

Виявлення та характеристика антитіл проти Hsp60 людини у вагітних

М.В. Макаренко¹, Д.А. Говсеєв, Р.М. Ворона¹, А.М. Цісаренко², О.Я. Васильчук²,
О.В. Павлюк², Л.Ф. Яковенко², І.В. Крупська², А.П. Погрібна², Л.Л. Сидорик²

¹Інститут післядипломної освіти Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, м. Київ

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

Білки теплового шоку (heat shock proteins – HSPs), або молекулярні шаперони, первинно охарактеризовані як учасники клітинної відповіді на різні види стресу (інфекція, дія важких металів, ішемія, гіпоксія, амінокислотне голодування, психоемоційний стрес, гормональний стрес тощо). Hsp60 – один із перших білків, що синтезуються під час ембріогенезу, і є необхідним для розвитку ембріона.

Мета дослідження: виявлення та характеристика анти-Hsp60-автоантитіл у вагітних для оцінювання можливої перспективи застосування їх як додаткового тесту прогнозування перебігу вагітності.

Матеріали та методи. Обстежено 170 пацієнток, серед них 20 клінічно здорових вагітних (контрольна група) та 150 вагітних з ускладненим анамнезом (основна група). Рівень IgG анти-Hsp60-антитіл у сироватці визначали з використанням імуноферментного аналізу (ІФА). Імунореактивність визначали методом вестерн-блотингу (імуноблотинг).

Результати. Методом ІФА анти-Hsp60-позитивну сироватку було виявлено у 7,7% вагітних контрольної групи та 14,0% вагітних з ускладненим анамнезом. Не встановлено статистично достовірної різниці між рівнем анти-Hsp60-автоантитіл (за середніми показниками) у вагітних основної групи та вагітних контрольної групи ($0,177 \pm 0,118$ проти $0,134 \pm 0,097$ од. опг. густини; $p > 0,05$). Частота виявлення патологій у вагітних, сироватка яких була анти-Hsp60-позитивною, вища порівняно з вагітними, сироватка яких була анти-Hsp60-негативною.

Заключення. Одержані результати свідчать, що у дослідженні анти-Hsp60-антитіл як додаткового тесту, зокрема прогнозу перебігу вагітності, поєднане використання ІФА та вестерн-блотингу є більш доцільним.

Ключові слова: вагітність, Hsp60, антитіла проти Hsp60 людини.

Білки теплового шоку (heat shock proteins – HSPs), або молекулярні шаперони, первинно охарактеризовані як учасники клітинної відповіді на різні види стресу (інфекція, дія важких металів, ішемія, гіпоксія, амінокислотне голодування, психоемоційний стрес, гормональний стрес тощо). На сьогодні прийнято вважати, що HSPs відіграють важливу роль у вродженому та адаптивному імунітеті [11].

Hsp60 – еволюційно консервативний шаперон/шаперонін мітохондріального походження – забезпечує за допомогою кошаперона Hsp10 правильну укладку клітинних білків у мітохондріях та під час стресу попереджає їхнє неправильне згортання та агрегацію. Hsp60 також виявляють у цитоплазмі клітин, де він виконує антиапоптотичну функцію. За стресових умов Hsp60 експонується на поверхні клітин та секретується у міжклітинний простір [6].

Установлено, що шаперонін є антигеном-мішенню при аутоімунних захворюваннях (атеросклероз, діабет I типу тощо), а Hsp60-реактивні Т- і В-клітини є частиною імунної відповіді при інфекційних захворюваннях. Hsp60 притаманні імунорегуляторні властивості, він може відігравати як про-

так і протизапальну роль залежно від мікрооточення в організмі, що робить його важливим антигеном гомеостазу [13].

