

ТИТРЫ АНТИТЕЛ К β_1 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРАМ И M_2 -ХОЛИНОРЕЦЕПТОРАМ У БОЛЬНЫХ С ЖЕЛУДОЧКОВЫМИ НАРУШЕНИЯМИ РИТМА СЕРДЦА БЕЗ ПРИЗНАКОВ ОРГАНИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ И ИХ ВОЗМОЖНОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

М.М. Рогова*, Н.А. Миронова, Е.С. Родионова, Т.А. Малкина, К.А. Зыков, Ж.Д. Беспалова, Р.Ш. Бибилашвили, Е.Е. Ефремов, С.П. Голицын

Российский кардиологический научно-производственный комплекс.
121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15А

Титры антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам у больных с желудочковыми нарушениями ритма сердца без признаков органического заболевания сердечно-сосудистой системы и их возможное клиническое значение

М.М. Рогова*, Н.А. Миронова, Е.С. Родионова, Т.А. Малкина, К.А. Зыков, Ж.Д. Беспалова, Р.Ш. Бибилашвили, Е.Е. Ефремов, С.П. Голицын
Российский кардиологический научно-производственный комплекс. 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15А

Цель. Определить наиболее перспективные антигенные детерминанты, моделирующие различные участки β_1 -адренорецепторов и M_2 -холинорецепторов, а также оценить их возможный вклад в развитие и поддержание нарушений ритма сердца, в частности, идиопатической желудочковой экстрасистолии.

Материал и методы. В исследование включено 70 больных с желудочковыми нарушениями ритма без признаков органических заболеваний со стороны сердечно-сосудистой системы (основная группа). Группу контроля составили 20 здоровых добровольцев. Всем пациентам выполнено определение уровней антител к антигенным детерминантам, моделирующим различные участки β_1 -адренорецепторов и M_2 -холинорецепторов. Части пациентов по показаниям проводилась этиотропная терапия кларитромицином и валацикловиром.

Результаты. При обследовании пациентов основной группы в 25% случаев были выявлены антитела к различным пептидным последовательностям β_1 -адренорецепторов и M_2 -холинорецепторов. Выявлена прямая корреляционная связь между частотой эпизодов желудочковой тахикардии и уровнями IgG к MRI-MRIV ($p=0,02$). При оценке эффективности проводимой этиотропной терапии в динамике в группе «нелеченных» больных отмечался рост титра антител к β_1 -адренорецепторам, к пептидной последовательности β_8 ($p=0,02$), а также снижение титра антител к M_2 -холинорецептору — химере MRI-MRIV IgM ($p=0,06$) и ARI-MRIV IgM ($p=0,07$). На фоне терапии валацикловиром зарегистрировано снижение титра IgG к ARI-MRIV ($p=0,02$), что в 4 случаях из 10 сопровождалось уменьшением желудочковой эктопической активности. Терапия кларитромицином на уровень антител достоверного влияния не оказывала.

Заключение. Продemonстрировано вероятное участие антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам в развитии идиопатических желудочковых аритмий. Отмечено наличие взаимосвязи между частотой эпизодов желудочковых тахикардий и уровнями титров антител к M_2 -холинорецепторам. Выполнена попытка проведения этиотропной терапии в зависимости от возможных механизмов развития аутоиммунного процесса. Из-за малочисленности групп наблюдения необходимы дальнейшие исследования для подтверждения или опровержения полученных результатов на большей выборке больных.

Ключевые слова: идиопатическая желудочковая экстрасистолия, антитела, β_1 -адренорецептор, M_2 -холинорецептор.

РФК 2012;8(5):647–654

Titers of antibodies to β_1 -adrenoceptor and M_2 cholinergic receptors in patients with ventricular arrhythmias without an organic cardiovascular disease and their possible clinical significance

М.М. Рогова*, Н.А. Мironova, Е.С. Rodionova, Т.А. Malkina, К.А. Zыkov, Zh.D. Bespalova, R.Sh. Bibilashvili, E.E. Efremov, S.P. Golitsyn.
Russian Cardiology Research and Production Complex. Tretya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

Aim. To identify the most promising epitopes that simulate various sites β_1 -adrenergic and M_2 -cholinergic receptors, and to evaluate their possible contribution to the development and maintenance of cardiac arrhythmias, particularly idiopathic ventricular arrhythmia.

Material and methods. Patients with ventricular arrhythmias without organic cardiovascular disease (the study group; $n=70$) were included in the study. The control group consisted of 20 healthy volunteers. Evaluation of levels of antibodies to antigenic determinants, modeling various sites β_1 -adrenergic and M_2 -cholinergic performed in all patients. Causal treatment with clarithromycin and valacyclovir performed in part of patients.

Results. Antibodies to different peptide sequences of β_1 -adrenergic and M_2 -cholinergic receptors have been identified in 25% of main group patients. A direct correlation between the frequency of episodes of ventricular tachycardia and IgG levels to MRI-MRIV ($p=0.02$) revealed. Increase in titre of antibodies to β_1 -adrenoceptors, to a peptide sequence β_8 ($p=0.02$), and lower titers of antibodies to the M_2 acetylcholine receptor — chimera MRI-MRIV IgM ($p=0.06$) and ARI-MRIV IgM ($p=0.07$) were observed when assessing the efficacy of the therapy in the causal dynamics in the group of "untreated" patients. IgG titer reduction of ARI-MRIV ($p=0.02$), which is 4 times out of 10 with reduction of ventricular ectopic activity, recorded after valacyclovir therapy. Clarithromycin therapy on the level of antibodies exerted no significant effect.

Conclusion. Possible involvement of antibodies to β_1 -adrenoceptor and M_2 -cholinergic receptors in the development of idiopathic ventricular arrhythmias demonstrated. The relationship between the frequency of episodes of ventricular tachycardia and levels of antibody titers to M_2 -cholinergic receptors found. Attempt of causal treatment, depending on the possible mechanisms of the autoimmune process is executed. Further studies to confirm or refute the results to the larger sample of patients are needed.

