© Климова Е. М., Кордон Т. И., Лавинская Е. В., Дроздова Л. А., Агаркова А. Н.

УДК 616.74-009.1:591.147.3-006.6+57.083.36:57.084:57.087

Климова Е. М., Кордон Т. И., Лавинская Е. В., Дроздова Л. А., Агаркова А. Н.

ИССЛЕДОВАНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННОЙ МИАСТЕНИЕЙ

ГУ «Институт общей и неотложной хирургии им. В. Т. Зайцева НАМН Украины»

(г. Харьков)

ktikti@mail.ru

Данная работа является фрагментом НИР «Изучение иммунопатологических механизмов формирования различных клинических фенотипов миастении», № государственной регистрации 0113U000143.

Вступление. Миастения – прогрессирующее аутоиммунное заболевание, обусловленное аутоантителами различной природы, нарушением синтеза цитокинов и возникновением аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, при котором происходят нарушения многих звеньев регуляции [9]. При таких патологических состояниях, сопровождающихся масштабными цитолитическими процессами, в крови и межклеточной жидкости накапливаются продукты деструкции клеток и тканей – фрагменты клеточных мембран, денатурированные белки и продукты катаболизма иммуноглобулинов, гликопротеины с измененной структурой и др. [3].

Известно, что миастения характеризуется выраженным клиническим полиморфизмом и различными механизмами нейротрансмиттерных нарушений, что обуславливает особенности течения, тяжесть и степень выраженности заболевания [2, 11].

Остается актуальным проблема поиска методов скрининга цитотоксических низко- и высокомолекулярных миастогенных сывороточных компонентов сыворотки крови для обоснования и выбора индивидуальной тактики лечения больных с различными клиническими фенотипами миастении. В настоящее время широко применяют детекторные биоиндикаторные системы на основе микроводорослей для скрининга потенциальной цитотоксичности веществ. В НИИ биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина и диагностической лаборатории ГУ «Институт общей и неотложной хирургии им. В. Т. Зайцева НАМН Украины» разработан метод биоиндикации, заключающийся в оценке изменений морфофункциональных параметров клеток микроводорослей *Dunaliella viridis* Teod. под действием сывороточных компонентов, обладающих потенциальным цитотоксическим действием [4]. Клетки водоросли непосредственно контактируют с тестируемыми мембранотропными лигандами плазматической мембраны из-за отсутствия целлюлозной клеточной стенки. Это обусловливает высокую чувствительность клеток *D. viridis* к наименьшим изменениям среды, в которой они находятся. Изменение формы и подвижности клеток, свидетельствующее об изменении микрофиламентов цитоскелета, может зависеть не только от свойств клеток, но и от природы и концентрации определенных компонентов в биологических средах. Клетки *D. viridis* реагируют на присутствие соединений различной природы в окружающей их среде по-разному: изменяют форму, теряют жгутики, образуют микро- и макроагрегаты посредством выделяемого ими экзометаболита с последующим агрегатообразованием [8].

Природа миастогенных факторов до конца не выяснена. Поскольку в патогенезе миастении большая роль принадлежит аутоантителам, цитокинам, стрессорным белкам, представляет интерес изучение белковых паттернов, характеризующих выраженность клинических фенотипов миастении. Для исследования природы и визуализации спектра цитотоксических миастогенных факторов использовали метод оценки процесса кристаллообразования белковых соединений в дегидратированной капле. Особенности структурной организации сухой пленки дегидратированной капли (фации) биологической жидкости определяются полимерностью и амфифильностью белковых молекул. При этом образуются кристаллические структуры, форма, количество и размеры которых опосредованно характеризуют физиологическое соотношение белков, солей и других веществ сыворотки крови [7,10].

Целью данного **исследования** было выяснение взаимосвязи между степенью цитотоксичности миастогенных факторов при действии на биоиндикатор *D. viridis in vitro*, изменением концентрации низко- и высокомолекулярных белковых паттернов и особенностями кристаллообразования в дегидратированной капле сыворотки крови.

Объект и методы исследования. Материалом для исследования служили форменные элементы и компоненты сыворотки крови 168 пациентов (141 женщина и 27 мужчин возрастом от 13 до 69 лет) с различными клиническими фенотипами миастении и поражением тимуса, которые были разделены на три группы. Классификацию клинических форм миастении проводили в соответствии с характером поражения вилочковой железы. Первую группу (М) составили 24 пациента с миастенией без поражения тимуса, вторую группу (МГ) составили 110 пациентов с миастенией и гиперплазией тимуса; третью группу (МТ) – 34 пациента с миасте-

нией, сочетающейся с различными типами тимом – лимфоэпителиальной, эпителиальной, лимфоидной, гранулематозной.