Hsp60 – один із перших білків, що синтезуються під час ембріогенезу, і є необхідним для розвитку ембріона [9]. Експериментально доведений прямий вплив анти-Hsp60-антитіл на розвиток ембріону миші *in vitro* [10]. Hsp60 у підвищеній кількості виявляють на ранніх стадіях вагітності (7–11 тиж) у материнській плаценті. Він може представляти потенційну мішень у першу чергу для перехресно реагуючих антитіл проти мікробного Hsp60, а також лімфоцитів, сенсibiliзованих мікробним Hsp60, що може призводити до імунного відторгнення ембріона. Установлено, що рівень Hsp60 у плаценті не відрізнявся при нормальній вагітності та перерваній на ранніх стадіях. Проте імунні комплекси Hsp60-анти-Hsp60-антитіло виявляли лише у плаценті жінок, які втратили вагітність на ранніх стадіях. Активация такими імунними комплексами, зокрема синтезу прозапальних цитокінів, може негативно впливати на результат вагітності (індукція передчасного народження дитини) [17].

Мета дослідження: виявлення та характеристика анти-Hsp60-автоантитіл у вагітних для оцінювання можливої перспективи застосування їх як додаткового тесту прогнозування перебігу вагітності.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обстежено 170 вагітних, яким було проведено лабораторні та інструментальні дослідження згідно з Наказом МОЗ України від 15.07.2011 р. № 417 «Про організацію амбулаторної акушерсько-гінекологічної допомоги в Україні». Серед них 20 клінічно здорових вагітних (контрольна група) та 150 вагітних з ускладненим анамнезом (основна група).

Рівень IgG анти-Hsp60-антитіл у сироватці визначали з використанням імуноферментного аналізу (ІФА) з модифікаціями [4]. Як позитивний контроль використовували поліклональні антитіла проти Hsp60 [15], негативний контроль – низькорективну сироватку клінічно здорових жінок-донорів.

Як антиген використовували рекомбінантний білок Hsp60 людини, одержаний раніше. Одержання та очистку рекомбінантного білка Hsp60 проводили за розробленою методикою [2]. Антитілопозитивною вважали сироватку, оптична густина якої у розведенні 1:100 перевищувала середнє значення оптичної густини сироватки контрольної групи на 2 стандартних відхилення ($m+2sd$).

Імунореактивність визначали методом вестерн-блотингу (імуноблотинг). Для детектування специфічного зв'язування вторинних антитіл мембрану витримували в ECL-регенті 5 хв та візуалізували за допомогою транслюмінатора ChemiDoc XRS+.

Статистичне оброблення результатів досліджень здійснювали за допомогою пакета програм STATISTICA 8.0 (Stat-Soft, 2007, США). Для порівняння вибірок досліджуваних груп використовували U-критерій Манна-Уїтні (Mann-Whitney U-test), частина результатів представлена у вигляді середніх значень з посиленням на середні квадратичні відхилення.

Частота виявлення патологій у вагітних з високими рівнями анти-Hsp60-автоантитіл у сироватці, %

Показник	Вагітні з високими рівнями анти-Hsp60-автоантитіл у сироватці	Вагітні з низькими рівнями анти-Hsp60-автоантитіл у сироватці
Мимовільні викидні, завмерла вагітність в анамнезі	31,8	21,7
Тонзилектомія в анамнезі	14,3	2,3
Апендектомія в анамнезі	23,8	13,28
Запальні захворювання органів малого таза	66,67	53,9
Перенесені запальні захворювання травного тракту	33,3	25,78
Перенесені запальні захворювання сечо-статевої системи	19,0	17,97
Хвороби щитоподібної залози	4,76	12,5
Варикозне розширення вен	4,76	3,12