Key words: idiopathic ventricular premature beats, antibodies, β_1 -adrenergic receptor, the M_2 acetylcholine receptor.

Rational Pharmacother. Card. 2012;8(5):647–654

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): amble@inbox.ru

Сведения об авторах:

Рогова Мария Михайловна — аспирант отдела клинической электрофизиологии и рентгенохирургических методов лечения нарушений ритма и проводимости сердца НИИ кардиологии им. А.Л. Мясникова РКНПК

Миронова Наталья Александровна — к.м.н., научный сотрудник того же отдела

Родионова Екатерина Сергеевна — аспирант того же отдела
Малкина Татьяна Анатольевна — к.м.н., научный сотрудник того же отдела

Зыков Кирилл Алексеевич — д.м.н., руководитель лаборатории иммунопатологии сердечно-сосудистых заболеваний НИИ кардиологии им. А.Л. Мясникова РКНПК

Беспалова Жанна Дмитриевна — к.м.н., руководитель лаборатории синтеза пептидов НИИ экспериментальной кардиологии РКНПК

Бибилашвили Роберт Шалвович — к.ф.-м.н., руководитель лаборатории генной инженерии НИИ экспериментальной кардиологии РКНПК

Ефремов Евгений Евгеньевич — к.б.н., руководитель лаборатории иммунохимии НИИ экспериментальной кардиологии РКНПК

Голицын Сергей Павлович — д.м.н., профессор, руководитель отдела клинической электрофизиологии и рентгенохирургических методов лечения нарушений ритма и проводимости сердца НИИ кардиологии им. А.Л. Мясникова РКНПК

Аутоиммунные реакции могут лежать в основе различных заболеваний миокарда, таких как дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), миокардиты, ревматизм, «идиопатические» персистирующие перикардиты и атеросклероз [1–9]. Еще несколько лет назад аутоиммунная природа ряда сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе нарушений ритма и проводимости сердца, не рассматривалась как ключевое звено в патогенезе. При многих заболеваниях аутоантитела могут быть обнаружены в сыворотке крови за годы до развития клинических проявлений [10–12]. В ходе немногочисленных работ была выявлена связь между наличием аутоантител к различным структурам миокарда и развитием нарушений ритма и проводимости сердца, в частности, фибрилляции предсердий (ФП), синусовой брадикардии, блокадами проведения импульса, наджелудочковой и желудочковой экстрасистолии, желудочковой тахикардии [13–15].

В последние годы все больше работ посвящено исследованию возможной роли антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам в патогенезе развития идиопатических нарушений ритма и проводимости сердца. Антитела к M_2 -холинорецепторам обнаруживают у больных с дисфункцией синусового узла (75% случаев) [16], ФП (25% случаев) [17], желудочковой тахикардией (40% случаев) [18], что дает возможность предположить участие аутоиммунных механизмов в патогенезе этих аритмий. Chiale P.A. и соавт. продемонстрировали наличие высоких уровней антител к β_1 - и β_2 -адренорецепторам у больных с первичными желудочковыми нарушениями ритма (до 50%) и проводимости сердца (до 35%) по сравнению с контрольной группой здоровых лиц [19]. Антитела к обоим типам рецепторов в низких титрах также выявлены в сыворотках крови здоровых лиц [20–24].

В современной литературе описан ряд скрининговых методов выявления антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам: ELISA, иммуноблоттинг, определение функциональных свойств рецепторов на основании оценки степени продукции цАМФ [25, 26]. Тем не менее, в настоящее время не существует единой методики определения антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам, что в ряде случаев обусловлено выбором в качестве мишени различных антигенных детерминант.

Целью настоящего исследования являлось определение наиболее перспективных антигенных детерминант, моделирующих различные участки β_1 -адренорецепторов и M_2 -холинорецепторов, а также оценка их возможного вклада в развитие и поддержание нарушений ритма сердца, в частности, идиопатической желудочковой экстрасистолии.

Материал и методы

В исследование включено 70 пациентов (20 мужчин и 50 женщин; группа наблюдения) с желудочковыми нарушениями ритма без признаков органического заболевания сердечно-сосудистой системы, наблюдающихся на базе Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова РКНПК. В группу контроля вошли 20 здоровых добровольцев, сопоставимых с группой наблюдения. У всех пациентов, включенных в исследование, диагнозы ишемической болезни сердца, гипертонической болезни, пороков сердца (врожденные и приобретенные), первичные заболевания миокарда (дилатационная кардиомиопатия, гипертрофическая кардиомиопатия, аритмогенная дисплазия правого желудочка) исключались на основании отсутствия соответствующих данных в анамнезе и по результатам проведенного обследования. Всем пациентам проводилось клиничко-лабораторное обследование, включавшее сбор жалоб, анамнеза, контроль АД на приеме у врача с анализом дневника ежедневного самоконтроля АД (критериями нормального АД считались значения $AD \leq 140/90$ мм рт.ст.), регистрация 12-канальной ЭКГ и холтеровское мониторирование ЭКГ, нагрузочная проба на велоэргометре по стандартному протоколу Брюса, включающему трехминутные ступени с постепенным увеличением нагрузки, рентгенография органов грудной клетки и эхокардиография. Во всех случаях была исключена патология щитовидной железы, заболевания печени, почек и нарушения липидного обмена.

Исследование было выполнено на фоне отмены антиаритмической терапии (не менее 3 периодов полувыведения лекарственного препарата).

