

Сравнительное исследование иммунореактивности тропонинового комплекса при дилатационной и ишемической кардиомиопатиях

Л. Л. Сидорик, О. М. Федоркова, Д. В. Рябенко¹, В. И. Бобык,
В. М. Данилова², В. С. Трегубов², Г. Х. Мацука

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹ Институт кардиологии им. акад. Н. Д. Стражеско АМН Украины
Ул. Народного ополчения, 5, Киев, 03151, Украина

² НИИ физиологии им. акад. Петра Богача Киевского университета им. Тараса Шевченко
Пр. Глушкова, 2, корп. 12, Киев, 03022, Украина

Изучены особенности иммунного ответа против тропонинового комплекса, выделенного из миокарда желудочков сердца, у больных с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) и пациентов с кардиомегалией ишемического генеза (ИКМП). Выявлено, что в сыворотках больных с ДКМП титры антител против антигенов тропонинового комплекса достоверно выше, чем у больных с ИКМП и в группе здоровых доноров. Наиболее иммуногенным из изучавшихся антигенов является тропониновый комплекс, выделенный из миокарда больного с ДКМП.

Введение. В соответствии с современным определением кардиомиопатии — это болезни миокарда, связанные с нарушением функции сердца. Одной из наиболее распространенных кардиомиопатий является дилатационная (ДКМП), которая характеризуется расширением и нарушением сократимости левого желудочка или обоих желудочков сердца [1]. За последнее десятилетие выявлен ряд этиологических факторов ДКМП, изучены возможные пути наследования и механизмы развития данного заболевания. В настоящее время наиболее широкое распространение получила вирусно-иммунологическая теория, согласно которой одним из важных патогенетических механизмов формирования ДКМП является развитие аутоиммунных реакций [2, 3]. Имеются данные о присутствии в сыворотках больных с ДКМП аутоантител (АТ) к различным антигенам сердца [3—6]. Одним из главных аутоантигенов при ДКМП принято считать миозин

[4, 5]. Данный белок в комплексе с актином играет ключевую роль в процессах сокращения сердечной мышцы. Однако помимо сократительных белков важное значение для осуществления процессов сокращения и расслабления миокарда имеет комплекс регуляторных белков — тропониозин (ТМ) и семейство тропонинов (Тн). Комплекс ТМ—Тн наиболее существен в регуляции кальций-чувствительного взаимодействия актина и миозина. В ряде исследований было показано, что мутации генов α -ТМ и Тн-Т могут приводить к развитию семейной гипертрофической кардиомиопатии.

Показано также наличие АТ против ТМ в сыворотках больных с ДКМП [6, 7]. В наших предыдущих исследованиях изучены особенности иммунных реакций против актина, миозина и ТМ при ДКМП [8, 9]. Логичным продолжением данных работ является исследование белков Тн-комплекса как возможных аутоантигенов при ДКМП.

Цель настоящего исследования состояла в изучении особенностей иммунного ответа против тропонинового комплекса миокарда при ДКМП.

Материалы и методы. Исследованы сыворотки

© Л. Л. СИДОРИК, О. М. ФЕДОРКОВА, Д. В. РЯБЕНКО,
В. И. БОБЫК, В. М. ДАНИЛОВА, В. С. ТРЕГУБОВ,
Г. Х. МАЦУКА, 2000

62 больных с ДКМП и 34 пациентов с кардиомега- лией, развившейся в результате хронической ише- мической болезни сердца (ИКМП) и 21 практиче- ски здорового донора (ЗД). Обследование и лечение больных проводили в Украинском институте карди- ологии им. Н. Д. Стражеско АМН Украины. Диаг- ноз ДКМП устанавливали согласно рекомендациям ВОЗ [10] с помощью клинических, инструменталь- ных и лабораторных методов исследования.

В качестве антигенов (АГ) использовали белки Тн-комплекса, выделенные из миокарда: а) боль- ных, умерших в результате ДКМП (ТнД); б) больных, умерших в результате ИКМП (ТнК); в) практически здорового человека, погибшего в ре- зультате случайной травмы (ТнН).

Патологоанатомический материал предостав- лен Украинским институтом кардиологии им. Н. Д. Стражеско АМН Украины.

