

КОСТЮКЕВИЧ МАРИНА ВАЛЕНТИНОВНА

**СВЯЗЬ АУТОАНТИТЕЛ К β 1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРУ С ЖЕЛУДОЧКОВЫМИ
НАРУШЕНИЯМИ РИТМА СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ
СЕРДЦА, ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ И БЕЗ ОРГАНИЧЕСКОГО
ЗАБОЛЕВАНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ**

14.01.05 – кардиология

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва, 2018

Работа выполнена в отделе клинической электрофизиологии и рентгенохирургических методов лечения нарушений ритма сердца и лаборатории иммунопатологии сердечно-сосудистых заболеваний НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Профессор РАН, доктор медицинских наук

Зыков Кирилл Алексеевич

Кандидат медицинских наук

Миронова Наталия Александровна

Официальные оппоненты:

Гиляров Михаил Юрьевич - доктор медицинских наук, доцент, заместитель главного врача по терапии ГБУЗ ГКБ №1 им. Н.И. Пирогова Департамента Здравоохранения г. Москвы

Донецкова Альмира Дмитриевна - доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.073.05 по присуждению ученой степени кандидата медицинских наук на базе ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России (Москва, 121552, 3-я Черепковская, д. 15а).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, <http://cardioweb.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Доктор медицинских наук

Сергиенко Игорь Владимирович

Список сокращений

ВСС – внезапная сердечная смерть
ДКМП – дилатационная кардиомиопатия
ЖНРС – желудочковые нарушения ритма сердца
ЖЭС - желудочковая экстрасистолия
ЖТ – желудочковая тахикардия
ИБС - ишемическая болезнь сердца
ИЛ - интерлейкин
ИФА – иммуноферментный анализ
КДР ЛЖ - конечный диастолический размер левого желудочка
КСР ЛЖ - конечный систолический размер левого желудочка
МРТ – магнитно-резонансная томография
НРС – нарушения ритма сердца
ПИКС – постинфарктный кардиосклероз
СРБ – С-реактивный белок
ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка
ФНО-а – фактор некроза опухоли альфа
ХМ-ЭКГ – холтеровское мониторирование ЭКГ
ЦИК 3% - циркулирующие иммунные комплексы 3%
ЦИК 4% - циркулирующие иммунные комплексы 4%
ЭКГ - электрокардиография
Эхо-КГ – эхокардиография
 β 1-АР - β 1-адренорецептор
С3 – С3 компонент комплемента
С4 – С4 компонент комплемента
СРБ – С-реактивный белок
NT-pro-BNP – N-концевой натрийуретический пептид

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

Нарушения ритма сердца (НРС) являются одной из главных причин заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистой патологии в развитых странах [Zheng Z. и соавт., 2001], причем важное место занимают желудочковые нарушения ритма сердца (ЖНРС). ЖНРС могут быть проявлением тяжелого органического поражения сердца или развиваться самостоятельно при отсутствии выявленной причины (идиопатические ЖНРС). Среди различных патофизиологических механизмов, лежащих в основе развития ЖНРС, большое значение могут иметь нарушения иммунной системы, в частности аутоиммунные процессы, приводящие к образованию антител к кардиомиоцитам и их различным структурам, например, ко второй внеклеточной петле $\beta 1$ -адренорецептора ($\beta 1$ -АР). Известно, что у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) аутоантитела к $\beta 1$ -АР выявляются в 10% случаев, а у больных с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) в 30-50% случаев. Аутоиммунная атака, направленная на $\beta 1$ -АР миокарда, может быть фактором развития ДКМП [Freedman N.J. и соавт., 2004]. Высокий титр аутоантител к $\beta 1$ -АР у пациентов с ДКМП, наряду с снижением фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) менее 30%, является предиктором внезапной сердечной смерти [Iwata M. и соавт., 2001]. У пациентов с ЖНРС без органической патологии сердца при сравнении с группой здоровых добровольцев также может отмечаться более высокий уровень аутоантител к $\beta 1$ -АР [Chiale P.A. и соавт., 1995].

Способность аутоантител к $\beta 1$ -АР вызывать электрофизиологические изменения в кардиомиоцитах была подтверждена в экспериментальных работах: при добавлении аутоантител к $\beta 1$ -АР отмечалось резкое повышение кальциевого тока через кальциевые каналы L-типа, удлинение потенциала действия, развитие ранних и поздних постдеполяризаций [Christ T. и соавт., 2001]. Также было показано, что иммунизация животных пептидом, соответствующим второй внеклеточной петле $\beta 1$ -АР, приводит не только к образованию специфичных аутоантител и электрофизиологическим изменениям (удлинению интервала QT, уменьшению калиевого тока и возникновению ранних постдеполяризаций), но и развитию эпизодов устойчивой желудочковой тахикардии [Fukuda Y. и соавт., 2004].

С учетом возможных электрофизиологических эффектов данных аутоантител, очень высока актуальность оценки их уровня у пациентов с нарушениями ритма сердца. Несмотря на множество попыток, до сих пор в мире не удалось создать доступных и надежных диагностических наборов. В большинстве исследований в основе методик для оценки уровня аутоантител к $\beta 1$ -АР используются синтетические пептиды, соответствующие участкам второй внеклеточной петли $\beta 1$ -АР, которые, однако, не обладают конформационными характеристиками нативного рецептора. В 2012 г. Holthoff и соавт. разработали метод определения данных аутоантител, основанный на

принципе конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием в качестве твердофазного носителя культуры клеток, трансфицированных геном β 1-АР человека и экспрессирующих на своей поверхности рекомбинантный β 1-АР в нативной конформации, что является принципиально важным [Holthoff Н.Р. и соавт., 2012]. В последние годы метод ИФА с использованием клеток, трансфицированных β 1-АР, был разработан и в Институте экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России [Шевелев А.Я. и соавт., 2015]. Ранее сопоставление результатов, полученных в различных экспериментальных и клинических исследованиях, было затруднительно в связи с тем, что в каждой работе использовались различные методологические подходы. Таким образом, оценка уровня аутоантител к β 1-АР методом ИФА с использованием клеток, наряду с методом ИФА с использованием пептидов, может позволить провести сравнительный анализ результатов, полученных при помощи двух принципиально различных методик. Кроме этого, в большинстве исследований основное внимание уделяется уровню аутоантител к β 1-АР у пациентов с ДКМП, тогда как данных относительно их уровня и участия в развитии другой сердечно-сосудистой патологии, в том числе ЖНРС, накоплено недостаточно.

Кроме аутоиммунных механизмов, в патогенезе ЖНРС могут участвовать различные факторы воспаления и фиброза, которые способны влиять на электрофизиологические процессы и приводить к развитию жизнеугрожающих НРС. [Duncan D.J. и соавт., 2010; Asar G. A. и соавт., 2014; Biasucci L.M. и соавт., 2006; Streitner F. и соавт., 2007]. Необходимо отметить, что аутоиммунные механизмы, процессы воспаления и фиброза тесно связаны между собой. В частности, имеются данные о наличии связи между аутоантителами к β 1-АР, компонентами клеточного иммунного ответа и фибробластами: показано, что аутоантитела к β 1-АР способствуют пролиферации Т-лимфоцитов [Du Y. и соавт., 2012] и стимулируют пролиферацию фибробластов миокарда [Lv T. и соавт., 2016]. Являясь мишенью для воздействия аутоантител, β 1-АР также имеют важное значение: на поверхности лимфоцитов β 1-АР опосредуют процессы активации клеток, их миграцию и продукцию антител [Loza M.J. и соавт., 2007], а активация β 1-АР на фибробластах может приводить к повышению уровня матриксной металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 [Xiang Y. и соавт., 2017].

В связи с этим, наряду с определением уровня аутоантител к β 1-АР, для оценки их места в развитии ЖНРС важным является одновременное исследование факторов воспаления и фиброза, а также клеточного статуса. Все вышеперечисленное объясняет актуальность темы настоящей работы и послужило предпосылкой для формулировки цели и задач исследования.

Цель исследования: Изучить связь между уровнем аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору и количественными характеристиками желудочковых нарушений ритма сердца у больных с ишемической болезнью сердца, дилатационной кардиомиопатией и у больных без органического заболевания сердечно-сосудистой системы.

Задачи исследования:

1. Определить и сопоставить уровень аутоантител к $\beta 1$ -АР с применением различных методов: иммуноферментного анализа с использованием клеток и пептидов у больных с ЖНРС при ишемической болезни сердца, ДКМП, а также при отсутствии органического заболевания сердечно-сосудистой системы.

