

Количественное определение изотипов антител к пептидам, имитирующим структуру $\beta 1$ -адренорецептора, у кардиологических больных

А.Я. ШЕВЕЛЕВ¹, Е.В. ЯНУШЕВСКАЯ^{1, 2}, Л.Н. ЛИПАТОВА^{1, 2}, Т.В. ШАРФ², И.Б. КУЗНЕЦОВА²,
Е.Н. МАМОЧКИНА², Н.М. КАШИРИНА^{1, 2}, М.М. ПЕКЛО^{1, 2}, И.Н. РЫБАЛКИН^{1, 2},
П.Н. РУТКЕВИЧ^{1, 2}, М.А. СЛИНКИН^{1, 2}, Е.Р. МАСЛОВА¹, М.В. КОСТЮКЕВИЧ², Н.А. МИРОНОВА²,
К.А. ЗЫКОВ², С.П. ГОЛИЦЫН², М.В. СИДОРОВА², Е.Е. ЕФРЕМОВ², Т.Н. ВЛАСИК^{1, 2}

¹ ООО «Мона», ул. Кастанеевская, 38, стр. 1, Москва, 121108, Российская Федерация;

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, ул. 3-я Черепковская, 15а, Москва, 121552, Российская Федерация

Резюме

Аутоантитела к $\beta 1$ -адренорецептору могут играть важную роль в развитии некоторых заболеваний сердечно-сосудистой системы. Иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием синтетических пептидов, традиционно применяемый с целью детекции таких антител, не позволяет получать адекватные данные, вероятно, вследствие слабого сходства конформаций пептидов с пространственной структурой внеклеточных участков $\beta 1$ -адренорецептора.

Цель исследования. Усовершенствовать метод ИФА для детекции аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору за счет раздельного определения аутоантител изотипов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM и IgA.

Материал и методы. Предложена модификация метода ИФА с использованием пептидов, соответствующих последовательностям первой и второй внеклеточных петель $\beta 1$ -адренорецептора, и вторых антител, специфических к вышеуказанным изотипам иммуноглобулинов человека. Метод опробован на панели образцов сыворотки крови, полученных от пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП), желудочковой аритмией и ишемической болезнью сердца.

Результаты. Для некоторых групп больных зафиксированы небольшие превышения средних значений сигналов отдельных изотипов антител по сравнению с группой здоровых добровольцев, однако эти отличия не являются статистически значимыми. Доля сигналов «выше уровня нормы» в группе больных ДКМП составила 21% для изотипа IgG1 и от 6 до 16% для остальных изотипов, что весьма далеко от частоты встречаемости аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору (70–80%), наблюдаемой у больных ДКМП при использовании функциональных методов анализа. В других группах доля таких сигналов не превысила 30% ни для одного изотипа антител.

Заключение. Раздельное измерение изотипов не привело к существенному увеличению информативности метода.

Ключевые слова: $\beta 1$ -адренорецептор, аутоантитела, иммуноферментный анализ, изотипы, пептиды, сердечно-сосудистые заболевания.

Quantitative detection of antibody isotypes to peptides mimicking the structure of $\beta 1$ -adrenergic receptor in cardiac patients

A.Y. SHEVELEV¹, E.V. YANUSHEVSKAYA^{1, 2}, L.N. LIPATOVA^{1, 2}, T.V. SHARF², I.B. KUZNETSOVA²,
E.N. MAMOCHKINA², N.M. KASHIRINA^{1, 2}, M.M. PEKLO^{1, 2}, I.N. RYBALKIN^{1, 2}, P.N. RUTKEVICH^{1, 2},
M.A. SLINKIN^{1, 2}, E.R. MASLOVA¹, M.V. KOSTYUKEVICH², N.A. MIRONOVA², K.A. ZYKOV², S.P. GOLITSYN²,
M.V. SIDOROVA², E.E. EFREMOV², T.N. VLASIK^{1, 2}

¹ MonA LLC, 38/1 Kastanayevskaya St., 121108, Moscow, Russian Federation;

² National Medical Research Center of Cardiology, 15A 3rd Cherepkovskaya St., 121552, Moscow, Russian Federation

Summary

Autoantibodies to $\beta 1$ -adrenergic receptor may play a role in the development of certain cardiovascular system diseases. Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), traditionally used for the detection of such antibodies, does not allow to obtain adequate data, probably due to the poor similarity of peptide conformations to the spatial structure of the extracellular regions.

Aim of the study: to improve the peptide-based ELISA method for the detection of autoantibodies to $\beta 1$ adrenergic receptor by a separate determination of the IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA autoantibody isotypes. **Material and methods:** a modification of the ELISA method with peptides corresponding to the sequences of the $\beta 1$ -adrenergic receptor first and second extracellular loops, and secondary antibodies specific to the above-mentioned human immunoglobulin isotypes. The method has been tested on a panel of samples obtained from patients with dilated cardiomyopathy (DCM), arrhythmia and coronary heart disease.

