

Т.В. Романова

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИТЕЛ К АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРАМ
У БОЛЬНЫХ МИАСТЕНИЕЙ**

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (Самара)

Миастения является хроническим аутоиммунным нервно-мышечным заболеванием. Антитела к ацетилхолиновым рецепторам обнаруживаются у 85–90 % больных генерализованной миастенией и играют важную роль в патогенезе болезни. В представленной работе проведено сопоставление уровня антител к ацетилхолиновым рецепторам у больных миастенией с тяжестью и длительностью течения болезни, возрастом начала заболевания, изменениями вилочковой железы, проводимым лечением. Было обследовано 80 пациентов. Исследование антител проводилось иммуноферментным методом. Самые высокие показатели уровня антител к АХР выявлены в группе больных, длительно получающих цитостатики, которые были назначены в связи с неуклонным прогрессированием болезни при всякой попытке отмены иммуносупрессивной терапии. Высокий уровень антител к АХР отмечен у больных с преобладанием в клинической картине слабости краниобульбарной мускулатуры. Корреляций уровня антител к АХР с полом, длительностью болезни, наличием тимомы выявлено не было.

Ключевые слова: миастения, антитела к ацетилхолиновым рецепторам, иммуноферментный метод

**RESEARCH OF ANTIBODIES TO THE ACETYLCHOLINE RECEPTORS
IN PATIENTS WITH MYASTHENIA GRAVIS**

T.V. Romanova

Samara State Medical University, Samara

Myasthenia is a chronic autoimmune neuromuscular disease. Antibodies to acetylcholine receptors are found in 85–90 % of patients with generalized myasthenia and play an important role in the pathogenesis of the disease. In the article compared comparison of the level of antibodies to the acetylcholine receptors (AChR) in patients with myasthenia gravis with the severity and duration of disease, age of onset, changes in the thymus and treatment was realized. We examined 80 patients. The research of antibodies was conducted by immune-enzymatic method. The highest levels of antibodies to AChR were detected in the group of patients who received long-term cytotoxic agents due to the steady progress of the disease. High level of antibodies to AChR was observed in patients with predominance of weakness in craniobulbar muscles in clinical presentation. There were no correlations of level of antibodies to AChR with sex, duration of disease, presence of thymoma.

Key words: myasthenia gravis, antibodies to acetylcholine receptors, immune-enzymatic method

Миастения является аутоиммунным заболеванием, при котором поражаются нервно-мышечные синапсы. В патогенезе заболевания ведущую роль играет выработка аутоантител к ацетилхолиновым рецепторам (АХР) постсинаптической мембраны нервно-мышечного соединения. Наряду с клиническими проявлениями болезни, положительной реакцией на введение антихолинэстеразных препаратов и электромиографическими феноменами увеличение титра АХР является общепринятым критерием диагностики аутоиммунной миастении [3, 8, 12]. Антитела к ацетилхолиновым рецепторам выявляются у 80–90 % больных с генерализованной миастенией [1, 3, 8, 9]. Большинство авторов подчеркивают отсутствие прямых корреляций между уровнем антител к АХР и тяжестью клинических проявлений болезни в основном за счет высокой индивидуальной вариабельности данного показателя [3, 8, 12]. Тем не менее, у одного и того же больного прослеживается зависимость между концентрацией антител к АХР и особенностями клинической картины болезни [4, 8, 10, 12]. Уровень антител к АХР уменьшается на фоне иммуносупрессивной терапии, после проведения тимэктомии и плазмафереза [4, 5, 7, 13]. Однако

в ряде публикаций отмечена диссоциация между изменением уровня антител к АХР и колебаниями в состоянии больных [4, 11, 14].

Целью данной работы было сопоставление уровня антител к АХР с тяжестью и длительностью течения болезни, возрастом начала заболевания, изменениями вилочковой железы, проводимым лечением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 80 пациентов: 61 женщина и 19 мужчин. Возраст обследованных колебался от 17 до 77 лет и составил в среднем $49,3 \pm 16,8$. Для женщин средний возраст был $47,6 \pm 16,7$ (22–77 лет), для мужчин — $55,2 \pm 15,9$ (17–77 лет). Длительность болезни к моменту обследования в среднем составляла $6,1 \pm 5,7$ (от 3 месяцев до 27 лет), для женщин — $6,9 \pm 6,1$ (от 3 месяцев до 27 лет), для мужчин — $3,4 \pm 3,3$ (от 4 месяцев до 11 лет).

