



В.В. Бойко, Е.М. Климова,
Л.А. Дроздова,
П.С. Белокопытова

ГУ «Институт общей
и неотложной хирургии
НАМНУ», г. Харьков

НИИ биологии Харьковского
национального университета
им. В.Н. Каразина

© Коллектив авторов

НАРУШЕНИЕ ПЕРВИЧНОГО И ВТОРИЧНОГО АДАПТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ФЕНОТИПАМИ МИАСТЕНИИ

Резюме. Нами было обследовано 204 человека с миастенией и поражением тимуса. В первую группу вошли пациенты с миастенией без поражения тимуса (М) – 22 человека, 2 группу составили пациенты с миастенией и гиперплазией тимуса (МГ) – 143 человека, 3 группа – пациенты с миастенией на фоне тимомы (МТ) – 39 человек. Были изучены иммунологические изменения в различных звеньях иммунорезистентности.

Ключовые слова: миастения, гиперплазия тимуса, тимомы, иммунорезистентность

Введение

Миастения представляет собой тяжелое аутоиммунное заболевание с прогрессирующим типом течения, которое клинически проявляется развитием патологической мышечной слабости и утомляемости различных мышечных групп. Наряду с этим наблюдаются нарушения функции внутренних органов и вегетативной нервной системы [1, 2].

Согласно литературным данным, в последнее время отмечается тенденция к увеличению заболеваемости миастенией. Наиболее часто встречается генерализованная форма заболевания – до 80 %. Увеличилась частота встречаемости прозеринорезистентных форм миастении, а также сочетание ее с другими аутоиммунными заболеваниями и патологией эндокринной системы.

Существует выраженная клиническая гетерогенность данной нозологической формы вследствие мультифакториальности этиологических и патогенетических факторов, наличия и характера генетической предрасположенности к развитию аутоиммунной патологии, возраста пациентов и давности заболевания [1].

Ведущее значение в патогенезе миастении принадлежит тимусу [6]. Ее изменения способствуют развитию аутоиммунных процессов с участием как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета, ведущих к нарушению работы никотиновых холинергических рецепторов постсинаптической мембраны и нарушению нейротрансмитерной передачи. Триггерными факторами нарушения данных механизмов являются инфекционные антигены: вирусные и бактериальные.

Известно, что при миастении продуцируются аутоантитела к АХР, к риадиноновым рецепторам скелетных мышц, к мускул–специфической тирозинкиназе и антитела к титину. Блокада антителами структур–мишеней

в конечном счете приводит к мышечной слабости [4, 7]. Однако, существует серонегативная форма миастении, при которой данные антитела не выявляются, особенно это характерно для глазной формы миастении [3].

Необходимость удаления тимуса у пациентов с прогрессирующим течением генерализованной миастении подчеркивается большинством авторов. При выявлении опухоли вилочковой железы показания к операции приближаются к абсолютным и не зависят от характера и тяжести заболевания [5]. Но до настоящего времени недостаточно четко выделены критерии отбора пациентов для оперативного лечения, схемы подготовки к операции и ведения в раннем и позднем послеоперационных периодах.

Целью данной работы является изучение механизмов и различных вариантов иммунопатологических нарушений у больных с различными клиническими фенотипами миастении для выбора индивидуальной тактики лечения.

Материалы и методы исследований

Нами было обследовано 204 человека с миастенией и поражением тимуса. В первую группу вошли пациенты с миастенией без поражения тимуса (М) – 22 человека, 2 группу составили пациенты с миастенией и гиперплазией тимуса (МГ) – 143 человека, 3 группа – пациенты с миастенией на фоне тимомы (МТ) – 39 человек.

Оценку фагоцитарной активности гранулоцитарных нейтрофилов проводили по их погложительной и переваривающей способности штамма дрожжей.

Определение общей окислительно–восстановительной активности нейтрофилов проводили в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ–тест).



Принцип метода основан на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза под влиянием супероксид-аниона, образующегося в НАДФ – Н-оксидазной реакции. Отложение сине-фиолетовых гранул диформаза в фагоцитирующей клетке, соответствует локализации НАДФ – Н-оксидазы. При этом размеры диформаза отложений являются показателем суммарной активности НАДФ – Н-оксидазы, инициирующей процесс стимуляции фагоцита. НСТ-тест, таким образом, интегрально характеризует кислород-зависимые антиинфекционные системы фагоцита.