Results: small excess of the signal mean values of individual antibody isotypes have been recorded for some groups of patients in comparison with the group of healthy volunteers. However, these differences were not statistically significant. The proportion of signals «above the

normal level» in the group of DCM patients was 21% for IgG1 isotype and from 6% to 16% for the other isotypes, which is far away from the frequency of β 1-adrenergic receptor autoantibodies observed in DCM patients (70%–80%) when used functional methods of analysis. In other groups, the proportion of such signals did not exceed 30% for any antibody isotype.

Conclusion: the separate measurement of isotypes did not lead to a significant increase in the method's informative value.

Key words: β 1-adrenoreceptor, autoantibodies, enzyme-linked immunosorbent assay, isotypes, peptides, cardiovascular diseases

Сведения об авторах:

Шевелев Александр Ясенович — к. б. н., главный специалист ООО «МонА»; e-mail: a.shevelev@gmail.com; +7 (916) 644-30-95; <https://orcid.org/0000-0003-4305-4132> (автор, ответственный за переписку).

Янушевская Елена Вадимовна — научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: yanushevskaya@yandex.ru

Липатова Людмила Николаевна — к. б. н., ст. научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: Liliudon3005@yandex.ru

Шарф Татьяна Васильевна — научный сотрудник лаборатории иммунохимии; e-mail: tsharf@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1993-9264>

Кузнецова Ирина Борисовна — мл. научный сотрудник лаборатории иммунохимии; e-mail: moscow-nona@yandex.ru <https://orcid.org/0000-0002-0893-7979>

Мамочкина Елена Николаевна — биолог лаборатории иммунохимии; e-mail: emchn@yandex.ru <https://orcid.org/0000-0002-0146-1285>

Каширина Наталья Михайловна — научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: kashka55@yandex.ru

Пекло Михаил Михайлович — к. б. н., ст. научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: Peclo@yandex.ru

Рыбалкин Игорь Николаевич — научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: irybalikin@yahoo.com

Руткевич Павел Николаевич — научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: p.rutkevich@gmail.com

Слинкин Михаил Алексеевич — к. б. н., эксперт лаборатории клеточной инженерии; e-mail: mikh.slinkin@gmail.com

Маслова Елена Раульевна — специалист ООО «МонА»; e-mail: lenam1305@gmail.com

Костюкевич Марина Валентиновна — к. м. н., мл. научный сотрудник отдела клинической электрофизиологии и рентгенохирургических методов лечения нарушений ритма сердца; e-mail: marik988@gmail.com <https://orcid.org/0000-0001-9022-1058>

Миронова Наталия Александровна — к. м. н., ст. научный сотрудник отдела клинической электрофизиологии и рентгенохирургических методов лечения нарушений ритма сердца; e-mail: mirona01@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2374-3718>

Зыков Кирилл Алексеевич — д. м. н., проф., гл. научный сотрудник лаборатории иммунопатологии сердечно-сосудистых заболеваний; e-mail: kirillaz@inbox.ru

Голицын Сергей Павлович — д. м. н., проф., гл. научный сотрудник отдела клинической электрофизиологии и рентгенохирургических методов лечения нарушений ритма сердца; e-mail: golitsyn@cardio.ru <https://orcid.org/0000-0001-9913-9974>

Сидорова Мария Владимировна — к. х. н., проф., вед. научный сотрудник лаборатории синтеза пептидов; e-mail: mvs.peptide@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-2540-6325>

Ефремов Евгений Евгеньевич — к. б. н., вед. научный сотрудник лаборатории иммунохимии; e-mail: efremoveugene@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7756-7027>

Власик Татьяна Николаевна — к. б. н., вед. научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: tanya.vlasik@gmail.com

Введение

Аутоантитела к β 1-адренорецептору могут вносить существенный вклад в патогенез ряда сердечно-сосудистых заболеваний, в первую очередь дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) [1]. При связывании с β 1-адренорецептором аутоантител-агонистов происходит активация рецептора, сопровождающаяся передачей сигнала через G-белки и аденилатциклазу внутрь клетки с повышением внутриклеточного уровня cAMP [2]. Постоянная стимуляция локализованных в сердечной мышце β 1-адренорецепторов аутоантителами оказывает кардиотоксическое действие [3], которое в конечном счете может приводить к хронической сердечной недостаточности [4], аритмии [5] и развитию признаков ДКМП [6]. Стимулирующим потенциалом в основном обладают аутоантитела ко второй внеклеточной петле рецептора (аминокислоты 197–222) и в меньшей степени к его первой внеклеточной петле (аминокислоты 121–132) [2, 7].

Наиболее адекватными считаются функциональные методы определения аутоантител-агонистов к β 1-адрено-

рецептору: измерение хронотропного эффекта на культуре кардиомиоцитов крысы [8] или детекция повышения внутриклеточной концентрации cAMP в клетках с рекомбинантным β 1-адренорецептором [2]. Частота встречаемости аутоантител к β 1-адренорецептору, определяемая функциональными методами, у больных ДКМП составляет 70–80%, не превышая нескольких процентов у здоровых людей [2, 9]. К сожалению, оба метода весьма трудоемки и плохо воспроизводимы.

