



УДК 612.179.2

Г. М. Воробйова, Я. В. Ткаченко, Л. Ф. Яковенко, Л. М. Капустян,
Л. Л. Сидорик, І. М. Ємець

Анти-Hsp60 антитіла у клінічно здорових донорів та новонароджених із критичною вродженою вадою серця, яким переливали компоненти донорської крові

(Представлено членом-кореспондентом НАН України О. І. Корнелюком)

Встановлено, що плазма клінічно здорових донорів може мати підвищений вміст анти-Hsp60 антитіл. Вперше показано, що IgG антитіла, афінно очищені із зразків високореактивної до Hsp60 за результатами ELISA сироватки клінічно здорових донорів, розпізнавали в сумарних лізатах біоптатів правого передсердя новонароджених з транспозицією магістральних судин (ТМС) білок з молекулярною масою близько 60 кДа. Встановлено пряму кореляцію між об'ємом перелитої донорської плазми і терміном перебування новонароджених з ТМС у стаціонарі ($r = 0,54, p < 0,05$) та сироватковим рівнем анти-Hsp60 антитіл у післяопераційний період (1-ша доба — $r = 0,37$; 3-тя доба — $r = 0,4; p < 0,05$).

Heat shock proteins (HSP) — висококонсервативні стресові білки, які одні із перших синтезуються під час гамето- та ембріогенезу. Hsp60 є основним мітохондріальним шапероном, який забезпечує правильний фолдинг мітохондріальних білків, а також присутній у цитоплазмі, де виконує антиапоптичну функцію [1]. Локалізація Hsp60 на клітинній мембрані асоційована з мембранним транспортом та сигнальними процесами. Hsp60 може вивільнятися в позаклітинне середовище (у кардіоміоцитах — екзосомальним шляхом) [2]. Позаклітинний Hsp60 відіграє роль ліганду для Toll-подібного рецептора 4 (TLR4) і розглядається як можливий сигнал “небезпеки” для імунної системи [3].

Показано, що індукція Hsp60 у кардіоміоцитах помірним стресом запобігає негативним наслідкам дії більш сильного стресу. Встановлено, що рівень Hsp60 у кардіоміоцитах пацієнтів із фібриляцією передсердя достовірно не відрізняється від такого у пацієнтів контрольної групи, проте у пацієнтів з помірним, сильним та дуже сильно вираженим міолізисом він достовірно нижчий порівняно з пацієнтами зі слабо вираженим міолізисом [4]. На клітинній поверхні кардіоміоцитів Hsp60 експонується в підвищеній кількості після дії будь-яких стресових факторів, у тому числі при гіпоксії та хірургічному втручанні [5].

© Г. М. Воробйова, Я. В. Ткаченко, Л. Ф. Яковенко, Л. М. Капустян, Л. Л. Сидорик, І. М. Ємець, 2013

Локалізація Hsp60 на мембрані кардіоміоцитів, а також його наявність у позаклітинному просторі може являти потенційну мішень для перехресно-реактивних антитіл до мікробних Hsp60. Такі антитіла можуть бути в донорській крові, компоненти якої використовуються, зокрема, при хірургічній корекції критичних вроджених вад серця (ВВС). Встановлено, що перехресно-реактивні антитіла до мікробних Hsp60 здатні опосередковувати комплемент-залежну цитотоксичність, зумовлювати лізис або апоптоз клітин, на поверхні яких локалізований ендогенний Hsp60 [6]. Вони можуть утворювати імунні комплекси з ендогенним Hsp60 (мембраноасоційованим та/або циркулюючим у плазмі). Такі імунні комплекси можуть зумовлювати активацію комплементу, індукувати продукцію прозапальних цитокінів, а також накопичуватись у органах, здійснюючи патологічний вплив на тканини [7]. Експериментально показано, що моноклональні анти-Hsp60 антитіла здатні підсилювати запальні реакції, індуковані Hsp60 (продукцію фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну-8) [8]. Встановлено зв'язок між наявністю в доопераційний період циркулюючих анти-Hsp65 антитіл класу IgG у дорослих пацієнтів з операціями на серці та розвитком фібриляції передсердя у післяопераційний період [5].

