome associated with iron hemostasis and modulated with the peptides contained in the drug.

Ген / Gen	Белок / Protein	Роль белка / Role of protein
<i>CUL1</i>	Куллин-1	Регулирует распад железо-регуляторных белков IRP, синтез ферритина и трансферрина
<i>HFE2</i>	Гемоювелин (белок гемохроматоза-2)	Подавляет экспрессию гепцидина
<i>FKBP1A</i>	Пептидил-пролил цис-транс-изомераза FKBP1A (иммунофилин FKBP12)	Подавляет экспрессию гепцидина
<i>RXRA</i>	Рецептор ретиноидов RXR-альфа	Снижает окислительный стресс, регулирует синтез ферропортина и ферритина
<i>SKP1</i>	CDK2-ассоциированный белок p19skp1	Регулирует деградацию железо-регуляторных белков IRP
<i>KIAA0253</i>	Гамма-секретаза	Синтез белка-предшественника амилоида A4 (APP) при болезни Альцгеймера
<i>FURIN</i>	Фурин	Синтез растворимого гемоювелина

Интересно отметить, что гепцидин контролирует метаболизм железа при регенерации печени: экспрессия гена гепцидина достигает пика в первоначальную стадию регенерации паренхимы, непосредственно после повреждающего воздействия. Затем наблюдается постоянное снижение уровней экспрессии гепцидина до завершения регенерации, что способствует достаточным «поставкам» железа в печень для ее восстановления [21].

Пептиды VYPFGE (соответствует фрагменту VYSFGE 140-145 сериновой протеазы TMPRSS6) и пептид VAALNS (соответствует пептиду IAALNS 212-217 сериновой протеазы TMPRSS6) взаимодействуют с гемоювелином (белок HFE2) и, кроме того, непосредственно ингибируют сериновую протеазу TMPRSS6 [22]. Аналогично, пептид SLEHEP способствует ингибированию протеазы под названием фурин. Ингибирование протеаз TMPRSS6 и фурина важно для торможения конверсии мембранно-связанного гемоювелина в растворимый гемоювелин.

Гемоювелин (белок-2 гемохроматоза, ген HFE2) – мембранный белок гепатоцитов, который, являясь одним из сенсоров концентраций железа в крови, регулирует уровни гепцидина через сигнальный каскад BMP/SMAD. Делеции гена HFE2 в эксперименте и врожденные мутации этого гена ассоциированы с формированием т.н. «ювенильного гемохроматоза» (или «гемохроматоза 2-го типа») [23]. Поэтому активность мембранной формы гемоювелина принципиально важна для повышения уровней гепцидина.

В то же время т.н. «растворимый» гемоювелин, наоборот, подавляет экспрессию гена гепцидина [24], антагонизируя эффекты мембранной формы гемоювелина в сигнальном каскаде BMP/SMAD [25]. Преобразование мембранного гемоювелина в растворимый осуществляется фурином и TMPRSS6 [26,27], которые, тем самым, ингибируют передачу сигналов по каскаду BMP/SMAD [28]. Таким образом, пептиды Лаеннека VYPFGE, VAALNS и SLEHEP, ингибируя трансформацию мембранной формы гемоювелина в растворимую форму, способствуют повышению уровней гепцидина.

Когда уровень гепцидина в крови высок, в кишечнике снижается всасывание железа, а концентрация железа в сыворотке крови падает вследствие контролируемого захвата железа макрофагами и гепатоцитами для осуществления физиологических функций этих клеток. Наоборот, при гемохроматозе наблюдаются аномально низкие уровни гепцидина, что сопровождается необычайным повышением всасывания железа в кишечнике и резким увеличением оттока железа из внутриклеточного депо (в виде ферритина) посредством повышения активности белка ферропортина. Таким образом, пептиды VYPFGE, VAALNS и SLEHEP будут способствовать повышению экспрессии гепцидина и, соответственно, снижению перегрузки клеток и тканей железом.

Экспрессия гепцидина активируется через сигнальный путь BMP/SMAD также и посредством ингибирования белкового комплекса mTOR/FKBP12 [29]. Пептиды GAGLPL (соответствует фрагменту GSGLPL 190-195 TGF-бета рецептора) и LPLLQV (соответствует фрагменту LPLLQV 193-198 TGF-бета рецептора) участвуют в связывании белка FKBP12 (иммуофилин) [30]. Поэтому ингибирование белка FKBP12 этими пептидами соответствует повышению уровней гепцидина.

Пептиды, ингибирующие убиквитинлигазу

Снижение уровней ферритина осуществляется посредством ингибирования пептидами белкового комплекса убиквитинлигазы SKP1-CUL1-RBX1-FBXL5, регулирующего распад железо-регуляторных белков IRP1 и IRP2. IRP-белки связываются с т.н. железо-чувствительными элементами РНК

(IRE) в мРНК ферритина и в мРНК рецептора трансферрина. Связывание IRP-белков с элементами IRE в мРНК ферритина приводит к подавлению синтеза ферритина. Связывание IRP-белков с мРНК рецептора трансферрина ингибирует деградацию этой мРНК. Комплекс SKP1-CUL1-RBX1-FBXL5 стимулирует деградацию белка IRP2 [31]. Пептид NLTVLSLP соответствует пептиду NLTVLSLP 29-36 белка циклин-FOS, в котором фрагмент 35-36 LP взаимодействует с белками SKP1-CUL1 [32]. Поэтому ингибирование белков SKP1 и CUL1 пептидом NLTVLSLP будет тормозить протеолиз белка IRP2 и, соответственно, ингибировать синтез новых молекул ферритина.

Пептиды, действующие на витамин А

Пептиды препарата могут усиливать сигналы от рецепторов ретиноидов (витамина А), что также способствует нормализации гомеостаза железа. Например, пептид SLLQLTG соответствует фрагменту SLLQITG 606-612 белка под названием «транскрипционный медиатор РНК-полимеразы-1». Замена пары остатков «LL» (лейцин-лейцин) в положении 607-608 на остатки «AA» (аланин-аланин) ухудшает взаимодействие фрагмента с рецептором ретиноидов RXRA [33,34]. Аналогичным эффектом обладает и пептид LELDSSD, соответствующий фрагменту LELDDSD 368-374 рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом [35]. Оба пептида являются потенциальными ко-активаторами (то есть совместными активаторами) рецептора ретиноидов RXRA.