Самым распространенным до недавнего времени методом определения аутоантител-агонистов в исследовательских целях был иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием синтетических пептидов, соответствующих последовательности второй внеклеточной петли [10, 11]. С его помощью, в частности, было продемонстрировано повышение частоты встречаемости аутоантител к β 1-адренорецептору у пациентов с нарушениями ритма и проводимости сердца [12]. Однако в последние годы у ведущих ученых, работающих в данном направлении, сформировалось мнение о неудовлетворительности данных, получаемых методом ИФА с использованием пептидов, вследствие их

слабой корреляции с результатами функциональных методов [9, 13, 14]. По-видимому, причина заключается в отличии конформаций синтетических пептидов от природной конформации второй внеклеточной петли и высокой конформационной чувствительности антител-агонистов [15]. Рядом групп ведутся разработки альтернативных подходов к проблеме диагностики аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору на основе иммунологических методов анализа [16–18].

Недавно внимание ученых начали привлекать необычные изотипические характеристики аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору. Судя по косвенным признакам, функционально активные аутоантитела к $\beta 1$ -адренорецептору в основном относятся к подклассу IgG3 [19, 20]. При этом информация о том, какие классы и подклассы иммуноглобулинов в основном взаимодействуют с эпитопами первой и второй внеклеточных петель $\beta 1$ -адренорецептора у пациентов с определенными нозологиями, в литературе отсутствует.

В настоящем исследовании предпринята попытка повысить информативность ИФА с использованием пептидных антигенов за счет дифференциации анализа по изотипам иммуноглобулинов и в случае успеха установить преимущественную изотипическую принадлежность антител к $\beta 1$ -адренорецептору у пациентов с различными видами сердечно-сосудистых заболеваний.

Материал и методы

Пациенты и образцы для анализа. Процедура отбора и обследования пациентов с диагнозом ДКМП ($n=38$), с желудочковыми нарушениями ритма сердца (ЖНРС) идиопатического характера без признаков органического заболевания сердца (группа ЖНРС-И, $n=37$), с ишемической болезнью сердца (ИБС) и нарушениями ритма второй градации по Лауну и выше (группа ИБС с ЖНРС, $n=37$), больных ИБС без ЖНРС ($n=14$) и здоровых добровольцев ($n=16$) была описана нами ранее [17]. Все пациенты и добровольцы подписали информированное согласие об участии в исследовании, включающее разрешение на опубликование результатов в научных изданиях.

Венозную кровь собирали в пробирки Monovette Serum Z/4.9 ml (Sarstedt) и отстаивали в течение 30 минут. Сыворотку отделяли от эритроцитов центрифугированием, аликвотировали и замораживали при температуре 70°C .

Синтетические пептиды. 9-членный пептид $\beta 3$ (EYGSFFCEL), являющийся фрагментом (125–133) первой внеклеточной петли $\beta 1$ -адренорецептора, получали методом ступенчатого твердофазного синтеза, 26-членный пептид $\beta 8$ (HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR), соответствующий последовательности (197–222) второй внеклеточной петли, получали методом конвергентного синтеза на твердой фазе [21]. Очистку пептидов производили с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, предотвращающих димеризацию продуктов за счет окисления свободных сульфгидрильных групп остатков цистеина. Дизайн, структура и синтез нелинейного пептида $\beta 25$, моделирующего конформацию второй внеклеточной петли $\beta 1$ -адренорецептора, были выполнены в НМИЦ кардиологии ранее [22].

Антиизотипические антитела. Биотинилированные мышинные моноклональные антитела против Fc-фрагментов иммуноглобулинов человека подклассов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и биотинилированные аффинно очищенные поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов человека классов IgM и IgA приобретали у компании Thermo Fisher Scientific.

ИФА. Пептиды в концентрации 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) адсорбировали на поверхности 96-луночных планшетов для ИФА (Corning) в течение ночи при 4°C . Мы отказались от использования карбонат-бикарбонатного буфера, традиционно применяемого при адсорбции пептидов и белков на поверхности планшетов для ИФА, поскольку инкубация пептида $\beta 8$ в щелочных условиях (рН 9,4) приводила к замыканию S-S связей и появлению значительного количества пептидных олигомеров.

На следующий день раствор пептидов удаляли, планшеты промывали 4 раза PBS с 0,05% Tween-20 и наносили по 100 мкл образцов сыворотки, разведенных в 20 раз блокирующим раствором, содержащим 18% казеинового концентрата CBC1 (5,5% коллоидный раствор казеина, Stereospecific Detection Technologies) и 0,05% Tween-20 в PBS. Инкубацию с образцами сыворотки проводили в течение 1 часа при 37°C с качением планшетов на орбитальном термощейкере, 500 об./мин., после чего сыворотку удаляли, планшеты промывали 4 раза PBS с 0,05% Tween-20 и инкубировали с биотинилированными антителами: анти-IgG1 0,5 мкг/мл, анти-IgG2 1,25 мкг/мл, анти-IgG3 0,33 мкг/мл, анти-IgG4 2 мкг/мл, анти-IgM 0,5 нг/мл, анти-IgA 0,75 нг/мл, по 100 мкл в блокирующем растворе 1 час в тех же условиях. Затем антитела удаляли, планшеты промывали 4 раза, наносили по 100 мкл конъюгата полимерной формы пероксидазы хрена со стрептавидином Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies), 0,2 мкг/мл в блокирующем растворе, и инкубировали 30 минут при комнатной температуре с качением. После 4-кратной отмыжки связавшийся конъюгат проявляли при помощи хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина с перборатом натрия в цитратном буферном растворе (рН 5,2) в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливали добавлением 10%-ной серной кислоты и считывали значения оптической плотности при 450 нм.