Выделение тропонинового комплекса миокар- да. Тропонин выделяли по методу [11]. Все опера- ции производили на холоде. Навеску измельченно- го миокарда суспендировали в трех объемах раство- ра, содержащего 0,3 М сахарозу, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ NaN_3 , 0,2 мМ фенилметилсульфо- нилфторид (ФМСФ). Осадок отделяли центрифуги- рованием при 4500 g в течение 10 мин. Промывку продолжали тремя объемами раствора следующего состава: 20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 50 мМ КCl, 10 мМ ЭДТА, 0,2 мМ ФМСФ, 1 мМ NaN_3 , 1 %-й тритон X-100. Из полученного после промывки осадка экстрагировали миозин тремя объемами рас- твора Губа—Штрауба (0,3 М КCl, 0,15 М калий- фосфатный буфер, рН 6,5), содержащего 10 мМ ЭДТА, 0,2 мМ АТР, 1 мМ NaN_3 , 0,2 мМ ФМСФ, 0,01 мг/мл соевого ингибитора трипсина, в течение 30 мин. Полученный после центрифугирования при 10000 g в течение 20 мин осадок отмывали тремя объемами воды, а затем два раза — тремя объема- ми 1 мМ раствора NaHCO_3 , содержащего 0,1 М КCl, 10 мМ ЭДТА, 1 мМ NaN_3 , 0,2 мМ ФМСФ, 0,01 мг/мл соевого ингибитора трипсина. Далее осадок промывали тремя объемами 1 мМ NaHCO_3 . На заключительных этапах следовали промывки одним объемом 1,2 М LiCl и двумя объемами 0,4 М LiCl (осадок отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 20 мин). Тропопиновый комп- лекс экстрагировали из осадка в течение ночи двумя объемами раствора, содержащего 0,4 М LiCl, 10 мМ ЭДТА, 1 мМ NaN_3 , 0,2 мМ ФМСФ, 0,01 мг/мл соевого ингибитора трипсина при рН 5,1. Далее снова доводили рН до 5,1 и центрифугирова- ли на протяжении 30 мин при 10000 g. рН надоса- дочной жидкости доводили до 7,5 1 Н NaOH. Тропопиновый комплекс, осажденный из надоса-

дочной жидкости сернокислым аммонием во фрак- ции 37—47 % насыщения, отделяли центрифуги- рованием (20 мин, 4500 g) и хранили в виде суспензии в течение 1—2 недель. Для более дли- тельного хранения тропопиновый комплекс перево- дили в буфер и хранили в жидком азоте.

Концентрацию белка определяли по Брэдфорду [12]. Электрофорез белков проводили в 14,5 %-м ПААГ в денатурирующих условиях согласно мето- дике, описанной в работе [13].

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Уровень циркулирующих АГ определяли с помощью метода ELISA [14] с модификациями. АГ иммобилизовали в 0,1 М карбонатном буфере, рН 8,2, в течение ночи при температуре 4 °С. Концентрация белка 5 мкг/мл. Плашки трехкратно отмывали от несвязавшегося АГ натрий-фосфат- ным буфером (PBS), рН 7,2, содержащим 0,1 % твина-20 (PBS-T). Сыворотки в соответствующих разведениях в PBS-T буфере наносили на плашки и инкубировали в течение 2 ч при температуре 37 °С или на протяжении ночи — при 4 °С. Несвязав- шийся белок интенсивно отмывали в PBS-T, и плашки инкубировали с конъюгатом анти-IgG че- ловека, меченных пероксидазой хрена (фирма «Ди- апроф», Украина). Результаты реакции визуализи- ровали добавлением субстрата (0,05 мг/мл ABTS с 0,05 % H_2O_2) и определяли количественно на ридере Titertek («Multiscan», Великобритания).

Для выявления АГ-положительных (АГ+) больных использовали значения уровня АГ, превы- шающие аналогичные показатели в группе ЗД на величину двух стандартных отклонений (2 σ).

Статистический анализ. Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет статистических программ «STATISTICA for Windows 5.0» с использованием *t*-критерия Стью- дента и метода ANOVA. Значения $p < 0,05$ рассмат- ривали как критерий достоверности различий.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представ- лена электрофореграмма препаратов Тн, выделен- ных из различных миокардов. Все три препарата имели одинаковую молекулярную массу. Изоелек- трические точки всех трех препаратов были иден- тичными (данные не представлены).

