

of adrenalin and noradrenalin maintenance at patients in pre-operative period of surgical and intervention treatment have been showed. Their level remained increased at patients after cardio pulmonary by-pass grafting and was normalized to 5 days after the conducted stenting.

УДК 616.24-002.5:615.0/58

**Е.М. Климова, Л.А. Дроздова,
П.Е. Нечитайло, Е.В. Лавинская,
Ю.В. Калашникова**

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОСЛОЖНЕННОГО ТЕЧЕНИЯ МИАСТЕНИИ У БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ ТИМЭКТОМИИ

*ГУ "Институт общей и неотложной хирургии имени
В. Т. Зайцева НАМНУ", г. Харьков, Украина*

Миастения — мультифакториальное заболевание с выраженным клиническим полиморфизмом нейротрансмиттерных нарушений, которое характеризуется индивидуальными особенностями течения — тяжестью и распространенностью поражения мышечных клеток, морфо-гистохимическими изменениями тимуса, щитовидной железы и паращитовидных желез [1]. Структурно-функциональные изменения тимуса способствуют развитию аутоиммунных процессов с участием как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета, ведущих к нарушению работы никотиновых холинэргических рецепторов постсинаптической мембраны и нарушению нейротрансмитторной передачи. Триггерными факторами нарушения данных механизмов являются инфекционные антигены: вирусные и бактериальные [2].

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 [3].

Известно, что при миастении продуцируются аутоантитела к ацетилхолиновым рецепторам (АХР), к рианодиновым рецепторам (Ryг) скелетных мышц, к мускул-специфической тирозинкиназе и антитела к титину. Блокада антителами структур-мишеней в конечном счете приводит к мышечной слабости [4,5]. Однако, существует серонегативная форма миастении, при которой данные антитела не выявляются, особенно это характерно для глазной формы миастении [6].

При различных клинических типах миастении в крови появляются миастогенные цитотоксические соединения, которые могут лежать в основе формирования фенотипических проявлений при данном заболевании (патент UA № 48134). Проблема состоит в том, что используя даже самые современные методы лабораторной диагностики очень сложно осуществлять динамический индивидуальный мониторинг содержания цитотоксических соединений в организме. Такая диагностическая задача может быть решена на основе интегральной оценки цитотоксических соединений с помощью универсальных биоиндикаторов [7].

Целью данной работы является оценка иммунологических маркеров у больных с осложненным течением различных клинических фенотипов миастении для выбора адресной иммуноткоррекции и назначения антихолинэстеразных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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.

Подавляющее большинство больных (69%) — с генерализованной миастенией, тяжелым проградентным течением и анамнезом болезни от 1 года до 4 лет. Остальные больные с локальными формами миастении (глотоочно-лицевая, скелетно-мышечная — 31%).

Для оценки тяжести миастении использовали классификацию Viets, Schwab (1975).

Оценку фагоцитарной активности гранулоцитарных нейтрофилов проводили по их поглотительной и переваривающей способности штамма

дрожжей *Sacharomices*, с последующей оценкой.

Результаты исследований фагоцитарной активности нейтрофилов в трех клинических группах больных миастенией на фоне морфо-функциональных изменений тимуса оценивали по показателям, характеризующим свойства нейтрофилов: фагоцитарный индекс (ФИ) — количество клеток участвующих в фагоцитозе, фагоцитарное число (ФЧ) — среднее количество микробов, поглощенных одним нейтрофилом крови, и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) — переваривающая способность нейтрофилов.

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

По восстановлению поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза под влиянием супероксид-аниона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции судили об активности ферментативной системы фагоцитирующих клеток. Отложение сине-фиолетовых гранул диформаза в фагоцитирующей клетке, соответствует локализации НАДФ-Н-оксидазы. При этом размеры диформазановых отложений являются показателем суммарной активности НАДФ-Н-оксидазы, инициирующей процесс стимуляции фагоцита. НСТ-тест, таким образом, интегрально характеризует кислород-зависимые антиинфекционные системы фагоцита.