Нормировка сигналов и статистическая обработка. Анализ каждого образца проводили в двух параллелях, полученные значения усредняли. Чтобы сравнивать сигналы, полученные в разных экспериментах и на разных планшетах, все сигналы нормировали на сигнал референсной сыворотки, представленной на каждом планшете, с пептидом $\beta 8$. Для изотипа IgG1 в качестве референсной использовали сыворотку крови здорового донора с добавлением 40 нг/мл рекомбинантных химерных (мышь/человек) антител подкласса IgG1, способных распознавать вторую внеклеточную петлю $\beta 1$ -AR [17]. Для остальных изотипов использовали сыворотку крови одного из пациентов, характеризующуюся достаточно высоким уровнем связывания антител всех изотипов с пептидом $\beta 8$, как продемонстрировано в таблице.

Рисунок 1. Распределение специфических сигналов в группах пациентов и здоровых добровольцев в виде «ящиков с усами». Средние значения обозначены крестиками, выбросы не показаны

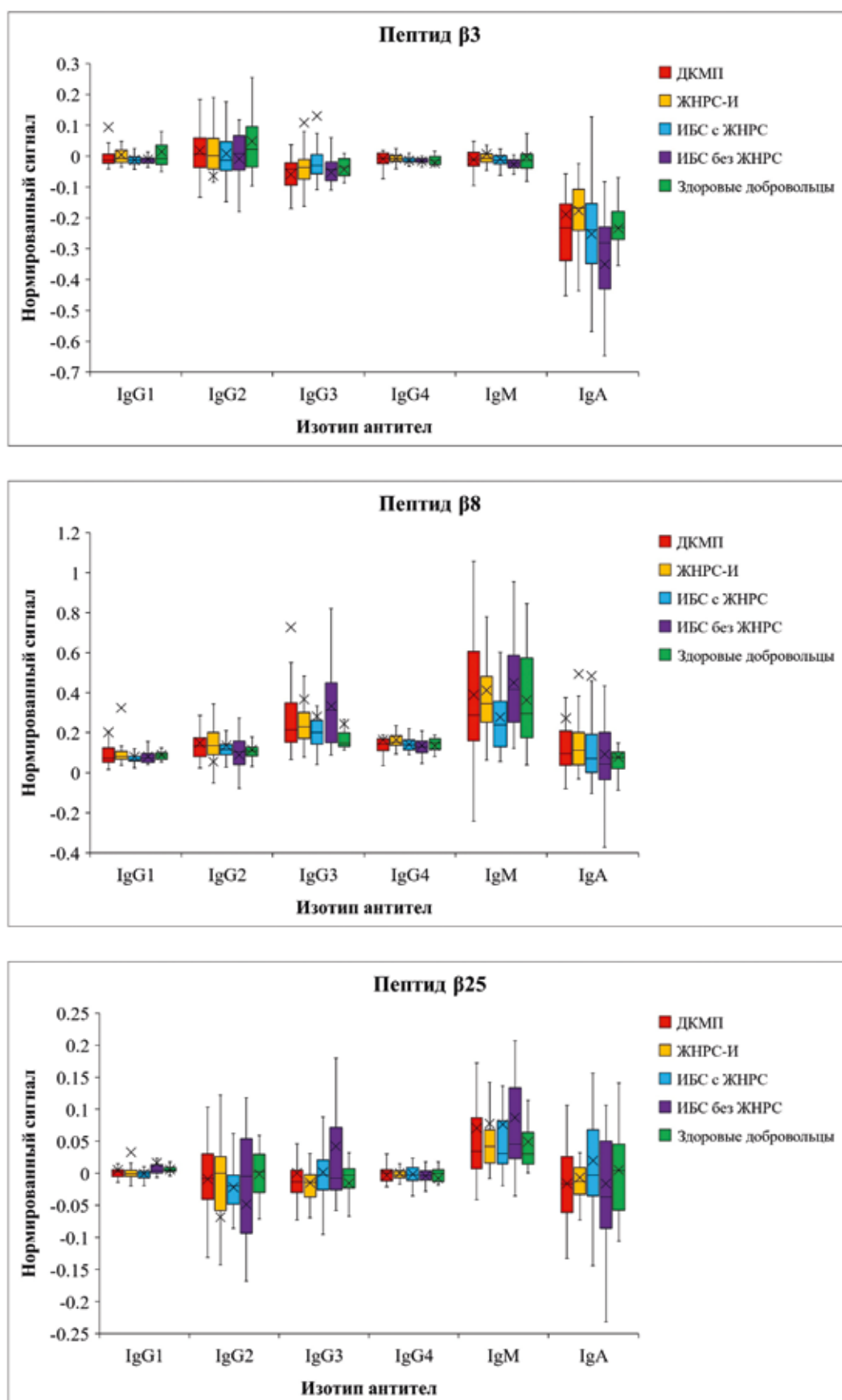


Таблица. 1. Типичный пример значений оптической плотности, полученных для референсных сывороток