На рис. 2 приведены результаты исследования уровня АГ с помощью ELISA. Видно, что титры АГ против всех трех АГ достоверно выше ($p < 0,001$) в сыворотках больных как с ДКМП, так и с ИКМП по сравнению с аналогичными показателями в группе ЗД. При этом наиболее высокий уровень циркулирующих АГ был выявлен у больных с ДКМП. У данных пациентов превышение уровня АГ ($\Delta\%$) над аналогичными значениями ЗД со-

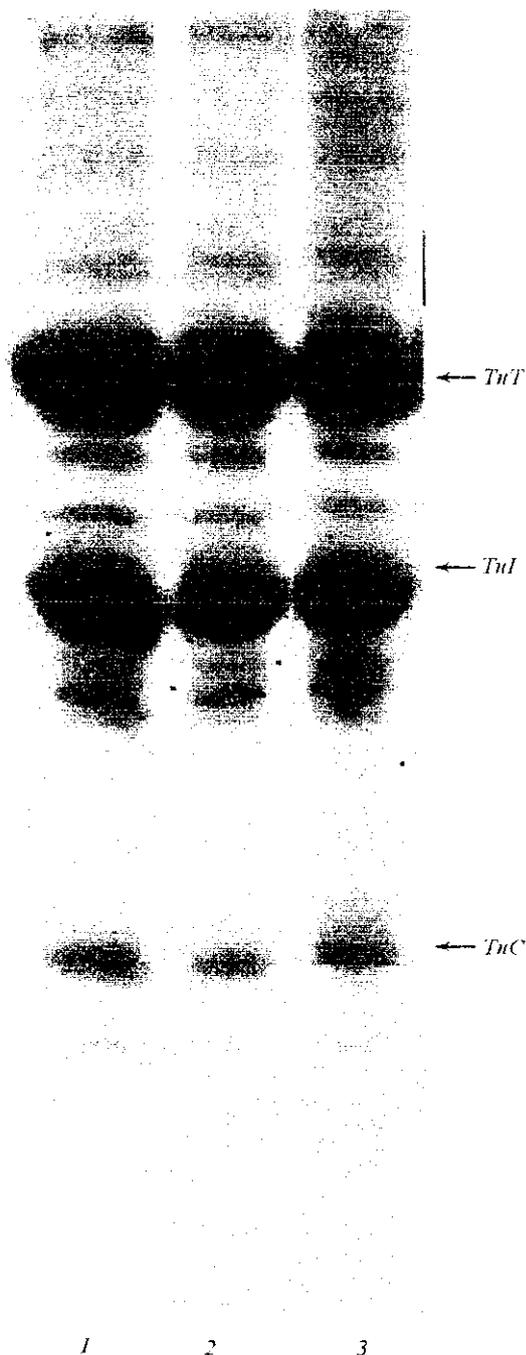


Рис. 1. Электрофореграмма тропонинового комплекса, выделенного из миокардов больных ДКМП (1), ИКМП (2) и практически здорового индивидуума (3)

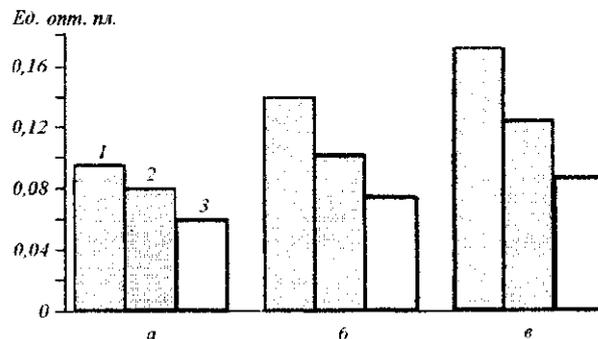


Рис. 2. Титры циркулирующих антител против тропонинового комплекса в сыворотках здоровых доноров (а), больных ИКМП (б), ДКМП (в): 1 — тропониновый комплекс, выделенный из миокарда, пораженного ДКМП; 2 — то же миокарда, пораженного ИКМП; 3 — то же миокарда практически здорового индивидуума

ставляло для ТнД 75,9; для ТнК и ТнН — 57,9 и 48,3 % соответственно и было достоверно выше, чем аналогичные показатели в группе ИКМП ($p < 0,05$) (рис. 2). Сравнительный анализ также показал, что наиболее иммуногенным является ТнД — тропониновый комплекс, выделенный из миокарда больного с ДКМП. Уровни циркулирующих АТ против ТнД во всех трех группах были достоверно выше ($p < 0,01$), чем титры АТ к ТнН и ТнК.