Экспрессию кластеров дифференцировки CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺ на субпопуляциях Т- и В-лимфоцитов оценивали иммунофлуоресцентным методом с использованием моноклональных антител, меченых FITC-красителем.

Органоспецифические антитела (ОСА) к тканям легких и печени, антитела к эластину и анти-нуклеарные антитела 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.

Определение концентрации холинэстеразы проводили кинетическим методом с использованием бутирилтиохолина в качестве субстрата при длине волны 405 нм на биохимическом анализаторе StatFax 1904 Plus.

Определение интегральной цитотоксичности с использованием клеточной тест-системы *D. viridis*. Проводили совместную инкубацию сыворотки крови больных с клеточной тест-системой. По изменению качественной и количественной оценки морфо-функциональных показателей клеток биоиндикатора с помощью световой микроскопии определяли степень цитотоксичности исследуемой сыворотки крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение ФИ, который характеризует количество клеток участвующих в фагоцитозе выявлено у пациентов с М и с МТ — $35,2 \pm 4,9\%$ и $32,4 \pm 2,6\%$ при $82,4 \pm 7,2\%$ в контрольной группе. ФЧ, показывающее среднее количество микробов, поглощенных одним нейтрофилом крови в этих группах так же достоверно снижено и составляет соответственно — $1,9 \pm 0,3$ и $2,1 \pm 0,5$. В группе больных МГ ФИ достоверно не отличался от контроля ($79,4 \pm 6,9\%$ и $82,4 \pm 7,2\%$ соответственно), а ФЧ в несколько раз превосходило контрольные величины и составляло $12,4 \pm 4,7$ (при $3,7 \pm 0,12$ в контрольной группе) (табл. 1).

ИЗФ, свидетельствующий об уровне эндцитоза 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 (М) и 3 (МТ) группах снижение показателей ФИ и ФЧ отмечалось на фоне дисбаланса кислородзависимой бактерицидности нейтрофилов: высокие показатели спонтанного НСТ-теста (за счет НАДФ-Н-оксидазной реакции) при недостаточной стимуляции ферментов нейтрофилов в НСТ-тесте.

Незавершенность фагоцитарной функции нейтрофилов приводит к накоплению инфекционных антигенов в тканевых депо и возможному распространению инфицированных клеток гематогенным путем, с последующим интенсивным образованием аутоантител к тканям различной локализации и к органоидам клеток.

Результаты исследования соотношения субпопуляций иммунокомпетентных клеток у больных миастенией на фоне морфологического изменения тимуса свидетельствуют о разнонаправленных изменениях интенсивности экспрессии кластеров клеточной дифференцировки CD (табл. 2).

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.

Экспрессия рецепторов Т- и В-лимфоцитов у пациентов с различными клиническими фенотипами миастении

Субпопуляция лимфоцитов	Контрольная группа	Миастения без поражения тимуса	Миастения на фоне гиперплазии тимуса	Миастения на фоне 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 больных с МГ содержание субпопуляции Т-лимфоцитов-хелперов CD4⁺ было повышено по сравнению с референтными величинами и в среднем составляло 44,0±20,5%, а экспрессия цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺ и В-лимфоцитов CD19⁺ значительно снижена (табл. 2).

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

У пациентов с различными клиническими фенотипами миастении выявили повышенный уровень лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы молекул адгезии CD50 и CD54. Наиболее высокий уровень экспрессии CD54 наблюдали у пациентов с М. А экспрессия кластеров дифференцировки CD50 была повышена у пациентов с различными фенотипами миастении, но наиболее высокий уровень выявили при МТ.

Исследование содержания ОАС и органонеспецифических антител показало, что при М и МГ выявили повышение антител к ткани печени, легких и антинуклеарных антител к нативной и денатурированной ДНК, но при МГ титр антител к легким и нативной ДНК был выше в среднем в 2,3 раза, чем в группе с М. При МТ выявили дополнительно антитела к эластину (табл. 3).

После тимомэктомии у больных с осложненным течением МТ в раннем послеоперационном периоде наблюдали снижение концентрации холинэстеразы. Изменение концентрации данного фермента коррелировало с состоянием пациентов в раннем послеоперационном периоде. У пациентов резкое снижение холинэстеразы сопровождалось холинергическим кризом.

