

LIFE SCIENCES. Health Care Sciences

ORIGINAL RESEARCH

Вибір тактики лікування хворих на міастенію різного віку
в залежності від показників імунорезистентності

Вклад Авторів:

A – Study design;
B – Data collection;
C – Statistical analysis;
D – Data interpretation;
E – Manuscript preparation;
F – Literature search;
G – Funds collection

Бойко В. В.^{1,2 DE}, Клімова О. М.^{1 BD}, Лавінська О. В.^{1 BD},
Дроздова Л. А.^{1 BD}, Мінухін Д. В.^{2 ABCDEFG}, Євтушенко Д. О.^{2 DEF}

¹ ДУ “Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В. Т. Зайцева НАМН України” (ДУ “ІЗНХ” ім. В. Т. Зайцева НАМНУ), Харків, Україна

² Харківський національний медичний університет (ХНМУ), Україна

Отримано: 02.09.2019; Прийнято: 24.09.2019; Опубліковано: 30.09.2019

Вступ та Мета дослідження:	Анотація Міастенія – захворювання, характеризується патологічною м'язовою слабкістю і підвищеною стомлюваністю різних груп м'язів і прогресуючим типом перебігу. Мета дослідження: з'ясувати діагностичної значущості вмісту прозапальних цитокінів, репертуару автоантитіл і характеру експресії кластерів диференціювання CD при різних клінічних фенотипах міастенії для вибору тактики лікування.
Матеріали і Методи:	Досліджено патогенетичну роль антитіл до нікотинових ацетилхолінових рецепторів (НАХР) та специфічних антинуклеарних антитіл (АНА) до певних ядерних структур, експресію кластерів диференціювання клітин і концентрацію цитокінів в механізмах формування різних фенотипів автоімунної міастенії.
Результати:	Максимальний рівень антитіл до $\alpha 1$ -субодиниці НАХР виявлено у пацієнтів з гіперплазією тимусу (МГ). При міастенії на тлі тимом (МТ) виявлено наявність нових молекулярних мішеней автоімунної агресії антитіл (АНА) до структур, які беруть участь в мітотичному поділі клітин: до центромер, до центромерного білку F, центросомного білку ахроматинового веретена NuMa. У пацієнтів з міастенією без ураження тимусу (М) виявлено зниження субпопуляції клітин CD4+CD28+, що, вочевидь, перешкоджає коstimulatory сигналіngu відносно інших клітин та індукує взаємодію між Т- і В-клітинами при розвитку автоімунної відповіді до багатьох тимусзалежних антигенів. В групі МГ виявили багаторазове зниження субпопуляції регуляторних Т-лімфоцитів CD4+CD25+, які здатні пригнічувати розвиток автоімунних процесів.
Висновки:	Вибір тактики лікування хворих при різних клінічних фенотипах міастенії повинен проводитись з урахуванням спрямованості зміни показників імунорезистентності – наявності специфічних ААТ, коливань цитокінового профілю та зміни експресії клітинних рецепторів та залежно від віку пацієнтів.
Ключові слова:	міастенія, автоантитіла, нікотиновий ацетилхоліновий рецептор, кластери диференціювання, цитокіни.
Копірайт:	© 2019 Бойко В. В., Клімова О. М., Лавінська О. В., Дроздова Л. А., Мінухін Д. В., Євтушенко Д. О. Опубліковано в архівах Міжнародного журналу освіти і науки DOI 10.26697/ijes.2019.3.4; УДК 616.74-009.17-08:577.27
DOI та УДК	
Конфлікт інтересів:	Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів
Рецензування:	Подвійне “сліпе”
Джерело фінансування:	Науково-дослідна робота (держреєстрація № 0116U004991 / 08.04.2016)
Інформація про авторів:	Бойко Валерій Володимирович – https://orcid.org/0000-0002-3455-9705 ; доктор медичних наук, професор, ХНМУ; директор, ДУ “ІЗНХ” ім. В. Т. Зайцева НАМНУ. Клімова Олена Михайлівна – https://orcid.org/0000-0002-4007-6806 ; доктор біологічних наук, професор, ДУ “ІЗНХ” ім. В. Т. Зайцева НАМНУ, Україна. Лавінська Олена Володимирівна – https://orcid.org/0000-0001-5813-3656 ; кандидат біологічних наук, н.с., ДУ “ІЗНХ” ім. В. Т. Зайцева НАМНУ, Україна. Дроздова Лариса Анатоліївна – https://orcid.org/0000-0001-9678-4046 ; кандидат біологічних наук, с.н.с., ДУ “ІЗНХ” ім. В. Т. Зайцева НАМНУ, Україна. Мінухін Дмитро Валерійович – https://orcid.org/0000-0003-3371-1178 ; кандидат медичних наук, доцент, ХНМУ, Україна. Євтушенко Денис Олександрович (Автор-Кореспондент) – https://orcid.org/0000-0003-1941-7183 ; dr.yevtushenko@ukr.net; доктор медичних наук, професор, ХНМУ, Україна.

Вступ

Міастенія – захворювання, що характеризується патологічною м'язовою слабкістю і підвищеною стомлюваністю різних груп м'язів і прогресуючим типом перебігу. Однією з основних причин виникнення міастенії є антитілоопосередковане порушення нервово-м'язової передачі в синапсах через блокування антитілами різних субодиниць нікотинних ацетилхолінових рецепторів (nAChR) або через їх деструкцію клонами автоагресивних Т-лімфоцитів. За деяких клінічних фенотипів міастенії, крім порушення синаптичної передачі, розвиваються структурно-функціональні зміни тимусу. Предикторами розвитку міастенії можуть виступати мікроорганізми і віруси, що викликають запальні реакції, або стрес, що супроводжується порушенням експресії кластерів диференціювання імунотетентних клітин, які забезпечують центральні і периферичні механізми формування автоагресивності. Важлива роль у стримуванні автоімунної агресії належить коstimулюючим молекулам CD28+ і CD25+-позитивним Т-регуляторним лімфоцитам, продуцентам протизапального інтерлейкіну-10.