Антиген	Изоотипы антител					
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA
Пептид $\beta 8$	1,228	0,345	0,633	0,258	2,044	0,581
Без пептида	0,132	0,116	0,361	0,068	0,387	0,434

Различия в распределениях нормированных сигналов между группами пациентов для каждого изоотипа антител оценивали при помощи U-критерия Манна — Уитни, а различия средних значений — при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

Содержание аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору определяли методом ИФА с использованием в качестве антигенов иммобилизованных на поверхности иммунологического планшета синтетических пептидов $\beta 3$ (фрагмент последовательности первой внеклеточной петли $\beta 1$ -адренорецептора), $\beta 8$ (последовательность второй внеклеточной петли) и $\beta 25$ (бициклический дисульфид, моделирующий пространственную структуру второй внеклеточной петли). Подклассы IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и классы IgM и IgA антител выявляли при помощи биотинилированных вторых антител, направленных к соответствующему изоотипу иммуноглобулинов человека.

Для проведения измерений использовали разведение сывороток 1:20, так как в предварительных экспериментах было показано, что начиная с этого уровня величина сигнала ИФА становится обратно пропорциональной разведению сыворотки. В процессе работы выяснилось, что некоторые сыворотки демонстрируют весьма высокий уровень фона, что, по-видимому, объясняется неспецифическим связыванием иммуноглобулинов сыворотки с поверхностью планшета. Поэтому сигналом специфического связывания антител с определенным пептидом мы считали разность между величиной оптической плотности, полученной при инкубации сыворотки с этим пептидом, и величиной фонового сигнала, полученного при проведении ИФА с той же сывороткой, но без пептида. Во многих случаях эти вычисления приводили к отрицательным значениям специфических сигналов. Мы интерпретировали такие результаты как отсутствие специфического связывания антител с данным пептидом при одновременном снижении уровня неспецифического связывания благодаря экранированию поверхности планшета адсорбированным пептидом.

На рис. 1 представлены распределения нормированных специфических сигналов в группах пациентов и здоровых добровольцев для каждого пептида и изоотипа антител. Как можно видеть, все медианы и большинство средних значений для пептида $\beta 3$ близки к нулю или отрицательны. Пептид $\beta 25$ демонстрирует слабые, но по-

ложительные сигналы лишь для антител класса IgM. Для пептида $\beta 8$, напротив, медианы и средние значения сигналов от всех анализируемых изоотипов положительны, что означает наличие в сыворотках пациентов антител, способных к специфической реакции с данным пептидом. Наиболее заметное отличие в распределении сигналов обнаружено между пациентами с ДКМП и здоровыми добровольцами для комбинации $\beta 8$ IgG3 ($p=0,014$). Однако ни для одной из четырех групп пациентов отличия ни по средним значениям, ни по распределениям сигналов как таковым в сравнении с контрольной группой здоровых добровольцев для любой комбинации «пептид — изоотип» не являются статистически значимыми.

Следует отметить, что распределения сигналов в пределах групп не носят характер гауссовых: некоторые сигналы превосходят средние значения на порядок и более. Поэтому важной характеристикой, потенциально имеющей диагностическую ценность, может служить доля сигналов, превышающих определенное пороговое значение. В качестве такого значения, выделяющего сигналы «выше нормы» для каждой комбинации «пептид — изоотип», была выбрана величина $(M + 2\sigma)$, где M — среднее значение соответствующего сигнала в группе здоровых добровольцев, σ — стандартное отклонение в этой же группе.