Диагноз миастении был поставлен на основании жалоб, данных клинического обследования, положительной прозеринового пробы, а также был подтвержден результатами декремент-теста.

Изменения вилочковой железы были выявлены всего у 51 (63,7 %) пациента: 33,8 % — гиперплазия тимуса, 28,7 % — тимомы, 1,2 % — атрофия тимуса.

Операции тимэктомиа или тимомтимэктомиа были произведены 32 больным (40 %). Эффект от операции был расценен как отличный и хороший у 18 человек (22,5 %), как удовлетворительный — у 7 (8,8 %), отсутствие улучшения после операции наблюдалось у 8,7 %.

Исследование антител проводилось в срок от 1 года до 22 лет после тимэктомии по поводу гиперплазии вилочковой железы ($6,7 \pm 6,4$ года); от 6 месяцев до 9 лет — по поводу тимомы ($4,1 \pm 3,4$ года).

Иммуносупрессивную терапию (глюкокортикоидные гормоны и/или цитостатики) получали в процессе лечения 55 больных (68,8 %); 47,5 % пациентов обследованы на фоне проводимой терапии. 18 больных (22,5 %) были обследованы на фоне длительного приема азатиоприна или сандиммуна. 31,2 % пациентов до обследования никогда не получали иммуносупрессивной терапии.

Тяжесть клинических проявлений миастении оценивалась по Международной клинической шкале (MGFA):

I — изолированная слабость наружных мышц глаз любой степени выраженности;

IIa — слабость иных мышц легкой степени выраженности в сочетании или без слабости глазных мышц, без выраженной слабости краниобульбарной мускулатуры;

IIb — преобладание слабости краниобульбарных мышц и/или дыхательных мышц с возможной слабостью иных мышц легкой степени выраженности;

IIIa — слабость мышц туловища и/или конечностей средней степени выраженности в сочетании или без слабости глазных мышц, без выраженной слабости краниобульбарной мускулатуры;

IIIb — преобладание слабости краниобульбарных мышц и/или дыхательных мышц с возможной слабостью иных мышц средней степени выраженности;

IVa — выраженная слабость мышц туловища и/или конечностей в сочетании или без слабости глазных мышц, без преобладания слабости краниобульбарной мускулатуры;

IVb — преобладание слабости краниобульбарной и/или дыхательной мускулатуры в сочетании с возможной умеренной слабостью мышц туловища и/или конечностей;

V — кризисные состояния с ИВЛ или без нее, зондовое питание.

Тяжесть заболевания в обследованной группе оценивалась дважды: по максимальному показателю, которого больной достигал от момента начала до настоящего времени, и по тяжести состояния на момент обследования.

Исследование антител проводилось иммуноферментным методом в отделе иммунологии Института экспериментальной медицины и биотехнологий Самарского государственного медицинского университета (заведующая отделом Л.В. Лимарева). Был использован набор AChRab ELISA фирмы Biovendor, предназначенный для количественного определения аутоантител к рецептору

ацетилхолина в человеческой сыворотке. Образцы сыворотки были заморожены при температуре -20° . Перед проведением анализа пробы были разморожены. Исследование проводилось по достижению образцами комнатной температуры. Метод основан на способности AChRab, присутствующих в человеческой сыворотке, связываться с сайтами AChR, аналогичными тем, с которыми связываются различные моноклональные антитела, такие, как MAb1 (сорбированные в лунках микропланшета), и/или MAb2, и/или MAb3 (биотилированные). В отсутствие AChRab блокируется комплекс, состоящий из MAb1, сорбированных в лунках микропланшета, AChR и биотилированных MAb2 и MAb3. Связанные биотилированные MAb2 и MAb3 затем выявляют с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза (SAPOD), субстрата (TMB), реакцию останавливают стоп-раствором. В присутствии антител к ацетилхолиновым рецепторам формирование комплекса MAb1 — AChR-биотилированные MAb2/MAb3 ингибируется, в результате связывается меньшее количество SAPOD и снижается оптическая плотность, измеряемая при длине волны 450 нм. Чем выше концентрация AChRab в тестируемом образце, тем сильнее ингибируется связывание биотилированных MAb.

