



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103141** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2012 12693	(72) Винахідник(и): Ткаченко Яніна Вікторівна (UA), Воробйова Ганна Михайлівна (UA), Сидорик Людмила Леонідівна (UA), Яковенко Людмила Федорівна (UA), Ємець Ілля Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.11.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.09.2013	
(41) Публікація відомостей про заяву: 25.04.2013, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ МЕДИЧНИЙ ЦЕНТР ДИТЯЧОЇ КАРДІОЛОГІЇ ТА КАРДІОХІРУРГІЇ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ", вул. Чорновола, 28/1, м. Київ, 01135 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2013, Бюл.№ 17	(74) Представник: Хоменко І. І.
	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Shamaei-Tousi A et al: "Plasma heat shock protein 60 and cardiovascular disease risk: the role of psychosocial, genetic, and biological factors" Cell Stress Chaperones, vol. 12, no. 4, 2007 Winter, pages 384-392 Cappello F et al: "Chlamydia trachomatis infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin" PLoS Pathogens, vol.5, no. 8, 2009 August 28; e1000552. doi:10.1371/journal.ppat.1000552 Анти Hsp60 антитіла у новонароджених зі складними вродженими вадами серця при застосуванні компонентів пуповинної та донорської крові / Ткаченко Я., Яковенко Л., Жовнір В., Часовський К., Федевич О., Капустян Л., Саламаніна А., Воробйова Г., Сидорик Л., Ємець І. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2011. – Випуск 14. – С.24-28

(54) ЗАСТОСУВАННЯ АНТИ-HSP60 АНТИТІЛ ЯК МАРКЕРІВ ІМУННОЇ БЕЗПЕКИ ПРОВЕДЕННЯ ГЕМОТРАНСFUЗІЙ У КАРДІОХІРУРГІЇ ВРОДЖЕНИХ ВАД СЕРЦЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується застосування анти-HSP60 антитіл сироватки крові донорів як маркерів імунної безпеки проведення гемотрансфузій в кардіохірургії вроджених вад серця.

UA 103141 C2

Винахід належить до молекулярної біології, імунології, медицини, зокрема до способу визначення нових маркерів безпеки гемотрансфузій у кардіохірургії вроджених вад серця.

HSP60 людини - молекулярний шаперон, який залежно від локалізації може виконувати різні функції. У мітохондріях HSP60 за допомогою ко-шаперону HSP10 забезпечує правильну укладку клітинних білків, при стресі - запобігає їх неправильному згортанню та агрегації. Цитоплазматичний HSP60 виконує антиапоптичну функцію [1, 2]. Присутність HSP60 на клітинній мембрані асоційована з мембранним транспортом та сигнальними процесами [3]. Підвищення рівня мембраннозв'язаного HSP60 вважається сигналом небезпеки для імунної системи [4]. HSP60 також секретується із клітин, виявляється у плазмі [5].

Відомо, що на клітинній поверхні кардіоміоцитів, HSP60 експресується лише після дії стресових факторів, у тому числі при гіпоксії [1] та хірургічному втручанні [6]. На культурі неонатальних кардіоміоцитів було показано, що HSP60 може секретуватись у позаклітинний простір екзосомальним шляхом, причому за стресових умов цей процес посилюється [5]. Підвищена експресія HSP60 захищає клітини та органи, включаючи серце, від негативних стресових чинників [7, 8]. Встановлено, що попередня індукція HSP60 у серці помірним стресом забезпечує протективний ефект проти більш сильного стресу [9, 10]. З іншого боку, підвищена експресія HSP60 на мембрані кардіоміоцитів, а також його наявність у позаклітинному просторі може представляти потенційну мішень для перехресно-реактивних антитіл до мікробних HSP60, які можуть бути у донорській крові, що використовується при хірургічній корекції вроджених вад серця (BBC). Показано, що такі анти-HSP60 антитіла можуть опосередковувати комплементзалежну цитотоксичність, зумовлювати лізис або апоптоз клітин, що експресують на своїй поверхні ендogenous HSP60. Анти-HSP60 здатні формувати імунні комплекси з ендogenous HSP60 і зумовлювати активацію комплементу [11]. Вони також можуть зв'язувати циркулюючий у плазмі крові ендogenous HSP60 і утворювати імунні комплекси з патологічним впливом на тканини [12]. Експериментально було показано, що моноклональні анти-HSP60 антитіла підсилювали запальні реакції, індуковані HSP60 [13]. Встановлено зв'язок між наявністю у доопераційний період циркулюючих анти-HSP60 антитіл у дорослих пацієнтів з операціями на серці та розвитком у післяопераційному періоді фібриляції передсердя (atrial fibrillation) [6].