Резкое снижение содержания холинэстеразы может свидетельствовать о нарушениях передачи сигнала в АХР. Следовательно, можно заключить, что тяжесть состояния коррелирует с кратностью снижения ацетилхолинэстеразы (рис.)

Под влиянием самых разнообразных причин миастенические симптомы могут периодически внезапно пароксизмально резко усиливаться,

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
Миастения без поражения тимуса	0,05±0,006*	0,018± 0,005*	0,002± 0,001	0,017±0,006*	0,043±0,01*
Миастения на фоне гиперплазии тимуса	0,045±0,001*	0,050±0,002*	0,001± 0,001	0,048± 0,01*	0,030±0,012*
Миастения на фоне тимомы	0,050±0,003*	0,035±0,005*	0,020±0,001*	0,032± 0,001*	0,083±0,006*

Примечание: * — $p < 0,05$.

перерастая в картину миастенических кризов [8]. Наиболее подвержен развитию осложненного течения послеоперационный период после тимэктомии с развитием тяжелых нарушений функции жизненно важных органов и систем.

Критическими сроками развития миастенических кризов являются 2–4-е сутки после тимэктомии, в течение которых в большинстве случаев отмечается ухудшение состояния больных [9].

Нормализация концентрации холинэстеразы сопряжена с улучшением дыхательной функции.

При МГ важным диагностическим и прогностическим критерием является снижение концентрации холинэстеразы в сыворотке крови, что также является и прогностическим критерием развития миастенического криза.

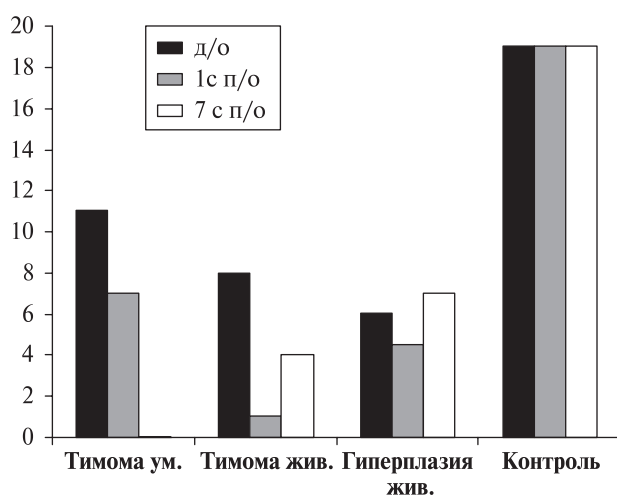


Рис. Изменение концентрации холинэстеразы у больных с разными фенотипами миастении

Послеоперационное течение, осложненное миастеническим и холинэргическим кризом наблюдали у пациентов с повышением экспрессии CD19, CD50, CD54 и органоспецифических антител к легким и нативной ДНК.

Помимо дифференцированных диагностических подходов контролировали динамику содержания всей совокупности цитотоксических соединений сыворотки крови больных миастенией и осуществляли мониторинг функционального их состояния. Нами ранее было показано, что при совместной инкубации культуры одноклеточной водоросли, не имеющей клеточной стенки и сыворотки больного выявляли структурно-функциональные изменения клеточной тест-системы *D. viridis* [11] в зависимости от типа и количества цитотоксических соединений в сыворотке крови. У пациентов с миастеническим кризом было выявлено увеличение в 1,8 раза коэффициента цитотоксичности, что указывало на дебют миастенического криза и коррелировало с увеличением концентрации гуморальных факторов [12]. Через некоторое время данный показатель снижался примерно на 30%, что характеризовало рецидив миастенического криза.

Наблюдали смешанные кризы у больных с локальными формами миастении. Они характеризовались присоединением к миастеническим проявлениям при приеме повышенных доз антихолинэстеразных препаратов после операции (прозерин внутримышечно по 2 мл через 3–4 часа) холинэргических проявлений с обильной секрецией слюнных желез и секрета бронхиального дерева, диспептических расстройств, фасциальными подергиваниями мышц.

