

## ПОЛІМОРФІЗМ КЛІНІЧНИХ ФЕНОТИПІВ І ГЕТЕРОГЕННІСТЬ АВТОІМУННИХ МІШЕНЕЙ МІАСТЕНІЇ

*Клімова О. М., Дроздова Л. А., Лавінська О. В., Кудревич О. М.*

**Резюме.** Метою дослідження є оцінка наявності автоантитіл до різних субодиниць nAHP і ядерних антигенів при різних фенотипах міастенії. В роботі досліджували наявність антитіл до  $\alpha 1$ - і  $\alpha 7$ -субодиниць nAHP; репертуар і частоту зустрічальності антинуклеарних автоантитіл при різних клінічних фенотипах міастенії для розуміння механізмів патогенезу різних форм даного захворювання. Виявлені додаткові фактори автоімунізації, що впливають на певні механізми патогенезу при тимуснезалежній і тимусзалежній міастенії. Виявили автоантитіла до  $\alpha 1$ - і  $\alpha 7$ -субодиниць нікотинового ацетилхолінового рецептору (nAHP) при тимуснезалежній міастенії і тимусзалежній міастенії на тлі гіперплазії тимусу або місцево-поширених тимом, а також наявність антинуклеарних антитіл при тимомах на тлі міастенії. Автоантитіла до  $\alpha 1$ -субодиниці nAHP є наявними у всіх обстежених хворих з тимуснезалежною і тимусзалежною міастенією, максимальний титр був у пацієнтів з міастенією на тлі гіперплазії тимусу. Наявність автоімуних антитіл до іншої мішені – до  $\alpha 7$ -субодиниці nAHP виявили у пацієнтів з тимуснезалежною міастенією та з міастенією на тлі гіперплазії тимусу. Виявлені антиядерні антитіла (ANA) у пацієнтів з тимомами, є переважно антитілами до структур, які беруть безпосередню участь в мітотичному поділі клітин – до центромер, до центромерного білку F, центросомного білку ахромаінового веретена – NuMa і антигену MSA-2 волокон мітотичного веретена, що впливає на перебіг клітинної проліферації, репаративні і регенеративні процеси в тканинах. Вибірковість ураження антитілами субодиниць nAHP при різних фенотипах міастенії і наявність ANA при тимусзалежній міастенії на тлі тимома має велику діагностичну та прогностичну цінність. Наявність специфічних автоантитіл до певних ядерних структур клітини, поряд з іншими механізмами автоімунізації впливає на різні метаболічні механізми, і це може бути використано для вибору адресної терапії з урахуванням індивідуальних патогенетичних мішеней автоімуного процесу.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** тимуснезалежна міастенія, тимусзалежна міастенія, гіперплазія тимусу, тимома, автоантитіла, антиядерні антитіла

### ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

**Клімова Олена Михайлівна**, д.б.н., професор, зав. діагностичної лабораторії з імуноферментним та імунофлуоресцентним аналізом ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМН України», в'їзд Балакірева, 1, Харків, Україна, 61103, e-mail: klimovalena53@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4007-6806>

**Дроздова Лариса Анатоліївна**, к.б.н., старший науковий співробітник діагностичної лабораторії з імуноферментним та імунофлуоресцентним аналізом ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМН України», в'їзд Балакірева, 1, Харків, Україна, 61103, e-mail: larissadr007@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9678-4046>

**Лавінська Олена Володимирівна**, к.б.н., науковий співробітник діагностичної лабораторії з імуноферментним та імунофлуоресцентним аналізом ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМН України», в'їзд Балакірева, 1, Харків, Україна, 61103, e-mail: elena.lavinskaya@ukr.net, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7320-0925>

**Кудревич Олександр Миколайович**, к.мед.н., доцент, завідувач кафедри хірургічних хвороб, оперативної хірургії та топографічної анатомії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 6, Харків, Україна, 61022, e-mail: o.m.kudrevych@karazin.ua, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2086-8822>

### ВСТУП

Міастенія – мультифакторіальне захворювання, що характеризується порушенням нервово-м'язової передачі і проявляється слабкістю і патологічною стомлюваністю поперечно-смугастих м'язів [1]. Автоімуна міастенія може поєднуватися зі структурно-функціональними порушеннями вилочкової

залози, що проявляється у вигляді гіперплазії і злоякісної тимоми [2, 3]. В основі захворювання лежать різноманітні автоімуні реакції, в тому числі спрямовані проти рухової кінцевої пластинки нікотинового ацетилхолінового рецептора (nAHP). Титр цих антитіл в сироватці крові не корелює з тяжкістю клінічних проявів, і у хворих з міастенією часто виявляються і

інші типи антитіл [4, 5]. Традиційне лікування міастенії включає гормонотерапію, цитостатики і антихолінестеразні препарати. При наявності структурно-функціональних порушень тимусу виконують його хірургічне видалення. Існуючий лікувально-діагностичний протокол не дозволяє збільшити ефективність лікування, так як захворювання характеризується високою клінічною гетерогенністю і наявністю різних етіологічних і патогенетичних механізмів.

Важливим є вивчення гетерогенності біомаркерів, специфічних для різних клінічних фенотипів тимуснезалежної та тимусзалежної міастенії для вибору адресного лікування. У наших роботах раніше було показано, що формування різних клінічних фенотипів міастенії асоційоване з віком пацієнтів, які відрізняються різною імунореактивністю і імунорезистентністю [6].

#### **МЕТА**

Оцінка наявності автоантитіл до різних субодиниць nAHP і ядерних антигенів при різних фенотипах міастенії.

#### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ**

Було обстежено 34 пацієнта з різними клінічними фенотипами міастенії: з тимуснезалежною міастенією (М) – 13 пацієнтів, з тимусзалежною міастенією на тлі гіперплазії тимусу (МГ) – 4 пацієнта і на тлі місцево-розповсюдженої тимоми (МТ) – 17 пацієнтів, у віці від 14 до 72 років.

