

Определение аутоантител против β_1 -адренорецептора и влияние их удаления на сократительную функцию миокарда левого желудочка у больных дилатационной кардиомиопатией

Е.А. Табакьян*, А.Г. Тоневицкий, Д.М. Атауллаханова*, А.Ю. Заруба*, В.В. Кухарчук*
НИИ трансплантологии и искусственных органов Росздрава, *НИИ клинической кардиологии
им. А.Л.Мясникова Российского кардиологического научно-производственного комплекса Росздрава.
Москва, Россия

β_1 -adrenoreceptor antibody measurement and antibody removal effects on left ventricular contractility in dilated cardiomyopathy patients

Е.А. Tabakyan*, A.G. Tonevitsky, D.M. Ataulakhanova*, A.Yu. Zaruba*, V.V. Kukharchuk*

Research Institute of Transplantology and Artificial Organs, State Federal Agency for Health and Social Development, *A.L. Myasnikov Research Institute of Clinical Cardiology, Russian Cardiology Scientific and Clinical Complex, State Federal Agency for Health and Social Development. Moscow, Russia

Цель. Разработать тест-систему для определения аутоантител против β_1 -адренорецептора (анти- β_1 -АР). Изучить влияние удаления аутоантител на сократительную функцию миокарда левого желудочка (ЛЖ).

Материал и методы. Пептиды, соответствующие фрагментам второй внеклеточной петли β_1 -АР человека (197-222 а.о.) были синтезированы модифицированным твердофазным методом и лиофилизированы. Контроль молекулярной массы осуществляли с помощью лазерно-десорбционной масс-спектрометрии. Были обследованы 47 больных с целью выявления анти- β_1 -АР. Из них с диагнозом дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) – 22, ишемическая кардиомиопатия – 8, постинфарктный кардиосклероз – 6, миокардит – 3, алкогольная кардиомиопатия – 1, посттрансплантационная кардиомиопатия – 7. Удаление анти- β_1 -АР проводили 4 больным с ДКМП: 3 – методом плазмафереза (ПФ) и 1 пациенту – методом иммуноадсорбции (ИА).

Результаты. Разработана иммуноферментная тест-система для определения аутоантител с использованием в качестве антигена пептида, содержащего 26 аминокислот второй внеклеточной петли β_1 -АР. Показано, что удаление анти- β_1 -АР у больных ДКМП методами ИА и ПФ приводит к улучшению сократительной функции миокарда ЛЖ.

Заключение. Важно выяснить, объясним ли факт улучшения сократительной функции миокарда только удалением анти- β_1 -АР. Следует разработать более совершенные методы детекции анти- β_1 -АР, других аутоантител к миокарду, установить их роль в нарушении сократительной функции миокарда.

Ключевые слова: аутоантитела против β_1 -адренорецептора, иммуноадсорбция, плазмаферез, сократимость миокарда левого желудочка.

Aim. To develop a test system measuring β_1 -adrenoreceptor antibody (anti- β_1 -AR) level. To study the effects of autoantibody removal on left ventricular (LV) contractility.

Material and methods. Peptides, according to second human extracellular β_1 -AR loop fragments (197-222 amino acid fragments), were synthesized by modified hard-phase method and then lyophilized. Molecular mass control was performed by laser desorption mass spectrometry. In total, 47 patients were examined, with the aim of anti- β_1 -AR detection. Dilated cardiomyopathy (DCMP) was diagnosed in 22 patients, ischemic CMP – in 8, post-infarction cardiosclerosis – in 6, myocarditis – in 3, alcohol CMP – in 1, and post-transplantation CMP – in 7 participants. Anti- β_1 -AR were removed in 4 DCMP patients, by plasmapheresis (PF; n=3) or immunoadsorption (IA; n=1).

Results. A new immuno-enzyme test system for autoantibody detection has been developed, using the second extracellular β_1 -AR loop 26 amino acid peptide as the antigen. Anti- β_1 -AR removal by IA or PF methods resulted in improved LV contractility among DCM patients.

Conclusion. It is important to determine whether LV contractility improvement is explained by anti- β_1 -AR removal exclusively. More advanced methods for anti- β_1 -AR and other anti-myocardial antibody detection should be developed, and auto-antibodies' role in impaired myocardial contractility should be studied.

Key words: β_1 -adrenoreceptor auto-antibodies, immuno-adsorption, plasmapheresis, left ventricular myocardial contractility.

Введение

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) определяется как заболевание сердца, характеризующееся расширением и прогрессирующим нарушением сократимости миокарда левого желудочка (ЛЖ) или обоих желудочков. Несмотря на использование для лечения хронической сердечной недостаточности (ХСН) новых групп лекарственных препаратов, смертность этой категории больных за 5-летний период составляет от 20-25% до 46% [1,2]. Нарушения гуморального и клеточного иммунитета, а именно аутоиммунная реактивность, рассматривается как один из главных механизмов в патогенезе ДКМП [3]. Показана роль аутоантител к β_1 -адренорецепторам (анти- β_1 -АР) в нарушении функционирования симпатoadrenalной системы сердца. Установлено, что содержание антител, взаимодействующих с функциональными эпитопами β_1 -АР у больных с ДКМП, осложненной желудочковыми аритмиями и нарушениями проводимости, встречается значительно чаще, чем с ДКМП без этих осложнений [4]. Высокий титр анти- β_1 -АР обнаруживается в сыворотке примерно 35% больных с ДКМП [5].

