

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 57.083.3; 577.112; 615.07; 616.12-07

**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ АУТОАНТИТЕЛ ПРОТИВ  
 $\beta_1$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ**

**Виталий Георгиевич Григоренко<sup>1</sup>, Ирина Петровна Андреева<sup>2</sup>, Елизавета Александровна Мельничук<sup>3</sup>, Павел Андреевич Левашов<sup>4</sup>**

<sup>1-4</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии

**Автор, ответственный за переписку:** Виталий Георгиевич Григоренко, vitaly.grigorenko@gmail.com

**Аннотация.** Созданы штаммы *E. coli* – продуценты рекомбинантных эпитопов  $\beta_1$ -адренорецептора в составе химерных белков. Соответствующие последовательности эпитопов находятся в С-концевой области связывающего жирные кислоты белка из сердца человека (с-БСЖК). Они отделены от белка линкерной последовательностью (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. Разработан твердофазный иммуноферментный метод определения аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору в сыворотке крови человека на основе рекомбинантного эпитопа. Проанализированы сыворотки крови пациентов ( $N = 76$ ) с разными диагнозами кардиопатологии и другими заболеваниями. У части пациентов с подтвержденным диагнозом сердечно-сосудистых заболеваний выявлен достоверно повышенный уровень аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору, в большинстве случаев это были пациенты с диагнозом острый инфаркт миокарда.

**Ключевые слова:** иммуноферментный анализ, аутоантитела,  $\beta_1$ -адренорецептор, белок, связывающий жирные кислоты, рекомбинантные антигены, дилатационная кардиомиопатия

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-203-211

**Список сокращений:** ИФА – иммуноферментный анализ, ДКМП – дилатационная кардиомиопатия, с-БСЖК – связывающий жирные кислоты белок из сердца человека.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 121041500039-8 «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды».

**Для цитирования:** Григоренко В.Г., Андреева И.П., Мельничук Е.А., Левашов П.А. Иммуноферментный анализ аутоантител против  $\beta_1$ -адренорецептора человека с использованием рекомбинантных антигенов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023. Т. 64. № 2. С. 203–211.

## ORIGINAL ARTICLE

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF AUTOANTIBODIES  
AGAINST HUMAN  $\beta_1$ -ADRENERGIC RECEPTOR USING RECOMBINANT  
ANTIGENSVitaly G. Grigorenko<sup>1</sup>, Irina P. Andreeva<sup>2</sup>, Elizaveta A. Melnichuk<sup>3\*</sup>,  
Pavel A. Levashov<sup>4</sup><sup>1-4</sup>Enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State  
University

\* Present adress: Headcount AG, Dreikönigstrasse 55, 8002 Zürich, Switzerland

**Corresponding author:** Vitaly G. Grigorenko, vitaly.grigorenko@gmail.com

**Abstract.** *E. coli* strains have been created as producers of recombinant  $\beta_1$ -adreno-receptor epitopes as part of chimeric proteins. The corresponding epitope sequences are located in the C-terminal region of the human heart fatty acid binding protein (hH-FABP) and separated from it by a linker sequence (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. A solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of autoantibodies against  $\beta_1$ -adrenergic receptor in human blood serum based on a recombinant epitope has been developed. Blood sera of patients ( $N = 76$ ) with various diagnoses of cardiopathologies and other diseases were analyzed. In some patients with a confirmed diagnosis of cardiovascular diseases, a significantly increased level of autoantibodies to  $\beta_1$ -adrenergic receptor was detected, in most cases those with a diagnosis of acute myocardial infarction.

**Keywords:** enzyme immunoassay, autoantibodies,  $\beta_1$ -adrenergic receptor, fatty acid binding protein, recombinant antigens, dilated cardiomyopathy

**Abbreviations:** ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, hH-FABP – the human heart fatty acid binding protein, DCM – dilated cardiomyopathy.

**Financial Support.** This work was performed within the framework of the Lomonosov Moscow State University state task (Government grant no. 121041500039-8 (Molecular Design, Structural, and Functional Analysis and Regulation of Enzyme Systems, Cell Structures, and Bionanomaterials: Fundamental Principles and Applications in Technology, Medicine, and Environmental Protection)).

**For citation:** Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Melnichuk E.A., Levashov P. A. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Autoantibodies Against Human  $\beta_1$ -Adrenergic Receptor Using Recombinant Antigens // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2023. T. 64. № 2. P. 203–211.