Пороговым значением уровня антител в сыворотке крови считается $0,45$ нмоль/л.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Различия считались статистически значимыми при уровне ошибки $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение больных по тяжести миастении, согласно классификации MGFA, представлено в таблице 1.

В ходе заболевания у одной пациентки развился миастенический, а у другой — смешанный криз с ИВЛ до 8 дней. Бульбарные нарушения были выявлены у 70 % больных. Более половины пациентов (51,3 %) имели среднетяжелую форму миастении, из них большая часть (41,3 %) приходилась на среднетяжелую форму с бульбарными нарушениями.

К моменту обследования состояние большинства больных существенно улучшилось на фоне проводимой терапии. Ремиссия была достигнута у 18,8 % больных; в 13,8 % случаев исследование проводилось на фоне полной безмедикаментозной ремиссии длительностью от 1 года до 9 лет, а у 5 % больных все миастенические симптомы исчезли на фоне приема азатиоприна. К моменту обследования не было больных с тяжелыми проявлениями болезни, а в среднетяжелом состоянии находилось менее 10 % пациентов.

Показатели уровня антител к АХР колебались от 0,1 до 31,5 нмоль/л. Средние показатели уровня антител к АХР в группе серопозитивной миастении составили $16,6 \pm 9,4$ нмоль/л.

Серонегативная миастения со средним показателем $0,2 \pm 0,1$ нмоль/л выявлена в 7,5 % случаев. Группа больных с серонегативной миастенией не

Таблица 1

Тяжесть клинических проявлений миастении у обследованных больных (по MGFA)

Тяжесть миастении	Женщины, абс. (%)		Мужчины, абс. (%)		Всего, абс. (%)	
	Максимальная	Обследование	Максимальная	Обследование	Максимальная	Обследование
Ремиссия	0 (0,0)	8 (13,1)	0 (0,0)	7 (36,8)	0 (0,0)	15 (18,8)
I	1 (1,6)	3 (4,9)	4 (21,1)	2 (10,5)	5 (6,3)	5 (6,3)
IIa	6 (9,8)	29 (47,6)	3 (15,8)	5 (26,3)	9 (11,2)	34 (42,5)
IIb	9 (14,8)	15 (24,6)	5 (26,3)	3 (15,8)	14 (17,5)	18 (22,5)
IIIa	8 (13,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	8 (10,0)	1 (1,3)
IIIb	26 (42,6)	6 (9,8)	7 (36,8)	1 (5,3)	33 (41,3)	7 (8,6)
IVa	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
IVb	9 (14,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (11,3)	0 (0,0)
V	2 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,4)	0 (0,0)
Итого, абс. (%)	61 (100,0)		19 (100,0)		80 (100,0)	

была однородна. В нее вошли три пациента в стадии безмедикаментозной ремиссии после тимэктомии длительностью 5, 8 и 9 лет. В этой подгруппе низкий уровень антител соответствовал хорошему состоянию пациентов. Мы предполагаем, что в данном случае речь идет не об изначально низком уровне антител, а о его значительном снижении в процессе лечения.

