

УДК 577.27+616.12-008.46-071

© Коллектив авторов, 2009

АНАЛИЗ АУТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ В СЫВОРОТКАХ БОЛЬНЫХ КАРДИОМИОПАТИЯМИ

А. М. Воробьева, Е. Я. Беспалова, Л. Л. Сидорик, В. И. Бобык

Национальный институт сердечно - сосудистой хирургии им. Н.М.Амосова АМН Украины, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины г. Киев.

ANALYSIS OF AUTOIMUNE REACTIONS IN SERA OF PATIENTS WITH CARDIOMYOPATIES

A. M. Vorobyova, E. Y. Bespalova, L. L. Sidorik, V. I. Bobyk

SUMMARY

The aim of investigations was to study the peculiarities of expression of molecular chaperons Hsp90, Hsp60 and Sgt-1 as autoantigens in dilated (DCM) and ischemic (ICM) cardiomyopathies in comparison with healthy donors (HD). The specific autoantibodies level was conducted by ELISA method. The anti-Hsp90 and anti-Sgt-1 antibodies level in all groups investigated was considerably and significantly higher than in control HD group. ore increased level of these antibodies was evaluated in sera of DCM patients. Conducted analysis showed that in majority of patients in all groups sera were antibody-positive. We proposed that specific anti-HSPs antibodies level changes could serve as diagnostic marker for cardiomyopathies of different genesis.

АНАЛІЗ АУТОІМУННИХ РЕАКЦІЙ У СИРОВАТКАХ ХВОРИХ НА КАРДІОМІОПАТІЇ

Г. М. Воробйова, О. Я. Беспалова, Л. Л. Сидорик, В. І. Бобик

РЕЗЮМЕ

В статті представлені дані по особливостям експресії молекулярних шаперонів Hsp90, Hsp60 і Sgt-1 як аутоантигенів при дилатаційній і ішемічній кардіоміопатії. Проведено порівняльний аналіз змін рівнів специфічних анти-Hsp90, анти-Hsp60 і анти-Sgt-1 аутоантитіл в сироватках крові хворих на ДКМП, ІКМП, ІХС+ІМ та практично здорових донорів. Виявлено найбільш імунореактивні антигени (Hsp90 і Sgt-1) і показано, що ДКМП має найвищий рівень специфічних аутоантитіл проти всіх тестованих стресових білків у порівнянні з іншими дослідженими патологіями. В умовах стресу важливе значення для функціонування кардіоміоцитів мають молекулярні шаперони Hsp90, Hsp60 і Sgt-1. Висунуто припущення, що зміни рівня специфічних анти-Hsp90, анти-Hsp60 і анти-Sgt-1 аутоантитіл можуть бути діагностичним маркером розвитку аутоімунного захворювання у хворих кардіоміопатіями.

Ключевые слова: кардиомиопатия, аутоантитела, молекулярные шапероны.

Сердечная недостаточность (Heart failure) считается важнейшей мировой проблемой кардиоваскулярной биологии и медицины, забирающей ежегодно больше жизней, чем все онкологические и инфекционные заболевания.

Особое внимание при изучении механизмов сердечной недостаточности привлекают различные кардиомиопатии, которые характеризуются, согласно классификации ВООЗ, как первичные заболевания сердечной мышцы неизвестной этиологии. Несмотря на распространенность кардиомиопатий, морфогенетические и молекулярные механизмы развития заболевания, приводящие к дисфункции миокарда, изучены недостаточно.

В последние годы доказана важная патогенетическая роль аутоиммунных процессов и выявлен целый ряд аутоантигенов при ДКМП [1-3]. Идентифицировано около 100 белков миокарда со значительными альтерациями в экспрессии при ДКМП: цитоскелетные и миофибриллярные белки, протеины, ассоциированные с продукцией энергии митохондриями и белки стресса или молекулярные шапероны (HSPs). HSPs – это семейство высококонсервативных белков, отвечающие за корректный белковый фолдинг, транспорт предшественников органелльных белков в соответствующие клеточные компартмен-

ты, формирование стресс-индуцированных регуляторных сигнальных каскадов, протеасомную деградацию убиквитинированных белков и презентацию эндогенных клеточных антигенов.

