

## Виявлення анти-Hsp60 та анти-Sgt1 антитіл у новонароджених із критичною вродженою вадою серця у віддаленому післяопераційному періоді

Воробйова Г.М.<sup>1</sup>, Ткаченко Я.В.<sup>1</sup>, Погрібна А.П.<sup>2</sup>, Жовнір В.А.<sup>1</sup>, Сидорик Л.Л.<sup>2</sup>, Ємець І.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України» (Київ)

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України (Київ)

Проведено порівняльне дослідження рівнів антитіл до Hsp60 та Sgt1 (стресові білки) у сироватці крові новонароджених із транспозицією магістральних судин (ТМС), яким під час операції переливали аутологічну пуповинну або компоненти донорської крові, у динаміці. У віддалений період після операції (термін спостереження 2 роки) підвищені рівні анти-Hsp60 та анти-Sgt1 антитіл (анти-Hsp60 та анти-Sgt1-позитивна сироватка) виявлено лише у пацієнтів з ТМС, яким переливали компоненти донорської крові. У пацієнтів, яким була перелита аутологічна пуповинна кров, спостерігалось зниження рівнів досліджуваних антитіл, або вони знаходилися в межах норми протягом всього періоду спостереження (2 роки).

**Ключові слова:** пуповинна кров, анти-Hsp60 та анти-Sgt1 антитіла, вроджені вади серця.

Державна установа «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України» є єдиним вітчизняним закладом, у якому вперше у світі досліджено терапевтичний потенціал аутологічної пуповинної крові та доведено доцільність її використання в комплексному лікуванні дітей із критичними вродженими вадами серця (ВВС).

Як маркер ефективності застосування аутологічної пуповинної крові у кардіохірургії критичних ВВС у новонароджених, нами було запропоновано виявлення антитіл до білка теплового шоку 60 (heat shock protein 60, Hsp60) у сироватці крові пацієнтів [1]. Нами раніше показано, що плазма клінічно здорових донорів може мати підвищений вміст анти-Hsp60 антитіл. Вперше показано, що IgG антитіла, афінно очищені із зразків високореактивної до Hsp60 за результатами ELISA сироватки клінічно здорових донорів, розпізнавали у сумарних лізатах біоптатів правого передсердя новонароджених із ТМС білок з молекулярною вагою близько 60 кДа [2]. Вважається, що високі рівні анти-Hsp60 антитіл слід розглядати як біологічний маркер несприятливого стану організму, наявності хронічних захворювань, аутоімунних процесів тощо [3]. Відомо, що підвищені рівні анти-Hsp60 антитіл у сироватці дорослих можуть бути ознакою наявності та важкості перебігу серцево-судинних захворювань [4], патологічних змін дрібних судин головного мозку [5] тощо. Інтерес становить білок Sgt1, який експресується в тканинах міокарда та головного мозку [6]. У науковій літературі не відображено питання щодо анти-Sgt1 антитіл та їх біологічної ролі як у клінічно здорових донорів, так і при патологічних процесах. З огляду на викладене, дослідження антитіл до консервативних білків Hsp60 та Sgt1 у новонароджених із ВВС становить науково-практичний інтерес як у ранній, так і у віддалений період після операції на серці із використанням гемотрансфузій.

**Метою роботи** було порівняльне дослідження рівнів антитіл до Hsp60 та Sgt1 у пацієнтів із транспозицією магістральних судин (ТМС), яким переливали аутологічну пуповинну або компоненти донорської крові, у ранньому та віддаленому післяопераційному періоді.

**Матеріал та методи дослідження.** У період з 2010 по 2012 рік включно обстежено 104 новонароджених із ТМС. 1-ша група – 42 пацієнти, яким під час операції з використанням апарату штучного кровообігу (АШК) переливали аутологічну пуповинну кров. 2-га група – 60 пацієнтів, яким під час операції переливали компоненти донорської крові. Контрольну групу склали 21 клінічно здоровий новонароджений.

