

АНТИТІЛА ДО HSP60 У НОВОНАРОДЖЕНИХ, ЯКИМ ПІД ЧАС ОПЕРАЦІЇ З ПРИВОДУ КРИТИЧНОЇ ВРОДЖЕНОЇ ВАДИ СЕРЦЯ ПЕРЕЛИВАЛИ АУТОЛОГІЧНУ ПУПОВИННУ КРОВ, У РАНЬОМУ ТА ВІДДАЛЕНОМУ ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОМУ ПЕРІОДІ

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

Науково—практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України,
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ

ANTIBODIES TO HSP60 IN NEWBORN BABIES, TO WHOM DURING THE INTERVENTION FOR CRITICAL INBORN HEART FAILURE, AUTOLOGOUS CORD BLOOD WAS TRANSFUSED, IN EARLY AND LATE POSTOPERATIVE PERIOD

G. M. Vorobyova, Ya. V. Tkachenko, L. F. Yakovenko, V. A. Zhovnr, L. L. Sydoryk,
I. M. Emets

Лікування ВВС потребує виконання невідкладної операції з використанням апарата штучного кровообігу (АШК) і застосування аlogenної донорської крові.

Вперше у світі з 2009 р. під час хірургічної корекції ВВС у новонароджених у клініці застосовують аутологічну пуповинну кров. Власна пуповинна кров не порушує баланс імунної системи новонародженого, її об'єм достатній для здійснення хірургічної операції [1].

Як маркер безпечності та ефективності використання аутологічної пуповинної крові у кардіохірургії новонароджених за критичних ВВС запропоноване визначення титру антитіл до білка теплового шоку 60 (heat shock protein 60 — Hsp60) у сироватці крові.

Hsp60 — основний мітохондріальний шаперон/шаперонін, що забезпечує правильний фолдинг мітохондріальних білків; у цитоплазмі виконує антиапоптотичну функцію [2]. Наявність мембранасоціюваного Hsp60 вважають сигналом "небезпеки" для імунної системи [3]. На поверхні кардіоміоцитів Hsp60 експонується у підвищеній кількості при дії будь-яких стресових чинників, зокрема, гіпоксії, хірургічного втру-

Реферат

Збільшення титру антитіл до Hsp60 (heat shock protein) у сироватці крові вважають біологічним маркером несприятливого стану організму. Проведене порівняльне дослідження титру антитіл до Hsp60 у сироватці крові новонароджених, оперованих з приводу критичної вродженої вади серця (ВВС), яким переливали аутологічну пуповинну кров або компоненти донорської крові, у ранньому та віддаленому післяопераційному періоді. У ранньому післяопераційному періоді спостерігали зниження титру антитіл до Hsp60 у сироватці крові у порівнянні з таким до операції, у віддаленому періоді (через 2 роки) в усіх досліджених зразках сироватки крові антитіла до Hsp60 не виявлені. У 35% пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові, встановлене збільшення титру антитіл до Hsp60 у ранньому післяопераційному періоді. Високий титр антитіл поєднувався з більшою частотою ускладнень. У віддаленому післяопераційному періоді антитіла до Hsp60 виявлені у 20% обстежених.

Ключові слова: вроджені вади серця; антитіла до Hsp60; оперативне втручання; аутологічна пуповинна кров.

Abstract

The titre of antibodies to Hsp60 (heat shock protein) enhancement in the blood serum is considered a biological marker of poor state of organism. Comparative investigation was done on the antibodies titre to Hsp60 in the blood serum of a newborn babies, suffering critical inborn heart failure, to whom autologous cord blood or the donor's blood components was transfused, in early and remote postoperative period. In early postoperative period the lowering of the antibodies titre to Hsp60 in the blood serum was observed in comparison with them preoperatively, in a late period (in 2 yrs) in all the blood serum samples investigated antibodies to Hsp60 were not revealed. In 35% of patients, to whom the donor's blood components were transfused, there was registered the enhancement of the antibodies to Hsp60 titre in early postoperative period. High titre of antibodies have associated with enhanced rate of complications. In late postoperative period antibodies to Hsp60 were revealed in 20% of the examined patients.

Key words: inborn heart failures; antibodies to Hsp60; operative intervention; autologous cord blood.

чання [4]. Мембранасоціюваний Hsp60 може бути потенційною мішенню для антитіл, здатних спричинити лізис або апоптоз клітин, що експресують на поверхні Hsp60, а також опосередковувати комплекс—залежну цитотоксичність. Антитіла до Hsp60 також можуть зв'язувати циркулюючий у плазмі крові Hsp60 і утворювати імунні

комплекси з патологічним впливом на тканини [3].