Скрининг цитотоксичности сыворотки крови проводили методом биоиндикации с использованием клеточной тест-системы *D. viridis*, представляющей собой синхронизированную 18-21 суточную культуру одноклеточной водоросли. В иммунологический планшет вносили в равных объемах исследуемую сыворотку крови и биоиндикатор *D. viridis*. После инкубирования в течение 30 минут при комнатной температуре проводили микроскопию образцов и оценивали влияние цитотоксических компонентов на клетки тест-системы по изменению ответной реакции клеток *D. viridis*: изменение морфологических (форма клеток) и функциональных (утрата подвижности, потеря жгутика, образование агрегатов) характеристик. После инкубации клеточной взвеси *D.viridis* с исследуемой сывороткой крови вычисляли количество измененных клеток: округлых, неподвижных и агрегированных, и выражали их соотношение в сравнении с контролем (определяли показатели цитотоксичности) [8].

Стандартными унифицированными методами определяли изменение концентрации низко- и высокомолекулярных белковых паттернов.

Определение концентрации общего белка проводили биуретовым методом. Оптическую плотность образцов измеряли на фотоколориметре КФК-3 при длине волны 546 нм.

Определение соотношения белковых фракций сыворотки крови проводили методом электрофореза с использованием ацетат-целлюлозных мембран (прибор для электрофореза ЭФ-1). Полученные фореграммы анализировали с помощью прибора АФ-1.

Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) – продуктов взаимодействия антиген-антитело-комплемент, оценивали спектрофотометрическим методом (спектрофотометр СФ-46) по преципитации ЦИК в полиэтиленгликоле.

Величину константы циркулирующих иммунных комплексов (ЦИКк) определяли по степени селективной преципитации ЦИК в градиенте плотности ПЭГ спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-46).

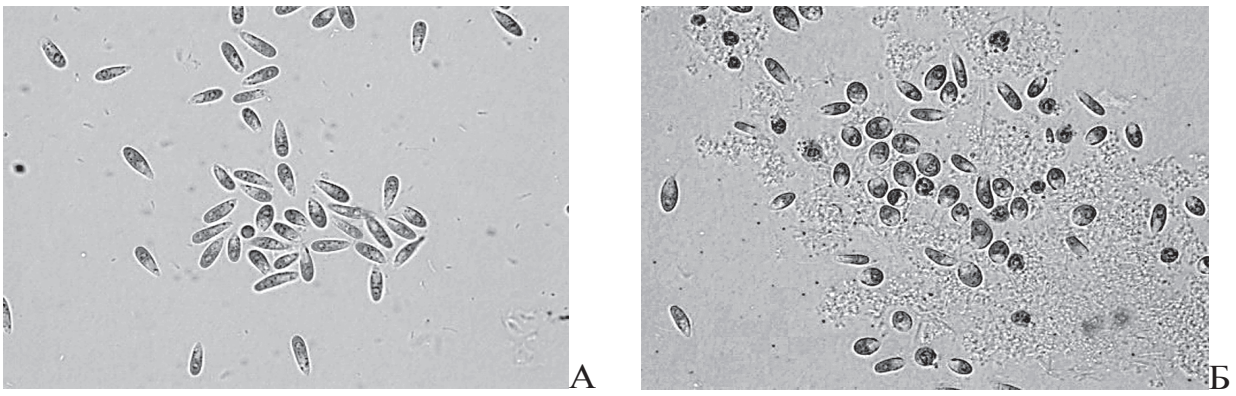
Определение уровня пептидов средней молекулярной массы (ПСММ) определяли спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-46) в ультрафиолетовом диапазоне длин волн после осаждения грубодисперсных белков.

Интегральную оценку уровня аутоиммунных антител проводили в тесте комплементзависимой лимфоцитотоксичности (по методу Терасаки) с последующей микроскопией (микроскоп Olympus BX53).

Наряду с этим исследовали характер спонтанного кристалообразования. Структурообразующие свойства сыворотки крови определяли по методу Шабалина В. Н., Шатохиной С. Н. [10]. Для получения препаратов спонтанного кристаллообразования в дегидратированной капле сыворотку крови пациентов в объеме 10 мкл наносили на предметное стекло и помещали в термостат на 24 часа при 37^{0}С до полного высыхания. Исследование структуры дегидратированной капли проводили методом темнопольной микроскопии (увеличение х40) с использованием микроскопа «Olympus BX53».