Патогенетически возникновение смешанного криза объясняется относительной резистентностью одних и большей чувствительностью других групп мышц к действию повышенных доз антихолинэстеразных препаратов, применяемых при миастеническом кризе. Комбинированный криз называют “ломким” вследствие противоположности механизмов, лежащих в его основе.

С одной стороны, больной нуждается в немедленном приеме антихолинэстеразных препаратов, а с другой — он не переносит эти препараты и состояние его ухудшается на фоне их приема [10].

Молекулярной основой развития миастенического криза может являться резкое уменьшение количества функционирующих АХР вследствие массивной атаки их аутоантителами [1].

У тех больных, у кого выявляли достоверное изменение иммунологических маркеров основной стратегией лечения было применение методов гравитационной хирургии и адресной гемофильтрации с использованием специфических сорбирующих моноклональных антител, обладающих способностью комплементарно связываться с тканевыми аутоантителами различного репертуара, а также применение препаратов с низкомолекулярными пептидами, экранирующими патогенные аутоантитела, приводящие к деструкции клеточных рецепторов и тканей.

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 [1]. 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.

В отдельных случаях развитие миастенического криза, резистентного к общепризнанным методам лечения, которые включают тимэктомию, плазмаферез, антихолинэстеразную терапию, требует респираторной поддержки и отмены антихолинэстеразных препаратов.

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 выражалось в повышении фагоцитарного числа. При миастении без морфологических изменений тимуса (М) 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 переноса 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 ОСА к легким, нативной ДНК и 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 и усиление экспрессии CD50 и CD54, что может быть использовано превентивно в дооперационном периоде для верификации диагноза прогноза миастенического криза.

5. В качестве скрининг-теста в индивидуальном мониторинге течения болезни и оценки эффективности лечения аутоиммунных патологий, а также с целью осуществления оценки цитотоксичности может быть использована клеточная тест-система *Dunaliella viridis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойко В.В., Климова Е.М., Кудревич А.Н. Лечение миастении с учетом иммунофизиологических фенотипов. — Харьков: Издательство Шейниной Е.В., 2008. — 424 с.
2. Бойко В.В., Климова Е.М., Дроздова Л.А., Белокопытова П.С. Нарушение первичного и вторичного адаптивного иммунного ответа у больных с различными клиническими фенотипами миастении // Харківська хірургічна школа. — 2013, № 3 (60). — С. 80–84.
3. Гехт Б.М. Нервно-мышечные болезни / Б.М. Гехт, Н.А. Ильина. — М.: Медицина, 1982. — 350 с.
4. Санадзе А.Г. Антитела к мышцам (*anti-titin-antibody*)

О.М. Угрин, В.М. Акімова,
Г.П. Никитюк

ВПЛИВ РОСЛИННИХ СЕРЕДНИКІВ НА ІМУННИЙ СТАТУС ЗА УМОВ АУТОІМУННОГО ТИРЕОЇДИТУ

Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького

Останнім часом в Україні відмічається збільшення числа хворих з різними ендокринопатіями, приріст яких, за офіційними статистичними даними, з 2005 по 2011 рр. склав 9,85% [1–3, 6, 9, 11, 13, 22].

Поширеність аутоімунного тиреоїдиту (АІТ) серед дорослого населення різних країн світу коливається від 2 до 4%. У жінок він зустрічається у 10–15 разів частіше, ніж у чоловіків. Діти хворіють на АІТ дещо рідше, ніж дорослі (поширеність — 1%), дівчатка втричі частіше, ніж хлопчики [3, 10, 11, 13, 14, 17].

У розвитку АІТ, як і кожного аутоімунного захворювання, провідну роль відіграє поєднання трьох основних груп факторів: базисних, ініціюючих та сприяючих [3, 4, 20]. Серед базисних, що створюють передумови для виникнення захворювання — генетичні особливості, стать, гормональний фон, патологія тимусу, первинні імунодефіцити. Ініціюючі, — це антигени, що реагують перехресно, модифіковані та комплексні антигени, суперантигени та дисбаланс субпопуляцій Т-лімфоцитів, тощо. Фактори, що сприяють розвитку аутоімунних процесів — дисфункція імунної системи з ослабленням супресорних механізмів, порушення аутоідентифікації [7, 13–15, 18, 20].