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

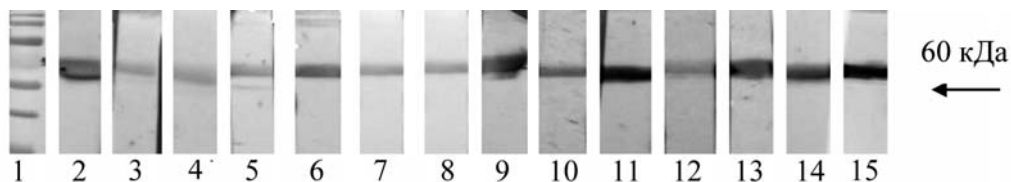
Було вивчено можливу імунореактивність сироваток вагітних проти шапероніну еукаріот Hsp60 за допомогою ІФА та вестерн-блотингу. Таке поєднане використання методів дозволяє визначити як рівень антитіл, так і їхню потенційну здатність з'язатись з антигеном-мішенню. Методом ІФА анти-Hsp60-позитивну сироватку було виявлено у 7,7% вагітних контрольної групи та 14,0% вагітних з ускладненим анамнезом. Не встановлено статистично достовірної різниці між рівнем анти-Hsp60-автоантитіл (за середніми показниками) у вагітних основної групи та вагітних контрольної групи (0,177±0,118 проти 0,134±0,097 од. опт. густини; p>0,05). Частота виявлення патологій у вагітних, сироватка яких була анти-Hsp60-позитивною, порівняно з вагітними, сироватка яких була анти-Hsp60-негативною, представлена в таблиці. Установлено, що у вагітних основної групи з високими рівнями антитіл проти Hsp60 людини у сироватці частіше в анамнезі виявляли порушення репродуктивної функції (мимовільні викидні, завмерла вагітність – у 1,5 разу), а також операції (тонзилектомія – у 7 разів та апендектомія – у 1,8 разу), порівняно з вагітними з низькими рівнями досліджуваних антитіл у сироватці.

Результати дослідження імунореактивності сироваток вагітних методом вестерн-блот-аналізу представлено на малюнку. Слід зазначити, що у вагітних контрольної групи лише одна сироватка виявилась високореактивною по відношенню до досліджуваного антигену. У вагітних, у яких в анамнезі були викидні на тлі захворювань з боку органів малого таза, сироватка виявилась високореактивною за результатами вестерн-блотингу. Результати вестерн-блотингу у вагітних не завжди були співставними з результатами ІФА (низькі рівні антитіл за результатами ІФА поєднувались з високою реактивністю досліджуваних антитіл за результатами вестерн-блотингу). Здатність розпізнавати антиген-мішень (Hsp60 людини), на нашу думку, є більш важливою

характеристикою і може свідчити про потенційну можливість антитіл зв'язуватись з ендогенним Hsp60. Установлено, що анти-Hsp60-антитіла здатні опосередковувати комплементзалежну цитотоксичність, зумовлювати лізис або апоптоз клітин, що експресують на своїй поверхні Hsp60. Антитіла також здатні зв'язувати циркулюючий у плазмі крові ендогенний Hsp60 і утворювати імунні комплекси з патологічним впливом на клітини і тканини [6].

Анти-Hsp60-антитіла різної специфічності виявляють у сироватці здорових осіб, їхній рівень підвищується під час різних захворювань [12]. Вважають, що високі рівні анти-Hsp60-антитіл слід розглядати як біологічний маркер несприятливого стану організму, наявності хронічних захворювань, аітоімунних процесів, ознаку наявності та важкості перебігу серцево-судинних захворювань, фактор ризику атеросклерозу, маркер канцерогенезу тощо [14, 16].

Раніше нами було встановлено зв'язок між наявністю підвищених рівнів антитіл проти мікробного гомолога Hsp60 людини – шапероніну *E.coli* (GroEL) та формуванням порушень репродуктивної функції (трубна безплідність, невиношування вагітності) (коефіцієнт взаємного спряження K=0,475; середня сила зв'язку) [3]. За результатами наших попередніх досліджень, рівень анти-GroEL-антитіл знаходився у межах контролю у 92,86% породіль. У породіль, сироватка яких була анти-GroEL-позитивною, було виявлено зміни клінічних показників (лейкоцитоз, підвищення ШОЕ), фіксували загрозу переривання вагітності, в анамнезі – передчасні пологи, викидні. Проведене нами раніше дослідження рівнів анти-GroEL-антитіл у сироватках вагітних з пренатально діагностованою критичною вродженою вадою серця плода не виявило за середніми показниками статистично значущої різниці рівнів досліджуваних антитіл в обстежених вагітних та клінічно здорових жінок (донори крові) [1]. За даними літератури, рівні анти-Hsp60-антитіл у матерів, які народили дітей з анатомічними вадами розвитку, достовірно не відрізнялись від контролю (вагітні з нормальним перебігом вагітності) [7].



