

Структурно-функциональное изучение тропомиозина миокарда как аутоантигена при дилатационной кардиомиопатии

Л. Л. Сидорик, О. М. Федоркова, Т. В. Ковеня, В. И. Бобык,
Н. В. Роднин, Г. Х. Мацука

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Тропомиозин из нормального и пораженного дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) миокарда человека получен в гомогенном состоянии методами высаливания и последовательной экстракции органическими и неорганическими растворителями. Для контрольных экспериментов получен тропомиозин скелетных мышц по аналогичной методике. Молекулярная масса препаратов тропомиозина, выделенного как из нормального, так и патологического миокардов, была идентичной. При иммуноскрининге методом ELISA в сыворотках пациентов с ДКМП аутоантитела к тропомиозину миокарда с низкой иммунореактивностью были обнаружены в небольшом проценте сывороток, аутоиммунная реакция против тропомиозина скелетных мышц отсутствовала. Иммуноблоттинг обоих препаратов миокардиальных тропомиозинов с наиболее иммунореактивными сыворотками пациентов с ДКМП показал, что эти антитела взаимодействуют, в основном, с детерминантами конформационного типа. Таким образом установлено, что в отличие от исследованных ранее кардиоспецифических антигенов актина и миозина тропомиозин не претерпевает существенных структурных изменений при развитии ДКМП, способных приводить к изменению его иммуногенности.

Введение. Изучение молекулярных механизмов развития аутоиммунных системных и органоспецифических патологий важно не только для понимания процессов нарушения собственной толерантности на уровне молекулярных взаимодействий лиганд(антиген) — рецептор, активации иммунокомпетентных клеток и развития иммунного ответа, но и для выяснения молекулярных механизмов возникновения и патогенеза этих аутоиммунных заболеваний. Наиболее распространенными заболеваниями, участие аутоиммунных процессов в которых не подлежит сомнению [1], являются различные сердечно-сосудистые патологии. В течение ряда лет в нашей лаборатории исследуются молекулярные механизмы развития тяжелой сердечной патологии неизвестной природы — идиопатической дилатационной кардиомиопатии (ДКМП), которая характеризуется расширением левого желудочка

сердца, гибелью кардиомиоцитов и коллагенозом ткани миокарда, приводящими обычно к летальному исходу. Рядом исследователей было показано наличие в сыворотках пациентов с различными сердечными патологиями (миокардит, ДКМП, острая ревматическая лихорадка, постинфарктный миокардиальный синдром и др.) аутоантител к ряду кардиоспецифических антигенов, таких как АНТ (аденин-нуклеотид-транслокатор) и дегидрогеназа кетоислот митохондрий [2, 3], β -адренорецептор [4, 5], α -изоформа миозина и тропомиозин [6], что иногда сопровождалось депозитом антител в виде иммунных комплексов в тканях миокарда с последующим их некрозом [7].

В отличие от миокардитов или постинфарктного синдрома молекулярные механизмы аутоиммунных и патологических процессов при ДКМП изучены недостаточно. Ранее нами были выявлены и охарактеризованы аутоантитела против основных кардиоспецифических антигенов, играющих клю-

чевую роль в сократительных процессах сердечной мышцы — миозина и актина [8,9]. Полученные нами данные позволили выдвинуть предположение о том, что в процессе развития ДКМП основные антигены миокарда, в частности, актин и миозин претерпевают определенные конформационные изменения, что и приводит к драматическому изменению их иммунореактивности, вызывающей мощную аутоиммунную реакцию организма против собственных антигенов.

Далее это было подтверждено и при исследовании АТРазной активности миозина и акто-миозинового комплекса миокарда [10], когда АТРазная активность патологического миозина была меньше нормы в несколько раз, что однозначно свидетельствует о структурных изменениях молекулы миозина, затрагивающих активный центр молекулы, при развитии данной патологии.