Результаты исследований и их обсуждение. Исследование цитотоксичности миастогенных факторов при действии на биоиндикатор D. viridis in vitro. У больных с различными клиническими фенотипами миастении оценивали наличие цитотоксических факторов с использованием клеточной тест-системы D. viridis. Сыворотка крови доноров после инкубации с тест-системой индуцировала изменение формы, в среднем, у (6,0±0,91)% клеток D. viridis, количество неподвижных клеток было на уровне (9,0±0,45)%.

После действия сыворотки крови пациентов группы М на клетки водоросли выявили достоверное увеличение в 7,1 раза количества клеток, изменивших форму и количества неподвижных клеток – в 6,2 раза по сравнению с контрольной группой. Количество агрегированных клеток в данной группе в среднем составляло (26,4±3,6)%. Следует отметить преобладание макроагрегатов (до 70 клеток в агрегате), находящихся в окружении экзометаболитов водоросли клеток *D. viridis* в сыворотках крови данной группы по сравнению с микроагрегатами (**рис. 1**).



А Б

Рис. 1. Культура одноклеточной водоросли D. viridis:
А – контроль; Б – после воздействия сыворотки пациента группы МТ

Таблица 1.

Показатели цитотоксичности сыворотки крови (при $К_{сп}$ = 3,4) пациентов с различными клиническими фенотипах миастении

Исследуемая группа	Количество неподвижных клеток D. viridis, %	Количество агрегированных клеток D. viridis, %	Коэффициент индуцированной цитотоксичности сыворотки (КЦС)	Индекс цитотоксичности (Иц)
Контроль	9,0±0,45	-	0,47±0,12	0,90±0,11
М	27,0±0,6	26,0±0,3	10,2±1,8*	2,91±0,34*
МГ	45,0±0,4	32,0±0,4	11,2±1,6*	3,29±0,82*
МТ	33,0±0,6	40,0±0,4	11,4±1,1*	3,35±0,59*

Примечание. *– достоверность различия с контролем p≤0,05.

Сыворотка крови пациентов группы МТ вызывала изменение формы и функциональной активности биоиндикатора в меньшей степени – на 15% и 13% соответственно, однако количество агрегированных клеток было на 2% больше, чем в сыворотке крови пациентов группы М. Количество округлых клеток под действием сыворотки крови пациентов группы МТ увеличилось в 6,2 раза, а количество неподвижных клеток возросло в 5,5 раз по сравнению с контролем. Очевидно, сыворотка пациентов группы МТ содержала большое разнообразие цитотоксических факторов, вызывающих временный «паралич» клеток (отсутствие движения и импульсивное подергивание), обусловленный повышением концентрации низко- и высокомолекулярных цитотоксических факторов, включающих цитокины, органоспецифические антитела и продукты их катаболизма – абзимы.

Коэффициент индуцированной цитотоксичности сыворотки крови условно здоровых доноров составил в среднем КЦС = 0,47±0,12. Во всех исследуемых сыворотках, потенциально содержащих цитотоксические факторы различной природы, выявили значительное увеличение коэффициентов цитотоксичности (**табл. 1**). Сыворотка крови пациентов группы М, МГ и МТ приводила к возрастанию коэффициента индуцированной цитотоксичности сыворотки крови в 21,7, 23,8 и 24,2 раза соответственно по сравнению с контролем. Между группами этот показатель отличался в среднем на 9,7% в данных группах.

Результаты оценки цитотоксичности сыворотки крови по методу Терасаки. Также изучали степень цитотоксичности сыворотки крови исследуемых групп пациентов с помощью унифицированного метода комплементзависимой лимфоцитотоксичности. Как известно, естественные аутоантитела, находящиеся в норме в небольшом количестве, стимулируют регенерацию тканей, не вызывая патологических процессов. При иммунной аутоагрессии не только увеличивается их количество, но происходят и качественные изменения – усиление антигенной специфичности, повышение авидности и т. д. Комплексы антиген-антитело-комплемент повреждают клеточные мембраны лимфоцитов, пропускают краситель, а окрашивание их анилиновыми красителями позволяет дифференцировать их от

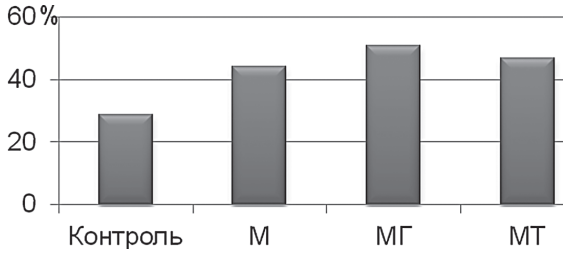


Рис. 2. Уровень лимфоцитотоксичности в группах пациентов с различными клиническими фенотипами миастении

живых, таким образом, определяя степень лимфоцитотоксичности.