В роботі досліджували наявність антитіл до  $\alpha 1$ - і  $\alpha 7$ -субодиниць nAHP; репертуар і частоту зустрічальності антинуклеарних автоантитіл при різних клінічних фенотипах міастенії для розуміння механізмів патогенезу різних форм даного захворювання.

Для визначення наявності антитіл до  $\alpha 1$ - і  $\alpha 7$ -субодиниць nAHP в сироватці крові використовували тест-систему для імуноферментного аналізу на твердофазному носії. В основі метода лежить специфічна взаємодія антигену, сорбованого на планшетах, з автоантитілами до  $\alpha 1$ - і  $\alpha 7$ -субодиниць nAHP, що містяться в досліджуваних сироватках. Комплекс «антиген-антитіло», що утворився виявляли за допомогою кон'югату, пероксидаза якого каталізує розщеплення субстрату (перекису

водню), викликаючи зміну забарвлення індикатора. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна вмісту антитіл до  $\alpha 1$ - і  $\alpha 7$ -субодиниць nAHP. Вимірювання оптичної щільності проводили при довжині хвилі 450 нм на імуноферментному аналізаторі STAT FAX 3200 (США).

Для виявлення сироваткових антиядерних антитіл (ANA) використовували скринінговий мультиспецифічний тест, що виконується методом непрямого імуноферментного аналізу (нІФА). Розведену сироватку пацієнтів інкубували в лунках планшета з нанесеною сумішшю очищених антигенів ядерних молекулярних структур SS-A (52 кДа), SS-A (60 кДа), SS-B, RNP-70, Sm, RNP / Sm, Scl-70, Centromere B і Jo-1.

Антитіла (ANA) сироватки пацієнтів, що зв'язалися з антигеном ідентифікували за допомогою ферментного кон'югату, що містить антитіла проти людського IgG. Далі в лунку додавали субстратно-хромогенний реагент, який перетворюється в забарвлений продукт під впливом ферментного компонента кон'югата. Для кількісної оцінки вмісту ANA в сироватці крові пацієнтів використовували формулу з урахуванням калібровача, що містить кількість сумарних ANA, що відповідають нормі: Індекс I = (OD зразка) / (OD cut-off). У нормі негативний індекс < 1.0, позитивний індекс > 1.2. (В дослідженнях використовували набір реактивів ANAscreen ORGENTEC, Німеччина).

При отриманні позитивного результату скринінгового обстеження пацієнтів за допомогою ІФА, на другому етапі для виявлення молекулярної мішені сироваткових специфічних антиядерних антитіл проводили непрямий імунофлуоресцентний аналіз з використанням МКАТ, мічених FITC і скелець з біочіповими реакційними зонами, поверхня яких вкрита субстратом: HEp-2 (епітеліальні клітини раку гортані людини) і криостатних зрізів печінки приматів (Набір реактивів EUROIMMUN, Німеччина). Специфічність світіння оцінювали за допомогою мікроскопу Olympus BX53 (Японія).

#### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

За результатами дослідження виявили закономірність в наявності основних патогенетичних маркерів міастенії –

автоантитіл (ААТ) до нАХР кінцевої пластинки синапсу за допомогою методу ІФА при клінічних фенотипах тимуснезалежної (М) і тимусзалежної (МГ і МТ) міастенії. Так як нАХР складаються з декількох субодиниць, що приєднують ацетилхолін, і мішенню автоімунних реакцій може бути будь-яка з них, ми вивчали

наявність антитіл до  $\alpha 1$ - і  $\alpha 7$ -субодиниць нАХР. Автоантитіла до  $\alpha 1$ -субодиниці нАХР виявили у всіх обстежених хворих з тимуснезалежною і тимусзалежною міастенією, максимальний титр був у пацієнтів групи МГ. Наявність автоантитіл до іншої мішені – до  $\alpha 7$ -субодиниці нАХР виявили в групах М і МГ (рис. 1).

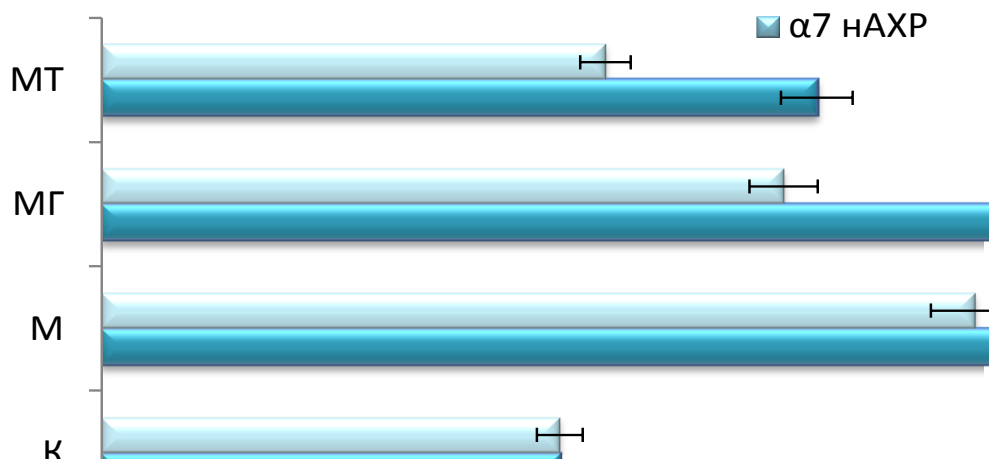


Рис. 1. Концентрація антитіл до  $\alpha 1$ - і  $\alpha 7$ -субодиниць нАХР у пацієнтів з різними клінічними фенотипами міастенії

За допомогою імуноферментного аналізу проводили скринінгові дослідження наявності автоантитіл до інших антигенних мішеней, що дозволило виявити наявність антиядерних антитіл у 61,5 % хворих з тимусзалежною міастенією на тлі місцево-поширених тимом (МТ), концентрація яких

в 4 рази перевищувала контрольний рівень (і в середньому становила  $(4,2 \pm 0,2)$  од. Е). При інших клінічних фенотипах тимуснезалежної (М) і тимусзалежної (МГ) міастенії антиядерні антитіла в сироватці крові не були виявлені (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст і частота зустрічальності антиядерних антитіл у пацієнтів з різними клінічними формами міастенії (М  $\pm$  m)