На основании фармакологических критериев β -АР подразделяют на β_1 , β_2 , β_3 -подтипы, классически определяя их как рецепторы сердечной ткани, гладких мышц дыхательных путей и жировой ткани, соответственно. В мембранах кардиомиоцитов β -АР представлены в основном β_1 и β_2 -подтипами. Все подтипы β -АР представляют собой гликопротеины с молекулярной массой порядка 65 кДа. Гены β -АР расположены на длинном плече хромосомы 5, имеют размер порядка 1200 пар оснований и не содержат интронов [6].

β_1 -АР составляет приблизительно 80% всех β -АР сердца. Подобно β_2 -АР (54% полной гомологии), β_1 -АР имеет три внеклеточные и три внутриклеточные полипептидные последовательности («петли») с 7 трансмембранными α -спиралями. Внутриклеточными доменами β -АР

связываются с стимуляторными гетеротримерными гуанинтрифосфат (ГТФ)-связывающими белками (G-белки). Активация β_1 -АР нуждается в специфической конформации рецептора, стабилизируемой при помощи агониста [7]. Кроме того, причиной активации рецептора, возможно, является димеризация β_1 -АР, что также может лежать в основе агонистических свойств анти- β_1 -АР антител, обнаруженных у пациентов с ХСН. Стимуляция β -АР вызывает каскад последовательных реакций: во-первых происходит активация G белков, затем аденилатциклазы с последующим образованием циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), и наконец, цАМФ-зависимой протеинкиназы (ПКА). Активированная ПКА последовательно фосфорилирует молекулы, необходимые для регулирования концентрации саркоплазматического $[Ca^{2+}]$ [7], и, таким образом, возрастает сократимость кардиомиоцитов, хронотропия, склонность к отклонениям от нормы. Активация G белков может также увеличить направленный ток в Ca^{2+} -каналах L-типа [8].

Важной чертой функционирования β -АР системы является достаточно быстрая потеря чувствительности (десенситизация) в ответ на продолжительное действие или чрезмерно высокую дозу агониста. Десенситизация происходит за счет фосфорилирования рецептора регуляторными киназами. Фосфорилирование снижает способность связанного с агонистом рецептора стимулировать G_s белок. Для β -АР известно два вида ПКА, вызывающих фосфорилирование, и, следовательно, различные механизмы десенситизации. Быструю десенситизацию β -АР вызывает специфическая β -адренергическая киназа (β -АРК) или другие близко родственные G белок-сопряженные рецепторные киназы (GPK), которая за короткое время (время полуреакции составляет ~ 20 сек.) фосфорилирует связанный с агонистом рецептор. Это фосфорилирование сопровождается связыванием с другим цитозольным белком-кофактором, β -арестином, что приво-

дит к отделению рецептора от G-белка с дальнейшей интернализацией рецептора внутри клетки. Существует также более общая, неспецифическая форма десенситизации (гетерологическая десенситизация), катализируемая цАМФ зависимой PKA, которая действует медленнее (время полуреакции ~ 3,5 мин.) и которая может активироваться, наряду с различными другими лигандами, более низкими, чем для β -АРК, концентрациями β -агонистов. Кроме функционального нарушения сопряжения рецепторов с Gs-белком и их интернализации существует более глобальный процесс десенситизации в ответ на длительное (часы или дни) воздействие агониста, который сопровождается необратимой потерей количества рецепторов (downregulation). В основе этого процесса лежат два главных механизма — усиленный распад рецепторов и их сниженный синтез [3].

В экспериментах на животных было показано, что длительная иммунизация пептидом, соответствующим второй экстрацеллюлярной петле β_1 -АР вызывала СН, подобную таковой при ДКМП [9]. Экспериментальная модель ДКМП продемонстрирована в работе [10]. Исследователи применили изогенные инъекции анти- β_1 -АР антисывороток у инбредных крыс для развития у них КМП, возникающей без воспаления. Аутоантитела к β_1 -АР иммуноглобулины подкласса G (анти- β_1 -АР IgG) оказались самодостаточны вызвать множество дисфункций миокарда, характерных для развития систолической СН [10].

Известно, что удаление аутоантител методом иммуноадсорбции IgG приводит к улучшению сократительной функции миокарда, показателей центральной гемодинамики и качества жизни пациентов с ДКМП [11,12].

Остаются не выясненными вопросы: какая стратегия — избирательная иммуноадсорбция (ИА) на сорбентах, содержащих фрагменты второй петли β_1 -АР или полное удаление иммуноглобулинов более эффективна; надо ли понижать максимально концентрацию анти- β_1 -АР или достаточно удалить 60-70% для достижения клинического (терапевтического) эффекта. Во втором случае возможно использование плазмафереза (ПФ), что значительно проще и доступнее. В данной работе впервые сравнили влияние двух методов лечения на состояние насосной функции сердца, течение заболевания и клинический эффект от этих процедур.

