

Желудочковый и предсердный кардиальный миозин при дилатационной кардиомиопатии: сравнительное исследование иммунореактивности

В. И. Бобык, О. М. Федоркова, Д. В. Рябенко¹, Т. В. Ковеня,
Л. Л. Сидорик, 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

Изучены особенности иммунного ответа против миозинов, выделенных из миокарда предсердий и желудочков сердца, у больных с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) и пациентов с кардиомиопатией ишемического генеза. Обнаружено, что во всех изучавшихся сыворотках выявляются высокие титры антител против миозина, выделенного из миокарда предсердий, однако иммунореактивность кардиальных желудочковых миозинов в большей степени характерна для больных с ДКМП. Среди больных с ДКМП чаще выявляются антитело-позитивные больные с высокими титрами антител к желудочковым миозинам, выделенным из нормального сердца и сердца, пораженного ДКМП.

Введение. По определению ВОЗ (1985), дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) является заболеванием сердечной мышцы, характеризующимся увеличением полости и нарушением сократимости левого желудочка или обоих желудочков сердца. Нарушение сократительной способности миокарда, лежащее в основе ДКМП, обуславливает снижение сердечного выброса и увеличение остаточного объема крови в желудочках сердца, что приводит к их дилатации и застою крови. В настоящее время известно несколько причинных, или предрасполагающих, факторов ДКМП: вирусная инфекция, токсические факторы, алиментарный дефицит витаминов, микро- и макроэлементов, наследственная предрасположенность, беременность и роды [1—5]. Однако механизмы, лежащие в основе развития и неуклонно прогрессирующего поражения миокарда при ДКМП, остаются невыясненными. Считается, что важнейшую роль в развитии ДКМП

играют нарушения иммунного статуса и, в частности, аутоиммунные механизмы [3—6]. В пользу последних свидетельствует выявление целого ряда аутоантител к различным антигенам (АГ) сердца. У больных с ДКМП были обнаружены антисарколеммальные, антифибрилярные и антиинтерфибрилярные антитела (АТ) [6—9]. Одним из основных аутоантигенов, с которыми реагируют антикардиальные АТ, является миозин. Однако данные АТ обнаруживаются лишь у 25—46 % больных с ДКМП и, хотя и значительно реже, выявляются у больных другими сердечно-сосудистыми патологиями [3, 4]. Ряд исследователей рассматривает АТ к предсердному кардиальному миозину в качестве маркеров органоспецифичности аутоиммунных реакций [3, 10, 11]. Однако до настоящего времени вопрос о патогенетической роли антимиозиновых АТ (особенно к различным изоформам данного белка) при ДКМП остается открытым, а однозначно говорить о кардиальном миозине как об антигене-мишени при данном заболевании не представляется возможным.

© В. И. БОБЫК, О. М. ФЕДОРКОВА, Д. В. РЯБЕНКО,
Т. В. КОВЕНЯ, Л. Л. СИДОРИК, Г. Х. МАЦУКА, 1999

Цель настоящего исследования состояла в изучении особенностей иммунного ответа против миозина, выделенных из миокарда предсердий и желудочков сердца, у больных с ДКМП.

Материалы и методы. Исследованы сыворотки 68 пациентов с ДКМП в возрасте от 33 до 64 лет (в среднем $46,6 \pm 1,7$ года) и 42 больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) и кардио-мегалией в результате хронической ишемической болезни сердца и эссенциальной гипертензии (ИКМП). Возраст больных с ИКМП в среднем составлял $46,3 \pm 3,3$ года (от 35 до 60 лет). Все пациенты проходили обследование и лечение в Украинском НИИ кардиологии им. акад. Н. Д. Стражеско. Диагноз ДКМП ставили в соответствии с критериями ВОЗ (НО/ISFC, 1985). Продолжительность симптомов заболевания в группе больных с ДКМП колебалась от 3 до 72 месяцев (в среднем $48,5 \pm 10,9$ месяца). Состояние пациентов в обеих группах соответствовало II—III функциональным классам согласно классификации NYHA. Все пациенты длительно получали лечение с использованием диуретика в комбинации с ингибитором ангиотензинпревращающего фермента и/или кардиоселективным β_1 -адреноблокатором.