Ми ставили за мету дослідження рівня анти-Hsp60 антитіл в сироватці клінічно здорових донорів, а також новонароджених з критичною ВВС, яким під час хірургічної операції з використанням апарату штучного кровообігу переливали компоненти донорської крові.

Матеріали та методи досліджень. Обстежено 112 клінічно здорових донорів віком від 20 до 48 років, 20 клінічно здорових новонароджених та 60 новонароджених з критичною ВВС — транспозицією магістральних судин (ТМС), яким під час операції з використанням апарату штучного кровообігу переливали компоненти донорської крові. Дозвіл на отримання біоптату правого передсердя новонароджених під час хірургічної корекції критичної ВВС було схвалено етичною комісією ДУ “Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України”.

Рівень IgG анти-Hsp60 антитіл у сироватці визначали ELISA з модифікаціями [9]. Як антиген використовували рекомбінантний білок GroEl *Escherichia coli* (прокаріотний гомолог Hsp60 людини). Одержання та очистку рекомбінантного білка GroEl *E. coli* проводили за розробленою методикою [10]. Як позитивний контроль використовували поліклональні антитіла до GroEl *E. coli*. Антитілопозитивною вважали сироватку, оптична густина якої у розведенні 1 : 50 перевищувала середнє значення оптичної густини на два стандартних відхилення ($m + 2sd$). Усі досліджувані зразки сироватки було проскриновано на наявність анти-Hsp60 антитіл одночасно (5 відтворюваних повторів), у роботі представлено результати останньої постановки.

Очищення IgG антитіл із зразків високореактивної до Hsp60 за результатами ELISA сироватки клінічно здорових донорів проводили методом афінної хроматографії на Protein G-сефарозі.

Сумарний лізат із біоптату правого передсердя міокарда новонароджених з ТМС ($n = 9$) отримували з використанням Rіра буферу (20 мМ *трис*-HCl, рН 7,5; 150 мМ NaCl; 1 мМ ЕДТА; 1% NP-40; 1% дезоксихолат натрію; 0,1% додецилсульфат натрію; 0,1% SDS, 0,1% розчин суміші інгібіторів протеаз (“Sigma”, США), PMSF).

Електрофорез отриманих білкових препаратів проводили у 12% ПААГ в денатуруючих умовах за Леммлі.

Вестерн-блотинг (імуноблотинг) проводили за стандартною методикою, використовували поліклональні анти-GroEl антитіла та очищені на Protein G-сефарозі IgG антитіла із