Материал и методы

Методика определения аутоантител. Пептиды, соответствующие фрагментам второй внеклеточной петли β_1 -АР человека (197-222 а.о.) были синтезированы модифицированным твердофазным методом и лиофилизованы как описано ранее [4]. Контроль молекулярной массы осуществляли с помощью лазерно-десорбционной масс-спектрометрии (Thermo Bioanalysis Corp., Англия).

В иммуноферментном анализе (ИФА) растворы пептидов в карбонатном буфере (0,04 М Na_2CO_3 , pH 9,6) сорбировали по 100 мкл в лунках поливинилхлоридных планшетов (Titertek, Шотландия). Для блокирования неспецифических реакций использовали 5% раствор обезжиренного молока в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР) pH 7,4, по 100 мкл в лунку в течение 20 мин. при 37°C. Исследуемые сыворотки крови разводили в 3% растворе обезжиренного молока в ФСБР, содержащего 0,05% твина-20, вносили по 100 мкл в лунку и выдерживали на планшете в течение 2 ч при 37°C. Для отмывки планшетов и разведения конъюгата использовали ФСБР, содержащий 0,05% твина-20. В качестве вторых антител использовали конъюгат с пероксидазой хрена кроличьих антител к иммуноглобулинам человека (ИМТЕК, Россия). Конъюгат разводили в ФСБР, содержащем 0,05% твина-20, вносили по 100 мкл в лунки планшета и инкубировали 45 мин. при 37°C. В качестве субстрата использовали раствор о-фенилендиамина и перекиси водорода в фосфатно-цитратном буфере, pH 4,7. Реакцию останавливали 10% раствором серной кислоты, оптическую плотность измеряли на многоканальном спектрофотометре Multiscan MS (Labsystems, Финляндия) при 492 нм. Для контроля сорбции пептидов на планшет использовали систему со стрептавидин-пероксидазой. Для контроля неспецифических реакций в ИФА образцов, содержащих аутоантитела, использовали несорбированные (без антигена) лунки планшета.

Отрицательным контролем служили сыворотки крови здоровых доноров, а положительным — сыворотки крови больных с подтвержденным диагнозом ДКМП, наличием систолической СН, снижением фракции выброса (ФВ) ЛЖ < 40%, находящиеся на лечении в НИИ трансплантологии.

Для предсказания антигенности используют показатели, отражающие физико-химические характеристики отдельных аминокислот. Метод Хоппа и Вудса базируется на анализе первичной структуры белков и предсказании антигенных эпитопов на основе локальной гидрофильности аминокислотных остатков. Метод Джеймсона и Вульфа основан на анализе доступности аминокислотных остатков растворителю, гибкости углеродного скелета и особенностях вторичной структуры [13].

Обследование пациентов и проведение процедур ПФ и ИА. Были обследованы 47 больных с целью выявления анти- β_1 -АР. Из них с диагнозом: ДКМП — 22; ишемическая кардиомиопатия (ИКМП) — 8; постинфарктный кардиосклероз (ПИКС) — 6; миокардит (МК) — 3; алкогольная КМП — 1; посттрансплантационная КМП — 7 (после пересадки сердца). Повышенное содержание анти- β_1 -АР наблюдалось у 7 больных с ДКМП, 3 — с ИКМП, 1 — с МК, 3 — с посттрансплантационной КМП. Удаление анти- β_1 -АР проводили 4 больным с ДКМП: 3 — методом ПФ и 1 пациенту методом ИА.

Все больные мужчины с ДКМП, систолической СН (ФВ ЛЖ < 40%), наличием анти- β_1 -АР (дважды подтверждено до проведения процедур). В результате обследова-

ния у них были исключены: коронарная болезнь сердца (КБС) после проведения коронароангиографии (КАГ), клапанные поражения миокарда, алкогольная КМП, артериальная гипертензия (АГ), хронические заболевания легких (бронхит, эмфизема, пневмосклероз), обострение сопутствующих хронических инфекций, сахарный диабет (СД), гипотиреоз. У всех пациентов был синусовый ритм; наличие постоянной формы мерцательной аритмии служило исключаяющим критерием в связи со сложностью точной оценки динамики размеров полостей сердца, ФВ ЛЖ.

Пациенты получали стандартную терапию – ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, диуретики, β -адреноблокаторы, антагонисты альдостерона; один пациент получал дигоксин, не менее 3 месяцев до проведения процедур ИА или ПФ. Терапия не была изменена по завершении процедур. Методы обследования до курса процедур и в последующие контрольные точки: эхокардиография (ЭхоКГ), проба на толерантность к физической нагрузке (ТФН) (тест с 6-минутной ходьбой), суточное мониторирование электрокардиограммы (СМ ЭКГ); до и после каждой процедуры определение содержания калия, натрия, креатинина, общего белка, альбуминов, IgG в плазме крови, анти- β_1 -АР.