Відповідно до пп. 3.2.1. Порядку медичного обстеження донорів крові та (або) її компонентів Закону України "Про донорство крові та її компонентів" (Відомості Верховної Ради України (ВВР), 1995, № 23, ст.183): Перед здаванням крові у донора визначається вміст гемоглобіну та (або) гематокрит, група крові за системою АВ0. Подальше обстеження взятої донорської крові проводиться у лабораторіях закладів переливання крові за такими показниками: група крові та резус-належність, Rh-типизація, визначення антиеритроцитарних антитіл; маркерів ВІЛ-1/2;

маркерів гепатиту С;

маркерів гепатиту В;

маркерів до сифілісу;

активність аланін-амінотрансферази (АЛТ).

Проте, дослідження донорської крові на особливо небезпечні інфекції не дає можливості повноцінно оцінити здатність донорської крові виконувати найважливіші функції не порушуючи імунної системи реципієнта. Саме чужорідні антитіла, які потрапляють із крові донора, здатні викликати імунні розлади, які приводять до певних дисфункцій і проявляються у вигляді клінічних ускладнень після гемотрансфузій, іноді вони можуть бути незворотні.

Анти-HSP60 антитіла, присутні у сироватці крові донорів, можуть потрапляти в організм реципієнта і спричинювати різні імунні дисфункції, зв'язувати циркулюючий у плазмі крові ендogenous HSP60 і утворювати імунні комплекси з патологічним впливом на тканини [12, 14]. Експериментально було показано, що моноклональні анти-HSP60 антитіла підсилювали запальні реакції, індуковані HSP60 [13].

Відомий спосіб дослідження властивостей білка теплового шоку (бтш70) (патент РФ № 2334988, МПК (2006.01) G01N33/68, опубліковано: 27.09.2008), під час якого визначають активність білка теплового шоку (БТШ70), для чого готують переживаючі зрізи нервової тканини мозку, інкубаційне середовище для зрізів, проводять вимірювання і зіставлення параметрів біоелектричної активності до і після тестуючих впливів. А саме, у приготованих зрізів реєструють вихідні параметри амплітуди N-метил-О-аспартатного збудливого постсинаптичного потенціалу (НМДА ВПСП), для визначення амплітуди НМДА ВПСП зрізи стимулюють електричними імпульсами прямокутної форми, тривалістю 0,1 мс, інтенсивністю 10 В, з частотою 1 імпульс у хвилину, далі аплікують (БТШ70) на всі зрізи в концентрації 1 мкг/мл, потім зрізи однієї групи тетанізують електричними імпульсами з частотою 100/с, тривалістю 30 с, зрізи

іншої групи піддають аноксичному впливові шляхом заміни кисневої атмосфери на азот протягом 10 хв., у всіх зрізах вимірюють амплітуду НМДА ВПСП після впливів.

Однак, даний спосіб не дає можливості визначити біологічну активність саме анти-HSP60 антитіл, їх здатності розпізнавати антиген-мішень у лізатах передсердь новонароджених з транспозицією магістральних судин (ТМС).

Авторами під час проведення патентно-інформаційних досліджень і підготовки заявки не виявлені способи визначення нових маркерів безпеки гемотрансфузій у кардіохірургії вроджених вад серця.

В основу винаходу поставлена задача створення такого способу визначення нових маркерів безпеки гемотрансфузій у кардіохірургії вроджених вад серця, який би дав можливість визначити імунологічну безпечність використання донорської крові та доказати переваги аутологічної пуповинної крові в кардіохірургії вроджених вад серця.

Поставлена задача вирішуються тим, що визначення нових маркерів безпеки гемотрансфузій у кардіохірургії вроджених вад серця, який включає забір венозної крові у новонароджених з транспозицією магістральних судин до операції, її заморожування при температурі 38-40 °С, проведення операції "артеріального переключення" з використанням аутологічної пуповинної крові для пацієнтів першої групи і застосування компонентів донорської крові для пацієнтів другої групи, забір біоптату з правого передсердя під час операції і заморожування його при температурі 38-40 °С, забір венозної крові на першу, третю, сьому добу після операції, центрифугування її і заморожування сироватки крові при температурі 38-40 °С, імунологічне дослідження по визначенню кількості анти-HSP60 антитіл в сироватці крові у новонароджених з транспозицією магістральних судин на всіх етапах дослідження до операції та на першу, третю, сьому добу після неї, визначення експресії HSP60 в сумарному лізаті біоптату правого передсердя новонароджених з транспозицією магістральних судин методом імуноблотингу, проведення скринінгу сироватки крові здорових донорів на наявність анти HSP60-антитіл, визначення найбільш імунореактивних до HSP60 сироваток, афінне очищення анти-HSP60 антитіл з найбільш імунореактивних до HSP60 сироваток донорів та новонароджених з транспозицією магістральних судин, визначення біологічної активності анти-HSP60 антитіл, проведення статистичної обробки отриманих даних, проведення кореляційного аналізу між імунологічними та клінічними показниками, за результатами досліджень визначення нових маркерів безпеки гемотрансфузій в кардіохірургії вроджених вад серця. Суть пропозиції пояснюється на схематичних кресленнях:

Суть винаходу пояснює креслення.