С другой стороны, критичным для работы сократительного аппарата сердечной мышцы является функционирование комплекса регуляторных белков — тропомиозина (ТМ) и семейства тропонинов (Тн). Если для гладких и скелетных мышц функционирование этого регуляторного комплекса изучено во многих аспектах, то структурно-функциональные особенности комплекса ТМ — Тн даже нормального миокарда изучены весьма слабо. Тем более нам представлялось важным попытаться выяснить возможную роль комплекса регуляторных белков миокарда в развитии ДКМП.

В ряде работ, описывающих наличие аутоантител к ТМ при некоторых сердечных патологиях (острая ревматическая лихорадка [11], миокардиты [12] и пост-стрептококковый гломерулонефрит [13]), отмечается, что эти аутоантитела дают перекрестную реакцию между антигеном стрептококка группы А и гликопротеинами миокарда, имеющими строгую структурную гомологию в α -спиральном участке со стрептококковым белком М6. К данным гликопротеинам принадлежат такие кардиоспецифические антигены, как миозин, тропомиозин, виментин, α -актинин.

ТМ, как и большинство миофибриллярных белков, существует в нескольких изоформах, и основные изменения в их экспрессии происходят во время миогенеза. ТМ кодируется мультигенным семейством [13], представляет собой суперспиральный димер, стабилизирующий филаменты актина, и является ключевым белком в контроле сокращения поперечно-полосатых мышц. Биохимические исследования показали, что для сердечной мышцы характерно присутствие молекул ТМ, в основном, в виде $\alpha\alpha$ -гомодимера [13]. В ассоциации с Тн-комплексом основная функция ТМ скелетных и

сердечных мышц — регуляция кальций-чувствительного взаимодействия актина и миозина. Комплекс ТМ — Тн ингибирует АТРазную активность акто-миозина при внутриклеточных концентрациях кальциевых ионов, характерных для расслабленной мышцы. В ответ на освобождение Ca^{2+} саркоплазматическим ретикуломом тропонин С (ТнС) связывает добавочные ионы кальция и сигнал конформационных изменений передается через Тн-связанный ТМ-комплекс. Акто-миозин активируется, АТРазная активность резко нарастает, что и приводит к сокращению саркомера.

При определенных сердечных патологиях было отмечено нарушение экспрессии генов отдельных белков саркомера, что в свою очередь нарушало функции сердечной мышцы и могло приводить к развитию определенных патологий. Так, показано, что мутации в тяжелых цепях вентрикулярного миозина (β -МНС), α -ТМ и кардиального тропонина Т (ТнТ) приводят к развитию семейной гипертрофической кардиомиопатии [15, 16]. При ДКМП роль комплекса регуляторных белков, возможные мутации в них, приводящие к изменению антигенности и к дальнейшему нарушению сокращения миофибрилл сердца, практически не изучены.

Основной целью нашей работы было выяснение того, может ли ТМ миокарда являться мишенью для аутоиммунной агрессии при ДКМП, происходит ли изменение антигенных свойств ТМ при развитии этой патологии и сопровождается ли это какими-то структурно-функциональными изменениями в молекуле ТМ.

Материалы и методы. Сыворотки пациентов с ДКМП были любезно предоставлены Институтом кардиологии им. Стражеско АМН Украины. Диагноз ДКМП устанавливался согласно рекомендациям ВОЗ (от 1980 и 1985 гг.) с помощью клинических, лабораторных и инструментальных методов исследования. Были исследованы 39 сывороток пациентов с ДКМП и 27 сывороток здоровых доноров. Все сыворотки тестировались количественно на наличие ревматоидного фактора, а также на наличие иммуноглобулинов классов G и M — для стандартизации результатов.

В работе использовали реактивы фирм «Sigma», «Bio-Rad» и «Calbiochem» (США), конъюгат против IgG и IgM человека (разобщенный) — фирмы «Amersham» (Великобритания), плашки для иммуноферментного анализа фирмы «Dunatex» (Великобритания), нитроцеллюлоза BA-85 фирмы «Shleicher & Shull» (ФРГ).