2. Определить относительную активность связывания $\beta 1$ -АР на клетках периферической крови радиолигандным методом с использованием йодоцианопиндолола у больных с идиопатическими ЖНРС.

3. Определить показатели клеточного и гуморального иммунного ответа и сопоставить их с уровнем аутоантител к $\beta 1$ -АР у больных с ЖНРС при ишемической болезни сердца, ДКМП, а также при отсутствии органического заболевания сердечно-сосудистой системы.

4. Сопоставить показатели аутореактивности с количественными характеристиками желудочковой эктопической активности у больных с ЖНРС при ишемической болезни сердца, ДКМП, а также при отсутствии органического заболевания сердечно-сосудистой системы.

Научная новизна. Впервые использован новый разработанный метод конкурентного иммуноферментного анализа с использованием клеток, экспрессирующих $\beta 1$ -АР, с помощью которого проведена оценка уровня аутоантител к $\beta 1$ -АР у пациентов с желудочковыми нарушениями ритма сердца при ишемической болезни сердца, ДКМП и у пациентов без органического заболевания сердечно-сосудистой системы.

Впервые проведено сопоставление результатов, полученных методом иммуноферментного анализа с использованием клеток и с использованием пептидов, соответствующих участкам второй внеклеточной петли $\beta 1$ -АР ($\beta 8$ и $\beta 25$), у данных категорий пациентов.

Впервые установлено, что уровень IgG3, определенный методом ИФА с использованием пептидов $\beta 8$ и $\beta 25$ достоверно выше у пациентов с ДКМП по сравнению со здоровыми добровольцами.

Впервые у пациентов с идиопатическими желудочковыми нарушениями ритма при помощи радиолигандного метода с использованием [125 I]-цианопиндолола сердца была показана принципиальная возможность оценки относительной активности связывания $\beta 1$ -АР на лимфоцитах периферической крови человека и в зависимости от ее значения проанализирован уровень аутоантитела к $\beta 1$ -АР.

У пациентов с идиопатическими желудочковыми нарушениями ритма при применении метода конкурентного иммуноферментного анализа с использованием клеток впервые был выявлен достоверно более низкий уровень аутоантитела к β 1-АР по сравнению со здоровыми добровольцами. Кроме этого установлено, что у пациентов с идиопатическими ЖНРС и относительной активностью связывания β 1-АР выше порогового уровня (500 имп./мин.) имеется отрицательная корреляционная связь между уровнем аутоантител к β 1-АР и одиночной желудочковой экстрасистолией.

Практическая значимость. Показано, что применение только метода ИФА с использованием пептидов для оценки общей фракции аутоантител к β 1-АР, с учетом отсутствия достоверных различий между исследованными группами пациентов, в клинической практике нецелесообразно. Для оценки уровня аутоантител к β 1-АР у больных с желудочковыми нарушениями ритма сердца различной этиологии, в частности у пациентов с идиопатическими желудочковыми нарушениями ритма, а также у пациентов с ДКМП, может быть применен метод ИФА с использованием клеток. Выявление значительного снижения или повышения уровня аутоантител к β 1-АР у данных категорий пациентов указывает на участие аутоиммунных механизмов в развитии заболевания, что требует проведения более углубленного иммунологического обследования и может послужить предпосылкой для включения в комплексное лечение данной категории пациентов иммуномодулирующей терапии или методов иммуноабсорбции.

Внедрение результатов в практику. Разработанный метод конкурентного иммуноферментного анализа на клетках для определения уровня аутоантител к β 1-АР внедрен в научную и практическую работу Отдела клинической электрофизиологии и рентгенохирургических методов лечения нарушений ритма сердца ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России. Получен Евразийский патент №026837 «Радиолигандный способ количественной оценки рецепторной активности β -адренорецепторов на поверхности Т-лимфоцитов человека». Подана заявка на патент: "Оптимизированный ген ADRB1opt β 1-адренорецептора человека, оптимизированные гены hNC2367 и hLC2367 тяжелой и легкой цепей химерного (мышь/человек) рекомбинантного антитела, оптимизированные гены mNC2367 и mLC2367 тяжелой и легкой цепей мышинового рекомбинантного антитела, химерное (мышь/человек) и биотинилированное мышиноое рекомбинантные антитела hAB2367 и mAB2367, линия клеток ADL-7A – продуцент рекомбинантного β 1-адренорецептора человека, линия клеток HR12 – продуцент химерного (мышь/человек) рекомбинантного антитела hAB2367, линия клеток MDR1 – продуцент мышинового рекомбинантного антитела mAB2367 и способ конкурентного иммуноферментного анализа для определения аутоантител к β 1-адренорецептору".

Апробация работы. Материалы доложены на межотделенческой конференции по апробации кандидатских диссертаций НИИ Клинической Кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «РКНПК» Минздрава России 13 июля 2017 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ (статей - 5, тезисов - 4), из них 2 в журналах, входящих в перечень ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации. Получен 1 патент. Подана заявка на 1 патент. Материалы работы представлены на: Московском Конгрессе Кардиологов 2017, Москва, Россия; EHRA Europace Cardioslim 2017, Вена, Австрия; 4th World Congress on Acute Heart Failure, 2017, Париж, Франция.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 252 публикации отечественных и зарубежных авторов. Работа содержит 27 таблиц и 31 рисунок.

Связь темы диссертационной работы с планом научных работ организации. Диссертационная работа выполнена в рамках прикладного научного исследования «Разработка диагностического набора, основанного на принципе конкурентного иммуноферментного анализа, для определения уровня аутоантител к β 1-адренорецептору у больных с идиопатическими нарушениями ритма и проводимости сердца и при наличии сердечно-сосудистой патологии» по соглашению о предоставлении субсидии от «27» июня 2014 г. № 14.604.21.0068 в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса на 2014-2020 годы». Уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60414X0068.

Личный вклад автора. Вклад автора является определяющим и заключается как в выборе темы, постановке целей и задач, так и в непосредственном отборе пациентов в исследование согласно критериям включения и исключения, создании базы данных, статистической обработке результатов, а также анализе и интерпретации полученных данных. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В общей сложности в исследование было включено 144 человека в возрасте 18-80 лет. Всем пациентам проводилось стандартное клинико-инструментальное обследование. По показаниям проводились пробы с дозированной физической нагрузкой, чреспищеводная электростимуляция, электрофизиологическое исследование, магнитно-резонансная томография (МРТ) сердца с контрастированием, коронарография и эндомиокардиальная биопсия.

Критериями исключения из исследования были: 1) нестабильная стенокардия или инфаркт миокарда в предшествующие 3 месяца до включения в исследование; 2) хроническая

сердечная недостаточность III-IV ФК NYHA; 3) имплантация электрокардиостимулятора/кардиовертера-дефибриллятора/ ресинхронизирующего устройства в предшествующие 6 месяцев до включения в исследование; 4) канналопатии; 5) заболевания почек со снижением СКФ менее 60 мл/мин; 6) заболевания печени с развитием печеночной недостаточности: повышение уровня печеночных трансаминаз более 3-х норм; 7) заболевания дыхательной системы с развитием дыхательной недостаточности (бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких и др.); 8) острые или хронические в стадии обострения инфекционные и воспалительные заболевания; 9) онкологические заболевания на момент исследования, а также в анамнезе, требовавшие проведения лучевой или химиотерапии; 10) известные аутоиммунные заболевания и заболевания соединительной ткани; 11) сахарный диабет 1 или 2 типа, требующий приема постоянной медикаментозной терапии; 12) заболевания центральной нервной системы (в т.ч. перенесенный инсульт или транзиторная ишемическая атака в предшествующие 6 месяцев до включения в исследование), психические расстройства, лица, злоупотребляющие алкоголем;

Формирование групп пациентов

В ходе исследования были сформированы три группы пациентов:

1. В группу с идиопатическими ЖНРС второй и выше градации по Лауну вошли 48 пациентов (группа «ЖНРС-И», 19 мужчин и 29 женщин, средний возраст $38,1 \pm 13$), у которых по результатам клинко-инструментального обследования была исключена органическая патология сердца. При отсутствии выраженной клинической симптоматики, противопоказаний и опыта приема β -адреноблокаторов пациенты были рандомизированы на 2 подгруппы (всего 13 человек). В подгруппе №1 пациентам лекарственная терапия не назначалась (7 пациентов, средняя продолжительность наблюдения 111,29 дней), в подгруппе №2 в качестве антиаритмической терапии назначались селективные β 1-адреноблокаторы - препарат конкор (Merck KGaA, Германия) (6 пациентов, средняя продолжительность наблюдения 67,8 дней). Исходно и в динамике проводилась оценка относительной активности связывания β 1-АР на лимфоцитах периферической крови, исследование уровня аутоантител к β 1-АР, ЭКГ и ХМ-ЭКГ.
2. В группу с ИБС и ЖНРС второй и выше градации по Лауну вошли 28 пациентов (группа «ИБС с ЖНРС», 26 мужчин и 2 женщины, средний возраст $62,4 \pm 7,3$). Диагноз ИБС был поставлен на основании данных анамнеза (перенесенный в прошлом инфаркт миокарда, стентирование коронарных артерий), характерных жалоб, данных инструментального обследования (ЭКГ, Эхо-КГ), наличия ишемической динамики сегмента ST при ХМ-ЭКГ или положительных результатов проб с дозированной физической нагрузкой, в том числе стресс-Эхо-КГ, а также данных коронарографии.