Методика синтеза полипептидных фрагментов β_1 -адренорецептора и M_2 -холинорецептора

На основании данных литературы и компьютерного предсказания потенциальных линейных антигенных детерминант для исследований были выбраны фрагменты 1-й и 2-й внеклеточных петель β_1 -адренорецептора: EYGSFFC(Acm)EL (125–133) **ARI**; ARRCYNPKCC(Acm)DF (206–218) **ARI**; HWWRAESDEARRCYN-DPKCCDFVTNR (197–222) **β8**; и M_2 -холинорецептора: YTVIGYWPLGVVCDL и YTVIGYWPLGVVC(CH₂CONH₂)DL (83–98) **MRI**; RTVEDGECYIQFFSNAAVTFGTAI и RTVEDGEC(CH₂CONH₂)YIQFFSNAAVTFGTAI (169–192) **MRII**; NTFCAPCIPNTV и NTFC(CH₂CONH₂)PC(CH₂CONH₂)IPNTV (410–421) **MRIII**; VEDGECYIQFFS (171–182) **MRIV**. Полипептиды получены в лаборатории синтеза пептидов Института экспериментальной кардиологии РКНПК. Для получения линейных полипептидов применялся твердофазный метод с использованием Fmoc-методологии. Полипептиды синтезированы в ручном варианте по стандартным протоколам твердофазного синтеза и после необходимых постсинтетических про-

цедур очищены до чистоты не менее 95% с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Кроме того, для получения искусственного антигена, наиболее близко повторяющего пространственную структуру 2-й внеклеточной петли β_1 -адренорецептора, в лаборатории генной инженерии Института экспериментальной кардиологии РКНПК, была рассчитана структура полипептида $\beta 25$, представляющая собой бициклический дисульфид. Химерные молекулы, представляющие собой несимметричные дисульфиды, и пептид $\beta 25$ были получены методами классической пептидной химии в растворе и очищены также с помощью ОФ-ВЭЖХ. Структура пептидов подтверждена данными масс-спектрометрии и 1H -ЯМР-спектроскопии; гомогенность пептидов подтверждена данными аналитической ВЭЖХ.

Методика иммуноферментного анализа

Определение аутоантител проводили унифицированным непрямым иммуноферментным методом (ИФА). Синтезированные на первом этапе пептидные последовательности, моделирующие внеклеточную часть β_1 -адренорецептора и M_2 -холинорецептора, были сорбированы на твердую фазу — полистироловый планшет для ИФА. Аутоантитела после взаимодействия с антигеном на твердой фазе определяются с помощью моноклональных антител к иммуноглобулинам класса IgG и IgM человека, ковалентно меченых ферментом — пероксидазой из хрена. Ферментативная активность, определяемая в колориметрической реакции пероксидазы с хромогеном, прямо пропорциональна концентрации определяемых антител. Уровень аутоантител определяли как отношение оптической плотности (ОП) A_{450} иммуноферментной реакции исследуемого образца к ОП стандарта.

При выявлении значимых титров антител к *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* по показаниям проводилась этиотропная терапия антибио-

тиком из группы макролидов — кларитромицином, а при наличии Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus и Herpes simplex 1,2 (по данным полимеразной цепной реакции и/или определении диагностически значимых титров антител к указанным вирусам по сравнению с референсными значениями) — противовирусным препаратом из группы аналогов нуклеозидов — валацикловиром с последующей оценкой динамики титра антител к β_1 -адренорецептору и M_2 -холинорецептору.

Статистический анализ

Анализ включал стандартные методы описательной статистики: вычисление средних, стандартных отклонений, стандартных ошибок, а также медианы и 25-й и 75-й перцентиль; определение критериев значимости — χ^2 Вальда, тест Манна-Уитни и F-критерий Фишера; категоризацию данных, построение таблиц сопряженности. Ввод данных, их редактирование и статистический анализ осуществлялись с использованием системы SAS (Statistical Analysis System), версия 6.

Результаты

Средний возраст пациентов группы наблюдения составил $37,2 \pm 13,6$ г. Пациенты данной группы имели желудочковые нарушения ритма сердца в виде желудочковой экстрасистолии (ЖЭС) не ниже II градации по В. Lown. По данным холтеровского мониторирования ЭКГ по 12 стандартным отведениям в 90% случаев преимущественным источником желудочковой эктопической активности являлся миокард правого желудочка. Диапазон общего количества ЖЭС за сутки по данным холтеровского мониторирования ЭКГ в группе наблюдения составил от 8000 до 89000, в среднем 16354 ± 15496 . Всем пациентам было выполнено определение антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам. Результаты были сопоставлены с данными, полученными среди здоровых лиц (рис. 1).