Процедуры ПФ проводили каждый день курсом по 3-4 дня. Применяли непрерывный ПФ методом плазмасепарации (сепаратор крови COBE-SPECTRA, США). За процедуру удаляли 1/2 объема плазмы. Объем плазмы пациента рассчитывали по номограмме с учетом веса, пола, гематокрита. Замещение в эквивалентном объеме раствором Рингера, реополиглолином, раствором альбумина 5% по 40г за процедуру.

Два курса ИА: первый курс 4 дня подряд по 1 процедуре и второй курс 3 дня подряд осуществляли путем перфузии плазмы, отделенной на сепараторе крови COBE-SPECTRA, поочередно через 2 колонки с поликлональными антителами – против IgG человека (Адсопак, Покард, Россия). Скорость тока плазмы через колонку – 25-30 мл/мин. Объем перфузированной плазмы в среднем за процедуру составил 4700 мл, а время процедуры в среднем – 200 мин. Каждая колонка, прошедшая цикл сорбции Ig, регенерировалась путем последовательного ее промывания: а) 400 мл. физиологического раствора, б) 400 мл. глицинового буфера с pH 2,5 во время чего происходит десорбция Ig, в) 400 мл. фосфатного буфера с pH 7,4 для восстановления физиологического pH колонки, г) 400 мл. физиологического раствора. После этого колонка готова к повторному применению на процедуре или заполнению консервирующим раствором азида натрия и хранения при температуре +4°C до очередной процедуры у данного пациента. Замещение во время ИА не проводили. В качестве антикоагулянта в обоих случаях использовали гепарин.

Непосредственно после последней процедуры курса ПФ и ИА назначали иммунотерапию внутривенно препаратом донорского иммуноглобулина человека Октагам® (ОСТАРНАМА Pharmazeutika Produccion ges m.b.H, Австрия) в дозе 0,25 г/кг.

Результаты и обсуждение

Известно, что основной мишенью для аутоантител является вторая внеклеточная петля рецептора. В опытах *in vitro* такие антитела

197 200 205 210 215 220 222
HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR (18,1)
HWWRAE (27,2) DFVTNR (27,5)
RAESDE (27,3)
DEARRCY (27,4)
ARRCYND (28,2)

Рис. 1 Химически синтезированные фрагменты второй внеклеточной петли (197-222) β_1 -АР человека.

оказывали стимулирующее влияние на изолированные крысиные кардиомиоциты.

Для определения сайтов связывания аутоантител провели пептидное картирование второй внеклеточной петли β_1 -АР (аминокислотная последовательность 197-222). Химически синтезированы были короткие 6-7 членные пептиды, соответствующие различным фрагментам этой последовательности (рисунок 1). Также был синтезирован 26-членный пептид (197-222). Взаимодействие аутоантител с различными фрагментами β_1 -АР изучалось с помощью метода иммуоферментного анализа. Среди коротких пептидов наиболее активными были пептиды (204-210) [DEARRCY] (последовательность аминокислот в белке, заглавные буквы означают первые буквы названия аминокислоты) (рисунок 2). Этот пептид соответствует пикам расчетных профилей антигенности (рисунок 3). При этом для предсказания В-клеточных эпитопов было использовано два метода: шкала гидрофильности и профиль индекса антигенности, включающий в себя такие параметры, как гидрофильность, доступность, подвижность и две шкалы вторичной структуры [4].

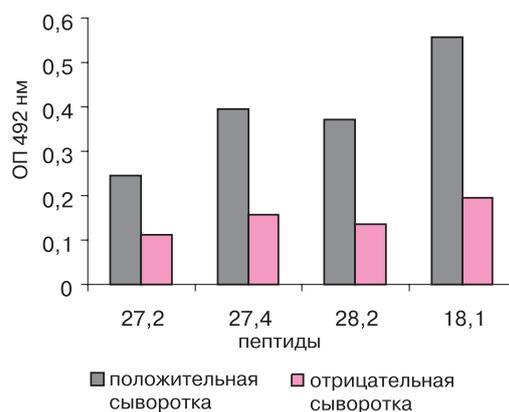
Пептид [DEARRCY] содержит также в своем составе аминокислотный остаток Cys209 (рисунок 3). Аминокислотные остатки Cys131 и Cys209 участвуют в образовании дисульфидной связи между первой и второй внеклеточными петлями рецептора и таким образом играют существенную роль в поддержании правильной конформации лиганд-связывающего центра [14]. По сравнению с короткими пептидами максимальной антигенной активностью в ИФА обладал 26-членный пептид (197-222), что, очевидно, связано с гетерогенностью популяции аутоантител, а также, возможно, со стерическими факторами – меньшей степенью деформации молекулы при иммобилизации.