В настоящее время накопилась обширная научная информация по действию аутоиммунных процессов при разных заболеваниях, в том числе сердечно-сосудистых, таких как, например, дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) [1–5]. У части пациентов с таким диагнозом обнаруживают аутоантитела к  $\beta_1$ -адренорецептору [7–10]. Этот рецептор локализуется в сердце и реагирует на действие норадреналина, при его стимуляции увеличиваются частота и сила сердечных сокращений, потребность миокарда в кислороде, артериальное давление. Если в организме присутствуют аутоантитела к  $\beta_1$ -адренорецептору, то они связываются с ним, что приводит либо к его блокировке, либо к постоянной стимуляции и, соответственно, изнашиванию сердечной мышцы [7].

Диагностика аутоиммунных заболеваний (в частности, детекция аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору) связана со сложностью подбора антигена для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) [11–14]. В настоящее время подобные антигены получают либо выделением соответствующих белков из тканей животных, либо химическим пептидным синтезом внеклеточных фрагментов. Выделение мембранных животных белков представляет собой сложный процесс, при осуществлении которого встает вопрос о сохранении иммунологической активности антигена. В случае пептидного синтеза также возникает много проблем соответствия искусственного антигена природному за счет вариаций конформации, приводящих к суще-

ственным различиям пространственной структуры. Кроме того, оба варианта сопровождаются значительными финансовыми затратами.

Использование генно-инженерного подхода с получением рекомбинантных химерных антигенов существенно расширяет возможности по созданию систем диагностики аутоиммунных заболеваний. Генно-инженерные подходы имеют ряд существенных преимуществ по сравнению с выделением белков из природных источников и получением конъюгатов традиционными методами химического синтеза. К ним относятся высокий выход готового препарата, его стоимость, воспроизводимость и технологичность; полученные препараты, как правило, имеют гомогенный состав, известную стехиометрию и сохраняют функциональную активность. Современные подходы биотехнологической науки практически решили проблему получения рекомбинантных ферментов (таких, как пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза и люцифераза), использующихся в методах ИФА в качестве маркёров, различных антител и всевозможных антигенов белковой природы [15–22]. Ранее для изучения роли аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору в развитии ДКМП был успешно использован рекомбинантный химерный белок, состоящий из глутатион-S-трансферазы и второй внеклеточной петли, соответствующей аминокислотным остаткам 195–225  $\beta_1$ -адренорецептора человека [10].

Цель настоящей работы – получение рекомбинантных антигенов (эпитопов  $\beta_1$ -адренорецептора человека) в составе конъюгатов со связывающим жирные кислоты белком из сердца человека (с-БСЖК), а также изучение возможности их использования для разработки иммуноферментного анализа аутоантител против  $\beta_1$ -адренорецептора человека.

### Материалы и методы

В работе использовали реагенты компаний «Sigma-Aldrich» (<https://www.sigmaaldrich.com>), Difco (<http://www.bd.com>). Для работы с ДНК применяли наборы QIA Spin Miniprep Kit и QIAquick Gel extraction Kit (<https://www.qiagen.com>). Использовали ферменты рестрикции и модификации ДНК производства компаний «New England Biolabs» (<https://www.neb.com>) и «Thermo Fisher Scientific» (<https://www.thermofisher.com>). Синтез олигонуклеотидов для секвенирования и ПЦР осуществлялся в компании «Синтол» (<https://www.syntol.ru>). Секвенирование ДНК проводили в компании

«Евроген» (<http://evrogen.ru>). Для определения концентрации белка использовали тест-набор ВСА («Sigma-Aldrich»); носитель для хроматографической очистки – SOURCE™ 15Q (<http://www.gehealthcare.com>). Все водные растворы готовили на деионизованной воде «Milli-Q» (<http://www.merckmillipore.com>).

**Микроорганизмы, среды, плазмиды и олигонуклеотиды.** Для генетических манипуляций были использованы клетки *E. coli* линии DH5 $\alpha$ , плазмидный вектор pET-FABP [21, 23], для экспрессии белка – *E. coli* BL21(DE3) («Novagen», США). Клетки культивировали в среде LB (1% экстракт дрожжей, 1% пептон, 0,5% NaCl), содержащей 100 мг/л ампициллина. Для получения компетентных клеток *E. coli* культуру наращивали до OD<sub>600</sub> = 0,4–0,6 в 50 мл среды LB, клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием при 3500 g при 4 °C в течение 10 мин. Осадок клеток ресуспендировали на льду в буфере TSS (буфер на основе среды LB, содержащий на 100 мл 10 г ПЭГ-6000, 5 мл DMSO и 0,6 г MgCl<sub>2</sub>; pH 6,5), выдерживали в течение 1 ч на льду и замораживали при –80 °C.