Имунологическое исследование пациентов осуществляли после достижения стабилизации симптомов ХСН. Уровень циркулирующих АТ определяли с помощью метода ELISA, описанного ранее [12].

В качестве АГ были использованы: 1) миозин, выделенный из левого предсердия (МПН) и левого желудочка (МЖН) миокарда практически здорового человека, умершего в результате случайной травмы; 2) миозин, выделенный из левого предсердия (МПД) и левого желудочка (МЖД) миокарда больных, умерших в результате ДКМП; 3) миозин, выделенный из левого предсердия (МПК) и левого желудочка (МЖК) миокарда больных, умерших в результате ХСН, обусловленной ИКМП; 4) миозин, выделенный из скелетной мышцы человека (МСК).

Миозин был очищен согласно методике, описанной нами ранее [13]. Чистоту препарата контролировали электрофоретически, согласно методу Лэммли [15] (рис. 1). Молекулярную массу очищенных миозинов определяли с помощью калибровочной кривой для смеси стандартных белков. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по Брэдфорду [16].

Имунологическим контролем служили сыворотки 28 здоровых доноров (ЗД) (средний возраст $38,5 \pm 3,2$ года).

Для выявления антителопозитивных больных

использовали уровень АТ, превышающий аналогичные титры АТ в группе ЗД на величину 1 δ (стандартное отклонение).

Статистический анализ. При статистической обработке результатов исследования использовали пакет статистических программ «STATISTICA for Windows 5.0». Для оценки достоверности различий показателей использовали *t*-критерий Стьюдента. Значения $p < 0,05$ рассматривали как критерий достоверности различий.

Результаты и обсуждение. Исследования последних лет направлены не только на поиск причин возникновения ДКМП, но и на установление механизмов, лежащих в основе неуклонно прогрессирующего повреждения миокарда при данном заболевании. Одним из важнейших механизмов, который может определять развитие и прогрессирование дисфункции миокарда при ДКМП, считается развитие аутоиммунных реакций у таких пациентов [3, 5, 6]. В пользу возможности аутоиммунного

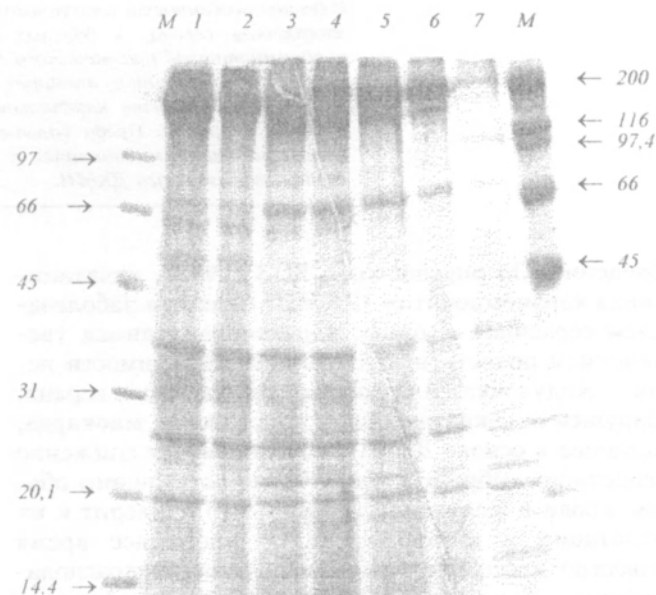


Рис. 1. Электрофорез препаратов миозина, выделенных из миокарда, пораженного ДКМП (1 — желудочка; 2 — предсердия) и ИКМП (3 — желудочка; 4 — предсердия), а также из здорового миокарда (5 — желудочка; 6 — предсердия); 7 — из скелетной мышцы. М — маркеры молекулярной массы

патогенеза ДКМП свидетельствует наличие у больных и клинически здоровых членов их семей циркулирующих аутоантител к различным антигенам сердца [14]. Одним из основных аутоантигенов, с которыми реагируют антикардиальные АТ, является миозин.