На **рисунке 2** представлены результаты исследования цитотоксического эффекта опсонизированных комплементзависимых антител сывороток пациентов исследуемых групп.

Во всех исследуемых группах отмечено повышение суммарного содержания аутоиммунных аутоантител, но в наибольшей степени – в группе МГ, что составило (50,7±1,3)% при контроле (28,6±5,3)%.

Таблица 2.

Концентрация общего белка и соотношение белковых фракций сыворотки крови при различных клинических фенотипах миастении

Показатели	Группы			
	Контроль	М	МГ	МТ
Общий белок, г/л	71,2±4,3	73,6± 0,95	68,2± 4,86	69,7± 4,1
Альбумин, %	58,0±4,1	44,3± 2,0*	50,9± 3,8	36,8± 0,9
α1-глобулин, %	4,2±1,5	8,0± 0,8*	6,1± 0,7	6,5± 1,1
α2-глобулин, %	8,8±1,4	13,0± 0,9*	11,9± 1,3	11,6± 0,9
β-глобулин, %	15,6±5,8	17,3± 1,1	13,6± 1,7	17,2± 2,0
γ-глобулин, %	18,2±2,9	17,4± 0,9	17,5± 2,0	27,9± 2,2*

Примечание: *p<0,05 (отличия достоверны от контроля)

В группах М и МТ этот показатель составил (42,1±2,4)% и (44,7±5,9)% соответственно. Различия в группах достоверными не были.

Исследование показателей белкового обмена. У пациентов с различными клиническими фенотипами было установлено, что концентрация общего белка в исследуемых группах достоверно не отличалась от референтных значений. Однако соотношения белковых фракций при различных клинических фенотипах миастении достоверно отличались **(табл. 2).**

У пациентов с миастенией без поражения вилочковой железы (М) наблюдали достоверное повышение α1-фракции, включающей транспортные (α1-липопротеин, тироксин-связывающий белок), регуляторные (эндогенные ингибиторы протеолитических ферментов), α2-фракции, содержащей острофазовые белки (гаптоглобин, церулоплазмин), белки системы комплемента, а также незначительное увеличение γ-фракции на фоне снижения альбумина.

У больных с миастенией на фоне гиперплазии вилочковой железы (МГ) фракции α1- и α2-глобулинов были увеличены, но в меньшей степени, чем при М. В группе пациентов с миастенией на фоне тимомы (МТ) выявили достоверное снижение альбумина и максимальное увеличение γ-глобулиновой фракции, включающей иммуноглобулины, в том числе аутоантитела.

Исследование концентрации продуктов взаимодействия антиген-антитело. Исследования концентрации циркулирующих иммунных комплексов и оценка их молекулярной массы показала, что максимальные величины, характеризующие сывороточную концентрацию ЦИК, были выявлены в группе МГ, что в среднем составило (175,3±27,5) ед.Е. при контрольной величине (98,3±21,1) ед.Е. **(табл. 3)**.

Возможно, некоторое увеличение содержания концентрации ЦИК в исследуемых группах может быть результатом интенсивности их образования за счет синтеза аутоантител.

Следует отметить, что цитотоксичность зависит не только от концентрации ЦИК, но и их молекулярного веса. Именно низкомолекулярные ЦИК являются патогенными, вызывающими многие иммуновоспалительные процессы, о чем свидетельствует достоверное снижение константы ЦИК в среднем на 30% по сравнению с контролем (табл. 3).

Таблица 3.

Показатели гуморального иммунитета при различных клинических фенотипах миастении

Показатели	Группы			
	Контроль	М	МГ	МТ
ЦИК, ед.Е.	98,3±21,1	135,8±13,3	127,3±8,22	175,3±27,5*
ЦИК-к	1,3±0,04	1,03±0,04*	1,0±0,04*	1,1±0,1
ПСММ, ед.Е.	0,240±0,021	0,273±0,02	0,355±0,01*	0,300±0,022

Примечание: *p<0,05 (отличия достоверны от контроля).