На следующем этапе работы определяли аминокислотные остатки, гипотетически входящие в состав активного центра β_1 -АР. Наиболее исследована структура активно го центра β_2 -АР. Агонист-связывающий центр β_2 -АР располо-

жен на 1/3 глубины мембранного пакета рецептора (15А°) с внешней стороны клеточной мембраны. Критическими для связывания агониста являются остатки аспарагиновой кислоты (D113) на третьем гидрофобном трансмембранном домене, два остатка серина (S204 и S207) на пятом гидрофобном домене и два остатка фенилаланина (F282 и F290) на шестом гидрофобном домене. Таким образом, существует модель агонист-связывающего сайта β_2 -АР, в которой лиганд связывается внутри мембранного гидрофобного кармана рецептора и «заякоривается» специфическими молекулярными взаимодействиями между аминокислотными остатками рецептора и функциональными группами лиганда [15,16]. На рисунке 4 показано выравнивание участков последовательностей III, V и VI трансмембранных доменов β_1 - и β_2 -АР; аналогичные аминокислоты β_1 - и β_2 -АР совпадают. Таким образом, можно предположить, что для β_1 -АР аналогичные аминокислоты также входят в состав активного центра.

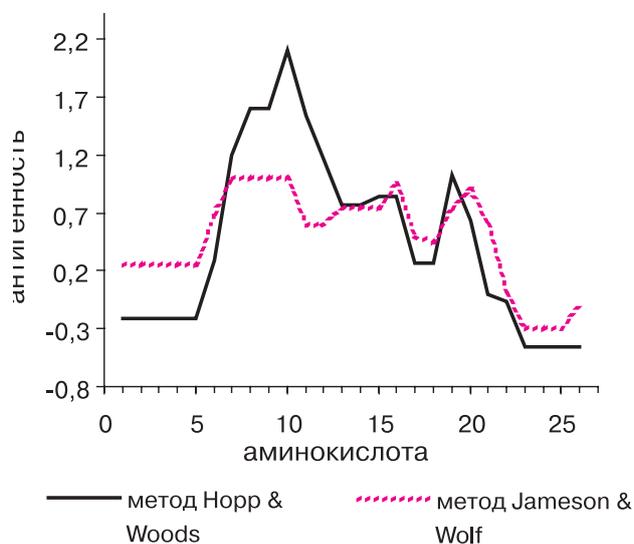
Чтобы определить к какому классу иммуноглобулинов относятся исследуемые аутоантитела в ИФА для проявления реакции использовали меченые пероксидазой моноклональные антитела к различным классам иммуноглобулинов человека. Было установлено, что аутоантитела относятся к иммуноглобулинам М и G, чаще всего имеет место сочетания IgG и IgM. Известно, что IgG и IgM аутоантитела присутствуют при органоспецифических аутоиммунных заболеваниях [17]. При этом патогенность, как правило, характерна для антител к антигенам клеточной поверхности, в частности к рецепторам (т.н. реакция гиперчувствительности II типа). Разработанный метод определения аутоантител был апробирован на образцах сыворотки крови больных с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) и здоровых доноров. Предел чувствительности в тест-системе для несомненно положительных сывороток соответствовал разведению 1/625. Исходя из калибровочной кривой по препарату IgG человека в системе сэндвич-ИФА, ориентировочно оценили концентрацию аутоантител в положительных сыворотках как 5-10 мкг/мл, что приблизительно соответствует 30-70 нМ.

Одной из причин появления таких аутоантител считают наличие перекрестных реакций с бактериальными белками. При хроническом повреждении тканей миокарда, вызванном



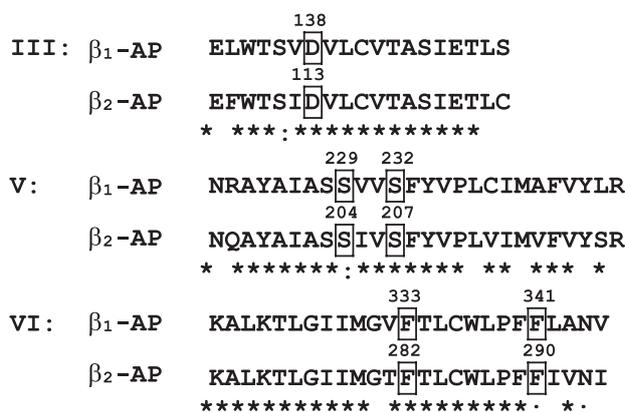
Примечание: концентрации пептидов 27,2; 27,4; 28,2 10 мкг/мл, пептида 18,1-1 мкг/мл.

Рис. 2 Взаимодействие аутоантител с различными фрагментами β_1 -АР (разведение сывороток 1/25).



Примечание: последовательность 204-210 подчеркнута, аминокислотный остаток Cys209 помечен звездочкой.

Рис. 3 Расчетные профили антигенности второй внеклеточной петли β_1 -АР.



Примечание: идентичные аминокислотные остатки обозначены звездочкой; сходные – двочетием внизу; аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра выделены прямоугольниками.

Рис. 4 Выравнивание участков последовательностей III, V и VI трансмембранных доменов β_1 - и β_2 -АР.