На сьогоднішній день завдяки досягненням сучасної імунології стало можливим розуміння механізмів розвитку захворювань, в основі яких лежить автоагресія імунної системи по відношенню до тих чи інших структур власного організму. Автоантитіла (ААТ) є серологічною ознакою більшості автоімунних захворювань (Klimova et al, 2016). На відміну від генетичних маркерів, які вказують на схильність до розвитку захворювання, деякі ААТ служать діагностичними біомаркерами і критеріями класифікації для ряду патологічних станів. У якості автоантигенів можуть виступати білки, фосфоліпіди, полісахара, нуклеїнові кислоти. В даний час описано близько 200 різновидів антитіл до ядерних компонентів – нуклеопротеїдів і рибонуклеїнових кислот, які отримали назву антинуклеарні антитіла (ANA). При автоімунних захворюваннях ААТ до ядерних антигенів не мають прямої цитотоксичної дії на клітини людини, однак утворюються імунні комплекси (антиген + антитіло + комплемент) здатні запускати імунологічне запалення, особливо в місцях, де судини особливо тонкі, в тому числі в нирках, шкірі, центральній нервовій системі, синовіальній оболонці суглобів, плеврі та ін. (Koval, Lykhmus, Omelchenko, Komisarenko, & Skok, 2009). Патогенетичне значення антинуклеарних антитіл полягає в їх здатності формувати циркулюючі імунні комплекси, які відкладаються в структурах різних органів, ініціюють звільнення лізосомальних ферментів з розвитком імунного запалення, що веде до деструкції тканин. Продукти цієї деструкції є новими антигенами, до яких утворюються нові антитіла, що забезпечує хронічний характер захворювання (Minukhin, Klimova, & Yevtushenko, 2019).

Для вибору оптимальної стратегії лікування (оперативне втручання, імуносупресивна терапія або плазмозамінація) міастенії за різних клінічних фенотипів, важливим є розуміння характеру індивідуальних імунних реакцій, які зумовлюють розвиток захворювання в тому чи іншому випадку.

Мета дослідження. З'ясувати діагностичну значущість вмісту прозапальних цитокінів, репертуару автоантитіл і характеру експресії кластерів диференціювання CD при різних клінічних фенотипах міастенії для вибору тактики лікування.

Матеріали і Методи

Обстежено 91 пацієнт з міастенією, яких було розподілено на 3 групи: в 1 групу увійшло 53 особи з тимуснезалежною міастенією без ураження тимусу (М) віком від 14 до 72 років, з них 31 жінка і 22 чоловіки; другу групу з тимусзалежною міастенією на тлі гіперплазії тимусу (МГ) склали 17 жінок у віці від 20 до 40 років, в третю групу з тимусзалежною міастенією на тлі тимом (МТ) увійшло 21 особа, віком від 31 до 68 років, з них 5 жінок і 16 чоловіків.

Визначення антитіл до $\alpha 1$ - і $\alpha 7$ -субодиниць nAChR в сироватці крові. Для визначення основної патогенетичної ланки в порушенні синаптичної передачі при міастенії досліджували наявність антитіл до $\alpha 1$ - і $\alpha 7$ -субодиниць nAChR в сироватці крові, використовуючи тест-систему для непрямого імуноферментного аналізу на твердофазному носії. В основі методу лежить специфічна взаємодія $\alpha 1$ і $\alpha 7$ nAChR, які сорбовані на полістироловій пластині, з ААТ до $\alpha 1$ і $\alpha 7$ nAChR, що містяться в досліджуваних сироватках. Утворений комплекс "антиген-антитіло" виявляли за допомогою кон'югата, пероксидаза якого каталізує розщеплення субстрату (перекису водню), викликаючи зміну забарвлення індикатора. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна вмісту антитіл до $\alpha 1$ - і $\alpha 7$ -субодиниць nAChR. Вимірювання оптичної щільності проводили при довжині хвилі 450 нм на імуноферментному аналізаторі Stat Fax 3200.

Визначення рівня $\alpha 7$ -субодиниць nAChR в мітохондріях проводили в препаратах, отриманих з тимуса і тимоми. Суспензію клітин тимусу отримували шляхом гомогенізації органу в розчині Хенкса і фільтрування через капроновий фільтр. Препарат ізольованих мітохондрій з тимусу (тимоми) отримували шляхом диференціального центрифугування. Для отримання осаду мітохондрій використовували середовище виділення наступного складу: 10 мМ HEPES, 200 мМ сахароза, 1 мМ EDTA - 1 (pH 7.4). Виділення проводили при температурі +2°C. Мітохондрії суспендували в середовищі інкубації наступного складу: 10 мМ HEPES, 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 0.1 мМ Р (у вигляді К-фосфатного буферу; pH 7.4), 5 мМ сукцинат натрію (+22°C). Концентрація протеїну в мітохондріях визначена за методом Bradford і становила 0.20 мг/мл.

Для визначення рівня $\alpha 7$ -субодиниць нАХР мітохондрій в препаратах тимусу використовували тест-систему для імуноферментного аналізу на твердофазному носії. В основі методу лежить специфічна взаємодія $\alpha 7$ нАХР, сорбованих на полістироловій пластині, з ААТ до $\alpha 7$ нАХР, що містяться в досліджуваних препаратах. Утворений комплекс “антиген-антитіло” виявляли за допомогою кон’югата, пероксидаза якого каталізує розщеплення субстрату (перекису водню), викликаючи зміну забарвлення індикатора. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна рівню $\alpha 7$ нАХР. Вимірювання оптичної щільності проводили при довжині хвилі 490 нм на імуноферментному аналізаторі Stat Fax 3200.

Визначення антинуклеарних антитіл ANA. Для виявлення сироваткових специфічних антитіл до ядерних структур (ANA) у всіх пацієнтів з тимуснезалежною (М) і тимусзалежною (МГ і МТ) міастенією проводили скринінговий мультиспецифічний тест методом непрямого кількісного ІФА тестування (Stat Fax 3200). Для цього розведену сироватку пацієнтів інкубували в лунках планшета з нанесеною сумішшю очищених антигенів SS-A (52 кДа), SS-A (60 кДа), SS-B, RNP-70, Sm, RNP / Sm, Scl-70, Centromere B і Jo-1. Зв’язані зі специфічними антигенами антитіла сироватки пацієнтів ідентифікували за допомогою ферментного кон’югата, що містить антитіла проти людського IgG. Далі в лунки додавали субстратно-хромогенний реагент, який перетворюється в забарвлений продукт під впливом ферментного компонента кон’югата – пероксидази. Для обчислення вмісту ANA в сироватці крові пацієнтів використовували формулу з урахуванням стандарту, що містить певну кількість ANA (Набір реактивів ANA screen, Orgentec, Німеччина). У разі отримання позитивного результату такого скринінгового обстеження проводили додаткове візуальне визначення різновиду антинуклеарних антитіл і характеру їх зв’язування з різними пептидними фрагментами клітинних ядер методом непрямой імунофлуоресценції (Набір реактивів Euroimmun, Німеччина). Результати оцінювали за допомогою люмінесцентного мікроскопа Olympus BX-53, з огляду на тип світіння.