Исследование продуктов гидролиза – пептидов средней молекулярной массы. Одним из показателей токсичности сыворотки является содержание эндогенных компонентов, образующиеся в процессе протеолиза в поврежденных тканях, а также в самой плазме при выходе в кровь протеолитических ферментов. При аутоиммунной патологии вследствие повышенного синтеза аутоантител происходит накопление большого количества белковых молекул и продуктов их деградации, имеющих среднемолекулярный вес 300-5000 Да. Содержание пептидов средней молекулярной массы в сыворотке крови пациентов с различными клиническими фенотипами миастении отличалось от контрольных значений, но максимальное повышение этого показателя (0,355±0,01) ед.Е отмечено в группе МГ.

Оценка особенностей кристаллообразования сыворотки крови в дегидратированной капле. На следующем этапе исследовали характер кристаллообразования дегидратированных капель сыворотки крови пациентов с различными фенотипами миастении. Морфологическая картина высушенной капли сыворотки крови здоровых доноров и пациентов исследуемых групп была различна **(рис. 3).**

Структурная организация сывороток крови практически здоровых доноров характеризовались

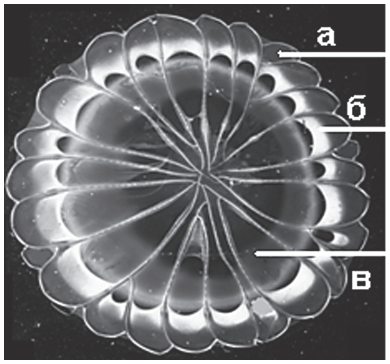
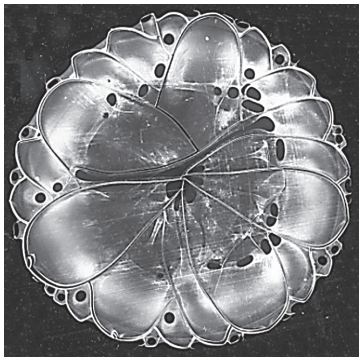


Рис. 3. Структурная организация дегидратированной капли сыворотки крови здоровых доноров



А



Б

Рис. 4. Кристаллограмма сывороток больных с различными клиническими фенотипами миастении, содержащих высокую (рис. А) и сниженную (рис. Б) концентрацию общего белка

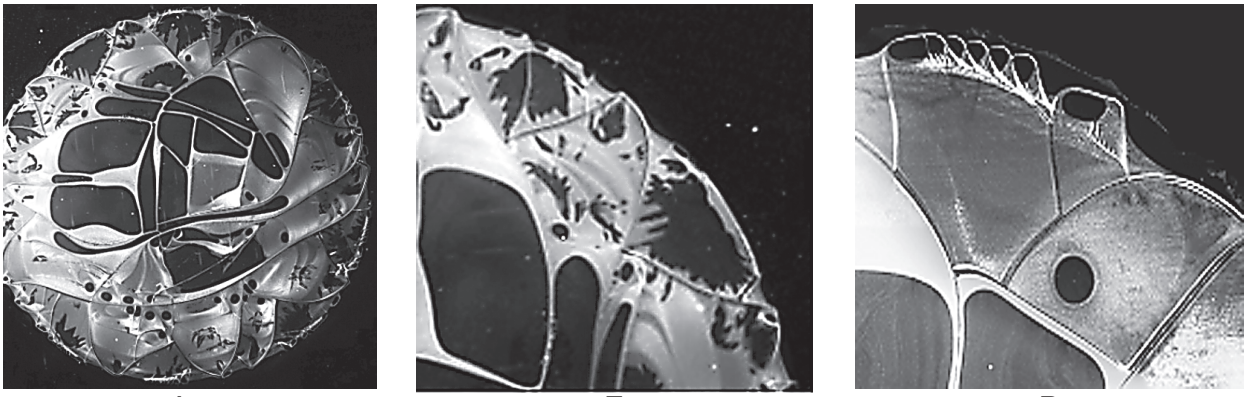


Рис. 5. Кристаллограмма сыворотки пациента группы М с высокой степенью цитотоксичности: А – общий вид капли; Б – фрагмент капли с характерными структурами «битое стекло» в краевой зоне; В – мелкопетлистые структуры в краевой зоне

наличием трех зон – краевой (а), промежуточной (б) и центральной (в). Структура капли упорядоченная, состояла из конкреций, отделенных со всех сторон трещинами. Фации имели по периферии радиальные трещины, загибающиеся в арки, сходящиеся в центре. В краевой зоне выявляли небольшое количество аморфных областей, а характер растрескивания имел аркадно-петельную структуру.