Імунореактивність (розпізнавання антиген-мішені) сироватки клінічно здорових вагітних та вагітних з порушеннями репродуктивної функції (в анамнезі – мимовільні викидні/завмерла вагітність) за результатами вестерн-блотингу: 1 – суміш білкових маркерів молекулярної маси; 2 – позитивний контроль (поліклональні анти-Hsp60-антитіла); 3–8 – сироватка клінічно здорових вагітних (розведення 1:100); 9–15 – сироватка вагітних з порушеннями репродуктивної функції (в анамнезі – мимовільні викидні/завмерла вагітність) (розведення 1:100)

ВИСНОВКИ

Низькі рівні антитіл проти Hsp60 людини у 92,3% вагітних контрольної групи та 86% вагітних з ускладненнями в анамнезі узгоджуються з одержаними нами раніше результатами та даними літератури. Проте висока реактивність за результатами вестерн-блотингу сироватки вагітної є, на нашу думку, несприятливою ознакою. Як вже згадувалось вище, анти-Hsp60-антитіла мають здатність пригнічувати розвиток ембріона, а та-

кож негативно впливати на результат вагітності (передчасне народження дитини) [9, 10]. Тому вагітні, сироватка яких проявляє високу реактивність у відношенні Hsp60 людини, потребують поглибленого клініко-лабораторного обстеження.

Отже, одержані результати свідчать, що у дослідженні анти-Hsp60-антитіл як додаткового тесту, зокрема прогнозу перебігу вагітності, поєднане використання ІФА та вестерн-блотингу є більш доцільним.

Идентификация и характеристика антител против Hsp60 человека у беременных

М.В. Макаренко, Д.А. Говсеев, Р.М. Ворона, А.М. Цисаренко, О.Я. Васильчук, О.В. Павлюк, Л.Ф. Яковенко, И.В. Крупская, А.П. Погребная, Л.Л. Сидорик

Белки теплового шока (heat shock proteins – HSPs), или молекулярные шапероны, первоначально охарактеризованы как участники ответа клетки на различные виды стресса (инфекция, влияние тяжелых металлов, ишемия, гипоксия, аминокислотное голодание, психоэмоциональный стресс, гормональный стресс и т.д.). Hsp60 – один из первых белков, которые синтезируются во время эмбриогенеза. Он необходим для развития эмбриона.

Цель исследования: определение и характеристика анти-Hsp60-аутоантител у беременных для оценки возможной перспективы их использования в качестве дополнительной возможности прогнозирования хода беременности.

Материалы и методы. Обследовано 170 пациенток, среди них 20 клинически здоровых беременных (контрольная группа) и 150 беременных с осложненным анамнезом (основная группа). Уровень IgG анти-Hsp60-антител в сыворотке определяли с использованием иммуноферментного анализа (ИФА). Иммунореактивность определяли методом вестерн-блоттинга (иммунный блоттинг).

Результаты. Методом ИФА анти-Hsp60-позитивная сыворотка была обнаружена у 7,7% беременных контрольной группы и у 14,0% беременных с осложненным анамнезом. Не установлено статистически достоверной разницы между уровнем анти-Hsp60-аутоантител (по средним показателям) у беременных основной группы и беременных контрольной группы ($0,177 \pm 0,118$ против $0,134 \pm 0,097$ ед. опт. плотности; $p > 0,05$). Частота выявления патологий у беременных, сыворотка которых была анти-Hsp60-позитивной, выше по сравнению с беременными, сыворотка которых была анти-Hsp60-негативной.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют, что в исследовании анти-Hsp60-антител как дополнительного теста, в частности прогноза хода беременности, совместное использование ИФА и вестерн-блоттинга более целесообразно.