3. В группу с ДКМП вошли 34 пациента (20 мужчин и 14 женщин, средний возраст $43,2 \pm 13,6$). В данную группу не включали пациентов с длительным анамнезом гипертонической болезни, ИБС, тяжелой клапанной патологией сердца, наличием семейного анамнеза ДКМП или других критериев исключения.

В качестве групп сравнения было сформировано 2 группы:

4. В группу с ИБС без ЖНРС или при наличии желудочковой экстрасистолии первой градации по Лауну вошли 15 пациентов (группа «ИБС без ЖНРС»), 13 мужчин и 2 женщины, средний возраст $60,9 \pm 9,1$).
5. В группу здоровых добровольцев вошли 19 человек, у которых в ходе клинико-инструментального обследования не было выявлено заболеваний сердечно-сосудистой системы, а ЖНРС либо полностью отсутствовали, либо имела место желудочковая экстрасистолия первой градации по Лауну (9 мужчин и 10 женщин, средний возраст $29,2 \pm 2,6$).

Характеристика сформированных групп пациентов

При сравнении групп по возрасту пациенты в группах с ИБС с и без ЖНРС были старше по сравнению с группой идиопатических ЖНРС, ДКМП и здоровых добровольцев; группы пациентов с ИБС не различались между собой. Пациенты с идиопатическими ЖНРС и здоровые добровольцы также были сопоставимы по возрасту.

Таблица 1. Характеристика сформированных групп пациентов по возрасту и полу.

Группа (№ группы)	Кол-во пац-в	Муж./жен.	Возраст, $M \pm SD$	Возраст, $Me[25;75]$	Возраст Мин.	Возраст Макс.
ЖНРС-И (№1)	48	19/29	$38,1 \pm 13$	37 [27;45,5]* ^{2,4}	18	68
ИБС с ЖНРС (№2)	28	26/2	$62,4 \pm 7,3$	63 [56;68]* ^{1,3,5}	46	76
ДКМП (№3)	34	20/14	$43,2 \pm 13,6$	42,5 [31;53]* ^{2,4,5}	22	69
ИБС без ЖНРС (№4)	15	13/2	$60,9 \pm 9,1$	62 [57;67]* ^{1,3,5}	42	71
Здоровые (№5)	19	9/10	$29,2 \pm 2,6$	28,5 [27;31]* ^{2,3,4}	26	34
Все группы	144	87/57	$46,8 \pm 16,1$	46,5 [31;61]	18	76

Примечание: Данные представлены как $M \pm SD$ – среднее \pm стандартное отклонение; Me – медиана, [25;75] – 25-й и 75-й перцентиль. *^{1/2/3/4/5} – статистически достоверные различия между соответствующими группами при анализе методом Краскелл-Уоллиса.

Специальные методы исследования

Исследование уровня аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору.

Иммуноферментный анализ с использованием клеток. По методике, описанной ранее, методом плазмидной трансфекции была получена стабильная линия клеток человека ADL-7A, экспрессирующая рекомбинантный $\beta 1$ -АР в количестве $2,35 \pm 0,3 \cdot 10^6$ молекул на клетку [Шевелев А.Я. и соавт., 2015]. Показана функциональность рекомбинантного рецептора, подобраны условия фиксации клеток. В качестве антител-конкурентов использовали мышинные рекомбинантные

антитела mAB2367, а в качестве внутреннего калибровочного стандарта – химерные (мышь/человек) рекомбинантные антитела (hAB2367). Человеческая константная часть калибровочных антител является имитатором природных аутоантител, а переменные домены придают им способность эффективно конкурировать с мышинными антителами mAB2367 за связывание с β 1-АР. Имобилизованные на поверхности 96-луночного планшета клетки линии ADL-7A инкубировали с образцами сыворотки пациентов в разведении 1:2. Для построения калибровочной кривой одновременно на те же планшеты наносили калибровочные антитела hAB2367 в концентрации от 0 до 50 нг/мл с добавлением стандарта человеческой сыворотки "Lyphochek Assayed Chemistry Control, Level 2" (Bio-Rad, США) в разведении 1:2. Планшеты инкубировали в течение 22 ч при 25°C, промывали и добавляли антитела-конкуренты mAB2367, также взаимодействующие со второй внеклеточной петлей β 1-АР с последующей инкубацией. Затем планшеты инкубировали с конъюгатом стрептавидин-пероксидазы (Stereospecific Detection Technologies, ФРГ), а связывание конъюгата проявляли с помощью субстрата пероксидазы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в цитратном буферном растворе. Реакцию останавливали добавлением 10%-й серной кислоты и значения оптической плотности при 450 нм (OD_{450}) считывали при помощи микропланшетного ридера "Luminometer Photometer LMA01" (Beckman Coulter, США). Таким образом, чем больше аутоантител присутствовало в сыворотке пациентов, тем меньше молекул β 1-АР оставалось свободными, и тем слабее был сигнал, получаемый при последующем связывании антител-конкурентов mAB2367. За одну единицу (1 ед.) было принято содержание аутоантител в сыворотке, ингибирующее связывание мышинных антител-конкурентов в стандартных условиях анализа в той же степени, что и калибровочные антитела hAB2367 с концентрацией 1 нг/мл.

Иммуноферментный анализ с использованием пептидов β 8 и β 25. 26-членный линейный пептид β 8 (HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR), соответствующий последовательности второй внеклеточной петли β 1-АР (аминокислоты 197-222), получали в лаборатории синтеза пептидов ФГБУ "НМИЦ кардиологии" Минздрава России методом конвергентного синтеза на твердой фазе [Chan W.C. и соавт., 2000]. Дизайн, структура и синтез пептида β 25 (NCWRAESDEARRCYNDPKCSDSVCK), имитирующего пространственную структуру второй внеклеточной петли β 1-АР благодаря наличию двух внутримолекулярных дисульфидных связей, описаны ранее [Бибилашвили Р.Ш. и соавт., 2013]. Пептиды адсорбировали на поверхности 96-луночных планшетов для ИФА и проводили стандартный непрямой иммуноферментный анализ образцов сыворотки пациентов в разведении 1:5 с включением калибровки в виде различных концентраций химерных антител hAB2367 в присутствии стандарта человеческой сыворотки "Lyphochek Assayed Chemistry Control, Level 2" в том же разведении 1:5. В качестве вторых антител использовали препарат меченных пероксидазой мышинных

моноклональных антител, специфичных к человеческим иммуноглобулинам класса IgG, в разведении 1:3000. Результаты выражены в тех же единицах, что и в случае ИФА с использованием клеток. Для оценки уровня аутоантител к β 1-АР IgG3 к пептидам, адсорбированным на поверхности 96-луночных планшетов, последовательно добавляли образцы сыворотки пациентов в разведении 1:5, затем биотинилированные антитела "Mouse anti-Human IgG3 Heavy Chain Secondary Antibody, Biotin, 1 mg/ml" (Thermo Fisher Scientific, clone HP6047). В качестве проявляющего конъюгата, содержащего полимерную пероксидазу со стрептавидином, использовали Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies, Germany). Учет результатов реакции ИФА осуществляли на спектрофотометре «Immunotech LMA01» при длине волны $\lambda = 450$ нм.

