

Сравнительное исследование количественных уровней аутоантител к тирозил-тРНК-синтетазе и ее отдельным доменам при хронической сердечной недостаточности разного генеза

Д.В. Рябенко, Ю.Ю. Кондратюк, Л.Л. Сидорик, А.И. Корнелюк

Национальный научный центр «Институт кардиологии им. акад. Н.Д. Стражеско» НАМН Украины, Киев
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тирозил-тРНК-синтетаза, аутоантитела, хроническая сердечная недостаточность

В последние десятилетия серьезные усилия клиницистов были направлены на решение вопросов профилактики и разработку новых патогенетических подходов к лечению хронической сердечной недостаточности (ХСН) [3]. На сегодняшний день раннее и все более широкое использование препаратов, влияющих на активность нейрогуморальных систем, а также применение немедикаментозных (ресинхронизирующей терапии, иммуносорбции) и хирургических методов лечения привели как к улучшению качества жизни, так и к продлению жизни больных с ХСН. Однако, несмотря на достигнутые успехи, этот синдром все еще остается достаточно серьезной не только медицинской, но и социально-экономической проблемой. С одной стороны, прогноз пациентов с ХСН продолжает оставаться неблагоприятным. Так, по некоторым данным 5-летняя выживаемость пациентов с клинически выраженной ХСН зачастую хуже, чем у больных с рядом онкологических заболеваний [29]. С другой стороны, все более актуальной становится экономическая сторона проблемы ХСН. Стойкая инвалидизация таких пациентов и необходимость проведения дорогостоящего лечения, зачастую стационарного, приводят к значительным экономическим потерям общества. А учитывая прогнозируемое увеличение распространенности ХСН (не менее чем на 20 %) к концу текущего десятилетия, она может превратиться в серьезную финансовую проблему для институтов здравоохранения многих стран [1, 2, 11, 20].

В связи с этим вопросы дальнейшего усовершенствования терапии ХСН не теряют своей

актуальности и в настоящее время. Продолжают изучаться возможности применения различных вариантов метаболической и иммуномодулирующей терапии при ХСН. Представляют интерес результаты исследований использования ингибитора I_f-тока ивабрадина при лечении таких пациентов [2, 12, 30].

Однако существенных изменений в подходах к терапии ХСН можно ожидать лишь при дальнейшем углублении наших представлений о патогенезе данного синдрома. Поэтому изучение патогенетической роли молекулярно-биологических и генетических нарушений при ХСН очень актуально. Именно понимание этих процессов наряду с использованием современных нанотехнологий позволяет надеяться на качественные изменения в подходах к лечению ХСН, что может способствовать достижению благоприятных изменений в течении этого опасного синдрома.

Одним из центральных процессов, обеспечивающих нормальное функционирование живой клетки, является биосинтез белка. В последние годы пристальное внимание уделяется дорибосомному этапу биосинтеза белка, критическую роль в котором отводят реакции аминокислотирования транспортных РНК (тРНК). В результате аминокислотирования происходит активация аминокислоты и ее соединение с соответствующей тРНК, а катализируют эти процессы специфические ферменты – аминокислот-тРНК-синтетазы (АРСаза). АРСазы участвуют не только в процессах транскрипции, трансляции и сплайсинга, но и являются важными факторами активации воспаления, ангиогенеза, апоптоза

[14, 22, 23]. Кроме того, фрагменты (домены) APCаз при определенных условиях могут приобретать цитокиновую активность и взаимодействовать со специфическими рецепторами на поверхности клеток [13]. В свою очередь, элементы иммунной системы могут оказывать влияние не только на экспрессию, но и на функциональную активность некоторых APCаз. Все это представляет значительный интерес в контексте углубления нашего понимания роли аутоиммунных и молекулярно-биологических механизмов развития и прогрессирования миокардиальной дисфункции.

Цель исследования – изучить особенности аутоиммунных реакций против тирозил-тРНК-синтетазы и ее доменов у больных с систолической хронической сердечной недостаточностью различного генеза.