### Создание экспрессионных векторов

**Праймеры для клонирования генов химер представлены в табл. 1.** Нуклеотидные последовательности, кодирующие рекомбинантные химерные антигены (А, В, С) получали с помощью последовательных ПЦР.

Для химеры А:

- 1ПЦР – с праймерами NcoI\_dir + L1\_rev,
- 2ПЦР – с продуктом 1ПЦР + праймером NcoI\_dir + праймер A2\_rev,
- 3ПЦР – с продуктом 2ПЦР + праймером NcoI\_dir + праймер A3\_rev.

Для химеры В:

- 1ПЦР – с праймерами NcoI\_dir + L1\_rev,
- 2ПЦР – с продуктом 1ПЦР + праймером NcoI\_dir + праймер B2\_rev,
- 3ПЦР – с продуктом 2ПЦР + праймером NcoI\_dir + праймер B3\_rev.

Для химеры С:

- 1ПЦР – с праймерами NcoI\_dir+L1\_rev,
- 2ПЦР – с продуктом 1ПЦР + праймером NcoI\_dir + праймер C2\_rev,
- 3ПЦР – с продуктом 2ПЦР + праймером NcoI\_dir + праймер C3\_rev,
- 4ПЦР – с продуктом 3ПЦР + праймером NcoI\_dir + праймер C4\_rev,
- 5ПЦР – с продуктом 4ПЦР + праймером NcoI\_dir + праймер C5\_rev.

Праймеры для клонирования генов химер (*dir* – прямой, *rev* – обратный)

Химера	Направление	Последовательность, нукл. (5' → 3')
А	NcoI_dir	GATATACCATGGTGGACGCTT
	L1_rev	TACCACCACCACCGCTACCACCACCACCTGCCTCTTTCTCATAAGTGCG
	A2_rev	GAACCATACTCGCTACCACCACCACCGCTACCACCACCACCGCTACCA
	A3_rev	GGCGGATCCTTACAGTTCGCAGAAGAATGAACCATACTCGCTACCACC
В	NcoI_dir	GATATACCATGGTGGACGCTT
	B2_rev	ATTATAGCAGCGGCGAGCGCTACCACCACCACCGCTACCACCACCACCGCTACC
	B3_rev	GGCGGATCCTTAAAAGTCGCAGCACTTCGGGTCATTATAGCAGCGGCGAGCG
С	NcoI_dir	GATATACCATGGTGGACGCTT
	C2_rev	GCCACCAATGGCTACCACCACCACCGCTACCACCACCACCGCTACC
	C3_rev	AGCGGCGAGCCTCATCTGATTCTGCGGCCACCAATGGCTACCACC
	C4_rev	AGTCGCAGCACTTCGGGTCATTATAGCAGCGGCGAGCCTCATCTGA
	C5_rev	GGCGGATCCTTAACGGTTGGTCACAAAGTCGCAGCACTTCGGGTC

ПЦР проводили в объеме 25 мкл в амплификаторе «Mastercycler gradient» («Eppendorf», Германия) по следующему протоколу: начальная денатурация при 95 °С, 2 мин; амплификация, 25 циклов: денатурация при 95 °С, 30 с; отжиг праймеров при 65 °С, 30 с; элонгация при 72 °С, 1 мин 30 с; конечная элонгация при 72 °С, 10 мин.

Для лигирования плазмидного вектора и ПЦР-продуктов использовали T4 ДНК лигазу в объеме 10 мкл при соотношении вставка : вектор, равном 1:1 и 3:1 (~40 нг в реакцию). Смесь инкубировали в течение ночи при 16 °С, затем использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5α.

### Экспрессия химерных генов

Полученные рекомбинантные плазмиды использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Отдельные колонии с чашек Петри были выбраны для инокуляции 10 мл LB среды, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). После инкубации в течение ночи при +37 °С (150 об/мин) ночную культуру разводили в 1000 раз свежей LB-средой с ампициллином и инкубировали в течении 3–4 ч при +37 °С (150 об/мин) до ОП<sub>600</sub> ≈ 0,6. Затем

добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ. Клетки инкубировали при +30 °С в течение 3 ч, центрифугировали (5000 об/мин, +4 °С, 15 мин) и замораживали при –20 °С.