Определение относительной активности связывания β 1-адренорецепторов на лимфоцитах человека. Выделение лимфоцитов и определение относительной активности β 1-АР лимфоцитов человека проводилось согласно методикам, описанным ранее [Böyum A. и соавт., 1968; Агапова О.Ю. и соавт., 2015]. Определение относительной активности связывания β 1-АР лимфоцитов человека проводилось радиолигандным методом, согласно разработанной методике [Агапова О.Ю., 2015]. Под относительной активностью связывания β 1- и β 2-АР лимфоцитов подразумевается суммарная характеристика количества и аффинности рецепторов на поверхности клетки. Для оценки относительной активности связывания β -АР методом радиолигандного анализа использовали [125 I]-цианопиндолол, который получали в лаборатории изотопных методов анализа Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Специфическое связывание с β 1- и β 2-АР определяли при добавлении соответствующих специфических лигандов: CGP-20712 (β 1-адреноблокатор) и ICI 118551 (β 2-адреноблокатор), Sigma-Aldrich, США. Специфическая активность β 1-АР определялась как разница количества [125 I]-цианопиндолола связанного с клетками в присутствии CGP-20712 и при его отсутствии. Аналогично, специфическая активность β 2-АР определялась как разница количества [125 I]-цианопиндолола связанного с клетками в присутствии ICI 118551 и при его отсутствии. Измерение количества радиоактивного материала в каждой пробе проводилось при помощи γ -счетчика Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer). Результаты выражены в имп./мин. на 1 млн. клеток.

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводилось методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител на проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США).

Уровень NT-pro-BNP в сыворотке крови определялся с использованием коммерческого набора «proBNP II» на электрохемилюминесцентном анализаторе Cobase 411e (Roche, Швейцария); высокочувствительного С-реактивного белка (вчСРБ), иммуноглобулинов А, М, G, компонентов комплемента С3, С4, а также С1 ингибитора - методом нефелометрии (анализаторе «Беринг

Нефелометр», BNProSpec, Dade-Behring Marburg GmbH, Германия; реагенты Siemens Healthcare Diagnostics); циркулирующие иммунные комплексы 3% и 4% - методом преципитации полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 Д на планшетном фотометре Anthos 2020 (Anthos Labtec, Австрия); цитокинов ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-10, TGF- β 1 - методом мультиплексного анализа, технология «xMAP» на анализаторе MagPix («Bio-Rad», США) с использованием коммерческих наборов («Bio-Rad», США) согласно инструкции фирмы-производителя.

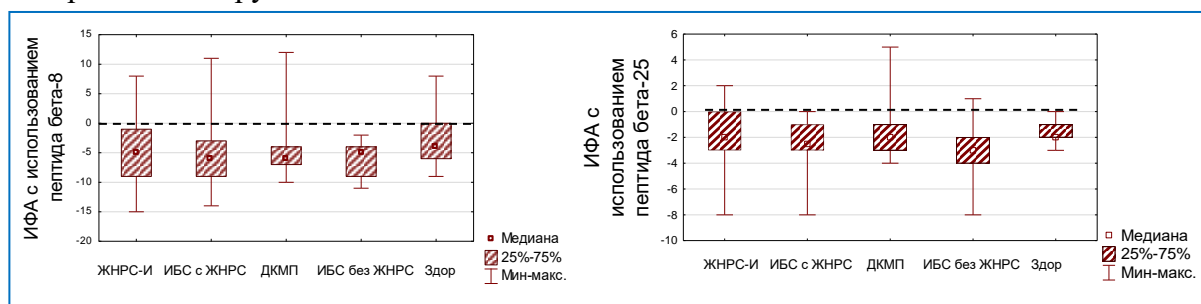
Статистический анализ данных. Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 10.0 и включал в себя оценку нормальности распределения данных, методы описательной статистики (процентные показатели, вычисление среднего, медианы, 25-го и 75-го перцентиля, моды, стандартных отклонений), категоризацию данных, построение таблиц сопряженности, проведение сравнительного (метод Манна-Уитни, метод Краскелл-Уоллиса с последующим проведением апостериорных сравнений методом Данна), корреляционного (метод Спирмена) и дисперсионного анализа. Для оценки изменения показателей в динамике использовался парный критерий Вилкоксона. Уровень значимости для всех использованных критериев - менее 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения уровня аутоантител к β 1-адренорецептору методом ИФА с использованием пептидов β 8 и β 25.

При определении уровня аутоантител к β 1-АР (общей фракции IgG) методом ИФА с использованием пептидов большинство сигналов попадали в зону низких значений: от -15 до +12 ед. для пептида β 8 и от -8 до +5 усл. ед. для пептида β 25. При сравнительном анализе групп достоверных различий выявлено не было.

Рисунок 1. Уровень аутоантител к β 1-АР в ИФА с использованием пептидов β 8 и β 25 у пациентов различных групп.

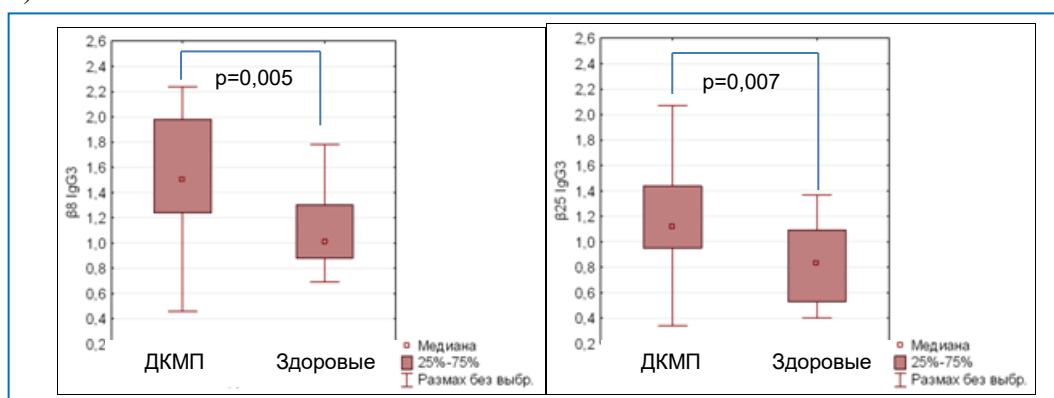


Отрицательные значения сигналов для большей части образцов объясняются тем, что за нулевую отметку при построении калибровочной кривой было принято значение сигнала, получаемого при нулевой концентрации калибровочных антител, но в присутствии стандарта сыворотки человека, для которого характерен сравнительно высокий уровень фона. С учетом полученных результатов, которые не сильно отличались от фоновых значений, дальнейший их

анализ и сопоставление с результатами лабораторно-инструментального обследования не проводилось.

С учетом того, что аутоантитела способны оказывать воздействие не только при связывании Fab-фрагмента с мишенью, но и при связывании Fc-фрагмента, определяющего принадлежность антител к определенному подклассу, важное значение может иметь подкласс аутоантител к β 1-АР [Staudt A. и соавт., 2007]. Несмотря на ранее показанные неблагоприятные эффекты аутоантител к β 1-АР подкласса IgG3 [Zwaka T.P. и соавт., 2002; Baba A. и соавт., 2010; Staudt A. и соавт., 2002], в последние годы появились данные о возможной протективной роли аутоантител данного подкласса. У пациентов с недавним анамнезом ДКМП (<6 месяцев) при наблюдении в течение 6 месяцев восстановление ФВ ЛЖ в наибольшей степени отмечалось у пациентов с наличием аутоантител к β 1-АР подкласса IgG3 [Nagatomo Y. и соавт. 2017]. В настоящей работе медиана уровня аутоантител к β 1-АР IgG3 в группе пациентов с ДКМП, определенных с использованием пептида β 8, составила 1,77 [1,29;2,1], с использованием пептида β 25 - 1,17 [0,96;1,5]. Медиана в группе здоровых добровольцев для IgG3, определенных с использованием пептида β 8 составила 1,01 [0,88;1,35], с использованием пептида β 25 – 0,83 [0,53;1,09]. Отмечалась сильная положительная корреляционная связь результатов, полученных с использованием пептидов β 8 и β 25 ($r=0,86$; $p<0,001$). В отличие от общей фракции IgG, которая достоверно не различалась между группами, уровень аутоантител к β 1-АР подкласса IgG3 был достоверно выше у пациентов с ДКМП по сравнению со здоровыми добровольцами ($p=0,005$, $0,007$).