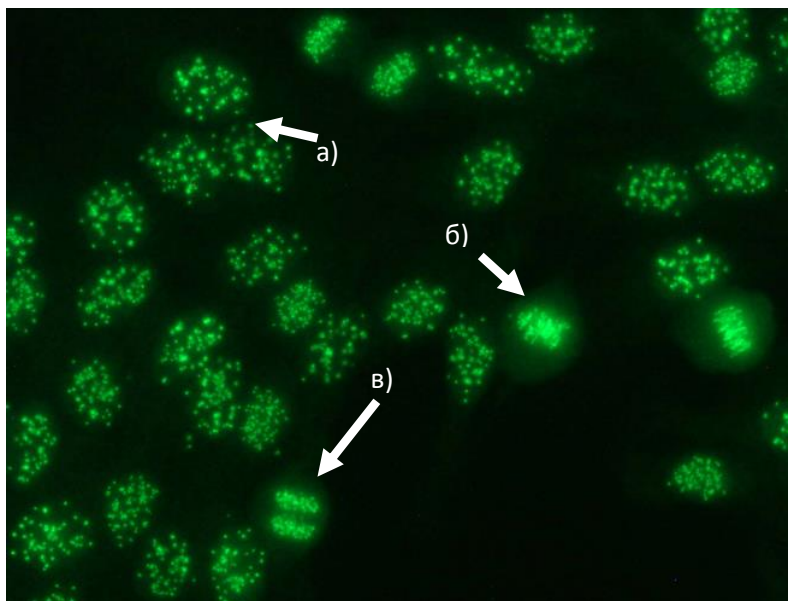
| Імунологічний показник |  | Референтні значення | Фенотип міастенії (n = 34) |                |               |
|------------------------|--|---------------------|----------------------------|----------------|---------------|
|                        |  |                     | М                          | МГ             | МТ            |
|                        |  |                     | (n = 13)                   | (n = 4)        | (n = 17)      |
| ІФА-скринінг           | Вміст автоантитіл ANA                              | $1,0 \pm 0,1$       | $0,3 \pm 0,02$             | $0,6 \pm 0,01$ | $4,2 \pm 0,2$ |
|                        | Частота зустрічальності ANA у виборці пацієнтів, % | –                   | 0                          | 0              | 61,5          |

Автоімунні реакції були більш виражені і більш різноманітні у хворих на тлі місцево-поширених тимом і стосувалися більшої кількості різних антигенних мішеней: ААТ були виявлені до  $\alpha 1$ -субодиниці нАХР та до ядерних структур.

Для візуалізації специфічності антиядерних антитіл проводили імунофлуоресцентний аналіз, що дозволив визначити цілий ряд додаткових структурних мішеней для автоантитіл у вигляді різних компонентів клітинних ядер.

У молодих пацієнтів (до 35 років) з міастенією на тлі тимом були виявлені ANA до центромер хромосом (табл. 2), які відповідальні за спрямований рух хромосом під час мітозу, беруть участь в адгезії сестринських хроматид, утворенні кінетохору, спарюванні гомологічних хромосом, а також залучені у 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 (рис. 2 а), тоді як у мітотичних клітинах вони утворюють стрічкоподібну структуру – одну посередині ядра (на стадії метафази) (рис. 2 б), або дві паралельні (на стадії анафази) (рис. 2 в).



**Рис. 2. Антиядерні антитіла до центромер хромосом у пацієнтів з міастенією на тлі тими (МТ) (РІФ-дослідження: забарвлення флуоресцентним барвником FITC комплексу сироваткових антитіл після їх взаємодії зі стандартним антигенним субстратом Нер-2)**

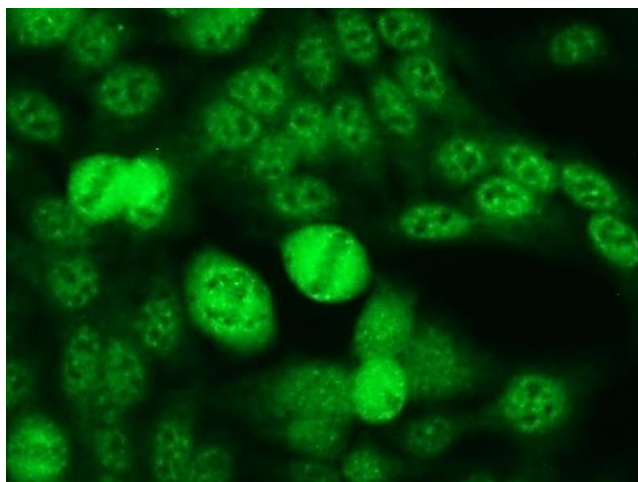
Також у пацієнтів групи МТ були виявлені ANA до центромерного білку F (СТNPF) (табл. 2), про що свідчить картина зв'язування сироваткових антитіл зі стандартним антигенним субстратом Нер-2: ядерний строкатий малюнок з вираженою мінливістю інтенсивності, з найсильнішим забарвленням у фазі G2 і слабким, або негативним забарвленням у фазі G1 клітинного циклу. Автоантитіла до білку F центромер позитивні тільки в прометафазі і метафазі і на препараті мають вигляд декількох дрібних і слабких точок однакового розміру. Прометафазні клітини мають слабе забарвлення ядерної оболонки. Під час анафази і телофази спостерігається інтенсивне забарвлення в середній зоні, де відбувається поділ дочірніх клітин. Цитоплазма мітотичних клітин дифузно пофарбована (рис. 3). За даними Fritzler M.J., наявність антиядерних автоантитіл до

центромерного білку F є маркером малігнізації [7], що є природним для хворих з пухлинним переродженням тимусу.