Уровень субпопуляций лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 оценивали иммунофлуоресцентным методом с использованием моноклональных антител и FITC – окраски.

Наличие антител к цитомегаловирусу (CMV), вирусу Эпштейна-Барра (VEB), вирусам гепатита В (HBV) и С (HCV) определяли используя стандартные тест-системы для дифференциальной ИФА – диагностики.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) использовали в качестве теста, подтверждающего результат ИФА – определения наличия антител к вирусам.

Диагностику вируса Эпштейна-Барра (VEB), цитомегаловируса (CMV) и вируса гепатита С (HCV) проводили методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Для этого из цельной крови пациентов выделяли ДНК сорбентным методом, используя набор ДНК сорб-В (АмплиСенс, Россия) для диагностики VEB и CMV. РНК вируса гепатита С выделяли набором Рибо-преп (АмплиСенс, Россия) на основе метода преципитации из сыворотки крови. Амплификацию проводили с использованием наборов АмплиСенс CMV-FL и АмплиСенс HCV-FL (АмплиСенс, Россия) на приборе Rotar-Gene 3000 Corbett Research (Австралия).

Органоспецифические антитела (ОСА) к тканям легких и печени, антитела к эластину и ДНК исследовали в сыворотке крови с использованием иммуноферментной тест-системы (Навина, Россия). Принцип метода заключается в специфическом взаимодействии тканевых антигенов, сорбированных на планшете, с антителами к ним, содержащимися в сыворотке крови.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты исследований фагоцитарной активности нейтрофилов в трех клинических группах больных миастенией на фоне морфо-функциональных изменений тимуса оценивали по показателям, характеризующим свойства нейтрофилов – фагоцитарный ин-

декс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ) и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ). Снижение фагоцитарного индекса выявлено у пациентов с миастенией, без поражения тимуса (М) и с миастенией, протекающей на фоне тимомы (МТ) – (35,2 ± 4,9) % и (32,4 ± 2,6) % при (82,4 ± 7,2)% в контрольной группе. Фагоцитарное число в этих группах так же достоверно снижено и составляет соответственно – 1,9 ± 0,3 и 2,1 ± 0,5. В группе больных миастенией на фоне гиперплазии тимуса ФИ достоверно не отличался от контроля ((79,4 ± 6,9) % и (82,4 ± 7,2 соответственно) %), а ФЧ в несколько раз превосходило контрольные величины и составляло 12,4 ± 4,7 (при 3,7 ± 0,12 в контрольной группе) (табл. 1).

Индекс завершенности фагоцитоза, свидетельствующий об уровне эндоцитоза микроорганизмов ферментами фагоцитирующих нейтрофилов, в группах пациентов с М и МТ не отличался от значения данного показателя в контрольной группе. У пациентов с МГ наблюдалась некоторая активация данного показателя (табл. 1).

В 1 и 3 группах снижение показателей ФИ и ФЧ отмечалось на фоне дисбаланса кислород-зависимой бактерицидности нейтрофилов (высокие показатели спонтанного НСТ-теста при угнетении стимулированного НСТ-теста).

Таблица 1

Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных миастенией на фоне морфологического изменения тимуса

Группы		Показатели		
		Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число	Индекс завершенности фагоцитоза
Контрольная группа	n = 63	82,4 ± 7,2	3,7 ± 0,12	1,4 ± 0,31
Миастения без поражения тимуса (М)	n = 22	35,2 ± 4,9	1,9 ± 0,3*	1,3 ± 0,2
Миастения на фоне гиперплазии тимуса (МГ)	n = 143	79,4 ± 6,9	12,4 ± 4,7*	2,16 ± 0,8
Миастения на фоне тимомы (МТ)	n = 39	32,4 ± 2,6*	2,1 ± 0,5	1,5 ± 0,2

Примечание: * – p < 0,05

Незавершенность фагоцитарной функции нейтрофилов приводит к накоплению инфекционных антигенов в тканевых депо и распространению инфицированных клеток гематогенным путем.