Активация рецептора RXRA ослабляет перегрузку печени железом и снижает окислительный стресс, вызванный избытком свободных ионов железа [36]. Эти эффекты ретиноидов осуществляются посредством модуляции экспрессии генов, вовлеченных в гомеостаз железа (транспортер-1 двухвалентных металлов, дуоденальный цитохром В, ферропортин-1, ферритин и др.). На фоне дефицита витамина А уровень мРНК ферритина в печени повышается [37]. Дефицит витамина А усиливает дефицит железа за счет усиления экспрессии белка IRP2, нарушающего экспрессию генов ферритина и рецептора трансферрина [38]. Соответственно, усиление активации рецептора ретиноидов пептидами SLLQLTG и LELDSSD будет способствовать и снижению синтеза ферритина, и снижению перегрузки тканей железом.

Пептиды, ингибирующие гамма-секретазу

Одним из интересных результатов настоящего исследования является обнаружение в препарате пептидов, ингибирующих избыточную активность гамма-секретазы, участвующей в синтезе амилоидного белка А4 при болезни Альцгеймера. Например, пептид MVGSVV соответствует фрагменту MVGGVV 706-711 белка А4, в котором сайт 711-712 претерпевает протеолиз гамма-секретазой. Так как в пептиде MVGSVV нет аминокислотного остатка, соответствующего остатку 712 белка-предшественника амилоида А4, то пептид MVGSVV с высокой вероятностью является ингибитором гамма-секретазы.

Ингибирование гамма-секретазы пептидом MVGSVV может способствовать замедлению прогрессии болезни Альцгеймера, которая, как известно, ассоциирована с формированием отложений алюминия и гемосидерина в мозге. Железо увеличивает активность гамма-секретазы в мозге через повышение уровней ферритина [39], тем самым повышая отложения амилоидного белка и воспаление в разных участках мозга.

Таким образом, пептиды препарата Лаеннек, идентифицированные в результате настоящего исследования, способствуют комплексной регуляции гомеостаза железа,

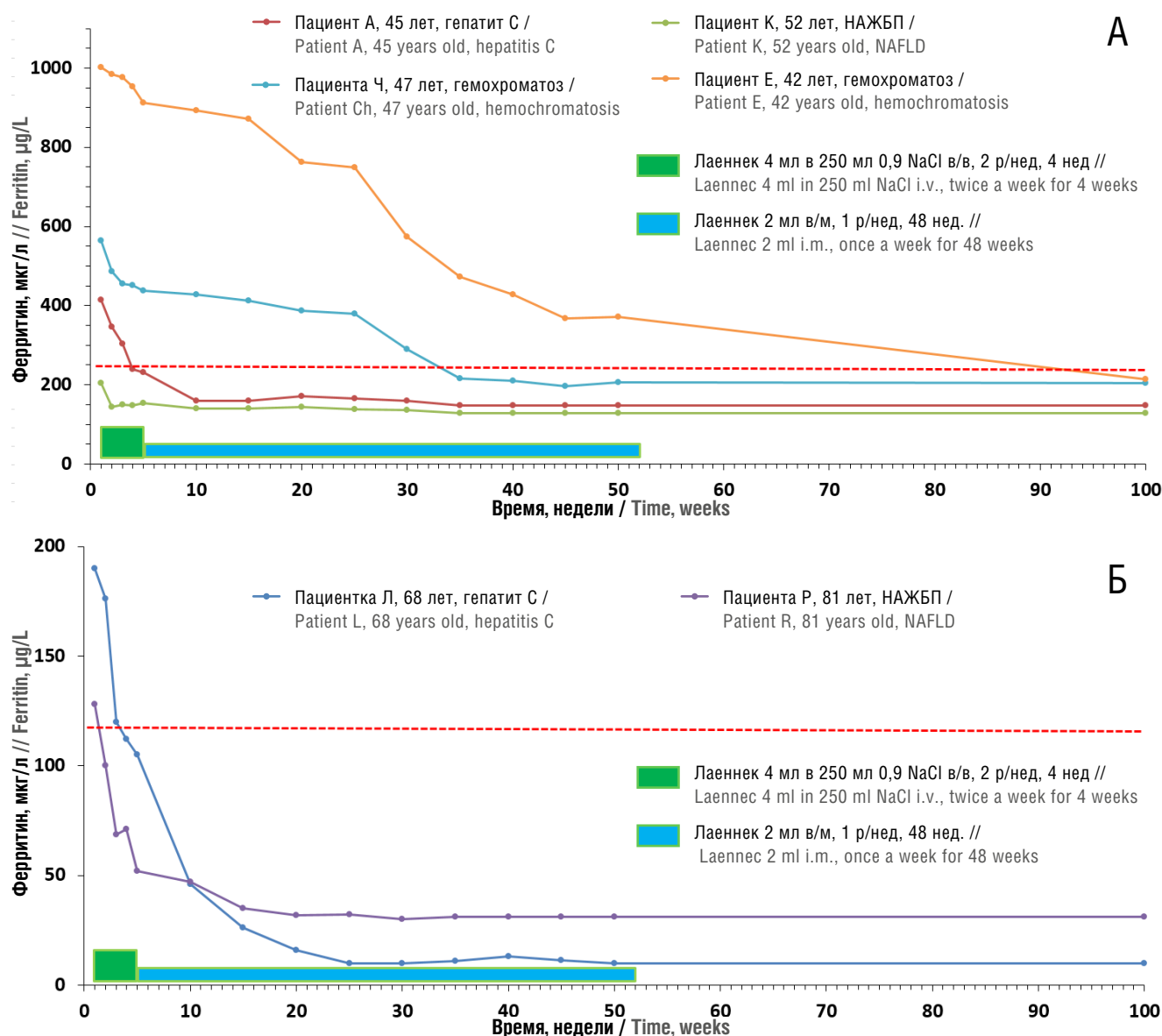


Рисунок 1. Клинические примеры: снижение ферритина в динамике лечения полипептидным препаратом Лаеннек у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС), неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) и гемохроматозом.

А – мужчины; Б – женщины: указан общий режим применения препарата. У пациентов с гемохроматозом препарат применялся в течение двух лет.