На фіг. 1 показано процент антитілопозитивних сироваток до анти-HSP60 у новонароджених з ТМС, яким під час операції застосовували кордову кров та компоненти донорської крові.

На фіг. 2 показано рівень анти-HSP60 антитіл в сироватках крові донорів.

На фіг. 3 показано HSP60-імунореактивність сироваток крові донорів, яку підтверджували методом імуноблотингу, де № 1- маркер, № 2-HSP60 оброблений поліклональними антитілами до HSP60 миші, № 3-7 - сироватка донорів з високою анти-HSP60 реактивністю, № 8-12 - сироватка донорів з низькою анти HSP60 реактивністю.

На фіг. 4 представлено результати досліджень рівня експресії HSP60 у передсерді новонароджених з ТМС, яким переливали пуповинну (1 група, n = 4) або донорську кров (2 група, n = 14), де № 1-4, 6-14 Лізати правого передсердя новонароджених оброблені поліклональними анти-HSP60 антитілами, № 5 - маркер.

На фіг. 5 представлено результати досліджень рівня експресії HSP60 у передсерді новонароджених з ТМС, яким переливали пуповинну (1 група, n = 4) або донорську кров (2 група, n = 14), де № 1-7, 8-9 Лізати правого передсердя новонароджених оброблені анти-HSP60 антитілами афінноочищеними з найбільш імунореактивних сироваток донорів.

На фіг. 6 графічно представлено післяопераційна гіпертермія у пацієнтів з перелитою донорською кров'ю по підгрупах (1-A, 1-B, 1-C, 1-D) з антитілопозитивною та антитілонегативною сироваткою крові до HSP60 у відсотках.

Спосіб визначення нових маркерів безпеки гемотрансфузій в кардіохірургії вроджених вад серця проводили наступним чином:

Об'єкт дослідження 122 новонароджених, із них 99 з транспозицією магістральних судин, розділені на дві групи:

Перша група новонароджених з транспозицією магістральних судин (N = 34), включала: пренатально встановлений діагноз, застосування аутологічної пуповинної крові під час оперативного втручання.

Друга група новонароджених з транспозицією магістральних судин (N = 65), включала: постнатально встановлений діагноз, застосування донорської крові під час оперативного втручання.

Третя група практично здорові новонароджені (N = 23).

1. Проводили забір венозної крові у новонароджених з транспозицією магістральних судин до операції, заморожували сироватку крові при t -40 °C.

2. Проводили операцію "артеріальне переключення" новонародженим з ТМС з використанням в 1-й групі аутологічної пуповинної крові, в 2-й групі компоненти донорської крові.

3. Проводили забір біоптату з правого передсердя у новонароджених з ТМС, під час операції, матеріал заморожували при t -40 °C.

4. Проводили забір венозної крові у новонароджених з транспозицією магістральних судин після операції на 1-у, 3-ю, 7-у добу, відбирали сироватку крові і заморожували при t -40 °C.

5. Проводили імунологічне дослідження по визначенню рівнів антитіл до білка HSP60 в сироватці крові новонароджених з ТМС до операції, на 1-у, 3-ю, 7-у добу після неї методом ELISA.

6. Проводили забір венозної крові у здорових донорів (123n), кров яких переливали новонародженим під час операції "артеріального переключення" з використанням апарата штучного кровообігу. Досліджували вміст анти-HSP60 антитіл в сироватці крові донорів.

7. На наступному етапі роботи найбільш імунореактивні до HSP60 сироватки донорів були афінно очищені з використанням ProteinG-сефарози для подальшого дослідження їх біологічних властивостей. Також були почищені найбільш імунореактивні до HSP60 сироватки новонароджених з ТМС (Табл. 1), для цього сироватки в загальному об'ємі 480-500 мкл розводили буфером РВС (4 мл) та фільтрували через Millipore фільтр (0,45 мн). Колонку врівноважували буфером PBS. Профільтровані сироватки 4 рази пропускали через колонку, потім наносили на колонку та інкубували 1 год. при кімнатній температурі. Колонку відмивали від білка, що не зв'язався, буфером PBS. Елюцію зв'язаного білка проводили 0,2 М гліциновим буфером, рН 2,5, з наступною нейтралізацією рН розчином 1 М Трис, рН 7,0. Пікові фракції антитіл діалізували проти буфера PBS протягом ночі при 4 °C. Антитіла зберігали з додаванням 1 мМ азиду натрію при +4 °C.