Рисунок 2. Сравнительный анализ уровня аутоантител к β 1-АР подкласса IgG3 в ИФА с использованием пептидов β 8 и β 25 у пациентов с ДКМП (20 человек) и здоровых добровольцев (15 человек).



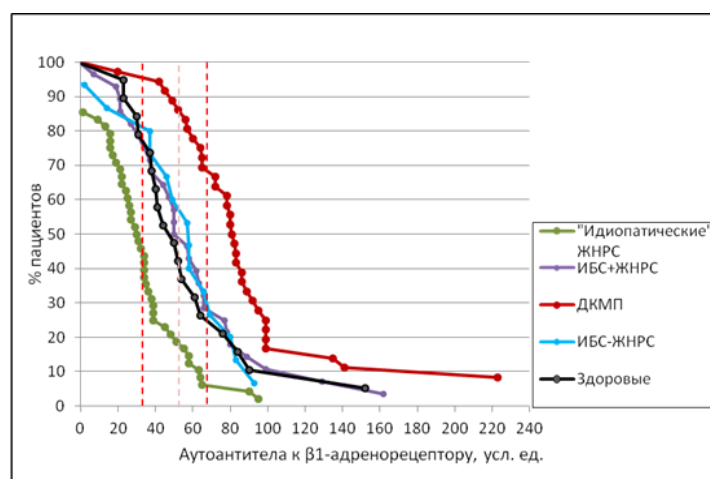
У пациентов с ДКМП связи уровня аутоантител класса IgG3 с размерами ЛЖ (КДР, КСР), ФВ ЛЖ или выраженностью желудочковой экстрасистолии выявлено не было. Тем не менее, полученные результаты демонстрируют, что наличие аутоантител различных подклассов может быть принципиально важным в патогенезе заболевания, в связи с чем требуются дальнейшие исследования с включением большего количества пациентов.

Результаты определения уровня аутоантител к β 1-адренорецептору методом ИФА с использованием клеток.

Тесты, используемые для оценки уровня аутоантител к β 1-АР и основанные на пептидах при сравнении с методами, основанными на цельных клетках, которые экспрессируют на своей поверхности β 1-АР в нативной конформации, намного менее чувствительны и специфичны, и способны выявлять только некоторых пациентов с повышенным уровнем аутоантител [Bornholz В. и соавт., 2013]. Одной из причин может быть отсутствие у пептидов конформационной характеристики нативного рецептора, которая является принципиально важной для взаимодействия аутоантител с рецептором [Jahns R. и соавт., 1999].

Таким образом, в настоящей работе для оценки уровня аутоантител к β 1-АР также был применен новый, разработанный ранее метод конкурентного ИФА с использованием клеток линии ADL-7A, экспрессирующих рекомбинантный β 1-АР [Шевелев А.Я. и соавт., 2015]. Уровень аутоантител к β 1-АР у пациентов с ДКМП был достоверно выше по сравнению с пациентами с идиопатическими ЖНРС, с ИБС и здоровыми добровольцами ($p < 0,001$, 0,047, 0,043). При попарном сравнении с группой здоровых добровольцев уровень аутоантител к β 1-АР был достоверно выше с уровнем значимости $p < 0,001$. При задании порога отсечения на уровне 64,5 усл.ед. повышение аутоантител к β 1-АР отмечалось у 70,59% пациентов с ДКМП и лишь у 21,05% пациентов из группы здоровых добровольцев.

Рисунок 3. Уровень аутоантител к β 1-АР в конкурентном ИФА с использованием клеток у пациентов различных групп.



Полученные данные в целом соответствуют результатам других клинических исследований, в которых повышение уровня аутоантител к β 1-АР наблюдалось у 30-75% пациентов [Liu H.R. и соавт., 1999; Holthoff H.P. и соавт., 2012; Mustafa A. и соавт., 2000; Herda L.R. и соавт. 2012].

Пациенты с ИБС и здоровые добровольцы были сопоставимы по уровню аутоантител к β 1-АР. Также не было выявлено достоверных различий между группами пациентов с ИБС вне

зависимости от наличия ЖНРС. Напротив, у пациентов с идиопатическими ЖНРС уровень аутоантител к β 1-АР был достоверно ниже по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p=0,0033$). При нижнем пороге на уровне 36,5 усл.ед. снижение уровня аутоантител отмечалось у 68,75% пациентов из группы пациентов с идиопатическими ЖНРС и у 21% пациентов из группы здоровых добровольцев. Подобное снижение уровня аутоантител к β 1-АР у пациентов с идиопатическими ЖНРС зарегистрировано нами впервые. В отличие от полученных нами результатов, ранее в немногочисленных исследованиях у пациентов с идиопатическими аритмиями отмечался напротив более высокий уровень аутоантител к β 1-АР и способность вызывать положительный хронотропный эффект на культуре кардиомиоцитов [Brisinda D. и соавт., 2012; Chiale P. и соавт., 1995]. Необходимо отметить, однако, что в них применялся метод ИФА с использованием пептидов, не обладающих конформационными особенностями нативного β 1-АР.

У ряда пациентов также отмечался парадоксально отрицательный уровень аутоантител к β 1-АР при измерении методом ИФА с использованием клеток (5 пациентов из группы пациентов с идиопатическими ЖНРС и 1 пациент из группы ИБС без ЖНРС) и, напротив, очень высокий уровень при измерении методом ИФА с использованием пептидов (у 4 человек из группы пациентов с идиопатическими ЖНРС, у 2 из группы ДКМП и 1 здорового добровольца). Кроме этого, при проведении корреляционного анализа результатов, полученных методами с использованием клеток и пептидов β 8 и β 25, была выявлена отрицательная корреляционная связь в группах с идиопатическими ЖНРС ($r=-0,53$; $-0,47$; $p<0,05$) и ИБС без ЖНРС ($r=-0,64$; $-0,67$), а также в группе с ИБС и ЖНРС (для пептида β 25) ($r=-0,48$; $p<0,05$).

Одной из причин детекции отрицательных сигналов у пациентов с идиопатическими ЖНРС может быть наличие аутоантител несколько иной специфичности и/или аффинности. Можно предположить, что такие аутоантитела связываются с другим эпитопом β 1-АР, изменяют его конформацию и, таким образом, не вытесняют конкурентные мышинные антитела, а наоборот усиливают их связывание с β 1-АР. Высоким содержанием аутоантител с такими свойствами у пациентов с идиопатическими ЖНРС может частично объясняться как получаемые отрицательные значения, так и в целом более низкий уровень аутоантител к β 1-АР по группе при сравнении со здоровыми добровольцами. Наличием аутоантител к β 1-АР различной специфичности и/или аффинности, по-разному взаимодействующих с пептидами β 8 и β 25 с одной стороны и с нативным β 1-АР – с другой, может также объясняться выявленная отрицательная связь результатов, полученных двумя методами.

Другой причиной появления как отрицательных значений, так и в целом более низкого уровня аутоантител к β 1-АР у пациентов с идиопатическими ЖНРС может быть истинное снижение уровня аутоантител к β 1-АР. Показано, что важное значение в регуляции иммунного

ответа и поддержании гомеостаза могут иметь естественные антитела [Bornholz В. и соавт., 2014; Jahns R. и соавт., 2004]. Протективная роль естественных антител была подтверждена в ходе экспериментальных [Lobo P.I. и соавт., 2014; Hurez V. И соавт., 1997; Rieben R. и соавт. 1999] и клинических работ при аутоиммунных заболеваниях [Werwitzke S. и соавт., 2015; Pal Z. и соавт., 2014; Li W. и соавт., 2014]. Нарушение баланса между естественными протективными антителами и аутореактивными патогенными аутоантителами может приводить к развитию различных заболеваний, в том числе аутоиммунных, как в случае наличия аутоантител с измененными свойствами, так и в случае, если наблюдается снижение уровня естественных антител. Таким образом, выявленное нарушение гуморального иммунного ответа у пациентов с идиопатическими ЖНРС, может являться одним из механизмов развития ЖНРС.

У пациентов с ДКМП несмотря на отсутствие непосредственной связи уровня аутоантител к β 1-АР с ЖНРС, была выявлена их положительная корреляционная связь с КДР ЛЖ ($r=0,34$, $p<0,05$), а у пациентов с частой ЖЭС с таким показателем дисфункции ЛЖ, как NT-pro-BNP ($r=0,53$; $p<0,05$). В совокупности эти данные свидетельствуют в пользу участия аутоиммунных факторов в ремоделировании ЛЖ и, как следствие, возможном развитии ЖНРС.