Високий титр антитіл до Hsp60 вважають біологічним маркером несприятливого стану організму [5]. Встановлений зв'язок між збільшенням титру антитіл до Hsp60 у сироватці крові дорослих пацієнтів, яким здійснювали операції на серці, та виникненням після операції фібриляції передсердя [4].

Метою роботи було порівняльне дослідження титру антитіл до Hsp60 у сироватці крові новонароджених за критичної ВВС, яким під час хірургічної корекції переливали аутологічну пуповинну кров або компоненти донорської крові, у ранньому та віддаленому післяопераційному періоді.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У 104 новонароджених здійснено транспозицію магістральних судин (ТМС), 42 з них (1—ша група) під час операції з використанням АШК переливали аутологічну пуповинну кров, операція виконана у строки 2 — 6 год після народження; у 60 (2—га група) під час операції переливали компоненти донорської крові, операцію виконували через 3 — 8 дів після народження. У контрольну групу включений 21 здоровий новонароджений. Обстежені 89 вагітних, у яких пренатально діагностовано патологію серця плода та 15 клінічно здорових жінок — донорів крові (контрольна група).

Титр антитіл до Hsp60 класу IgG у сироватці визначали за методом ELISA. Як антиген використовували рекомбінантний білок GroEl Escherichia coli (прокаріотний гомолог Hsp60 людини), який отримували та очищували за розробленою методикою [6]. Антитілопозитивною вважали сироватку, оптична щільність якої у розведенні 1:50 перевищувала середнє значення оптичної щільності сироватки у контрольній групі у 2 стандартних відхиленнях ($m+2sd$). Титр антитіл до Hsp60 досліджували в динаміці — до операції, у 1—шу, на 3—тю і 7—му добу після неї, а також у віддаленому періоді (через 3, 6, 12 міс, 1,5 і 2 роки). Скринінг досліджуваних зразків

Титр антитіл до Hsp60 класу IgG у вагітних за пренатально діагностованої патології серця плода та народжених ними дітей

Титр антитіл до Hsp60 класу IgG, од. опт. щільн.	
у вагітних за пренатально діагностованої патології серця плода	у новонароджених за ВВС (до операції)
0,212	0,245
0,394	0,259
0,148	0,151
0,18	0,182
0,094	0,195
0,369	0,241
0,164	0,202
0,757*	0,411**
0,155	0,136
0,832*	0,501**

Примітка. * — анти-Hsp60 позитивна сироватка у порівнянні з такою у клінічно здорових жінок; ** — анти-Hsp60 позитивна сироватка у порівнянні з такою у клінічно здорових новонароджених.

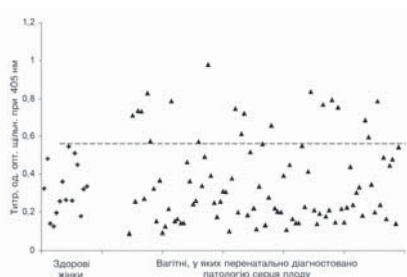


Рис. 1. Титр антитіл до Hsp60 у клінічно здорових жінок та вагітних за пренатально діагностованої ВВС плода.

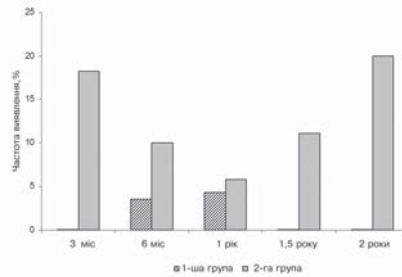


Рис. 2. Частота виявлення анти-Hsp60-позитивної сироватки у пацієнтів з ВВС після операції.

сироватки для виявлення антитіл Hsp60 класу IgG здійснювали одночасно (6 відтворюваних повторів), у роботі представлені результати останнього дослідження.

Статистична обробка результатів проведена за допомогою пакету програм Statistica 8.0 (Stat-Soft, 2007, США). Для порівняння вибірок досліджуваних груп використовували Mann-Whitney U-test, для визначення відмінностей між двома виборками парних вимірювань використовували Wilcoxon signed-rank test, що дозволяло оцінити спрямованість та вираженість змін досліджуваного показника.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Досліджували титр антитіл до Hsp60 у вагітних за пренатально

діагностованої патології серця плода (рис. 1). Анти-Hsp60-позитивна сироватка відзначена у 19,0% вагітних. Титр досліджуваних антитіл у вагітних та клінічно здорових жінок становив відповідно $(0,364 \pm 0,226)$ та $(0,317 \pm 0,134)$ од. опт. щільн. ($p=0,86$).