Таблица 1

Содержание общего белка, IgG, альбумина, анти-β₁-АР после курсов процедур ПФ и ИА

Пациенты ПФ/ИА	IgG, г/л	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Анти-β-АР A ₄₉₂ , опт.ед.
	до → после	до → после	до → после	до → после
«С» (ПФ)	12,56 → 3,53	76 → 53	45 → 31	0,40 → 0,26 (K-0,14, K+0,71)
«М» (ПФ)	12,19 → 4,51	74,5 → 45	43,5 → 30	0,48 → 0,29 (K-0,08, K+0,59)
«Л» (ПФ)	12,36 → 3,91	68 → 51	40,6 → 35	0,34 → 0,18 (K-0,16, K+0,5)
«Ш» (ИА)	14,00 → 2,60	65 → 50	43 → 34	0,96 → 0,42 (K-0,38, K+0,98)

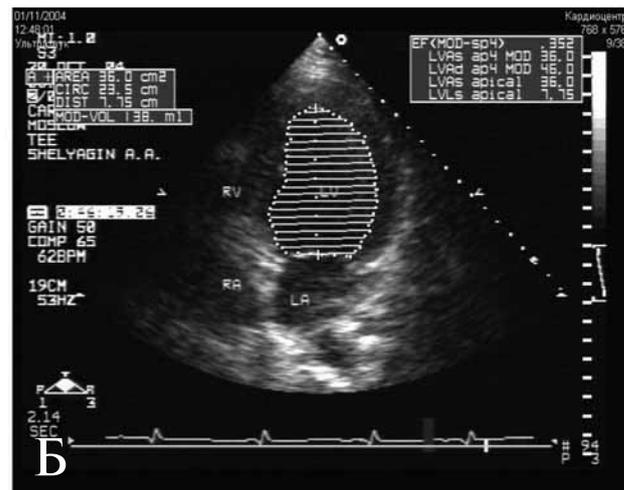
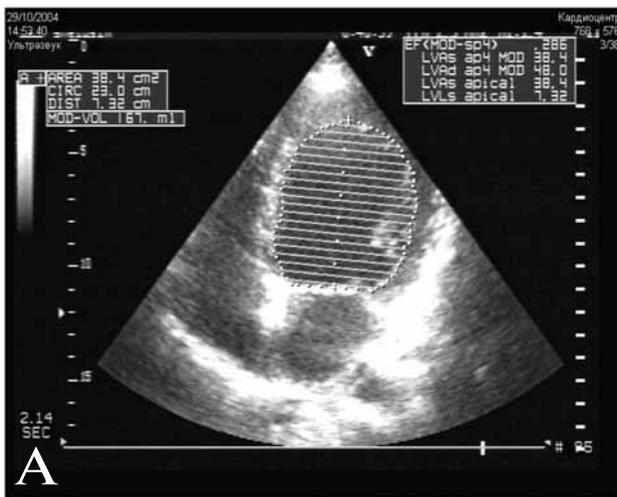
Таблица 2

Результаты ЭхоКГ пациентов с ДКМП до и через 2 недели после курсов ПФ и ИА

Пациенты ПФ/ИА	КДР ЛЖ, см.		КСР ЛЖ, см.		СДЛА, мм рт.ст.		ПЖ, см.		ФВ ЛЖ, %	
	до	после	до	после	до	после	до	после	до	после
«С» (ПФ)	9,1	8,2	-	-	58	45	2,6	2,6	19	23
«М» (ПФ)	6,8	5,8	5,8	4,2	< 25	< 25	3,6	3,6	35	42
«Л» (ПФ)	8,1	8,0	6,7	6,6	> 25	< 25	4,7	3,9	22	26
«Ш» (ИА)	7,2	6,2	6,0	4,6	28	27	2,8	2,8	28,6	34,4

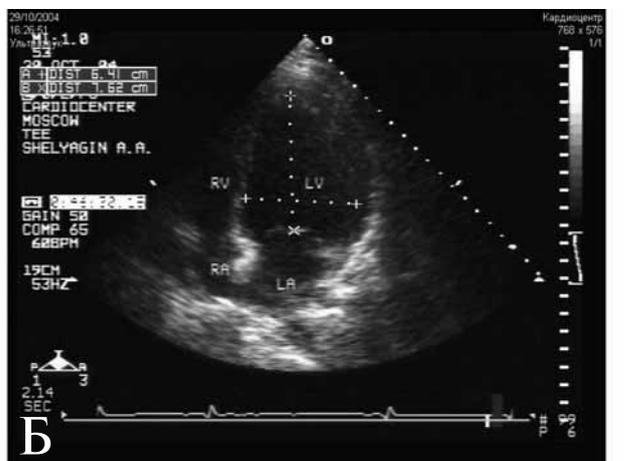
трипаносомой T.stuzi, были обнаружены антитела к внутриклеточным бактериальным белкам, в частности к С-концевым доменам рибосомальных Р белков [18]. Одним из основных антигенных эпитопов при этом является фраг-

мент [AESEE] (последовательность аминокислот в белке, заглавные буквы – первые буквы аминокислоты), расположенный на С-концевом домене рибосомального белка Р0 (34 кДа). Было показано, что антитела к рибосомальным



Примечание: до ИА, КСО 167 мл, ФВ 28,6% (А); через 14 месяцев, КСО 138 мл, ФВ 35,2% (Б).