Пациентам с незавершенным фагоцитозом нейтрофильных гранулоцитов применяли пептидный препарат микс-фактор, что приводило к повышению фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса, а так же увеличению субпопуляций CD8+, CD16+.

В таблице 2 представлены результаты исследования субпопуляций иммунокомпетентных клеток у больных миастенией на фоне морфологического изменения тимуса.

Таблиця 2

Експресія рецепторів Т- і В-лімфоцитів у пацієнтів з миастенією і морфологічними порушеннями тимуса

Субпопуляція лімфоцитів	Контрольна група	Миастенія без поразення тимуса	Миастенія на фоні гіперплазії тимуса	Миастенія на фоні тимомы
CD8+, %	28,0 ± 2,6	7,1 ± 2,3*	7,2 ± 6,4*	14,2 ± 7,2*
CD16+, %	8,0 ± 4,3	13,6 ± 2,1	19,0 ± 6,1*	19,0 ± 9,1*
CD19+, %	15,0 ± 4,8	20,2 ± 8,1	8,0 ± 1,0*	31,1 ± 15,1*

Примечание: * – p < 0,05

У больних с МГ содержание субпопуляции CD4+–хелперов было повышено по сравнению с референтными величинами и в среднем составляло (44,0 ± 20,5) %, а уровень цитотоксических лимфоцитов CD8+ и В-лимфоцитов CD19+ значительно снижен (табл. 2).

У больных с МГ наблюдается снижение уровня субпопуляций общих CD3+–лимфоцитов до 26,2 ± 9,4 %, CD4+ Т-хелперов до 21,7 ± 9,1 % и CD8+ цитотоксических лимфоцитов, нарушен иммунорегуляторный индекс. Содержание субпопуляций CD16+ и CD19+ повышено, что свидетельствует об активации цитотоксичности и антителообразования (табл. 2).

Исследование содержания органоспецифических и органонеспецифических антител показало, что при миастении без поражения тимуса и миастении на фоне гиперплазии выявили повышение антител к ткани печени, легких и к нативной и денатурированной ДНК, но при МГ титр антител к легким и нативной ДНК был выше более чем в 2 раза, чем в группе с М. При миастении на фоне тимомы выявили дополнительно антитела к эластину (табл. 3).

На рис. 1 представлена диаграмма, указывающая на частоту встречаемости у больных миастенией цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барра, вирусных гепатитов HBV и HCV. Повышение уровня сывороточных антител к CMV выявлено у 89 % всех обследованных пациентов, а к VEB у 72 %. Уровень специфических антител к CMV в первой группе составил 17,5 МЕ/мл, а во второй группе отмечен более высокий уровень этого показателя, который составил в среднем 42,25 МЕ/мл. После прове-

дения ПЦР, как подтверждающего теста, было показано наличие CMV у 76,6 %.

Вирус гепатита В (HBV) выявлен у 21 % больных миастенией, вирусная персистенция HCV встречалась более часто – у 42 % обследованных.

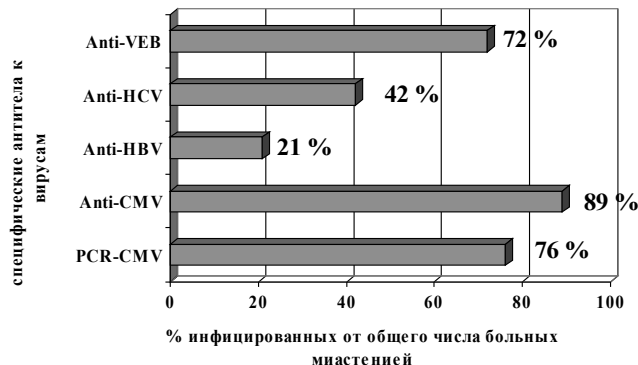


Рис. 1 Частота встречаемости персистирующей вирусной инфекции у больных миастенией

Стандартная противовирусная терапия с использованием ингибиторов транскрипции вирусных нуклеиновых кислот является эффективной в течение короткого срока, т.к. подобный вид фармпрепаратов не уничтожает транслоцированный геном вирусов, лизогенно встроенный в геном клеток хозяина.