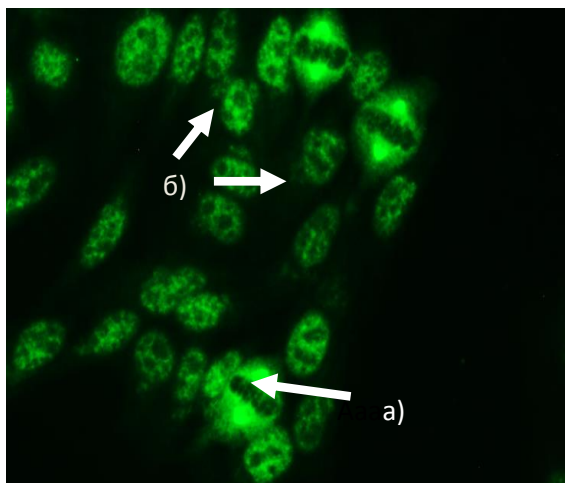
У пацієнтів групи МТ також були виявлені ANA до білка, що бере участь у формуванні мітотичного веретена – NuMa, який асоційований з центросомою (табл. 2). В інтерфазних клітинах він розподілений в ядрі, а в мітотичних – в полюсах веретена, і накопичення цього білка у мікротрубочках веретена здатне стабілізувати орієнтацію їх пучків [8]. Застосування специфічного субстрату Нер-2 для виявлення антитіл до даного антигену при флуоресцентній мікроскопії дозволило виявити мілке плямисте забарвлення ядер на різних стадіях клітинного циклу міжфазних клітин, при цьому забарвлення ядерця відсутнє (рис. 4 а). А мітотичні клітини виявляють яскраву флюоресценцію волокон ахроматичного веретена (рис. 4 б).

Крім того, в групі пацієнтів МТ виявили антитіла до антигену MSA-2 волокон мітотичного веретена. При мікроскопії спостерігали забарвлення у мітотичних клітинах волокон мітотичного веретена (рис. 5 а). Ядра інтерфазних клітин не забарвлюються (рис. 5 б). Білок MSA-2 бере участь у регуляції транскрипції при G1/S-переході мітотичного клітинного циклу. Він необхідний для репресій транскрипцій

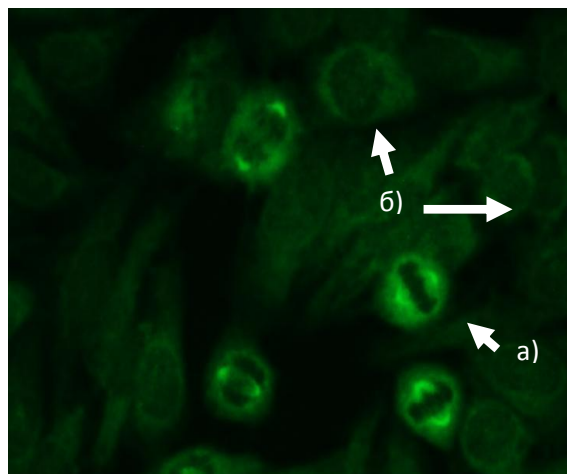
багатьох генів-мішеней [9]. Регуляція цих генів за допомогою MSA-1 та MSA-2, ймовірно важлива для нормального переходу від проліферації до періоду спокою. Наявність антитіл для білка MSA-2, можливо, сприяє порушенню переходу клітин від проліферації до стадії спокою, і викликає неконтрольований поділ клітин тимусу і, як наслідок, утворення тимом.



**Рис. 3.** Антиядерні антитіла до центромерного білку F (CTNPF) у хворих з міастенією на тлі тимому (МТ) (РІФ-дослідження: забарвлення флуоресцентним барвником FITC комплексу сироваткових антитіл після їх взаємодії зі стандартним антигенним субстратом Нер-2)



**Рис. 4.** Антиядерні антитіла до білку ахроматинового веретена NuMa у хворих з міастенією на тлі тимому (МТ) (РІФ-дослідження: забарвлення флуоресцентним барвником FITC комплексу сироваткових антитіл після їх взаємодії зі стандартним антигенним субстратом Нер-2)



**Рис. 5.** Антиядерні антитіла до антигену MSA-2 волокон мітотичного веретена у хворих з міастенією на тлі тимому (МТ) (РІФ-дослідження: забарвлення флуоресцентним барвником FITC комплексу сироваткових антитіл після їх взаємодії зі стандартним антигенним субстратом Нер-2)

Також у пацієнтів з міастенією на тлі тимоми були виявлені інші антитіла ANA – до цитоскелету, який представлений білками цитокератинами та тропоміозином. Відомо, що цитокератини входять до складу проміжних філаментів цитоскелету, а тропоміозин представляє собою волокнистий білок, який взаємодіє з актином у м'язовій тканині та бере участь у процесі

скорочення м'язів. На препараті зв'язування білків цитоскелету з ANA сироватки пацієнтів виявлено цитоплазматичний фібрилярний нитчатий патерн, який представляє собою яскраво забарвлені мікротрубочки і проміжні волокна, що розповсюджуються у напрямку від ядерної оболонки, і профарбовані більш інтенсивно в ділянках, прилеглих до ядра (рис. 6 а).

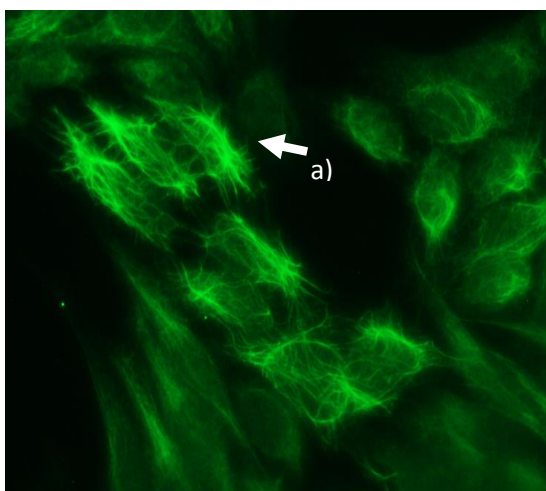
Таблиця 2

**Специфічність антиядерних антитіл у пацієнтів з різними клінічними формами міастенії**

| Імунологічний показник   | Фенотип міастенії<br>N = 34 |                 |                                       |                              |   |   |   |
|--|-----------------------------|-----------------|---------------------------------------|------------------------------|---|---|---|
|  | М                           | МГ              | МТ                                    |                              |   |   |   |
|  | n = 13                      | n = 4           | n=17                                  |                              |   |   |   |
|  |                             |                 | n = 6                                 | n = 4                        | n = 3                                     | n = 2   | n = 2   |
| Специфічність ANA до різних молекулярних мішеней клітинного ядра | ANA не виявлено             | ANA не виявлено | ANA до центромерхромосом (СЕМР А,В,С) | ANA до центромерного білку F | ANA до білку ахроматинового веретена NuMa | ANA антигену MSA-2 волокон мітотичного веретена | ANA до білків цитоскелету (цитокератини, тропоміозин) |

В мітотичних клітинах білки цитоскелету, які зв'язанні з ANA, візуалізуються у вигляді численних

яскравих цяток, що розташовані навколо хромосом, які не світяться (рис. 6 б).