Figure 1. Clinical examples: dynamics of a decrease in the level of ferritin during the therapy with Laennec in patients with chronic viral hepatitis C, nonalcoholic fatty liver disease, and hemochromatosis. А – мужчины (men); Б – женщины (women): general schedule of administration of the drug. Patients with hemochromatosis received the drug for two years.

включающей не только снижение избыточного синтеза ферритина, но и торможение перегрузки железом различных тканей. Экспериментальные и клинические исследования подтверждают эффективность использования полипептидного препарата для торможения перегрузки железом.

Исследования эффективности исследуемого полипептидного препарата для устранения нарушений обмена железа

Ранее в экспериментальном исследовании моделей хронической перегрузки железом у крыс были оценены эффекты препарата Лаеннек на гемосидероз. Модели воспроизводились посредством применения сульфата железа или железа в составе полимальтозного комплекса путем зондирования в течение двух месяцев. Нарушения функции печени и почек были более выражены при использовании сульфата железа и несколько менее – при использовании полимальтозного комплекса для воспроизведения модели. В случае обеих моделей перегрузки железом применение исследуемого полипептидного препарата приводило к

снижению повреждения гепатоцитов, уменьшению гемосидероза печени, почек и головного мозга [40].

Предварительные результаты клинических наблюдений у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП, код K76.0 по МКБ-10), хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС, код V18.2 по МКБ-10), гемохроматозом (код E83.1 по МКБ-10) подтверждают эффективность использования препарата Лаеннек (4 мл в 250 мл 0,9% NaCl в/в, 2 раза/нед., 4 нед.; затем 2 мл в/м, 1 раз/нед., 48 нед.) для лечения гемосидероза печени и гиперферритинемии, сопровождающих перегрузку железом.

У всех пациентов, вне зависимости от патологии (ХВГС, НАЖБП, гемохроматоз) при использовании препарата отмечено достоверное снижение уровней аланинотрансферазы (АЛТ): в среднем по выборке (n=42), от 51±22 Ед/л до 25±18 Ед/л (p<0,05). Вне зависимости от патологии, применение препарата также приводило к снижению повышенных уровней ферритина: в среднем по выборке, концентрации ферритина снижались от 190±55 до 121±32 мкг/л (p<0,01). Как видно из

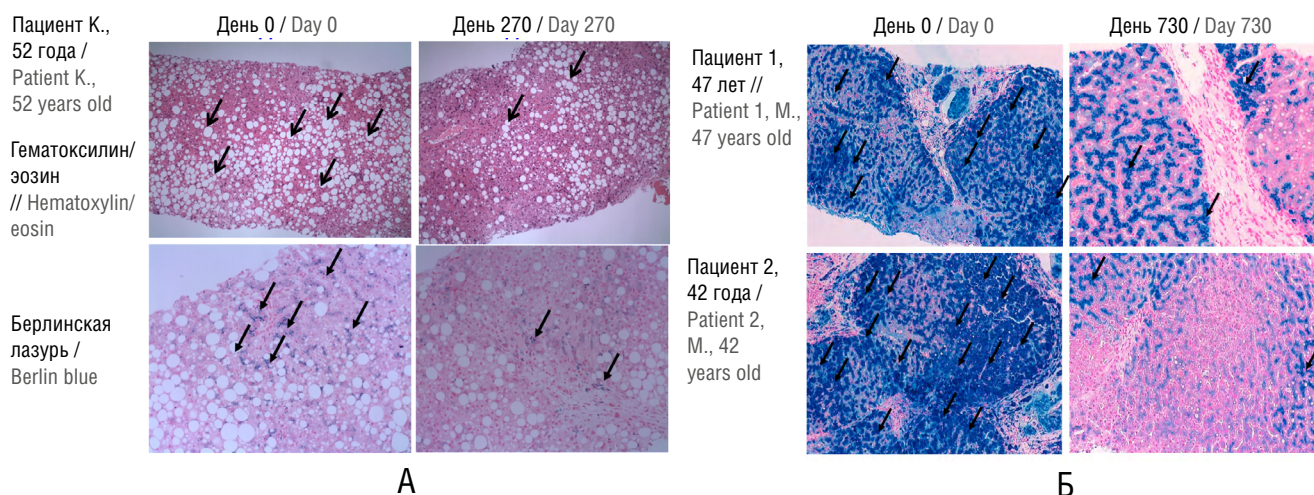


Рисунок 2. Примеры гистологического анализа биоптатов печени пациентов, получавших терапию Лаеннеком.

А — пациент К., 52 года, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП): применение полипептидного препарата приводило к снижению жировой инфильтрации печени (окраска гематоксилином/эозином, $\times 200$) и гемосидероза печени (окраска «берлинской лазурью», $\times 400$), что соответствует переходу от III стадии НАЖБП к II стадии.

Б — пациент 1 (47 лет) и пациент 2 (42 года) с гемохроматозом. Окраска на гемосидероз «берлинской лазурью» ($\times 400$). Очевидно существенное снижение гемосидероза.

Figure 2. Examples of histological analysis of liver biopsates obtained from patients that received Laennec therapy.

А — patient K, 52 years old, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Laennec therapy resulted in a reduction of fatty liver infiltration (hematoxylin/eosin staining, $\times 200$) and liver hemosiderosis (Berlin blue staining, $\times 400$), which corresponded to a shift from III stage of НАЖБП to II stage of NAFLD.

Б — patient 1 (47 years old) and patient 2 (42 years old) with hemochromatosis. Berlin blue staining for hemosiderosis identification ($\times 400$). A significant reduction of hemosiderosis.

примеров на **рисунке 1**, у большинства пациентов длительное курсовое применение полипептидного препарата способствовало снижению уровня ферритина до диапазона нормы.