Больным миастенией после выявления вирусной персистенции с помощью определения антител к вирусной инфекции и антигенов методом ПЦР проводили направленную иммунокоррекцию против цитомегаловируса и вируса Эпштейна–Барра с использованием синтетических специфических иммуноглобулиновых антител к цитомегаловирусу и вирусу Эпштейна–Барра, включающую 3 курса терапии внутримышечного применения по 1 мл, 20 дней – через день. У больных с выраженными миастеническими проявлениями дополнительно проводили курс с использованием иммуноглобулина человека.

Опыт лечения в клинике ГУ «ИОНХ НАМН Украины» пациентов с миастенией на фоне поражения железистой ткани тимуса с помощью специфических синтетических иммуноглобу-

Таблиця 3

Содержание органоспецифических антител у больных с различными клиническими фенотипами миастении

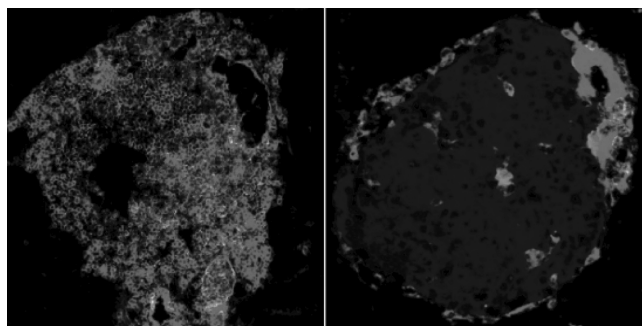
Клинические фенотипы миастении	Органоспецифические и органонеспецифические антитела				
	к ткани печени, ед. опт. пл.	к ткани легких, ед. опт. пл.	к эластину, ед. опт. пл.	к нативной ДНК, ед. опт. пл.	к денатурированной ДНК, ед. опт. пл.
Контрольная группа	0,002±0,001	0,007± 0,001	0,002± 0,001	0,003± 0,001	0,004±0,001
Миастенія без поразення тимуса	0,05±0,006*	0,018± 0,005*	0,002± 0,001	0,017±0,006*	0,043±0,01*
Миастенія на фоні гіперплазії тимуса	0,045±0,001*	0,050±0,002*	0,001± 0,001	0,048± 0,01*	0,030±0,012*
Миастенія на фоні тимомы	0,050±0,003*	0,035±0,005*	0,020±0,001*	0,032± 0,001*	0,083±0,006*

Примечание: * – p < 0,05



линовых антител класса G человека позволяет опсонизировать инфицированные вирусом клетки человека. Частичная нейтрализация и лизис инфицированных клеток препятствует дальнейшей пролиферации клеток с вирионами и лизогенно встроенным геномом. При повторном обследовании пациентов через 6 месяцев после проведенной противовирусной терапии было показано снижение титра антител к вирусам в 4–5 раз и снижение титра органоспецифических антител и антител к ДНК.

Чапел Хилл и Роланд Тиш из Университета Каролины предложили иммунотерапию, с применением экзогенных иммуноглобулиновых антител (фото 1).



а) б)

Фото 1. Микрофотографии железистой ткани, инфицированной вирусами, до лечения (а) и после лечения (б) специфическими иммуноглобулиновыми антителами.

Данная иллюстрация является доказательством элиминации клеток инфицированных вирусом Эпштейна–Барра и наличия интенсивной регенерации железистой ткани с восстановлением ее функции.

Выводы

1. При различных клинических фенотипах миастении (М, МГ, МТ) наблюдали иммунопатологические изменения в различных звеньях иммунорезистентности. Полученные данные могут служить основой для классификации различных клинических фенотипов миастении в зависимости от характера иммунопатологических состояний.

2. При гиперплазии тимуса на фоне миастении (МГ) выявили активацию фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов, что выразилось в повышении фагоцитарного числа. При миастении без морфологических изменений тимуса и при миастении на фоне тимом (МТ) наблюдали снижение фагоцитарной активности нейтрофилов (адгезии и эндоцитоза), что свидетельствует об анергии в первичном звене иммунорезистентности, и высокой вероятности тереноса инфицированных фагоцитов гематогенным путем.