Цитофлуориметричний аналіз популяцій лімфоцитів, експресії активаційних маркерів виконували протягом 2 годин після забору крові з периферичної вени в пробірки з додаванням КЗЕДТА за стандартним протоколом. У кожному зразку аналізували не менше 10000 клітин. Використовували моноклональні антитіла до молекул CD4-PE, CD25-FITC, CD28-FITC, CD14-FITC, CD11c-PE (“Beckman Coulter”, США). З метою коректного виключення із зони аналізу клітин, які не відповідали параметрам, вводили необхідні логічні обмеження в гістограми розподілу часток за малокутовим боковим світлорозсіюванням (SSC). Оцінку рівня експресії досліджуваних поверхневих рецепторів проводили за середньої інтенсивності флуоресценції. Для

видалення еритроцитів пробопідготовку проводили за безвідмиваючими технологіями з використанням лізуючого розчину OptiLyse C (Beckman Coulter, США). Аналіз забарвлених клітин проводили на проточному цитофлуориметрі Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

Оцінку експресії кластерів диференціювання CD4+, CD8+, CD16+, CD19+ на субпопуляціях Т- і В-лімфоцитів проводили імунофлуоресцентним методом (мікроскоп Olympus BX-53) з використанням моноклональних антитіл (“Сорбент”, Росія), мічених барвником FITC.

Концентрацію цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-8 в сироватці крові визначали за допомогою тест-систем (Вектор-Бест, Росія) твердофазного імуноферментного аналізу на аналізаторі Stat Fax 3200 з використанням специфічних моноклональних антитіл до ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-8, сорбованих на полістиролових планшетах, і пероксидазою хрину в якості індикаторного ферменту.

Результати

Автоантитіла до $\alpha 1$ - і $\alpha 7$ -субодиниць нейронального ацетилхолінового рецептора (нАХР). При обстеженні пацієнтів з різними клінічними фенотипами міастенії у всіх групах виявили антитіла до $\alpha 1$ -субодиниці нАХР, які є, на нашу думку, основною патогенетичною ланкою втрати автотолерантності при міастенії. Максимальне підвищення даного показника спостерігалось в групі МГ і становило 0.389 од. Е. при 0.180 од. Е. в контрольній групі. Концентрація ААТ до $\alpha 7$ -субодиниці нАХР була підвищена тільки у 20% молодих пацієнтів з М і у всіх літніх пацієнтів з МТ.

Наявність нАХР в мітохондріях тимусу пацієнтів з тимуснезалежною і тимусзалежною міастенією. При аналізі рівня $\alpha 7$ -субодиниць нАХР в мітохондріях препаратів (тимус, тимома, тимус + тимома) виявили зв’язування специфічних структур з $\alpha 7$ -субодиницями нАХР в усіх досліджуваних морфологічних структурах тимуса. Достовірних відмінностей в рівні $\alpha 7$ -субодиниць нАХР між шарами тимусу не було, але було істотна різниця між рівнем цього показника у пацієнтів з тимомами і без тимома, при цьому не суттєво, чи проба була взята з тимома, чи з морфологічно незміненої частини тимусу.

Рівень $\alpha 7$ -субодиниць нАХР мітохондрій гіперплазованого тимусу пацієнтів другої групи (МГ) був мінімальним і становив 0.23 од. Е. Максимальний рівень $\alpha 7$ -субодиниць нАХР мітохондрій було виявлено в матеріалі тимоми (група МТ) – 0.43 од. Е., що було в 1.9 рази вище, ніж в мітохондріях морфологічно незміненого тимусу (рисунок 1).

Функцією нАХР мітохондрій є контроль за утворенням мітохондріальної пори перехідної провідності, яка є джерелом проапоптичних факторів і активних форм кисню, що вивільняються в цитозолі. Тому виявлена різниця між

мітохондріями пацієнтів з тимомами і без них вказує на те, що пухлинна трансформація супроводжується збільшенням мітохондріальних нАХР, і це підтримує життєздатність пухлинних клітин. При цьому рівень $\alpha 7$ -субодиниць нАХР вище і в незмінній частині тимуса пацієнтів з тимомами. Отже, розподіл і співвідношення субтипів нАХР в мітохондріях є тканиноспецифічним. Отримані результати вказують на те, що стійкість пухлинних клітин до апоптозу реалізується через збільшення мітохондріальних нАХР, а різна стійкість до апоптозу клітин з різних шарів тимусу регулюється іншими механізмами (наприклад, кортикостероїдами).

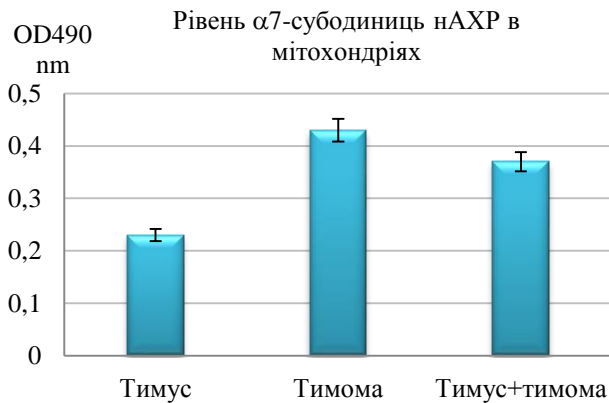


Рисунок 1. Зміна рівня $\alpha 7$ -субодиниць нАХР мітохондрій в препаратах тимусу пацієнтів з тимомами і без тимом.

Антиядерні автоантитіла (ANA). Скринінгові дослідження наявності антитіл до інших мішеней за допомогою імуноферментного аналізу дозволили виявити наявність антиядерних антитіл (ANA) у хворих з тимусзалежною міастенією на тлі місцево-поширених тимом (МТ), вміст яких в 4 рази перевищував контрольний рівень і в середньому становив (4.2 ± 0.2) од. Е. При інших клінічних фенотипах тимуснезалежної (М) і тимусзалежної (МГ) міастенії антиядерні антитіла (ANA) в сироватці крові не виявлено (рисунок 2).