В последнее десятилетие накоплено множество данных, подтверждающих потенциальную кардиопротекторную роль основного цитоплазматического шаперона Hsp70 при ишемии, термошоке и экспериментальном инфаркте у животных. Более того, суперэкспрессия Hsp70 у трансгенных животных улучшала сердечную функцию, поддерживала выживание и уменьшала размеры инфарктных зон после экспериментальной ишемии/реперфузии [4, 5]. Эти результаты и полученные нами данные об изменении уровней анти-Hsp70 и анти-Hsp60 аутоантител в сыворотках пациентов с ДКМП, а также изменение экспрессии и клеточной локализации шаперонов семейств Hsp70 и Hsp60 в пораженном ДКМП миокарде [6, 7] позволили нам предположить, что выявленные изменения могут быть существенны и для развития постинфарктной ишемической кардиомиопатии. Особый интерес в этой связи представляют семейства Hsp60, Hsp90 и ко-шаперона Sgt-1 как потенциальные регуляторы проапоптозных сигнальных каскадов кардиомиоцитов, синтеза провоспалительных цитокинов и модуляторов иммунного отве-

та. Множество данных свидетельствуют о том, что появление и продукция натуральных каталитических антител строго ассоциирована с патологическими условиями.

Поэтому целью данной работы было выявление взаимосвязи развития аутоиммунных повреждений с нарушением антистрессовой защиты миокарда у больных кардиомиопатиями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований была сыворотка крови больных кардиомиопатиями: I группа - больные дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) - 23 пациента; II группа - больные ишемической кардиомиопатией (ИКМП) - 18 пациентов; III группа - больные (n=23) в анамнезе которых на фоне ишемической болезни сердца (ИБС) было перенесено 2-3 инфаркта миокарда (ИМ) - (ИБС+ИМ); IV группа - контрольная, 15 практически здоровых лиц. Сыворотки крови пациентов хранили в 50% глицерине при -20°C.

Возраст больных составил 58,2±2,4 лет.

Конечный диастолический объем (КДО) и конечный систолический объем (КСО): I группа больных - (КДО) 258,3±22,3 мл, (КСО) 116,3±14,1 мл. II группа: (КДО) 245,3±2,3 мл, (КСО) 189,6±14, мл. III группа: (КДО) 275,3±19,8 мл, (КСО) 199,6±16,9 мл. IV группа: (КДО) 100,0 мл, (КСО) 40,0 мл.

Фракция выброса (ФВ) в I группе была 26,6±2,2 %; во II группе - 32,9±3,83 %; в III группе - 28,9±1,83 %; в IV группе - 64,5±3,7 %. У всех больных была выражена застойная сердечная недостаточность 3-4 функционального класса (по классификации Нью-Йоркской ассоциации сердца NYHA). Длительность течения заболевания ДКМП от 2-х до 3-х лет, ИКМП - 5-8 лет, ИБС с ИМ до 10 лет (в анамнезе 2-3 ИМ).

Первым этапом чего было определение и сравнительный анализ уровня специфических циркулирующих аутоантител против белков Hsp60, Hsp90 и ко-шаперона Sgt-1 в сыворотках больных с кардиомиопатиями разного генеза.

В качестве антигенов были взяты белки семейств молекулярных шаперонов Hsp90, Hsp60 и ко-шаперон Sgt-1. Препарат Hsp90 из мозга быка и рекомбинантного Sgt-1 любезно предоставлены профессором Я. Кузницким (Международный Институт молекулярной и клеточной биологии, Варшава, Польша) и профессором А. Филипек (Институт биохимии Польской Академии Наук им. проф. Ненского, Варшава, Польша).

Рекомбинантный белок GroEL (прокариотический гомолог эукариотического шаперона Hsp60) получен по разработанному нами методу [8]. Чистоту белков контролировали электрофорезом в 12% ПААГе в денатурирующих условиях по Лэммли [9]. Концентрацию белков измеряли по методу Брэдфорд [10].

Уровень специфических анти-Hsp90, анти-Hsp60 и анти-Sgt-1 аутоантител в сыворотках крови пациентов и практически здоровых доноров определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) как описано в [11].

