

УДК 576.858:616.74-009.17:616.155.3-008.13

ИНТЕГРАЛЬНАЯ МЕТОДОЛОГИЯ И.И. МЕЧНИКОВА И СОВРЕМЕННАЯ АДРЕСНАЯ ИММУНОКОРРЕКЦИЯ ПРИ МИАСТЕНИИ

Климова Е.М., Дроздова Л.А., Лавинская Е.В.,
Быченко Е.А.

ГУ «Институт общей и неотложной хирургии им.
В.Т. Зайцева НАМНУ», Klimova_elenal@list.ru

Реферат. Для исследования аспектов фагоцитарной функции иммунных клеток и инфекционных факторов в этиологии и патогенезе прогрессирующей миастении проведена реконструкция прошлого в области интегральных научных открытий знаменитого естествоиспытателя И.И. Мечникова. Проанализированы ведущие факторы, сформировавшие научное мировоззрение и интегральную аналитическую методологию познания И.И. Мечникова – уроженца Харьковской губернии, выпускника Харьковского Императорского Университета 1864 г., Лауреата Нобелевской премии 1908 г. за создание теории фагоцитоза и автора множества работ в области микробиологии, иммунологии, вирусологии.

В работе показано, что степень выраженности и частота встречаемости персистенции цитомегаловируса и вируса Эпштейна-Барра взаимосвязаны с дефектами различных стадий фагоцитоза, его завершенности и активности внутриклеточных ферментов, участвующих в образовании активных форм кислорода, и интенсивности образования мономеров ДНК микроорганизмов, захваченных фагоцитами.

Использование эволюционной научной методологии И.И. Мечникова в синтетическом подходе к диагностике триггерных факторов и мониторингу стадийности формирования патологического процесса позволяет обосновать индивидуальный лечебно-диагностический алгоритм для коррекции различных клинических форм аутоиммунных заболеваний. Обоснованы подходы к адресной терапии при различных клинических фенотипах миастении, включающая проведение многоэтапной монолигандной терапии пептидами и энзимами, направленной на активацию внутриклеточных ферментов нейтрофилов при незавершенности фагоцитоза, и применение иммуноглобулинов, специфичных к герпетическим вирусам.

Ключевые слова: миастения, барьерная функция, вирусная персистенция, иммунокоррекция

Введение. Прогноз будущего в реализации научных результатов не всегда возможен. А как обстоит дело с прошлым? Всегда ли можно реконструировать, предсказать значение, однозначно истолковать прошлое? Очевидно, здесь проблем быть не должно. Раз исторические траектории удаляются одна от другой при движении вперед, то они должны

сближаться в одну точку при движении назад. Так, очевидно, оно и есть.

Реконструкция исторического прошлого является значимой для понимания и осознания научного наследия нашего знаменитого земляка – философа, естествоиспытателя, биолога, зоолога, бактериолога, патофизиолога, эмбриолога, иммунолога, геронтолога – И.И. Мечникова.

Мечников И. И., уроженец Слобожанщины, стал лауреатом Нобелевской премии в области физиологии и медицины 1908 г. за открытие фагоцитарной теории иммунитета. Интегральный подход в исследованиях и энциклопедический ум ученого позволили ему стать основоположником многих научных направлений в биологии и медицине [1,2].

Как происходило формирование научных взглядов Ильи Мечникова, что было наиболее значимым для его воспитания и образования в детские и юношеские годы? И. Мечников родился в Харьковской области 15 мая 1845 г. и в юношеские годы общался с удивительными учителями и педагогами. В гимназии учитель З.П. Парфенов, который считался лучшим учителем словесности образовывал и воспитывал гимназистов, и никогда на уроках не был равнодушным [2].

Илья Мечников, еще учась в 6-м классе, перевел с французского книгу Грове «Взаимодействие физических сил», в которой шла речь о взаимопревращении разных видов энергий. Свидетельством раннего формирования научных взглядов Мечникова был его интерес к величайшей проблеме естествознания – закону сохранения энергии, провозглашенному М. Ломоносовым, который высказывал замечательные эволюционные идеи, соответствующие современному уровню науки [1,2].

