

Поиск антигена-мишени при дилатационной кардиомиопатии

В. И. Бобык, Т. В. Ковеня, О. М. Федоркова, В. М. Данилова¹,
В. С. Трегубов¹, Д. В. Рябенко², Л. Л. Сидорик

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

¹ НИИ физиологии им. академика Петра Богача Киевского национального университета имени Тараса Шевченко
Пр. Глушкова, 2, корпус 12, Киев, 03022, Украина

² Институт кардиологии им. академика Н. Д. Стражеско АМН Украины
Ул. Народного ополчения, 5, Киев, 03151, Украина

Идентификация антигена-мишени при аутоиммунных патологиях основана на современных методах иммуноферментного анализа (ELISA и иммуноблоттинг). Для определения антигена-мишени при дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) (аутоиммунное органоспецифическое поражение миокарда неизвестной этиологии) исследован уровень специфических циркулирующих аутоантител в сыворотках крови больных ДКМП и здоровых доноров в реакции ELISA против миозина, выделенного из нормального и пораженного ДКМП миокардов, и их цепей. Показано, что уровень антимиозиновых аутоантител в группе больных достоверно выше, чем в сыворотках здоровых доноров. При сравнении уровня специфических аутоантител против тяжелых и легких цепей миозина установлено, что иммунный ответ в сыворотках больных ДКМП достоверно выше против тяжелых цепей ДКМП миозина. Впервые продемонстрировано, что тяжелая цепь ДКМП миозина является антигеном-мишенью при ДКМП.

Введение. ДКМП (дилатационная кардиомиопатия) — это заболевание сердечной мышцы, характеризующееся расширением полости левого (реже — обоих) желудочка, снижением сократимости миокарда, что приводит к развитию сердечной недостаточности. Этиология развития этого заболевания до конца не выяснена. В последнее время широкое распространение получила вирусно-иммунологическая гипотеза, согласно которой персистирующий воспалительный процесс (вирусная инфекция) приводит к развитию в организме аутоиммунных реакций против собственных миокардиальных антигенов [1, 2].

Особое место среди антигенов миокарда занимают белки сократительного аппарата, а именно: актин и миозин. Показано, что при миокардитах и различных кардиомиопатиях в крови больных по-

являются аутоантитела к миозину [3]. В миокарде человека присутствует несколько типов миозинов, в связи с чем существуют противоречивые данные о наличии к ним специфических антител в сыворотках крови больных ДКМП [4].

Цель настоящей работы состояла в поиске антигена-мишени при развитии ДКМП. Определение антигена-мишени важно не только для понимания молекулярных механизмов развития болезни, но и для создания тест-систем для ранней диагностики заболевания, определения стратегии и тактики лечения.

Ткани нормального и пораженного ДКМП (патологоанатомический секционный материал) миокардов, а также сыворотки крови здоровых доноров и больных ДКМП получены из Института кардиологии им. акад. Н. Д. Стражеско АМН Украины. Диагноз ДКМП устанавливали с помощью клинических, лабораторных и инструментальных методов, согласно критериям ВОЗ (НО/ISFC, 1985).

© В. И. БОБЫК, Т. В. КОВЕНЯ, О. М. ФЕДОРКОВА,
В. М. ДАНИЛОВА, В. С. ТРЕГУБОВ, Д. В. РЯБЕНКО,
Л. Л. СИДОРИК. 2004

Продолжительность симптомов заболевания в группе больных ДКМП составляла в среднем $48,5 \pm 10,9$ месяца, а состояние пациентов соответствовало II—III функциональным классам согласно классификации NYHA.

Выделение и очистку миозина проводили по методике, описанной ранее, с некоторыми модификациями [5]. Ткань очищали от жира и крови, гомогенизировали и трижды отмывали в буфере (50 мМ трис HCl, pH 7,2, 100 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА и 2 мМ ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид)), осадок собирали центрифугированием в течение 15 мин при 5000 g и температуре 4 °С. Миозин экстрагировали в течение 30—60 мин буфером А: 100 мМ амидазол, pH 6,8, 0,5 М KCl, на холоду и центрифугировали в том же режиме. К надосадку добавляли 10 объемов холодного дистиллята и оставляли на ночь при 4 °С. Осадок собирали центрифугированием при 8000 g и температуре 4 °С в течение 30 мин. Осадок растворяли в буфере А. Процедуру переосаждения повторяли 2—3 раза. После этого миозин доочищали хроматографией на DEAE-сефадексе. Цепи разделяли по известной методике [6]. Белок растворяли в буфере Б (0,1 М трис-HCl, pH 8,0, 6 М гуанидинхлорид, 2 мМ ЭДТА, 0,3 М KCl), продували азотом и инкубировали в плотно закупоренной пробирке на протяжении 4 ч при 37 °С.