У 1—ї групі до операції анти-Hsp60-позитивна сироватка виявлена у 14,28% пацієнтів. Титр антитіл до Hsp60 класу IgG у вагітних за пренатально діагностованої патології серця плода та народжених ними дітей був зіставним (див. таблицю).

У ранньому післяопераційному періоді у пацієнтів 1—ї групи збільшення титру досліджуваних антитіл не спостерігали. За критерієм Wilcoxon виявлене зменшення титру антитіл до Hsp60 у сироватці крові пацієнтів 1—ї групи після опе-

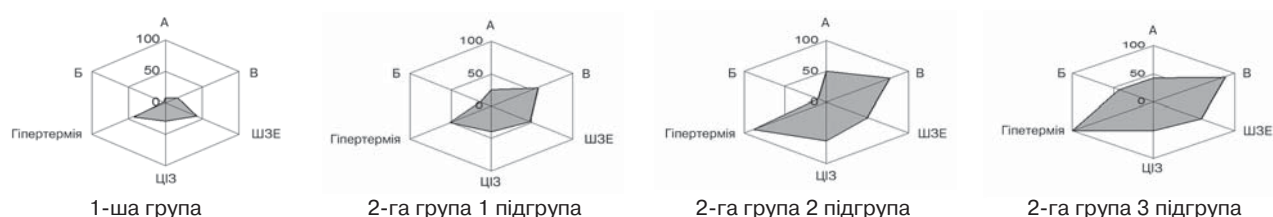


Рис. 3.

Графічний аналіз клінічних показників у новонароджених при ВВС, яким під час операції переливали аутологічну пуповинну кров та компоненти донорської крові. ЦІЗ - цитокіновий індекс запалення. Чим більша площа заштрихованої фігури, тим більшою була кількість пацієнтів, які перебували у відділенні реанімації понад 7 діб (А); у стаціонарі - понад 20 діб (Б); тривалість антибактеріальної терапії перевищувала 5 діб (В).

рації у порівнянні з такими до операції ($p=0,00009$ — у 1—шу добу; $p=0,014$ — на 3—тю добу; $p=0,005$ — на 7—му добу). Встановлено обернену кореляцію між титром антитіл до Hsp60 та об'ємом аутологічної пуповинної крові, перелитої пацієнту під час операції (на 3—тю добу $r=-0,39$). Через 1 рік після операції анти—Hsp60—позитивна сироватка виявлена у 5% пацієнтів, через 2 роки всі досліджені зразки сироватки пацієнтів 1—ї групи були анти—Hsp60—негативними (рис. 2).

У 2—ій групі у 67,5% пацієнтів сироватка була анти—Hsp60 — негативною протягом усього періоду спостереження (1—ша підгрупа), у 20% — анти—Hsp60—позитивну сироватку виявляли як до операції, так і в ранньому післяопераційному періоді (2—га підгрупа); у 12,5% — анти—Hsp60—позитивну сироватку виявляли лише після операції (3—тя підгрупа). За критерієм Wilcoxon, у 35,4% пацієнтів 2—ї групи виявлене збільшення досліджуваного показника у ранньому післяопераційному періоді ($p=0,00001$). Встановлено пряму кореляцію між об'ємом перелитої донорської плазми та титром антитіл до Hsp60 у новонароджених після ТМС (у 1—шу добу $r=0,37$, на 3—тю добу $r=0,4$, $p<0,05$), а також тривалістю лікування новонароджених у стаціонарі ($r=0,54$, $p<0,05$). Через 1 рік після операції анти—Hsp60—позитивна сироватка виявлена у 7,6% обстежених, через 2 роки — у 20%.

На рис. 3 представлені результати графічного аналізу деяких клінічних показників у пацієнтів 1—ї та 2—ї груп. Кількість пацієнтів, які перебували у відділенні реанімації по-

над 7 діб, у стаціонарі — понад 20 днів, тривалість курсу антибактеріальної терапії перевищувала 5 діб, була найбільшою у 3—ій підгрупі 2—ї групи, найменшою — у 1—ій групі.