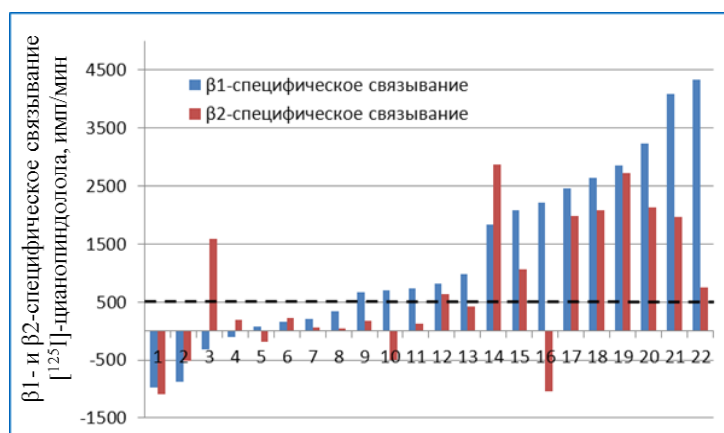
У пациентов с ИБС и ЖНРС непосредственной связи ЖНРС с уровнем аутоантител к β 1-АР также выявлено не было. Тем не менее отмечалась связь процента одиночной ЖЭС от общего количества ЖЭС с уровнем ЦИК 3%, ЦИК 4% и IgM ($r=0,46$, $0,38$, $0,42$; $p<0,05$). В свою очередь уровень аутоантител к β 1-АР положительно коррелировал с уровнем ЦИК 4%, IgM, антител к кардиолипину IgM и C1 компонентом комплемента ($r=0,39$, $0,53$, $0,43,0,41$; $p<0,05$). Необходимо отметить, что при разделении всех пациентов в зависимости от наличия инфаркта миокарда в анамнезе связь уровня аутоантител к β 1-АР с ЦИК 4%, АТ к кардиолипину IgM и общим IgM сохранялась лишь у пациентов с ПИКС ($r=0,39$, $0,42$, $0,46$; $p<0,05$). Несмотря на то, что уровень аутоантител к β 1-АР не различался между пациентами с ИБС и здоровыми добровольцами, выявленная связь ЦИК, аутоантител к β 1-АР и одиночной ЖЭС у пациентов с ИБС и ЖНРС указывает на возможное участие аутоиммунных механизмов наряду с воспалением в развитии ЖНРС.

Определение относительной активности β -адренорецепторов на лимфоцитах человека.

С учетом возможного воздействия аутоантител на β 1-АР, при помощи радиолигандного метода, разработанного ранее [Агапова О.Ю. и соавт., 2015], была оценена относительная активность связывания β 1-АР на суммарных лимфоцитах периферической крови. Всего было проведено 22 измерения у пациентов с идиопатическими ЖНРС, не получающими лекарственной терапии. Относительная активность связывания β 1-АР была выше порогового уровня в 500 имп./мин у 14 пациентов (63,64%) и составила 2146,29 [809.39;2856] имп./мин. Достоверных

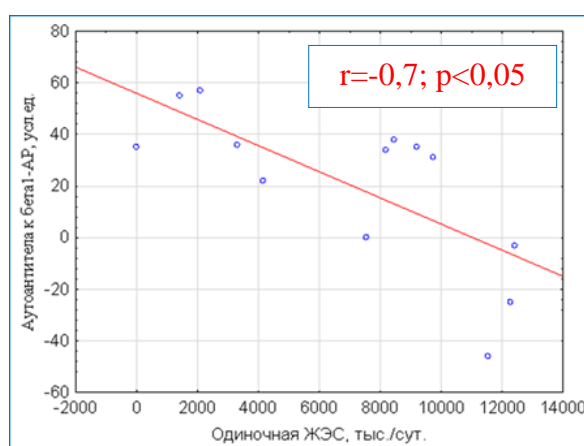
различий по лабораторно-инструментальным показателям между пациентами с $\beta 1$ -специфическим связыванием более или менее 500 имп./мин. выявлено не было.

Рисунок 4. $\beta 1$ - и $\beta 2$ -специфическое связывание [^{125}I]-цианопиндолола на лимфоцитах 22 пациентов с идиопатическими ЖНРС без лечения. Связывание приведено в имп./мин. на 1 млн. клеток.



Ранее было показано, что у здоровых людей относительная активность связывания $\beta 1$ -АР, в отличие от относительной активности связывания $\beta 2$ -АР, данным методом практически не определяется [Агапова О.Ю. и соавт, 2015]. Одним из возможных факторов, влияющих на функцию $\beta 1$ -АР и участвующих в развитии желудочковых нарушений ритма сердца, могут быть аутоантитела к $\beta 1$ -АР. Именно у пациентов с детектируемым уровнем $\beta 1$ -специфического связывания отмечалась отрицательная корреляционная связь между уровнем аутоантител к $\beta 1$ -АР и одиночной ЖЭС ($r=-0,7, p<0,05$). В совокупности с полученными результатами об общем более низком уровне аутоантител в группе с идиопатическими ЖНРС по сравнению со здоровыми добровольцами, эти данные свидетельствует о важном вкладе циркулирующих аутоантител к $\beta 1$ -АР в патогенез ЖНРС у пациентов без органической патологии сердца.

Рисунок 5. Корреляционная связь между уровнем аутоантител к $\beta 1$ -АР и одиночной ЖЭС у пациентов с идиопатическими ЖНРС на чистом фоне и уровнем $\beta 1$ -специфического связывания более 500 имп./мин.



С учетом множества факторов, способных оказывать влияние на результат оценки относительной активности связывания $\beta 1$ -АР было проанализировано 2 подгруппы пациентов с

идиопатическими ЖНРС в динамике: без лечения и на фоне приема селективных β 1-адреноблокаторов.

При наблюдении за пациентами в динамике без лечения (всего 7 пациентов) существенного изменения количества ЖЭС не отмечалось, однако зарегистрировано значительное повышение относительной активности связывания β 1-АР в 15 раз, хотя и статистически недостоверное ($p=0,07$). Обратная ситуация наблюдалась у пациентов на фоне длительного лечения β 1-адреноблокаторами (всего 6 пациентов), у которых на фоне значительного уменьшения желудочковой эктопической активности (почти на 50%) относительная активность связывания β 1-АР достоверно не изменялась.

Важно отметить, что у пациентов на фоне назначения β 1-адреноблокаторов не происходило значимого изменения уровня аутоантител к β 1-АР, что позволяет использовать метод определения уровня аутоантител у пациентов, находящихся на лекарственной терапии.

Результаты, полученные при исследовании клеточного звена иммунного ответа пациентов различных групп, и их обсуждение.

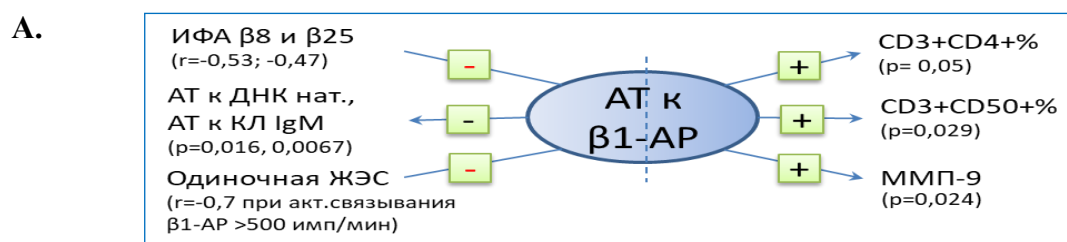
С учетом наличия тесной связи между аутоиммунными нарушениями и процессами воспаления и фиброза у всех включенных в исследование пациентов была проведена оценка ряда показателей клеточного и гуморального иммунного ответа. При попарном сравнении со здоровыми добровольцами у пациентов с ДКМП отмечался достоверно более низкий уровень общих и активированных В-лимфоцитов ($p=0,028, 0,032$), а у пациентов с идиопатическими ЖНРС лишь активированных В-лимфоцитов ($p=0,037$).

Напротив, в этих группах отмечался достоверно более высокий уровень активированных Т-лимфоцитов ($p=0,02; <0,001$). У пациентов с ИБС и ЖНРС при сравнении с пациентами без аритмии также был выявлен более высокий уровень активированных Т-лимфоцитов ($p<0,001$), а у пациентов с идиопатическими ЖНРС отмечалась положительная корреляционная связь активированных Т-лимфоцитов с количеством пробежек ЖТ и парной ЖЭС ($r=0,34, 0,29; p<0,05$).