Гистологическое исследование биопсий печени, взятых у пациентов с тяжелыми поражениями печени, указало на существенно снижение содержания гемосидерина в биоптатах

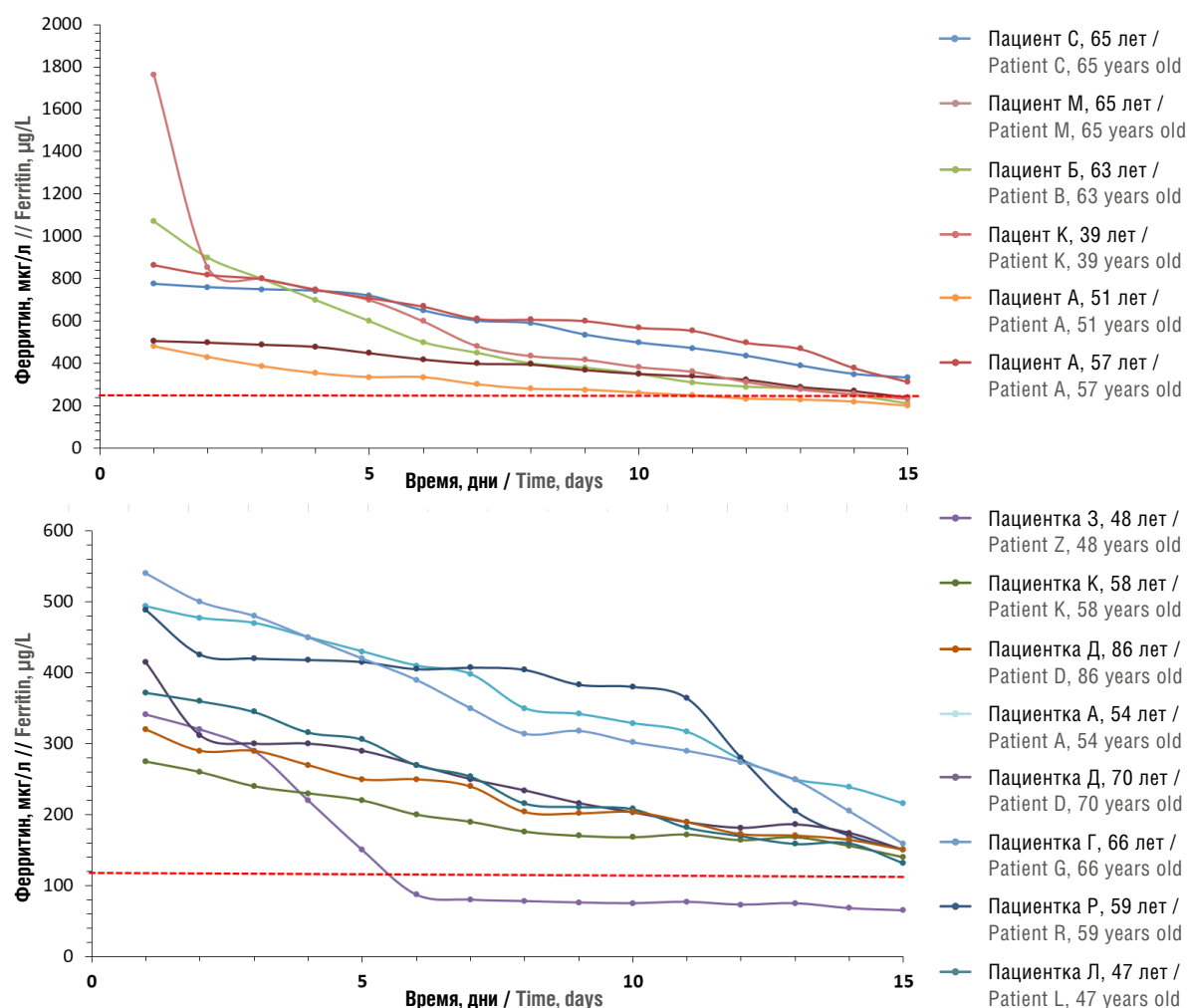


Рисунок 3. Динамика уровней ферритина при лечении COVID-19 с использованием препарата Лаеннек.

Figure 3. Dynamics of the levels of ferritin in patients with COVID-19 that received Laennec.

в динамике лечения препаратом. На **рисунке 2** приведены результаты исследований биоптатов печени пациентов с различными патологиями до и после лечения: очевидно существенное снижение жировой инфильтрации печени при НАЖБП и отложений гемосидерина при НАЖБП и при гемохроматозе.

В случае пациентов с гемохроматозом курс лечения был еще более длительным – не менее двух лет. Наследственный гемохроматоз 2-го типа (ювенильный гемохроматоз) является редким аутосомно-рецессивным заболеванием, которое вызывается мутациями упоминаемого ранее гена гемоювелина (HFE2) и проявляется, прежде всего, выраженным накоплением гемосидерина в печени. Исследование биопсий печени до и после курса лечения исследуемым полипептидным препаратом указало на существенное устранение гемосидероза (см. рис. 2Б).

Применение препарата Лаеннек при COVID-19

Применение препарата способствовало снижению гиперферритинемии у пациентов со средним и тяжелым течением COVID-19. Гиперферритинемия у пациентов с COVID-19 ассоциирована с дисфункцией печени и с повышенным риском «цитокинового шторма». У 14 пациентов (возраст – 39–86 лет, шесть мужчин, восемь женщин) с застойным течением COVID-19 Лаеннек использовался в составе комплексной терапии [41] в/в, кап. (6 мл в 350 мл 0,9% р-ра NaCl первые 3 сут.; затем 6 мл в 250 мл 0,9% р-ра NaCl) ежедневно, № 10. Пациенты в контрольной группе (n=14) получали только комплексную терапию, рекомендованную МЗ РФ. Применение препарата приводило к положительной клинической динамике: снижению уровней ферритина (у мужчин на 282 мкг/л, у женщин на 80 мкг/л; $p=0,039$ (**рис. 3**)); увеличению оксигенации крови до диапазона физиологической нормы ($p=0,0029$); снижению объема повреждения легких по данным КТ (в среднем на 10%; $p=0,0027$); повышению относительного содержания лимфоцитов (на 8%; $p=0,04$), нормализации маркеров дисфункции печени (АСТ, АЛТ), креатинина, а также систолического АД ($p<0,05$). Все пациенты,

получавшие препарат, выздоровели в течение 3–15 дней после начала применения препарата и были выписаны с отрицательным ПЦР-тестом на вирус SARS-CoV-2 [6].