Таблиця 1

Концентрація IgG антитіл, почищених на ProteinG сефарозі з найбільш імунореактивних до HSP60 сироваток

N п/п	Групи пацієнтів	Концентрація афінно очищених на ProteinG сефарозі IgG антитіл
1	Донори	C = 1,04 мг/мл
2	Донори	C = 0,93 мг/мл
3	Новонароджені з ВВС, яким переливали донорську кров, до операції (рівень анти-Hsp60 антитіл підвищений)	C = 0,87 мг/мл
4	Новонароджені з ВВС, яким переливали донорську кров, 8 доба після операції (до операції рівень анти-HSP60 антитіл підвищений)	C = 1,0 мг/мл
5	Новонароджені з ВВС, яким переливали донорську кров, 8 доба після операції (до операції рівень анти-HSP60 антитіл в нормі)	C = 0,37 мг/мл
6	Новонароджені з ВВС, яким переливали пуповинну кров, до операції	C = 0,89 мг/мл
7	Новонароджені з ВВС, яким переливали пуповинну кров, 8 доба після операції	C = 0,61 мг/мл

8. Одержували сумарний лізат із тканини правого передсердя міокарду. Тканину правого передсердя новонароджених з ТМС (m = 10-14 мг) промивали в PBS буфері та обережно гомогенізували у фарфоровій ступці з додаванням кварцового піску, всі процедури здійснювали на льоду. Використовували Rіра буфер: 20 мМ Трис-HCl, рН 7,5; 150 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1 % NP-40; 1 % дезоксихолат натрію; 0,1 % додецилсульфат натрію; 0,1 % SDS, 0,1 % розчин суміші інгібіторів протеаз (Sigma, США), PMSF. Екстракцію проводили протягом 30 хв. при +4 °C. Гомогенат центрифугували (14000 × g, 30 хвилин при +4 °C). Надосад обережно переносили в

полістиролову мікропробірку і вимірювали концентрацію білка в лізаті на спектрофотометрі при 280 нм. Лізат зберігали при -20 °C.

9. Досліджували рівень експресії HSP60 у передсерді новонароджених з TMC, яким переливали пуповинну або донорську кров. Для цього:

5 - проводили електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі (ПААГ). Електрофорез отриманих лізатів проводили у 12 % ПААГ-SDS у денатуруючих умовах за Леммлі. У лунки ПААГ пластини наносили зразки, вирівняні по концентрації білка (5 мкг/мкл) та по об'єму (по 15 мкл на доріжку). До досліджуваних зразків додавали 1/4 об'єму Sample буфера (500 мМ Трис-HCl, pH 6,8; 2 % додецилсульфату натрію (SDS); 5 % 2-меркаптоетанолу; 0,1 % барвника бромфенолового синього). Зразки прогрівали (5 хв., 95 °C) і наносили на гель. Після електрофорезу гель використовували для електропереносу на нітроцелюлозу BA-85 (ShleicherandShull), після чого гель фарбували для контролю переносу білків буфером, який містив 0,2 % CoomassiebrilliantR-250 в 45 % етанолі та 10 % оцтової кислоти, упродовж ночі при кімнатній температурі, або 30-60 хв. при температурі 90 °C. Надлишок фарби відмивали

10

15 буфером, що містив 10 % оцтової кислоти та 5 % етанолу при перемішуванні до появи чітких білкових зон.

- проводили вестерн-блот аналіз (імуноблотинг). Після електрофорезу гель прикладали до нітроцелюлозної мембрани і переносили білки протягом 1 години при 180 мА на приладі для напівсухого перенесення CSLSemiDryMiniSystem "CleaverScientificLtd" (США), з використанням буфера, що містив 200 мМ гліцину, 25 мМ Трис-HCl, pH 7,4 і 20 % метанолу. Потім вільні сайти адсорбції на мембрані блокували 5 % розчином знежиреного молока в буфері PBS-T протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього її інкубували протягом ночі з поліклональними анти-GroEl антитілами у розчині PBS-T-5 % знежирене молоко (100 мкл антитіл [C = 1 мг/мл] на 5 мл буфера). Надлишок антитіл відмивали PBS-T 3 рази по 10 хвилин. Далі мембрану інкубували 1 годину при кімнатній температурі з вторинними антитілами у розведенні 1:5000 (Jackson, GreatBritain) в PBS-T. Надлишок антитіл відмивали PBS-T. Для візуалізації результату блотингу мембрану вимочували впродовж 5 хвилин в ECL реагенті (1,25 мМ люмінол, 0,45 мМ кумарова кислота, 0,015 % H₂O₂ в 100 мМ Трис-HCl, pH 8,5) і експонували на рентгенівську плівку.

20

25

10. Для визначення, які взаємозв'язки можуть утворювати анти-HSP60 антитіла із клінічними маркерами і як це клінічно проявляється, проводили кореляційний аналіз між деякими досліджуваними клінічними показниками і кількістю антитіл в сироватці крові новонароджених 2-ї групи. Друга група новонароджених, яким переливалась донорська кров, була поділена на підгрупи: 1A - пацієнти, які як до операції, так і після неї мали високі титри анти-HSP60 антитіл в сироватці крові;

30

35

1B - діти які до операції мали низькі титри анти-HSP60 антитіл в сироватці, після операції мали антитілопозитивну сироватку крові;

1C - новонароджені, які як до, так і після операції мали низькі титри анти-HSP60 антитіл;

1D - діти які до операції мали низькі титри анти-HSP60 антитіл в сироватці, а після операції їх кількість зростала і вони мали як підвищені, так і високі анти-HSP60 антитіла в сироватці крові.