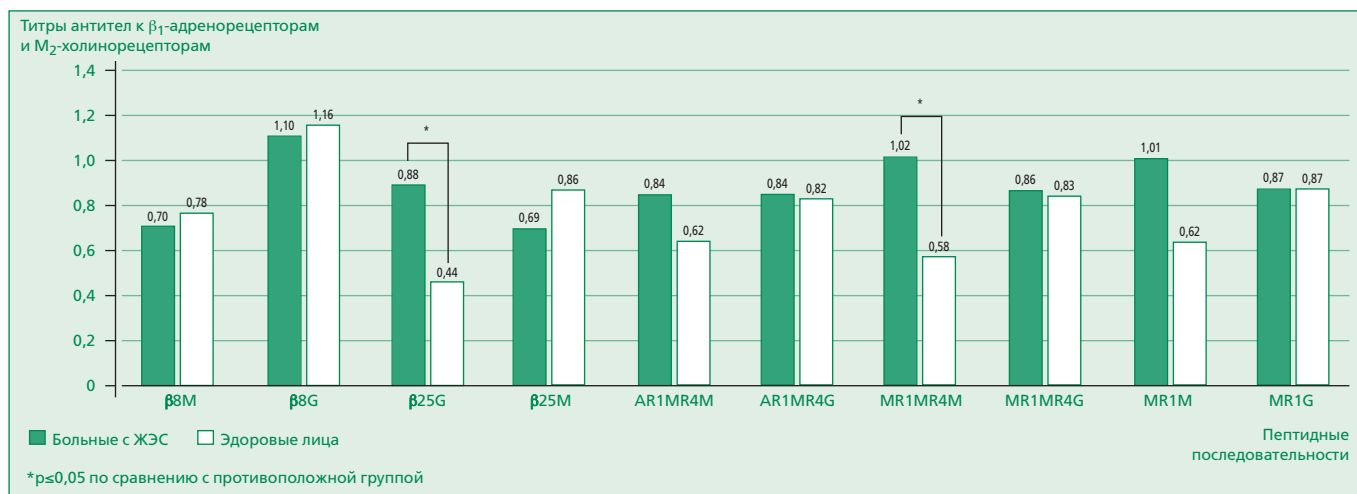


Рисунок 1. Показатели средних титров антител в группе больных с желудочковыми аритмиями и контрольной группе

Таблица 1. Результаты сравнения групп пациентов по уровням антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам с использованием критерия Манна-Уитни

Антитела класса IgM и IgG к синтезированным полипептидным фрагментам β_1 -адренорецептора и M_2 -холинорецептора	Ранг больные с ЖЭС (n=70)	Ранг контрольная группа (n=20)	U	Z	p	Z	p
β_8 Ig M	3258,00	747,00	594,00	0,19	0,85	0,19	0,85
β_8 Ig G	3381,00	805,00	606,00	-0,23	0,81	-0,23	0,81
β_{25} Ig M	3356,50	829,50	581,50	-0,48	0,63	-0,48	0,63
β_{25} Ig G	3435,00	570,00	417,00	2,04	0,04*	2,04	0,04
ARI-MRIV IgM	3278,00	638,00	502,00	0,80	0,42	0,80	0,42
ARI-MRIV IgG	3449,50	736,50	583,50	0,46	0,64	0,46	0,64
MRI-MRIV IgM	3452,50	552,50	399,50	2,22	0,03*	2,22	0,03
MRI-MRIV IgG	3451,50	734,50	581,50	0,48	0,63	0,48	0,63
MRI IgM	3388,00	617,00	464,00	1,54	0,12	1,54	0,12
MRI IgG	3398,00	788,00	623,00	-0,06	0,95	-0,06	0,95

* $p \leq 0,05$ по сравнению с противоположной группой

В группе наблюдения имело место 2-кратное повышение титра IgG к пептидной последовательности β_{25} ($0,88 \pm 0,41$) по сравнению со здоровыми добровольцами ($0,44 \pm 0,27$; $p=0,04$). Схожие результаты были получены при использовании в качестве антигенной детерминанты химеры MRI-MRIV IgM ($1,02 \pm 1,27$ — пациенты с ЖЭС; $0,58 \pm 0,22$ — контрольная группа; $p=0,03$) (табл. 1).

В ходе исследования за условную границу диагностической значимости был принят титр антител, превышающий или равный 1.

При обследовании пациентов с частой ЖЭС без признаков органической патологии со стороны сердечно-сосудистой системы в 25% были выявлены антитела к различным пептидным последовательностям β_1 -адренорецепторов и M_2 -холинорецепторов (табл. 2).

Принимая во внимание, что у всех больных, включенных в настоящее исследование, единственным клиническим проявлением патологического процесса,

протекающего в сердце, явились желудочковые нарушения ритма, оценивалось влияние антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам на развитие и поддержание желудочковой аритмии.

В ходе анализа данных было выявлено наличие прямой корреляционной связи между частотой эпизодов желудочковой тахикардии и уровнями IgG к MRI-MRIV ($p=0,02$). В то же время среди пациентов с высокими титрами IgG к MRI-MRIV отмечается тенденция к снижению средних значений частоты сердечных сокращений (ЧСС) за сутки ($p=0,06$) по данным холтеровского мониторирования ЭКГ. Отмечено наличие достоверной обратной связи между уровнем антител к β_1 -адренорецепторам и степенью желудочковой бигеминии (β_8 ; $p=0,08$), а также максимальной частотой сердечных сокращений за сутки (β_{25} ; $p=0,09$). При оценке полученных результатов отмечается тенденция к увеличению длительности QTc на фоне роста титра антител к пептидной последовательности β_{25} ($p=0,07$).

Таблица 2. Частота встречаемости «положительных» результатов среди пациентов с ЖЭС

Антитела класса IgM и IgG к синтезированным полипептидным фрагментам β_1 -адренорецептора и M_2 -холинорецептора	Количество наблюдений	Среднее значение	Медиана	Минимум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка
β_8 Ig M	9	1,46	1,26	1,10	2,57	1,14	1,66	0,48	0,16
β_8 Ig G	10	3,91	2,73	1,05	11,89	1,10	4,71	3,73	1,18
β_{25} Ig M	15	1,47	1,19	1,02	3,31	1,04	1,70	0,61	0,16
β_{25} Ig G	13	1,59	1,31	1,06	3,93	1,11	1,55	0,81	0,22
ARI-MRIV IgM	15	1,85	1,30	1,02	6,50	1,14	1,73	1,54	0,40
ARI-MRIV IgG	12	1,17	1,12	1,01	1,37	1,06	1,31	0,14	0,04
MRI-MRIV IgM	17	2,39	1,23	1,07	8,81	1,12	2,48	2,12	0,51
MRI-MRIV IgG	15	1,18	1,14	1,02	1,47	1,08	1,25	0,14	0,04
MRI IgM	15	2,46	1,36	1,07	8,65	1,12	2,90	2,06	0,53
MRI IgG	16	1,19	1,18	1,00	1,59	1,07	1,23	0,15	0,04