Таким образом, применение полипептидного препарата способствует устранению гемосидероза и гиперферритинемии. Заметим, что необдуманное назначение неорганических препаратов железа пациентам с ЖДА [42] не только не способствует лечению анемии, но и усиливает уже существующие поражения печени, связанные с гемосидерозом (как это было показано в экспериментальных исследованиях [40]). Снижение перегрузки железом также важно для нормализации гемостаза [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ / CONCLUSION

Нарушения обмена железа сопровождают заболевания печени, нейродегенеративные патологии, болезни суставов и легких (включая инфекцию COVID-19). Этим патологиям в той или иной мере присуще не просто избыточное накопление железа в клетках, а гемосидероз – то есть буквальное «пропитывание» тканей гемосидерином, который состоит из мелкодисперсных и нерастворимых в воде оксидов железа. Гемосидероз тканей стимулирует развитие хронического воспаления, вызывая гибель паренхиматозной ткани и замещение ее фибротической. В настоящей работе идентифицированы пептиды в составе препарата Лаеннек, потенциально важные для нормализации распределения железа в тканях. Идентифицированные пептиды можно разделить на три группы: 1) пептиды-хелаторы ионов железа; 2) гормоно-подобные пептиды геморфин, спинорфин и 3) пептиды-ингибиторы специфических таргетных белков TMPRSS6, FURIN, FKBP1A, CUL1, SKP1. Идентифицированные пептиды способствуют устранению перегрузки тканей железом посредством регуляции уровней гепцидина и ферритина. Экспериментальные и клинические исследования подтверждают перспективность использования препарата для лечения пациентов с перегрузкой железом и в т.ч. с гемосидерозом.

Благодарности

Хроматографическое разделение и масс-спектрометрический анализ пептидов проводили с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ.

Acknowledgements

Chromatographic separation and mass-spectrometry of peptides were performed with the equipment provided by the Center for Collective Usage “Human proteome” (Institute of Biomedical Chemistry).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Liu C., Jiang Z.C., Shao C.X., Zhang H.G., Yue H.M., Chen Z.H., Ma B.Y., Liu W.Y., Huang H.H., Yang J., Wang Y., Liu H.Y., Xu D., Wang J.T., Yang J.Y., Pan H.Q., Zou S.Q., Li F.J., Lei J.Q., Li X., He Q., Gu Y., Qi X.L. Preliminary study of the relationship between novel coronavirus pneumonia and liver function damage: a multicenter study. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2020 Feb 20; 28 (2): 148–152. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2020.02.003>.
2. Болезни перегрузки железом (гемохроматозы). Под ред. А.Г.Румянцев, Ю.Н. Токарева. М. 328 с.
3. Макацария А.Д., Григорьева К.Н., Мингалимов М.А., Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Элалами И., Шкода А.С., Немировский В.Б., Блинов Д.В., Митрюк Д.В. Коронавирусная инфекция (COVID-19) и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания. *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. 2020;14 (2): 123–131. <https://doi.org/10.17749/2313-7347.132>.
4. Громова О.А., Торшин И.Ю., Шаповалова Ю.О., Курцер М.А., Чучалин А.Г. COVID-19 и железодефицитная анемия: взаимосвязи патогенеза

- и терапии. *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. 2020; 14 (5): 644–655. <https://doi.org/10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2020.179..>
5. Торшин И. Ю., Громова О. А. Мировой опыт использования гидролизатов плаценты человека в терапии. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2019; 170 (10): 79–89. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-170-10-79-89>.
6. Максимов В. А., Торшин И. Ю., Чучалин А. Г., Лазебник Л. Б., Ткачева О. Н., Стражеско И. Д., Громова О. А. Эффективность и безопасность полипептидного препарата (Лаеннек) в терапии COVID-19. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2020; 178 (6): 55–63.
7. Кейтс М. Техника липидологии. М. 1975; 322 с.
8. Громова О.А., Торшин И.Ю., Згода В.Г., Тихонова О.В. Комплексный протеомный анализ «легкой» пептидной фракции препарата Церебролизин. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019; 119 (8): 75–83. <https://doi.org/10.17116/jnevro201911908175>.
9. Torshin I.Y., Rudakov K.V. Combinatorial analysis of the solvability

- properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. Part 1: factorization approach. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017; 27 (1): 16–28.
10. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. Part 2: metric approach within the framework of the theory of classification of feature values. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017; 27 (2): 184–199.
11. Torshin I.Y. Optimal dictionaries of the final information on the basis of the solvability criterion and their applications in bioinformatics. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2013; 23 (2): 319–327.
12. Torshin I. Yu., Rudakov K. V. On the theoretical basis of the metric analysis of poorly formalized problems of recognition and classification. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2015; 25 (4): 577–587.
13. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 2: density properties. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2016; 26 (3): 483–496.
14. Torshin I.Y., Rudakov K.V. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. part 1: fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2014; 24 (1): 11–23.
15. Torshin I. Yu., Rudakov K. V. On the Procedures of Generation of Numerical Features Over Partitions of Sets of Objects in the Problem of Predicting Numerical Target Variables. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2019; 29 (4): 654–667. <https://dx.doi.org/10.1134/S1054661819040175>.
16. Faber H.R., Bland T., Day C.L., Norris G.E., Tweedie J.W., Baker E.N. Altered domain closure and iron binding in transferrins: the crystal structure of the Asp60Ser mutant of the amino-terminal half-molecule of human lactoferrin. *J Mol Biol.* 1996 Feb 23; 256 (2): 352–63. <https://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0091>.
17. Громова О.А., Торшин И.Ю., Волков А.Ю., Смарицын С.Н., Назаренко О.А. Препарат «ЛАЕННЕК»: элементный состав и фармакологическое действие. *Пластическая хирургия и косметология*. 2010; 327–333.
18. Chang T.Y., Liu K.L., Chang C.S., Su C.T., Chen S.H., Lee Y.C., Chang J.S. Ferric Citrate Supplementation Reduces Red-Blood-Cell Aggregation and Improves CD163⁺ Macrophage-Mediated Hemoglobin Metabolism in a Rat Model of High-Fat-Diet-Induced Obesity. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Jan; 62 (2).
19. Zhao Q., Garreau I., Sannier F., Piot J.M. Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Biopolymers*. 1997; 43 (2): 75–98.
20. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гришина Т.Р., Томилова И.К. Значение использования препаратов железа и его молекулярных синергистов для профилактики и лечения железодефицитной анемии у беременных. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2015; 15 (4): 85–94. <https://doi.org/10.17116/rosakush201515485-94>.
21. Mollbrink A., Holmström P., Sjöström M., Hultcrantz R., Eriksson L.C., Stål P. Iron-regulatory gene expression during liver regeneration. *Scand J Gastroenterol*. 2012 May; 47 (5): 591–600. <https://doi.org/10.3109/00365521.2012.661761>.
22. De Falco L., Silvestri L., Kannengiesser C., et al. Functional and clinical impact of novel TMPRSS6 variants in iron-refractory iron-deficiency anemia patients and genotype-phenotype studies. *Hum Mutat*. 2014; 35 (11): 1321–1329. <https://doi.org/10.1002/humu.22632>.
23. Niederkofler V., Salie R., Arber S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest*. 2005; 115 (8): 2180–2186. <https://doi.org/10.1172/JCI25683>.
24. Zhang A.S.. Control of systemic iron homeostasis by the hemojuvelin-hepcidin axis. *Adv Nutr*. 2010; 1 (1): 38–45. <https://doi.org/10.3945/an.110.1009>.
25. Core A.B., Canali S., Babitt J.L. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol*. 2014; 5: 104. Published 2014 May 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00104>.
26. Kuninger D., Kuns-Hashimoto R., Nili M., Rotwein P. Pro-protein convertases control the maturation and processing of the iron-regulatory protein, RGMc/hemojuvelin. *BMC Biochem*. 2008; 9: 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-9>.
27. Silvestri L., Pagani A., Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood*. 2008; 111 (2): 924–931.
28. Silvestri L., Pagani A., Nai A., De Domenico I., Kaplan J., Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. 2008; 8 (6): 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.012>.
29. Colucci S., Pagani A., Pettinato M., Artuso I., Nai A., Camaschella C., Silvestri L. The immunophilin FKBP12 inhibits hepcidin expression by binding the BMP type I receptor ALK2 in hepatocytes. *Blood*. 2017 Nov 9; 130 (19): 2111–2120.
30. Chen Y.G., Liu F., Massague J. Mechanism of TGF-beta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J*. 1997 Jul 1; 16 (13): 3866–76. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3866>.
31. Vashisht A.A., Zumbrennen K.B., Huang X., Powers D.N., Durazo A., Sun D., Bhaskaran N., Persson A., Uhlen M., Sangfelt O., Spruck C., Leibold E.A., Wohlschlegel J.A. Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science*. 2009 Oct 30; 326 (5953): 718–21. <https://doi.org/10.1126/science.1176333>.
32. D'Angiolella V., Donato V., Vijayakumar S., Saraf A., Florens L., Washburn M.P., Dynlacht B., Pagano M. SCF(Cyclin F) controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation. *Nature*. 2010 Jul 1; 466 (7302): 138–42. <https://doi.org/10.1038/nature09140>.
33. Rachez C., Gamble M., Chang C.P., Atkins G.B., Lazar M.A., Freedman L.P. The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol Cell Biol*. 2000 Apr; 20 (8): 2718–26. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.8.2718-2726.2000>.
34. Burakov D., Wong C.W., Rachez C., Cheskis B.J., Freedman L.P. Functional interactions between the estrogen receptor and DRIP205, a subunit of the heteromeric DRIP coactivator complex. *J Biol Chem*. 2000 Jul 7; 275 (27): 20928–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002013200>.
35. Gorla-Bajszczak A., Juge-Aubry C., Pernin A., Burger A.G., Meier C.A. Conserved amino acids in the ligand-binding and tau(i) domains of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha are necessary for heterodimerization with RXR. *Mol Cell Endocrinol*. 1999 Jan 25; 147 (1–2): 37–47. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00217-2](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00217-2).
36. Tsuchiya H. Retinoids as promising treatment for non-alcoholic fatty liver disease. *Yakugaku Zasshi*. 2012; 132 (8): 903–9. <https://doi.org/10.1248/yakushi.132.903>.
37. Citelli M., Bittencourt L.L., da Silva S.V., Pierucci A.P., Pedrosa C. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res*. 2012 Oct; 149 (1): 64–70. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9397-6>.
38. Jiang S., Wang C.X., Lan L., Zhao D. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. *Nutrition*. 2012 Mar; 28 (3): 281–7. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.015>.
39. Li X., Liu Y., Zheng Q., Yao G., Cheng P., Bu G., Xu H., Zhang Y.W. Ferritin light chain interacts with PEN-2 and affects γ -secretase activity. *Neurosci Lett*. 2013 Aug 26; 548: 90–4. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.05.018>.

40. Назаренко О.А., Громова О.А., Гришина Т.Р., Торшин И.Ю., Демидов В.И., Томилова И.К., Алексахина Е.Л., Гоголева И.В. Коррекция Лаеннеком хронической перегрузки железом печени, почек и головного мозга. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2017; 2: 39–44.

41. Временные методические рекомендации МЗ РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», 5-я версия от 08.04.2020.

42. Громова О.А., Торшин И.Ю., Хаджидис А.К. Нежелательные эффекты сульфата железа в акушерской, педиатрической и

терапевтической практике. *Земский врач*. 2010; 2: 1–8.

43. Хизроева Д.Х., Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Третьякова М.В., Слуханчук Е.В., Элалами И., Гри Ж., Радецкая Л.С., Макацария Н.А., Сулина Я.Ю., Цибизова В.И., Шкода А.С., Блинов Д.В. Лабораторный мониторинг COVID-19 и значение определения маркеров коагулопатии. *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. 2020; 14 (2): 132–147. <https://doi.org/10.17749/2313-7347.141>.

REFERENCES:

1. Liu C., Jiang Z.C., Shao C.X., Zhang H.G., Yue H.M., Chen Z.H., Ma B.Y., Liu W.Y., Huang H.H., Yang J., Wang Y., Liu H.Y., Xu D., Wang J.T., Yang J.Y., Pan H.Q., Zou S.Q., Li F.J., Lei J.Q., Li X., He Q., Gu Y., Qi X.L. Preliminary study of the relationship between novel coronavirus pneumonia and liver function damage: a multicenter study. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2020 Feb 20; 28 (2): 148–152. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2020.02.003>.

2. Iron overload diseases (hemochromatosis). Ed. A.G. Romyantseva, Yu.N. Tokarev. Moscow. 328 p. (in Russ.).

3. Makatsariya A.D., Grigorieva K.N., Mingalimov M.A., Bitsadze V.O., Khizroeva J.Kh., Tretyakova M.V., Elalamy I., Shkoda A.S., Nemirovskiy V.B., Blinov D.V., Mityuk D.V. Coronavirus disease (COVID-19) and disseminated intravascular coagulation. *Akusherstvo, Ginekologiya i Reproduktsiya = Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2020; 14 (2): 123–131. (In Russ.). <https://doi.org/10.17749/2313-7347.132>.

4. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Shapovalova Yu.O., Kurtser M.A., Chuchalin A.G. COVID-19 and iron deficiency anemia: relationships of pathogenesis and therapy. *Akusherstvo, Ginekologiya i Reproduktsiya = Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2020; 14 (5): 644–655. <https://doi.org/10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2020.179>.

5. Torshin I.Yu., Gromova O.A. Worldwide experience of the therapeutic use of the human placental hydrolytes. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019; 1(10):79–89. (In Russ.) <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-170-10-79-89>.

6. Maksimov V. A., Torshin I. Yu., Chuchalin A. G., Lazebnik L. B., Tkacheva O. N., Strazhesko I. D., Gromova O. A. The effectiveness and safety of a polypeptide drug (Laennec) for the treatment of COVID-19. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2020; 178 (6): 55–63. (In Russ.).

7. Kates M. Technique of lipidology. Moscow. 1975; 322 p.

8. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Zgoda V.G., Tikhonova O.V. An analysis of the peptide composition of a «light» peptide fraction of Cerebrolysin. S.S. Korsakov *Journal of Neurology and Psychiatry = Zhurnal Nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2019; 119 (8): 75–83. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/jnevro201911908175>.

9. Torshin I.Y., Rudakov K.V. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. Part 1: factorization approach. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017; 27 (1): 16–28.

10. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. Part 2: metric approach within the framework of the theory of classification of feature values. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017; 27 (2): 184–199.

11. Torshin I.Y. Optimal dictionaries of the final information on the basis of the solvability criterion and their applications in bioinformatics. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2013; 23 (2): 319–327.

12. Torshin I. Yu., Rudakov K. V. On the theoretical basis of the metric analysis of poorly formalized problems of recognition and classification. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2015; 25 (4): 577–587.

13. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 2: density properties. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2016; 26 (3): 483–496.

14. Torshin I.Y., Rudakov K.V. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. part 1: fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2014; 24 (1): 11–23.

15. Torshin I. Yu., Rudakov K. V. On the Procedures of Generation of Numerical Features Over Partitions of Sets of Objects in the Problem of Predicting Numerical Target Variables. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2019; 29 (4): 654–667. <https://dx.doi.org/10.1134/S1054661819040175>.

16. Faber H.R., Bland T., Day C.L., Norris G.E., Tweedie J.W., Baker E.N. Altered domain closure and iron binding in transferrins: the crystal structure of the Asp60Ser mutant of the amino-terminal half-molecule of human lactoferrin. *J Mol Biol*. 1996 Feb 23; 256 (2): 352–63. <https://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0091>.

17. Gromova O.A., Torshin I.YU., Volkov A.YU., Smarygin S.N., Nazarenko O.A. The drug “LAENNEK”: elemental composition and pharmacological action. *Plasticheskaya khirurgiya i kosmetologiya*. 2010; 327–333. (In Russ.)

18. Chang T.Y., Liu K.L., Chang C.S., Su C.T., Chen S.H., Lee Y.C., Chang J.S. Ferric Citrate Supplementation Reduces Red-Blood-Cell Aggregation and Improves CD163⁺ Macrophage-Mediated Hemoglobin Metabolism in a Rat Model of High-Fat-Diet-Induced Obesity. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Jan; 62 (2).

19. Zhao Q., Garreau I., Sannier F., Piot J.M. Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Biopolymers*. 1997; 43 (2): 75–98.

20. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Grishina T.R., Tomilova I.K. Value of the use of iron preparations and molecular synergists for the prevention and treatment of iron-deficiency anemia in pregnant women. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2015; 15 (4): 85–94. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/rosakush201515485-94>.

21. Mollbrink A., Holmström P., Sjöström M., Hultcrantz R., Eriksson L.C., Stål P. Iron-regulatory gene expression during liver regeneration. *Scand J Gastroenterol*. 2012 May; 47 (5): 591v600. <https://doi.org/10.3109/00365521.2012.661761>.

22. De Falco L., Silvestri L., Kannengiesser C., et al. Functional and clinical impact of novel TMPRSS6 variants in iron-refractory iron-deficiency anemia patients and genotype-phenotype studies. *Hum Mutat*. 2014; 35 (11): 1321–1329. <https://doi.org/10.1002/humu.22632>.

23. Niederkofler V., Salie R., Arber S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest*. 2005; 115 (8): 2180–2186. <https://doi.org/10.1172/JCI25683>.

24. Zhang A.S.. Control of systemic iron homeostasis by the hemojuvelin-hepcidin axis. *Adv Nutr*. 2010; 1 (1): 38–45. <https://doi.org/10.3945/an.110.1009>.