Лизис клеток проводили в буфере (20 мМ Трис/НСl, 15 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0). После пипетирования вязкой массы в течение 2–3 мин проводили несколько циклов размораживания/замораживания клеток с последующей обработкой ультразвуком (3 раза по 1 мин). Полученный после центрифугирования (10 000 g, +4 °С, 20 мин) супернатант диализовали против 10 мМ Трис/НСl (рН 7,5).

**Выделение и очистка рекомбинантных белков F, A, B, C.** Процедура выделения и очистки рекомбинантных белков после диализа из культуры клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS против Tris-HCl-буфера (рН 7,5) включала анионообменную хроматографию (расчетные изоэлектрические точки белков: pI(F) = 6,29; pI(A) = 5,61; pI(B) = 6,82; pI(C) = 6,42) на носителе SOURCE™ 15Q («GE Healthcare», Швеция). Химерные белки элюировали в градиенте NaCl (0–0,3 М) в течение 1 ч со скоростью 1 мл/мин.

**Иммуноферментный анализ.** Рекомбинантные химерные антигены (А, В, С или



с-БСЖК(F)) после стадии хроматографической очистки разводили 0,01 М карбонатным буфером, pH 9,6 до концентрации 5 мкг/мл и сорбировали на планшеты фирмы («Nunc Maxisorb», Дания) по 150 мкл в лунку, инкубировали в течение ночи при +4 °С. Планшеты промывали 0,01 М фосфатным буфером, содержащим 0,05% Твин-20, pH 7,4 (PBST) (3×0,25 мл), стабилизировали раствором (по 150 мкл 0,5% БСА в PBS) в течение 2 ч при комнатной температуре, высушивали и хранили при +4 °С.

Исследуемые сыворотки (предоставлены компанией ЗАО «НВО Иммунотех», Россия) разводили в 100 раз буфером PBST, содержащим 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и вносили по 100 мкл в лунки. Инкубацию проводили в течение 1 ч при +37 °С. Лунки промывали буфером PBST (3×0,25 мл), вносили по 100 мкл конъюгата антител против IgG человека с пероксидазой хрена (<https://www.sigmaaldrich.com>) и инкубировали в течение 1 ч при температуре +37 °С. Затем планшет промывали буфером PBST (3×0,25 мл), вносили по 100 мкл раствора субстрата (3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ, ЗАО «НВО Иммунотех», Россия) с добавлением перекиси водорода) и инкубировали в течение 15–20 мин при температуре +37 °С. Реакцию останавливали 1 М серной кислотой (100 мкл/лунку) и регистрировали оптическое поглощение на 450 нм.

### Результаты и их обсуждение

**Клонирование химерных генов.** Для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний, таких как дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), требуется система, позволяющая детектировать аутоантитела против  $\beta_1$ -адренорецептора человека. Для создания такой системы в качестве антигенов были получены химерные рекомбинантные белки, содержащие белок-носитель и эпитопы  $\beta_1$ -адренорецептора человека (рис. 1).

На основе литературных данных [12, 24, 25], а также интернет-ресурса (Immune Epitope Database, <https://www.iedb.org/>) были выбраны 3 аминокислотные последовательности эпитопов, которые соответствуют разным участкам молекулы  $\beta_1$ -адренорецептора: А – участок 1-й внеклеточной петли; В – участок 2-й внеклеточной петли; С – 2-я внеклеточная петля с фрагментами трансмембранных доменов (рис. 2). Целевая аминокислотная последовательность эпитопов: А: 125-133 – EYGSFFCEL; В: 206-218 – ARRCYNPKCCDF; С: 197-222 – HWWRAESDE-ARRCYNPKCCDF-VTNR.

В качестве носителя для рекомбинантного антигена был использован белок, связывающий жирные кислоты, из сердца человека (с-БСЖК или h-FABP (fatty-acid binding protein, heart type), который наряду с миоглобином и тропонином является биохимическим маркером повреждения миокарда [23]. Преимуществом использования с-БСЖК в качестве белка-носителя эпитопов является отсутствие данных о существовании аутоантител на этот белок, что очень важно для создания ИФА, а также высокий уровень его экспрессии в растворимой форме.

Аминокислотная последовательность соответствующих эпитопов находится на С-конце белка-носителя. Такая схема была успешно использована в составе рекомбинантного конъюгата GST с участком (195–225) второй внеклеточной петли  $\beta_1$ -адренорецептора человека [10]. Аналогичная схема реализуется для получения иммуносорбентов на основе синтетических пептидов [25, 26]. Между целевой последовательностью и белком-носителем введена гибкая линкерная последовательность (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, что обеспечивает отделение эпитопа от носителя и сохранение иммунологических свойств. Выбор линкерной последовательности обусловлен тем, что аналогичная последовательность была успешно применена для создания химерных структур [21, 22].

