

Изучение биологической активности антитропониновых антител при дилатационной кардиомиопатии

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

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

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

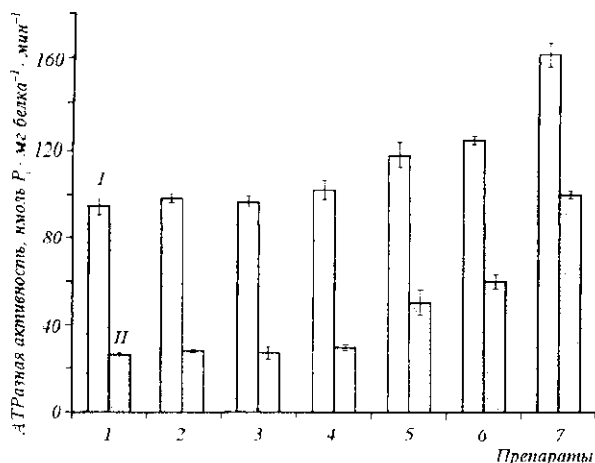
² Институт биохимии им. О. В. Палладина НАН Украины
Ул. Леонтовича, 9, Киев, 01601, Украина

При дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) — органоспецифической аутоиммунной патологии человека — выявляются антитела против целого ряда белков кардиомиоцитов. В данной работе изучали возможную биологическую активность моноспецифических к кардиальному тропонину аутоантител при ДКМП. Показано, что эти аутоантитела из сывороток больных ДКМП оказывают активизирующее влияние на АТРазную активность чувствительного к кальцию актомиозина in vitro.

Введение. Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) — одна из основных причин тяжелой сердечной недостаточности и показаний к трансплантации вследствие дилатации левого или обоих желудочков и сократительной дисфункции миокарда. Широкое распространение получила вирусологическая теория возникновения болезни, согласно которой одним из ведущих патогенетических механизмов формирования ДКМП является развитие аутоиммунных реакций против целого ряда антигенов [1—5]. При изучении сократительных белков миокарда внимание уделяли в основном исследованию иммунных реакций против структурных белков миофибриллы, в частности миозина [3]. Кроме того, в нашей лаборатории показано, что иммуногенность кардиального тропониозина не повышается при ДКМП [4], а сердечного тропонина — возрастает [5]. Сделаны первые шаги в определении функциональной характеристики и патогенетического значения некоторых аутоантител при этом заболевании [1, 2].

Целью нашего исследования было изучение возможной биологической активности антитропониновых антител (АТ), выделенных из сывороток больных с ДКМП, путем определения их влияния на АТРазную активность чувствительного к кальцию актомиозина.

Материалы и методы. Препараты тропонинового комплекса выделяли из секционного материала желудочков трех больных с ДКМП и практически здорового человека, умершего вследствие несчастного случая, как описано ранее [5]. Чистоту полученных белковых препаратов определяли с помощью электрофореза по методу Лэммли [6]. Концентрацию белков определяли по Брэдфорду [7]. В работе исследованы сыворотки 62 больных ДКМП и 21 сыворотка здоровых доноров. Обследование и лечение больных проводили в Институте кардиологии им. Н. Д. Стражеско АМН Украины. Иммунореактивность исследуемых сывороток определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, как описано ранее [5]. Поликлональные АТ выделяли из наиболее иммунореактивных сывороток больных с ДКМП (АТд) и здоровых доноров (АТн) методами ионообменной (носитель



Влияние АТн и АТд на АТРазную активность чувствительного к кальцию актомиозина в кальциевой (I) и бескальциевой (II, ЭГТА) среде: 1 — без добавления АТ; 2, 3, 4 — с добавлением 10, 15 и 25 мкг АТн соответственно; 5, 6, 7 — с добавлением 10, 15 и 25 мкг АТд соответственно

DEAE-Toyorearl 650M) и аффинной хроматографии (носитель Protein-G-сефароза) по [8]. На последнем этапе АТд и АТн очищали на аффинной колонке с пришитым тропониновым комплексом. Аффинную колонку синтезировали по модифицированному нами методу [8]. Чувствительный к кальцию актомиозин (т. е. содержащий тропомиозин-тропоминовое звено) выделяли по методу [9] из миокарда быка. Биологическую активность АТ определяли по их возможному модифицирующему воздействию на энзиматическую (АТРазную) активность чувствительного к кальцию актомиозина. Перед постановкой опыта для выявления АТРазной активности актомиозин преинкубировали с разным количеством АТд и АТн соответственно. АТРазную активность актомиозина оценивали по количеству отщепленного неорганического фосфата, который определяли, как описано в [10]. Чувствительность актомиозина к кальцию рассчитывали по [11]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ «STATISTICA for Windows 5.0» с использованием *t*-критерия Стьюдента. Значения $p < 0,05$ рассматривали как критерий достоверности различий.