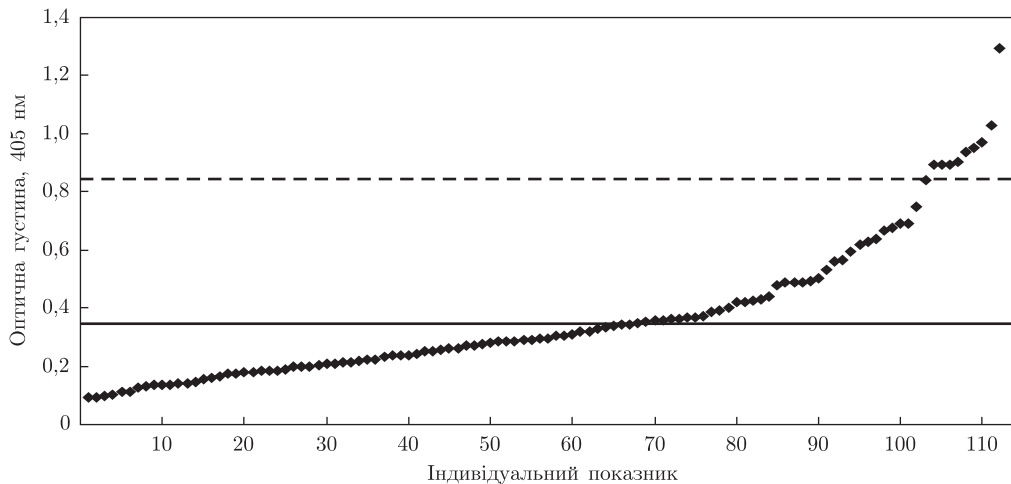


Рис. 1. Рівень анти-Нсп60 антитіл у сироватці клінічно здорових донорів (індивідуальні показники в зростаючому порядку), визначений ELISA. Анти-Нсп60-позитивною (штрихова лінія) вважали сироватку, оптична густина якої перевищувала середнє значення оптичної густини на два стандартних відхилення ($m + 2sd$). Суцільна лінія — середнє значення досліджуваного показника (m)

зразків високореактивної до Нсп60 за результатами ELISA сироватки клінічно здорових донорів.

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою пакета програм STATISTICA 8.0 (Stat-Soft, 2007, США). Результати подано у вигляді середніх значень (m) з вказівкою на стандартне відхилення (sd). Для порівняння вибірок досліджуваних груп використовували U -критерій Манна-Уїтні (Mann-Whitney U -test), для порівняння вибірко-вих часток — критерій Фішера.

Коефіцієнт взаємного спряження визначали згідно з [11].

Результати досліджень та їх обговорення. У сироватці усіх обстежених клінічно здорових донорів виявлено анти-Нсп60 антитіла (рис. 1). У 8,93% (10/112) донорів сироватка була анти-Нсп60-позитивною (штрихова лінія), ще у 25% (28/112) досліджуваний показник перевищував середнє значення (суцільна лінія).

Компоненти донорської крові застосовували під час хірургічної корекції вади у новонароджених з ТМС, тому ми визначали рівень анти-Нсп60 антитіл у даних пацієнтів у динаміці: до операції та на 1-шу, 3-тю, 7-му добу після неї. За результатами проведених досліджень, у 67,5% пацієнтів сироватка була анти-Нсп60-негативною протягом всього періоду спостереження (I підгрупа), у 20% — анти-Нсп60-позитивною як до операції, так і в післяопераційний період (II підгрупа), у 12,5% — анти-Нсп60-позитивна сироватка детектувалася лише в післяопераційний період (III підгрупа). Між зазначеними підгрупами не виявлено статистично достовірної різниці за середніми значеннями клінічних показників (табл. 1). За результатами частотного аналізу, у реанімації більше 144 год (6 діб) перебувало: серед новонароджених I підгрупи — 25,7%, II підгрупи — 50%, III підгрупи — 42,85% пацієнтів, у стаціонарі більше 20 днів після операції — 12, 10 та 42,85% пацієнтів відповідно, гіпертермія в післяопераційний період спостерігалася у 51,35, 88,9 та 100% пацієнтів, тривалість антибіотикотерапії понад 7 діб мала місце у 19,35, 62,5 та 50% пацієнтів ($p > 0,05$). На рис. 2 наведено графічне зображення клінічних показників у формі порівнюваних площин.