Изучая морфологическую структуру фации в группах пациентов с различными клиническими фенотипами миастении, были выявлены отличия от кристаллообразования в контроле (**рис. 4**).

Классифицируя кристаллограммы сыворотки по морфологическому сходству и проанализировав некоторые результаты иммунологических исследований, была выявлена следующая взаимозависимость: в кристаллограмме пациентов, в сыворотке крови которых концентрация общего белка в среднем составила (73,6±6,2)% г/л, краевая зона занимала 1/3 – 1/2 радиуса фации **(рис. 4А).** У пациентов со сниженным содержанием общего белка (в среднем 56,7±4,3% г/л) краевая зона была истончена, а в некоторых участках фации отсутствовала **(рис. 4Б).**

Для визуализации особенностей отдельных значимых параметров, характеризующих степень цитотоксичности сыворотки и характером кристаллообразования в дегидратированной капле представлены примеры распределения низко- и высокомолекулярных белковых компонентов, которые коррелировали с разной степенью цитотоксичности в тесте с использованием *D. viridis* **(рис. 5).**

Степень цитотоксичности миастогенных факторов сыворотка крови пациента Ш. (М 56 лет) группы М была выше контрольных значений в тесте с *D. viridis* (Иц = 2,9), в тесте Терасаки (уровень противолимфоцитарных антител составил 49,0%). Также отмечали высокую концентрацию пептидов средней молекулярной массы (0,284 ед. Е.) и повышенное содержание ЦИК 196 ед. Е. Кристаллограмма сыворотки пациента группы М характеризовалась наличием в краевой зоне характерных структур, имеющих вид «битого стекла» **(рис. 5Б),** мелкопетлистых структур и наличием «морщин» – маркера интоксикации **(рис. 5В).**

У пациента Б. (Ж, 65) группы МТ в периферической крови фация в основном состояла из краевой и центральной зоны при отсутствии промежуточной

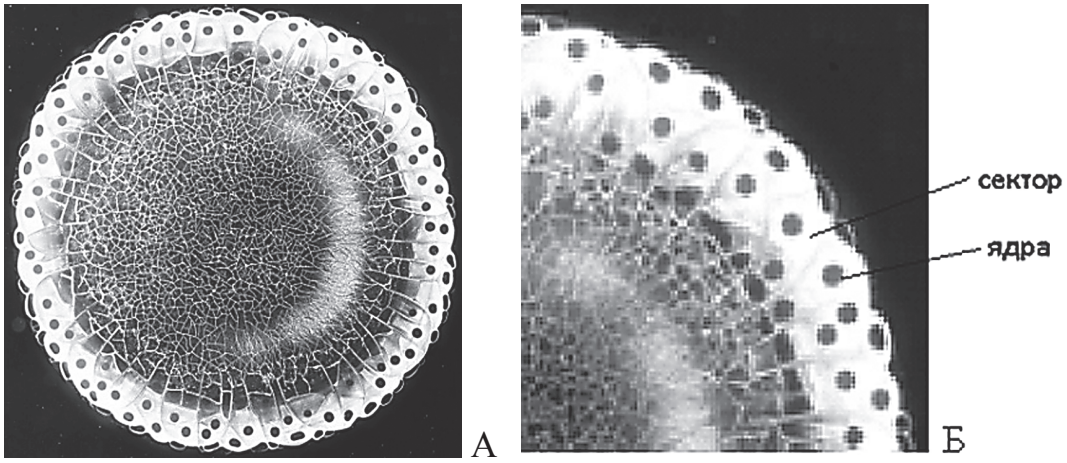


Рис. 6. Кристаллограмма сыворотки пациента группы МГ с высоким содержанием ПСММ и g

зоны. В краевой зоне фации наблюдали насыщение белковыми соединения и формирование ячеистой структуры – секторов, в которых содержались «ядра», или конкреции **(рис. 6А, 6Б).** Центральная часть фации состояла из большого количества хаотичных растрескиваний, формирующих мелкие секторы неправильной формы на фоне аморфной подложки.

Характер феномена клиновидной дегидратации сыворотки крови определяется количеством белков различной молекулярной массы, которые распределяются в соответствии с закономерностью радиальной диффузии в зависимости от их молекулярной массы в высыхающей капле сыворотки крови пациентов с аутоиммунной патологией. Количество общего белка прямо пропорционально внешнему радиусу высыхающей капли белого цвета. Наличие в сыворотке крови белковых паттернов с различной молекулярной массой может приводить к появлению трещин. В норме трещины в центральной зоне фации сыворотки крови прямые и имеют преимущественно радиальное направление. При заболеваниях аутоиммунной природы по данным других авторов в дегидраитированной капле сыворотки крови часто встречаются волнообразные трещины [1,7]. Морщины в периферической зоне фации сыворотки крови являются маркером интоксикации [6]. Возможно, сочетание волнообразных трещин и морщин обусловлено наличием различного спектра белковых соединений и цитотоксических факторов.