Статистическая обработка результатов с использованием пакета статистических программ «STATISTICA for Windows 5.1». Для оценки достоверности разницы показателей использовали t-критерий Стьюдента и Mann-Whitney U тест. Значение $p < 0,05$ рассматривали как критерий достоверности разницы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно для идентификации аутоантигена необходимым является изучение его иммуногенности, то есть определение уровня циркулирующих специфических аутоантител.

В таблице 1 представлены результаты сравнительного анализа уровня аутоантител против белков семейств молекулярных шаперонов Hsp90, Hsp60 и ко-шаперона Sgt-1 в сыворотках пациентов исследуемых групп.

Таблица 1

Выявление аутоантител к стрессовым белкам у больных кардиомиопатиями

Показатель, ЕД	ДКМП n = 23	ИКМП n = 18	ИБС+ИМ n = 23	Контрольная группа, n = 15
Анти-Hsp60	1,28±0,04*	0,64±0,03*#	0,58±0,05*#	0,13±0,018
Анти-Hsp90	1,81±0,08*	1,45±0,06*#	1,34±0,07*#	0,28±0,02
Анти-Sgt-1	1,80±0,07*	1,57±0,05*#	1,47±0,06*#	0,25±0,02

Примечание: P* < 0,05 по сравнению с контрольной группой; P# < 0,05 по сравнению с ДКМП.

Из представленной таблицы 1 видно, что уровень специфических анти-Hsp60, анти-Hsp90 и анти-Sgt-1 аутоантител в группе больных ДКМП и с ИКМП был значительно и достоверно выше, чем в группе боль-

ных ИБС+ИМ, хотя уровень данных аутоантител последней группы был также достоверно увеличен по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$. При этом более чем 85% сывороток во всех исследуемых груп-

пах были антитело-позитивными.

Сравнительный анализ показал, что наиболее высоким оказался уровень аутоантител против Hsp90 и Sgt-1 и в сыворотках крови пациентов с ДКМП (в 1,25 раза выше, чем в группе ИКМП, и в 1,35 раза выше, чем в группе ИБС+ИМ). Уровень анти-Hsp60 аутоантител был ниже почти в 2 раза в сыворотках крови пациентов с ИКМП и ИБС+ИМ как по сравнению с сыворотками ДКМП пациентов, так и в сравнении с уровнем анти-Hsp90 и анти-Sgt-1 аутоантител во всех исследуемых группах.

Ранее нами был обнаружен повышенный уровень циркулирующих анти-Hsp60 и анти-Hsp90 аутоантител в сыворотках крови больных ДКМП в сравнении со здоровыми донорами, что сопровождалось изменением как экспрессии данных белков, так и их клеточной локализации [12]. Исходя из важной роли молекулярных шаперонов не только в антистрессовом ответе клетки, но и в регуляции большинства жизненно важных процессов, включая регуляцию сигнальных каскадов в иммунокомпетентных клетках, мы предполагаем существенную роль молекулярных шаперонов в регуляции аутоиммунных процессов при сердечной недостаточности.

В последнее десятилетие установлено, что аутоантитела против компонентов сердечной мышцы являются неспецифическими маркерами ее повреждения и могут участвовать в различных физиологических процессах, таких как блокирование и удаление инфекционных агентов и ксенобиотиков, элиминация стареющих клеток [13]. Оказалось, что натуральные антитела способны проникать не только через клеточные, но и ядерные мембраны, блокируя либо активируя соответствующие антигены-мишени в клетке [14], нарушая, таким образом, жизнедеятельность клетки. Известно, что при системных и органо-специфических аутоиммунных патологиях репертуар натуральных антител содержит полиспецифические аутоантитела против собственных антигенов или мимикрирующих эпитопов собственных тканей. Более того, аутоиммунные патологии часто ассоциированы с активной продукцией разных абзимов (антиидиопатических антител с каталитической активностью – ДНК гидролизующих или протеолитических), которые синтезируются против многих своих или чужеродных антигенов и, таким образом, могут вовлекаться в процесс аутоиммунного поражения миокарда при прогрессирующей сердечной недостаточности. Недавно нами были обнаружены в сыворотках больных аутоиммунным миокардитом аутоантитела с протеолитической активностью, которые гидролизуют специфические аутоантигены, в частности, скелетный и сердечный миозин, и проникая в клетки-мишени, представляли собой дополнительный источник появления новых или модифицированных пептидов, которые вместе с продуктами апоптоза способны гипотетически индуцировать и

поддерживать аутоиммунный процесс [15].