Материал и методы

Определяли уровень специфических антител против полноразмерной тирозил-аминоацил-тРНК-синтетазы (TyrRS) и ее N- и C- концевых фрагментов в сыворотке больных с кардио-мегалией и систолической ХСН коронарогенного и некоронарогенного генеза. В исследование были включены сыворотки 20 больных с дилатационной кардиомиопатией (группа ДКМП), 44 – с хроническим диффузным миокардитом (группа ХМ) и 18 пациентов с ХСН, развившейся в результате ишемической болезни сердца и эссенциальной гипертензии (группа ИБС). Диагнозы ДКМП и ХМ устанавливали согласно рекомендациям ВОЗ, Европейского и Украинского общества кардиологов [6, 16, 19]. У всех больных была диагностирована ХСН IIA–IIB стадии, их состояние соответствовало II–III функциональному классу по NYHA. По результатам эхокардиографического исследования, индекс конечнодиастолического объема левого желудочка (ЛЖ) исследуемых больных составлял в среднем ($125,95 \pm 4,28$) мл/м², фракция выброса ЛЖ – ($34,25 \pm 0,53$) %. Все больные получали длительное стандартное лечение ХСН с использованием β -адреноблокаторов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, диуретиков. Кровь для получения сыворотки забиралась лишь в случае полной стабилизации клинического состояния больного.

Контролем служили образцы сыворотки крови 20 практически здоровых доноров (группа ЗД).

Для получения рекомбинантных белков полноразмерной TyrRS, ее N-концевого каталитического и C-концевого EMAP II-подобного фрагментов были использованы штаммы-продуценты на основе *Escherichia coli* BL21(DE)pLysE. Штаммы *E. coli* трансформировали по общепринятой методике соответствующими сконструированным плазмидным векторам pET30a-59K TyrRS, pET30a-39K TyrRS, pET30a-20K TyrRS, как описано ранее [5]. Рекомбинантные белки получали из супернатантов лизированных клеток методом металхелатирующей хроматографии на Ni-NTA-агарозной колонке. Чистоту целевых белков определяли с помощью SDS-гель-электрофореза по Леммли в денатурирующих условиях с использованием маркерных белков производства Fermentas (Литва) [5].

Исследование уровней специфических антител к тирозил-тРНК-синтетазе проводили по методике, описанной нами ранее, с помощью ELISA с количественным подсчетом на ридере Titertek (Multiscan, Великобритания) [4].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета компьютерных программ Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Результаты и их обсуждение

APCазы обладают очень высокой специфичностью, причем каждая из 20 APCаз узнает лишь одну из 20 аминокислот и одну или несколько изоакцепторных тРНК, антикодоны которых соответствуют данной аминокислоте. Ошибочное присоединение аминокислот обуславливает неправильное считывание генетической информации с мРНК, что может вызывать изменения свойств или даже потерю активности белковой молекулы. Эти изменения могут инициировать развитие различных патологических состояний. Так, некоторые мутации генов, кодирующих APCазы, приводят к серьезным нейродегенеративным нарушениям, вплоть до развития нейропатии [7, 24, 27]. Кроме того, как было отмечено ранее, APCазы активно вовлекаются в такие процессы, как воспаление, ангиогенез и апоптоз [22, 23]. Некоторые APCазы, как мультидоменные белки, являются процитокинами, то есть не обладают сигнальной активностью, однако в результате альтернативного сплайсинга или естественного протеолиза могут образовываться их специфические фрагменты, которые проявляют цитокиновую активность и взаимодей-

ствуют со специфическими рецепторами на поверхности клеток [13].

С другой стороны, элементы иммунной системы организма могут, в свою очередь, влиять на данные ферменты. Так, было продемонстрировано, что интерферон- γ способен повышать экспрессию и секрецию в экстрацеллюлярное пространство триптофанил- t -РНК-синтетазы [14]. У больных с такими заболеваниями, как ревматоидный артрит, полимиозит, системная красная волчанка, были не только описаны аутоантитела к различным АРСазам, но и в ряде случаев выявлено их функциональное влияние на патологические процессы, которые происходят в больном организме [9]. Так, было продемонстрировано, что антитела против TyrRS, афинно очищенные из сывороток больных с ревматоидным артритом и системной красной волчанкой, способны усиливать активность данного фермента [28].

Все вышеперечисленное позволяет предположить, что взаимное влияние элементов иммунной системы и АРСаз, и особенно нарушения этого взаимодействия, могут быть одним из важных механизмов развития и прогрессирования сердечной недостаточности.