Численні дослідження останніх років довели, що виникнення АІТ є, перш за все, результатом поєднання генетичної схильності та несприятливих факторів оточуючого середовища [4, 13, 17, 18, 21, 22].

Більшість авторів [1, 2, 5, 7, 8, 13, 16, 19] проводять протиречиві дані про участь клітинних і гуморальних факторів імунної системи у виникненні і формуванні аутоімунного процесу.

На нинішній день створена велика група імуноотропних препаратів, які прямо або опосередковано впливають на імунну систему. Особливий інтерес становлять препарати, що створені на основі природних компонентів. До них

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. Aarli J., Skeie G., Mygland A., Gilhus N. Muscle striation antibodies in myasthenia gravis. Diagnostic and functional significance // *Ann. N.Y. Acad.Sci.* — 1998. — Vol. 841. — P. 505–515.
6. Лайсек Р.П. Миастения / Р.П. Лайсек, Р.Л. Барчи. — М.: Медицина, 1984. — 272 с.
7. Божков А.И., Климова Е.М., Бойко В.В. Связь клинических форм миастении с частотой встречаемости HLA-DR-фенотипа и разработка клеточного биосенсора для оценки этой патологии // *Научно-теоретический журнал Президії НАНУ.* — 2002. — № 3. — С. 35–40.
8. Скрипниченко Д.Ф., Шевнюк М.М. Хирургическое лечение миастении. — К.: Здоровье, 1982. — С. 121–123.
9. Varelos P.N., Natterman S., Chua H.C., Barmadia L. Вентиляционная поддержка при кризе миастении gravis // *Медицинский реф. журнал.* — 2003. — № 1. — С. 21.
10. Бойко В.В., Нечитайло П.Е., Костя Ю.П., Бачерикова Ю.А. Хирургическая оценка отдаленных результатов хирургического лечения миастении // *Харьковская хирургическая школа.* — 2010. — № 3. — С. 72–74.
11. Климова Е.М., Лавинская Е.В. Использование микроводоросли *Dinialiella Viridis Teodor (Chloro-phyta)* в качестве клеточного биоиндикатора // *Альгология.* — 2012. — № 2. — С. 208–218.
12. Бойко В.В., Климова О.М., Дроздова Л.А., Кудревич О.М. Спосіб диференціальної діагностики і прогнозування перебігу варіантів мультифакторіальних захворювань Пат. № 32556 А61В 5/00 Державна установа “Інститут загальної та невідкладної хірургії Академії медичних наук України” (UA), пр. 19.11.2007, опубл. 26.05.2008, Бюл. № 10.

ДІАГНОСТИЧНІ КРИТЕРІЇ УСКЛАДНЕНОГО ПЕРЕБІГУ МІАСТЕНІЇ У ХВОРИХ ПІСЛЯ ТІМЕКТОМІЇ

О.М. Клімова, Л.А. Дроздова, П.Є. Нечитайло,
О.В. Лавинська, Ю.В. Калашнікова

Оцінка діагностичних маркерів первинного і вторинного гуморального і клітинного імунітету і моніторингування цитотоксичних факторів за допомогою клітинної тест-системи у хворих з різними клінічними фенотипами міастенії дозволяє здійснювати адресну імунокорекцію для профілактики міастенічних і холінергічних кризів.

DIAGNOSTIC CRITERIA OF COMPLICATED MYASTHENIA DISEASE IN PATIENTS AFTER THYMECTOMY

О.М. Klimova, L.A. Drozdova, P.Ye. Nechitaylo,
O.V. Lavinska, Yu.V. Kalashnikova

Evaluation of diagnostic markers of primary and secondary humoral and cellular immunity and monitoring of cytotoxic factors by cell test-system in patients with different clinical phenotypes of myasthenia allows for targeted prevention immunocorrection myasthenic and cholinergic crises.