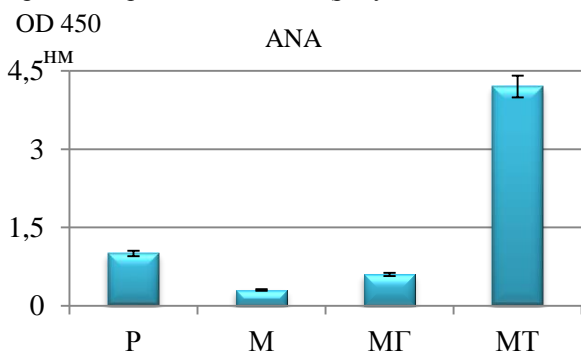


Рисунок 2. Вміст ААТ ANA у пацієнтів з різними фенотипами міастенії (Р – референтний рівень, М – міастенія без ураження тимусу, МГ – міастенія на тлі гіперплазії тимусу, МТ – міастенія на тлі тимоми).

Для визначення мішеней ААТ були проведені додаткові дослідження, що дозволяють візуалізувати специфічні структури в клітинному ядрі.

У молодих пацієнтів з міастенією на тлі тимом (до 35 років) були виявлені ANA до центромер хромосом, які відповідальні за спрямований рух хромосом під час мітозу, беруть участь в адгезії сестринських хроматид, утворенні кінетохора, спарюванні гомологічних хромосом, а також залучені в контроль генетичної експресії. Імунофлуоресцентний метод дозволив визначити світіння, яке характеризує центромерний тип зв'язування антитіл у вигляді дискретних крупнозернистих плям: гранули невеликого і однакового розміру (46 або 92 центромер на ядро в хромосомах і хроматидах). У інтерфазних клітинах ці гранули рівномірно розподілені в ядрі, тоді як в мітотичних клітинах вони утворюють стрічкоподібну структуру – одну посередині ядра (на стадії метафази) або дві паралельні (на стадії анафази) (рисунок 3а).

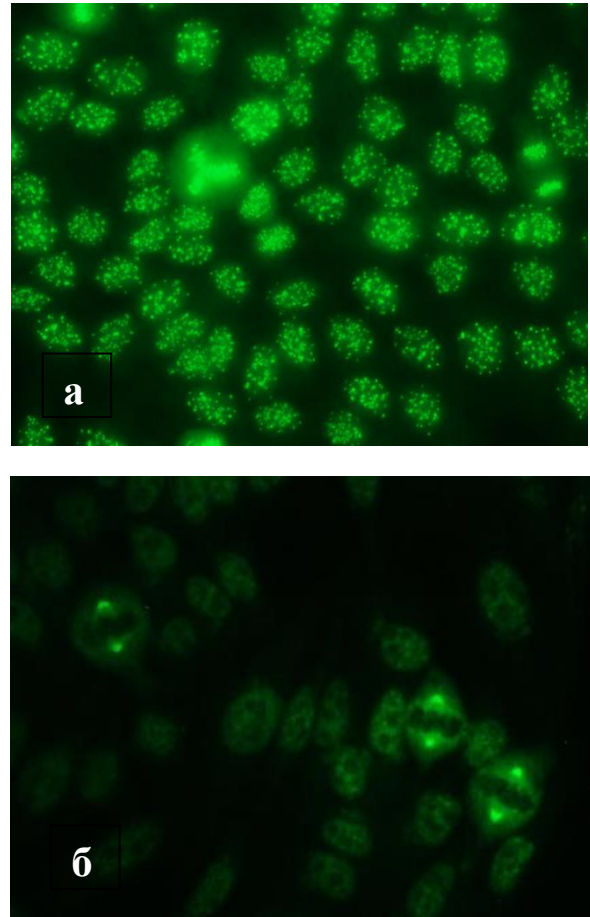


Рисунок 3. Антиядерні ААТ у пацієнтів з тимомами на тлі міастенії (забарвлення FITC стандартних антигенних субстратів Нер-2 після взаємодії з сироватковими антитілами): а – до центромерів хромосом; б – до білка ахроматинового веретена NuMa.

У пацієнтів групи МТ також був виявлений ще один вид ANA – до білка NuMa, який асоційований з центросомою і бере участь в утворенні мітотичного веретена. У інтерфазних клітинах він розподілений в ядрі, а в мітотичних – в полюсах веретена, і накопичення цього білка в мікротрубочках веретена сприяє стабілізації орієнтації їх пучків (Алиева & Узбеки, 2008). Застосування специфічного антигену Нер-2 при флуоресцентній мікроскопії дозволило виявити дрібне плямисте забарвлення ядер на різних стадіях клітинного циклу міжфазних клітин, при цьому фарбування ядерців відсутнє (рисунок 3б). А мітотичні клітини виявляють яскраву флуоресценцію волокон ахроматинового веретена. Також у пацієнтів з міастенією на тлі тимом було виявлено інші антиядерні ААТ – до центромірного білку F та до білків цитоскелету.

Вміст субпопуляцій імунокомпетентних клітин у хворих з різними формами міастенії. В результаті дослідження вмісту субпопуляцій імунокомпетентних клітин у хворих на міастенію на тлі морфо-функціональних змін тимусу було показано, що у пацієнтів з міастенією на тлі гіперплазії тимусу (МГ) вміст субпопуляції цитотоксичних Т-клітин CD8⁺ в 2.3 рази нижче контролю і становить $(7.2 \pm 2.4) \%$. У хворих, які увійшли до групи М даний показник так само значно знижений і складає $(7.1 \pm 2.3)\%$. У групі хворих з МТ рівень субпопуляції лімфоцитів CD8⁺ в 2 рази вище, ніж в попередніх групах, але значно нижче референтних значень і становить $14.2 \pm 7.2\%$ (рисунок 4а).

Вміст субпопуляції CD16⁺ достовірно підвищено в групі пацієнтів з міастенією на тлі гіперплазії (МГ) і міастенією на тлі тимом (МТ) (рисунок 4б). У пацієнтів групи М даний показник не відрізнявся від референтних значень. Так само у пацієнтів з МТ спостерігається підвищення вмісту субпопуляції CD19⁺, що свідчить про активацію антитілооутворення (рисунок 4в).

Костимулюючі молекули CD28⁺ у частини молодих пацієнтів з М знижені (рисунок 5а).