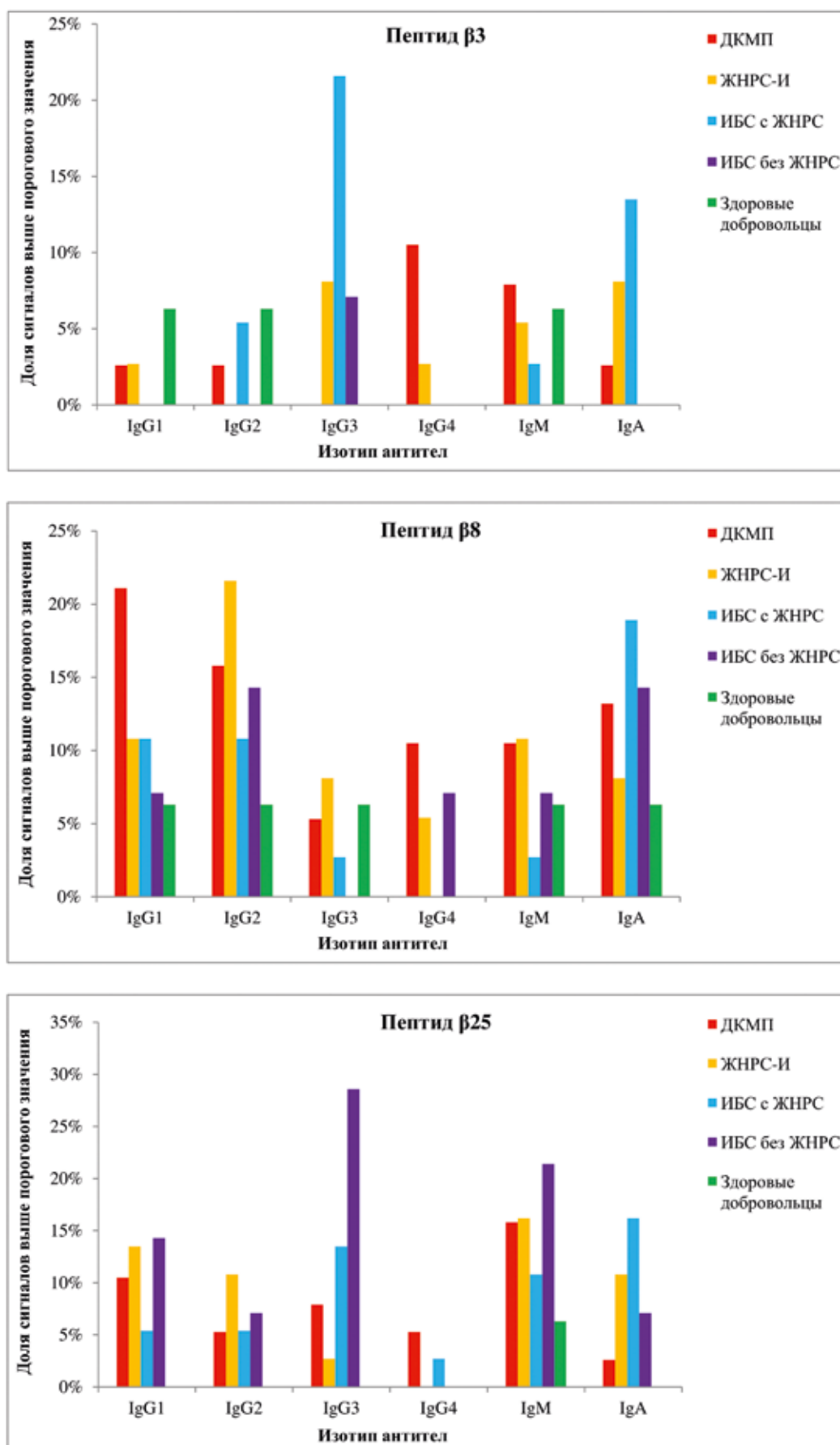
Можно видеть (рис. 2), что доля сигналов выше порогового уровня варьирует в диапазоне 5–20% достаточно случайным образом, не превосходя 30% ни в одной из групп пациентов. В частности, доля таких сигналов для пептида $\beta 8$ и изоотипа IgG1 составляет 21% в сравнении с 6% в группе здоровых добровольцев, а для остальных изоотипов — от 6 до 16%, причем наименьшее значение зафиксировано для изоотипа IgG3. Для пептида $\beta 25$ доля сигналов IgM в группе ДКМП составляет 10,5%, а в группе здоровых добровольцев — 6,2%.

Обсуждение

Задачей настоящего исследования было измерение содержания антител изоотипов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM и IgA, специфически реагирующих с синтетическими пептидами, соответствующими фрагментам первой и второй внеклеточных петель молекулы $\beta 1$ -адренорецептора. В идеале следовало бы ожидать, что хотя бы для одного изоотипа антител доля сигналов выше порогового уровня нормы в группе больных ДКМП окажется близкой к частоте встречаемости аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору, определенной посредством функциональных методов анализа (70–80%). Однако результаты проведенных экспериментов не подтвердили этого предположения: распределения сигналов в группах пациентов и здоровых добровольцев слабо отличаются друг от друга, а доля сигналов выше порогового значения ни для одной комбинации «пептид — изоотип» не превосходит 30%. В целом различия между исследованными группами соответствуют случайным статистическим флуктуациям, ожидаемым для использованных в работе размеров выборок.

Можно предположить, что в спектрах конформаций, принимаемых пептидами на поверхности планшета для

Рисунок 2. Доля сигналов каждой комбинации «пептид — изотип», превышающих пороговые значения, в группах пациентов



ИФА, доли конформаций, точно соответствующих пространственным структурам первой и второй внеклеточных петель молекулы $\beta 1$ -адренорецептора, достаточно малы или вообще отсутствуют. Поэтому человеческие антитела, реагирующие с пептидами, необязательно окажутся способны распознавать природный $\beta 1$ -адренорецептор. С другой стороны, весьма вероятно, что некоторая часть реальных аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору по этой же причине не будет обнаружена анализом.

Что касается нелинейного пептида $\beta 25$, дизайн которого имел целью наилучшим образом воспроизвести конформацию второй внеклеточной петли, то для этого пептида сигналы всех изотипов, кроме IgM, близки к нулю, а различий между долей IgM-сигналов выше порога в группе ДКМП по сравнению с группой здоровых добровольцев практически не наблюдается. К сожалению, данный пептид не оправдал возлагавшихся на него ожиданий.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bornholz B., Roggenbuck D., Jahns R., Boege F. Diagnostic and therapeutic aspects of $\beta 1$ -adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. *Autoimmun. Rev.* 2014; 13 (9): 954–962. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.08.021>
2. Nikolaev V., Boivin V., Störk S., Angermann C.E., Ertl G., Lohse M.J., Jahns R.A. Novel Fluorescence Method for the Rapid Detection of Functional $\beta 1$ -Adrenergic Receptor Autoantibodies in Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50 (5): 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.03.051>
3. Jane-wit D., Altuntas C., Johnson J., Yong S., Wickley P.J., Wang C., Popovic Z.B., Damson D.S., Perez D.M., Tuohy V.K. $\beta 1$ -Adrenergic Receptor Autoantibodies Mediate Dilated Cardiomyopathy by Agonistically Inducing Cardiomyocyte Apoptosis. *Circulation.* 2007; 116 (4): 399–410. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.683193>
4. Boivin-Jahns V., Jahns R., Boege F. Relevant effects of $\beta 1$ -adrenoceptor autoantibodies in chronic heart failure. *Frontiers in Bioscience.* 2018; 23 (11): 2146–2156. <https://doi.org/10.2741/4695>
5. Zuo L., Du Y., Ma J., Wang K., Zhao Y., Bai F., Wu B., Ma X., Liu H. Pro-arrhythmic action of autoantibodies against the second extracellular loop of $\beta 1$ -adrenoceptor and its underlying molecular mechanisms. *Int. J. Cardiol.* 2015; 198: 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.06.144>
6. Jahns R., Boivin V., Lohse M. Beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmunity as a cause of dilated cardiomyopathy in rats. *Int. J. Cardiol.* 2006; 112 (1): 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.05.008>
7. Wallukat G., Wollenberger A., Morwinski R., Pitschner H.F. Anti- $\beta 1$ -adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: Mapping of epitopes in the first and second extracellular loops. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1995; 27 (1): 397–406. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(08\)80036-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(08)80036-3)
8. Wenzel K., Schulze-Rothe S., Haberland A., Müller J., Wallukat G., Davideit H. Performance and in-house validation of a bioassay for the determination of $\beta 1$ -autoantibodies found in patients with cardiomyopathy. *Heliyon.* 2017; 3 (7): e00362. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00362>
9. Bornholz B., Hanzen B., Reinke Y., Felix S.B., Jahns R., Schimke I., Wallukat G., Boege F. Detection of DCM-associated $\beta 1$ -adrenergic receptor autoantibodies requires functional readouts or native human $\beta 1$ -receptors as targets. *Int. J. Cardiol.* 2016; 202: 728–730. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.10.068>
10. Matsui S., Fu M., Shimizu M., Fukuoka T., Teraoka K., Takekoshi N., Murakami E., Hjalmarson A. Dilated Cardiomyopathy Defines Serum Autoantibodies Against G-Protein-Coupled Cardiovascular Receptors. *Autoimmunity.* 1995; 21 (2): 85–88. <https://doi.org/10.3109/08916939508993354>
11. Iwata M., Yoshikawa T., Baba A., Anzai T., Mitamura H., Ogawa S. Autoantibodies against the second extracellular loop of $\beta 1$ -adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37 (2): 418–424. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(00\)01109-8](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(00)01109-8)
12. Chiale P.A., Rosenbaum M.B., Elizari M.V., Hjalmarson A., Magnusson Y., Wallukat G., Hoebeke J. 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): 864–869. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(95\)00262-2](https://doi.org/10.1016/0735-1097(95)00262-2)
13. Jahns R., Boege F. Questionable Validity of Peptide-Based ELISA Strategies in the Diagnostics of Cardiopathogenic Autoantibodies That Activate G-Protein-Coupled Receptors. *Cardiology.* 2015; 131 (3): 149–150. <https://doi.org/10.1159/000376546>
14. Wenzel K., Schulze-Rothe S., Müller J., Wallukat G., Haberland A. Difference between $\beta 1$ -adrenoceptor autoantibodies of human and animal origin – Limitations detecting $\beta 1$ -adrenoceptor autoantibodies using peptide based ELISA technology. *PLoS ONE.* 2018; 13 (2): e0192615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192615>
15. Jahns R., Boivin V., Siegmund C., Inselmann G., Lohse M., Boege F. Autoantibodies Activating Human $\beta 1$ -Adrenergic Receptors Are Associated With Reduced Cardiac Function in Chronic Heart Failure. *Circulation.* 1999; 99 (5): 649–654. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.5.649>
16. Bornholz B., Benninghaus T., Reinke Y., Felix S.B., Roggenbuck D., Jahns-Boivin V., Jahns R., Boege F. A standardised FACS assay based on native, receptor transfected cells for the clinical diagnosis and monitoring of $\beta 1$ -adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016; 54 (4): 683–691. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0603>
17. Шевелев А.А., Костюкевич М.В., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Миронова Н.А., Зыков К.А., Каширина Н.М., Кузнецова И.Б., Шарф Т.В., Мамочкина Е.Н., Липатова Л.Н., Пекло М.М., Руткевич П.Н., Янушевская Е.В., Рыбалкин И.Н., Стукалова О.В., Малкина Т.А., Беляева М.М., Кузнецова Т.В., Ткачев Г.А., Зинченко Л.В., Гупало Е.М., Агапова О.Ю., Юренева-Тхоржевская Т.В., Рвачева А.В., Сидорова М.В., Садгян А.С., Терещенко С.Н., Голицын С.П. Определение содержания аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору в сыворотке крови пациентов методом конкурентного иммуноферментного анализа на клетках. *Кардиология.* 2016; 56 (11): 61–70. [Shevelev A.Y., Kostyukovich M.V., Efremov E.E., Vlasik T.N., Mironova N.A., Zikov K.A., Kashirina N.M., Kuznetsova I.B., Sharf T.V., Mamochkina E.N., Lipatova L.N., Peklo M.M., Rutkevich P.N., Yanushevskaya E.V., Rybalkin I.N., Stukalova J.V., Malkina T.A., Belyarva M.M., Kuznetsova T.B., Tkachev G.A., Zinchenko L.V., Gupalo E.M., Agapova O.Y., Yureneva-Tkhorzhevskaya T.V., Rvacheva A.V., Sidorova M.V., Sadgjan A.S., Tereshchenko S.N., Golitsyn S.P. Detection of Autoantibodies Against the $\beta 1$ -Adrenergic Receptor in the Sera of Patients via the Competitive cell-Based Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Kardiologiya.* 2016; 56 (11): 61–70. (In Russ.)] <https://doi.org/10.18565/cardio.2016.11.61-70>
18. Trippel T.D., Mueller D.N., Obradovic D., Edelmann F., Tahirovic E., Wilck N., Riemekasten G., Dragun D., Busjahn A., Heidecke H., Junker J., Pieske B., Dungen H.D., Dechend R. Anti- $\beta 1$ -Adrenoreceptor auto-Antibodies in elderly heart failure patients. *Frontiers in Bioscience.* 2019; 24 (6): 1037–1049. <https://doi.org/10.2741/4766>

Закключение

Таким образом, наши эксперименты показали, что модификация метода, выразившаяся в раздельном измерении каждого изотипа антител, не привела на использованных в работе выборках пациентов к существенному увеличению информативности анализа.

Работа выполнена за счет собственных средств ООО «Мона» и при финансовой поддержке в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2014–2020 гг.»: Соглашение № 14.604.21.0068 от 27.06.2014, уникальный идентификатор RFMEFI60414X0068.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.12.2019

Принята в печать 29.12.2019

19. Staudt A., Böhm M., Knebel F., Grosse Y., Bischoff C., Hummel A., Dahm J.B., Borges A., Jochmann N., Wernecke K.D., Wallukat G., Baumann G., Felix S.B. Potential Role of Autoantibodies Belonging to the Immunoglobulin G-3 Subclass in Cardiac Dysfunction Among Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 2002; 106 (19): 2448–2453. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000036746.49449.64>
20. Nagatomo Y., Li D., Kirsop J., Borowski A., Thakur A., Tang W.H. Autoantibodies Specifically Against $\beta 1$ Adrenergic Receptors and Adverse Clinical Outcome in Patients With Chronic Systolic Heart Failure in the β -Blocker Era: The Importance of Immunoglobulin G3 Subclass. *J. Card. Fail.* 2016; 22 (6): 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2016.03.005>
21. Сидорова М.В., Палькеева М.Е., Азьмуко А.А., Овчинников М.В., Молокеедов А.С., Шарф Т.В., Ефремов Е.Е., Голицын С.П. Твердо-фазно-фрагментный способ синтеза пептидов из иммунодоминантной последовательности 1-адренорецептора *Биоорганическая химия*. 2017; 43 (4): 339–346. [Sidorova M.V., Palkeeva M.E., Az'muko A.A., Ovchinnikov M.V., Molokoedov A.S., Sharf T.V., Efremov E.E., Golitsyn S.P. Solid-Phase Fragment Condensation for Synthesis of Peptides from the Immunodominant Sequence of $\beta 1$ -Adrenoreceptor. *Bioorganicheskaya Khimiya*. 2017; 43 (4): 339–346. (In Russ.)] <https://doi.org/10.7868/s0132342317040133>
22. Бибилашвили Р.Ш., Сидорова М.В., Молокеедов А.С., Беспалова Ж.Д., Бочаров Э.В., Ефремов Е.Е., Шарф Т.В., Рогова М.М., Миронова Н.А., Зыков К.А., Голицын С.П. Новый конформационный пептидный антиген, моделирующий иммунодоминантный эпитоп 2-й внеклеточной петли $\beta 1$ -адренорецептора. Компьютерное моделирование, синтез, изучение пространственной структуры. *Биоорганическая химия*. 2013; 39 (6): 658–670. [Bibilashvili R.S., Sidorova M.V., Molokoedov A.S., Bepalova Z.D., Bocharov E.B., Efremov E.E., Sharf T.V., Rogova M.M., Mironova N.A., Zikov K.A., Golitsyn S.P. Novel conformational peptide antigen, which simulates an immunodominant epitope of the 2nd extracellular loop of $\beta 1$ -adrenoceptor. Computer simulation, synthesis, spatial structure. *Bioorganicheskaya Khimiya*. 2013; 39 (6): 658–670. (In Russ.)] <https://doi.org/10.7868/s0132342313060031>