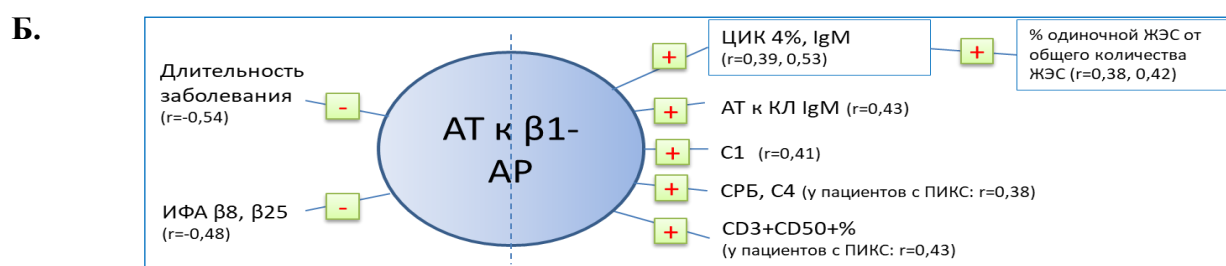
Согласно данным литературы активация Т-лимфоцитов может наблюдаться у всех включенных в настоящее исследование групп пациентов. [Stephenson E. и соавт., 2016; Noutsias M. и соавт., 2011; Smorodina N. и соавт., 2017; Robertson A.K.L. и соавт., 2006; Zhou X. и соавт., 2000]. Однако, с учетом выявленных изменений важным представляется не столько абсолютное снижение В-лимфоцитов, сколько дисбаланс Т- и В-клеточного звеньев иммунного ответа. Наряду с В-лимфоцитами, Т-клетки также участвуют в развитии различных аутоиммунных заболеваний [Dornmair K. и соавт., 2003]. Существует теория, согласно которой после повреждения (ишемического или инфекционного) сердце может стать мишенью для Т-клеточно-опосредованного аутоиммунного воспаления [Stephenson E. И соавт., 2016].

Имеются данные, что β 1-АР на поверхности лимфоцитов опосредуют процессы активации клеток, их миграции и продукции антител [Loza M.J. и соавт., 2007]. Было показано, что аутоантитела к β 1-АР от пациентов с ДКМП способствуют пролиферации Т-лимфоцитов через β 1-АР, ингибируют синтез ИФН- γ и увеличивают синтез ИЛ-4 [Du Y. и соавт., 2012]. В настоящей работе связь уровня аутоантител к β 1-АР с различными субпопуляциями Т-лимфоцитов была выявлена у пациентов с ДКМП, идиопатическими ЖНРС, ИБС без ЖНРС, а также у пациентов с ИБС и ПИКС в анамнезе (Рисунок 6).

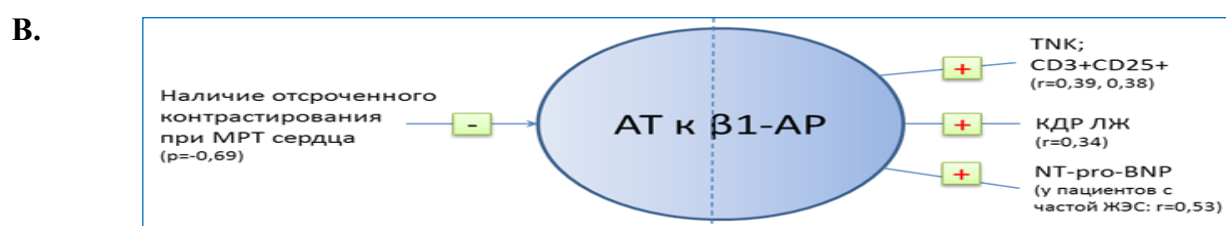
Рисунок 6. Связь уровня аутоантител к β 1-АР, определенного методом ИФА с использованием клеток, с другими лабораторными и инструментальными показателями у пациентов с идиопатическими ЖНРС (А), с ИБС и ЖНРС (Б) и с ДКМП (В).



Примечание: Для показателей CD3+CD4+%, CD3+CD50+%, ММП-9, АТ к ДНК нат., АТ к КЛ IgM приведены значения «р» при сравнении групп пациентов с уровнем аутоантител к β 1-АР ≤ 1 усл. ед. и $\geq 36,5$ усл.ед., для показателей ИФА β 8, ИФА β 25 и одиночной ЖЭС приведен коэффициент корреляции «г» при уровне $p < 0,05$.



Примечание: Для всех показателей приведен коэффициент корреляции «г» при уровне $p < 0,05$.



Примечание: Для показателей TNK, CD3+CD25+, КДР ЛЖ, NT-pro-BNP приведен коэффициент корреляции «г» при уровне $p < 0,05$; значение «р» использовано при сравнении пациентов с и без отсроченного контрастирования по данным МРТ сердца.

Таким образом, изменение уровня аутоантител к β 1-АР, наряду с дисбалансом Т- и В-клеточного звеньев иммунитета, могут свидетельствовать о важном значении аутоиммунного компонента в патогенезе заболевания.

Результаты, полученные при исследовании гуморального звена иммунного ответа пациентов различных групп, и их обсуждение.

Доказано, что повышение уровня маркеров воспаления может быть независимым предиктором развития ЖНРС и ВСС [Zhou X. и соавт., 2000; Hansson G.K. и соавт., 2005]. Достоверное повышение уровня СРБ, С3 и С4 компонентов комплемента, а также ФНО- α наблюдалось при сравнении пациентов с ДКМП со здоровыми добровольцами ($p=0,0013, 0,0031, 0,0083, 0,041$), что согласуется с данными литературы [Albert C.M. и соавт., 2002; Bruins P. и соавт., 1997]. При этом у пациентов с уровнем СРБ более 2,3 мг/л при сравнении с пациентами с уровнем СРБ менее 0,89 мг/л отмечался достоверно больший КДР и КСР ЛЖ ($p=0,003; 0,007$). У пациентов с редкой ЖЭС снижение ФВ ЛЖ было ассоциировано с повышением уровня ФНО- α ($r=-0,72; p<0,05$). Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым повышение уровня провоспалительных маркеров тесно связано с выраженностью симптомов сердечной недостаточности, эхокардиографическими параметрами дисфункции левого желудочка [Mahon N.G. и соавт., 2002; Zwaka T.P. и соавт., 2002], ассоциированы с неблагоприятным прогнозом и/или смертностью [Nasonov E.L. и соавт., 1989; Kim S.K. и соавт., 2011], что в совокупности подтверждает роль воспаления в развитии данного заболевания [Hogue M. и соавт., 2004].

У пациентов с ИБС активация воспалительных реакций также может быть ассоциирована с прогрессированием заболевания и являться предиктором неблагоприятных событий, в том числе развития ЖНРС [Szodoray P. и соавт., 2006]. У пациентов с ИБС при наличии ЖНРС достоверно чаще по сравнению с пациентами без аритмии отмечалось повышение уровня ИЛ-6 ($p=0,04$), а ФНО- α коррелировал с парной ЖЭС и пробежками ЖТ ($r=0,38, 0,47, p<0,05$). Действительно, у пациентов с ИБС и ранее имплантированным КВД некоторые маркеры воспаления, в том числе ИЛ-6, ассоциированы с риском развития ЖТ или ФВ ЛЖ и могут использоваться для стратификации риска ВСС [Streitner F. и соавт., 2007]. Также отмечалась взаимосвязь маркеров воспаления с размерами и ФВ ЛЖ: у пациентов с ИБС и ЖНРС выявлена отрицательная корреляционная связь ФВ ЛЖ с уровнем ФНО- α и ИЛ-6 ($r=-0,43; p<0,05$). У пациентов с ИБС без ЖНРС КДР ЛЖ положительно коррелировал с уровнем СРБ ($r=0,52, p<0,05$). Полученные данные в совокупности свидетельствуют в пользу роли воспаления в ремоделировании левого желудочка и развитии ЖНРС.

У пациентов с идиопатическими ЖНРС за исключением достоверно более высокого уровня ФНО- α по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p<0,001$), связи маркеров воспаления с выраженностью ЖНРС и размерами левого желудочка выявлено не было.