Отсутствие сайтов гликозилирования в последовательности эпитопов (А, В, С) обусловило использование эффективной системы получения рекомбинантных белков на основе клеток *E. Coli* BL21(DE3)pLysS. Созданная система экспрессии позволила получать целевые химерные белки, содержащие эпитопы к  $\beta_1$ -адренорецептору человека в цитоплазме клеток *E. coli* в растворимом состоянии с высоким уровнем синтеза рекомбинантного препарата. Общий выход очищенных рекомбинантных препаратов составил 15–25 мг с 1 л культуры клеток *E. coli*.

**Иммуноферментный анализ аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору человека.** Для определения аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору человека была выбрана схема непрямого двухстадийного ИФА. В качестве антигена, иммобилизованного на поверхности полистиролового планшета, использовали полученные рекомбинантные химерные белки, содержащие эпитопы  $\beta_1$ -адренорецептора человека: А, В и С в составе с белком-носителем с-БСЖК. При наличии соответствующих аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору человека в анализируемом образце происходит образование иммуно-

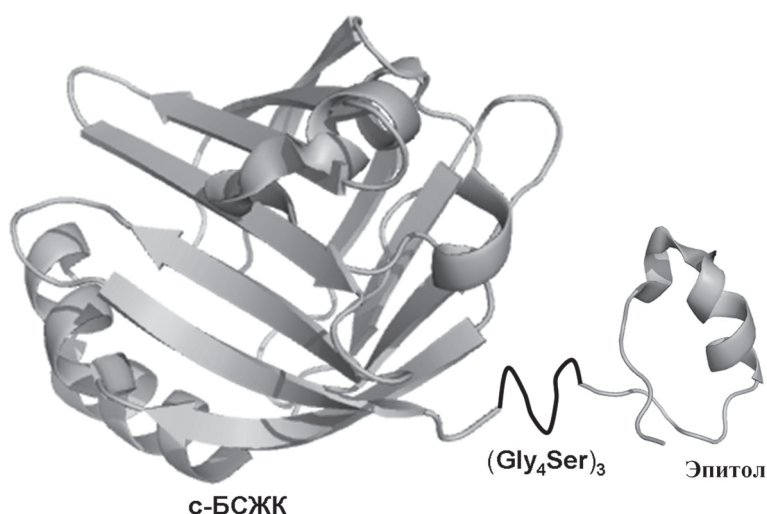


Рис. 1. Химерный белок, содержащий с-БСЖК (PDB entry: 1G5W) и эпитол к  $\beta_1$ -адренорецептору человека (PDB entry: 2LSQ)