Концентрации белков определяли по методу Брэдфорда [17].

Электрофорез белков проводили в градиенте

концентрации (7—22 %) ПААГ в денатурирующих условиях по Лэммли [18].

Выделение тропомиозина миокарда. Тропомиозин выделяли из миокарда пациента, погибшего от ДКМП (ТМд), и миокарда практически здорового индивидуума, погибшего в результате несчастного случая (ТМн), по описанному методу [19] с модификациями. Навеску кусочка миокарда измельчали ножницами и промывали в боратном буфере для миофибрилл (40 мМ H_2BO_3 , 0,1 М КСl) до светло-желтого цвета. Ткань гомогенизировали в буфере для экстракции миозина (0,3 М КСl, 0,15 М K_2HPO_4 , рН 6,8, 0,01 М Na_2HPO_4 , 1 мМ $MgCl_2$, 2 мМ PMSF) в гомогенизаторе Поттера. После экстракции миозина и центрифугирования (6000 g 30 мин) осадок заливали тремя объемами дистиллированной воды и оставляли на 30 мин при 4 °С. Осадок собирали центрифугированием при 6000 g, 30 мин, затем заливали двумя объемами дистиллята. Собранный центрифугированием осадок смешивали с этанолом (1 : 1, v/v), выдерживали в течение 30 мин и осаждали при 6000 g, 30 мин. Таким же образом проводили дальнейшую экстракцию ТМ эфиром.

Далее экстрагировали ТМ из эфирного осадка в семи объемах 1 М раствора КСl, рН которого доводили до 7,0 содой, в течение 12—14 ч при 4 °С. Затем рН супернатанта доводили 1 н. НСl до 4,3 и выдерживали в течение 1 ч при 4 °С. Гелеподобный осадок собирали центрифугированием при 6000 g (30 мин) гомогенизировали в дистилляте и высаливали сульфатом аммония ступенчато до конечного насыщения 70 %. Тропомиозиновый осадок диализовали против дистиллята, подкисленного НСl до рН 4,7.

Тропомиозин скелетных мышц выделяли по аналогичной методике.

Чистоту полученных белков определяли электрофоретически.

Твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA). Аутоантитела против ТМн и ТМд выявляли методом ELISA [20] с модификациями. Антигены иммобилизовали в течение ночи при 4 °С в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,2. Концентрация антигенов 5 мкг/мл. Затем плашки были тщательно отмыты натрий-фосфатным буфером (PBS), рН 7,2, содержащим 0,1 % Tween-20 (PBS-T), и свободные сайты адсорбции блокировали буфером PBS-T с 0,5 %-желатиной (PBS-T-Gel). Сыворотки в соответствующем разведении в буфере PBS-T-Gel инкубировали в течение 2 ч при 37 °С и в течение ночи — при 4 °С. После интенсивной отмывки в PBS-T плашки инкубировали 1 ч с биотинилированными антителами против IgG или IgM челове-

ка, затем в течение 20 мин — с конъюгатом стрептавидин—пероксидаза. Результат реакции визуализировали добавлением субстрата (0,05 мг/мл АВТС с 0,05 % H_2O_2) и определяли количественно при 405 нм на ридере Titertek («Multiscan», Великобритания).

Результаты, полученные с исследуемыми сыворотками при указанном разведении против данного антигена, сравнивали с результатами для пула 27 нормальных сывороток, исследованных в тех же условиях. Антиген-положительными считали сыворотки, значение OD_{405} которых было выше $2OD_{405}$ для пула нормальных сывороток.