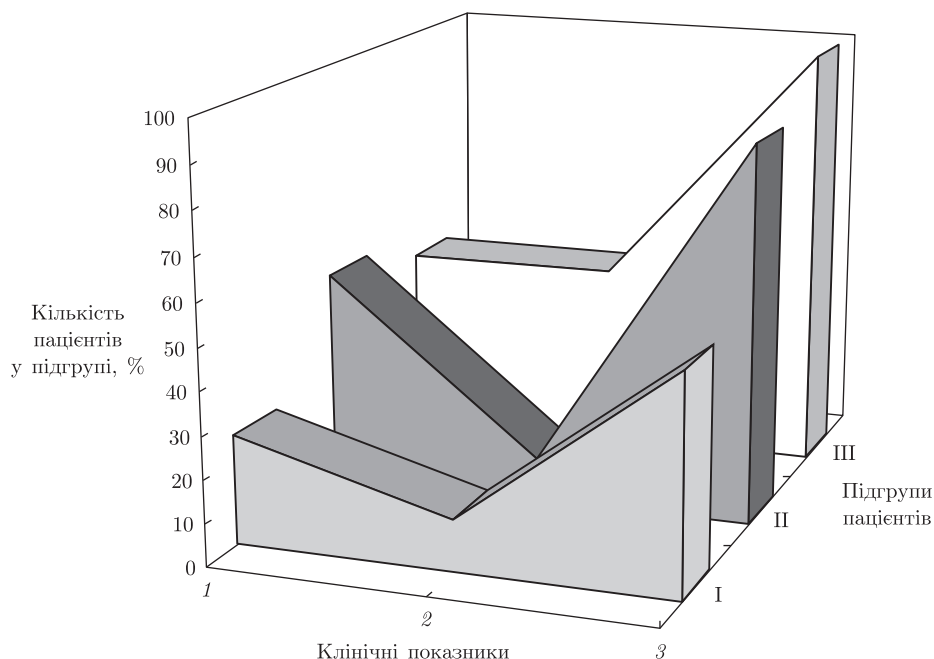


Рис. 2. Графічний аналіз за клінічними показниками пацієнтів з транспозицією магістральних судин, яким переливали компоненти донорської крові. Клінічні показники: 1 – термін перебування пацієнтів у реанімації більше 144 год; 2 – термін перебування у стаціонарі більше 20 днів після операції; 3 – гіпертермія у післяопераційний період).

Підгрупи пацієнтів: I – анти-Нсп60-негативна сироватка до та після операції; II – анти-Нсп60-позитивна сироватка до та після операції; III – анти-Нсп60-позитивна сироватка лише після операції

Коефіцієнт взаємного спряження гіпертермії та наявності анти-Нсп60-позитивної сироватки в післяопераційний період становив $K = 0,374$. Виявлено пряму кореляцію між об'ємом перелитої донорської плазми та терміном перебування новонароджених з ТМС у стаціонарі ($r = 0,54, p < 0,05$), а також між об'ємом перелитої донорської плазми та рівнем анти-Нсп60

Таблиця 1. Клінічні показники у новонароджених із транспозицією магістральних судин, яким під час хірургічної операції переливали компоненти донорської крові

Показник	I підгрупа, антитілонегативна сироватка до та після операції	II підгрупа, антитілопозитивна сироватка до та після операції	III підгрупа, антитілопозитивна сироватка після операції	Норма
Термін перебування в реанімації, год	153,4 ± 66,40	204,1 ± 100,73	171,42 ± 52,18	—
Термін перебування в стаціонарі після операції, дів	15,0 ± 6,14	15,0 ± 3,52	16,7 ± 5,5	—
Тривалість антибіотикотерапії, дів	6,96 ± 4,94	9,5 ± 5,83	8,8 ± 2,28	—
Швидкість осідання еритроцитів (8-ма доба), мм/год	15,31 ± 11,59	13,0 ± 13,83	23,83 ± 18,17	1–20
Інтерлейкін-8 (8-ма доба), пг/мл	40,86 ± 27,82	92,47 ± 84,34	86,76 ± 96,41	12,54 ± 3,8