Рівень IgG анти-Hsp60 та анти-Sgt1 антитіл у сироватці визначали методом ELISA [7]. Як антиген використовували рекомбінантний білок GroE1 *Escherihia coli* (прокаріотичний гомолог Hsp60 людини) та рекомбінантний білок Sgt1. Одержання та очистку рекомбінантного білка GroE1 *E.coli* проводили за розробленою методикою [8]. Антитіло-позитивною вважали сироватку, оптична густина якої у розведенні 1:50 перевищувала середнє значення оптичної густини на 2 стандартних відхилення ( $m+2sd$ ). Як позитивний контроль використовували поліклональні антитіла проти рекомбінантного Hsp60 (GroEL *E.coli*) та рекомбінантного Sgt1. Поліклональні антитіла було одержано нами за методикою [9].

Дослідження рівнів анти-Hsp60 та анти-Sgt1 антитіл проводили у динаміці – до операції, на 1, 3, 7 добу після операції, а також у віддалений період (3, 6, 12 місяців, 1,5 та 2 роки). Всі досліджувані зразки сироватки було проскриновано на наявність антитіл класу IgG одночасно (6 та 2 відтворювані повтори відповідно), у роботі представлено результати останньої постановки.

*Статистичну обробку результатів* досліджень здійснювали за допомогою пакету програм STATISTICA 8.0 (Stat-Soft, 2007, США). Результати представлено у вигляді середніх значень ( $m$ ) із вказівкою на стандартне відхилення ( $sd$ ). Для порівняння вибірок досліджуваних груп використовували U-критерій Манна-Уїтні (Mann-Whitney U- test) та критерій Wilcoxon.

**Результати досліджень та їх обговорення.** За результатами проведених досліджень, до операції анти-Hsp60 - позитивну сироватку виявлено у 14,28% випадків серед пацієнтів 1-ї групи. У ранньому післяопераційному періоді не спостерігалось зростання рівнів досліджуваних антитіл у жодного з обстежених пацієнтів. За критерієм Wilcoxon виявлено достовірно значуще зниження вмісту анти-Hsp60 антитіл у сироватці крові обстежених пацієнтів після операції порівняно з доопераційним періодом ( $p=0,00009$  – 1-а доба;  $p=0,014$  – 3-я доба;  $p=0,005$  – 7-а доба). Встановлено обернену кореляцію між об'ємом перелитої новонародженому під час операції аутологічної пуповинної крові та рівнем анти-Hsp60 антитіл у сироватці (3 доба  $r=-0,39$ ,  $p<0,05$ ). Через 1 рік після операції анти-Hsp60 позитивну сироватку виявлено у 5% (1/20) обстежених пацієнтів, через 2 роки всі досліджувані зразки сироватки пацієнтів 1-ї групи були анти-Hsp60 негативними.

У 67,5% випадків серед обстежених пацієнтів 2-ї групи сироватка була анти-Hsp60 негативною як до операції, так і в ранньому післяопераційному періоді (1 підгрупа). У 20% випадків серед пацієнтів 2-ї групи анти-Hsp60 позитивна сироватка крові детектувалась як до операції, так і в ранньому післяопераційному періоді (2 підгрупа). У 12,5% випадків серед пацієнтів анти-Hsp60-позитивна сироватка виявлялася лише після операції (3 підгрупа). За критерієм Wilcoxon, у 35,4% випадків серед пацієнтів 2-ї групи встановлено достовірне зростання рівнів досліджуваного показника в ранній післяоперацій-

ний період ( $p=0,00001$ ). Виявлено пряму кореляцію між об'ємом перелитої донорської плазми та рівнем анти-Нсп60 антитіл у новонароджених із ТМС (1 доба –  $r=0,37$ ; 3 доба –  $r=0,4$ ;  $p<0,05$ ), а також між об'ємом перелитої донорської плазми та терміном перебування новонароджених із ТМС у стаціонарі ( $r=0,54$ ,  $p<0,05$ ). За результатами частотного аналізу в реанімації більше 6 діб перебувало: серед новонароджених 1 підгрупи – 25,7%, 2 підгрупи – 50%, 3 підгрупи – 42,85% пацієнтів; у стаціонарі більше 20 днів після операції відповідно – 12%, 10% та 42,85% пацієнтів; гіпертермія у післяопераційному періоді спостерігалася у 51,35%, 88,9% та 100% випадків, тривалість антибіотикотерапії більше 7 діб мала місце у 19,35%, 62,5% та 50% пацієнтів ( $p>0,05$ ). На рис. 1 наведено графічне зображення клінічних показників у формі порівнюваних площин.