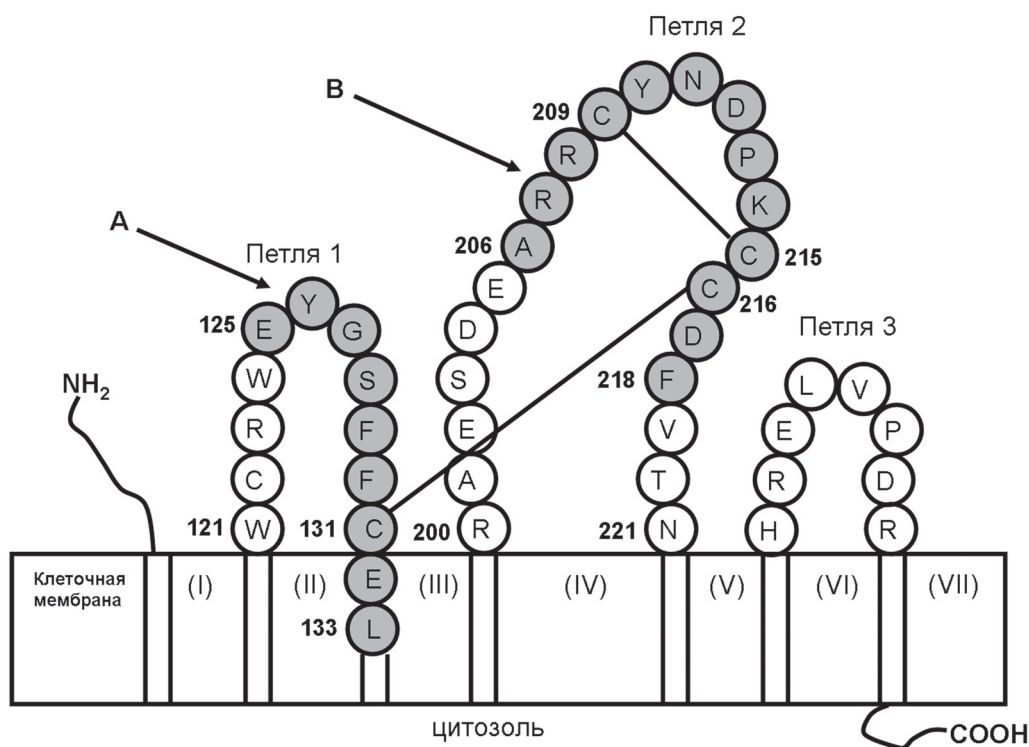


Рис. 2. Схематическое изображение структуры  $\beta_1$ -адренорецептора [24, 25]

комплекса с иммобилизованным на поверхности планшета антигеном. Для детекции связавшихся антител из анализируемого образца использовали конъюгат моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена (ПХ) в качестве фермента маркера.

Проблема, которую предстояло решить при разработке ИФА, заключалась в отсутствии меж-

дународного стандарта положительного контроля наличия аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору человека, в связи с чем предстояло выбрать внутренний положительный и отрицательный контрольные стандарты. В этих целях были проанализированы 15 образцов сывороток крови пациентов с разными сердечно-сосудистыми патологиями (табл. 2). Данный выбор

Т а б л и ц а 2

**ИФА-анализ сывороток крови пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями\***

Номер сыворотки (N)	ОП <sub>ср.</sub> , λ = 450 нм (N = 10)
1	0,177
2	0,172
4 (K <sup>-</sup> )	0,116
5	0,134
6	0,756
7	0,124
18	0,167
21	0,829
22	0,185
23 (K <sup>+</sup> )	1,009
24	0,136
26	0,125
27 (K <sub>ср.</sub> )	0,383
28	0,163
32	0,204

\* В качестве антигена на поверхность полистиролового планшета иммобилизован рекомбинантный химерный антиген В-(ARRCYNDPKCCDF).

сывороток обусловлен тем, что, согласно литературным данным, наличие аутоантител к β<sub>1</sub>-адренорецептору может приводить к серьезным сердечно-сосудистым заболеваниям.

На основе полученных данных были выбраны отрицательный контроль (K<sup>-</sup>) – сыворотка № 4, положительный контроль (K<sup>+</sup>) – сыворотка № 23, а также (K<sub>ср.</sub>) – сыворотка № 27 с промежуточным значением сигнала. Воспроизводимость результатов измерений для проанализированных образцов составила 3,8–6,9% (N = 10).

При выборе антигена для иммобилизации на планшете использовали рекомбинантные химерные антигены А, В, С, а также в качестве контроля белок-носитель с-БСЖК, не содержащий эпитопы к β<sub>1</sub>-адренорецептору человека (табл. 3).

Были рассчитаны соотношения сигнал/фон (K<sup>+</sup>/K<sup>-</sup>) и K<sub>ср.</sub>/K<sup>-</sup>. Эти показатели составили соответственно 6,7 и 2,2 для антигена С; 11,8 и 3,0 для антигена В, который и был выбран для проведения дальнейших исследований. Для антигена А и БСЖК значения оптического поглощения находились на уровне фонового сигнала в пределах погрешности эксперимента.

Получение рекомбинантных конъюгатов – задача сложная, поскольку на сегодняшний день

невозможно достоверно предсказать структуру получаемого конъюгата. В результате из-за неправильного фолдинга двух составных частей химерного белка возможна потеря функциональной активности [19–22]. Отсутствие взаимодействия исследуемых образцов сывороток с эпитопной последовательностью А можно объяснить как отсутствием соответствующих антител к этому участку петли, так и неправильным фолдингом в составе химерной молекулы. На особенности фолдинга указывает и тот факт, что эпитопная последовательность С включает в себя последовательность А и В, однако демонстрирует гораздо худшее связывание (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

**Выбор антигена для иммобилизации на планшете (представлены данные оптического поглощения при 450 нм)**

Контроль	Иммобилизованный антиген			
	БСЖК	А	В	С
K <sup>+</sup> (23)	0,133	0,131	1,270	0,673
K <sup>-</sup> (4)	0,107	0,097	0,108	0,101
K <sub>ср.</sub> (27)	0,124	0,133	0,322	0,225