В данной работе определяли уровни антител против TyrRS в сыворотках больных с ХСН коронарогенного и некоронарогенного генеза. Результаты проведенных исследований показали, что антитела, способные распознавать полноразмерную TyrRS, присутствуют в сыворотках

больных с ХСН некоронарогенного генеза. Уровень данных антител в сыворотках больных групп ДКМП и ХМ был достоверно выше, чем в контрольной группе ЗД, в то время как в группе больных с ХСН ишемического генеза не превышал значений нормы (рис. 1).

Общим свойством в структуре АРСаз является наличие коровой части – каталитического модуля, который содержит активный центр синтетазы. В то же время в состав данных ферментов входят дополнительные модули, образованные концевыми удлинениями и вставками между элементами сердцевинной структуры, которые и определяют большое разнообразие размеров и свойств АРСаз. В глобуле АРСаз присутствуют два основных домена – аминокацилирующий, в котором располагается активный центр, и антикодон-связывающий, который узнает последовательность антикодона t -РНК. Установлено, что N- и C-концевые фрагменты TyrRS различаются не только основными, но и своими неканоническими функциями. Изолированный N-концевой каталитический модуль (39K TyrRS или mini-TyrRS) обладает не только ферментативной активностью *in vitro*, но и способен функционировать как хемокин интерлейкин-8, стимулировать миграцию полиморфонуклеарных клеток (*polymorphonuclear cells*), активно участвует в процессах передачи сигнала эндотелиальным клеткам и в регуляции ангиогенеза [21, 31, 34]. Интересно, что N-концевой модуль оказывает дозозависимый эффект на ангиогенез и проницаемость сосудов в условиях ишемии. Высокие концентрации mini-TyrRS ($600 \text{ мг}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$) оказывают стимулирующее действие, в то время как в низких концентрациях ($3 \text{ мг}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$) данный фрагмент ингибирует активность вышеуказанных процессов [13].

В свою очередь, C-концевой некаталитический модуль (20K TyrRS) после протеолитического расщепления функционирует подобно цитокину EMAP II (endothelial monocyte-activating polypeptide II) – увеличивает хемотаксис моноцитов, стимулирует выработку ряда тканевых факторов, в частности миелопероксидазы, и фактора некроза опухолей [17, 32, 33].

Учитывая функциональные различия N- и C-концевых модулей TyrRS, интерес вызывают особенности антителообразования к данным модулям АРСазы при ХСН.

Результаты исследования показали, что антитела к C-концевому фрагменту АРСазы в

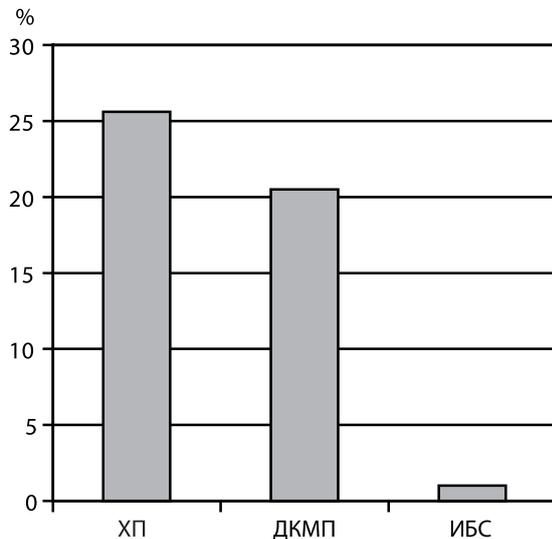


Рис. 1. Степень превышения уровня специфических антител к полноразмерной TyrRS (59 кДа) в сыворотках крови больных с ХСН различного генеза относительно нормы.

равной степени присутствуют в сыворотках крови больных с ХСН независимо от генеза синдрома (рис. 2). Титры данных антител во всех изучавшихся группах больных были достоверно выше, чем в контрольной группе ЗД.

В то же время существенные различия были обнаружены при определении уровня антител к N-концевому модулю (39K TyrRS) данной синтетазы. Так, достоверное повышение титров этих антител было выявлено лишь в сыворотках больных с ДКМП (рис. 3).