Ключевые слова: беременность, Hsp60, антитела против Hsp60 человека.

Identification and characterization of antibodies against human Hsp60 at pregnancy

M. Makarenko, D. Govseiev, R. Vorona, A. Tsisarenko, O. Vasil'tchuk, O. Pavlyuk, L. Yakovenko, I. Kroupska, A. Pogribna, L. Sidorik

Heat shock proteins (HSPs) or molecular chaperones were originally described as members of the cell response to different types of stress (infection, the influence of heavy metals, ischemia, hypoxia, amino acid starvation, psycho-emotional stress, hormonal stress, etc.). Hsp60 is one of the first proteins that are synthesized during embryogenesis. Hsp60 is necessary for the development of the embryo.

The objective: was the identification and characterization of anti-Hsp60 autoantibodies in pregnant women to assess the prospects for a possible use as additional capabilities for the prediction of pregnancy progress.

Patients and methods. Was a group of 170 pregnant women. 20 pregnant women were clinically healthy (control group) and 150 pregnant women had complicated anamnesis (main group). The level of IgG anti-Hsp60 antibodies in the serum was determined using immunoassay (IFA). Immunoreactivity was determined by Western blot (immunoblotting).

Results. Using the IFA method, anti-Hsp60 positive serum was detected in 7.7% of pregnant women from the control group and in 14.0% of pregnant with complicated anamnesis. A statistically significant difference between the level of anti-Hsp60 autoantibody (on average) in pregnant women of the main group and the control group was not identified (0.177 ± 0.118 vs. 0.134 ± 0.097 units of optical density, $p > 0.05$). Also, it was determined the frequency of detection of pathologies in pregnant women which have an anti-Hsp60 positive serum, compared with pregnant women which have an anti-Hsp60 negative serum.

Conclusions. Our results suggest that in relation to the anti-Hsp60 antibody studies as an additional test, in particular, the forecast of progress of pregnancy, joint use IFA and Western blotting is more appropriate.

Key words: pregnancy, Hsp60, anti-Hsp60 autoantibodies.

Сведения об авторах

Макаренко Михаил Васильевич – Кафедра акушерства и гинекологии последипломного образования Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, 01601, г. Киев, бульвар Тараса Шевченко, 13/7; тел.: (044) 275-80-77

Говсеев Дмитрий Александрович – Кафедра акушерства и гинекологии последипломного образования Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, 01601, г. Киев, бульвар Тараса Шевченко, 13/7; тел.: (044) 275-80-77. E-mail: nm@proffkom.com

Ворона Роман Николаевич – Кафедра акушерства и гинекологии последипломного образования Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, 01601, г. Киев, бульвар Тараса Шевченко, 13/7; тел.: (044) 275-80-77

Цисаренко Анастасия Николаевна – Лаборатория Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150; тел.: (044) 526-55-89

Васильчук Ольга Яковлевна – Лаборатория Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150; тел.: (044) 526-55-89

Павлюк Ольга Васильевна – Лаборатория Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150; тел.: (044) 526-55-89

Яковенко Людмила Федоровна – Лаборатория Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150; тел.: (044) 526-55-89

Крупская Ирина Владимировна – Лаборатория Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150; тел.: (044) 526-55-89

Погребная Алла Петровна – Лаборатория Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150; тел.: (044) 526-55-89

Сидорик Людмила Леонидовна – Лаборатория Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150; тел.: (044) 526-55-89