Гіпертермію у пацієнтів 1—ї групи спостерігали протягом 9 діб, 2—ї групи — до 17 діб; максимальна температура тіла у пацієнтів 1—ї групи становила $37,9^{\circ}\text{C}$, у пацієнтів 2—ї групи — $38,9^{\circ}\text{C}$. У деяких пацієнтів 2—ї групи у ранньому післяопераційному періоді виникли ускладнення з ураженням дихальної системи. Понад 20 днів у стаціонарі лікували одного пацієнта 1—ї групи і майже 50% пацієнтів 2—ї групи.

Heat shock proteins (HSPs) — молекулярні шаперони, висококонсервативні й високоімунногенні білки, які одними з перших синтезуються під час гамето— та ембріогенезу, необхідні для розвитку ембріону [7]. Вважають, що індукція імунної відповіді до HSPs під час критичного періоду формування органів ембріону може вплинути на їх нормальний розвиток [8]. Підвищення титру антитіл до HSPs у матері може корелювати з виникненням анатомічних дефектів у новонародженого [9].

Нами досліджений титр антитіл до Hsp60 у сироватці крові вагітних за пренатально діагностованої критичної ВВС у плода.

За середніми показниками не встановлено вірогідної різниці титру досліджуваних антитіл у вагітних та клінічно здорових жінок, що узгоджується з даними літератури. Титр антитіл до Hsp60 у матерів, які народили дітей з анатомічними вадами розвитку, достовірно не відрізнявся від такого в контролі (у жінок за

нормального перебігу вагітності) [9].

За результатами дослідження, титр антитіл до Hsp60 класу IgG у вагітних (36 — 40 тиж вагітності) за пренатально діагностованої патології серця у плода зіставний з таким у народжених ними дітей. Антитіла класу IgG здатні "проходити" крізь плаценту, материнські антитіла визначають майбутній профіль антитіл дитини [10]. Переливання аутологічної пуповинної крові новонародженим під час хірургічного втручання з приводу ВВС супроводжувалося зниженням титру антитіл до Hsp60 у сироватці у ранньому післяопераційному періоді.

Встановлено обернену кореляцію між титром антитіл до Hsp60 у сироватці та об'ємом аутологічної пуповинної крові, пряму кореляцію — між титром досліджуваних антитіл та об'ємом донорської плазми, перелитої пацієнту під час операції. Найбільшу кількість пацієнтів, які довше перебували у відділенні реанімації, стаціонарі, яким довше проводили антибактеріальну терапію, спостерігали у 2—ій групі 3—ій підгрупі, найменшу — у 1—ій групі. Ускладнення з ураженням дихальної системи виникли лише у пацієнтів 2—ї групи. За результатами проведеного поетапного економічного аналізу, витрати у пацієнтів 1—ї групи за весь період лікування на 50,2% менші, ніж у 2—ій групі [11].

У віддаленому післяопераційному періоді (у строки до 2 років) анти—Hsp60—позитивну сироватку виявляли лише у пацієнтів 2—ї групи.

На нашу думку, донорська кров є потенційним джерелом антитіл до

Hsp60. За даними літератури, антитіла до Hsp60 у різному титрі виявляють у сироватці клінічно здорових осіб, з віком титр антитіл до Hsp60 збільшується [3]. За даними проведених нами раніше досліджень, анти—Hsp60—позитивну сироватку крові виявляли у 8,93% клінічно здорових донорів, компоненти крові яких використовували під час хірургічної корекції ВВС. У 25% донорів крові титр антитіл до Hsp60 перевищував середнє значення показника [12]. Високий титр антитіл до Hsp60 слід вважали біологічним маркером несприятливого стану організму, в тому числі наявності хронічного запалення, аутоімунних процесів, персистентної бактеріальної інфекції тощо [5].

Антитіла до Hsp60, одержані пацієнтом з донорської крові, очевидно, можуть справляти негатив-

ний вплив на організм, брати участь у запальних та аутоімунних процесах. Зокрема, експериментально доведено, що моноклональні антитіла до Hsp60 здатні активізувати запальні реакції, індуковані Hsp60 (продукцію фактору некрозу пухлин— α , інтерлейкіну—8 тощо) [13].

На нашу думку, попередній скринінг плазми донорів крові, яку використовуватимуть для переливання, виявлення антитіл до Hsp60 у високому титрі дозволить зменшити ризик виникнення запальних та аутоімунних процесів в організмі новонародженого при ВВС у подальшому [14].