Иммуоблоттинг (Western-blot). Иммуоблоттинг наиболее реактивных сывороток против исследуемых антигенов проводили, как описано ранее [21] с небольшими модификациями. Препаративный электрофорез в градиенте концентрации ПААГ осуществляли в денатурирующих условиях по Лэммли [18]. Нитроцеллюлозную реплику препаративного электрофореза после отмывки в буфере PBS-T и заполнения свободных сайтов адсорбции буфером PBS-T-Gel разрезали поперек на узкие полоски шириной 2—3 мм и все дальнейшие процедуры, включая инкубацию с индивидуальными сыворотками, с конъюгатом и красителем, проводили в Mini-Incubation Trays (фирма «Bio-Rad», США) для такого типа Western-blot анализа. Сыворотки в разведении 1 : 50 в PBS-T-Gel буфере с 0,03 %-м азидом натрия инкубировали с полосками блота в течение 2 ч при 37 °С и 14 ч при 4 °С (так как аутоантитела имеют низкую аффинность). Реакцию визуализировали, используя разобренный конъюгат биотинилированных вторых антител козы против иммуноглобулинов G и M человека с последующей инкубацией со стрептавидин-конъюгированной пероксидазой. Блот окрашивали раствором 4-хлоро-1-нафтола (0,5 мг/мл) в 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, с 0,05 % H_2O_2 . Реакцию останавливали, опуская полоски блота по мере развития окраски и фона, в дистиллированную воду.

Результаты и обсуждение. Модифицированный нами метод выделения ТМ позволяет получить достаточные для выполнения дальнейших исследований количества высокоочищенного препарата белка. На рис. 1 представлена электрофореграмма препаратов ТМ, выделенных из нормального и пораженного ДКМП миокардов. Оказалось, что оба препарата имеют одинаковую молекулярную массу и изоэлектрическую точку (данные не представлены), что может свидетельствовать об отсутствии существенных различий в первичной структуре исследуемых антигенов, а также о сходном характере процессинга этих белков в течение миогенеза

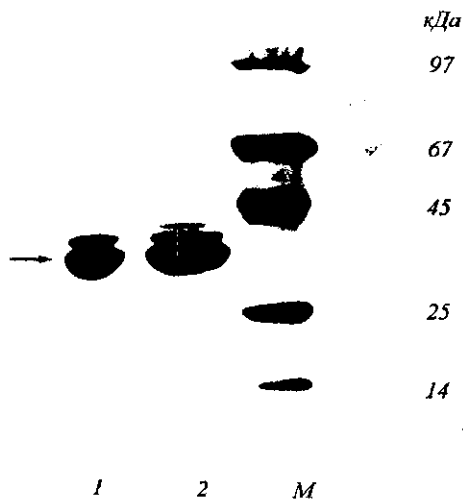


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов тропомиозина, выделенного из нормального (1) и пораженного ДКМП (2) миокардов; М — смесь стандартных белковых маркеров

как нормального миокарда, так и при развитии патологии. Точечные мутации в молекуле ТМ были обнаружены только при исследовании пациентов с острой ревматической лихорадкой [11], пост-вирусным миокардитом [12] и семейной гипертрофической кардиомиопатией [22]. Подобные отличия отмечены и при исследовании других кардиоспецифических антигенов, таких как миозин. Можно предположить, что различный характер поражения основных миофибриллярных белков при разных сердечных патологиях (включая и разные виды кардиомиопатий) обуславливает и разный патогенез этих заболеваний.

Следующим этапом изучения структурно-функциональных особенностей ТМ при ДКМП было определение иммунореактивности исследуемых антигенов против сывороток пациентов с ДКМП и здоровых доноров.

Предварительное тестирование всех исследуемых сывороток на наличие ревматоидного фактора, а также определение концентраций естественных (natural) иммуноглобулинов классов G и M показало отсутствие корреляции интенсивности иммунного ответа против исследуемых антигенов (ТМн и ТМд) и относительной концентрации IgG и IgM в тестируемых сыворотках. Это свидетельствует о специфичности иммунного ответа аутоантител сывороток пациентов к исследуемым антигенам. На рис. 2 представлены результаты изучения иммуно-

реактивности ТМн и ТМд против сывороток пациентов с ДКМП в реакции ELISA.