Смесь охлаждали до 0 °С, добавляли равный объем 1 М свежеперекристаллизованного ацетамида и инкубировали в течение 1 ч при 0 °С и pH 8,0. Избыток ацетамида нейтрализовали добавлением 2-меркаптоэтанола и диализовали против буфера: 100 мМ имидазол, pH 7,2, 0,3 М KCl, 2 мМ ЭДТА, 6 М гуанидинхлорид. Цепи разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-75 или Toyopearl HW-55 в том же буфере. Чистоту препаратов контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях по методу Лэммли [7]. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [8], а также спектрофотометрически.

Уровень циркулирующих аутоантител к миозину и его цепям регистрировали с помощью метода твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) с некоторыми модификациями [9]. Антиген иммобилизовали в 0,1 М карбонатном буфере, pH 9,2, в течение ночи при температуре 4 °С, троекратно отмывали фосфатно-солевым буфером с 0,1 %-м твином-20, pH 7,2 (PBS-T). Сыворотки в соответствующих разведениях в PBS-T наносили на плашку и инкубировали на протяжении ночи при 4 °С. Отмывали PBS-T, а затем инкубировали в течение 1,5 ч с конъюгатом белок А—пероксидаза

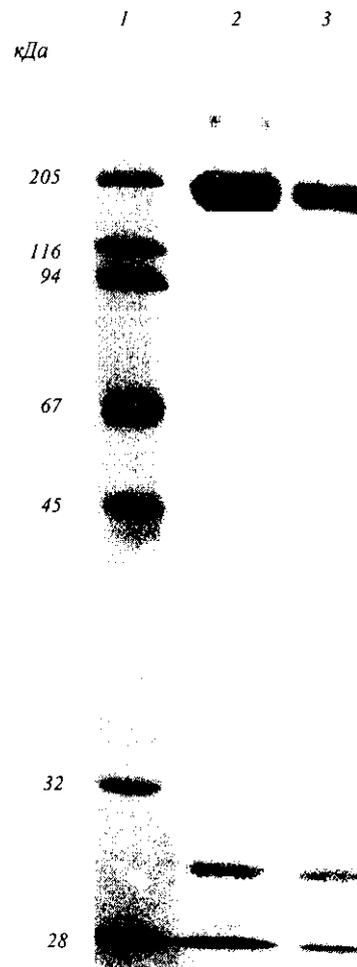


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов миозинов человека в 14 %-м ДСН-ПААГ: 1 — маркерные белки; 2, 3 — миозин, выделенный из здорового и пораженного ДКМП миокардов человека соответственно

хрена при 37 °С. Отмывали 3 раза PBS-T, добавляли 0,5 мг/мл АВТС (2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин)-6-сульфокислота) с 0,05 % перекиси водорода в цитратном буфере, pH 7,2, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Результаты обсчитывали количественно на ридере Multiscan фирмы «Titertek» (Англия).

Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет программ «STATISTICA for Windows 5.0» с использованием *t*-критерия Стьюдента и метода ANOVA. Значения $p < 0,05$ рассматривали как критерий достоверности различий. Антителоположительными (АТ+) считали сыворотки, превышавшие на величину 2σ значения в группе здоровых доноров.

Материалом для выделения миозина и его цепей служили патоморфологические пробы из сер-

Таблица 1

Уровни антител против миозинов, выделенных из нормального и пораженного ДКМП миокардов человека, в сыворотках больных ДКМП и здоровых доноров ($M \pm m$), в реакции иммуноферментного анализа

Миозин	Сыворотки крови		
	Здоровые доноры (28)	Больные ДКМП	
		АТ (62)	АТ+ (21)
Норма	0,111±0,005	0,158±0,018*	0,151±0,005*
ДКМП	0,116±0,005	0,165±0,023*	0,286±0,036**

Примечание. Достоверная разница по отношению к здоровым донорам* и нормальному миозину**; АТ+ — антителоположительные сыворотки.