## Результаты анализа сывороток

Диагноз	Число (N)	Положительный результат ( $> *K_{\text{порог.}}$ )	«Серая зона» ( $*K_{\text{порог.}} \pm 15\%$ )
Острый инфаркт миокарда (ОИМ)	32	6	3
Ишемическая болезнь сердца (ИБС)	13	1	3
Нестабильная стенокардия (НС)	12	0	1
Аортокоронарное шунтирование (АКШ)	3	0	0
Атриовентрикулярная блокада	1	1	0
Гипертиреоз	8	0	0
Прочие заболевания	7	0	0
Общее количество	76	8	7

$$*K_{\text{порог.}} = 2K^-.$$

Таким образом, был разработан метод ИФА для определения аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору человека с использованием рекомбинантного химерного антигена, содержащего участок 2-й внеклеточной петли рецептора.

**Определение аутоантител против  $\beta_1$ -адренорецептора человека в образцах крови методом ИФА.** Для определения возможности использования разработанной тест-системы было проанализировано 76 сывороток крови пациентов с различными диагнозами (табл. 4). В качестве положительного и отрицательного контроля использовали сыворотки, ранее выбранные в ходе разработки метода. Для оценки результатов анализа использовали критерии, принятые в методах иммуноферментного анализа. Результат считали положительным, если оптическое поглощение превышало значение  $2K^-$ , где  $K^-$  –

отрицательный контроль. Значение оптического поглощения меньше  $2K^-$  расценивали как отрицательный результат. При интенсивности сигнала в интервале  $2K^- \pm 15\%$  результат относили к «серой зоне». На основании изучения 76 образцов было выявлено достоверное превышение уровня аутоантител к  $\beta_1$ -адренорецептору человека у 8 пациентов, а еще 7 образцов попадали в так называемую «серую зону». Следует отметить, что большинство положительных результатов (28%) наблюдалось у пациентов с диагнозом ОИМ.

Таким образом, впервые на основе рекомбинантного эпитопа  $\beta_1$ -адренорецептора человека, полученного в составе химерного белка-носителя, используемого в качестве антигена, был разработан твердофазный иммуноферментный метод определения соответствующих аутоантител в сыворотке крови человека.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang Y., Liu J., Shi L., Chen M., Liu J. // Scand. Cardiovasc. J. 2021. Vol. 55. N 3. P. 160 (DOI: 10.1080/14017431.2020.1869300).
- Shi L., Liu J., Zhang Y., Chen M., Liu J. // BMC Cardiovasc. Disord. 2020. Vol. 20. N 1. P. 269 (DOI: 10.1186/s12872-020-01492-3).
- Bacova B.S., Radosinska J., Wallukat G., Barancik M., Wallukat A., Knezl V., Sykora M., Paulis L., Tribulova N. // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. N 2. P. 526 (DOI: 10.3390/ijms21020526).
- Wang L., Ning N., Wang C., Hou X., Yuan Y., Ren Y., Sun C., Yan Z., Wang X., Liu H. // Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai). 2019. Vol. 51. N 10. P. 1016 (DOI: 10.1093/abbs/gmz089).
- Yu H., Pei J., Liu X., Chen J., Li X., Zhang Y., Li N., Wang Z., Zhang P., Cao K., Pu J. // Disease Markers. 2014. Vol. 2014. Article ID 796075 (DOI: 10.1155/2014/796075).
- Wallukat G., Schimke I. // Semin Immunopathol. 2014. Vol. 36. N 3. P. 351 (DOI: 10.1007/s00281-014-0425-9).
- Becker N.P., Müller J., Göttel P., Wallukat G., Schimke I. // Autoimmunity Reviews. 2017. Vol. 16. N 3. P. 269 (DOI: 10.1016/j.autrev.2017.01.012).
- Dandel M., Wallukat G., Potapov E., Hetzer R. // Immunobiology. 2012. Vol. 217. N 5. P. 511 (DOI: 10.1016/j.imbio.2011.07.012).
- Bornholz B., Roggenbuck D., Jahns R., Boege F. // Au-