ВИСНОВКИ

1. У новонароджених, яким під час операції з приводу ВВС переливали аутологічну пуповинну кров, спостерігали зменшення титру ан-

титіл до Hsp60 у сироватці крові у ранньому післяопераційному періоді у порівнянні з таким до операції.

2. У віддаленому періоді (у строки до 2 років) всі досліджувані зразки сироватки виявилися анти—Hsp60—негативними.

3. У 33% пацієнтів, оперованих з приводу ВВС, яким переливали компоненти донорської крові, встановлене збільшення досліджуваного показника у ранньому післяопераційному періоді.

4. Високий титр антитіл до Hsp60 у пацієнтів 2—ї групи у ранньому післяопераційному періоді поєднувався з більш вираженими клінічними ускладненнями.

5. У віддаленому періоді анти—Hsp60—позитивна сироватка виявлена у 20% обстежених.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вплив аутологічної пуповинної та донорської крові на цитокіновий профіль у новонароджених з транспозицією магістральних судин / Я. В. Ткаченко, Г. М. Воробйова, В. А. Жовнір, І. М. Ємець // *Фізіол. журн.* — 2012. — Т. 58, № 2. — С. 44 — 50.
2. Gupta S. Hsp60, Вах, apoptosis and the heart / S. Gupta, A. Knowlton // *J. Cell. Mol. Med.* — 2005. — Vol. 9, N 1. — P. 51 — 58.
3. Chlamydia trachomatis infection and anti—Hsp60 immunity: the two sides of the coin / F. Cappello, E. de Macario, V. Di Felice [et al.] // *Plos Pathogens.* — 2009. — Vol. 5, N 8. — P. 1 — 9.
4. Association of anti—heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation / K. Mandal, M. Jahangiri, M. Mukhin [et al.] // *Circulation.* — 2004. — Vol. 110. — P. 2588 — 2590.
5. Wu T. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? / T. Wu, R. Tanguay // *Cell Stress Chaperones.* — 2006. — Vol. 11, N 1. — P. 1 — 12.
6. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс—реактивность с Hsp60 / Л. Н. Капустян, Р. Г. Киямова, В. С. Гришкова [и др.] // *Biopolym. Cell.* — 2006. — Vol. 22, N 2. — P. 117 — 121.
7. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis [Review] / A. Neuer, S. Spandorfer, P. Giraldo [et al.] // *Inf. Dis. Obstet. Gynec.* — 1999. — Vol. 7. — P. 10 — 16.
8. German J. Embryonic stress hypothesis of teratogenesis / J. German // *Am. J. Med.* — 1984. — Vol. 76. — P. 293 — 301.
9. Birth defects and anti—heat shock protein 70 antibodies in early pregnancy / D. Child, P. Hudson, C. Hunter—Lavin [et al.] // *Cell Stress Chaperones.* — 2006. — Vol. 11, N 1. — P. 101 — 105.
10. Mother—child immunological interactions in early life affect long—term humoral autoreactivity to heat shock protein 60 at age 18 years / G. Victora, M. Bilate, A. Socorro—Silva [et al.] // *J. Autoimmun.* — 2007. — Vol. 29. — P. 38 — 43.
11. Економічний аналіз реалізації інноваційного підходу до операції артеріального переключення / В. А. Жовнір, Н. М. Мирута, О. М. Федевич [та ін.] // *Серцево—судинна хірургія.* — 2011. — Вип. 19. — С. 133 — 137.
12. Анти—Hsp60 антитіла у клінічно здорових донорів та новонароджених із критичною вродженою вадою серця, яким переливали компоненти донорської крові / Г. М. Воробйова, Я. В. Ткаченко, Л. Ф. Яковенко [та ін.] // *Доп. НАН України.* — 2013. — № 6. — С. 169 — 175.
13. Yokota S. Anti—HSP auto—antibodies enhance HSP—induced pro—inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll—like receptors / S. Yokota, S. Minota, F. Nobuhiro // *Intern. Immun.* — 2006. — Vol. 18. — P. 573 — 580.
14. Пат. 103141 Україна, МПК G01N33/53 (2006.01). Застосування анти—Hsp60 антитіл як маркерів імунної безпеки проведення гемотрансфузій у кардіохірургії вроджених вад серця / Я. В. Ткаченко, Г. М. Воробйова, Л. Л. Сидорик [та ін.] (Україна). — № а201212693; заявл. 07.11.12. Опубл. 10.09.13. Бюл. № 17.