Выводы

Таким образом, выявлена взаимосвязь степени изменений различных паттернов белковых соединений у пациентов с аутоиммунной миастенией с характером ответа клеточного биоиндикатора *D. viridis* и формированием структурных дефектов (морщин и трещин) в дегидратированных каплях сыворотки крови на наличие миастогенных факторов.

Перспективы дальнейших исследований позволят разработать ранговые критерии для скрининговых методов оценки цитотоксичности с использованием биоиндикатора *D. viridis* и визуальной оценки кристаллообразования белковых соединений в дегидратированной капле.

Литература

1. Беляков К. М. Особенности морфологической картины плазмы крови при полиневропатиях / К. М. Беляков // Неврологический вестник. – 2007. – Т.XXXIX. – вып.1. – С.115-118.
2. Бойко В. В. Лечение миастении с учетом иммунофизиологических фенотипов / В. В. Бойко, Е. М. Климова, А. Н. Кудревич. – Харьков, 2008.– 424с.
3. Дедаев С. И. Антитела к аутоантигенным мишеням при миастении и их значение в клинической практике / С. И. Дедаев // Нервно-мышечные болезни.– 2014. – № 2. – С. 6–15.
4. Климова Е. М. Сравнительная оценка чувствительности клеточного биоиндикатора *Dunaliella viridis* Teod. для определения степени цитотоксичности патологических сывороток больных с различными заболеваниями / Е. М. Климова, Е. В. Лавинская // Клінічна та експериментальна патологія. – 2011. – Т. X, № 2 (36), Ч. 1. – С. 32-37.
5. Максимов С. А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине / С. А. Максимов // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – № 4. – С. 80-85.
6. Маркевич В. Э. Методы клиновидной дегидратации биологических жидкостей / В. Э. Маркевич, Е. А. Кириленко, В.А. Петрашенко, Т. Ю. Заблоцкая, М. А. Билоконь // Morphologia. – 2014. – Т. 8. – № 1.– С.113-117.
7. Матусевич А. К. Кристаллогенные свойства биологический жидкости при введении химического агента / А. К. Матусевич, Ж. Г. Симонова // СТМ. – 2011. – № 1. – С. 95-98.
8. Пат. UA № 08958, G01N33/15, C12Q1/04, C12M1/34. Спосіб біосенсорної індикації цитотоксичних факторів біологічної і хімічної природи / О. М. Клімова, А. І. Божков, В. В. Бойко, Т. І. Кордон, Л. А. Дроздова, О. В. Лавінська. – Заявл. 28.08.2009; Опубл. 10.03.2010, Бюл. № 5.
9. Санадзе А. Г. Титин, тимома и миастения / А. Г. Санадзе, Д. В. Сиднев, П. С. Ветшев, Л. И. Ипполитов // Нейроиммунология. – 2006. – Т. 4. – № 3–4. – С. 24-27.
10. Шабалин В. Н. Морфология биологических жидкостей человека / В. Н. Шабалин, С. Н. Шатохина. – М.: Хризостом, 2001. – 304 с.
11. Brenner T. Acetylcholinesterase inhibitors and cholinergic modulation in Myasthenia Gravis and neuroinflammation / T. Brenner, E. Nizri, M. Irony-Tur-Sinai, Y. Hamra-Amitay, I. Wirguin // Journal of Neuroimmunology. 2008. – Vol. 201–202. – P. 121-127.

УДК 616.74-009.1: 591.147.3-006.6 + 57.083.36: 57.084: 57.087

ДОСЛІДЖЕННЯ СИРОВАТКОВИХ КОМПОНЕНТІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИ У ПАЦІЄНТІВ З АВТОІМУННОЮ МІАСТЕНІЄЮ

Клімова О. М., Кордон Т. І., Лавінська О. В., Дроздова Л. А., Агаркова А. М.

Резюме. Проведено оцінку ступеню цитотоксичності сироватки при різних формах міастенії та структурних змінах тимусу скринінговими та уніфікованими лабораторними методами. Виявлено взаємозв'язок ступеня змін різних патернів білкових сполук у пацієнтів з автоімунною міастенією з характером відповіді клітинного біоіндикатора *D. viridis* і формуванням структурних дефектів (зморшок і тріщин) в дегідратованих краплях сироватки крові на наявність міастогенних факторів.