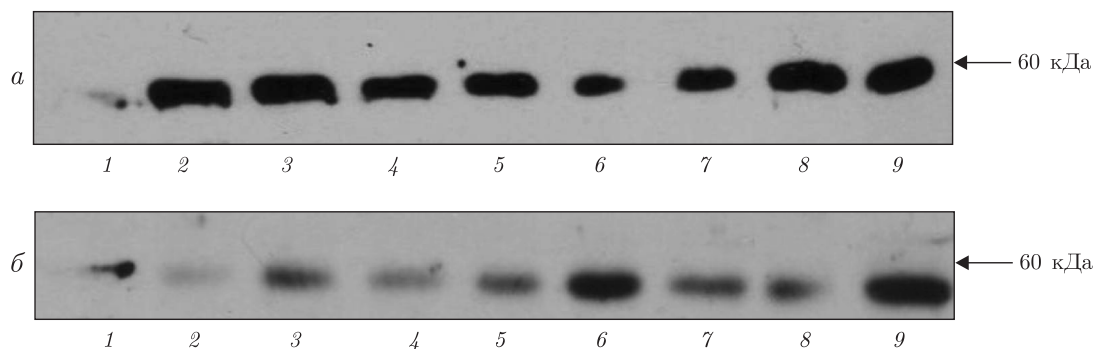


Рис. 3. Виявлення Hsp60 у сумарних лізатах правого передсердя новонароджених з ТМС методом вестерн-блотингу.

1–9 – індивідуальні сумарні лізати біоптатів правого передсердя новонароджених з ТМС; а – вестерн-блотинг з використанням поліклональних анти-GroE1 антитіл; б – вестерн-блотинг з використанням IgG антитіл, афінно очищених на Protein G сефарозі із зразків високореактивної до Hsp60 (за результатами ELISA) сироватки клінічно здорових донорів

антитіл у новонароджених з ТМС (1-ша доба – $r = 0,37$; 3-тя доба – $r = 0,4$; $p < 0,05$). Тобто чим більший об'єм донорської плазми переливали новонародженим з ТМС, тим довше пацієнти перебували в стаціонарі і тим вищим був сироватковий рівень анти-Hsp60 антитіл у післяопераційний період. Новонароджені III підгрупи мали ускладнення з боку дихальної системи.

Із зразків високореактивної до Hsp60 (за результатами ELISA) сироватки донорів на ProteinG сефарозі були почищені IgG антитіла. Встановлено, що такі антитіла розпізнавали в сумарних лізатах правого передсердя новонароджених з ТМС білок з молекулярною масою близько 60 кДа, що відповідає молекулярній масі досліджуваного білка Hsp60 (рис. 3).

За даними літератури, анти-Hsp60 антитіла виявляються в сироватці клінічно здорових осіб, їх вміст широко варіює і з віком рівень анти-Hsp60 антитіл зростає [7, 12, 13]. На сьогодні не встановлено, який рівень анти-Hsp60 антитіл у сироватці слід вважати нормою, відкритим також залишається питання про специфічність анти-Hsp60 антитіл та їх авідність у клінічно здорових донорів. Важливими завданнями є створення панелі добре охарактеризованих антигенів для оцінки спектра специфічних анти-Hsp60 антитіл у сироватці клінічно здорових донорів, а також стандартизація методу [7]. Аналіз даних літератури та результати власних досліджень дають можливість припустити, що у сироватці крові клінічно здорових донорів, найімовірніше, представлено сукупність анти-Hsp60 антитіл різної специфічності. Це можуть бути антитіла до Hsp60 нормальної мікрофлори шлункового тракту людини або мікроорганізмів, наявних у перидонтальних кишнях [7, 13]. Антитіла до Hsp60 людини можуть бути присутніми в сироватці клінічно здорових осіб і представляти природні (нормальні) аутоантитіла (“natural autoantibody”) [13, 14]. Вважається, що такі аутоантитіла відіграють важливу роль у регуляції аутоімунних процесів [14]. Проте їх вміст у нормі знаходиться на низькому рівні, до того ж, це переважно низькоафінні антитіла класу IgM, тоді як при патологічних процесах найчастіше продукуються високоафінні IgG аутоантитіла в підвищених кількостях. Оскільки Hsp60 є загальним імунодомінантним антигеном різних патогенних мікроорганізмів, які спричинюють гострі або хронічні захворювання, анти-Hsp60 антитіла можуть синтезуватися у відповідь на такі мікробні патогени [13]. На

думку деяких дослідників [14], підвищений рівень анти-Hsp60 антитіл є лише своєрідним “підписом” про наявність у минулому інфекційного захворювання. Інші дослідники вважають, що високий рівень анти-Hsp60 антитіл слід розглядати як біологічний маркер несприятливого стану організму, у тому числі наявності хронічного запалення, аутоімунних процесів тощо [15].