Отже, через недостатність костимулюючих сигналів автоагресивні Т-лімфоцити в тимусі не елімінуються. Костимулюючі сигнали компенсаторно гіперактивовані в 2 рази, це призводить до посилення загибелі кілерних Т-лімфоцитів, розвитку імунодефіциту в Т-клітинній ланці імунітету і онкологічного процесу в тимусі у літніх пацієнтів з МТ. Костимулюючі молекули CD28⁺ змінюють свою експресію в тимусі, що впливає на механізми втрати автотолерантності у одних пацієнтів, а у інших – призводить до розвитку злоякісних тимом.

Експресія CD4⁺CD25⁺ значно знижена у пацієнтів з М і МТ. CD4⁺CD25⁺ регуляторні Т-лімфоцити синтезують ІЛ-10, який регулює автоімунні реакції (рисунок 5б). Механізм супресії автоімунного компонента відсутній при низькому вмісті регуляторних Т-лімфоцитів CD4⁺CD25⁺. Зниження CD25⁺ призводить до зниження синтезу ІЛ-10, що сприяє розвитку механізму периферичної втрати автотолерантності.

Кластери диференціювання CD14⁺CD11c⁺ визначають адгезію, хемотаксис і опосередковану міжклітинну взаємодію в процесі запальної реакції. Експресія CD14⁺CD11c⁺ у молодих пацієнтів з М була на рівні референтних значень, а при прогресуванні захворювання їх експресія значно підвищується у хворих старшого віку групи МТ (рисунок 5в).

Концентрація цитокінів у пацієнтів з різними клінічними фенотипами міастенії. При дослідженні цитокінового профілю було виявлено зниження концентрації ІЛ-1β у групах МГ та МТ. Прозапальний цитокін ІЛ-2, який є індуктором всіх цитотоксичних клітин перевищував референтний рівень у всіх досліджуваних групах пацієнтів з міастенією. Дослідження вмісту ІЛ-4 показало, що цей протизапальний цитокін перевищував контрольні величини у всіх групах обстежених пацієнтів. Максимальне значення ІЛ-4 виявили у пацієнтів з міастенією на тлі тимом - (666.4 ± 44.5) ммоль/л (таблиця 1).

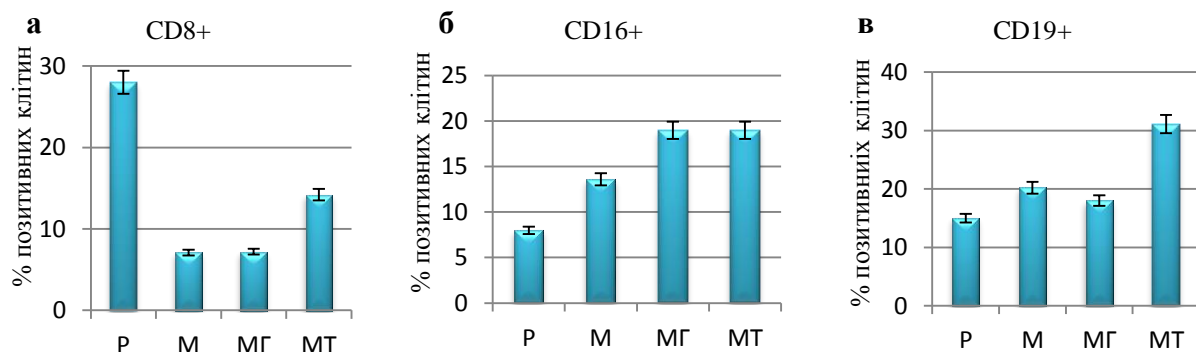


Рисунок 4. Експресія рецепторів (а – CD8⁺, б – CD16⁺, в – CD19⁺) лімфоцитів у пацієнтів з різними клінічними фенотипами міастенії (Р – референтний рівень, М – міастенія без ураження тимусу, МГ – міастенія на тлі гіперплазії тимусу, МТ – міастенія на тлі тимом).

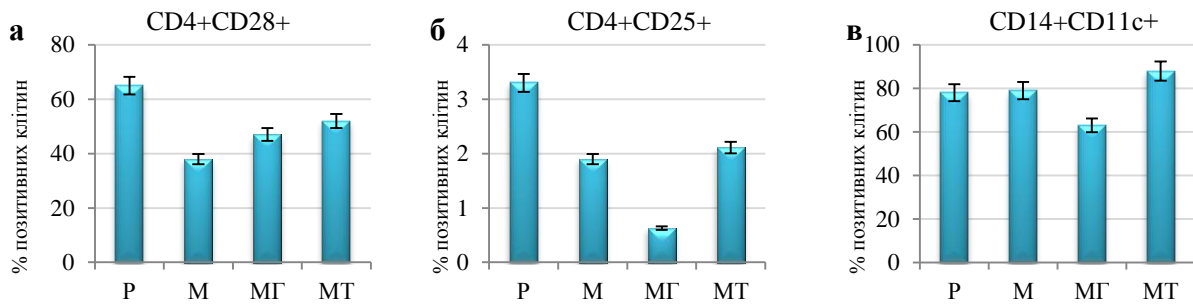


Рисунок 5. Експресія функціонально значущих маркерів (а - CD4+CD28+, б - CD4+CD25 +, в - CD14+CD11c+) на імунотимотивних клітинах у пацієнтів з різними фенотипами міастенії (Р – референтний рівень, М – міастенія без поразки тимусу, МГ – міастенія на тлі гіперплазії тимусу, МТ – міастенія на тлі тимому).

Таблиця 1. Вміст цитокінів у пацієнтів з міастенією різних клінічних фенотипів.

Показники	Референтний рівень (Р)	Міастенія без ураження тимусу (М)	Міастенія на тлі гіперплазії тимусу (МГ)	Міастенія на тлі тимому (МТ)
ІЛ-1β, пг/мл	1.6 ± 0.3	1.1 ± 0.6	0.5 ± 0.1*	0.5 ± 0.2*
ІЛ-2, пг/мл	2.7 ± 0.4	6.6 ± 3.2*	11.4 ± 7.8*	15.3 ± 9.6*
ІЛ-4, ммоль/л	70.0 ± 22.9	337.3 ± 59.4	492.5 ± 52.8*	666.4 ± 44.5*
ІЛ-8, пг/мл	10.0 ± 8.4	72.3 ± 21.5*	88.3 ± 34.2*	590.9 ± 67.1*

Примітка. * $p < 0.05$.