Другую подгруппу составили три наблюдения с тяжелой (IVb — 2 больных) и среднетяжелой (IIIb — 1 пациентка) формой болезни, у которых к моменту обследования было достигнуто незначительное и неустойчивое улучшение состояния на фоне постоянного приема азатиоприна. Данная подгруппа имела ряд клинических особенностей в виде преобладания слабости краниобульбарной мускулатуры, неизбежного наступления ухудшения при всякой попытке отмены иммуносупрессивной терапии, незначительной положительной динамики на фоне длительного (более полутора лет) приема иммуносупрессантов, отсутствия существенной динамики после проведенной тимомэктомии. Длительность заболевания составляла 3 года, 4 года и 6 лет. Возраст начала заболевания колебался от 28 до 39 лет. Во всех трех случаях заболевание манифестировало бурно с выраженной слабости краниобульбарной мускулатуры, эффект от антихолинэстеразных препаратов был хорошим, но без применения иммуносупрессантов болезнь неуклонно прогрессировала; на фоне приема преднизолона (метипреда) возникло значительное увеличение веса, у одной больной выявился сахарный диабет, что потребовало перевода на лечение цитостатиками.

Все больные с серопозитивной миастенией были разделены на группы: по полу, по возрасту начала и длительности течения болезни; по характеру клинической картины (с преобладанием слабости краниобульбарной мускулатуры и без таковой); по характеру изменения вилочковой железы (тимомы, гиперплазия, отсутствие изменений тимуса по данным КТ/МРТ); по тяжести болезни и степени

компенсации процесса на фоне проводимой терапии. Сравнение данных групп выявило следующие закономерности.

Средний уровень антител к АХР у больных женщин был несколько выше, чем у мужчин, хотя достоверных различий в группах женщин и мужчин выявлено не было: $17,1 \pm 9,1$ и $14,6 \pm 10,0$ соответственно.

В группах с возрастом начала болезни до 40 и после 40 лет различий уровня антител к АХР выявлено не было: $16,6 \pm 8,8$ и $16,7 \pm 9,6$.

В группах с возрастом начала до 60 и после 60 лет выявлено статистически значимое различие по уровню антител к АХР: $15,6 \pm 8,5$ и $19,6 \pm 8,1$ соответственно ($p < 0,01$).

При сравнении групп пациентов с длительностью болезни до 5 и более 5 лет достоверных различий в уровне антител к АХР не получено: $17,3 \pm 9,4$ и $15,1 \pm 9,0$.

Уровень антител к АХР был статистически значимо ($p < 0,01$) выше у больных с преобладанием в клинической картине слабости краниобульбарной мускулатуры: $18,8 \pm 9,0$ и $12,2 \pm 9,3$.

В группах больных с тимомой, гиперплазией тимуса и без данных об изменении тимуса по результатам КТ/МРТ-исследований различия в уровне антител к АХР были статистически не значимыми: $16,5 \pm 9,2$, $15,2 \pm 10,0$ и $18,1 \pm 9,0$ соответственно. Также не получено достоверных различий в уровне антител после операций тимэктомии и тимомти-мэктомии как при сравнении групп с отличным/хорошим результатом операций, так и при сравнении групп с незначительным или отсутствующим эффектом.

При сравнении групп пациентов, у которых болезнь на протяжении всего времени сохранялась на уровне 1–2-го (глазная и легкая форма генерализованной миастении) и 3–5-го классов (среднетяжелая — тяжелая генерализованная миастения) по шкале MGFA, выявлено статистически значимое отличие уровня антител к АХР: $15,3 \pm 9,0$ и $18,3 \pm 8,9$ ($p < 0,01$). При этом анализ динамики