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антитіла до Hsp60 у новонароджених, яким під час операції з приводу критичної вродженої вади серця переливали аутологічну пуповинну кров, у ранньому та віддаленому післяопераційному періоді / Г.М. Воробйова, Я.В. Ткаченко, Л.Ф. Яковенко, та ін. // Клінічна хірургія. – 2014. – № 12. – С. 33–36.
2. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 / Л.Н. Капустян, Р.Г. Киямова, В. С. Гришкова и др. // Biopolim. Cell. – 2006. – V. 22, № 2. – P. 117–12.
3. Антитіла до GroE E.coli (гомолог Hsp60 людини) у жінок із хронічними запальними захворюваннями органів малого тазу / Л.Ф. Яковенко, О.В. Ромашенко, А.В. Руденко та ін. // ПАГ. – 2011. – № 3. – С. 91–96.
4. Avrameas S. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies / S. Avrameas, T. Termynck // Mol. Immunol. – 1993. – Vol. 30. – P. 119–127.
5. Bradford M.A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding / M.A. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
6. Chlamydia trachomatis infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin / F. Cappello, E. Macario, V. Di Felice et al. // Plos Pathogens. – 2009. – Vol. 5, N 8. – P. 1–9.
7. Birth defects and anti-heat shock protein 70 antibodies in early pregnancy / D. Child, P. Hudson, C. Hunter-Lavin et al. // Cell Stress and Chaperones. – 2006. – Vol. 11, N 1. – P. 101–105.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685.
9. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis [Review] / A. Neuer, S. Spandorfer, P. Giraldo et al. // Infect. Dis. Obstet. Gynecol. – 1999. – Vol. 7. – P. 10–16.
10. The role of heat shock proteins in reproduction / A. Neuer, S. Spandorfer, P. Giraldo et al. // Hum. Reprod. Update. – 2000. – Vol. 6. – P. 149–159.
11. Quintana F. The HSP60 immune system network / F. Quintana, I. Cohen // Trends Immunol. – 2011. – Vol. 32, N 2. – P. 89–95.
12. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals / A.G. Pockley, J. Bulmer, B.M. Hanks et al. // Cell Stress Chaperones. – 1999. – Vol. 4. – P. 29–35.
13. Rajaiiah R. Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity / R. Rajaiiah, K. Moudgil // Autoim. Rev. – 2009. – Vol. 8, № 5. – P. 388–393.
14. Heat shock protein-60 and risk for cardiovascular disease / M. Rizzo, A. Macario, E. de Macario et al. // Curr. Pharm. Des. – 2011. – Vol. 17, N 33. – P. 662–668.
15. Immuno-chemical non-cross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases / L. Sidorik, V. Gudzera, V. Dragovoz et al. // FEBS. – 1991. – Vol. 292, N 1. – P. 76–78.
16. Wu T. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? / T. Wu, R. Tanguay // Cell Stress Chaper. – 2006. – Vol. 11. . – P. 1–12.
17. Heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues / M. Ziegert, S. Witkin, I. Sziller et al. // Infect. Dis. Obstet. Gynecol. – 1999. – Vol. 7. – P. 180–185.

Статья поступила в редакцию 04.10.2016

Н О В О С Т И М Е Д И Ц И Н Ы

УЧЕНЫЕ: ПЛОХОЕ ПИТАНИЕ БЕРЕМЕННОЙ
УСКОРЯЕТ СТАРЕНИЕ СЕРДЦА РЕБЕНКА

Беременным женщинам, как известно, необходимо уделять особенно пристальное внимание организации своего рациона питания.

Коллаборация ученых из университетов Вайоминга и Техаса, возглавленная Джефри Кларком, проводила экспериментальные исследования на бабуинах, у которых, в итоге, была выявлена четкая корреляция между состояни-

ем сердечно-сосудистой системы и питанием, получаемым в период внутриутробного развития.

"Неправильное питание в ходе беременности может приводить к таким негативным процессам, как нарушения развития внутренних органов, в частности, сердца. Которое, в итоге, формируется аномальным образом, в результате чего склонно к преждевременному старению", -

говорит профессор Джефри Кларк.

Ученые, обнаружившие феномен, заявляют, что последствия от преждевременного старения сердца являются довольно серьезными.

То есть, они могут в значительной степени снизить качество жизни людей, чьи матери не уделяли необходимого внимания своему

med-expert.com.ua