**Рис. 6. Антиядерні антитіла до білків цитоскелету у хворих з міастенією на тлі тимоми (МТ) (РІФ-дослідження: забарвлення флуоресцентним барвником FITC комплексу сироваткових антитіл після їх взаємодії зі стандартним антигенним субстратом НЕР-2)**

Таким чином, нами виявлено додаткові фактори аутоімунізації, що впливають на конкретні механізми патогенезу при тимуснезалежній та тимусзалежній

міастенії. Найбільш характерним при міастенії є наявність ААТ проти nAHP, так як вони можуть екранувати і пошкоджувати постсинаптичну мембрану

та інгібувати синаптичну передачу, але існує вибірковість ураження субодиноць нАХР при різних фенотипах даного захворювання. Імуноферментний аналіз спектру аутоантитіл у хворих із різними клінічними фенотипами міастенії виявив у всіх обстежених пацієнтів наявність ААТ до  $\alpha 1$ -субодиноць нАХР, максимальний титр був у пацієнтів з міастенією на тлі гіперплазії тимусу. В групах М і МГ виявили ААТ до  $\alpha 7$ -субодиноць нАХР, а скринінговий ІФА-метод і імунофлюоресцентний аналіз показав наявність антиядерних антитіл лише у хворих з тимусзалежною міастенією на тлі тимом.

Роль аутоімунних антитіл до сих пір не зовсім зрозуміла: чи служать вони предикторами результату захворювання, чи є захистом від патологічного процесу або сигнатурою збудника аутоімунитету [7]. Системно організована загальноорганізменная мережа природних аутоантитіл є відображенням особливостей антигенного складу організму. Природні аутоантитіла складають значну частину від загальних циркулюючих імуноглобулінів, і беруть участь у реалізації гомеостатичних функцій імунної системи. Зміна антигенного складу клітин при різних захворюваннях призводить до продукції і секреції відповідних аутоантитіл, які безпосередньо залучаються до компенсаторних механізмів порушених функцій, в тому числі на клітинному рівні. Первинні порушення в структурі репертуару і кількості аутоантитіл головним чином залежать від кількості аномалій в продукції аутоантитіл, особливо вірус-індукованих, і можуть бути безпосередньою причиною розвитку різних захворювань [10].

Бобкова Н.В. (2008) показала, що ААТ до певних сайтів  $\alpha 7$ -субодиноць нАХР можуть захищати нейрони від нейротоксичної дії епігеномних факторів середовища при такій грізній патології, як хвороба Альцгеймера. Для корекції патологічного процесу авторами були отримані синтетичні пептиди – аналоги даного типу ААТ до  $\alpha 7$ -субодиноць нАХР, які мали регуляторну нейротрофічну і нейропротективну активність [11]. В експерименті подібна дія може формуватися в результаті пасивної

імунізації антитілами до цього пептиду з подальшим його зв'язуванням. Імунізація тварин відновлювала щільність  $\alpha 7$ -субодиноць нАХР, це підтверджує захисний механізм даної імунізації [11].

Виявлені нами ANA, є переважно антитілами до структур, які беруть безпосередньо участь в мітотичному поділі клітин – до центромер, до центромерного білку F, центросомного білку ахроматинового веретена – NuMa і антигену MSA-2 волокон мітотичного веретена, що асоційоване з прямим впливом на перебіг клітинної проліферації, репаративні і регенеративні процеси в тканинах, в тому числі в синапсах і тимусі.

Наявність ANA до центромерного білку F, які були нами виявлені у хворих з тимомами, розглядається іншими авторами як маркер малігнізації [8], яка є наслідком порушення механізмів репарації ДНК, і це може бути одним з патогенетичних чинників при формуванні злоякісних місцево-поширених тимом.

Аутоантитіла до центросомного білку NuMa, який бере участь в розходженні хромосом до полюсів мітотичного веретена і стабілізації мікротрубочок в ньому, а також здійснює особливу роль в диференціації нервових клітин, можливо, призводять до порушення нейро-м'язової передачі у хворих з тимомами. Оскільки, в центросому входить РНК, яка володіє поліфункціональною активністю, то при блокуванні центросоми може відбуватися порушення механізмів нейро-трансмітерних реакцій. Білки центросоми є структурними компонентами, які беруть участь в механізмах, що керують динамічною морфологією клітини в цілому [8]. Центросома – це ключова структура клітини в регуляторних процесах і порушення її функції призводить до аномалій клітинного циклу і дефектів в диференціюванні тканин, і, в кінцевому рахунку, до виникнення трофічних і онкологічних захворювань [12]. Отримані нами дані про наявність аутоантитіл до центросомного білку NuMa, можуть свідчити про порушення функції центросоми і процесу мітозу, що може бути патогенетичним фактором у пацієнтів з тимомами на тлі міастенії. Відомо, що зміна форми, розміру,

структури і кількості центросом спостерігається в клітинах агресивних пухлин [13, 14, 15].