Среди пациентов с ДКМП значительно чаще встречаются АТ+ больные, чем в группе ИКМП (табл. 1, 2). Из рис. 3—5 видно, что во всех трех группах АТ+ больных с ДКМП отмечается наиболее высокий уровень АТ к ТнД. При этом титры АТ ко всем изучавшимся АГ у АТ+ больных с ДКМП значительно выше, чем у АТ+ пациентов с ИКМП.

Полученные данные свидетельствуют о том, что высокий иммунный ответ на Тн-антигены является более характерным для больных с ДКМП по сравнению с больными с кардиомегалией в результате хронической ишемической болезни сердца. Результаты проведенного исследования также позволяют предположить, что наиболее иммуногенным является тропониновый комплекс, выделенный из миокарда больных с ДКМП. В доступной нам литературе мы не смогли найти информации об исследованиях, посвященных изучению данного вопроса. При ДКМП главным образом изучали особенности аутоиммунных реакций против таких внутриклеточных АГ, как миозин и его изоформы,

Таблица 1
Антителоположительные пациенты в группах больных с ДКМП и ИКМП

Антиген	p	Группы АТ-положительных больных			
		ДКМП (n = 62)		ИКМП (n = 34)	
		Количество	%	Количество	%
ТнД	НД	26	42	10	29
ТнК	0,009	18	29	2	6
ТнН	0,009	11	18	0	—

Примечание. ТнД, ТнК и ТнН — тропониновый комплекс, выделенный из миокардов больных ДКМП, ИКМП и практически здорового индивидуума соответственно.

Таблица 2
Превышения уровня АТ (Δ %) над аналогичными значениями здоровых доноров в группах АТ-положительных больных с ДКМП и ИКМП

АТ-положительные больные	Группа больных	Показатели, %		
		Антиген		
		ТнД	ТнК	ТнН
ТнД АТ+	ДКМП	150,9	119,8	86,7
	ИКМП	88,9	36,4	33,1
ТнК АТ+	ДКМП	138,6	165,3	107,6
	ИКМП	48,4	95,7	26,7

Примечание. См табл. 1.

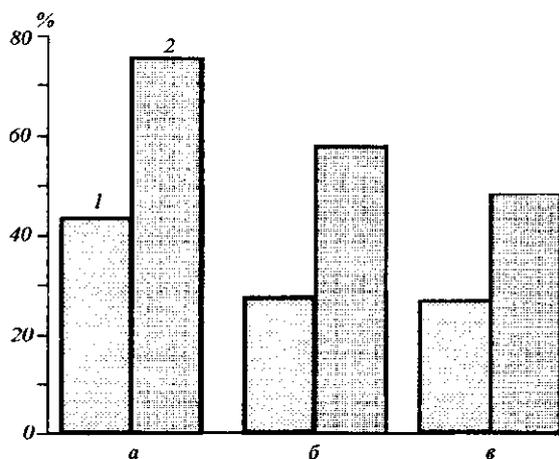


Рис. 3. Превышение уровня антител (Δ %) в сыворотках больных ИКМП (1) и ДКМП (2) над аналогичными показателями здоровых доноров (показатели здоровых доноров приняты за нулевую линию): а — тропониновый комплекс, выделенный из миокарда, пораженного ДКМП; б — то же миокарда, пораженного ИКМП; в — то же миокарда практически здорового индивидуума

актин [4, 6, 7] и, в меньшей мере, тропомиозин. Пристальное внимание исследователей к первым двум АГ объясняется тем, что данные белки являются основными сократительными компонентами кардиомиоцита и, кроме того, миозин считается одним из главных аутоантигенов.

Работа сердца как насоса определяется комплексом кардиальных и экстракардиальных факторов, однако решающими являются процессы сокращения и расслабления миофибрилл кардиомиоцита.

Чередование процессов сокращения и расслабления миофибрилл в сердце определяется входом Ca^{2+} в миоплазму через сарколемму и из депо саркоплазматического ретикулума, его связыванием с регуляторным белком тропонином С и выходом ионов Ca^{2+} из миоплазмы.