3. При М и МГ выявили одинаковую закономерность в репертуаре органоспецифических антител (наличие антител к печени, к легким, к ДНК), но при МГ титр антител к легким и ДНК был выше более чем в 2 раза. При МТ выявили дополнительный спектр антител к эластину, что позволит проводить адресную гемофильтрацию с использованием специфических сорбирующих моноклональных антител, обладающих способностью комплементарно связываться с тканевыми аутоантителами различного репертуара.

4. У больных с МГ выявили снижение субпопуляции В–лимфоцитов, экспрессирующих кластер дифференцировки CD19+. А у больных с МТ значительное повышение данного показателя, что может быть использовано превентивно в дооперационном периоде для верификации диагноза.

5. В работе показано, что триггерным фактором формирования иммунопатологических состояний и клинических проявлений у больных с миастенией является сочетанная вирусная инфекция, включающая герпетические вирусы различных типов и вирусы гепатита В и С.

6. Эффективным методом лечения вирусной персистенции является применение специфических иммуноглобулиновых антител на фоне направленной иммунокоррекции с применением пептидных препаратов, стимулирующих первичный иммунитет и экранирующих деструктивное действие аутоантител.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гехт Б.М. Нервно–мышечные болезни / Б.М. Гехт, Н.А. Ильина. – М.: Медицина, 1982. – 350 с.
2. Лайсек Р.П. Миастения / Р.П. Лайсек, Р.Л. Барчи. – М: Медицина, 1984. – 272 с.
3. Пономарева Е.Н. Миастения / Е.Н. Пономарева. – Минск: Мет., 2002. – С. 146 – 164.
4. Санадзе А.Г. Антитела к мышцам (anti–titin–antibody) у больных с поздним началом миастении: клинические и электрофизиологические корреляции / А.Г. Санадзе, Т.В. Сиднев, Т.В. Давыдова // Неврологический журнал. – 2003. – Т. 8. – Приложение 1. – С. 23 – 26.
5. Хирургическая лечение тимом у больных генерализованной миастенией / П.С. Ветшев, Л.И. Ипполитов, Д.М. Меркулова, В.А. Животов // Хирургия. – 2003. – № 10. – С. 15 – 20.
6. Eymard B. Role of the thymus in the physiopathology of myasthenia / B. Eymard// Rev.Neurol. – 1995. – V. 151. – P. 6–15.
7. Muscle striation antibodies in myasthenia gravis. Diagnostic and functional significance / Aarli J., Skeie G., Myglund A., Gilhus N.// Ann. N.Y. Acad.Sci. – 1998. – Vol. 841. – P. 505–515.



ПОРУШЕННЯ ПЕРВИННОЇ
ТА ВТОРИННОЇ
АДАПТИВНОЇ ІМУННОЇ
ВІДПОВІДІ У ХВОРИХ
З РІЗНИМИ КЛІНІЧНИМИ
ФЕНОТИПАМИ МІАСТЕНІЇ

*В.В. Бойко, Е.М. Клімова,
Л.А. Дроздова,
П.С. Белокопитова*

Резюме. Нами було обстежено 204 людини з міастенією та ураженням тимусу. У першу групу ввійшли пацієнти з міастенією без ураження тимусу (М) – 22 особи, 2 групу склали пацієнти з міастенією і гіперплазією тимуса (МГ) – 143 особи, 3 група – пацієнти з міастенією на тлі тімоми (МТ) – 39 осіб. Були вивчені імунологічні зміни в різних ланках імунорезистентності.

Ключові слова: *міастенія, гіперплазія тимуса, тимома, імунорезистентність.*

VIOLATION OF PRIMARY
AND SECONDARY
ADAPTIVE IMMUNE
RESPONSE IN PATIENTS
WITH DIFFERENT CLINICAL
PHENOTYPES
OF MYASTHENIA

*V.V. Boyko, E.M. Klimova,
L.A. Drozdova,
P.S. Belokopytova*

Summary. In different clinical phenotypes of myasthenia observed immunopathological changes in the various links of immune resistance. These data provide a basis for the classification of different clinical phenotypes of myasthenia depending on the nature of immunopathological states. Effective treatment for viral persistence is the use of specific immunoglobulin antibodies directed against the immune using peptide drugs that stimulate the immune system and the primary screening destructive action of autoantibodies.

Key words: *immune response, myasthenia, viral persistence.*