Анализируя полученные результаты, не следует забывать о способности антител оказывать различные физиологические эффекты как *in vivo*, так и *in vitro*. Хорошо известны факты положительного хронотропного действия анти- β_1 -адренорецепторных антител при ДКМП, их способность увеличивать концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} , повышать активность протеинкиназы, каспаз 3, 9 и 12 и т. д. [15, 18].

Доказана индуцируемая изопротеренолом способность аутоантител к мускариновым M2-ацетилхолиновым рецепторам блокировать повышение тока Ca^{2+} через каналы L-типа и предотвращать удлинение потенциала действия [10]. Продемонстрировано снижение активности Na-K-АТФазы и уменьшение 3H -оубаин(3H -ouabain)-связывающей аффинности кардиомиоцитов под влиянием антител к Na-K-АТФазе [8].

Классическими являются результаты исследований, проведенных в 90-х годах прошлого

столетия под руководством К. Schulze и Н.Р. Schultheiss, посвященных изучению аденин-нуклеотидного транслокатора – фермента внутренней мембраны митохондрий. Авторы выяснили, что антитела к аденин-нуклеотидному транслокатору способны пенетрировать внутрь клетки, связываться с митохондриальной мембраной и перекрестно реагировать с комплексными белками Ca^{2+} -каналов миоцитов. Такое взаимодействие приводило к увеличению трансмембранного тока Ca^{2+} и даже Ca^{2+} -зависимому лизису клеток [25, 26].

Поэтому выявленные особенности антителообразования к полноразмерной TyrRS и ее С- и особенно N-концевому модулям дает возможность предположить участие специфических аутоиммунных реакций при ХСН и делает необходимым проведение дальнейших исследований для уточнения их роли в развитии и прогрессировании миокардиальной дисфункции.

Выводы

1. В сыворотках крови больных с хронической сердечной недостаточностью некоронарогенного генеза выявлено достоверное (на 20–25 %) повышение уровня антител, способных распознавать полноразмерную тирозил-тРНК-синтетазу.

2. В сыворотках крови больных с хронической сердечной недостаточностью независимо от ее генеза отмечают повышение (на 19–28 %)

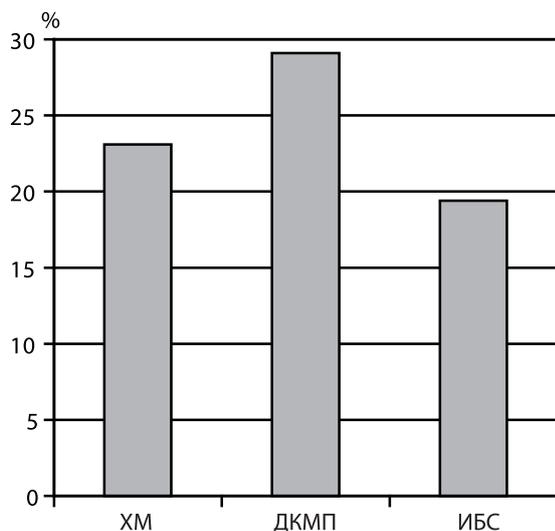


Рис. 2. Степень превышения уровня специфических антител к С-концевому некаталитическому модулю (20K TyrRS) TyrRS в сыворотках крови больных с ХСН различного генеза относительно нормы.

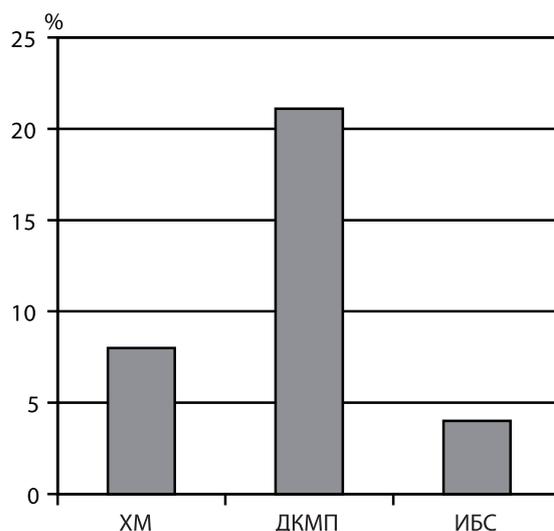


Рис. 3. Степень превышения уровня специфических антител к N-концевому каталитическому модулю (39K TyrRS) TyrRS в сыворотках крови больных с ХСН различного генеза относительно нормы.