Підвищений рівень анти-Hsp60 антитіл виявляється при багатьох аутоімунних захворюваннях — артеріїті Такаяшу, поліартриті, гранулематозі Вегенера, системному червоному вовчаку, ревматоїдному артриті, аутоімунному гломерулонефриті, ювенільному дерматомиозиті, псоріазі, при різних серцево-судинних патологіях (коронарних захворюваннях серця, інфаркті міокарда, інсульті, гіпертензії, рестенозі після ангіопластики). Вважається, що анти-Hsp60 антитіла є фактором ризику розвитку серцево-судинних (насамперед атеросклерозу) та церебральних захворювань [7]. Специфічність анти-Hsp60 антитіл та їх роль у патогенезі захворювань залишається остаточно не визначеною.

За результатами проведених досліджень, у 8,93% обстежених нами клінічно здорових донорів сироватка була анти-Hsp60-позитивною, ще 25% донорів мали підвищений рівень анти-Hsp60 антитіл. Відкритими на сьогодні залишаються питання, чи може підвищений рівень анти-Hsp60 антитіл у обстежених нами донорів свідчити про наявність у них не діагностованих хронічних бактеріальних інфекцій, патологічних процесів тощо, чи можуть циркулюючі у плазмі донорів анти-Hsp60 антитіла бути цитотоксичними для кардіоміоцитів новонародженого, як відбувається нейтралізація чужорідних донорських антитіл у організмі новонародженого і які віддалені наслідки буде мати переливання донорської плазми з підвищеним рівнем анти-Hsp60 антитіл на організм новонародженого з ТМС.

Таким чином, встановлено, що плазма клінічно здорових донорів може мати підвищений вміст анти-Hsp60 антитіл. Вперше показано, що IgG антитіла, афінно очищені із зразків високореактивної до Hsp60 за результатами ELISA сироватки клінічно здорових донорів, розпізнавали в сумарних лізатах біоптатів правого передсердя новонароджених з ТМС білок з молекулярною масою близько 60 кДа. Виявлено пряму кореляцію між об’ємом перелитої донорської плазми та терміном перебування новонароджених з ТМС у стаціонарі ($r = 0,54$, $p < 0,05$) та сироватковим рівнем анти-Hsp60 антитіл у післяопераційний період (1-ша доба — $r = 0,37$; 3-тя доба — $r = 0,4$; $p < 0,05$). У всіх новонароджених з ТМС, у яких після операції детектувалася анти-Hsp60-позитивна сироватка, спостерігалася гіпертермія в післяопераційний період, серед них був вищим процент пацієнтів, які перебували в реанімації більше 144 год, у стаціонарі — більше 20 діб, курс антибіотикотерапії у яких перевищував 7 діб, порівняно з пацієнтами, сироватка яких була анти-Hsp60-негативною протягом всього періоду спостереження (до та після операції — 7 діб).

1. Gupta S., Knowlton A. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis // *Circulation*. – 2002. – **106**. – P. 2727–2733.
2. Gupta S., Knowlton A. Hsp60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway // *Amer. J. Physiol. Heart and Circulat. Physiol.* – 2007. – **292**, No 6. – P. 3052–3056.
3. Osterloh A., Meier-Stiegen F., Veit A. et al. Lipopolysaccharide-free heat shock protein 60 activates T cells // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 47906–47911.
4. Yang M., Tan H., Cheng L. et al. Expression of heat shock proteins in myocardium of patients with atrial fibrillation // *Cell Stress and Chaperones*. – 2007. – **12**, No 2. – P. 142–150.
5. Mandal K., Jahangiri M., Mukhin M. et al. Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation // *Circulation*. – 2004. – **110**. – P. 2588–2590.