В результате наших исследований (рис. 2) установлено, что наиболее высокий иммунный ответ в сыворотках как больных с ДКМП и ИКМП, так и здоровых доноров выявляется против миозина, выделенных из миокарда предсердий (МПН, МПК и МПД). Титры циркулирующих АТ против МПН, МПК и особенно против МПД достоверно ($p < 0,05$) превышали уровни АТ к миозинам, выделенным из миокарда желудочков сердца (МЖН, МЖК и МЖД).

Однако расчеты показали (рис. 3, А), что в сыворотках больных с ИКМП титры АТ против МПН и МПК лишь незначительно (на 14 %) превышали аналогичные показатели в группе ЗД. Уровень АТ против МПД в сыворотках больных с ИКМП и ЗД практически не отличался. В то же время в группе больных с ДКМП титры АТ против МПН, МПК и МПД превышали аналогичные показатели в группе ЗД на 31, 21 и 7 % соответственно. Уровень АТ против МПН в сыворотках больных с ДКМП достоверно превышал ($p = 0,005$) аналогичные значения в группе пациентов с ИКМП.

В настоящее время доказано, что миозин, содержащийся в миокарде предсердий, несколько отличается от белка, выделяемого из сердечной мышцы желудочков сердца человека. В норме молекула кардиального миозина состоит из тяжелой и двух типов легких цепей [11]. Для молекулы предсердного миозина характерна α -изоформа тяжелой цепи, а в желудочковом присутствует главным образом β -изоформа [10, 11]. В работах [4, 11] было показано, что органоспецифичными являются аутоиммунные реакции именно против α -изоформы тяжелой цепи миозина. Результаты нашего исследования также показали, что во всех изучавшихся сыворотках выявляются наиболее высокие титры АТ против миозина, выделенного из миокарда предсердий, а наиболее высокий уровень АТ — против МПД. Отсутствие различий иммунного ответа на данный АГ в исследуемых группах сывороток, по-видимому, указывает на то, что данный ответ не является специфичным ни для одного из изучавшихся заболеваний. В то же время наиболее высокий уровень АТ против МПД позволяет предположить, что данный белок, выделенный из миокарда значительно дилатированной полости сердца, возможно, претерпевает конформационные изменения, в результате которых с его детерминантами

реагируют как специфические, так и неспецифические к МПД АТ. Возможные изменения антигенных свойств предсердного миозина при ДКМП не связаны с условиями хранения некропсийного материала или с методикой выделения белка — они были идентичны для всех АГ. Вероятность конформационных изменений предсердного миозина при ДКМП требует проведения дальнейшего детального изучения физико-химических свойств данного АГ.

Значительный интерес представляют особенности гуморального ответа против МПК и МПН. Высокий уровень АТ против МПК и МПН в сыворотках больных с ИКМП, по всей видимости, свидетельствует о том, что сам по себе синдром ХСН может predispose к развитию иммунных реакций против предсердного миозина. Данные АТ, скорее всего, являются маркерами повреждения миокарда в результате ХСН или подтверждением возможности появления в миокарде желудочков сердца при ХСН так называемого «фе-

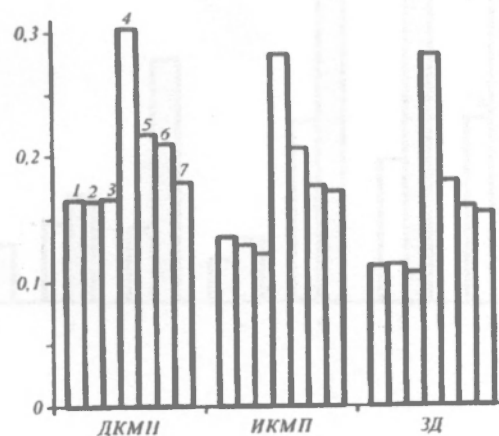


Рис. 2. Титры циркулирующих АТ (ед. опт. пл.) против миозина, выделенного из человеческого миокарда левого предсердия и желудочков сердца, и миозина, выделенного из скелетной мышцы, в группах больных дилатационной кардиомиопатией (ДКМП), кардиомиопатией ишемического генеза (ИКМП) и здоровых доноров (ЗД) (разведение сывороток 1:100): 1 — миозин, выделенный из миокарда желудочка сердца больного с ДКМП; 2 — то же сердца больного с ИКМП; 3 — то же нормального сердца; 4 — миозин, выделенный из миокарда предсердия сердца больного с ДКМП; 5 — то же с ИКМП; 6 — миозин, выделенный из миокарда предсердия нормального сердца; 7 — миозин, выделенный из скелетной мышцы человека. Данные реакции ELISA