Також у даної категорії хворих виявили антитіла до білків цитоскелету тропоміозину, з унікальною структурою подвійної  $\alpha$ -спіралі, і цитокератину. Збільшення синтезу деяких ізоформ цитокератинів є маркером малігнізації епітеліальних клітин, а зміна в синтезі різних ізоформ тропоміозину асоційована із злоякісною трансформацією клітин, що ми спостерігаємо у хворих зі злоякісними місцево-поширеними епітеліальними і лімфоїдними тимомами. Як відомо, точкові мутації – амінокислотні заміни в генах тропоміозину, і підвищення конформаційної рухливості молекули тропоміозину асоційовані з міопатіями [16, 17]. А поліморфізм даного білку може змінювати його антигенні властивості, що індукує утворення антинуклеарних антитіл. Цей білок виконує найважливіші функції в регуляції м'язових скорочень і бере участь в регуляції структури і функції актинового цитоскелету. Наявність

антитіл до нього може призводити до порушення нейрон-трансмітерних процесів у хворих на міастенію.

## **ВИСНОВКИ**

Вибірковість ураження антитілами субодиниць nAHP при різних фенотипах міастенії і наявність ANA при тимусзалежній міастенії на тлі тимом має велику діагностичну та прогностичну цінність. Важливою є локальна мішень, з якою зв'язуються антитіла. Від цього залежать механізми деструкції тканин і характер метаболічних порушень, які впливають на інтенсивність проліферації, регуляцію апоптозу, ступінь вираженості патологічного процесу і прогноз перебігу захворювання. Наявність специфічних автоантитіл до певних ядерних структур клітини поряд з іншими механізмами автоімунізації впливає на механізми втрати автотолерантності і може бути використано для адресної терапії з урахуванням індивідуальних патогенетичних мішеней автоімунного процесу.

## **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Klimova E. M., Lavinskaya E. V., Minukhin D. V., Syrovaya A. O., Drozdova L. A., Samoilova A. P., Makarov V. V., Makarov V. A., Lukianova L. V. On Forming Central and Peripheral Markers of Self-Tolerance Loss in Diverse Clinical Myasthenic Phenotypes // *Scholars Research Library / Der Pharmacia Lettre.* – 2017. – V.9 (6). – P. 8–17.
2. Drachman D. B. Myasthenia gravis // *N. Engl. J. Med.* 1994. Vol. 330. P. 1797–1810.
3. Meriglioli M. N., Sanders D. B. Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis? // *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2012. Vol. 8, suppl. 5. P. 427–438.
4. Romi F., Skeie G. O., Gilhus N. E., Aarli J. A. Striational antibodies in myasthenia gravis: reactivity and possible clinical significance // *Arch. Neurol.* 2005. Vol. 62, suppl. 3. P. 442–446.
5. Товбина М. Г., Пищик В. Г., Лапин С. В., Нуралиев С.М. Антитела к скелетным мышцам и ацетилхолиновым рецепторам в оценке результатов хирургического лечения больных аутоиммунной миастенией / М. Г. Товбина, В. Г. Пищик, С.В. Лапин, С. М. Нуралиев // *Вестник хирургии.* – 2017. – Т.176, №3. – С. 21-27.
6. Klimova E., Bozhkov A., Avdosyev Yu., Drozdova L., Lavinskaya E., Boyko V. Myasthenogenic markers indifferent types of self-tolerance loss in patients with myasthenia gravis // *International conference on Disease biomarkers and precision medicine, October 22–24, 2018, Houston, TX, USA.*
7. Fritzler M. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes // *Autoimmunity Reviews.* – 2008. – V. 7 (8): 616–20.
8. Алиева И.Б., Узбеков Р.Э. Центросома – полифункциональный мультибелковый клеточный комплекс // *Биохимия.* – 2008. – Т. 73, вып. 6. – с. 782 – 803.
9. Miles S, et al. (2016) Msa1 and Msa2 Modulate G1-Specific Transcription to Promote G1 Arrest and the Transition to Quiescence in Budding Yeast. *PLoS Genet* 12(6):e1006088 PMID:27272642.
10. Гришина Т. И., Филатова Г. А. Иммунная система человека как механизм обеспечения жизнедеятельности / Т. И. Гришина, Г. А. Филатова // *Вестник РГМУ.* – 2013. – № 5–6. – С. 96–100.
11. Бобкова Н. В. Нейротоксичность бета-амилоида. Механизмы, гипотезы, противоречия // *Одиннадцатый международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», Судак, Крым, 2015.* – С. 87 – 89.



12. Узбеков Р. Э., Алиева И. Б. Центросома – загадка «клеточного процессора» / Р. Э. Узбеков, И. Б. Алиева // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 2. – С. 91–112.
13. Brinkley B. R. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division // Trends Cell Biol. – 2001. – V. 11. – P. 18–21.
14. Nigg E. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression // Nat. Rev. Cancer. - 2002. – V. – 2. – Н. 15–25.
15. Pihan G. A., Purohit A., Wallace J., Malhotra R., Liotta L., Doxsey S. J. Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression // Cancer Res. – 2001. – V. 61. – P. 2212–2219.
16. Ивина А. А., Семкин В. А., Бабиченко И. И. Цитокератин 15 как диагностический маркер начала малигнизации эпителия слизистой оболочки рта / А. А. Ивина, В. А. Семкин, И. И. Бабиченко // Стоматология. – 2018. – № 6. – С.61–62.
17. Невзоров И. А., Левицкий Д. И. Тропомозин: двойная спираль из мира белков / И. А. Невзоров, Д. И. Левицкий // Успехи биологической химии. – 2011. – Т. 51. – С. 283–334.