Через 1 рік після операції анти-Нсп60 позитивну сироватку детектовано у 7,6% випадків (1/13) серед обстежених пацієнтів ( $n=13$ ), через 2 роки – у 12% (1/4).

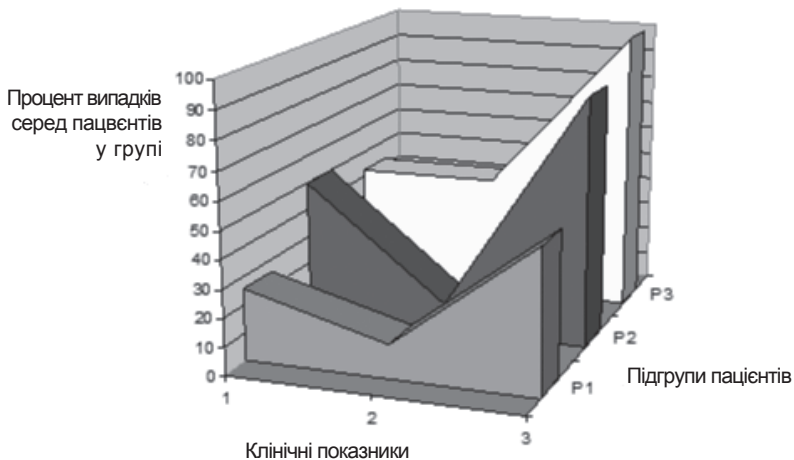


Рис. 1. Графічний аналіз за клінічними показниками пацієнтів з транспозицією магістральних судин, яким переливали компоненти донорської крові

- 1 – термін перебування пацієнтів у реанімації більше 144 год.;
- 2 – термін перебування у стаціонарі більше 20 днів після операції;
- 3 – гіпертермія в післяопераційному періоді).

P1 – 1 підгрупа (анти-Нсп60-негативні сироватки до та після операції)

P2 – 2 підгрупа (анти-Нсп60-позитивні сироватки до та після операції)

P3 – 3 підгрупа (анти-Нсп60-позитивні сироватки лише після операції)

На рис. 2 подано результати порівняльного дослідження вмісту анти-Sgt1 антитіл у клінічно здорових новонароджених та пацієнтів із ТМС (індивідуальні показники). Встановлено, що до операції у пацієнтів 1-ї групи рівень анти-Sgt1 антитіл знаходився в межах норми, тоді як у 8,3% випадків серед пацієнтів 2-ї групи сироватка крові виявилася анти-Sgt1-позитивною.

У післяопераційному періоді у пацієнтів 1-ї групи не було виявлено анти-Sgt1-позитивної сироватки. Спостерігалось зниження рівнів досліджуваних антитіл, або вони залишались незмінними протягом усього періоду спостереження (2 роки). За критерієм

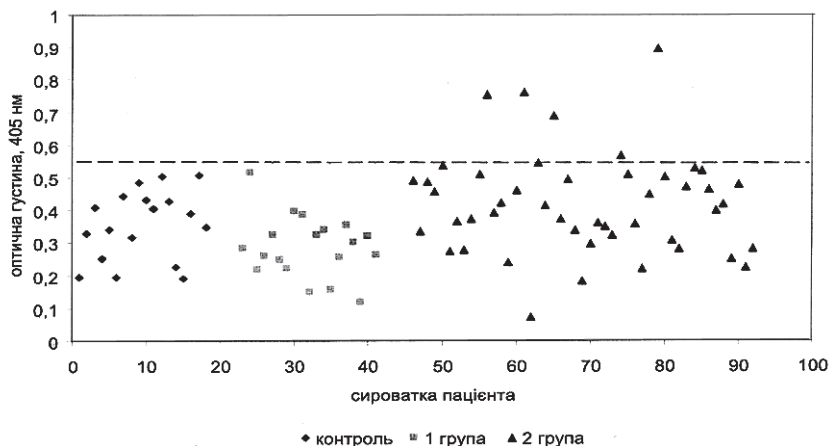


Рис. 2. Анти-Sgt1 антитіла у клінічно здорових новонароджених та пацієнтів із ТМС до операції

Wilcoxon виявлено достовірно значуще зниження рівнів анти-Sgt1 антитіл на 1-шу добу після операції порівняно з доопераційним періодом ( $p=0,002$ ), на 7-му добу порівняно з 1-ю добою ( $p=0,0068$ ).