Рис. 5 А. Б. КСО и ФВ ЛЖ до и через 14 месяцев после 1 курса ИА.



Примечание: до ИА – ИС=0,9 (N – 0,55) (А); через 14 месяцев – ИС=0,84 (Б).

Рис. 6 А. Б. ИС ЛЖ до и через 14 месяцев после 1 курса ИА.

Таблица 3

Расстояние, пройденное за 6 минут в максимально быстром темпе до и через 2 недели после проведения процедур

Пациенты ПФ/ИА	До курса процедур	После курса процедур
«С» (ПФ)	480	540
«М» (ПФ)	515	580
«Л» (ПФ)	480	560
«Ш» (ИА)	725	769

Таблица 4

Динамика ЖНР сердца после иммуноадсорбции

Тип НРС	До Ig-афереза	2 недели после Ig-афереза	4 месяца после Ig-афереза	1,5 года после Ig-афереза
	β_1 -АТ (+)*	β_1 -АТ (-)*	β_1 -АТ (+)	β_1 -АТ (-)
ЖЭ Общее число	4432	3391	6455	7300
ЖЭ – Пары	254	102	209	74
ЖТ/ЖЭ в ЖТ	16/50	3/9	17/56	4/14

Примечание: β_1 -АТ (+) – наличие аутоантител; β_1 -АТ (-) – отсутствие аутоантител.

Р белкам трипаносомы перекрестно реагируют со второй внеклеточной петлей β_1 -АР человека и в опытах *in vitro* оказывают стимулирующее влияние на крысиные неонатальные кардиомиоциты. Полагают, что появление перекрестных реакций антител связано с гомологией аминокислотных последовательностей антигенных эпитопов этих белков. Фрагмент [AESEE] белка Р0 трипаносомы обладает высокой гомологией с фрагментом (201-205) β_1 -АР человека (рисунок 1). Таким образом, можно предположить, что являясь первоначально антителами к бактериальным белкам, аутоантитела к β_1 -АР человека играют существенную роль в патогенезе СН.

Пациенту: «Ш» 30 лет, вес 85 кг, рост 181 см, индекс массы тела (ИМТ) 25,7 кг/м², дважды проводили курсы ИА (с разницей в полгода) из 4 и 3 процедур.

Пациентам: «С» 37 лет, вес 94 кг, рост 183 см, ИМТ 28,5 кг/м²; «М» 30 лет, вес 77 кг, рост 174 см, ИМТ 25,6 кг/м²; «Л» 30 лет, вес 91 кг, рост 193 см, ИМТ 24,5 кг/м² проводили курсы ПФ.

В таблице 1 представлена динамика уровней белков плазмы крови после 3 (пациенты «С» и «М»), 4 (пациент «Л») процедур ПФ и 3 процедур ИА (пациент «Ш»).

Проведение курса ПФ с замещением 40 г альбумина за каждую процедуру вызывало умеренное снижение его содержания. Осложнений во время курса процедур, связанных с колебаниями уровня альбумина, не отмечено, при этом, концентрация альбумина через 3 дня после окончания курсов процедур существенно не отличалась от исходного.

С помощью ИА удается эффективнее снизить уровень IgG. Однако неселективное удаление IgG методом ПФ было достаточным

для существенного снижения концентрации анти- β_1 -АР. Удаление анти- β_1 -АР при ПФ оказалось сравнимо с таковым при применении ИА.

Изменение показателей, характеризующих состояние насосной функции сердца через 2 недели после окончания курсов процедур, представлены в таблице 2: размеры левого желудочка (ЛЖ) сердца, конечный диастолический и систолический размеры (КДР и КСР) ЛЖ, а также размеры правого желудочка (ПЖ), величина систолического давления в легочной артерии (СДЛА), ФВ ЛЖ.

Незначительное уменьшение размеров ЛЖ сердца, увеличение ФВ наблюдали в случаях применения как ПФ, так и ИА. У 2 больных при ПФ наблюдали снижение СДЛА, уменьшение размера ПЖ, что также может быть результатом улучшения насосной функции сердца. Ухудшения показателей гемодинамики не наблюдалось ни в одном случае.

Изменение ТФН оценено при проведении пробы с 6-минутной ходьбой. Незначительная положительная динамика присутствовала во всех случаях (таблица 3).

Пациенту «Ш» процедуры ИА выполняли на 1,5-2 года раньше, чем остальным пациентам, в связи с чем возможно представить результаты ЭхоКГ через 14 месяцев после проведения первого курса процедур ИА (рисунки 5 А и Б). Конечный систолический объем (КСО) ЛЖ уменьшился, а ФВ ЛЖ увеличилась через 14 месяцев после 1-го курса ИА. Уменьшение КСО сопровождалось снижением конечного диастолического объема (КДО) с 234 мл перед курсом ИА, до 203 мл после ИА, соответственно), увеличением ФВ ЛЖ с 28,6% до 35,2%.