Ионы Ca^{2+} , поступающие в миоплазму, образуют комплексы с тропонином С, в результате чего молекулы последнего претерпевают конформационные изменения. В результате этих изменений происходит экспонирование центров актиновых

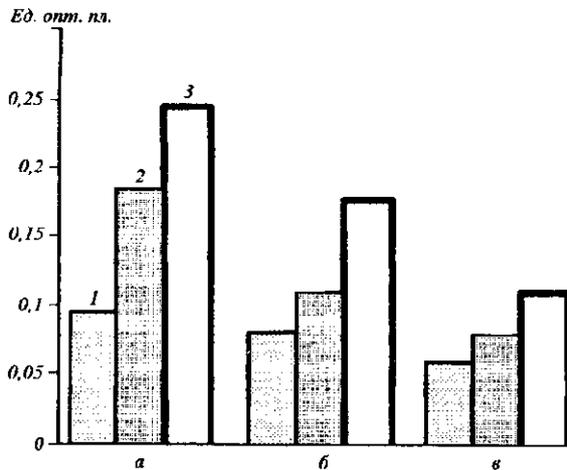


Рис. 4. Титры циркулирующих антител против тропонинового комплекса в сыворотках здоровых доноров (1), ТнД-антителоположительных больных с ИКМП (2) и ДКМП (3). Остальные обозначения, как на рис. 3

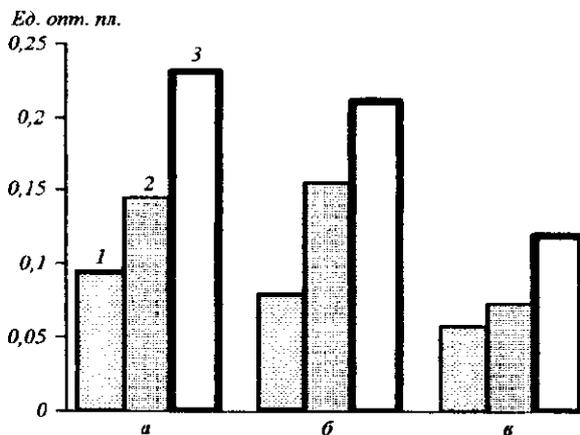


Рис. 5. Титры циркулирующих антител против тропонинового комплекса в сыворотках здоровых доноров (1), ТнК-антителоположительных больных с ИКМП (2) и ДКМП (3). Остальные обозначения, как на рис. 3, 4

протофибрилл, способствующих взаимодействию актина и миозина, а также формированию актомиозиновых мостиков. Акттомиозиновые мостики способны генерировать силу и обеспечивать скольжение толстых и тонких филаментов относительно друг друга, т. е. осуществлять сокращение миофибрилл.

В этой связи полученные нами данные позво-

ляют сделать вывод о том, что высокая иммуногенность тропонинового комплекса при ДКМП может быть результатом определенных (возможно, конформационных) изменений данных белков. Даже незначительные изменения свойств регуляторных белков могут быть критическими для реализации процессов сокращения и расслабления миофибрилл. В нашем исследовании в качестве антигена использован тропониновый комплекс. Однако известно, что в его состав входят три белковые субъединицы: тропонин С, тропонин I и тропонин Т, выполняющие Ca^{2+} -связывающую, ингибиторную и тропомизинсвязывающую функции соответственно. Тропонины I и Т имеют множественные кардиоспецифические изоформы, не экспрессирующиеся в скелетных мышцах взрослого человека [15, 16]. Эти две субъединицы больше своих скелетномышечных аналогов по молекулярной массе и имеют важные для регуляции сокращения миокарда сайты фосфорилирования, которые не представлены в скелетномышечных I и Т тропонинах [17]. В связи с этим представляется необходимым проведение дальнейших, более детальных исследований, направленных на изучение иммуногенности и физико-химических свойств белковых субъединиц тропонинового комплекса как при дилатационной кардиомиопатии, так и при дилатации полостей сердца иной этиологии.

Л. Л. Сидорик, О. М. Федоркова, Д. В. Рябенко, В. I. Бобик, В. М. Данилова, В. С. Трегубов, Г. Х. Мацука

Порівняльне дослідження імунореактивності тропонінового комплексу при дилатативній та ішемічній кардіоміопатіях

Резюме

Вивчено особливості імунної відповіді проти тропонінового комплексу, виділеного з міокарда шлуночків серця, у хворих з дилатативною кардіоміопатією (ДКМП) і пацієнтів з кардіомегалією ішемічного генезу (ІКМП). Виявлено, що в сироватках хворих з ДКМП титри антитіл проти антигенів тропонінового комплексу вірогідно вищі, ніж у хворих з ІКМП і в групі здорових донорів. Найімуногеннішим з антигенів, що вивчалися, є тропоніновий комплекс, виділений з міокарда хворого з ДКМП.