титров антител к С-концевому ЕМАР II-подобному некаталитическому модулю тирозил-тРНК-синтетазы.

3. Достоверное повышение (на 21 %) титров циркулирующих антител к N-концевому каталитическому модулю тирозил-тРНК-синтетазы (39K TyrRS) было выявлено лишь у больных с дилатационной кардиомиопатией.

Литература

1. Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю., Агеев Ф.Т. Эпидемиологические исследования сердечной недостаточности: состояние вопроса // Серд. недостат. – 2002. – Т. 3, № 2. – С. 57–58.
2. Воронков Л.Г. Нормализация частоты сердечных сокращений как актуальная терапевтическая задача при хронической сердечной недостаточности // Серд. недостат. – 2011. – № 2. – С. 9–19.
3. Воронков Л.Г. Первичная профилактика сердечной недостаточности – один из приоритетов современной кардиологии // Укр. кардіол. журн. – 2004. – № 4. – С. 9–13.
4. Кондратюк Ю.Ю., Сидорик Л.Л., Бобик В.І. та ін. Виявлення аутоантител до тирозил-тРНК синтетази при серцевих дисфункціях // Biopolym. Cell. – 2010. – Vol. 26, № 5. – P. 373–377.
5. Кондратюк Ю.Ю., Бабарик М.А., Корнелюк О.І. Оптимізація процесу біосинтезу рекомбінантної повнорозмірної еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази при культивуванні рекомбінантного штаму *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – Т. 3, № 4. – С. 6–12.
6. Серцево-судинні захворювання. Класифікація, стандарти діагностики та лікування кардіологічних хворих / За ред. В.М. Коваленка, М.І. Лутая, Ю.М. Сіренка. – К., 2007. – 128 с.
7. Antonellis A., Green E.D. The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases // Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2008. – Vol. 9. – P. 87–107.
8. Baba A., Yoshikawa T., Iwata M. et al. Antigen-specific effects of autoantibodies against sarcolemmal Na-K-ATPase pump in immunized cardiomyopathic rabbits // Int. J. Cardiol. – 2006. – Vol. 112. – P. 15–20.
9. Betteridge Z., Gunawardena H., North J. et al. Anti-synthetase syndrome: a new autoantibody to phenylalanyl transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia // Rheumatology. – 2007. – Vol. 46 (6). – P. 1005–1008.
10. Chiale P.A., Ferrari L., Mahler E. et al. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction // Circulation. – 2001. – Vol. 103. – P. 1765–1771.
11. Di Napoli P., Barsotti A. Prognostic relevance of metabolic approach in patients with heart failure // Curr. Pharm. Des. – 2009. – Vol. 15. – P. 883–892.
12. Fox K., Ford I., Steg P.G. et al. Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial // Lancet. – 2008. – Vol. 372. – P. 807–816.
13. Greenberg Y., King M., Kiosses W.B. et al. The novel fragment of tyrosyl tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells // FASEB J. – 2008. – Vol. 22. – P. 1597–1605.
14. Guo M., Schimmel P., Yang X-L. Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions // FEBS Lett. – 2010. – Vol. 584 (2). – P. 434–442.
15. Jane-wit D., Altuntas C.Z., Johnson J.M. et al. Beta-adrenergic receptor autoantibodies mediate dilated cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis // Circulation. – 2007. – Vol. 116. – P. 399–410.
16. Kaski J.P., Elliott P. The Classification Concept of the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Disease for Dilated Cardiomyopathy // Herz. – 2007. – Vol. 32. – P. 446–451.
17. Kornelyuk A.I., Tas M.P., Dubrovsky A., Murray C.J. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Biopolym. Cell. – 1999. – Vol. 15 (2). – P. 168–172.
18. Liu J., Mao W., Iwai C. et al. Adoptive passive transfer of rabbit beta1-adrenoceptor peptide immune cardiomyopathy into the Rag2-/- mouse: Participation of the ER stress // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2008. – Vol. 44. – P. 304–314.
19. Maisch B., Portig I., Ristic A. et al. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report // Herz. – 2000. – Vol. 25 (3). – P. 200–209.
20. Najafi F., Jamrozik K., Dobson A.J. Understanding the 'epidemic of heart failure': a systemic review of trends in determinations of heart failure // Eur. J. Heart Failure. – 2009. – Vol. 11. – P. 472–479.
21. Otani A., Slike B.M., Dorrell M.I. et al. A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2002. – Vol. 99. – P. 178–183.
22. Park S.G., Ewalt K.L., Kim S. Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers // Trends Biochem. Sci. – 2005. – Vol. 30. – P. 569–574.
23. Park S.G., Kim S. Do aminoacyl-tRNA synthetases have biological functions other than in protein biosynthesis? // IUBMB Life. – 2006. – Vol. 58. – P. 556–558.
24. Park S.G., Schimmel P., Kim S. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 11043–11049.
25. Schulze K., Heineman F., Schultheiss H.P., Balaban R. Impairment of myocardial calcium homeostasis by antibodies against the adenine nucleotide translocator // Cell. Calcium. – 1999. – Vol. 25. – P. 361–370.
26. Schulze K., Witzendichler B., Christmann C., Schultheiss H.P. Disturbance of myocardial energy metabolism in experimental virus myocarditis by antibodies against the adenine nucleotide translocator // Cardiovasc. Res. – 1999. – Vol. 44. – P. 91–100.
27. Seburn K.L., Nangle L.A., Cox G.A. et al. An active dominant mutation of glycyltRNA synthetase causes neuropathy in a Charcot-Marie-Tooth 2D mouse model // Neuron. – 2006. – Vol. 51. – P. 715–726.
28. Sidorik L.L., Rodnin N.V., Savinskaya L.A. et al. Autoantibodies directed against tyrosyl-tRNA synthetase modulate its aminoacylating activity // Biopolym. Cell. – 1996. – № 5. – P. 21–28.
29. Steward S., Mac Intyre K., Hole D.J. et al. More malignant than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure // Eur. J. Heart Failure. – 2001. – Vol. 3. – P. 315–322.
30. Swedberg K., Komajda M., Bohm M. et al. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomized placebo-controlled study // Lancet. – 2010. – Vol. 376. – P. 875–885.
31. Tzima E., Reader J. S., Irani-Tehrani M. et al. Biologically active fragment of a human tRNA synthetase inhibits fluid shear stress-activated responses of endothelial cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 14903–14907.
32. Wakasugi K., Schimmel P. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274. – P. 23155–23159.
33. Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 147–151.
34. Wakasugi K., Slike B.M., Hood J. et al. A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 173–177.