25. Core A.B., Canali S., Babitt J.L. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis.

- Front Pharmacol.* 2014; 5: 104. Published 2014 May 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00104>.
26. Kuninger D., Kuns-Hashimoto R., Nili M., Rotwein P. Pro-protein convertases control the maturation and processing of the iron-regulatory protein, RGMc/hemojuvelin. *BMC Biochem.* 2008; 9: 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-9>.
27. Silvestri L., Pagani A., Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood.* 2008; 111 (2): 924–931.
28. Silvestri L., Pagani A., Nai A., De Domenico I., Kaplan J., Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab.* 2008; 8 (6): 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.012>.
29. Colucci S., Pagani A., Pettinato M., Artuso I., Nai A., Camaschella C., Silvestri L. The immunophilin FKBP12 inhibits hepcidin expression by binding the BMP type I receptor ALK2 in hepatocytes. *Blood.* 2017 Nov 9; 130 (19): 2111–2120.
30. Chen Y.G., Liu F., Massague J. Mechanism of TGF-beta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.* 1997 Jul 1; 16 (13): 3866–76. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3866>.
31. Vashisht A.A., Zumbrennen K.B., Huang X., Powers D.N., Durazo A., Sun D., Bhaskaran N., Persson A., Uhlen M., Sangfelt O., Spruck C., Leibold E.A., Wohlschlegel J.A. Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science.* 2009 Oct 30; 326 (5953): 718–21. <https://doi.org/10.1126/science.1176333>.
32. D'Angiolella V., Donato V., Vijayakumar S., Saraf A., Florens L., Washburn M.P., Dynlacht B., Pagano M. SCF(Cyclin F) controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation. *Nature.* 2010 Jul 1; 466 (7302): 138–42. <https://doi.org/10.1038/nature09140>.
33. Rachez C., Gamble M., Chang C.P., Atkins G.B., Lazar M.A., Freedman L.P. The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol Cell Biol.* 2000 Apr; 20 (8): 2718–26. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.8.2718-2726.2000>.
34. Burakov D., Wong C.W., Rachez C., Cheskis B.J., Freedman L.P. Functional interactions between the estrogen receptor and DRIP205, a subunit of the heteromeric DRIP coactivator complex. *J Biol Chem.* 2000 Jul 7; 275 (27): 20928–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002013200>.
35. Gorla-Bajszczak A., Juge-Aubry C., Pernin A., Burger A.G., Meier C.A. Conserved amino acids in the ligand-binding and tau(i) domains of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha are necessary for heterodimerization with RXR. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 Jan 25; 147 (1–2): 37–47. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00217-2](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00217-2).
36. Tsuchiya H. Retinoids as promising treatment for non-alcoholic fatty liver disease. *Yakugaku Zasshi.* 2012; 132 (8): 903–9. <https://doi.org/10.1248/yakushi.132.903>.
37. Citelli M., Bittencourt L.L., da Silva S.V., Pierucci A.P., Pedrosa C. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 2012 Oct; 149 (1): 64–70. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9397-6>.
38. Jiang S., Wang C.X., Lan L., Zhao D. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. *Nutrition.* 2012 Mar; 28 (3): 281–7. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.015>.
39. Li X., Liu Y., Zheng Q., Yao G., Cheng P., Bu G., Xu H., Zhang Y.W. Ferritin light chain interacts with PEN-2 and affects γ -secretase activity. *Neurosci Lett.* 2013 Aug 26; 548: 90–4. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.05.018>.
40. Nazarenko O.A., Gromova O.A., Grishina T.R., Torshin I.Yu., Demidov V.I., Tomilova I.K., Aleksakhina E.L., Gogoleva I.V. Correction by Laennec of chronic iron overload liver, kidneys and brain. Pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2017; 2: 39–44. (In Russ.).
41. Temporary guidelines of the Ministry of Health of the Russian Federation “Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)”, 5th version of 08/04/2020 (In Russ.).
42. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Hadzhidis A.K. Adverse effects of iron sulfate in obstetrics, pediatrics and therapeutics. *Zemskij vrach.* 2010; 2: 1–8. (In Russ.).
43. Khizroeva J.Kh., Makatsariya A.D., Bitsadze V.O., Tretyakova M.V., Slukhanchuk E.V., Elalamy I., Gris J.-C., Radetskaya L.S., Makatsariya N.A., Sulina Ya.Yu., Tsibizova V.I., Shkoda A.S., Blinov D.V. Laboratory monitoring of COVID-19 patients and importance of coagulopathy markers. *Akusherstvo, Ginekologiya i Reproduktsiya = Obstetrics, Gynecology and Reproduction.* 2020; 14 (2): 132–147. (In Russ.). <https://doi.org/10.17749/2313-7347.141>.

Сведения об авторах:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., проф., в.н.с., научный руководитель Института фармакоинформатики, ФИЦ «Информатика и Управление» РАН; в.н.с. Центра хранения и анализа больших данных, МГУ. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>; Scopus Author ID: 7003589812; WoS Researcher ID: J-4946-2017; РИНЦ SPIN-код: 6317-9833; eLIBRARY ID: 94901. E-mail: unesco.gromova@gmail.com.

Торшин Иван Юрьевич – к.ф.-м.н., к.х.н., с.н.с., Институт фармакоинформатики, ФИЦ «Информатика и Управление» РАН. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>; Scopus Author ID: 7003300274; WoS Researcher ID: C-7683-2018; РИНЦ SPIN-код: 1375-1114; eLIBRARY ID: 54104.

Максимов Валерий Алексеевич – д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, заслуженный врач Российской Федерации, профессор кафедры диетологии и нутрициологии ФГБОУ ДПО РМАНПО. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4120-1071>.

Чучалин Александр Григорьевич – д.м.н., академик РАН, пульмонолог, заведующий кафедрой госпитальной терапии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5070-5450>.

Згода Виктор Гаврилович – д.б.н., Центр коллективного пользования «Протеом человека», ИБМХ им. В.Н. Ореховича. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4532-4274>.

Тихонова Ольга Валентиновна – к.б.н., Центр коллективного пользования «Протеом человека», ИБМХ им. В.Н. Ореховича. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2810-566X>.

About the authors:

Olga A. Gromova – MD, Dr Sci Med, Professor, Senior Researcher, Scientific Director of the Federal Research Center “Informatics and Management”, Russian Academy of Sciences; Leading Researcher, Center for Big Data Analysis, Moscow State University. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>; Scopus Author ID: 7003589812; WoS Researcher ID: J-4946-2017; RSCI SPIN-code: 6317-9833; eLIBRARY ID: 94901. E-mail: unesco.gromova@gmail.com.

Ivan Yu. Torshin – MD, PhD, Senior Researcher, Federal Research Center “Informatics and Management”, Russian Academy of Sciences; Big Data Storage and Analysis Center, Moscow State University. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>; Scopus Author ID: 7003300274; WoS Researcher ID: C-7683-2018; RSCI SPIN-code: 1375-1114; eLIBRARY ID: 54104.

Valery A. Maksimov – MD, Dr Sci Med, Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Honored Doctor of the Russian Federation; Professor of the Department of Dietetics and Nutrition, Russian Medical Academy of Postgraduate Education. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4120-1071>.

Alexander G. Chuchalin – MD, Dr Sci Med, Academician of the Russian Academy of Sciences, Pulmonologist, Head of the Department of Hospital Therapy of the Pediatric Faculty of the Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5070-5450>.

Victor G. Zgoda – MD, Dr Sci Med, Center for collective use “Human Proteome”, IBMC. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4532-4274>.

Olga V. Tikhonova – PhD (Biology), Center for collective use “Human Proteome”, IBMC. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2810-566X>