Видно, что только незначительный процент сывороток пациентов с ДКМП можно считать позитивными, и уровень иммунного ответа против ТМ в целом значительно ниже, чем иммунный ответ тех же пациентов против препаратов миозина, выделенного из ДКМП-миокарда, что было определено нами ранее. Никакой иммунной реакции не было отмечено при тестировании сывороток пациентов против ТМ, выделенного из скелетных мышц. Можно считать, что ТМ является низкоиммуногенным, то есть при развитии ДКМП молекула ТМ (в отличие от ранее исследованных миозина и актина) не претерпевает существенных структур-

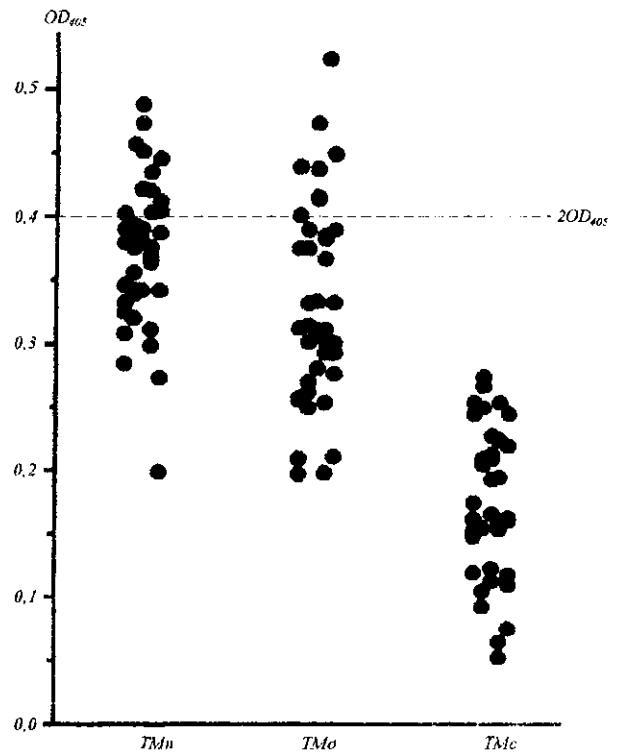


Рис. 2. Иммунореактивность препаратов тропомиозина, выделенного из нормального (ТМн), пораженного ДКМП (ТМд) миокардов и из скелетных мышц (ТМс), определенная в реакции ELISA. Условия проведения реакции — в разделе «Материалы и методы»

ных изменений, что может привести к изменению антигенности.

Информация, полученная с помощью реакции ELISA, является неполной без данных иммуноблоттинга — высокочувствительного метода, позволяющего установить не только наличие многих аутоантигенов при исследуемых патологиях, но также определить природу детерминант, против которых вырабатываются аутоантитела. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что даже в наиболее иммунореактивных сыворотках, используемых в данном эксперименте, нет аутоантител к ТМ, способных узнавать детерминанты линейного типа.

Наличие кардиоспецифических аутоантител к ТМ было недавно описано группой исследователей при изучении сывороток пациентов с острой ревматической лихорадкой (ОРЛ) [11]. Ранее многими исследователями были описаны кардиореактивные аутоантитела в сыворотке пациентов с ОРЛ: эти аутоантитела имели иммунологический перекрест с антителами М белка стрептококка и генерировались против сходного структурного α -спирального участка таких белков, как М6 белок стрептококка, миозин и ламинин миокарда [23, 24]. Сходные аутоантитела были выявлены у больных с острым пост-стрептококковым гломерулонефритом и неосложненной стрептококковой инфекцией [11]. С помощью мышинных моноклональных антител против М белка стрептококка была продемонстрирована их высокая реактивность с ТМ сердца человека и ТМ сердца кролика [25].