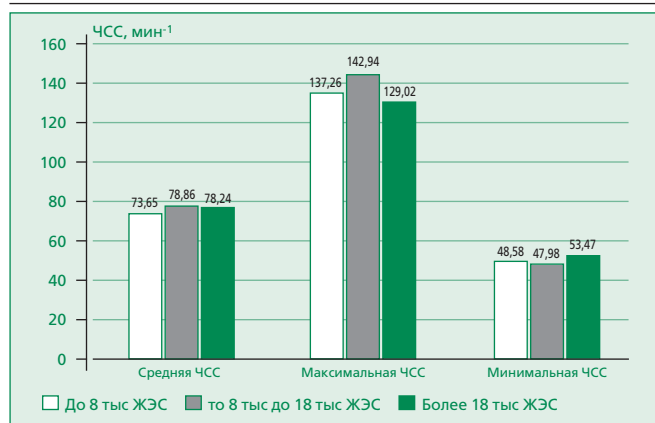


Рисунок 2. Частотные характеристики синусового ритма по группам, в зависимости от общего количества ЖЭС за сутки по данным холтеровского мониторирования ЭКГ

При рассмотрении данных холтеровского мониторирования отмечена неоднородность группы пациентов по уровню желудочковой экстрасистолии за сутки, в связи с чем было выполнено разделение всех пациентов на 3 группы по уровню общей желудочковой эктопической активности согласно терциям. Группу 1 составили пациенты с общим числом ЖЭС <8 тысяч за сутки; во 2-ю группу вошли пациенты с уровнем ЖЭС от 8 до 18 тысяч; в 3-ю группу вошли пациенты с общим количеством ЖЭС ≥18 тысяч за сутки. В дальнейшем было выполнено сравнение сформированных групп.

Учитывая возможное влияние антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам на частоту сердечных сокращений (ЧСС), проводился анализ частотных показателей синусового ритма. При оценке средних и максимальных частот максимальные значения были зарегистрированы во второй группе пациентов (ЧСС_{ср} 78,86 мин⁻¹, ЧСС_{макс} 142,93 мин⁻¹) (рис. 2). В то же время наибольшие значения минимальной ЧСС за сутки зарегистрированы среди пациентов 3 группы (53,47 мин⁻¹) (рис. 2).

По уровням антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам достоверных различий между группами не выявлено. Однако среди антител к различным пептидным последовательностям β_1 -адренорецептора у пациентов 2 группы отмечаются максимальные титры антител к β_8 ($p=0,09$), а у пациентов с максимальным количеством ЖЭС (3 группа) являются наибольшие титры антител к пептидной последовательности β_{25} ($p=0,09$).

Согласно дизайну исследования, части пациентов по показаниям проводилась этиотропная терапия кларитромицином при выявлении значимых титров антител к *Chlamydomydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, и валацикловиром при наличии Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus и Herpes simplex 1,2 по данным полимеразной цепной реакции и/или определении диагностически

значимых титров антител к указанным вирусам по сравнению с референсными значениями. В соответствии с этими показаниями лечение было назначено 22 больным, в частности, у 12 проведен курс антибактериальной терапии и у 10 — противовирусной. Остальным пациентам терапия не проводилась. При последующем визите в группе «нелеченных» больных отмечался рост титра антител к β_1 -адренорецепторам, к пептидной последовательности β_8 ($p=0,02$) и снижение титра антител к M_2 -холинорецептора — химере MRI-MRIV IgM ($p=0,06$) и ARI-MRIV IgM ($p=0,07$). На фоне терапии валацикловиром зарегистрировано снижение титра IgG к ARI-MRIV ($p=0,02$). Терапия кларитромицином на уровень антител достоверного влияния не оказывала.

В ходе динамического наблюдения в течение 3-х мес у 20 пациентов вне зависимости от проводимого лечения по данным многократного холтеровского мониторирования ЭКГ наблюдалось снижение общего количества желудочковой эктопической активности более чем на 50%. При сопоставлении титров антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам на 1 и 2 визите были получены следующие результаты. У пациентов с сохраняющейся на последующих визитах частой ЖЭС отмечается достоверный рост титров антител G к β_8 ($p=0,04$) и MRI ($p=0,04$). Среди пациентов с достигнутым снижением количества ЖЭС по данным холтеровского мониторирования ЭКГ отмечается более выраженная динамика титров антител к M_2 -холинорецепторам: снижение титра MRI-MRIV IgM на 0,96 по сравнению с исходной точкой ($p=0,004$), MRI IgM на 1,14 ($p=0,003$), а также титра антител M к ARI-MRIV на 0,7 ($p=0,006$) (табл. 3).

Обсуждение

Обнаружение антимиекардиальных антител и определение аутоантигенов служит косвенным свидетельством аутоиммунного процесса. Аутоантитела к различным структурам миокарда могут взаимодействовать с цитоплазматическими и эндоплазматическими антигенами, такими как рецепторные структуры, сократительные белки и другие клеточные и митохондриальные антигены (антитела к тропонину и тяжелым цепям миозина, антитела к M_2 -холинорецепторам и β_1 -адренорецепторам, антитела к Na/K-АТФазе и др.) [2,3,13].