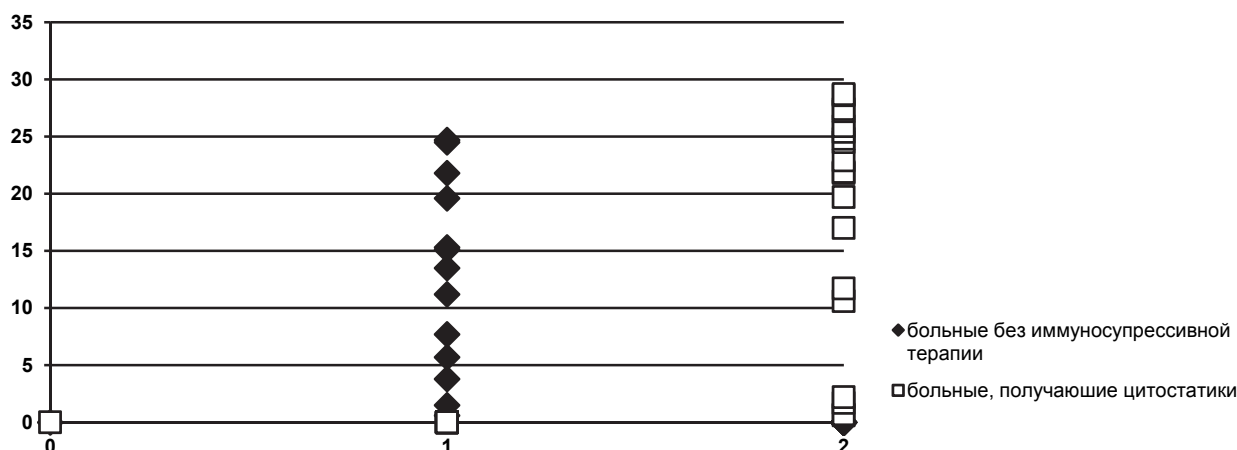


Рис. 1. Распределение уровня антител к АХР у пациентов, получающих цитостатики, и пациентов, никогда не получавших иммуносупрессивную терапию: по оси абсцисс: 1 – пациенты болеющие более 5 лет, но не получавшие иммуносупрессивной терапии; 2 – пациенты, длительно получающие цитостатики; по оси ординат – уровень антител к АХР в нмоль/л.

состояния в процессе лечения при улучшении состояния от тяжелого (IV) до легкого (I – II) и ремиссии не показал значимого уменьшения среднего уровня антител.

В трех группах сравнения: больные, у которых в процессе лечения достигнута динамика состояния от тяжелого до ремиссии или класса 1 – 2 по шкале MGFA (уровень антител к АХР – $24,2 \pm 5,3$), больные с динамикой от тяжелого до среднетяжелого состояния (уровень антител к АХР – $10,5 \pm 12,4$) и группа без существенной динамики (уровень антител к АХР – $16,2 \pm 7,8$) статистически значимые различия получены между группами с хорошей динамикой состояния и группой с незначительной динамикой состояния ($p < 0,05$), причем меньший уровень антител отмечен в группе с незначительной динамикой.

При сравнении группы больных, получающих в настоящее время цитостатики более 1 года, в связи с невозможностью достичь стабилизации процесса за счет применения симптоматической терапии и курсов глюкокортикоидных гормонов, и группы относительно «доброкачественно» болеющих пациентов с длительностью заболевания более 5 лет, но не получавших в процессе лечения иммуносупрессивной терапии в связи со стабильным состоянием и хорошей реакцией на АХЭ препараты, получена достоверная разница по уровню антител к АХР: $20,4 \pm 7,5$ и $13,7 \pm 8,3$ ($p < 0,05$). Распределение уровня антител в данных группах представлено на рисунке 1. Необходимо отметить, что большая часть пациентов, получающих цитостатики, в том числе и те, у которых состояние нормализовалось настолько, что они прекратили прием антихолинэстеразных препаратов, имели высокие показатели уровня антител к АХР. Исключение в данной группе составили четыре пациента, уровень антител у которых был от 0,6 до 2,2 нмоль/л. Эти пациенты имели сходный паттерн заболевания с теми тремя пациентами из группы серонегативной миастении, которые, несмотря на нормальные

показатели титра антител к АХР, имели тяжелое прогрессирующее течение миастении. Вероятно, обе эти подгруппы при невысоких показателях антител к АХР имели другие варианты аутоантител, нарушающих нормальное функционирование нервно-мышечного синапса.

Проведенные исследования показали, что у больных миастенией существует выраженная вариабельность по уровню антител к АХР. Прямых корреляций между состоянием пациента и уровнем антител к АХР не получено, что соответствует данным большинства литературных источников [2, 4, 7, 13].

ВЫВОДЫ

1. Не выявлено корреляций уровня антител к АХР с полом, длительностью болезни, наличием тимомы, что подтверждают исследования, проведенные другими авторами [2, 3, 8].

2. Более высокие показатели титра антител к АХР получены у пациентов с поздним началом болезни.