Отримані нами дані свідчать, що максимальне збільшення ІЛ-8 (в 60 разів) виявлено у хворих на міастенію, що супроводжується пухлинами тимусу. Це пов'язано з тим, що ІЛ-8 проявляє себе як фактор посилення пухлинної прогресії. Це пояснюється дією ІЛ-8, як аутокринного фактора росту пухлин і як фактора посилення ангіогенезу шляхом впливу на капіляри метастазів (Дедаєв, 2014).

Обговорення

Відомо, що найбільш характерним при міастенії є наявність ААТ проти різних субодиниць nAChR, так як вони можуть екранувати і пошкоджувати постсинаптичну мембрану і пригнічувати синаптичну передачу. Автоантитіла до $\alpha 1$ -субодиниці nAChR нами виявлені у всіх обстежених хворих з тимусозалежною і тимуснезалежною міастенією, максимальний титр був у пацієнтів з міастенією без структурно-функціональних порушень тимусу. А у хворих з МТ виявили наявність ААТ до іншої аутоімунної мішені – до $\alpha 7$ -субодиниці nAChR. Роль ААТ до сих пір не зовсім зрозуміла: чи є вони патогенними або тільки специфічними для захворювань, чи можуть служити предикторами результату захворювання, є захистом від патологічного процесу або служать сигнатурою збудника аутоімунітету (Бернет, 1971). Бобкова (2015) показала, що ААТ до певних сайтів $\alpha 7$ -субодиниці nAChR можуть захищати нейрони від

нейротоксичної дії епігеномних факторів середовища при хворобі Альцгеймера. Для корекції патологічного процесу авторами було отримано синтетичні пептиди - аналоги даного типу ААТ до $\alpha 7$ -субодиниці nAChR, які володіли регуляторною нейротрофічною і нейропротективною активністю. В експерименті подібна дія може формуватися в результаті пасивної імунізації антитілами до цього пептиду з подальшим його зв'язуванням.

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR), що відносяться до суперсімейства лігандзалежних іонних каналів, опосередковують швидку синаптичну передачу в м'язових і нервових клітинах (Гергалова & Скок, 2013). Дослідження останніх років довели присутність nAChR на багатьох незбудливих клітинах, включаючи кератиноцити шкіри, епітелій дихальних шляхів, ендотелій судин і клітини імунної системи (Лапин та інші, 2014; Левченкова, Новиков, & Пожилова, 2014). Показано, що nAChR, які містять $\alpha 7$ -субодиницю, експресовані на зовнішній мембрані мітохондрій і регулюють процеси ініціації апоптозу шляхом впливу на потенціалзалежні іонні канали (Пальцев, Полетаєв, & Сучков, 2010). Процеси, які супроводжують десенситизацію мітохондріальних $\alpha 7$ nAChR, впливають на стан внутрішньої мембрани мітохондрій, запобігаючи транспорту Ca^{2+} , що призводить до підтримання мембранного потенціалу мітохондрій і зниження їх здатності до накопичення Ca^{2+} .

Механізм впливу нАХР на відкриття мітохондріальної пори не потребує участі його іонного каналу і може бути індукований зв'язуванням специфічних агоністів, антагоністів, антитіл. Відкриття мітохондріальної пори відбувається за участю внутрішньомітохондріальних кіназ: під дією Ca^{2+} активуються Са-кальмодулінзалежна кіназа II типу (СаКМII) і протеїнкіназа С (РКС), а під дією пероксиду водню – Src-кіназа і РКС. Цілісність мітохондрій підтримується сигнальним каскадом фосфатидил-інозитол-3-кінази (PI3) і протеїнкінази В. Активация нАХР мітохондрій перешкоджає відкриттю мітохондріальної пори, впливаючи на кіназний каскад мітохондрій: $\alpha 7$ нАХР в основному активує PI3-кіназний шлях.

Проведений в роботі подальший пошук додаткових автоімунних мішеней при різних формах міастенії, за допомогою нових методичних підходів, дозволив виявити наявність специфічних антинуклеарних антитіл тільки у хворих з тимомами на тлі міастенії. Виявлено ANA переважно до структур, які беруть участь безпосередньо в мітохондриальному поділі клітин – до центроміру, до центромірного білку F, центросомного білку ахроматинового веретена NuMa, що асоційовано з прямим впливом на перебіг клітинної проліферації, репаративні і регенеративні процеси в тканинах, в тому числі в синапсах і тимусі.

У пацієнтів з міастенією без ураження тимусу (М) клітини природного імунітету активовано менше, ніж в інших групах. Лімфоцити цих пацієнтів знаходяться в активованому стані, але здатні відповідати на стимуляцію, тобто відбувається активна імунна реакція. Рівень і специфічність ААТ та кількість імунних комплексів подібні до таких у групі МТ. У цих хворих очевидно є активація системи адаптивного імунітету, включаючи як В-, так і Т-лімфоцити. Таким пацієнтам необхідно проводити хірургічне лікування протягом одного року після дебюту захворювання.

В групі МГ було визначено мінімальний рівень експресії регуляторних CD4+CD25+ Т-лімфоцитів. У цих хворих можна очікувати найбільш вираженого прояву симптомів міастенії, але помірного ураження інших органів і тканин організму. У хворих з МГ виявили нижчу експресію CD4+CD28+ у порівнянні з групою МТ і менш виражене підвищення вмісту IL-2, очевидно, на тлі раннього дебюту і малої тривалості захворювання. Даній категорії хворих можна рекомендувати плазмозферез для видалення автоантитіл і імунних комплексів, а також протизапальну і імуносупресивну терапію.

У хворих з тимоною (МТ) порівняно невисокий рівень антитіл проти м'язового нАХР, але присутні автоантитіла проти численних антигенів інших органів і тканин. Відмічено максимальний рівень костимулюючих молекул CD4+CD28+ та регуляторних CD4+CD25+ , які можуть пригнічувати і інші клітини при запальних процесах. У цих хворих можна очікувати більш

загальної автоімунної реакції з ураженнями різних органів і тканин.

Для запобігання тяжких ускладнень у вигляді міастенічних й холінергічних кризів та масивних кровотеч для зниження концентрації пухлинних автоантигенів можливе проведення ендovasкулярної емболізації судин тимусу для зменшення його розмірів.

Наявність комплексу змін, що включає специфічні ААТ до певних ядерних структур клітини, зміна експресії клітинних рецепторів і посилений синтез цитокінів впливає на різні метаболічні механізми повинно враховуватись і бути основою при призначенні адресної терапії з урахуванням індивідуальних патогенетичних ланок автоімунного процесу.