L. L. Sidorik, O. M. Fedorkova, D. V. Ryabenko, V. I. Bobyk, V. M. Danilova, V. S. Tregubov, G. Kh. Matsuka

Comparative study of troponin complex immunoreactivity at dilated and ischemic cardiomyopathies

Summary

The features of the immune reactions against troponin complex isolated from human ventricular myocardium in sera of patients with dilated cardiomyopathy (DCM) and patients with cardiomegaly of ischemic origin (ICM) have been investigated. The results have shown that sera antibodies level against troponin complex antigens were considerably higher in patients with DCM. The most

pronounced immunogenicity of troponin complex isolated from DCM patient myocardium has been shown.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амосова Е. Н. Кардиомиопатии. Руководство.—К.: Книга плюс, 1999.—425 с.
2. Caforio A. L. P. Role of autoimmunity in dilated cardiomyopathy // *Brit. Heart. J.*—1994.—72 (suppl).—P. S30—S34.
3. Goldman J., McKenna W. Immunopathogenesis of dilated cardiomyopathies // *Curr. Opin. Cardiol.*—1995.—10.—P. 306—311.
4. Caforio A. L. P., Grazzini M., Mann J., Keeling P. J., Dottazzo G. F., McKenna P. J., Chiaffino F. S. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy // *Circulation.*—1992.—85.—P. 1734—1742.
5. Caforio A. L. P., Keeling P. J., Mestroni L. Increased frequency of organ-specific cardiac antibodies in healthy relatives of patients with dilated cardiomyopathy: evidence for autoimmune pathogenesis // *Brit. Heart. J.*—1993.—6. (Abstr.).—P. 7.
6. Latif N., Baker C., Dunn M., Rose M., Brady P., Yacoub M. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting // *J. Amer. Coll. Cardiol.*—1993.—N 22 (5).—P. 1378—1384.
7. Konstadoulakis M., Kroumbouzou H., Tsiamis E., Trikas A., Toutouzias P. Clinical significance of antibodies against troponin, actin and myosin in patients with dilated cardiomyopathy // *J. Clin. Lab. Immunol.*—1993.—N 40 (2).—P. 61—67.
8. Сидорик Л. Л., Федоркова О. М., Ковеня Т. В., Бобык В. И., Роднин Н. В., Мацука Г. Х. Структурно-функциональное изучение тропомиозина миокарда как аутоантигена при дилатационной кардиомиопатии // *Биополимеры и клетка.*—1998.—14, № 3.—С. 203—209.
9. Сидорик Л. Л., Рябенко Д. В., Бобык В. И., Роднин Н. В., Овчаренко Г. В., Ельская А. В., Мацука Г. Х. Иммунный ответ на некоторые внутриклеточные антигены у больных с дилатационной кардиомиопатией // *Укр. кардиол. журн.*—1999.—№ 1.—С. 46—51.
10. *Кардиомиопатии: Докл. Комитета экспертов ВОЗ: Серия техн. докл.: 697.*—Женева, 1985.
11. Барская Н. В., Гусев Н. Б. Тропонин сердца быка: выделение и изучение катионсвязывающих свойств с помощью флюоресцентного зонда диметиламинаофтэйдина // *Биохимия.*—1981.—№ 46.—С. 495—503.
12. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation and microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.*—1976.—N 86.—P. 193—200.
13. Sobieszek A. Gradient polyacrylamide gel electrophoresis in presence of sodium dodecyl sulfate: A practical approach to muscle contractile and regulatory proteins // *Electrophoresis.*—1994.—15.—P. 1014—1020.
14. Matsiota P., Druet P., Dasquet P. Natural autoantibodies in systemic lupus erythematosus // *Clin. Exp. Immunol.*—1987.—69.—P. 79—88.
15. Hunkeler N., Kullman J., Murphy A. Troponin I isoform expression in human heart // *Circul. Res.*—1991.—69.—P. 1409—1414.
16. Andersom A., Malouf N., Dakeley A., Pagani E., Allen P. Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle // *Circul. Res.*—1991.—69.—P. 1226—1233.
17. Solaro R., Rarick H. Troponin and tropomyosin. Proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments // *Circul. Res.*—1998.—83.—P. 471—480.

УДК 577.152

Поступила в редакцию 10.06.99