3. Достоверно более высокий уровень антител к АХР отмечен у больных с преобладанием в клинической картине слабости краниобульбарной мускулатуры.

4. Самые высокие показатели уровня антител к АХР выявлены в группе больных, длительно получающих цитостатики, которые были назначены в связи с неуклонным прогрессированием болезни при всякой попытке отмены иммуносупрессивной терапии.

5. Исследование концентрации антител к АХР у больных миастенией является важным методом подтверждения диагноза, оценки течения и прогноза заболевания и эффективности проводимой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гехт Б.М., Ланцова В.Б., Сепп Е.К. Роль антител к ацетилхолиновому рецептору в патогене-

незе миастении // Неврол. ж. — 2002. — № 6. — С. 18–21.

2. Санадзе А.Г., Гехт Б.М., Сиднев Д.В. и др. Антитела к ацетилхолиновому рецептору в диагностике миастении и других форм, связанных с патологией нервно-мышечной передачи // Неврол. ж. — 2003. — Прил. 1. — С. 19–20.

3. Сиднев Д.В., Карганов М.Ю., Щербакова Н.И. и др. Антитела к ацетилхолиновому рецептору у больных с различными клиническими формами миастении и миастеническим синдромом Ламберта — Итона // Ж. неврол. и психиатр. — 2006. — Вып. 106, № 1. — С. 53–55.

4. Сиднев Д.В., Санадзе А.Г., Дедаев С.И. и др. Антитела к ацетилхолиновому рецептору в оценке эффективности патогенетической терапии у больных с миастенией // Ж. неврол. и психиатр. — 2010. — Вып. 110, № 11. — С. 37–40.

5. Dau P.C., Lindstrom J.M., Cassel C.K. et al. Plasmapheresis and immunosuppressive drug therapy in myasthenia gravis // J. Neurol. Sci. — 1993. — Vol. 29, N 5. — P. 734–738.

6. Drachman D.B., Adams R.N., Josifek L.F., Self S.G. Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia gravis // N. Engl. J. Med. — 1982. — Vol. 307. — P. 769–773.

7. Kennel P.F., Vilquin J.T., Braun S. et al. Myasthenia gravis: comparative autoantibody assays using human muscle, TE671 and glucocorticoid-treated TE671 cells as sources of antigen // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1995. — Vol. 74. — P. 293–296.

8. Lindstrom J., Shelton D., Fujii Y. Myasthenia gravis // Adv. Immunol. — 1988. — Vol. 42. — P. 233–284.

9. Lindstrom J. Acetylcholine receptor and myasthenia // Muscle & Nerve. — 2000. — Vol. 23. — P. 453–477.

10. Oosterhuis H.J., Limburg P.S., Hummel-Tappel E. Anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. Part 2. Clinical and serological follow-up of individual patients // Neurol. Sci. — 1983. — Vol. 58. — P. 371–385.

11. Psaradi-Lunardaki L., Trakas N., Mamalaki A., Tzartos S.J. Specific immunoadsorption of the antibodies from myasthenic patients using the extracellular domain of the human muscle acetylcholine receptor alpha-subunit: Development of an antigen-specific therapeutic strategy // Neuroimmunol. — 2005. — Vol. 159, N 1–2. — P. 183–191.

12. Romi F., Skeie G.O., Aarli J.A., Gilhus N.E. Muscle autoantibodies in subgroups of myasthenia gravis // Neurol. — 2000. — Vol. 247. — P. 369–375.

13. Vincent A., Newsom-Davis J., Newton P., Beck N. Acetylcholine receptor autoantibody and clinical response to thymectomy in myasthenia gravis // Neurology. — 1983. — Vol. 33, N 10. — P. 1276–1282.

14. Voltz R., Hohlfeld R., Faten-Moghadam A. et al. Myasthenia gravis: measurement of anti-AChR autoantibodies using cell line TE671 // Neurol. — 1991. — Vol. 41. — P. 1836–1838.

Сведения об авторах

Романова Татьяна Валентиновна — кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89; тел.: 8 (846) 242-02-65; e-mail: tvrom63@mail.ru)