Інша картина виявлялась у пацієнтів 2-ї групи. Підвищення рівнів анти-Sgt1 антитіл (анти-Sgt1-позитивна сироватка) спостерігалось у ранньому післяопераційному періоді у 12,5% випадків, у віддаленому післяопераційному періоді – у 38,2% випадків. За критерієм Wilcoxon встановлено статистично достовірне підвищення рівнів досліджуваних антитіл через 3 та 6 місяців після операції, порівняно з 1 добою після операції ( $p=0,03$  та  $p=0,02$  відповідно). Виявлено статистично значущу різницю рівнів анти-Sgt1 антитіл у пацієнтів 1-ї та 2-ї групи (1 доба –  $p=0,000001$ , 7 доба –  $p=0,000001$ , 6 місяців –  $p=0,00028$ , 1 рік –  $p=0,022$ ). Слід зазначити, що у віддаленому післяопераційному періоді підвищений рівень анти-Hsp60 та анти-Sgt1 антитіл спостерігався у одних і тих самих пацієнтів, яким була перелита донорська кров.

За результатами проведених досліджень, у післяопераційному періоді між новонародженими з ВВС, яким переливали аутологічну пуповинну кров або компоненти донорської крові, виявлено такі відмінності. У пацієнтів 1-ї групи у ранньому та віддаленому післяопераційному періоді спостерігалось зниження рівнів анти-Hsp60 та анти-Sgt1 антитіл або вони залишались незмінними протягом всього періоду спостереження (анти-Hsp60 та анти-Sgt1-негативна сироватка крові). Виняток становив лише один пацієнт, у якого через 1 рік після операції сироватка залишалась анти-Hsp60 позитивною. У частини пацієнтів (12,5%) 2-ї групи, навпаки, в ранньому післяопераційному періоді спостерігалось значне підвищення рівнів досліджуваних антитіл (анти-Hsp60- та анти-Sgt1-позитивна сироватка). У віддаленому післяопераційному періоді (2 роки) анти-Hsp60- та анти-Sgt1-позитивна сироватка виявлялась відповідно у 12% та 38,2% випадків серед обстежених пацієнтів 2-ї групи.

Трансфузія донорської крові несе чужорідну генетичну інформацію, що ініціює розвиток розладів імунної системи реципієнта. Виходячи з одержаних нами результатів, ви-

явлення у віддаленому післяопераційному періоді антитіл до Hsp60 та Sgt1 лише у пацієнтів з ТМС, яким під час операції на серці переливали компоненти донорської крові, на нашу думку, може свідчити про ймовірний ризик розвитку аутоімунних процесів в організмі цих хворих та ініціювати аутоімунні ушкодження клітин міокарда та головного мозку у віддалений період після операції.

### **Висновки**

1. У віддаленому післяопераційному періоді підвищені рівні анти-Hsp60 та анти-Sgt1 антитіл (анти-Hsp60 та анти-Sgt1-позитивна сироватка) виявлено лише у пацієнтів із ТМС, яким переливали компоненти донорської крові.
2. У пацієнтів із ТМС, яким переливали аутологічну пуповинну кров, спостерігалось зниження рівнів досліджуваних антитіл протягом усього періоду спостереження (2 роки).
3. Виявлення анти-Hsp60 та анти-Sgt1 антитіл у віддалений післяопераційний період вказує на ризик розвитку аутоімунних процесів в організмі новонароджених із ВВС.