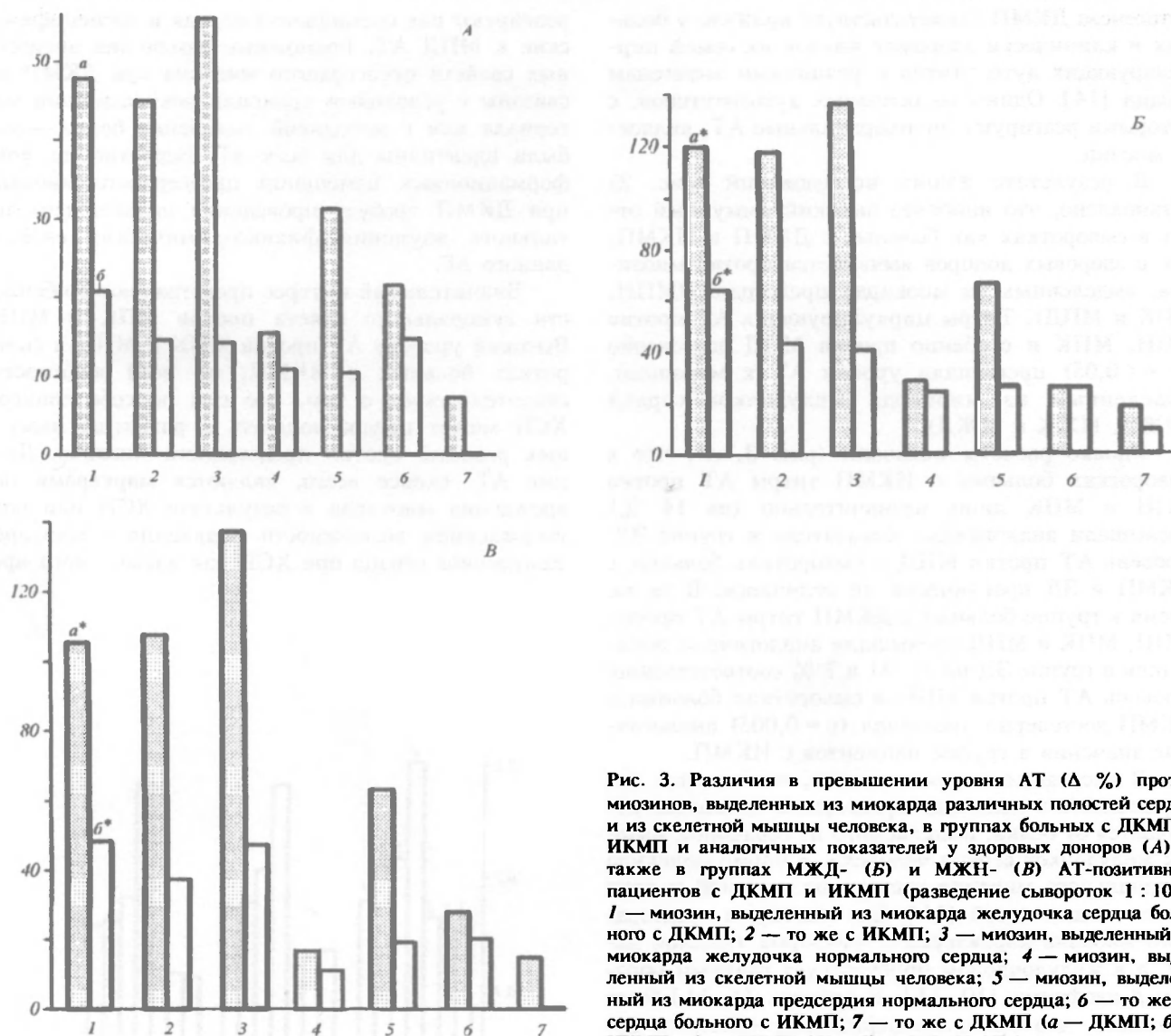


Рис. 3. Различия в превышении уровня АТ (Δ %) против миозинов, выделенных из миокарда различных полостей сердца и из скелетной мышцы человека, в группах больных с ДКМП и ИКМП и аналогичных показателей у здоровых доноров (А), а также в группах МЖД- (Б) и МЖН- (В) АТ-позитивных пациентов с ДКМП и ИКМП (разведение сывороток 1 : 100): 1 — миозин, выделенный из миокарда желудочка сердца больного с ДКМП; 2 — то же с ИКМП; 3 — миозин, выделенный из миокарда желудочка нормального сердца; 4 — миозин, выделенный из скелетной мышцы человека; 5 — миозин, выделенный из миокарда предсердия нормального сердца; 6 — то же из сердца больного с ИКМП; 7 — то же с ДКМП (а — ДКМП; б — ИКМП; а* — ДКМП АТ+; б* — ИКМП АТ+)

тального» (эмбрионального) миозина, для которого характерно преобладание α -изоформы.

Иммунореактивность кардиальных желудочковых миозинов (МЖД, МЖК и МЖН), как обнаружено нами, более характерна для больных с ДКМП. Титры АТ против желудочковых миозинов в сыворотках больных с ДКМП достоверно превышали, во-первых, аналогичные показатели в сыворотках пациентов с ИКМП и, во-вторых, — уровень иммунного ответа против предсердных миози-