40

За результатами способу визначення нових маркерів безпеки гемотрансфузій в кардіохірургії вроджених вад серця при дослідженні сироваток крові новонароджених з TMC на наявність анти-HSP60 у після операційний період підвищений рівень анти-HSP60 антитіл виявлявся лише у новонароджених 2-ї групи, яким переливали донорську кров (у 40 % випадків), тоді як у новонароджених 1-ї групи, яким переливали пуповинну кров у післяопераційний період анти-HSP60 позитивні сироватки не детектувались (Фіг. 1). Антитілопозитивною вважали сироватку m+2SD. До операції ми бачимо що антитілопозитивні до HSP60 сироватки крові зустрічались як в 1-й так і в 2-й групі пацієнтів, ці антитіла діти отримали від матері трансплацентарно.

45

50

У післяопераційному періоді у антитілопозитивних до операції новонароджених 1-ї групи, яким переливали аутологічну пуповинну кров, спостерігалось поступове зниження рівня анти-HSP60 антитіл в сироватці крові, що свідчить про те що дані антитіла поступово руйнуються в організмі дитини. Слід відмітити, що в жодного пацієнта цієї групи не спостерігалось зростання рівня таких антитіл. Тоді як у частини новонароджених, яким переливали донорську кров, у післяопераційний період, навпаки спостерігалось зростання рівня анти-HSP60 антитіл, причому, деякі пацієнти ставали антитілопозитивними, отримавши донорську кров та плазму.

55

Авторами було проведено кореляційний аналіз між кількістю перелитої чужорідної плазми новонародженим 2-ї групи та кількістю анти-HSP60 антитіл в сироватці крові дітей 2-ї групи на 1-у та 3-ю добу після операції і виявлено позитивну кореляцію $r = 0,37$ (на 1-у добу), $r = 0,4$ (на 3-ю

60

добу). Тобто, чим більша кількість плазми вливалась тим вищими були рівні анти-HSP60 антитіл в сироватці крові новонароджених. Проведення кореляції між перелитою пуповинною кров'ю та кількістю анти-HSP60 антитіл у новонароджених 1-ї групи показало негативну кореляцію на 3-ю добу після операції $r = -0,39$, між кількістю перелитої пуповинної крові на 1 кг маси тіла дитини і кількістю анти-HSP60 антитіл в сироватці також отримали негативну кореляцію, де $r = -0,42$, що свідчить про те, що власна пуповинна кров впливає на руйнування антитіл до HSP60, чим більше її вливаєш, тим нижче вміст анти-HSP60 антитіл в сироватці крові. Досліджували рівень експресії HSP60 у передсерді новонароджених з ТМС, яким переливали пуповинну (1 група, $n = 4$) або донорську кров (2 група, $n = 14$), - результати представлено на Фіг. 4, 5.

Отримані авторами результати, які представлені на Фіг. 5, свідчать, що IgG антитіла, почищені з найбільш імунореактивних до HSP60 сироваток донорів на ProteinG-сефарозі, проявляли свою біологічну активність, розпізнаючи в лізатах передсердь новонароджених з ТМС білок з молекулярною вагою близько 60 кДа, що відповідає молекулярній вазі досліджуваного шапероніну HSP60. Це свідчить, що анти-HSP60 антитіла, потрапляючи в організм реципієнта із донорської крові, здатні зв'язуватись з білком HSP60 на поверхні кардіоміоцитів, де їх кількість значно перевищує за інші клітини, особливо після стресу, яким може бути операція на серці, коли цитоплазматичний HSP60 експресується на поверхні клітини і виходить у позаклітинний простір. Зв'язуючись з HSP60 на поверхні клітини анти-HSP60 антитіла можуть опосередковувати комплементзалежну цитотоксичність, зумовлювати лізис або апоптоз клітин, що експресують на своїй поверхні ендogenous HSP60. Анти-HSP60 здатні формувати імунні комплекси з ендogenous HSP60 і зумовлювати активацію комплементу [11].

Скринінг сироваток крові здорових донорів показав, що анти-HSP60 антитіла виявлено у всіх донорів ($n = 123$, віком від 20 до 48 років) Фіг. 2. За результатами проведених досліджень у 6,5 % обстежених донорів сироватки були антитілопозитивними, у 21 % анти-HSP60 антитіла були вищими більше, ніж в 2 рази за показник середнього значення. Антитілопозитивною вважали сироватку $m+2SD$.