6. Perschinka H., Mayr M., Millonig G. et al. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – **23**, No 6. – P. 1060–1065.
7. Cappello F., de Macario E., Di Felice V. et al. *Chlamydia trachomatis* infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin // *Plos Pathogens.* – 2009. – **5**, No 8. – P. 1–9.
8. Yokota S., Minota S., Nobuhiro F. Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors // *Intern. Immun.* – 2006. – **18**. – P. 573–580.
9. Ткаченко Я. В., Яковенко Л. Ф., Жовнір В. А., Часовський К. С., Федевич О. М., Капустян Л. М., Саламаніна А. О., Воробйова Г. М., Сидорик Л. Л., Ємець І. М. Анти-Hsp60 антитіла у новонароджених зі складними вродженими вадами серця при застосуванні компонентів пуповинної та донорської крові // *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка.* – 2011. – **14**. – С. 24–28.
10. Капустян Л. Н., Киямова Р. Г., Гришкова В. С., Терентьев А. Г., Филоненко В. В., Сидорик Л. Л. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 // *Biopolym. Cell.* – 2006. – **22**, № 2. – P. 117–121.
11. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. – Москва: Изд-во АН СССР, 1963. – 333 с.
12. Rea I., McNerlan S., Pockley A. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging // *Exp. Gerontol.* – 2001. – **36**. – P. 341–346.
13. Uray K., Hudecz F., Fust G., Prohaszka Z. Comparative analysis of linear antibody epitopes on human and mycobacterial 60-kDa heat shock proteins using samples of healthy blood donors // *Int. Immunol.* – 2003. – **15**. – P. 1229–1236.
14. Varbiro Sz., Biro A., Cervenak J. et al. Human anti-60 kD heat shock protein autoantibodies are characterized by basic features of natural autoantibodies // *Acta Physiol. Hungar.* – 2010. – **97**, No 1. – P. 1–10.
15. Wu T., Tanguay R. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? // *Cell Stress Chaper.* – 2006. – **11**, No 1. – P. 1–12.

ДУ “Науково-практичний медичний центр
дитячої кардіології та кардіохірургії
МОЗ України”, Київ
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 29.11.2012

**А. М. Воробйова, Я. В. Ткаченко, Л. Ф. Яковенко, Л. М. Капустян,
Л. Л. Сидорик, И. М. Емец**

**Анти-Hsp60 антитела у клинически здоровых доноров
и новорожденных с критическим врожденным пороком сердца,
которым переливали компоненты донорской крови**

Установлено, что плазма клинически здоровых доноров может иметь повышенное содержание анти-Hsp60 антител. Впервые показано, что IgG антитела, афинно очищенные из образцов высокореактивной к Hsp60 по результатам ELISA сыворотки клинически здоровых доноров, узнавали в суммарных лизатах биоптатов правого предсердия новорожденных с транспозицией магистральных сосудов (ТМС) белок с молекулярной массой около 60 кДа. Установлена прямая корреляция между объемом перелитой донорской плазмы и термином пребывания пациентов в стационаре ($r = 0,54$, $p < 0,05$), а также сывороточным уровнем анти-Hsp60 антител в послеоперационный период (1-е сутки – $r = 0,37$; 3-и сутки – $r = 0,4$; $p < 0,05$).

G. M. Vorobyova, Y. V. Tkachenko, L. F. Yakovenko, L. M. Kapustian,
L. L. Sidorik, I. M. Yemets

**Anti-Hsp60 antibodies in clinically healthy donors and newborns with
complex congenital heart defect after donor blood components
transfusion**

High level of anti-Hsp60 antibodies has been detected in the plasma of some clinically healthy donors. It is shown firstly that affinely purified IgG antibodies from antibody-positive to Hsp60 sera of clinically healthy donors are recognized by the 60 kDa protein band in cardiac bioplates total lysates of neonates with TGV. The direct correlation between the volume of transfused donor plasma, the term of patients hospital staying ($r = 0.54$, $p < 0.05$) and serum levels of anti-Hsp60 antibodies in the postoperative period (1 day – $r = 0.37$; 3 days – $r = 0.4$; $p < 0.05$) has been established.