нов (рис. 2, 3, А). Δ % АТ против МЖД, МЖК и МЖН в группе ДКМП составлял 47,8; 44,9 и 55,5 % соответственно, в то время как в группе ИКМП данные значения равнялись 20,8; 14,6 и 14,3 % соответственно (рис. 3, А).

Изучение особенностей гуморального ответа позволило выявить антитело-позитивных (АТ+) пациентов среди больных с ДКМП и пациентов с ИКМП (табл. 1). Из данных таблицы видно, что АТ+ пациенты с ответом против МЖД и МЖН

Таблица 1

Титры антител против миозинов в группах здоровых доноров (ЗД) и больных с ДКМП и ИКМП, антителоопозитивных к миозину, выделенному из миокарда желудочка сердца больного с ДКМП, и миозину, выделенному из миокарда желудочка нормального сердца ($M \pm m$)

Антиген	р	Группа больных			
		ДКМП (n = 62)		ИКМП (n = 34)	
		Количество	%	Количество	%
Миозин, выделенный из миокарда желудочка сердца больного с ДКМП	0,008	21	33,9	3	8,8
То же больного с ИКМП	НД	15	24,2	4	11,8
Миозин, выделенный из миокарда желудочка нормального сердца	0,02	23	37,1	5	14,7
Миозин, выделенный из скелетной мышцы человека	НД	22	37,0	8	23,5
Миозин, выделенный из миокарда предсердия нормального сердца	НД	32	51,6	13	38,2
Миозин, выделенный из миокарда предсердия сердца больного с ИКМП	НД	29	46,8	10	29,4
То же больного с ДКМП	НД	12	19,4	3	8,8