Авторами встановлена кореляція між перелитою донорською кров'ю пацієнтам 2 групи та перебуванням їх в стаціонарі $r = 0,54$, $p < 0,05$. Чим більше перелито чужорідної крові, тим довше пацієнти перебували в стаціонарі. Виявлена достовірна різниця між групами в періоді перебування в стаціонарі (1 група -14 діб, 2 група - 18 діб). За клінічними показниками новонароджені 2-ї групи в післяопераційний період мали ускладнення, такі як довготривала гіпертермія та ускладнення з боку дихальної системи.

2-га група новонароджених була поділена на підгрупи (1-A, 1-B, 1-C, 1-D) за наявністю високого або низького вмісту анти-HSP60 антитіл в сироватці крові. При проведенні статистично-логічного аналізу за наявністю гіпертермії у пацієнтів досліджуваних підгруп виявлено: в підгрупі 1-A після операції підвищення температури тіла зустрічалося у 79 % випадках, в підгрупі 1-B післяопераційна гіпертермія у 87,5 % дітей, в підгрупі 1-C у 47,2 % новонароджених, в підгрупі 1-D у 78 % випадків. Фіг. 6. Отримані авторами результати, які представлені на Фіг. 6, свідчать, що найвищий процент зустрічальності високої температури тіла у новонароджених 2-ї групи у підгрупах 1-A, 1-B, 1-D, саме у тих пацієнтів, які на післяопераційному етапі мали високі титри анти-HSP60 антитіл в сироватці крові. Найвища відсоткова цифра в підгрупі 1-B, де новонароджені не мали високого сироваткового вмісту анти-HSP60 антитіл до операції, але після переливання донорської крові кількість анти-HSP60 антитіл значно виросла. В підгрупі 1-C найменша кількість новонароджених з гіпертермією, вони мали низькі рівні анти-HSP60 антитіл в сироватці крові як до, так і після операції. Ці дані свідчать про однозначний вплив анти-HSP60 антитіл на розвиток запальних процесів в організмі, пов'язаних з гіпертермією.

Статистично-логічний аналіз по підгрупах (1-A, 1-B, 1-C, 1-D) за деякими клінічними показниками представлений в табл. 2.

Таблиця 2

Клінічні показники в підгрупах (1-A, 1-B, 1-C, 1-D) 2-ї групи новонароджених з ТМС

2-га група новонароджених поділена на підгрупи	ІЛ-8 на 8 добу після операції (пг/мл)	Години перебування у відділенні реанімації (год.)	Кількість днів антибіотикотерапії
1-A	*84,3±81	187	8,5±5,6
1-B	*73,5±72	171	8,3±2,3
1-C	*43,3±29	155	7±5
1-D	*70,2±65	165	7,9±4,9

* різниця статистично достовірна між групами 1-A, B, D та групою 1-C, $p < 0,002$.

Відповідно до даних таблиці, в підгрупах є статистично достовірна різниця за ІЛ-8 між 1-C - антитілонегативними пацієнтами і 1-A, B, D - пацієнтами з антитілопозитивною сироваткою (після операції) до HSP60. Також спостерігається така сама тенденція між групами за кількістю днів антибіотикотерапії і перебуванням пацієнтів у відділенні реанімації.

За даними дослідженнями зроблено висновок, що циркуляція підвищених рівнів HSP60 в сироватці крові новонароджених з ТМС, які вони отримали із донорської крові під час проведення операції, приводить до певних системних порушень, які в свою чергу супроводжуються клінічними ускладненнями, інтоксикацією і більш вираженою тяжкістю перебігу післяопераційного періоду.

Тобто, переливаючи донорську кров з високими титрами анти-HSP60 антитіл в організм дитини, її піддають ризику функціонального розладу в імунній системі та ризику розвитку аутоімунних процесів в подальшому.

За допомогою застосування способу визначення нових маркерів безпеки гемотрансфузій в кардіохірургії вроджених вад серця визначено, що саме маркером імунної безпеки проведення гемотрансфузій в кардіохірургії вроджених вад серця є рівні анти-HSP60 антитіл в сироватці крові, яку отримує пацієнт під час операції.

Визначення анти-HSP60 антитіл в сироватці крові донорів може слугувати критерієм використання крові для трансфузій не тільки в дитячій кардіохірургії, але і при інших патологіях.

1. Gupta, S. and A.A. Knowlton \Cytosolic HSP60, Hypoxia, and Apoptosis. \Circulation 2002. 106:2727-2733.

2. Gupta, S. and A.A. Knowlton. \ HSP60. Bax, Apoptosis and the Heart. J. Cell. Mol. Med. 2005. 9:51-58.

3. Soltys BJ, Gupta RS. \ Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (HSP60) in mammalian cells. / Cell Biol Int. 1997 May; 21(5):315-20.

4. Osterloh A, Meier-Stiegen F, Veit A, Fleischer B, von Bonin A, Breloer M. \Lipopolysaccharide-free heat shock protein 60 activates T cells / J Biol Chem. 2004 Nov. 12; 279(46):47906-11.