### **Література**

1. Анти-Hsp60 антитіла у новонароджених зі складними вродженими вадами серця при застосуванні компонентів пуповинної та донорської крові / Ткаченко Я. В., Яковенко Л. Ф., Жовнір В. А., Часовський К. С., Федевич О. М., Капустян Л. М., Саламаніна А. О., Воробйова Г. М., Сидорик Л. Л., Ємець І. М. // Вісник КДУ. – 2011. – № 14. – С. 24–28.
2. Анти-Hsp60 антитіла у клінічно здорових донорів та новонароджених із критичною вродженою вадою серця, яким переливали компоненти донорської крові / Воробйова Г. М., Ткаченко Я. В., Яковенко Л. Ф., Капустян Л. М., Сидорик Л. Л., Ємець І. М. // Доповіді Національної Академії Наук України. – 2013. – № 6. – С. 169–176.
3. Wu T., Tanguay R. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? // Cell Stress Chaper. – 2006. – Vol. 11, N 1. – P. 1–12.
4. Zhang X., He M., Cheng L., Zhou L., Zeng H., Wang J., Wang F., Chen Y., Hu F., Wu T. Joint effect of antibody to heat shock protein 60, hypertension, and diabetes on risk of coronary heart disease in Chinese // Clinical Chemistry. – 2008. – Vol. 54. – N 6. – P. 1046–1052.
5. Kimura A., Sakurai T., Yamada M., Koumura A., Hayashi Y., Hozumi I., Takemura M., Seishima M., Inuzuka T. Elevated anti-heat shock protein 60 antibody titer is related to white matter hyperintensities // J. Stroke Cerebrov. Diseases. – 2012. – Vol. 21, N 4. – P. 305–309.
6. Spiechowicz M., Filipek A. The expression and function of Sgt1 protein in eukaryotic cells // Acta Neurobiol. Exp. – 2005. – Vol. 65. – P. 161–165.
7. Avrames S., Termynck T. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies // Mol. Immunol. – 1993. – Vol. 30. – P. 119–127.
8. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 / Капустян Л. Н., Киямова Р. Г., Гришкова В. С., Терентьев А. Г., Филоненко В. В., Сидорик Л. Л. // Biopolym. & Cell. – 2006. – Vol. 22, N 2. – P. 117–121.
9. Sidorik L., Gudzera O., Dragovoz V., Tucalo M., Beresten S. Immuno-chemical noncross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases // FEBS Letters. – 1991. – Vol. 292, N 1, 2. – P. 76–78.

## **Выявление анти-Hsp60 и анти-Sgt1 антител у новорожденных с критическим врожденным пороком сердца в отдаленном послеоперационном периоде**

**Воробьева А.М., Ткаченко Я.В., Погребная А.П., Жовнир В.А., Сидорик Л.Л., Емец И.Н.**

Проведено сравнительное исследование уровней антител к Hsp60 и Sgt1 (стрессовые белки) в сыворотке крови новорожденных с транспозицией магистральных сосудов (ТМС), которым во время операции переливали аутологичную пуповинную или компоненты донорской крови, в динамике. Повышенные уровни анти-Hsp60 и анти-Sgt1 антител (анти-Hsp60 и анти-Sgt1 -положительная сыворотка) обнаружены лишь у пациентов с ТМС, которым переливали компоненты донорской крови. У пациентов, которым переливали аутологичную пуповинную кровь, либо наблюдалось снижение уровней исследуемых антител, либо они находились в пределах нормы в течение всего периода наблюдения (2 года).

**Ключевые слова:** *пуповинная кровь, анти-Hsp60 и анти-Sgt1 антитела, врожденные пороки сердца.*

## **Anti-Hsp60 and Anti-Sgt1 Antibodies in Neonates with Critical Congenital Heart Disease in the Postoperative Period**

**Vorobyova G.M., Tkachenko Y.V., Pogrebna A.P., Zhovnir V.A., Sidoryk L.L., Yemets I.M.**

The levels of anti-Hsp60 and anti-Sgt1 antibodies in newborns with transposition of great arteries (TGA) using autologous umbilical cord blood (AUCB) or donor blood components transfusion after heart cardiac surgery were identified. Patients bearing the high levels of anti-Hsp60 and anti-Sgt1 antibodies were detected only in group of patients with transfusion of allogenic donor blood. In patients who had been poured of autologous umbilical cord blood, had reduction levels or normal range of antibodies during observation period (2 years).

**Key words:** *cord blood, anti-Hsp60 and anti-Sgt1 antibody, congenital heart disease.*