Таблица 2

АТ+ пациенты к изучавшимся антигенам в группах больных с ДКМП и ИКМП

Антиген	Здоровые доноры	Группа больных			
		Миозин, выделенный из миокарда желудочка сердца больного с ДКМП (АТ+)		Миозин, выделенный из миокарда желудочка нормального сердца (АТ+)	
		ДКМП	ИКМП	ДКМП	ИКМП
Миозин, выделенный из миокарда желудочка сердца больного с ДКМП	0,113±0,005	0,246±0,036**	0,184±0,004**	0,230±0,003**	0,166±0,012**
То же больного с ИКМП	0,113±0,005	0,246±0,042**	0,162±0,006**	0,235±0,039**	0,155±0,012**
Миозин, выделенный из миокарда желудочка нормального сердца	0,108±0,005	0,252±0,048**	0,151±0,003**	0,254±0,043**	0,158±0,002**
Миозин, выделенный из скелетной мышцы человека	0,155±0,003	0,199±0,009**	0,193±0,007**	0,194±0,008**	0,171±0,011**
Миозин, выделенный из миокарда предсердия нормального сердца	0,160±0,016	0,266±0,028**	0,202±0,007**	0,262±0,025**	0,191±0,010**
Миозин, выделенный из миокарда предсердия сердца больного с ИКМП	0,180±0,004	0,227±0,008**	0,227±0,013**	0,231±0,007**	0,217±0,011**
То же больного с ДКМП	0,282±0,0058	0,334±0,019**	0,308±0,021	0,324±0,018**	0,283±0,024

*Достоверность отличий ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми донорами; **достоверность отличий ($p < 0,05$) по сравнению с ИКМП

выявляются достоверно чаще среди больных с ДКМП, чем в группе пациентов с ИКМП. Причем в обеих группах АТ+ больных с ДКМП титры АТ против миозинов, выделенных из миокарда желу-

дочков и левого предсердия нормального сердца, были достоверно выше, чем показатели в группах больных с ИКМП (табл. 2). Обращает на себя внимание также тот факт, что в обеих группах АТ+

больных с ДКМП обнаружены более высокие титры АТ против МПД. Как следует из рис. 3, Б, В, уровень АТ против желудочковых миозинов и МПН в группах АТ+ больных с ДКМП в 2—3 раза превышал аналогичные показатели АТ+ пациентов с ИКМП. Проведенные расчеты также показали, что уровень АТ, в два раза превышающий средние значения (2 М) ЗД, выявляется лишь среди больных с ДКМП: против МЖД — у 11,3 %; против МЖК и МЖН — у 8,1 %; против МПН — у 4,8 % пациентов. Среди больных с ИКМП ни один пациент с такими высокими титрами АТ выявлен не был.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что высокий уровень иммунного ответа против желудочкового миозина является характерным именно для ДКМП. Выявлено также, что у больных с ДКМП присутствует аутоиммунный компонент, на что указывают более высокие, чем у пациентов с ИКМП, титры АТ против МЖН и МПН. Такой высокий уровень анти-миозиновых АТ в сыворотках больных с ДКМП может быть связан с нарушениями иммунного статуса, обнаруженными у больных с ДКМП. С одной стороны, можно предположить, что при ДКМП происходит выработка АТ, которые могут реагировать с общими детерминантами кардиального миозина, выделенного как из предсердия, так и из миокарда желудочков. Однако нельзя также исключить, что АТ, вырабатываемые на желудочковый миозин при ДКМП, могут связываться с различными цепями (а, возможно, и их доменами) миозиновой молекулы. В этой связи представляется целесообразным проведение дальнейших исследований по локализации и секвенированию возможной АГ-мишени на молекулах кардиального миозина.

В результате проведенного исследования можно сделать следующие выводы: 1) в сыворотках больных с ДКМП титры антител против кардиального желудочкового миозина и против миозина, выделенного из миокарда предсердий нормального сердца, достоверно выше, чем у больных с ИКМП; 2) 37 и 34 % больных с ДКМП являются антитело-положительными с высокими титрами антител против кардиального желудочкового миозина, выделенного из нормального сердца и сердца больного с ДКМП; 3) в группах антитело-положительных больных с ДКМП уровень циркулирующих антител против кардиального желудочкового миозина и предсердных миозинов, выделенных из нормального сердца и сердца больного с ДКМП, достоверно выше, чем аналогичные показатели у антитело-положительных пациентов с ИКМП.