Механизм аутоиммунного ответа в каждом конкретном случае сложен и полностью не изучен. Различные факторы (генетические, иммунологические, гормональные и факторы внешней среды) оказывают непосредственное влияние на формирование патологических реакций, приводящих к повреждению и разрушению нормальных тканей и к развитию аутоиммунного воспаления. По мнению ряда авторов, аутоиммунный ответ в некоторых случаях следует непосредственно за миокардиальным повреждением, в том числе под воз-

Таблица 3. Динамика титров антител у пациентов между 1 и 2 визитами наблюдения (n=20)

Антитела класса М и G к синтезированным полипептидным фрагментам β_1 -адренорецептора и M_2 -холинорецептора	Отсутствие динамики ЖЭС на фоне лечения		Снижение количества ЖЭС на 50% на фоне лечения	
	Дельта титра	p	Дельта титра	p
β_8 Ig M	-0,02	0,5	-0,03	0,61
β_8 Ig G	0,12	0,04*	0,005	0,8875
β_{25} Ig G	-0,04	0,03*	0,05	0,13
β_{25} Ig M	0,06	0,08	-0,021	0,85
ARI-MRIV IgM	-0,1	0,25	-0,23	0,1
ARI-MRIV IgG	-0,003	0,84	-0,002	0,94
MRI-MRIV IgM	-0,011	0,81	-0,24	0,004*
MRI-MRIV IgG	0,003	0,88	-0,02	0,6
MRI IgM	0,06	0,45	-0,26	0,003*
MRI IgG	-0,04	0,04*	-0,004	0,89

*p<0,05 по сравнению с визитом 1

действие инфекционных, токсических, ишемических или других кардиотоксических факторов. Заражение специфическими вирусами, паразитами или бактериями может стать причиной развития аутоиммунных реакций вследствие перекрестного взаимодействия между аутоантигенами и инородными агентами [1–9]. Сходство между антигенными детерминантами поверхности миоцита и микробными эпитопами может представлять собой ключевой механизм образования эндогенных аутоантител. Подобный механизм описывается в литературе как антигенная мимикрия [27].

Другая гипотеза образования эндогенных аутоантител к рецепторам предполагает, что антигенные детерминанты поверхности или цитозоля миоцита, защищенные от иммунной системы физиологическими барьерами, могут подвергаться иммунной агрессии при нарушении целостности структуры клеток миокарда. Такое повреждение наиболее часто наблюдается при ишемическом (острый инфаркт миокарда) или инфекционном поражении сердца (острый миокардит), при которых происходит апоптоз и/или некроз кардиомиоцитов [28,29]. Последующее высвобождение продуктов распада (собственных антигенов) и презентация их иммунной системе может индуцировать развитие аутоиммунного ответа с вовлечением клеточного (Т-клетки) или гуморального (В-клетки) звена или коактивацией врожденного и приобретенного иммунитета [29, 30].

В настоящей работе, используя синтезированные пептидные последовательности, моделирующие различные участки β_1 -адренорецептора и M_2 -холинорецептора, изучалось влияние аутоантител на нарушения ритма сердца, в частности, идиопатическую желудочковую экстрасистолию. Для создания высокоэффективных синтетических антигенов, наиболее близко повторяющих структуру и антигенные свойства природных антигенов мускаринового и β_1 -адренорецептора, были предприняты попытки получения двух новых конфор-

мационных синтетических антигенов — химерных молекул, в которых пептидные цепочки, соответствующие разным внеклеточным петлям этих белков, соединены дисульфидными связями. Кроме того, для получения искусственного антигена, наиболее близко повторяющего пространственную структуру 2-й внеклеточной петли β_1 -адренорецептора, в лаборатории генной инженерии была рассчитана структура полипептида β_{25} .

В ходе настоящего исследования отмечено, что по мере увеличения общего количества желудочковых экстрасистол наблюдается повышение титров антител к β_1 -адренорецепторам. В то же время на фоне нарастания титров антител к β_1 -адренорецепторам увеличивается продолжительность интервала QTc. Возможным механизмом данного явления является усиление антителами к β_1 -адренорецепторам кальциевого тока через каналы L-типа, пролонгирование фазы плато потенциала действия и активирование натрий/кальциевого обмена. Так, в ряде работ было показано, что развитие электрической нестабильности и пролонгирование фазы поздней реполяризации повышает риск развития желудочковых аритмий [31–34].

Согласно данным литературы, антитела к β_1 -адренорецепторам оказывают положительный хронотропный и инотропный эффект на миокард [35–38].

Механизм влияния антител к β_1 -адренорецепторам на кардиомиоциты до конца не ясен. Антитела к β_1 -адренорецепторам, оказывая стимулирующее действие на β_1 -адренорецептор, приводят к образованию гуанозин-5-трифосфата и аденилатциклазы [32]. Кроме того, антитела к β_1 -адренорецепторам активируют внеклеточно-регулируемые киназы (ERK) 1/2 посредством протеинкиназы A и Src-подобной тирозинкиназы по дозозависимому принципу. Показано, что активация ERK каскада способствует развитию гипертрофии миокарда и развитию сердечной недостаточности [39,40], что, в свою очередь, ассоциируется с высоким

риском развития внезапной сердечной смерти и жизнеугрожающих аритмий [41].

Частота полученных «положительных» результатов по уровню антител к β_1 -адренорецепторам среди пациентов с идиопатическими желудочковыми аритмиями меньше, чем продемонстрировано в работе Chiale P.A. с соавт. [19], что, возможно, обусловлено малым объемом выборки.

При сопоставлении титров антител, полученных в группе наблюдения и среди здоровых лиц, обращает на себя внимание 2-кратное превышение уровней IgG к β_25 и IgM к MRI-MRIV у пациентов с ЖЭС. Данное наблюдение позволяет рассматривать синтезированные пептидные последовательности β_25 и MRI-MRIV, моделирующие различные участки β_1 -адренорецептора и M_2 -холинорецептора как потенциальные антигенные детерминанты для дальнейшей диагностики наличия антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам, которые могут выступать в качестве одного из возможных патогенетических звеньев развития желудочковых аритмий.

В настоящее время большинство работ, посвященных исследованию антител к M_2 -холинорецепторам, связывают их наличие с преимущественным повреждением миокарда предсердий. Однако в ходе настоящего исследования выявлено наличие прямой корреляционной связи между частотой эпизодов желудочковой тахикардии и уровнями антител к M_2 -холинорецепторам. В тоже время на фоне уменьшения общего количества ЖЭС отмечается достоверное снижение титров антител к различным пептидным последовательностям M_2 -холинорецепторов. Развитие желудочковых аритмий под воздействием антител к M_2 -холинорецепторам, возможно, связано с замедлением реполяризации, удлинением интервала QT и повышением его дисперсии, однако эти данные пока не доказаны, а патогенетические механизмы не известны [42–45].