В этой связи изучение возможной патофизиологической роли аутоантител против стрессовых белков представляет не только теоретический, но и практический интерес. Идентификация и исследование их биологической активности, включая поиск возможных партнеров и антигенов-мишеней, поможет лучше понять механизмы прогрессирования, а возможно и развития миокардиального повреждения.

Таким образом, проведенные нами исследования могут служить теоретическим базисом для создания новых прогностических показателей развития кардиомиопатий разного генеза, которые помогут выделить категорию больных с неблагоприятным прогнозом заболевания как у группы больных ДКМП, так и больных ИКМП. Диагностика уровня специфических анти-Hsp60, анти-Hsp90 и анти-Sgt-1 аутоантител может способствовать объективизации диагноза и успешному проведению необходимой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fatkin D. Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies / Fatkin D., Graham R. // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol.82. – P.945-980.
2. Fu M., Matsui S. Is cardiomyopathy an autoimmune disease? // *Keio J. Med.* – 2002. – Vol.4. – P. 208-212.
3. Caforio A.C Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression / Caforio A.C., Yoidman Y.A., Baig M.K. et al // *Heart.* – 1997.- Vol. 77.- P. 62-67.
4. Donnelly TJ. Heat shock protein induction in rat hearts: a role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion. / Donnelly TJ, Sievers RE, Vissein FL, Welch WJ, Wolfe CL // *Circ* 1992; 85: 769-76.
5. Snoeckx LHEH. Heat Shock Proteins and Cardiovascular Pathophysiology. / Snoeckx LHEH, Cornelusson RN, VanNieuwenhoven FA, Reneman RS, VanderVusse GJ. // *Physiol Rev* 2001; 8: 1461-97.
6. Сидорик Л.Л. Изучение роли Hsp70 при дилатационной кардиомиопатии/ Сидорик Л.Л., Федорова О.М., Вигонтина О.Г., Бобык В.И. и др. // *Укр.-кардиол.ж.* – 2002. – N 5. – С.345-352
7. Vigontina OG. Shaperon Hsp60 as autoantigen at development of dyshormonal breast diseases/ Vigontina OG, Efimenko OA, Yakovenko LF, Kyuyamova RG, Filonenko VV, et al. // *Экспер. онкология.* – 2002. – N2. – С.112-115. 2002; 2: 112-115.
8. Капустян Л.Н. Получение рекомбинантного GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 / Капустян Л.Н., Киямова Р.Г., Гришкова В.С., Терентьев А.Г., Филоненко В.В., Сидорик Л.Л. // *Біополімери та клітина.* – 2006. – т.22, N 2. – С. 117-120.
9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage / Laemmli UK. // *T4. Nature* 1970; 227: 680-685.

10. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. / Bradford M. // *Anal Biochem* 1976; 46: 193-200.

11. Matsiota P. Natural autoantibodies in systems lupus erythematosus / Matsiota P., Druet P., Dosguet P., Zuilbert B. S. Avrameas, *Unite Immunocytochimie. Department Immunologie. Institut Pasteur Paris Clin Exp Immunol.* – 1987. - V.69.- P.79-88.

12. Капустян Л.Н. Hsp90 как аутоантиген при дилатационной кардиомиопатии / Капустян Л.Н., Рябенко Д.В., Вигонтина О.Г., Рожко О.Т. и др. // *Укр.-кардиол.ж.* – 2008. – 6. – С. 75-78.

13. Zimas E.J. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy- A pathogenetic role/ Zimas C.J. // *Circulation.* – 1997. – Vol.95. – P.1979-1980.

14. Ruiz-Arguelles A. Penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells / Ruiz-Arguelles A., Perez-romano B., Llorente L., Alarcon-Segovia D., Castellanos J. // *J Autoimmun.* - 1998. - Vol.11, №5. - P.547-556.

15. Ponomarenko N. Catalytic antibodies in clinical and experimental pathology: human and mouse models / Ponomarenko N., Durova O., Vorobiev I., Alexandrova E., Telegin G., Chamborant O., Sidorik L., Suchkov S., Alekberova Z., Gnuchev N., Gabibov A. // *J.Immunol.Methods.* – 2002. – v.269. – P.197-211.