Comparative study of anti-tyrosyl-tRNA synthetase and quantitative levels of its special domains autoantibodies in congestive heart failure of different origin

D.V. Riabenko, Yu.Yu. Kondratiuk, L.L. Sidorik, A.I. Korneliuk

The purpose of the investigation was to study peculiarities of autoimmune reactions against full-size tyrosyl-tRNA synthetase (TyrRS) and its individual modules in patients with systolic congestive heart failure (CHF) of different origin. The estimation of level of specific antibodies (AB) against full-size TyrRS and its individual N- and C-modules in blood sera of patients with cardiomegaly and systolic CHF of coronary (ischemic heart disease) and noncoronary (dilated cardiomyopathy, DCM, and chronic myocarditis, ChM) origin was carried out by the ELISA method. Sera of 20 patients with DCM, 44 pts with ChM and 18 pts with CHF resulting from chronic ischemic heart disease and essential hypertension were studied. All patients had CHF IIA–IIB stage, NYHA II–III functional classes. The average index of left ventricular (LV) end-diastolic volume was 125.95 ± 4.28 ml/m², LV ejection fraction – 34.25 ± 0.53 %. All patients were treated with beta-blocker, inhibitor of angiotensin-converting enzyme, diuretic. Blood tests were performed only after clinical stabilization. Sera of 20 practically healthy donors (HD) were used as a control. Significant increase (by 20–25 %) of anti-full-size TyrRS AB level was detected only in sera of patients with «noncoronary» CHF (DCM and ChM). This AB level in sera of patients with «coronary» CHF (ischemic heart disease) didn't exceed the normal value. The increased level of specific anti-C-module of TyrRS AB was found in all groups of CHF patients, regardless of syndrome origin. These AB titers in all groups of CHF patients were significantly higher (by 19–28 %) than in control group HD. At the same time significant elevation (by 21 %) of specific anti-TyrRS N-module AB level was detected only in sera DCM patients.