С другой стороны, антитела к M_2 -холинорецепторам оказывают отрицательный хронотропный эффект на миокард [46–49], что согласуется с полученными результатами: среди пациентов с высокими титрами антител к M_2 -холинорецепторам отмечается тенденция к снижению средних значений частоты сердечных сокращений.

Согласно современным представлениям, в качестве триггера, вызывающего развитие аутоиммунного поражения миокарда, могут выступать кардиотропные инфекционные агенты, в связи с чем в ходе нашей работы оценивалась эффективность этиотропной терапии в лечении идиопатических нарушений ритма сердца. Принимая во внимание тот факт, что в ряде случаев причиной развития миокардиального повреждения могут выступать атипичные возбудители, такие, как *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, среди ряда антибактериальных препаратов нами выбран макролидный антибиотик кларитромицин. Терапия кла-

ритромицином по стандартной схеме не оказывала влияния на уровни антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам. В то же время назначение в качестве противовирусной терапии валацикловира (против Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus и Herpes simplex 1,2 типа) по стандартной схеме приводило к достоверному снижению титров антител к β_1 -адренорецепторам и M_2 -холинорецепторам, что в 4 случаях из 10 сопровождалось уменьшением желудочковой эктопической активности. Однако из-за малочисленности групп пациентов требуются дальнейшие исследования.

В ходе динамического наблюдения у трети пациентов вне зависимости от проводимой терапии отмечено уменьшение желудочковой эктопической активности до 50%. Среди этих пациентов отмечается более выраженная динамика титров антител к M_2 -холинорецепторам — снижение титра MRI-MRIV IgM, MRI-IgM, ARI-MRIV. При этом у больных с сохраняющейся на последующих визитах частой ЖЭС отмечается достоверный рост титров IgG к β_8 и MRI пептидным последовательностям, что может свидетельствовать о кардиотоксическом воздействии антител к рецепторным структурам на кардиомиоциты.

Заключение

В процессе проведенного исследования продемонстрировано вероятное участие антител к β_1 -адренорецепторам M_2 -холинорецепторам в развитии желудочковых аритмий. Отмечено наличие взаимосвязи между частотой эпизодов желудочковых тахикардий и уровнями титров антител к M_2 -холинорецепторам. Для дальнейшего тестирования на большей выборке пациентов были отобраны потенциальные антигенные детерминанты, моделирующие различные участки β_1 -адренорецептора и M_2 -холинорецептора, а именно, β_25 и MRI-MRIV. Выполнена попытка проведения этиотропной терапии в зависимости от возможных механизмов развития аутоиммунного процесса. В ходе дальнейших исследований необходимо попытаться ответить на вопрос: являются ли выявляемые антитела звеньями единого патогенетического процесса или выступают в качестве его маркеров. Ответ на этот вопрос позволит разработать новые подходы в лечении данной категории больных.

Конфликт интересов. Авторы не сообщили об отсутствии потенциального конфликта интересов по данной статье.

Статья написана в рамках проведения работ по государственному контракту №16.512.11.2176 от 01 марта 2011 г. ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