Более того, эти моноклональные антитела вы-

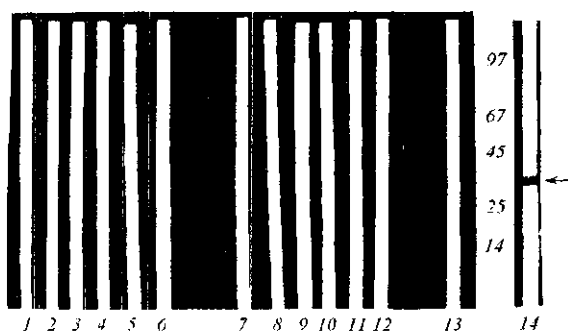


Рис. 3. Иммуноблоттинг препаратов тропомиозина, выделенного из нормального (1—6) и пораженного ДКМП (7—12) миокардов: 1—4 и 7—10 — инкубация с сыворотками пациентов с ДКМП; 5, 6, 11, 12 — с сыворотками здоровых доноров; 13 — контроль сорбции конъюгата; 14 — контроль эффективности переноса препарата ТМ с геля на нитроцеллюлозу (окраска полоски блота в Ропсау). Положение ТМ обозначено стрелкой

являли детерминанты линейного типа у ТМ в иммуноблоттинге, хотя исследованные сыворотки пациентов с ОРЛ подобной реактивности в иммуноблоттинге не показали. Это согласуется с полученными ранее данными многочисленных исследований о природе и структурно-функциональных особенностях natural antibodies (аутоантител) по сравнению с provoked antibodies (антителами, полученными иммунизацией лабораторных животных) к одному и тому же антигену и является базисом для понимания особенностей развития аутоиммунных патологий, когда происходит «отмена толерантности» и развиваются аутоиммунные реакции против собственных антигенов [26].

В случае ОРЛ ТМ-позитивными были почти 100 % исследованных пациентов, в случае пост-стрептококкового острого гломерулонефрита — около 10 %, при миокардитах — 5—8 %, а в случае неосложненной стрептококковой инфекции, синдрома Кавасаки и у здоровых доноров не было выявлено ни одного случая наличия аутоантител к ТМ миокарда [11]. Это можно объяснить первопричиной данных патологий — острой стрептококковой инфекцией, при которой генерируется большое количество антител, перекрестно реагирующих как с белком М6 стрептококка, так и гомологичными α -спиральными последовательностями таких белков миокарда, как миозин и тропомиозин. Патологии же вирусной или другой этиологии (в частности ДКМП) имеют иные механизмы развития аутоиммунных процессов, при которых не отмечается значительного количества аутоантител к данному гомологичному супер-спирализованному участку антигенов, таких как тропомиозин.

В случае ДКМП ни одна из теорий ее происхождения не основана на первичной стрептококковой инфекции: предпочтение отдается вирусной и токсической (например, алкогольная ДКМП) моделям патогенеза ДКМП. Поэтому и природа, и функциональное значение аутоантител при ДКМП будут, естественно, отличаться от таковых при сердечных патологиях микробного происхождения.

Функционально ТМ играет важную роль в мышечном сокращении и релаксации. Когда мышца активируется освобождающимися ионами кальция, молекулы ТМ, ассоциированные с Тн-белками, индуцируют конформационные изменения в тропонинах. Полученные нами данные дают основание полагать, что при развитии ДКМП тропомиозин, выполняющий важную функционально-регуляторную роль, в отличие от других компонентов миофибрилл (миозина или актина) не претерпевает столь драматических изменений, могущих приве-

сти к изменению его антигенности. В то же время известно, что ДКМП характеризуется развитием изменений в функционировании кальциевых насосов миофибрилл сердечной мышцы, в свою очередь, приводящих к нарушению нормального сокращения сердечных саркомеров [27]. Резонно предположить, что определенные структурно-функциональные перестройки могут происходить в комплексе Тн-белков. Выявление возможных изменений в комплексе тропониновых белков миокарда, исследование молекулярных особенностей их взаимодействия с акто-миозиновым комплексом сердечной мышцы при развитии ДКМП является предметом дальнейших исследований.