Увеличение ударного объема, однако, не отмечено — 67 мл до и 65 мл через 14 месяцев. Улучшение сократимости миокарда ЛЖ, вероятно, также связано с его ремоделированием, на что указывает изменение индекса сферичности (ИС) ЛЖ — отношение размеров ЛЖ по длинной и короткой осям. При ДКМП это отношение приближается к единице (рисунок 6).

Положительная динамика размеров полости ЛЖ и показателей сократимости через 2 недели после ИА сохранялась после 14 месяцев наблюдения (рисунки 6 А, Б). Результаты наблюдения пациента после процедур ИА и иммунотерапии согласуются с результатами, опубликованными немецкими исследователями (кратковременный эффект и отдаленные результаты) [11, 12].

У пациента «Ш» также удалось проследить связь между повышением уровня анти β_1 -АР IgG и частотой желудочковых нарушений ритма (ЖНР) сердца: желудочковых экстрасистол (ЖЭ), эпизодов желудочковой тахикардии (ЖТ). Данные представлены в таблице 4.

Что касается динамики ЖНР через 2 недели после проведения процедур ПФ, то существенных положительных или отрицательных изменений не наблюдалось.

Литература

1. Grogan M, Redfoeld MM, Bailey KR, et al. Long-term outcome of patients with biopsy-proved myocarditis: comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. *JACC* 1995; 26(1): 80-4.
2. Erdmann E. The management of the heart failure — an overview. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 13-7.
3. Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Anti- β_1 -adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Invest* 2004; 113: 1379-82.
4. Шумаков В.И., Рулева Н.Ю., Коробов Н.В. и др. Разработка аналитического метода на основе иммуноферментного анализа для определения аутоантител к β_1 -адренорецепторам в сыворотке крови больных с дилатационной кардиомиопатией. *Вест трансплант искусств орг* 1999; 34-41.
5. Caforio AL, Goldman JH, Baig MK, et al. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression. *Heart* 1997; 77: 62-7.
6. Tomaszewski M, Brain NJ, Charchar FJ, et al. Essential Hypertension and β_2 -Adrenergic Receptor Gene. *Hypertension* 2002; 40: 286-91.
7. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen, T. What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 2003; 93: 896-906.
8. Lader AS, Xiao YF, Ishikawa Y, et al. Cardiac G α overexpression enhances L-type calcium channels through an adenylyl cyclase independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9669-74.
9. Matsui S, Fu ML, Hobeke JJ. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *Mol Cell Cardiol* 1977; 29: 641-55.

Выводы

Выполнен эпитопный анализ аутоантител анти — β_1 -АР в сыворотках больных ДКМП. Основным эпитопом для аутоантител является аминокислотная последовательность DEAR-RCY. Разработана иммуноферментная тест-система для детекции аутоантител с использованием в качестве антигена пептида, содержащего 26 аминокислот второй внеклеточной петли β_1 -АР.

Удаление аутоантител анти — β_1 -АР у больных ДКМП методами ИА и ПФ улучшает насосную функцию сердца. Это улучшение функции сердца через 2 недели после курсов ПФ сравнимо с таковым при проведении ИА. Следует отметить удовлетворительную переносимость больными процедур ПФ и ИА; побочные реакции, осложнения отсутствовали.

В дальнейшем важно выяснить объясним ли факт улучшения сократительной функции миокарда только удалением анти- β_1 -АР, или же необходимо удаление и других аутоантител. Для этого необходимо создать более совершенные методы детекции анти- β_1 -АР, других аутоантител к миокарду, установить их роль в нарушении сократительной функции миокарда.

10. Jahns R, Boivin V, Hein L, et al. Direct evidence for a β_1 -adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2004; 113: 1419-29.
11. Knebel F, Bohm M, Staudt A, et al. Reduction of morbidity by immunoadsorption therapy in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2004; 97(3): 517-20.
12. Felix SB, Staudt A, Dorffel WD, et al. Hemodynamic Effects of Immunoadsorption and Subsequent Immunoglobulin Substitution in Dilated Cardiomyopathy. Three-Month from a Randomized Study. *JACC* 2000; 35(6): 1590-8.
13. Wisdom G.V. Peptide Antigens. Oxford University Press Inc. Oxford New York Tokyo 1994; 252.
14. Fraser CM. Site-directed mutagenesis of β -adrenergic receptors. *J Biol Chem* 1989; 264: 9266-70.
15. Strader CD, Candelore MR, Hill WS, et al. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the β -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 13572-80.
16. Tota MR, Candelore MR, Dixon RAF, Strader CD. Biophysical and genetic analysis of the ligand binding site of the beta-adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 4-6.
17. Naparstek Y, Plotz PH. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 79-104.
18. Kaplan D, Ferrari I, Bergami PL, et al. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10301-6.

Поступила 14/04-2006
Принята к печати 29/05-2006