Результаты и обсуждение. Препараты тропоминовых комплексов, выделенных из дилатационного и нормального миокардов, были достаточной чистоты (данные не представлены). Для выяснения возможной биологической роли АТ изучали их влияние на АТРазную активность чувствительного к кальцию актомиозина. Мы исходили из тех соображений, что именно такая система будет наи-

более пригодна для возможного взаимодействия антитропоминовых антител с соответствующими эпитопами на миофибрилле. Результаты эксперимента приведены на рисунке и в таблице. Установлено, что АТн не оказывали практически никакого влияния на активность исследуемого фермента. В сыворотках пациентов с ДКМП были выявлены биологически активные АТд, оказывающие дозозависимое активирующее влияние на АТРазную активность чувствительного к кальцию актомиозина. Предварительно было показано, что АТ не способны проявлять АТРазную активность, то есть они не являются абзимами — АТ с каталитической активностью, сходной с ферментативной активностью актомиозина.

Активирующее влияние АТд на ферментативную активность актомиозина, возможно, связано с тем, что при взаимодействии со своими эпитопами на миофибрилле они способны определенным образом изменять ее конформацию. Последнее приводит к активации АТРазы актомиозина.

При ДКМП некоторые аутоантитела против антигенов кардиомиоцитов могут участвовать в патогенезе болезни. Авторы работы [1] впервые при ДКМП описали способность аутоантител против митохондриального адениннуклеотидтранслокатора перекрестно реагировать с детерминантами кальциевых каналов поверхностной мембраны кардиомиоцитов. Последнее приводит к усилению притока кальция, кальциевой перегрузке и клеточной гибели. Лимас с соавт. [2] обнаружили, что анти-

Влияние моноспецифических антитропоминовых аутоантител на АТРазную активность чувствительного к кальцию кардиального актомиозина (АМ)

Препарат	АТРазная активность АМ, нмоль P _i · мг белка ⁻¹ · мин ⁻¹		Чувствительность к Ca ²⁺ , %
	Кальциевая среда	Бескальциевая среда	
АМ	94,4 ± 5,05	25,8 ± 1,25	72,6 ± 4,45
АМ + 10 мкг АТн	97,8 ± 2,27	27,8 ± 0,99	71,6 ± 6,01
АМ + 15 мкг АТн	96,2 ± 3,34	27,8 ± 3,56	71,1 ± 6,78
АМ + 25 мкг АТн	101,7 ± 5,05	31,1 ± 1,57	69,4 ± 4,45
АМ + 10 мкг АТд	117,2 ± 6,67*	52,6 ± 7,12*	55,1 ± 4,01*
АМ + 15 мкг АТд	123,6 ± 1,80*	60,3 ± 4,09*	51,2 ± 3,33*
АМ + 25 мкг АТд	161,4 ± 6,80*	99,6 ± 2,25*	38,3 ± 0,55*

Примечание. *Достоверное различие с аналогичными показателями для АМ ($p < 0,01$); АТн — аутоантитела, очищенные из сывороток здоровых доноров; АТд — аутоантитела, очищенные из наиболее иммунореактивных сывороток больных с ДКМП.

β 1-адренорецепторные антитела больных с ДКМП способны иммунопреципитировать β -адренорецепторы и ингибировать аденилат-циклазную активность.

На сегодня известно, что иммуноглобулины могут проникать через цитоплазматическую мембрану клеток и даже внутрь ядер. Такие данные получены как на культуре клеток [12], так и *in vivo* на животных моделях [13]. Прямые доказательства того, что АТд или какие-то другие АТ проникают в кардиомиоциты при ДКМП, пока отсутствуют. Но после установления факта проникновения иммуноглобулинов через цитоплазматическую мембрану было бы некорректно игнорировать их способность проникать в кардиомиоциты. При ДКМП имеет место снижение сократительной способности кардиомиоцитов. Поэтому, если АТд действительно способны попадать внутрь клеток *in vivo*, нельзя исключить того, что они будут взаимодействовать с миофиламентами и влиять на сократительную способность миофибриллы. Представляется необходимым проведение дальнейших, более детальных исследований патологической роли АТд при ДКМП.