Ключові слова: міастенія, цитотоксичність, біоіндикація, кристалоутворення.

УДК 616.74-009.1:591.147.3-006.6+57.083.36:57.084:57.087

ИССЛЕДОВАНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННОЙ МИАСТЕНИЕЙ

Климова Е. М., Кордон Т. И., Лавинская Е. В., Дроздова Л. А., Агаркова А. Н.

Резюме. Проведена оценка степени цитотоксичности сыворотки при различных видах миастении и структурных изменениях тимуса скрининговыми и унифицированными лабораторными методами. Выявлена взаимосвязь степени изменений различных паттернов белковых соединений у пациентов с аутоиммунной миастенией с характером ответа клеточного биоиндикатора *D. viridis* и формированием структурных дефектов (морщин и трещин) в дегидратированных каплях сыворотки крови на наличие миастогенных факторов.

Ключевые слова: миастения, цитотоксичность, биоиндикация, кристаллообразование.

UDC 616.74-009.1: 591.147.3-006.6 + 57.083.36: 57,084: 57,087

INVESTIGATION OF DIFFERENT SERUM COMPONENTS IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE MYASTHENIA

Klimova E. M., Kordon T. I., Lavinskaya E. V., Drozdova L. A., Agarkova A. N.

Abstract. Myasthenia is characterized by marked clinical polymorphism and different mechanisms of neurotransmitter disturbances that determines the course characteristics, severity and extent of disease. It remains relevant the problem of finding relevant screening methods cytotoxic low and high molecular weight serum components of blood serum for the study and the choice of individual tactics of treatment for patients with different clinical phenotypes of myasthenia.

The aim of this study was to determine the relationship between the degree of cytotoxicity myasthenic factors under the action of bioindicator *D. viridis in vitro*, changes in the concentration of low and high molecular weight protein patterns and characteristics of crystal formation in the dehydrated drop of blood serum.

The material for the study were shaped elements and components of blood serum of patients with different clinical phenotypes of myasthenia and the defeat of the thymus – M (myasthenia without defeat of the thymus), MH (myasthenia with hyperplasia of the thymus gland) and MT (myasthenia, combined with various types of thymoma).

In the study of cytotoxicity myasthenic factors using bioindicator *D. viridis in vitro* is determined that induced serum cytotoxicity coefficient was significantly higher than controls (healthy donors): 21,7 times in the group M, 23,8 times in the group MH and 24,2 times in MT group.

In the complement dependent cytotoxicity test in all groups was determined an increase in the total content of autoimmune autoantibodies – in the group M (42,1 ± 2,4)%, in the the MT group (44,7 ± 5,9)%, but at most – in the group MH (50,7 ± 1,3)% relative to a control (28,6 ± 5,3)%.

The ratio of protein fractions in different clinical phenotypes of myasthenia has been significantly different. In the group M a significant increase of α1- and α2-fraction, a slight increase in γ-fraction due to lower albumin was observed. In the group MH fraction α1- and α2-globulins were increased, but to a lesser extent than group M. In patients of group MT a reduction in albumin and significant increase γ-globulin fraction has showed.

Maximum content of the concentration of circulating immune complexes (175,3 ± 27,5) unit extinction and the average molecular weight peptides (0,355 ± 0,01) unit extinction in the group MH is observed.

In groups of patients with different clinical phenotypes myasthenia differences morphological structure dehydrated serum drops is revealed. In crystallograms patients with a high content of total protein in averaged boundary zone occupies 1/3 – 1/2 radius facies. In patients with reduced total protein regional zone it was thinned or absent. In patients with a high degree of cytotoxicity myasthenic factors crystallograms characterized by the presence in the regional zone of the characteristic patterns of the form "broken glass" sectors, containing the “cores”, small loop wale structure and "wrinkles" – markers of intoxication.

Thus, the relation between the degree of changes in different patterns of protein compounds in patients with autoimmune myasthenia with the nature of the cellular response bioindicator D. viridis and the formation of structural defects (cracks and wrinkles) in dehydrated serum drops of blood for the presence of factors is revealed.

Further studies allow develop ranking criteria for screening methods for assessing cytotoxicity using bioindicator D. viridis and visual evaluation of crystal protein compounds in dehydrated drop.

Keywords: myasthenia, cytotoxicity, bioindication, crystal formation.

Рецензент – проф. Скрипник І. М.

Стаття надійшла 01.11.2015 року