ВЫВОДЫ

1. Метод ИФА с использованием линии клеток, трансфицированных геном β 1-АР человека и экспрессирующих на своей поверхности рекомбинантный β 1-АР, позволяет оценивать уровень аутоантител к β 1-АР у пациентов с ЖНРС различной этиологии и у здоровых добровольцев.
2. При анализе уровня аутоантител к β 1-АР методом ИФА с использованием клеток пациенты с ДКМП характеризовались достоверно более высоким уровнем, а пациенты с идиопатическими ЖНРС - достоверно более низким уровнем аутоантител по сравнению со здоровыми добровольцами, что свидетельствует о том, что изменение уровня аутоантител к β 1-АР может вносить вклад в патогенез заболевания. Уровень аутоантител к β 1-АР у пациентов с ИБС с и без ЖНРС достоверно не отличался от такового у здоровых добровольцев.
3. Уровень аутоантител к β 1-АР (общая фракция IgG), определенный при помощи ИФА с использованием пептидов β 8 и β 25, не различался между группами пациентов и существенно не отличался от фоновых значений. Вместе с тем, уровень аутоантител к β 1-АР (подкласс IgG3) был достоверно выше у пациентов с ДКМП по сравнению со здоровыми добровольцами, что может свидетельствовать о различном вкладе разных подклассов аутоантител в патогенез заболевания.
4. При помощи модифицированного радиолигандного метода у пациентов с идиопатическими ЖНРС оценена относительная активность связывания β 1-АР на суммарных лимфоцитах периферической крови. Наличие отрицательной корреляционной связи между уровнем аутоантител к β 1-АР и одиночной ЖЭС у пациентов с детектируемым уровнем относительной активности связывания β 1-АР (>500 имп. мин.) и достоверно более низкий уровень аутоантител в данной группе в целом по сравнению со здоровыми добровольцами свидетельствует в пользу роли данных аутоантител в патогенезе ЖНРС.
5. У пациентов с идиопатическими ЖНРС, ДКМП и ИБС без ЖНРС выявлена положительная корреляционная связь уровня аутоантител к β 1-АР с различными субпопуляциями лимфоцитов.
6. У пациентов с ИБС и ЖНРС выявлена положительная корреляционная связь уровня аутоантител к β 1-АР с ЦИК 4% и IgM, которые в свою очередь коррелировали с процентом одиночной ЖЭС от общего количества, а при наличии ПИКС в анамнезе - с маркерами воспаления (СРБ и С4 компонентом комплемента), что может указывать на участие аутоиммунного компонента наряду с воспалением в генезе ЖНРС у данной категории пациентов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки уровня аутоантител к $\beta 1$ -АР возможно применение как метода ИФА с использованием клеток, трансфицированных геном $\beta 1$ -АР человека (для определения общей фракции IgG), так и ИФА с использованием пептидов (для определения подкласса IgG3).
2. Наряду с методами стандартного клинического обследования, для выявления аутоиммунного компонента в патогенезе заболевания у пациентов с идиопатическими ЖНРС и ДКМП в диагностический алгоритм целесообразно включать исследование уровня аутоантител к $\beta 1$ -АР.
3. Изменение уровня аутоантител к $\beta 1$ -АР у пациентов с идиопатическими ЖНРС и ДКМП наряду с выявлением дисбаланса Т- и В-клеточного звеньев иммунного ответа (снижением уровня активированных В-лимфоцитов и повышением уровня активированных Т-лимфоцитов относительно здоровых) указывает на возможный воспалительный генез заболевания у данных категорий пациентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Gupalo E.M., Kostyukevich M.V., Mironova N.A., Shlevkov N.B., Kiktev V.G., Bakalov S.A., Sharf T.V., Efremov E.E., Chumachenko P.V., Golitsyn S.P., Ostroumov E.N., Shumakov D.V., Kotina E.D. Electrical storm due to myocarditis in post-infarct patient: When two diseases meet Cor et vasa. – 2015.-57. С. 347–353
2. Костюкевич М.В., Зыков К.А., Миронова Н.А., Агапова О.Ю., Шевелев А.Я., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Голицын С.П.. Роль аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору при сердечно-сосудистых заболеваниях. Кардиология. – 2016. -№ 12 - С. 5-11
3. Миронова Н.А., Беляева М.М., Костюкевич М. В., Голицын С.П. Аутоиммунное воспаление - как вероятный фактор развития нарушений ритма и проводимости сердца. Неотложная кардиология. – 2016. -№4 – С. - 51-59
4. Шевелев А.Я., Костюкевич М.В., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Миронова Н.А., Зыков К.А., Каширина Н.М., Кузнецова И.Б., Шарф Т.В., Мамочкина Е.Н., Липатова Л.Н., Пекло М.М., Руткевич П.Н., Янушевская Е.В., Рыбалкин И.Н., Стукалова О.В., Малкина Т.А., Беляева М.М., Кузнецова Т.В., Ткачев Г.А., Зинченко Л.В., Гупало Е.М., Агапова О.Ю., Юренева-Тхоржевская Т.В., Рвачева А.В., Сидорова М.В., Садгян А.С., Терещенко С.Н., Голицын С.П.. Определение содержания аутоантител к $\beta 1$ адренорецептору в сыворотке крови пациентов методом конкурентного иммуноферментного анализа на клетках. Кардиология. – 2016. - №11 – С. 61-70
5. Костюкевич М.В., Агапова О.Ю., Скоблов Ю. С., Зыков К.А., Миронова Н.А., Малкина Т.А. Голицын С.П. $\beta 1$ -адренорецепторная активность лимфоцитов периферической крови у

пациентов с желудочковой экстрасистолией без органической патологии сердца. Вестник Аритмологии, Приложение А. – 2016. – С. 61

6. Костюкевич М.В., Агапова О.Ю., Скоблов Ю. С., Зыков К.А., Ефремов Е.Е., Шарф Т.В., Миронова Н.А., Голицын С.П. Роль циркулирующих аутоантител к $\beta 1$ -адренорецепторам и состояние $\beta 1$ -адренорецепторного аппарата у пациентов с желудочковыми нарушениями ритма сердца. X Региональная научно-практическая конференция с международным участием «Клиническая электрофизиология и интервенционная аритмология». Материалы конгресса. Томск. – 2016. - С. 42-45
7. Костюкевич М.В., Зыков К.А., Миронова Н.А., Малкина Т.А., Шевелев А.Я., Власик Т.Н., Ефремов Е.Е., Шарф Т.В., Голицын С.П. Уровень аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору у пациентов с «идиопатическими» желудочковыми нарушениями ритма сердца, ишемической болезнью сердца и ДКМП. Материалы VII Всероссийского съезда аритмологов. Москва. – 2017. – С. 60-61.
8. Kostyukevich M.V., Zykov K.A., Mironova N.A., Shevelev A.Y., Vlasik T.N., Efremov E.E., Sharf T.V., Golitsyn S.P. Level of autoantibodies against beta1-adrenoreceptor in patients with ventricular arrhythmias with DCM, ischemic heart disease and "idiopathic" heart rhythm disorders Europace. – 2017. – Vol. 19. – Suppl. 3. – P. 219.
9. Kostyukevich M.V., Yeghiazaryan L.H., Zykov K.A., Mironova N.A., Stukalova O.V., Golitsyn S.P. Markers of fibrosis in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy and ventricular arrhythmia. European Journal of Heart Failure. - 2017. – Vol. 19. Suppl. 1. – P. 255.

ПАТЕНТЫ

1. Получен Евразийский патент №026837: «Радиолигандный способ количественной оценки рецепторной активности β -адренорецепторов на поверхности Т-лимфоцитов человека».
2. Подана заявка на патент: "Оптимизированный ген *ADRB1opt* $\beta 1$ -адренорецептора человека, оптимизированные гены *hNC2367* и *hLC2367* тяжелой и легкой цепей химерного (мышь/человек) рекомбинантного антитела, оптимизированные гены *mNC2367* и *mLC2367* тяжелой и легкой цепей мышинового рекомбинантного антитела, химерное (мышь/человек) и биотинилированное мышинное рекомбинантные антитела *hAB2367* и *mAB2367*, линия клеток ADL-7A – продуцент рекомбинантного $\beta 1$ -адренорецептора человека, линия клеток HR12 – продуцент химерного (мышь/человек) рекомбинантного антитела *hAB2367*, линия клеток MDR1 – продуцент мышинового рекомбинантного антитела *mAB2367* и способ конкурентного иммуноферментного анализа для определения аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору".