

Аутоантитела к β 1-адренорецептору: патогенетическая роль, механизмы действия и методы определения

ПЕКЛО М.М., ЛИПАТОВА Л.Н., ГЕРАСИМОВА Е.И.

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

Резюме

Аутоантитела к β 1-адренорецептору (АДР β 1 АТ) часто обнаруживаются в сыворотке пациентов с хронической сердечной недостаточностью, обусловленной различными этиологическими факторами. АДР β 1 АТ выявляются также и у некоторых здоровых доноров, однако они отличаются по своим функциональным свойствам от антител крови больных. Патогенетическая роль АДР β 1 АТ была продемонстрирована в различных модельных экспериментах на животных. Рассмотрены предполагаемые патогенетические механизмы действия АДР β 1 АТ. Приводятся различные данные, свидетельствующие о предполагаемой особой роли аутоантител подкласса IgG3 в развитии сердечно-сосудистых патологий. В клинической практике наличие АДР β 1 АТ в крови больных играет прогностическую роль, а также может являться маркером желудочковых нарушений ритма сердца. Анализируются различные методы выявления АДР β 1 АТ: иммуноферментный анализ с использованием пептидов в качестве антигена, а также методы с использованием в качестве антигена нативной молекулы адренорецептора. Наиболее информационно значимыми являются функциональные методы определения АДР β 1 АТ, в которых исследуется их биологическая активность. Такими методами являются определение хронотропного эффекта антител на культурах кардиомиоцитов, а также детектирование подъема концентрации цАМФ на линиях клеток, экспрессирующих молекулу адренорецептора.

Ключевые слова: β 1-адренорецептор, аутоантитела, IgG3, сердечно-сосудистые заболевания.

Autoantibodies to β 1-adrenergic receptor: pathogenetic role, mechanisms of action and methods of determination

PECLO M.M., LIPATOVA L.N., GERASIMOVA E.I.

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

Summary

Autoantibodies to β 1-adrenergic receptor (β 1ADR Ab) are often found in the serum of patients with congestive heart failure due to various etiologic factors. β 1ADR Abs also occur in some healthy donors, however, such antibodies differ by their functional characteristics from those discovered in the blood of diseased subjects. Pathogenetic role of β 1ADR Abs has been demonstrated in various animal models. Presumed pathogenetic mechanisms of β 1ADR Ab action have been reviewed. Different evidences for putative specific role of IgG3 autoantibodies in the development of cardiovascular disorders are presented. In clinical practice, the presence of β 1ADR Abs in patients' blood has a prognostic value and can also be a marker of ventricular cardiac rhythm disturbances. Different methods of β 1ADR Abs detection have been reviewed, including enzyme-linked immunosorbent assay using peptides as antigens and methods utilizing a native molecule of adrenergic receptor as an antigen. The highest informative value have the functional methods of β 1ADR Abs detection, which are based on the evaluation of their biologic activity. These methods include the measuring of the chronotropic effect of antibodies in cultured cardiomyocytes and detection of increase in intracellular cAMP levels in cell lines expressing the molecules of adrenergic receptor.

Keywords: β 1-adrenoreceptor, autoantibodies, IgG3, cardiovascular diseases.

Сведения об авторах:

Пекло Михаил Михайлович [Mikhail M. Peclo] (автор, ответственный за переписку) — к. б. н., ст. научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: Peclo@yandex.ru +7 (917) 548-03-36, ORCID: 0000-0001-5485-4683

Липатова Людмила Николаевна [Liudmila N. Lipatova] — к. б. н., ст. научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: Liliudon3005@yandex.ru, ORCID: 0000-0003-0176-5147

Герасимова Екатерина Ивановна [Ekaterina I. Gerasimova] — аспирант лаборатории клеточной инженерии; e-mail: kaygerasimova@gmail.com, ORCID: 0000-0001-5529-0605

Введение

В настоящее время считается, что основную роль в регуляции сердечно-сосудистой системы играют адренорецепторы. Известны две группы адренорецепторов (α и β), различающиеся по локализации, опосредованным эффектам и родству к определенным веществам.

Все β -адренорецепторы, подразделенные на три подтипа, сопряжены с G-белком, имеют схожее строение и характеризуются двумя концевыми доменами (N и C), семью трансмембранными спиралями и наличием трех внеклеточных и трех внутриклеточных петель. Внеклеточные петли участвуют в процессе активации рецепторов и взаимодействии их с лигандом [1].

β_1 -адренорецепторы (АДРБ₁) встречаются преимущественно в сердце, сосудах, юктагломерулярном аппарате почек, цилиарном теле глаза. В сердце они играют важную роль в регуляции частоты и силы сокращения кардиомиоцитов, ускорении проведения импульсов по проводящей системе сердца. Их количество может изменяться при различных заболеваниях и уменьшается с возрастом [2].

Взаимодействие расположенных на клеточной мембране адренорецепторов с адреналином вызывает активацию аденилатциклазы и усиление синтеза циклического АМФ (цАМФ), что, в свою очередь, приводит к активации протеинкиназы А, затем фосфорилированию кальциевых каналов и усилению движения ионов кальция внутрь клетки, высвобождение их из саркоплазматического ретикулума. В итоге это и приводит к возрастанию частоты сердечных сокращений [3].

Одним из механизмов изменения функции адренорецепторов и развития различных заболеваний могут быть аутоиммунные изменения, приводящие к выработке аутоантител, в том числе к β_1 -адренорецепторам.

Аутоантитела к β_1 -адренорецептору при сердечно-сосудистой патологии. Антитела к β_1 -адренорецептору (АДРБ₁ АТ) часто обнаруживаются в сыворотке пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН), обусловленной различными этиологическими факторами. Так, АДРБ₁ АТ выявляются у больных болезнью Чагаса [4], дилатационной кардиомиопатией (ДКМП [5, 6]), ишемической кардиомиопатией [3], околородовой кардиомиопатией [7]. Эпитопы, наиболее часто узнаваемые этими антителами, расположены во второй внеклеточной петле АДРБ₁ [8, 9]. Помимо этого, антитела к первой петле также были описаны в случае ДКМП. Функциональная активность антител к первой и второй петле АДРБ₁ была показана в опытах *in vitro*, продемонстрировавших выраженный хронотропный эффект [9, 10].

Следует отметить, что АДРБ₁ АТ обнаруживаются и в крови здоровых доноров, хотя они выявляются

с меньшей частотой, чем при вышеуказанных заболеваниях [11]. Однако АДРБ₁ АТ от здоровых доноров отличаются от таких антител, выявляемых в крови больных, по своей функциональной активности. АДРБ₁ АТ от здоровых доноров оказались неспособны стимулировать подъем концентрации цАМФ в клетках НЕК293, экспрессирующих АДРБ₁, а также стимулировать сокращения эмбриональных кардиомиоцитов человека, что отличало их от антител, выделенных из крови больных ДКМП, обладавших вышеуказанными свойствами [12].

Было показано также, что агонистические (функционально активные, способные вызывать подъем концентрации цАМФ в клетках-мишенях) АДРБ₁ АТ в крови больных ДКМП и ИБС различаются тоже по своей активности. Антитела примерно половины больных были отнесены к «сильным активаторам»: они продемонстрировали примерно 50%-ную активность от активности сильных агонистов, таких как изопреналин. Антитела оставшейся половины больных были названы «слабыми активаторами», так как они обладали не более чем 30% активности по отношению к «сильным активаторам». Оказалось, что «сильные активаторы» связываются преимущественно со второй внеклеточной петлей АДРБ₁, в то время как «слабые активаторы» связываются с первой внеклеточной петлей рецептора [13].

Следует отметить, что в настоящее время определение АДРБ АТ не входит в перечень обязательных рутинных лабораторных исследований при вышеуказанных патологиях, так как до сих пор не создано удобных для повседневного применения методов определения АДРБ АТ.

Патогенетическое значение и механизм действия АДРБ₁ АТ. АДРБ₁ АТ играют существенную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), что было продемонстрировано в опытах на животных. Так, иммунизация кроликов пептидом, соответствующим последовательности аминокислот второй внеклеточной петли АДРБ₁, приводила к увеличению объема желудочков и истончению их стенки. Микроскопическое исследование выявило фокальный лизис мышечных волокон, утрату миофиламентов, разбухание митохондрий и их конденсацию, вакуолизацию саркоплазмы и отложение электронноплотных гранул в саркоплазме [14]. Таким образом, были воспроизведены нарушения, наблюдающиеся при ДКМП у человека. Признаки кардиомиопатии наблюдались также в аналогичных опытах, проведенных над крысами [15, 16]. Расширение левого желудочка и его дисфункция наблюдались у крыс, которым вводили сыворотки от животных той же линии, иммунизированных пептидом, соответствующим последовательности аминокислот второй внеклеточной петли АДРБ₁ [15].

Аутоиммунную кардиомиопатию удалось перенести от кроликов мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (severe combined

immunodeficiency, SCID) путем инъекций IgG или лимфоцитов, выделенных из крови кроликов [17]. Кардиомиопатию удалось индуцировать также у SCID мышей, которым вводили лимфоциты больных ДКМП людей [18].

Долгое время главным патогенетическим механизмом действия АДРБ1 АТ считались десенси- тизация и последующее подавление рецептора. Однако накопленные к настоящему моменту данные относительно этого механизма противоречивы [19]. Альтернативным механизмом является прямое цитотоксическое действие антител на кардиомиоциты. Так, активная иммунизация АДРБ1-белком слияния либо пассивная иммунизация моноклональными антителами к АДРБ1 сопровождается апоптозом кардиомиоцитов и стрессовой реакцией эндоплазматического ретикулума [20, 21, 22]. Существуют также данные о том, что АДРБ1 АТ от больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) индуцировали апоптоз в изолированных кардиомиоцитах взрослых крыс [23].

Но не только кардиомиоциты являются мишенями для воздействия АДРБ1 АТ. Так, было показано, что кондиционированная среда от культивируемых фибробластов, обработанных моноклональными АДРБ1 АТ, индуцировала апоптоз кардиомиоцитов. Таким образом, АДРБ1 АТ могут обладать непрямым действием на кардиомиоциты, обусловленным изменением продукции цитокинов фибробластами [24].

Патогенетическая роль аутоантител подкласса IgG3. Существует мнение, что среди различных подклассов IgG антитела изотипа IgG3 обладают более выраженным провоспалительным действием и играют важную роль в развитии сердечных патологий [25]. На это указывает способность данных антител связывать более широкий спектр Fc-рецепторов и активировать систему комплемента [26]. По мнению авторов, это обуславливает стимуляцию выработки цитокинов, усиление трансляции внутриклеточного сигнала и дегрануляции воспалительных клеток, что вызывает развитие патологических процессов в миокарде.

Описаны также методики определения локализации накоплений IgG в миокарде, а также их потенциальное связывание с фактором комплемента C3c путем иммунофлуоресцентного окрашивания срезов миокарда на IgG1, IgG3 и C3c [27]. Было выявлено обильное накопление иммуноглобулинов подкласса IgG3 и фактора комплемента C3c у пациентов с ИБС и ДКМП.

В том же исследовании было обнаружено увеличение уровня иммуноглобулинов подкласса IgG1 и IgG3 у пациентов, находящихся в терминальной стадии сердечной недостаточности. Однако следует отметить, что авторы не идентифицировали антигены, распознаваемые данными антителами.

В ходе мультицентрового исследования IMAC-2 (Intervention in Myocarditis and Acute Cardiomyopathy)

Nagatomo с соавторами продемонстрировали, что у IgG3-позитивных пациентов с недавно возникшими ДКМП и миокардитом (фракция выброса левого желудочка [LVEF] $\leq 0,40$; < 6 месяцев) выявлены более благоприятные исходы восстановления сердечной деятельности, несмотря на то что АДРБ1 АТ подкласса IgG3, по мнению авторов, активно участвуют в патогенезе данных видов заболеваний [28]. Тем не менее только у 34% пациентов исследуемой группы (из 353 человек) были обнаружены АДРБ1 АТ, и у 18% пациентов из них были выявлены АДРБ1 АТ подкласса IgG3. Наличие данных аутоантител определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием синтетического пептида, соответствующего предполагаемой последовательности аминокислот во второй внеклеточной петле АДРБ1. Использование данного метода подверглось критике некоторыми авторами (см. далее), так же как и использование в качестве объекта исследования второй петли внеклеточного рецептора, без обнаружения аутоантител к первой внеклеточной петле АДРБ1, которые были, по мнению авторов, также функционально активными [29].

Некоторые данные по выяснению роли АДРБ1 АТ подкласса IgG3 в развитии сердечной патологии были получены в результате иммуноадсорбции АДРБ1 АТ у пациентов с ДКМП [25]. Авторы связывают улучшение гемодинамики у данной группы пациентов с сорбцией преимущественно АДРБ1 АТ подкласса IgG3, что впоследствии улучшило функцию и ингибировало воспаление миокарда, наблюдаемое при данной патологии. Это позволяет сделать выводы о значительной роли АДРБ1 АТ подкласса IgG3 в сердечной дисфункции при ДКМП.

Необходимо тем не менее отметить, что вопрос об особой роли аутоантител подкласса IgG3 при различных ССЗ остается открытым и его решение требует дальнейших исследований.

Клиническое значение АДРБ1 АТ. В клинической практике присутствие в крови больных АДРБ1 АТ является существенным прогностическим показателем. Так, было показано, что их наличие связано с существенным ухудшением функции левого желудочка при ДКМП [6]. Стимулирующие АДРБ1 АТ были ассоциированы с повышенной смертностью больных ДКМП и ишемической кардиомиопатией [30], а также с более выраженной желудочковой аритмией при болезни Чагаса и ДКМП [23]. Антитела к АДРБ1 имеют также предсказательное значение в отношении внезапной сердечной смерти при ДКМП и ХСН [32, 33]. В работе [34] была показана тесная связь обнаружения АДРБ1 АТ с наличием желудочковых нарушений ритма сердца у больных ДКМП, что позволяет использовать АДРБ1 АТ в качестве дополнительного маркера таких нарушений.

Патогенетическая роль АДРБ1 АТ делает их потенциальной терапевтической мишенью. Как было продемонстрировано в работах [35, 36, 37], иммуно-

адсорбция таких антител приводит к терапевтическому эффекту, равно как и нейтрализация антител с помощью пептидных аналогов второй внеклеточной петли АДРБ1 [38].

Из сказанного выше можно заключить, что определение в крови больных АДРБ1 АТ является насущной потребностью клинической практики.

Методы определения АДРБ1 АТ. До недавнего времени наиболее распространенным методом определения антител-агонистов АДРБ1 являлся ИФА с использованием в качестве антигена пептидов, соответствующих второй внеклеточной петле адренорецептора [6, 32, 34, 39]. Однако, как показало сравнение пептидных ИФА с функциональными методами определения антител и методами, в которых в качестве антигена выступает нативная молекула рецептора, пептидные ИФА выявляют на порядок меньше антиген-позитивных случаев [40, 41, 42]. Это может быть обусловлено тем, что АДРБ1 АТ узнают лабильный конформационно-зависимый эпитоп, присутствующий на нативных молекулах рецептора [39]. Только незначительная часть линейных молекул пептида, чья конформация определяется стохастически, способна воссоздавать такой эпитоп. В работе [40] было показано, что содержание АДРБ1 АТ в крови больных очень мало. Таким образом, можно предположить, что пептидному ИФА не хватает чувствительности, чтобы достоверно определить АДРБ1 АТ в большей части образцов сыворотки крови у больных. Тем не менее существуют коммерческие пептидные наборы для постановки ИФА (CUSABIO, Wuhan, PR China).

Методы, в которых в качестве антигена выступает целая нативная молекула АДРБ1, являются более достоверными. В работе [6] для выявления АДРБ1 АТ использовали не прямое иммунофлуоресцентное окрашивание клеток насекомых Sf9, транзитно трансдуцированных бакуловирусной конструкцией с геном АДРБ1. Воеге с соавторами для выявления антител использовали линию клеток HT1080, трансфицированную конструкцией, содержащей АДРБ1. Клетки окрашивали методом непрямой иммунофлуоресценции и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра [44]. Метод был валидирован в соответствии с требованиями GLP (Good Laboratory Practice).

Holthoff с соавторами предложили конкурентный ИФА-метод определения уровня АДРБ1 АТ [45]. В качестве антигена выступала молекула АДРБ1, экспрессирующаяся на поверхности клеток Sf9, транзитно трансдуцированных бакуловирусом, несущим данную молекулу. Мышинные моноклональные антитела, узнающие эпитоп АДРБ1, конкурировали с АДРБ1 АТ сыворотки пациентов. На следующем этапе добавляли антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой, после чего реакцию визуализировали с помощью субстратного раствора с тетраметилбензидином. Данный метод был мо-

дифицирован и улучшен в нашей лаборатории [42]. Вместо транзитно трансдуцированных клеток насекомых мы использовали полученную ранее линию клеток ADL-7, стабильно экспрессирующую рекомбинантный АДРБ1 человека [46]. Помимо этого, был изменен протокол постановки анализа, что повысило чувствительность теста.

Описаны также методики определения АДРБ1 АТ с использованием изолированных молекул АДРБ1 в качестве антигена. В работе [47] сообщается о разработке стеклянного чипа, покрытого наночастицами золота, который позволяет одновременно определять антитела к десяти различным антигенам, значимым для сердечно-сосудистых патологий. В качестве одного из этих антигенов выступала рекомбинантная молекула АДРБ1.

Существует также коммерчески доступный ИФА-диагностикум для определения АДРБ1 АТ, в котором антигеном является молекула АДРБ1, изолированная из трансфицированных клеток линии CHO (CellTrend GmbH, Luckenwalde, Germany). Данный диагностикум был успешно использован в работе [48]. Тем не менее отмечается, что чувствительность и специфичность этого теста остаются еще до конца неисследованными.

Наиболее информационно значимыми являются функциональные методы определения АДРБ1 АТ, в которых исследуется биологическая активность антител. Золотым стандартом таких методов считается изучение хронотропного эффекта АДРБ1 АТ на культурах сокращающихся кардиомиоцитов. Wallukat и Wollenberger впервые предложили этот метод в 1987 году [49]. Мишенями для изучения хронотропного эффекта являются первичные культуры кардиомиоцитов, выделенных из желудочков сердца новорожденных крысят. Хотя данный метод неоднократно успешно применялся в научных исследованиях, использование его в рутинной клинической лабораторной практике представляется проблематичным. Тем не менее Wenzel с соавторами недавно провели валидацию данного метода [50] в соответствии с американскими [51] и европейскими [52] документами, регламентирующими биоаналитические исследования.

Этот метод был недавно трансформирован в полностью автоматизированный высокопроизводительный метод с использованием кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека [53]. Результаты, полученные с использованием данного метода, были аналогичны результатам при постановке классическим методом на кардиомиоцитах крысят, за единственным исключением: в случае использования антител к N-терминальному участку молекулы АДРБ1 на кардиомиоцитах, полученных из иПСК, наблюдали хронотропный эффект, чего не отмечалось при применении классического метода. Авторы объясняют этот результат видовыми отличиями клеток-мишеней.

Существуют также менее распространенные методы определения активности АДРБ1 АТ, в которых исследуется сократимость артериол кремастера крысы [54] либо изолированных предсердий крысы [55].

Другим способом обнаружения функциональной активности АДРБ1 АТ является изучение подъема концентрации цАМФ в клетках после обработки их соответствующими антителами. При этом могут быть использованы коммерческие наборы для определения концентрации цАМФ [6, 54].

Nikolaev с соавторами предложили оригинальный метод оценки изменения концентрации цАМФ с использованием разработанного ими сенсора и определения излучения этого сенсора методом флуоресцентного резонансного переноса энергии (fluorescence resonance energy transfer, FRET [13]). В качестве мишеней использовали клетки HEK293, стабильно экспрессирующие молекулу АДРБ1 и транзитно трансфицированные конструкцией, содержащей сенсор. Данный метод является быстрым и высокочувствительным, однако его использование требует наличия сложной аппаратуры, не встречающейся в клинических лабораториях. Следует отметить, что после первой публикации в 2007 году [13] в литературе больше не имеется сообщений о применении данного метода.

В нашей лаборатории была создана репортерная плазмида pC6BGSW-GL3, содержащая ген люциферазы под цАМФ-зависимым промотором (дизайн такой конструкции был описан в работе [56]). Использование этой плазмиды позволяет де-

тектировать подъем концентрации цАМФ в клетках-мишенях. С помощью трансфекции плазмидой pC6BGSW-GL3 линии клеток ADL-7, стабильно экспрессирующих АДРБ1, была получена линия клеток BG-22, стабильно экспрессирующая люциферазную конструкцию. Добавление к этим клеткам агониста АДРБ1 изопротеренола приводило к подъему концентрации цАМФ, определяемому по измерению люминесценции субстрата люциферазы в лизатах клеток [46]. Данная линия клеток может быть использована в дальнейшем для определения функциональной активности АДРБ1 АТ в крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Заключение

АДРБ1 АТ играют важную роль в развитии различных сердечно-сосудистых заболеваний. С учетом этого с клинической точки зрения определение уровня АДРБ1 АТ в развитии сердечно-сосудистых заболеваний может быть оправдано в дополнение к стандартным лабораторным методам диагностики. Несмотря на многообразие подходов, изложенных выше, необходима разработка надежного, валидированного надлежащим образом метода выявления АДРБ1 АТ, удобного для применения в повседневной лабораторной работе, что также позволило бы его апробацию в клинической практике.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Strosberg AD. Structure, function and regulation of the three β -adrenergic receptors. *Obesity Res* 1995; 3, Suppl. 4: 501–505. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1995.tb00219.x>
2. Kostyukovich MV, Zykov KA, Mironova NA, Agapova OY, Shevelev AY, Efremov EE, Vlasik TN, Golitsyn SP. Role of autoantibodies against β_1 -adrenergic receptor in cardiovascular disease. *Kardiologiya* 2016; 12: 5–11 (Костюкович М.В., Зыков К.А., Миронова Н.А., Агапова О.Ю., Шевелев А.Я., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Голицын С.П. Роль аутоантител к β_1 -адренорецептору при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Кардиология*, 2016; 12: 5–11).
3. Tobin AB. G-protein-coupled receptor structure: What can we learn? *Biol Rep* 2009; 1: 11–19. <https://doi.org/10.3410/B1-11>
4. Sterin-Borda L, Cossio PM, Gimeno MF, Gimeno AL, Diez C, Laguens RP et al. Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and function aspects. *Cardiovasc Res* 1976; 10: 613–622. <https://doi.org/10.1093/cvr/10.6.613>
5. Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 1994; 89: 2760–2767. <https://doi.org/10.1161/01.cir.89.6.2760>
6. Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Inselmann G, Lohse MJ, Boege F. Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation* 1999; 99: 649–654. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.5.649>
7. Forster O.A.E.M. Peripartum cardiomyopathy- an autoimmune disease. Thesis Johannesburg: Faculty of Health Sciences. University Witwatersrand; 2007. <http://wiredspace.wits.ac.za/bitstream/handle/10539/5011/PhD%20Thesis%20final.pdf?sequence=1>
8. Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, Waagstein F, Andersson B, Vahlne A et al. Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1990; 86: 1658–1663. <https://doi.org/10.1172/JCI114888>
9. Wallukat G, Wollenberger A, Morwinski R, Pitschner HF. Anti-beta1-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: 397–406. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(08\)80036-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(08)80036-3)
10. Wallukat G, Nissen E, Morwinski R, Muller J. Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy. *Herz* 2000; 25: 261–6. <https://doi.org/10.1007/s000590050017>
11. Becker NP, Muller J, Gottel P, Wallukat G, Schimke I. Cardiomyopathy- An approach to the autoimmune background. *Autoimmunity Reviews*, 2017; 16: 269–286. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.01.012>
12. Bornholz B, Weidtkamp-Peters S, Schmitmeier S, Seidel C A.M., Herda LR, Felix SB, Lemoine H, Hescheler J, Nguemo F, Schäfer C, Christensen MO, Mielke C, Boege F. Impact of human autoantibodies on β_1 -adrenergic receptor conformation, activity, and internalization. *Cardiovasc Res*, 2013; 97(3): 472–480. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs350>
13. Nikolaev VO, Boivin V, Störk S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ, Jahns R. A Novel Fluorescence Method for the Rapid Detection of Functional β_1 -Adrenergic Receptor Autoantibodies in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*, 2007; 50: 423–31. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.03.051>
14. Matsui S, Fu ML, Katsuda S et al. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J Mol Cell Cardiol*, 1997; 29: 641–55. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0307>
15. Jahns R, Boivin V, Hein L et al. Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2004; 113: 1419–29. <https://doi.org/10.1172/JCI20149>
16. Buval L, Bollano E, Chen J, Shultze W, Fu M. Phenotype of early cardiomyopathic changes induced by active immunization of rats with a

- synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of the human β 1-adrenergic receptor. *Clin Exp Immunol.* 2006 Feb; 143 (2): 209–215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02986.x>
17. Matsui S, Fu M, Hayase M, Katsuda S, Yamaguchi N, Teraoka K. Transfer of immune components from rabbit autoimmune cardiomyopathy into severe combined immunodeficiency (SCID) mice induces cardiomyopathic changes. *Autoimmunity*, 2006 (2); 39: 121–128. <https://doi.org/10.1080/08916930500314855>
18. Omerovic E, Bollano E, Andersson B et al. Induction of cardiomyopathy in severe combined immunodeficiency mice by transfer of lymphocytes from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2000; 32: 271–80. <https://doi.org/10.3109/08916930008994101>
19. Boivin-Jahns V, Jahns R, Boege F. Relevant effects of beta1-adrenoceptor autoantibodies in chronic heart failure. *Front Biosci*, 2018; 23: 2146–2156.
20. Liu J, Mao W, Iwai C, Fukuoka S, Vulapalli R, Huang H, Wang T, Sharma VK, Sheu SS, Fu M, and Liang CS. Adoptive passive transfer of rabbit beta-1 adrenoceptor peptide immune cardiomyopathy into the Rag2^{-/-} mouse: participation of the ER stress. *J Mol Cell Cardiol*, 2008; 44 (2): 304–314. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2007.11.007>
21. Jane-wit D, Altuntaz CZ, Johnson JM, Yong S, Wickley PJ, Clark P, Wang Q, Popovic ZB, Penn MS, Damron DS, Perez DM, and Tuohy VK. 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>
22. Jahns R, Boivin V, Schwarzbach V, Erti G and Lohse MJ. Pathological autoantibodies in cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2008; 41(6): 454–461. <https://doi.org/10.1080/08916930802031603>
23. Staudt Y, Mobini R, Fu M, Felix SB, Kuhn JP, and Staudt A. Beta (1)-adrenoceptor antibodies induce apoptosis in adult isolated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2003; 466(1–2): 1–6. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01431-6](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01431-6)
24. Lv T, Du Y, Cao N, Zhang S, Gong Y, Bai Y, Wang W. and Liu H. Proliferation in cardiac fibroblasts induced by beta1-adrenoceptor autoantibody and the underlying mechanisms. *Sci Rep* 2016; 6: 32430. <https://doi.org/10.1038/srep32430>
25. Staudt A, Bohm M, Knebel F, Grosse Y, Bischoff C, Hummel A, Dahm JB, Borges A, Jochmann N, Wernecke KD, Wallukat G, Baumann G, Felix SB. Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2002; 106: 2448–53. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000036746.49449.64>
26. Patel J.K. The β 1-adrenergic receptor IgG subclass 3 autoantibody in dilated cardiomyopathy: friend or foe? *J Am Coll Cardiol*, 2017; 69: 978–980. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.01.008>
27. Van den Hoogen P, de Jager SCA, Huibers MMH, Schoneveld AH, Puspitasari YM, Valstar GB, Oerlemans MIFJ, de Weger RA, Doevendans PA, den Ruijter HM, Laman JD, Vink A, Sluijter JPG.J. Increased circulating IgG levels, myocardial immune cells and IgG deposits support a role for an immune response in pre- and end-stage heart failure. *Cell Mol Med*. 2019; 26. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcmm.14619>
28. Nagatomo Y, McNamara DM, Alexis JD, Cooper LT, Dec GW, Pauly DF, Sheppard R, Starling RC, Tang WH; IMAC-2 Investigators. Myocardial recovery in patients with systolic heart failure and autoantibodies against β 1-adrenergic receptors. *J Am Coll Cardiol* 2017; 69: 968–977. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.067>
29. Müller J, Wallukat G, Schimke I. Autoantibodies Directed Against the β 1-Adrenergic Receptor in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70(6): 808–809. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.068>
30. Störk S, Boivin V, Horf R, Hein L, Lohse MJ, Angermann CE, Jahns R. Stimulating autoantibodies directed against the cardiac β 1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2006; 152: 697–704. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2006.05.004>
31. Chiale PA, Ferrari I, Mahler E, Vallazza MA, Elizari MV, Rosenbaum MB, et al. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 2001; 103: 1765–71. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.13.1765>
32. 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: 418–24. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(00\)01109-8](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(00)01109-8)
33. Pei J, Li N, Chen J, Li X, Zhang Y, Wang Z, et al. The predictive values of beta1-adrenergic and M2 muscarinic receptor autoantibodies for sudden cardiac death in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012; 14: 887–94. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfs082>
34. Гупало Е.М., Стукалова О.В., Рогова М.М., Миронова Н.А., Малкина Т.А., Шарф Т.В., Ефремов Е.Е., Герасимова В.В., Бакалов С.А., Терновой С.К., Голицын С.П. Взаимосвязь очагового фиброза миокарда по данным магнитно-резонансной томографии, аутоантител к рецепторам кардиомиоцитов и желудочковых нарушений ритма у больных дилатационной кардиомиопатией. *Кардиология* 2014 (12): 29–36 [Gupalo EM, Stukalova OV, Rogova MM, Vironova NA, Malkina TA, Sharf TV, Efremov EE, Gerasimova VV, Bakalov SA, Ternovoy SR, Golitsyn SP. Relationship of focal Fibrosis according to magnetic resonancetomography, autoantibodies to cardiac membrane receptors and ventricular arrhythmias in patients with dilated cardiomyopathy. *Kardiologiya* 2014(12): 29–36. (InRuss)]
35. Felix SB, Staudt A, Landsberger M, Grosse Y, Stangl V, Spielhagen T, et al. Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoabsorption. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 646–52. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01794-6](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01794-6)
36. Ronspeck W, Brinckmann R, Egner R, Gebauer F, Winkler D, Jekow P, et al. Peptide based adsorbers for therapeutic immunoabsorption. *Ther Apher Dial* 2003; 7: 91–7. <https://doi.org/10.1046/j.1526-0968.2003.00017.x>
37. Wallukat G, Muller J, Hetzer R. Specific removal of beta1-adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2002; 347: 1806. <https://doi.org/10.1056/NEJM200211283472220>
38. Munch G, Boivin-Jahns V, Holthoff HP, Adler K, Lappo M, Truol S, et al. Administration of the cyclic peptide COR-1 in humans (phase I study): ex vivo measurements of anti-beta1-adrenergic receptor antibody neutralization and of immune parameters. *Eur J Heart Fail* 2012; 11: 1230–9. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfs118>
39. Matsui S., Fu M.L., 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: 85–88. <https://doi.org/10.3109/08916939508993354>
40. Wenzel K, Schulze-Rothe S, Muller J, Wallukat G, Haberland A. Difference between beta1-adrenoceptor autoantibodies of human and animal origin—Limitations detecting beta1-adrenoceptor autoantibodies using peptide based ELISA technology. *Plos One* 2018; 9: 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192615>
41. Bornholz B, Hanzen B, Reinke Y, Felix SB, Jahns R, Schimke I, Wallukat G, Boege F. Detection of DCM-associated β 1-adrenergic receptor autoantibodies requires functional readouts or native human β 1-receptors as targets. *Int J Cardiol* 2016; 202: 728–730. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.10.068>

42. Шевелев А.Я., Костюкевич М.В., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Миронова Н.А., Зыков К.А., Каширина Н.М., Кузнецова И.В., 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., Фгапова О.Я., Юреньева-Тхоржевская Т.В., Рвачева А.В., Сидорова М.В., Садгян А.С., Терешенко С.Н., Голицын С.П. Определение содержания аутоантител к $\beta 1$ -адренорецептору в сыворотке крови пациентов методом конкурентного иммуноферментного анализа на клетках. Кардиология, 2016; 11: 61–70. [Shevelev AY, Kostyukovich MV, Efremov EE, Vlasik TN, Mironova NA, Zykov KA, Kashirina NM, Kuznetsova IB, Sharf TV, Mamochkina EN, Lipatova LN, Peklo MM, Rutkevich PN, Yanushevskaya EV, Ribalkin IN, Stukalova OV, Malkina TA, Belyaeva MM, Kuznetsova TV, Tkachev GA, Zinchenko LV, Gupalo EM, Agapova OY, Yureneva-Thkorzevskaya TV, Rvacheva AV, Sidorova MV, Sadgjan AS, Tereshchenko SN, Golitsyn SP. 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; 11: 61–70. (InRuss)]. <https://doi.org/10.18565/cardio.2016.11.61-70>
43. Bornholz B, Roggenbuck D, Jahns R, Boege F. Diagnostic and therapeutic aspects of $\beta 1$ -adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. Autoim Rev 2014; 13: 954–962. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.08.021>
44. Bornholz B, Benninghaus T, Reinke Y, Felix SB, 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 Apr; 54(4): 683–91. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0603>
45. Holthoff HP, Zeibig S, Jahns-Boivin V, Bauer J, Lohse MJ, Kaßab S, Clauss S, Jahns R, Schlipp A, Münch G, Ungerer M. Detection of Anti- $\beta 1$ -AR Autoantibodies in Heart Failure by a Cell-Based Competition ELISA. Circ Res. 2012; 111: 675–684. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.272682>
46. Шевелев А.Я., Каширина Н.М., Кузнецова И.В., Шарф Т.В., Мамочкина Е.Н., Агапова О.Ю., Гурская Т.Х., Липатова Л.Н., Пекло М.М., Руткевич П.Н., Янушевская Е.В., Рыбалкин И.Н., Скоблов Ю.С., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Зыков К.А. Линия клеток с экспрессией рекомбинантного $\beta 1$ -адренорецептора для определения уровня аутоантител-агонистов методом конкурентного иммуноферментного анализа. Вестник Биотехнологии, 2015; 11(4): 5–14. [Shevelev AY, Kashirina NM, Kuznetsova TB, Sharf TV, Mamochkina EN, Agapova OY, Gurskaya TK, Lipatova LN, Peklo MM, Rutkevich PN, Yanushevskaya EV, Rybalkin IN, Skoblov YS, Efremov EE, Vlasik TN, Zykov KA. Cell line expressing recombinant $\beta 1$ -adrenergic receptor for the agonistic autoantibodies detection by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Vestnik Biotechnol, 2015; 11(4): 5–14. (InRuss)]
47. Xiaoyang L, Kuznetsova T, Cauwenberghs N, Wheeler M, Maecker H, Wu JC, Haddad and Dai H. Autoantibody profiling on a plasmonic nano-gold chip for the early detection of hypertensive heart disease. PNAS 2017; 114(27): 7089–7094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621457114>
48. Trippel TD, Mueller DN, Obradovic D, Edelmann F, Tahirovic E, Wilck N, Riemekasten G, Dragun D, Busjahn A, Heidecke H, Junker J, Pieske B, Dungen HD, Dechend R. Anti- $\beta 1$ -Adrenoreceptor auto-Antibodies in elderly heart failure patients. Front Biosci (Landmark Ed). 2019 Mar 1; 24: 1037–1049.
49. Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. Biomed. Biochim. Acta. 1987; 46: S634–S639.
50. 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 beta1-autoantibodies found in patients with cardiomyopathy. Heliyon. 2017 Jul 31; 3(7): e00362. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00362>
51. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf> (accessed May 19, 2016)
52. Guideline Bioanalytical method validation-[12TD\$DIF] WC500109686.pdf, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.2**, February 2012. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (accessed September 2, 2016)
53. Joshi-Barr S, Haberland A, Bartel S, Müller J, Choi T, Wallukat G. High throughput bioassay for beta1-adrenoceptor autoantibody detection. Int. J. Cardiol. 2016; 219: 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.002>
54. Li H, Yu X, Liles C, Khan M, Vanderlinde-Wood M, Galloway A, Zillner C, Benbrook A, Reim S, Collier D, Hill MA, Raj SR, Okamoto LE, Cunningham MW, Aston CE, Kem DC. Autoimmune basis for postural tachycardia syndrome, J Am Heart Assoc 2014; 3: e000755. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000755>
55. Sterin-Borda L, Cossio PM, Gimeno MF, Gimeno AL, Diez C, Laguens RP, Meckert PC, Arana RM. Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and function aspects, Cardiovasc Res 1976; 10: 613–622. <https://doi.org/10.1093/cvr/10.6.613>
56. Himmler A, Stratowa C, and Czernilofsky AP. Functional testing of human dopamine D1 and D5 receptors expressed in stable cAMP responsive luciferase reporter cell lines. J Receptor Res 1993; 13(1-4): 79–94. <https://doi.org/10.3109/10799899309073647>