Литература

- Jahns R., Boivin V., Lohse M.J. Beta 1-adrenergic receptor directed autoimmunity as a cause of dilated cardiomyopathy in rats. *Int J Cardiol* 2006; 112: 7–14.
- Nussinovitch U., Shoenfeld Y. Autoimmunity and heart diseases: pathogenesis and diagnostic criteria. *Arch Immunol Ther Exp* 2009; 57: 95–104.
- Rodionova E.S., Mironova N.A., Aparina O.P. et al. Role of autoimmune reactions in development of cardiac arrhythmia and conduction disturbances. *Ter Archiv* 2012; 4: 74–78. Russian (Родионова Е.С., Миронова Н.А., Апарина О.П. и соавт. Роль аутоиммунных реакций в развитии нарушений ритма и проводимости сердца. *Терапевтический архив* 2012; 4: 74–78).
- Brucato A., Maestroni S., Cumetti D. et al. Recurrent pericarditis: infectious or autoimmune? *Autoimmun Rev* 2008; 8: 44–47.
- Gershwin M.E. The mosaic of autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 161–163.
- Stojanovich L., Marisavljevic D. Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 209–213.
- Gleicher N., Elkayam U. Peripartum cardiomyopathy, an autoimmune manifestation of allograft rejection? *Autoimmun Rev* 2009; 8: 384–387.
- Zifman E., Amital H., Gilburd B., Shoenfeld Y. Antioxidants and smoking in autoimmune disease-opposing sides of the seesaw? *Autoimmun Rev* 2008; 8: 165–169.
- Sitja S., Atzeni F., Sarzi-Puttini P. et al. Cardiovascular involvement in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 281–286.
- Gleicher N., Barad D., Weghofer A. Functional autoantibodies, a new paradigm in autoimmunity? *Autoimmun Rev* 2007; 7: 42–45.
- Fritzier M.J. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 616–620.
- Briani C., Samaroo D., Alaedini A. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 644–650.
- Li Y., Heuser J.S., Cunningham L.C. et al. Mimicry and antibody-mediated cell signaling in autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2006; 177: 8234–8240.
- Deubner N., Berliner D., Schlipp A. et al. Cardiac beta1-adrenoceptor autoantibodies in human heart disease: rationale and design of the Etiology, Titre-Course, and Survival (ETICS) Study. *Eur J Heart Fail* 2010; 12: 753–762.
- Kaya Z., Katus H.A., Rose N.R. Cardiac troponins and autoimmunity: their role in the pathogenesis of myocarditis and of heart failure. *Clin Immunol* 2010; 134(1):80–8.
- Chiale P.A., Ferrari I., Mahler E. et al. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 2001; 103(13): 1765–1771.
- Baba A., Yoshikawa T., Fukuda Y. et al. Autoantibodies against M2-muscarinic acetylcholine receptors: new upstream targets in atrial fibrillation in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2004; 25(13): 1108–15.
- Villecco A.S., de Liberali E., Bianchi F.B., Pisi E. Antibodies to cardiac conducting tissue and abnormalities of cardiac conduction in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1983; 53(3): 536–40.
- Chiale P.A., Rosenbaum M.B., Elizari M.V. et al. High prevalence of antibodies against beta 1- and beta 2-adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26(4): 864–9.
- Nussinovitch U., Shoenfeld Y. Anti-troponin autoantibodies and the cardiovascular system. *Heart* 2010; 96: 1518–1524.
- Chiale P.A., Garro H.A., Schmidberg J. et al. Inappropriate sinus tachycardia may be related to an immunologic disorder involving cardiac beta adrenergic receptors. *Heart Rhythm* 2006; 3: 1182–1186.
- Magnusson Y., Marullo S., Hoyer S. et al. Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1990; 86: 1658–1663.
- Liu H.R., Zhao R.R., Zhi J.M. et al. Screening of serum autoantibodies to cardiac beta1-adrenoceptors and M2-muscarinic acetylcholine receptors in 408 healthy subjects of varying ages. *Autoimmunity* 1999; 29: 43–51.
- Jahns R., Boivin V., Siegmund C. et al. Activating beta-1-adrenoceptor antibodies are not associated with cardiomyopathies secondary to valvular or hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1545–1551.
- Nikolaev V.O., Boivin V., Stork S. et al. A novel fluorescence method for the rapid detection of functional beta1-adrenergic receptor autoantibodies in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 423–431.
- Chiale P.A., Ferrari I., Mahler E. et al. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 2001; 103: 1765–1771.
- Hoebke J. Structural basis of autoimmunity against G protein-coupled membrane receptors. *Int J Cardiol* 1996; 54: 103–111.
- Caforio A.L., Mahon N.J., Tona F., McKenna W.J. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 2002; 4: 411–417.
- Rose N.R. Infection, mimics, and autoimmune disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 943–944.
- Eriksson U., Ricci R., Hunziker L. et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires co-operation between adaptive and innate immunity. *Nat Med* 2003; 9: 1484–1490.
- Yoshikawa T., Baba A., Nagatomo Y. Autoimmune mechanisms underlying dilated cardiomyopathy. *Circ J* 2009; 73: 602–607.
- Nagatomo Y., Yoshikawa T., Kohno T. et al. A pilot study on the role of autoantibody targeting the beta1-adrenergic receptor in the response to beta-blocker therapy for congestive heart failure. *J Card Fail* 2009; 15: 224–232.
- Stork S., Boivin V., Horf R. et al. Stimulating autoantibodies directed against the cardiac beta1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2006; 152: 697–704.
- Christ T., Wettwer E., Dobrev D. et al. Autoantibodies against the beta1 adrenoceptor from patients with dilated cardiomyopathy prolong action potential duration and enhance contractility in isolated cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1515–1525.
- Sterin-Borda L., Cossio P.M., Gimeno M.F. et al. Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and function aspects. *Cardiovasc Res* 1976; 10: 613–622.
- Caforio A.L., Tona F., Bottaro S. et al. Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2008; 41: 35–45.
- Mobini R., Staudt A., Felix S.B. et al. Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against beta1-adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* 2003; 20: 345–350.
- Muller J., Wallukat G., Dandel M. et al. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101: 385–391.
- Tutor A.S., Penela P., Mayor F. Jr. Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies are potent stimulators of the ERK1/2 pathway in cardiac cells. *Cardiovasc Res* 2000; 76: 51–60.
- Hebert T.E. Anti-beta1AR antibodies in dilated cardiomyopathy: are these a new class of receptor agonists? *Cardiovasc Res* 2007; 76: 5–7.
- Nussinovitch U., Katz U., Nussinovitch M. et al. Echocardiographic abnormalities in familial dysautonomia. *Pediatr Cardiol* 2009; 30: 1068–1074.
- Lazzerini P.E., Capecchi P.L., Guideri F. et al. Autoantibody mediated cardiac arrhythmias: mechanisms and clinical implications. *Basic Res Cardiol* 2008; 103: 1–11.
- Medei E., Pedrosa R.C., Benchimol Barbosa P.R. et al. Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: basis for electrical disturbance. *Int J Cardiol* 2007; 115: 373–380.
- Nussinovitch N., Livneh A., Katz K. et al. QT dispersion in uncomplicated familial Mediterranean fever. *Clin Rheumatol* 2010; 29: 1353–1356.
- Nussinovitch U., Katz U., Nussinovitch M., Nussinovitch N. Late ventricular potentials and QT dispersion in familial dysautonomia. *Pediatr Cardiol* 2009; 30: 747–751.
- Wallukat G., Nissen E., Morwinski R., Muller J. Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy. *Herz* 2000; 25: 261–266.
- Wallukat G., Fu H.M., Matsui S. et al. Autoantibodies against M2 muscarinic receptors in patients with cardiomyopathy display non-desensitized agonist-like effects. *Life Sci* 1999; 64: 465–469.
- Wang W.Z., Zhao R.R., Wu B.W. et al. Effects of anti-peptide antibodies against human M2 muscarinic receptors on cardiac function in rats in vivo. *Blood Press Suppl* 1996; 3: 25–27.
- Goin J.C., Leiros C.P., Borda E., Sterin-Borda L. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *FASEB J* 1997; 11: 77–83.

Поступила: 21.09.2012

Принята в печать: 25.09.2012