5. Gupta, S., A.A. Knowlton / HSP60 Trafficking in Adult Cardiac Myocytes: Role of the Exosomal Pathway. \ J. Physiol. 2007. 292:H3052-6.

6. Mandal K, Jahangiri M, Mulhin M, Poloniecki J, Camm AJ, Xu Q. \Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillationA Circulation. 2004; 110: 2588-2590.

7. Pockley A. \Heat shock proteins inflammation, and cardiovascular diseases\ Circulation.-2002. 105.-P.1012-1017.

8. Xu Q. \Role of heat shock proteins in atherosclerosis. \Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 2002 Oct 1;22 (10): 1547-59.

9. Donnelly, C.E., G.C. Walker \ Coexpression of UmuD' with UmuC suppresses the UV mutagenesis deficiency of groE mutants. \ J.Bacteriol. 1992. 174:3133-3139.

10. Currie, R.W., Tanguay, R.M. and Kingma, J.G. Jr.: Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. \Circulation 1993. 87, 963-971.

11. Yokota SI, Hirata D, Minota S, Higashiyama T, Kurimoto M, Yanagi H, Yura T, Kubota H. \Autoantibodies against chaperonin CCT in human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other HSP60 family proteins. \Cell Stress Chaperones. 2000 Oct; 5(4):337-46.

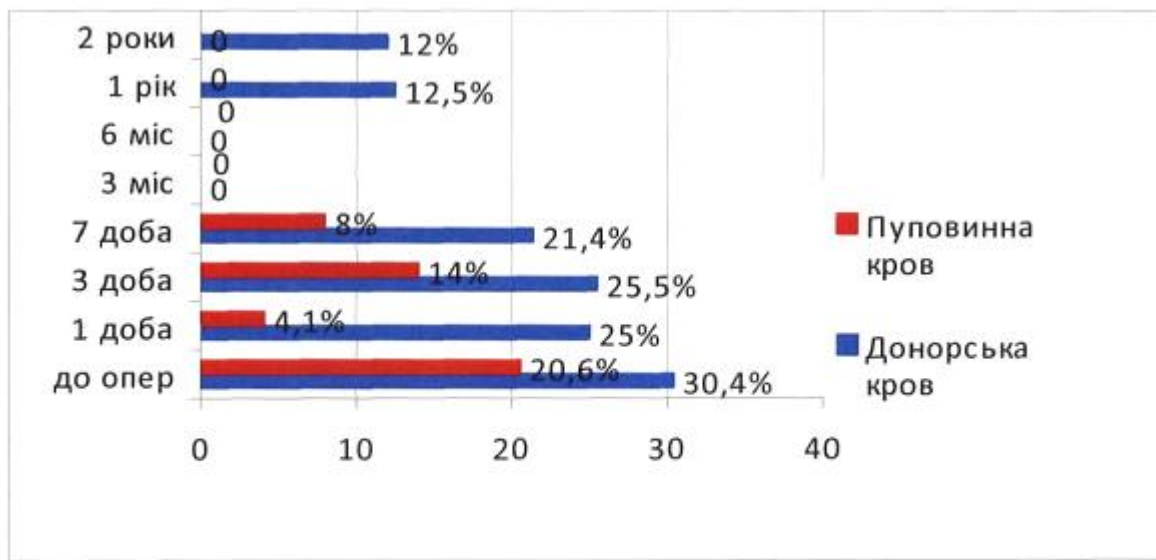
12. Cappello F., de Macario E., Di Felice V. et al. Chlamydia trachomatis infection and anti-HSP60 immunity: the two sides of the coin // Plos. Pathogens. - 2009. - Vol. 5, N 8. - P. 1-9.

13. Yokota S., Minota S., Nobuhiro F. Fnti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced proinflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors \ Intern. Immun. - 2006. - 18. - P. 573-580.

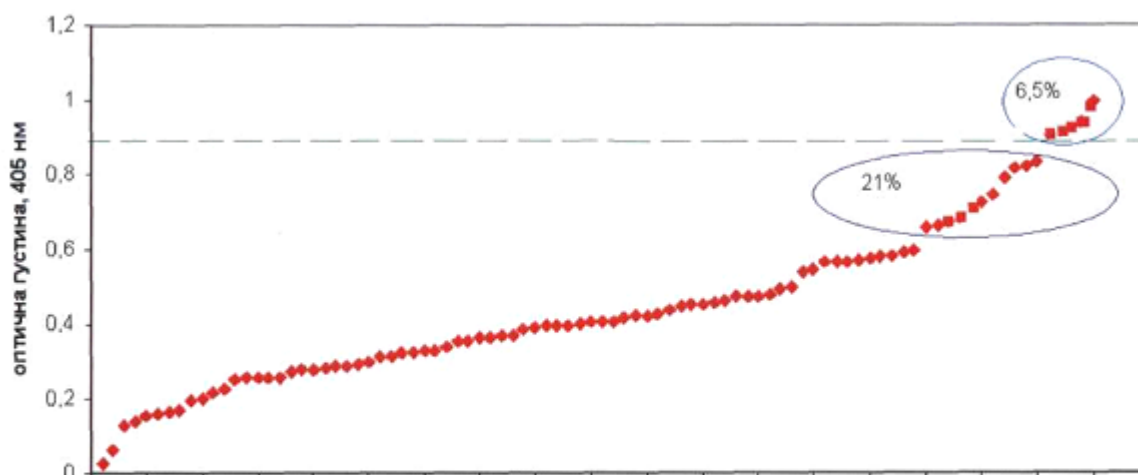
14. Shamaei-Tousi A., Steptoe A., Donnel O., Plasma K. / Plasma heat shock protein 60 and cardiovascular disease risk: the role of psychosocial, genetic, and biological factor // 2007. CM Stress Chaperon 12:384-392.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 10 Застосування анти-HSP60 антитіл сироватки крові донорів як маркерів імунної безпеки проведення гемотрансфузій в кардіохірургії вроджених вад серця.