Висновки

1. Виявлено специфічні біомаркери для різних клінічних фенотипів міастенії: М – міастенія без ураження тимусу (найбільш гетерогенна група), МГ – міастенія на тлі гіперплазії тимусу (жінки віком до 45 років), МТ – міастенія на тлі тимоми (в основному чоловіки старшого віку).
2. У всіх обстежених пацієнтів з тимуснезалежною (М) і тимусзалежною міастенією (МТ і МГ) виявили основний патогенетичний фактор міастенії – антитіла до $\alpha 1$ -субодиниці нАХР. Максимальна величина антитіл даного типу була виявлена у пацієнтів з гіперплазією тимусу (МГ) і перевищувала контрольні значення в 2.5 рази.
3. Максимальний рівень $\alpha 7$ -нАХР в мітохондріях виявили в тканині тимоми, отже, пухлинна трансформація супроводжується збільшенням мітохондріальних нАХР, і є можливим фактором підтримки життєздатності пухлинних клітин.
4. Подальший пошук автоімунних мішеней дозволив виявити тільки у хворих групи МТ наявність специфічних антиядерних антитіл ANA до центромер хромосом, до центромерного білку F, до білку ахроматинового веретена NuMa, до білків цитоскелету.
5. У групі пацієнтів з міастенією на тлі тимоми виявили максимальний рівень костимулюючих CD4+CD28+ , регуляторних CD4+CD25+ молекул на лімфоцитах і адгезійних молекул CD11c+ на моноцитах в комплексі зі змінами цитокінового профілю.
6. Вибір тактики лікування хворих, прогноз прогресування або ремісії при різних клінічних фенотипах міастенії повинен проводитись з урахуванням спрямованості зміни показників імунорезистентності – наявності специфічних ААТ, коливань цитокінового профілю та зміни експресії клітинних рецепторів.

Джерело фінансування

Це дослідження проводилось без гранту на базі ДУ “Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В. Т. Зайцева НАМН України” та Харківського національного медичного університету у 2016-2018 рр. в межах виконання науково-дослідної

роботи на тему: “Удосконалення та розробка методів діагностики і хірургічного лікування захворювань і травм органів черевної порожнини та грудної клітки, судин верхніх та нижніх кінцівок із використанням мініінвазивних методик у пацієнтів на високий ризик розвитку післяопераційних ускладнень” (державний реєстраційний номер 0116U004991 / 08.04.2016).

Література

- Алиева И. Б., Узбеков Р. Э. Центросома – полифункциональный мультибелковый клеточный комплекс. *Биохимия*. 2008. Т. 73. Вып. 6. С. 782–803.
- Бернет Ф. Клеточная иммунология. Москва: Мир, 1971. 206 с.
- Бобкова Н. В. Нейротоксичность бета-амилоида. Механизмы, гипотезы, противоречия. *Нейронаука для медицины и психологии: материалы XI межд. междисц. конгр., 2-12 июня 2015 г. Судак, Крым, 2015*. С. 87–89.
- Гергалова Г. Л., Скок М. В. Вплив нікотину на мембранний потенціал мітохондрій: участь нікотинових ацетилхолінових рецепторів. *Український біохімічний журнал*. 2011. Т. 83. № 5. С. 13–21.
- Дедаев С. И. Антитела к аутоантигенным мишеням при миастении и их значение в клинической практике. *Нервно-мышечные болезни*. 2014. № 2. С. 6–15.
- Клинические рекомендации по лабораторной диагностике аутоиммунных заболеваний/Лапин С. В. и др. Москва, 2014. 22 с.
- Левченкова О. С., Новиков В. Е., Пожилова Е. В. Митохондриальная пора как мишень фармакологического воздействия. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2014. Т. 13. № 4. С. 24–33.
- Пальцев М. А., Полетаев А. Б., Сучков С. В. Аутоиммунитет и аутоиммунный синдром: границы нормы и патологии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2010. № 8. С. 3–6.
- Berrih-Aknin S., Frenkian-Cuvelier M., Eymard B. Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis. *Journal of Autoimmunity*. 2014. Vol. 48-49. Iss. February–March. P. 143–148. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.003
- Endogenic cytotoxic factors and formation of the clinic forms of myasthenia/Klimova E. M. and others. *Translational Biomedicine*. 2016. Vol. 7. Iss. 3. P. 1–13. doi:10.21767/2172-0479.100084
- Fritzler M. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmunity Reviews*. 2008. Vol. 7. Iss. 8. P. 616–620. doi:10.1016/j.autrev.2008.06.007
- Hurst R., Rollema H., Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013. Vol. 137. Iss. 1. P. 22–54. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.08.012
- Individual features of the self-tolerance loss in various clinical manifestation of myasthenia gravis and the rationale for treatment/Klimova E. M. and others. *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2018. Vol. 2. Iss. 25. P. 28–32.
- Minukhin D. V., Klimova E. M., Yevtushenko D. O. Electrophysiological efficiency of surgical treatment of patients with generalized myasthenia gravis. *International Journal of Education and Science*. 2019. Vol. 2. № 2. P. 62. doi:10.26697/ijes.2019.2.46
- Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity/Conti-Fine B. M. and others. *European Journal of Pharmacology*. 2000. Vol. 393. Iss. 1-3. P. 279–294. doi:10.1016/s0014-2999(00)00036-4
- The role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation/Koval L. M. and others. *Український біохімічний журнал*. 2009. Vol. 81. Iss. 4. P. 5–11.