Выводы. Продемонстрировано, что моноспецифические к дилатационному кардиальному тропонину антитела из сывороток больных ДКМП оказывают активирующее влияние на АТРазную активность чувствительного к кальцию актомиозина *in vitro*. Эти антитела могут играть определенную роль в патогенезе болезни.

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

Investigation of biological activity of antitroponin antibodies at dilated cardiomyopathy

Summary

The autoantibodies directed against several cardiomyocytes proteins have been detected at human organospecific autoimmune disease — dilated cardiomyopathy (DCM). In the present work we investigated biological activity of monospecific antitroponin antibodies at DCM. The activating influence of these autoantibodies from DCM patients sera on the actomyosin ATPase activity has been found in vitro.

O. M. Федоркова, В. І. Бобик, Д. В. Рябенко, В. М. Данилова, Г. Х. Мацука, Л. Л. Сидорик

Вивчення біологічної активності антитропонінових антитіл при дилатаційній кардіоміопатії

Резюме

При дилатаційній кардіоміопатії (ДКМП) — органоспецифічній аутоімунній патології людини — виявляються антитіла проти цілого ряду білків кардіоміоцитів. У даній роботі вивчали можливу біологічну активність моноспецифічних до

кардіального тропоніну аутоантитіл при ДКМП. Продемонстровано, що ці аутоантитіла з сироваток крові хворих на ДКМП справляли активуючий вплив на АТРазну активність чутливого до кальцію актомиозину in vitro.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schulze K., Heineman F., Schultheiss H. P., Balaban R. Impairment of myocardial calcium homeostasis by antibodies against the adenine nucleotide translocator // *Cell Calcium*.—1999.—25.—P. 361—370.
2. Limas C. J., Goldenberg I., Limas C. Autoantibodies against β -adrenoreceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy // *Circ. Res.*—1989.—64.—P. 97—103.
3. Caforio A., Mahon N., McKenna W. Cardiac autoantibodies to myosin and other heart-specific autoantigens in myocarditis and dilated cardiomyopathy // *Autoimmunity*.—2001.—34.—P. 199—204.
4. Сидорик Л. Л., Федоркова О. М., Ковеня Т. В., Бобык В. И., Родник Н. В., Мацука Г. Х. Структурно-функциональное изучение тропомиозина миокарда как аутоантигена при дилатационной кардиомиопатии // *Биополимеры и клетка*.—1998.—14, № 3.—С. 203—209.
5. Сидорик Л. Л., Федоркова О. М., Рябенко Д. В., Бобык В. И., Данилова В. М., Трегубов В. С., Мацука Г. Х. Сравнительное исследование иммунореактивности тропомиозинового комплекса при дилатационной и ишемической кардиомиопатиях // *Биополимеры и клетка*.—2001.—16, № 1.—С. 40—45.
6. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // *Nature*.—1970.—227, N 52.—P. 680—685.
7. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation and microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.*—1976.—46.—P. 193—200.
8. Sidorik L., Gudzera O., Dragovoz V., Tukalo M., Beresten S. Immuno-chemical non-cross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases // *FEBS Lett.*—1991.—292.—P. 76—78.
9. Margossian S. Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain 2 and its influence on ATP hydrolysis // *J. Biol. Chem.*—1985.—260.—P. 13747—13754.
10. Fiske C., Subbarow Y. The calorimetric determination of phosphorus // *J. Biol. Chem.*—1925.—66.—P. 375—400.
11. Федоркова О. М., Ковеня Т. В., Бобык В. И., Рябенко Д. В., Данилова В. М., Трегубов В. С., Сидорик Л. Л., Мацука Г. Х. Изучение молекулярных механизмов функционирования кардиомиоцитов при дилатационной кардиомиопатии на модели реконструированной миофибриллы миокарда млекопитающих // *Биополимеры и клетка*.—2000.—16, № 5.—С. 425—429.
12. Portales-Perez D., Alarcon-Segovia D., Llorente L., Ruiz-Arguelles A., Abud-Mendoza C., Baranda L., Fuente H., Ternynck T., Gonzalez-Amaro R. Penetrating anti-DNA monoclonal antibodies induce activation of human peripheral blood mononuclear cells // *J. Autoimmun.*—1998.—11, N 5.—P. 563—571.
13. Ruiz-Arguelles A., Perez-romano B., Llorente L., Alarcon-Segovia D., Castellanos J. Penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells // *J. Autoimmun.*—1998.—11, N 5.—P. 547—556.

УДК 577.152.3 + 616.127
Надійшла до редакції 21.04.03