Фиг. 1

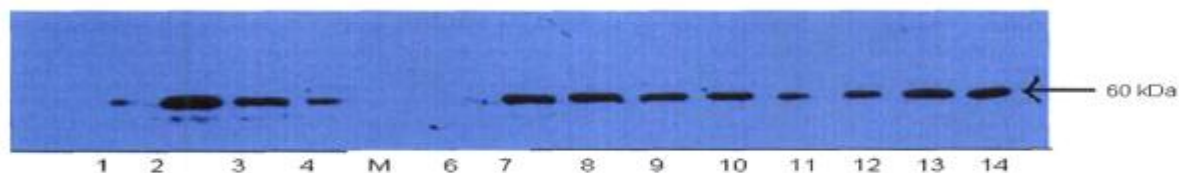


Фиг. 2



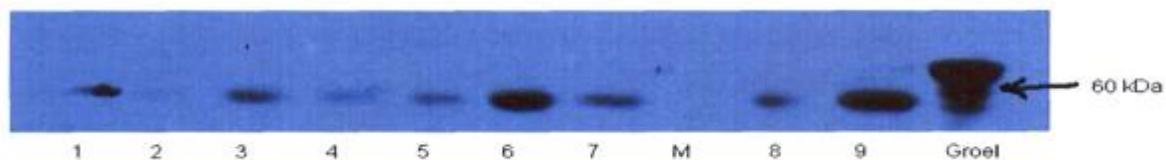
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Фиг. 3



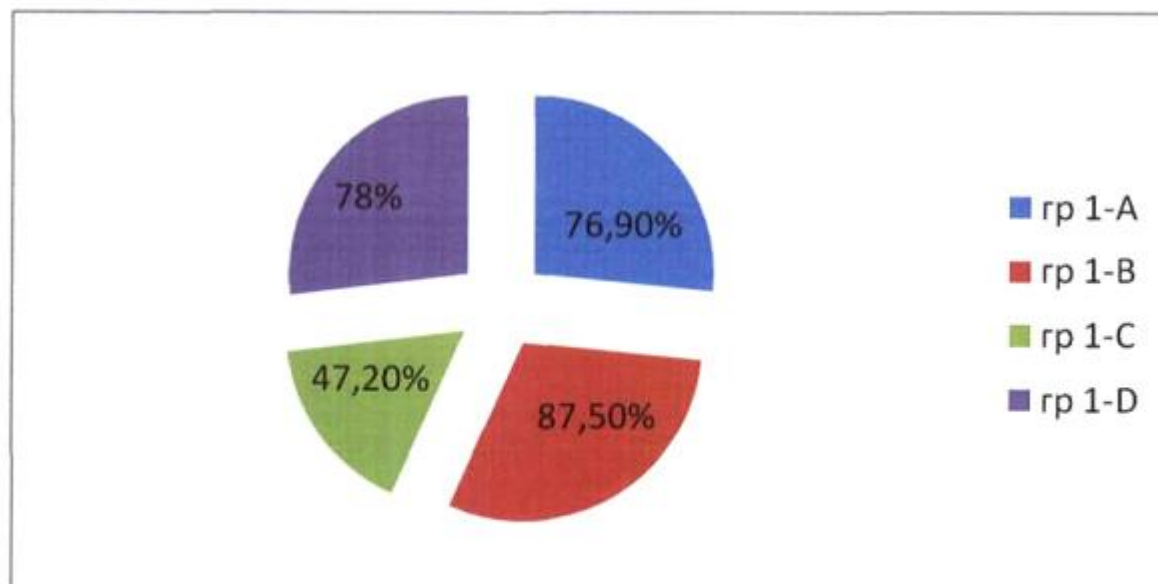
1 2 3 4 M 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Фиг. 4



1 2 3 4 5 6 M 8 9 Groel

Фиг. 5



Фиг. 6

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601