Л. Л. Сидорик, О. М. Федоркова, Т. В. Ковеня, В. І. Бобик,
М. В. Роднін, Г. Х. Мацука

Структурно-функціональні вивчення тропоміозину міокарда як аутоантигена при дилатаційній кардіоміопатії

Резюме

Тропоміозин з нормального і ураженого дилатаційною кардіоміопатією (ДКМП) міокарда людини отримано в гомогенному стані методами висолювання і послідовної екстракції органічними та неорганічними розчинниками. Для контрольних експериментів одержано тропоміозин скелетних м'язів за аналогічною методикою. Молекулярна маса препаратів тропоміозину, виділеного як з нормального, так і патологічного міокардів, була однаковою. При імуноскринінгу методом ELISA у сироватках пацієнтів з ДКМП аутоантитіла до тропоміозину міокарда з низькою імунореактивністю були виявлені у невеликому відсотку сироваток, аутоімунна реакція проти тропоміозину скелетних м'язів була відсутня. Імуноблотинг обох препаратів тропоміозину міокардів з найімунореактивнішими сироватками пацієнтів з ДКМП показав, що ці антитіла взаємодіють, в основному, з детермінантами конформаційного типу. Таким чином, знайдено, що на відміну від досліджених раніше кардіоспецифічних антигенів актину і міозину тропоміозин не піддається суттєвим структурним змінам при розвитку ДКМП, здатним призвести до зміни його імуногенності.

L. L. Sidorik, O. M. Fedorkova, T. V. Kovenja, V. I. Bobyk,
N. V. Rodnin, G. Kh. Matsuka

Structural and functional studies of cardiac tropomyosin as autoantigen at dilated cardiomyopathy