References

- Alieva, I. B., & Uzbekov, R. Je. (2008). Centrosoma – polifunkcional'nyj mul'tibelkovyj kletocnyj kompleks [Centrosome is a multifunctional multi-protein cellular complex]. *Biohimija – Biochemistry*, 73(6), 782–803. [in Russian]
- Bernet, F. (1971). *Kletocchnaja immunologija* [Cellular immunology]. Moscow: Mir. [in Russian]
- Bobkova, N. V. (2015). Nejrotoksichnost' beta-amiloida. Mehanizmy, gipotezy, protivorechija [Neurotoxicity of beta-amyloid. Mechanisms, hypothesis, controversies]. In E. V. Loseva (Ed.), *Neyronauka dlya meditsiny i psikhologii – Neuroscience for Medicine and Psychology* (pp. 87–89). Sudak, Crimea. [in Russian]
- Herhalova, H. L., & Skok, M. V. (2011). Vplyv nikotyну na membrannyi potentsial mitokhondrii: uchast nikotynovykh atsetylkholinovykh retseptoriv [Effect of nicotine on the membrane potential of mitochondria: involvement of nicotinic acetylcholine receptors]. *Ukrainskyi biokhimichnyi zhurnal – Ukrainian Biochemical Journal*, 83(5), 13–21. [in Ukrainian]
- Dedaev, S. I. (2014). Antitela k autoantigennym mishenjam pri miastenii i ih znachenie v klinicheskoy praktike [Antibodies to autoantigenic targets in myasthenia gravis and their significance in clinical practice]. *Nervno-myshechnye bolezni – Neuromuscular diseases*, 2, 6–15. [in Russian]
- Lapin, S. V., Mazing, A. V., Bulgakova, T. V., Surkova, E. A., Blinova, T. V., Holopova, I. S., ... Jemanujel', V. L. (2011). *Klinicheskie rekomendacii po laboratornoj diagnostike autoimmunnyh zabolevanij* [Clinical recommendations for the laboratory diagnosis of autoimmune diseases]. Moscow. [in Russian]

- Levchenkova, O. S., Novikov, V. E., & Pozhilova, E. V. (2014). Mitochondrial'naja pora kak mishen' farmakologicheskogo vozdejstviya [Mitochondrial pore as a target of pharmacological effects]. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii – Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*, 13(4), 24–33. [in Russian]
- Pal'cev, M. A., Poletaev, A. B., & Suchkov, S. V. Autoimmunitet i autoimmunnyj sindrom: granicy normy i patologii [Autoimmunity and autoimmune syndrome: the boundaries of norm and pathology]. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 8, 3–6. [in Russian]
- Berrih-Aknin, S., Frenkian-Cuvelier, M., & Eymard, B. (2014). Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis. *Journal of Autoimmunity*, 48–49(February–March), 143–148. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.003
- Klimova, E. M., Bozhkov, A. I., Boyko, V. V., Drozdova, L. A., Lavinskaya, E. V., & Skok, M. V. (2016). Endogenic cytotoxic factors and formation of the clinic forms of myasthenia. *Translational Biomedicine*, 7(3), 1–13. doi:10.21767/2172-0479.100084
- Fritzier, M. (2008). Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmunity Reviews*, 7(8), 616–620. doi:10.1016/j.autrev.2008.06.007
- Hurst, R., Rollema, H., & Bertrand, D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 137(1), 22–54. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.08.012
- Klimova, E. M., Drozdova, L. A., Lavinskaya, O. V., & Minukhin, D. V. (2018). Individual features of the self-tolerance loss in various clinical manifestation of myasthenia gravis and the rationale for treatment. *Norwegian Journal of Development of the International Science*, 2(25), 28–32.
- Minukhin, D. V., Klimova, E. M., & Yevtushenko, D. O. (2019). Electrophysiological efficiency of surgical treatment of patients with generalized myasthenia gravis. *International Journal of Education and Science*, 2(2), 62. doi:10.26697/ijes.2019.2.46
- Conti-Fine, B. M., Navaneetham, D., Lei, S., & Maus, A. D. (2000). Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *European Journal of Pharmacology*, 393(1–3), 279–294. doi:10.1016/s0014-2999(00)00036-4
- Koval, L. M., Lykhmus, O. Yu., Omelchenko, D. M., Komisarenko, S. V., & Skok, M. V. (2009). The role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation. *Ukrainskyi biokhimichnyi zhurnal – Ukrainian Biochemical Journal*, 81(4), 5–11.

The Choice of Treatment in Various Ages Patients with Myasthenia Against to Immuneresistance Parameters

Boyko V. V.^{1,2}, Klimova O. M.¹,
Lavinskaya O. V.¹, Drozdova L. A.¹,
Minukhin D. V.², Yevtushenko D. O.²

¹ Zaycev Institute of General and Urgent Surgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine

² Kharkiv National Medical University, Ukraine

Abstract

Background: Myasthenia disease is a disease characterized by pathological muscle weakness and increased fatigue of different muscle groups and a progressive type of course.

The aim of the study: to determine the diagnostic significance of proinflammatory cytokine content, autoantibody repertoire and the nature of expression of CD differentiation clusters in different clinical phenotypes of myasthenia to select treatment tactics.

Materials and Methods: The pathogenetic role of antibodies to nicotinic acetylcholine receptors (NAHR) and specific antinuclear antibodies (ANA) to certain nuclear structures, the expression of cell differentiation clusters and the concentration of cytokines in the mechanisms of formation of various autoimmune myasthenia phenotypes were investigated.

Results: The maximum level of antibodies to the $\alpha 1$ -subunit of NAHR was found in patients with thymic hyperplasia (MH). In myasthenia amid thymia (MT), the presence of new molecular targets of autoimmune aggression of antibodies (ANA) to structures involved in mitotic cell division: to centromere, to centromeric protein F, the centrosomal protein of achromatin spindle NuMa has been revealed. In patients with myasthenia-free thymus (M), a decrease in the subpopulation of CD4 + CD28 + cells was found, which apparently interferes with costimulatory signaling relative to other cells and induces interaction between T- and B-cells in the development of an autoimmune response to many antigens. In the group MH revealed a multiple decrease in the subpopulation of regulatory T lymphocytes CD4 + CD25 +, which are able to suppress the development of autoimmune processes.

Conclusions: The choice of tactics for the treatment of patients with different clinical phenotypes of myasthenia should be made taking into account the orientation of changes in immunoresistance – the presence of specific AAT, fluctuations in the cytokine profile and changes in the expression of cellular receptors, and depending on the age of patients.

Keywords: myasthenia, autoantibodies, nicotinic acetylcholine receptor, differentiation clusters, cytokines.

Cite this article as:

Boyko, V. V., Klimova, O. M., Lavinskaya, O. V., Drozdova, L. A., Minukhin, D. V., & Yevtushenko, D. O. (2019). Vybir taktyky likuvannia khvorykh na miasteniui riznoho viku v zalezhnosti vid pokaznykiv imunorezystentnosti [The Choice of Treatment in Various Ages Patients with Myasthenia Against to Immuneresistance Parameters]. *International Journal of Education and Science*, 2(3), 43–52. doi:10.26697/ijes.2019.3.4 [in Ukrainian]

The electronic version of this article is the complete one and can be found online at: <http://ijes.culturehealth.org/index.php/en/archive>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).