Таблица 2

Иммунореактивность сывороток больных ДКМП и здоровых доноров против цепей миозинов, выделенных из миокарда пораженного ДКМП и здорового человека ($M \pm m$), в реакции иммуноферментного анализа

Антигены (цепи миозинов)	Сыворотки крови	
	Больные ДКМП	Здоровые доноры
ДКМП		
Тяжелые	1,608±0,136*	1,160±0,099**
Легкие	1,456±0,043	0,364±0,033
Норма		
Тяжелые	1,091±0,060**	0,941±0,069**
Легкие	0,380±0,037	0,323±0,025

Примечание. Достоверная разница по отношению к легким цепям, здоровым донорам и к нормальному миозину*; достоверная разница по отношению только к нормальному миозину**.

дца практически здорового человека, погибшего в результате несчастного случая (норма), и пациента, умершего от дилатационной кардиомиопатии. Чистота препаратов миозинов составляла 90—95 % по данным электрофореза в ПААГ (рис. 1). Методом ELISA определяли уровни циркулирующих аутоантител к миозинам в сыворотках крови пациентов с диагнозом ДКМП (62 человека) и в сыворотках здоровых доноров (28 человек).

Результаты этих экспериментов представлены в табл. 1. Как видно из данных этой таблицы, уровень иммунного ответа на оба миозина достоверно выше в группе больных ДКМП по сравнению с группой здоровых доноров. У антителоположительных пациентов уровень иммунного ответа на миозин, выделенный из пораженного ДКМП миокарда, достоверно выше такового из нормального миозина. Это может быть результатом конформа-

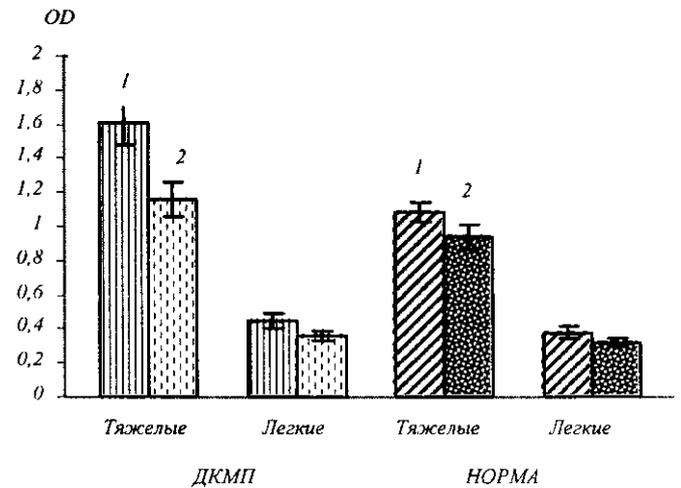


Рис. 2. Иммунореактивность сывороток крови больных ДКМП (1) и здоровых доноров (2) против тяжелых и легких цепей миозинов, выделенных из нормального и пораженного ДКМП миокардов человека

ционных изменений, вызванных либо различными посттрансляционными модификациями молекул сердечного миозина при развитии болезни (гликозилирование, фосфорилирование и т. д.), либо неправильной укладкой молекулы под действием молекулярных шаперонов, экспрессия и локализация которых меняется в кардиомиоцитах при развитии многих аутоиммунных патологий, в том числе кардиоваскулярных [10].

Известно, что молекула миозина состоит из шести полипептидных цепей — двух тяжелых (205 кДа) и двух пар легких (22 и 18 кДа), соединенных между собой дисульфидными связями. При этом закономерно возникает вопрос, какая часть молекулы является антигеном-мишенью при ДКМП?

Для локализации антигена-мишени препараты миозина разделяли на цепи и определяли уровни антимиозиновых аутоантител против полученных антигенов (тяжелые и легкие цепи) в сыворотках больных ДКМП и здоровых доноров. Результаты этих исследований приведены в табл. 2.

Как видно, иммунный ответ против тяжелых цепей значительно и достоверно выше, чем против легких, независимо от того, из какого миокарда был выделен миозин. В отличие от этого, иммунный ответ на тяжелые цепи миозина, выделенного из нормального миокарда и из миокарда, пораженного ДКМП, отличается. Так, в группе здоровых доноров разница в иммунном ответе недостоверна, а в группе пациентов с ДКМП эта разница достоверна и иммунный ответ на цепи ДКМП-миозина существенно выше (рис. 2).

Иммунный ответ на тяжелые цепи, выделенные из ДКМП-пораженного миокарда, в группе ДКМП пациентов почти на 30 % выше, чем в группе здоровых доноров, и эта разница достоверна. Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что антиген-мишень при развитии ДКМП локализуется на тяжелой цепи молекулы миозина. Для более точной локализации (определение аминокислотной последовательности участка тяжелой цепи) необходимо провести эпитопное картирование с последующим аминокислотным анализом выделенного эпитопа, что и является предметом дальнейших исследований.

Таким образом, в работе впервые показано, что антиген-мишень при ДКМП локализован на тяжелой цепи миозина, выделенного из пораженного ДКМП миокарда.

V. I. Bobyk, T. V. Kovenya, O. M. Fedorkova, V. M. Danilova,
V. S. Tregubov, D. V. Ryabenko, L. L. Sidorik

The target antigen identification at dilated cardiomyopathy

Summary

Identification of target antigen at autoimmune pathologies is based on the use of immunological approaches such as ELISA and Western blot analysis. To determine the antigen at dilated cardiomyopathy (DCM) which is a severe autoimmune cardiospecific pathology of unknown origin we have studied the level of specific antibodies against myosin. The panel of blood sera from healthy donors and DCM patients has been screened in ELISA using as antigen myosins purified from the myocardia of healthy donors and DCM patients. We have observed that the level of antimyosin antibodies in sera of DCM patients is significantly higher than in sera of healthy donors. The comparative analysis of immune response against heavy and light chains of myosins revealed that heavy chain of DCM myosin were the most immunogenic. For the first time we have demonstrated that heavy chain of DCM myosin is a target antigen at dilated cardiomyopathy.

V. I. Бобык, Т. В. Ковеня, О. М. Федоркова, В. М. Данилова,
В. С. Трегубов, Д. В. Рябенко, Л. Л. Сидорик

Пошук антигену-мішені при дилатативній кардіоміопатії

Резюме

Ідентифікація антигену-мішені при аутоімунних патологіях базується на сучасних методах імуноферментного аналізу (ELISA та імуноблотинг). Для визначення антигену при дилатативній кардіоміопатії (ДКМП) (аутоімунне, органоспе-

цифічне ураження міокарда невідомої етіології) досліджено рівень специфічних циркулюючих аутоантитіл у сироватках крові хворих ДКМП і здорових донорів у реакції ELISA проти міозину, виділеного з нормального і ураженого ДКМП міокардів та їхніх ланцюгів. Показано, що рівень антиміозинових аутоантитіл у групі хворих достовірно вищий, ніж у сироватках здорових донорів. При порівнянні рівня специфічних аутоантитіл проти важких та легких ланцюгів міозинів встановлено, що імунна відповідь у сироватках хворих на ДКМП достовірно вища проти важких ланцюгів ДКМП міозину. Вперше продемонстровано, що важкий ланцюг ДКМП міозину є антигеном-мішенню при ДКМП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldman J., McKenna W. Immunopathogenesis of dilated cardiomyopathies // *Curr. Opin. Cardiol.*—1995.—10.—P. 306—311.
2. Limas C. J. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. A pathogenetic role // *Circulation.*—1997.—95.—P. 1979—1980.
3. Sidorik L. L., Rodnin N. V., Bobyk V. I., Ryabenko D. V., Veberov A. V., Tkachenko T. Yu., Matsuka G. Kh. Investigation of autoantibodies directed against tissue-specific myocardial antigens // *Биополимеры и клетка.*—1995.—11, № 1.—С. 81—86.
4. Caforio A. L. P., Grazzini M., Mann J. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoform as major autoantigens in dilated cardiomyopathy // *Circulation.*—1992.—85.—P. 1734—1742.
5. Бобык В. И., Веберов А. В., Рябенко Д. В., Дубровская Г. В., Сидорик Л. Л., Роднин Н. В. Выделение основных тканеспецифических антигенов из миокарда здоровых лиц и больных дилатационной кардиомиопатией // *Биополимеры и клетка.*—1993.—9, № 1.—С. 63—65.
6. *Практическая химия белка* / Под ред. А. Дабре.—М.: Мир, 1989.—623 с.
7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227, N 52.—P. 680—685
8. Bredford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—72.—P. 248—254.
9. Masiola P., Druet P., Dosquet P., Avrameas S. Natural autoantibodies in systemic lupus erythematosus // *Clin. Exp. Immunol.*—1987.—69.—P. 79—88.
10. Knowlton A. A., Kapadia S., Torre-Amione G., Durand L. B., Bies R., Young J., Mann D. L. Differential expression of heat shock proteins in normal and failing human hearts // *J. Mol. Cell and Cardiol.*—1998.—30.—P. 811—818.

УДК 616.127-007.64:612.017
Надійшла до редакції 21.05.04