Summary

Tropomyosin have been purified to homogeneity from normal and affected by dilated cardiomyopathy (DCMP) human myocardium and from skeletal muscle as well. The molecular masses of both preparations of cardiac tropomyosins were identical. The immunoscreening of DCMP patients sera by ELISA method have shown the presence of autoantibodies directed against cardiac tropomyosin in the limited number of sera. No immunoreactivity have been detected against skeletal tropomyosin. Western blot analysis detected any linear determinants in tropomyosin molecule under denaturing conditions. We suggest that cardiac tropomyosin doesn't undergoes sufficient structural changes at dilated cardiomyopathy progression.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Rose N. R., Neumann D. A., Herskowitz A. Autoimmune myocarditis: concepts and questions // Immunol. Today.—1991.—12, N 6.—P. 253—255.
- Schultneiss H. P., Bolfe H. D. Immunological analysis autoantibodies against the adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy // J. Mol. Cell. Cardiol.—1985.—17.—P. 603—612.
- Neumann D. A., Bureck C. L., Baughman K. L. et al. Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy // Amer. Coll. Cardiol.—1990.—16.—P. 839—846.
- Limas C. J., Limas C. Immune-mediated modulation of β -adrenoreceptor function in human dilated cardiomyopathy // Clin. Immunol. and Immunopathol.—1993.—68, N 2.—P. 204—207.
- Limas C. J., Kubo S. H., Olivari H.-T. Anti-beta-receptor antibodies in human dilated cardiomyopathy and correlation with HLA-DR antigens // Amer. J. Cardiol.—1990.—65, N 1.—P. 483—487.
- Rose N. R., Herskowitz A., Neumann D., Neu N. Autoimmune myocarditis: a paradigm of post-infectious autoimmune disease // Immunol. Today.—1988.—9.—P. 117—120.
- DeScheerder I. M., DeBysore M., Algoed L. et al. Characteristic anti-heart antibody patterns in post-cardiac injury syndrome, endocarditis and acute myocarditis // Eur. Heart J.—1987.—8.—P. 237—238.
- Бобик В. І., Веберов А. В., Рябенко Д. В. і др. Очистка тканеспецифических антигенов из нормального миокарда и миокарда пациентов с дилатационной кардиомиопатией // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 6.—С. 61—64.
- Sidorik L. L., Rodnin N. V., Bobyk V. I. et al. Investigation of autoantibodies directed against tissue-specific myocardial antigens in dilated cardiomyopathy // Там же.—1995.—11, № 1.—P. 81—86.
- Болгарин Р. Н., Роднін Н. В., Сидорик Л. Л. Изучение аутоантител к триптофанил-тРНК синтетазе при системных аутоиммунных заболеваниях // Молекуляр. биология.—1998.—№ 3.—С.
- Khanna A. K., Nomura Y., Fischetti V. A., Zabriskie J. B. Antibodies in the sera of acute rheumatic fever patients bind to human cardiac tropomyosin // J. Autoimmun.—1997.—10.—P. 99—106.
- Liao L., Sindhuri R., Rojkind M. et al. Antibody-mediated autoimmune myocarditis depends on genetically determined target organ sensitivity // J. Exp. Med.—1995.—181.—P. 1123—1131.
- Kaplan M. H., Svec M. H. Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. III. Presence in human sera of streptococcal antibody cross-reactive with heart tissue. Association with streptococcal infection, rheumatic fever, and glomerulonephritis // Ibid.—1964.—119.—P. 651—666.
- Muthuchamy M., Grupp I. L., Grupp G. et al. Molecular and physiological effects of overexpressing striated muscle β -tropomyosin in the adult murine heart // J. Biol. Chem.—1995.—270, N 51.—P. 30593—30602.
- Ross R. S., Bulkley B. H., Hutchins G. M. et al. Idiopathic familial myocardial pathology in three generations: a clinical and pathological study // Amer. Heart J.—1978.—96.—P. 170—178.
- Mestroni L., Miani D., DiLenarda A. et al. Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy // Amer. J. Cardiol.—1990.—65.—P. 1449—1453.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein binding // *Anai. Biochem.*—1976.—86, N 1.—P. 193—200.
18. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227, N 52.—P. 680—685.
19. *Mische S., Manjula B. N., Fischetti V. A.* Relationship of Streptococcal M protein with human and rabbit tropomyosin: the complete amino acid sequence of human cardiac alpha tropomyosin, a highly conserved contractile protein // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1987.—142.—P. 813—818.
20. *Matsiota P., Druet P., Dosquet P. et al.* Natural autoantibodies in systemic lupus erythematosus // *Clin. Exp. Immunol.*—1987.—69.—P. 79—88.
21. *Ternynck T., Bleux C., Gregoire J. et al.* Comparison between autoantibodies arising during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and natural autoantibodies // *J. Immunol.*—1990.—144, N 4.—P. 1504—1511.
22. *Fiorito S., Autore C., Fragola P. V. et al.* HLA-DRs antigen linkage in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy // *Amer. Heart J.*—1986.—111—P. 91—94.
23. *Kaplan M. H., Freugley J. D.* Autoimmunity to the heart in cardiac disease. Current concepts of the relation of autoimmunity to rheumatic fever, postcardiotomy and post-infarction syndromes and cardiomyopathies // *Amer. J. Cardiol.*—1969.—24.—P. 459—473.
24. *Zabriskie J. B.* Rheumatic Fever: the interplay between host, genetics, and microbe. Levis and Conner Memorial Lecture // *Circulation.*—1985.—71.—P. 1077—1086.
25. *Fenderson P. C., Fischetti V. A., Cunningham M. W.* Tropomyosins shares immunologic epitopes with group A streptococcal M proteins // *J. Immunol.*—1989.—142.—P. 2475—2481.
26. *Avrameas S.* Natural autoantibodies: from «horror autotoxicus» to «gnothi seaution» // *Immunol. Today.*—1991.—12.—P. 154—159.
27. *Movsesian M. A., Bristow M. R., Krall J.* Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy // *Circ. Res.*—1989.—65.—P. 1141—1144.

Поступила в редакцию 24.02.98