- toimmunity Reviews. 2014. Vol. 13. N 9. P. 954 (DOI: 10.1016/j.autrev.2014.08.021).
10. Jahns R., Boivin V., Hein L., Triebel S., Angermann C.E., Ertl G., Lohse M.J. // *J. Clin. Invest.* 2004. Vol. 113. N 10. P. 1419 (DOI: 10.1172/JCI20149).
11. Magnusson Y., Marullo S., Hoyer S., Waagstein F., Andersson B., Vahlne A., Guillet J.G., Strosberg A.D., Hjalmarson A., Hoebeke J. // *J. Clin. Invest.* 1990. Vol. 86. N 5. P. 1658. (DOI: 10.1172/JCI114888).
12. Афанасьева О.И., Клесарева Е.А., Ефремов Е.Е., Сидорова М.В., Беспалова Ж.Д., Левашов П.А., Ежов М.В., Адамова И.Ю., Покровский С.Н. // *Клиническая Лабораторная Диагностика*. 2013. № 4. С. 24. (<https://elibrary.ru/item.asp?id=18923726>).
13. Fu L.X., Magnusson Y., Bergh C.H., Liljeqvist J.A., Waagstein F., Hjalmarson A., Hoebeke J. // *J. Clin. Invest.* 1993. Vol. 91. N 5. P. 1964 (DOI: 10.1172/JCI116416).
14. Holthoff H.P., Zeibig S., Jahns-Boivin V., Bauer J., Lohse M.J., Kääh S., Clauss S., Jahns R., Schlipp A., Münch G., Ungerer M. // *Circ. Res.* 2012. Vol. 111. N 6. P. 675 (DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.272682).
15. Lindbladh C., Mosbach K., Bulow L. // *Trends Biochem. Sci.* 1993. Vol. 18. P. 279.
16. Arai R., Ueda H., Kitayama A., Kamiya N., Nagamune T. // *Protein Eng.* 2001. Vol. 14. P. 592.
17. Markaryan A.N., Mashko S.V., Kukel L.V., Lapidus A.L., Bach A.N., Egorov A.M. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1991. Vol. 646. P. 125.
18. Lindbladh C., Persson M., Bulow L., Stahl S., Mosbach K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987. Vol. 149. P. 607.
19. Smirnova D.V., Rubtsova M.Y., Grigorenko V.G., Ugarova N.N. // *Photochem. Photobiol.* 2017. Vol. 93. N 2. P. 541 (DOI: 10.1111/php.12666).
20. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N., Grigorenko V.G., Frank L.A. // *Photochem. Photobiol.* 2017. Vol. 93. N 2. P. 548 (DOI: 10.1111/php.12648).
21. Grigorenko V., Andreeva I., Borchers T., Spener F., Egorov A. // *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. P. 1134.
22. Koliashnikov O.V., Grigorenko V.G., Egorov A.M., Lange S., Schmid R.D. // *Acta Naturae.* 2011. Vol. 3. N 3. P. 85.
23. Schreiber A., Specht B., Pelsers M.M.A.L., Glatz J.F.C., Borchers T., Spener F. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998. Vol. 36. P. 288.
24. Sidorova M.V., Pal'keeva M.E., Molokoedov A.S., Az'muko A.A., Sekridova A.V., Ovchinnikov M.V., Levashov P.A., Afanas'eva O.I., Berestetskaia Y.V., Afanas'eva M.I., Razova O.A., Bespalova Zh.D., Pokrovskii S.N. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2009. Vol. 35. N 3. P. 285. (DOI: 10.1134/s1068162009030029).
25. Rönspack W., Brinckmann R., Egner R., Gebauer F., Winkler D., Jekow P., Wallukat G., Müller J., Kunze R. // *Ther. Apher. Dial.* 2003. Vol. 7, N 1. P. 91 (DOI: 10.1046/j.1526-0968.2003.00017.x).
26. Wallukat G., Müller J., Hetzer R. // *Specific Removal of  $\beta$ 1-Adrenergic Autoantibodies from Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy* // *N. Engl. J. Med.* 2002. Vol. 347. N 22. P. 1806. (DOI: 10.1056/NEJM200211283472220).

### Информация об авторах

Григоренко Виталий Георгиевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук ([vitaly.grigorenko@gmail.com](mailto:vitaly.grigorenko@gmail.com));

Андреева Ирина Петровна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук ([imtek1@mail.ru](mailto:imtek1@mail.ru));

Мельничук Елизавета Александровна – студентка химического факультета МГУ ([li.mistryukova@gmail.com](mailto:li.mistryukova@gmail.com)); адрес в настоящее время: Headcount AG, Dreikönigstrasse 55, 8002 Zürich, Switzerland.

Левашов Павел Андреевич – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, доктор хим. наук ([levashov@yahoo.com](mailto:levashov@yahoo.com))

### Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.09.2022;  
одобрена после рецензирования 12.10.2022;  
принята к публикации 14.11.2022.