## REFERENCES

1. Klimova, E. M., Lavinskaya, E. V., Minukhin, D. V., Syrovaya, A. O., Drozdova, L. A., Samoilova, A. P., Makarov, V. V., Makarov, V. A., Lukianova, L. V. (2017). On Forming Central and Peripheral Markers of Self-Tolerance Loss in Diverse Clinical Myasthenic Phenotypes. *Scholars Research Library/ Der Pharmacia Lettre*, 9(6), 8–17. Retrieved from <https://www.scholarsresearchlibrary.com/abstract/on-forming-central-and-peripheral-markers-of-selftolerance-loss-in-diverse-clinical-myasthenic-phenotypes-12424.html>.
2. Drachman, D. B. (1994). Myasthenia gravis. *N. Engl. J. Med*, 330, 1797–1810. DOI: 10.1056/nejm199406233302507.
3. Meriggioli, M. N., Sanders, D. B. (2012). Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis? *Expert Rev. Clin. Immunol*, 8(5), 427–438. DOI:10.1586/eci.12.34.
4. Romi, F., Skeie, G. O., Gilhus, N. E., Aarli, J. A. (2005). Striation antibodies in myasthenia gravis: reactivity and possible clinical significance. *Arch. Neurol*, 62(3), 442–446. DOI: 10.1001/archneur.62.3.442.
5. Tovbina, M. G., Pishchik, V. G., Lapin, S. V., Nuraliev, S. M. (2017). Antibodies to striated muscle and acetylcholine receptors in evaluation of surgical treatment outcomes in patients with autoimmune myasthenia gravis. *Grekov's Bulletin of Surgery Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova*, 176(3), 21–27. DOI: 10.24884/0042-4625-2017-176-3-21-27.
6. Klimova, E., Bozhkov, A., Avdosyev, Yu., Drozdova, L., Lavinskaya, E., Boyko, V. (2018). *Myasthenogenic markers indifferent types of self-tolerance loss in patients with myasthenia gravis. International conference on Disease biomarkers and precision medicine, October 22–24, 2018*. Houston, TX, USA. Retrieved from <https://unitedscientificgroup.com/conferences/disease-biomarkers-and-precision-medicine/pdfs/final-program.pdf>.
7. Fritzler, M. (2008). Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmunity Reviews*, 7(8), 616–20. DOI:10.1016/j.autrev.2008.06.007.
8. Alyeva, Y. B., Uzbekov, R. E. (2008). Centrosome - a polyfunctional multi-protein cell complex. *Biochemistry*, 73(6), 782–803. Retrieved from <http://naukarus.com/tsentrosoma-polifunktionalnyy-multibelkovyy-kletochnyy-kompleks>.
9. Miles, S, et al. (2016). Msa1 and Msa2 Modulate G1-Specific Transcription to Promote G1 Arrest and the Transition to Quiescence in Budding Yeast. *PLoS Genet* 12(6):e1006088 PMID:27272642. DOI:10.1371/journal.pgen.1006088.
10. Grishina, T. I., Filatova G.A. (2013), Human Immune System as a Mechanism for Vivat Activity. *Bulletin of RSMU*, 5-6, 96–100. Retrieved from [https://vestnikrgmu.ru/files/issues/2013/5-6/2013-5-6-20\\_ru.pdf](https://vestnikrgmu.ru/files/issues/2013/5-6/2013-5-6-20_ru.pdf).
11. Bobkova, N. V. (2015). *Neurotoxicity of beta-amyloid. mechanisms, hypothesis, controversies*. XI International interdisciplinary congress NEUROSCIENCE FOR MEDICINE AND PSYCHOLOGY. 87–89. Retrieved from [https://istina.msu.ru/media/publications/article/d34/4ec/11668643/Sbornik\\_2015\\_Sudak.pdf](https://istina.msu.ru/media/publications/article/d34/4ec/11668643/Sbornik_2015_Sudak.pdf).

12. Uzbekov, R. E., Alyeva, Y. B. (2008). THE CENTROSOME – A RIDDLE OF THE «CELL PROCESSOR». *Cytology*, 50(2), 91–112. Retrieved from [http://www.tsitologiya.incras.ru/50\\_2/uzbekov.pdf](http://www.tsitologiya.incras.ru/50_2/uzbekov.pdf).
13. Brinkley, B. R. (2001). Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol*, 11, 18–21. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146294>.
14. Nigg, E. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 15 - 25. DOI:10.1038/nrc924.
15. Pihan, G. A., Purohit, A., Wallace, J., Malhotra, R., Liotta, L., Doxsey, S. J. (2001). Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res*, 61, 2212–2219. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11280789>.
16. Ivina, A. A., Semkin, V. A., Babichenko, I. I. (2018). Cytokeratin 15 as a diagnostic marker for oral epithelial malignization. *Stomatology*, 6, 61–62. DOI:10.17116/stomat20189706161.
17. Nevzorov, Y. A., Evytskyi, D. Y. (2011). Tropomyosin: a double helix from the world of proteins. *Advances in biological chemistry*, 51, 283–334. Retrieved from <https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/Nevzorov.pdf>.

## **POLYMORPHISM OF CLINICAL PHENOTYPES AND HETEROGENEITY OF AUTOIMMUNE TARGETS OF MYASTHENIA GRAVIS**

***Klimova E. M., Drozdova L. A., Lavinskaya E. V., Kudrevich A. N.***

---

**Abstract.** The aim of the study was to evaluate the presence of autoantibodies to different subunits of nAChR and nuclear antigens at different myasthenia phenotypes. The work has investigated the presence of antibodies to  $\alpha 1$ - and  $\alpha 7$ -subunits of nAChR, the repertoire and frequency of occurrence of antinuclear autoantibodies in different clinical phenotypes of myasthenia to understand the mechanisms of pathogenesis of various forms of the disease. Additional factors of autoimmunization were identified that affect certain mechanisms of pathogenesis in thymus-independent and thymus-dependent myasthenia gravis. Autoantibodies to  $\alpha 1$  and  $\alpha 7$  subunits of nAChR were detected in case of thymus-independent myasthenia gravis and thymus-dependent myasthenia gravis with thymus hyperplasia or locally spread thymoma, as well as the presence of antinuclear antibodies in case of thymoma on the background of myasthenia gravis. Autoantibodies to the  $\alpha 1$  subunit of nAChR are available in all patients with thymus-independent and thymus-dependent myasthenia gravis; the maximum titer was in patients with myasthenia and thymus hyperplasia. The presence of autoimmune antibodies to another target – to the  $\alpha 7$  subunit of nAChR was found in patients with thymus-independent myasthenia gravis and with myasthenia and thymus hyperplasia. Detected antinuclear antibodies (ANA) in patients with thymoma, are preferably antibodies to structures that are directly involved in mitotic cell division, that is to centromere, to centromeric protein F, to the centrosomal protein of achromatin spindle – NuMa and MSA-2 antigen mitotic spindle that affects the course of cell proliferation, reparative and regenerative processes in tissues. The selectivity of antibody damage by the subunit of NAHR in different myasthenia phenotypes and the presence of ANA in thymus-dependent myasthenia with thymoma has great diagnostic and prognostic value. The presence of specific autoantibodies to certain nuclear structures of the cell, along with other autoimmunization mechanisms, affects various metabolic mechanisms and can be used to select targeted therapy taking into account individual pathogenic targets of the autoimmune process.