В. И. Бобык, О. М. Федоркова, Д. В. Рябенко, Т. В. Ковеня, Л. Л. Сидорик, Г. Х. Мацука

Шлуночковий та передсердний кардіальний міозин при дилатаційній кардіоміопатії: порівняльне дослідження імунореактивності

Резюме

Вивчено особливості імунної відповіді проти міозинів, виділених із міокарда передсердь і шлуночків серця, у хворих із дилатаційною кардіоміопатією (ДКМП) і пацієнтів із кардіоміопатією ішемічного генезу. Знайдено, що в усіх сироватках, що вивчалися, виявляються високі титри антитіл проти міозину, виділеного з міокарда передсердь, однак імунореактивність кардіальних шлуночкових міозинів більше характерна для хворих із ДКМП. Серед хворих із ДКМП частіше виявляються антитіло-позитивні хворі з високими титрами антитіл до шлуночкових міозинів, виділених із нормального серця і серця хворого з ДКМП.

V. Bobyk, O. Fedorkova, D. Ryabenko, T. Kovenia, L. Sidorik, G. Matsuka

The ventricular and atrium cardiac myosin at dilated cardiomyopathy: a comparative study of immunoreactivity

Summary

The peculiarities of the immune reaction against myosin, purified from atria and ventricular myocardia in patients with dilated (DCM) and ischemic (ICM) cardiomyopathies were investigated. The high level of antibodies against atria myosin was revealed in all sera. However, the DCM patients characteristic was more significant cardiac ventricular myosin immunoreactivity. Antibody-positive patients with high sera antibody level against myosin purified from normal human and DCM affected ventricular myocardia were revealed more often in DCM than ICM patients group.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dec G., Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy // *New Engl. J. Med.*—1994.—331.—P. 1564—1575.
2. Keeling P., Tracy S. Link between enteroviruses and dilated cardiomyopathy: serological and molecular data // *Brit. Heart. J.*—1994.—72, Suppl.—P. S25—S29.
3. Caforio A. L. P. Role of autoimmunity in dilated cardiomyopathy // *Brit. Heart. J.*—1994.—72, Suppl.—P. S30—S34.
4. Goldman J., McCenna W. Immunopathogenesis of dilated cardiomyopathies // *Curr. Opin. Cardiol.*—1995.—10.—P. 306—311.
5. Herskowitz A., Neumann D., Ansari A. Concepts of autoimmunity applied to idiopathic dilated cardiomyopathy // *J. Amer. Coll. Cardiol.*—1993.—22.—P. 1385—1388.
6. Рябенко Д. В. Дилатационная кардиомиопатия. 1. Вирусологическая теория: трансформация вирусного миокардита в дилатационную кардиопатию // *Укр. кардиол. журн.*—1998.—№ 1.—С. 70—76.
7. Limas C. J., Limas C., Kubo S., Olivari M. Anti-beta-receptor antibodies in human dilated cardiomyopathy and correlation with HLA-DR antigens // *Amer. J. Cardiol.*—1990.—65.—P. 483—487.
8. Limas C. J. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. A pathogenetic role // *Circulation.*—1997.—95.—P. 1979—1980.
9. Fu M., Hoebek J., Matsui S. Autoantibodies against cardiac G-protein-coupled receptors define different populations with cardiomyopathies but not with hypertension // *Clin. Immunol. Immunopathol.*—1994.—72.—P. 15—20.

10. Liao L., Sindhwani R., Leinwand L. Cardiac alpha-myosin heavy chain differ in their induction of myocarditis: identification of pathogenic epitopes // *J. Clin. Invest.*—1993.—92.—P. 2877—2882.
11. Cafforio A. L. P., Grazzini M., Mann J. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy // *Circulation.*—1992.—85.—P. 1734—1742.
12. Ternynck T., Bleux C., Gregoire J. Comparison between autoantibodies arising during *Trypanosoma cruri* infection in mice and natural autoantibodies // *J. Immunol.*—1990.—144.—P. 1504—1511.
13. Бобык В. И., Веберов А. В., Рябенко Д. В., Дубровская Г. В., Сидорик Л. Л., Родня Н. В. Выделение основных тканеспецифических антигенов из миокарда здоровых лиц и больных дилатационной кардиомиопатией // *Биополимеры и клетка.*—1993.—№ 9.—С. 63—65.
14. Cafforio 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.—P. 7.
15. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227, N 52.—P. 680—685.
16. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.*—1976.—86, N 1.—P. 193—200.

УДК 577.152

Поступила в редакцию 25.02.99