**KEY WORDS:** thymus-independent myasthenia gravis, thymus-dependent myasthenia gravis, thymus hyperplasia, thymoma, autoantibodies, antinuclear antibodies

### **INFORMATION ABOUT AUTHORS**

**Klimova Olena**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of Diagnostic laboratory with immunoenzym and immunofluorescence analysis, State institution «Zaycev V. T. Institute of general and urgent surgery of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 1, Balakireva vyizd, Kharkiv, Ukraine, 61103, e-mail: klimovalena53@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4007-6806>

**Drozdova Larisa**, Ph.D., Senior Research Officer in diagnostic laboratory with immunoenzym and immunofluorescence analysis State institution «Zaycev V. T. Institute of general and urgent surgery of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 1, Balakireva vyizd, Kharkiv, Ukraine, 61103, e-mail: larissadr007@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9678-4046>

**Lavinska Olena**, Ph.D., Research Officer in diagnostic laboratory with immunoenzym and immunofluorescence analysis State institution «Zaycev V. T. Institute of general and urgent surgery of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 1, Balakireva vyizd, Kharkiv, Ukraine, 61103, e-mail: elena.lavinskaya@ukr.net, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7320-0925>

**Kudrevych Oleksandr**, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Surgical Diseases, Operative Surgery and Topographical Anatomy V. N. Karazin Kharkiv National University, Svobody sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, e-mail: o.m.kudrevych@karazin.ua, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2086-8822>

## ПОЛИМОРФИЗМ КЛИНИЧЕСКИХ ФЕНОТИПОВ И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ АУТОИММУННЫХ МИШЕНЕЙ МИАСТЕНИИ

*Климова Е. М., Дроздова Л. А., Лавинская Е. В., Кудревич А. Н.*

**Резюме.** Целью исследования явилась оценка наличия аутоантител к различным субъединиц nAHP и ядерных антигенов при различных фенотипах миастении. В работе исследовали наличие антител к  $\alpha 1$ - и  $\alpha 7$ -субъединиц nAHP; репертуар и частоту встречаемости антинуклеарных аутоантител при различных клинических фенотипах миастении для понимания механизмов патогенеза различных форм данного заболевания. Выявлены дополнительные факторы аутоиммунизации, влияющие на определенные механизмы патогенеза при тимуснезависимой и тимусзависимой миастении. Выявили аутоантитела к  $\alpha 1$ - и  $\alpha 7$ -субъединицам никотинового ацетилхолинового рецептора (nAHP) при тимуснезависимой и тимусзависимой миастении на фоне гиперплазии тимуса или местнораспространенных тимоммах, а также наличие антинуклеарных антител ANA при тимоммах на фоне миастении. Аутоантитела к  $\alpha 1$ -субъединице nAHP были в наличии у всех обследованных больных с тимуснезависимой и тимусзависимой миастенией, максимальный титр был у пациентов с миастенией на фоне гиперплазии тимуса. Наличие аутоиммунных антител к другой мишени – к  $\alpha 7$ -субъединице nAHP выявили у пациентов с тимуснезависимой миастенией и с миастенией на фоне гиперплазии тимуса. Обнаруженные антиядерные антитела у пациентов с тимоммами, являются преимущественно антителами к структурам, которые принимают непосредственное участие в митотическом делении клеток – к центромерам, к центромерному белку F, центросомному белку ахроматинового веретена – NuMa и антигена MSA-2 волокон митотического веретена, влияют на ход клеточной пролиферации, репаративные и регенеративные процессы в тканях. Избирательность поражения антителами субъединиц nAHP при различных фенотипах миастении и наличие ANA при тимусзависимой миастении на фоне тимоммы имеет большую диагностическую и прогностическую ценность. Наличие специфических аутоантител к определенным ядерным структурам клетки, наряду с другими механизмами аутоиммунизации влияет на различные метаболические механизмы, что может быть использовано для выбора адресной терапии с учетом индивидуальных патогенетических мишеней аутоиммунного процесса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** тимуснезависимая миастения, тимусзависимая миастения, гиперплазия тимуса, тимома, аутоантитела, антиядерные антитела

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Климова Елена Михайловна**, д.б.н., профессор, зав. диагностической лабораторией с иммуноферментным и иммунофлуоресцентным анализом ГУ «Институт общей и неотложной хирургии имени В. Т. Зайцева НАМН Украины», вьезд Балакирева, 1, Харьков, Украина, 61103, e-mail: klimovalena53@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4007-6806>

**Дроздова Лариса Анатольевна**, к.б.н., старший научный сотрудник диагностической лаборатории с иммуноферментным и иммунофлуоресцентным анализом ГУ «Институт общей и неотложной хирургии имени В. Т. Зайцева НАМН Украины», вьезд Балакирева, 1, Харьков, Украина, 61103, e-mail: larissadr007@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9678-4046>

**Лавинская Елена Владимировна**, к.б.н., научный сотрудник диагностической лаборатории с иммуноферментным и иммунофлуоресцентным анализом ГУ «Институт общей и неотложной хирургии имени В. Т. Зайцева НАМН Украины», вьезд Балакирева, 1, Харьков, Украина, 61103, e-mail: elena.lavinskaya@ukr.net, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7320-0925>

**Кудревич Александр Николаевич**, к.мед.н., доцент, зав. кафедрой хирургических болезней, оперативной хирургии и топографической анатомии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, площадь Свободы, 6, Харьков, Украина, 61022, e-mail: o.m.kudrevych@karazin.ua, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2086-8822>