Любопытный настойчивый гимназист Мечников (1856 г.) осмелился обратиться к профессорам императорского университета с замечанием о методологии научных исследований: «Я, господа профессора, прочел много книг по зоологии, и мне кажется недопустимым, что ученые, не зная простого, работают над изучением сложного» [3].

Перед выпускными экзаменами в гимназии Мечников получил возможность заниматься собственными исследованиями живых объектов с помощью усовершенствованного микроскопа. Изучая инфузории, он подметил некоторые неизвестные науке явления.

Мечников оканчивает гимназию с золотой медалью (1862 г) и доказывает своим близким, что единственная цель его жизни – служение науке. На выпускных экзаменах знания Мечникова оказались значительно выше знаний многих студентов университета, И в официальном документе Харьковского попечительского совета было сказано, что «юноша по степени своего умственного развития признан способным к университетскому образованию» [2, 4].

Во время учебы в Харьковском императорском университете (1864 г.) Илья Мечников благодаря талантливым учителям – наставникам (таким как А.Н. Бекетов, И.П. Щелков) получил разностороннее образование в области естествознания.

Окончив учебу в Харькове, он отправился сначала изучить морскую фауну на Гельголанд, а затем в университете Гессена, где он работал под Лейкартом. Впоследствии он учился в университете Геттингена и в Мюнхенской академии, где работал в лаборатории фон Зиболда. В 1865 году в Гессене он обнаружил внутриклеточное пищеварение у одного из плоских червей, наблюдение этого процесса повлияло на его более поздние открытия. В Неаполе он подготовил диссертацию на соискание ученой степени доктора наук, изучив эмбриональное развитие каракатицы *Sepiola* и ракообразных *Nelalia*. В 1867 году он вернулся в Россию и был назначен доцентом в новом Одесском университете. А затем в 1870 году он был назначен титулярным профессором зоологии и сравнительной анатомии в университете Одессы [5,7,8].

В 1887 покинул Россию и переехал в Париж, где ему была предоставлена лаборатория в созданном Луи Пастером институте. С 1905 он стал заместителем директора этого института, а в 1911 году он возглавлял экспедицию Института Пастера в очаг чумы в России, при этом сделал важные наблюдения, касающиеся не только чумы, но и туберкулеза [2,4,5].

Мечников предложил оригинальную теорию происхождения многоклеточных животных. Изучая механизмы внутриклеточного пищеварения, ученый обнаружил, что эти процессы лежат и в основе защитных функций организмов. В 1882 г. он описал явление фагоцитоза (о чём доложил в 1883 на 7-м съезде русских естествоиспытателей и врачей в Одессе), и разработал на этой основе сравнительную патологию воспаления (1892), а в дальнейшем – фагоцитарную теорию иммунитета («Невосприимчивость в инфекционных болезнях» – 1901; Нобелевская премия – 1908, совместно с П. Эрлихом). Многочисленные работы Мечникова по бактериологии посвящены вопросам эпидемиологии холеры, брюшного тифа, туберкулеза и других инфекционных заболеваний. Его открытия в области иммунологии позволяют сегодня решать проблемы касающиеся этиологии и патогенеза иммунозависимых заболеваний [5,6]. К сожалению, аналитические возможности в области лабораторной медицины иногда приводят к утрате синтетического подхода при интерпретации данных и постановке диагноза в случае выраженного клинического полиморфизма нозологической формы. Научные открытия и идеи Мечникова являются примером интегрального мышления для разработки лечебно-диагностических алгоритмов.

Фагоцитарную активность иммунокомпетентных клеток, как фундаментальную составляющую иммунной защиты организма, в настоящее время считают одним из основных критериев оценки состояния иммунитета. Нарушение

фагоцитарных функций приводит к ослаблению всей системы защитных механизмов. Это связано с тем, что эволюционно фагоцитоз является наиболее древним защитным приспособлением, на основе которого сформировалась вся система иммунной защиты. Возможно по этой же причине нарушение фагоцитарной реакции лейкоцитов происходит раньше других функциональных сдвигов при действии на организм неблагоприятных факторов [9,10].

При аутоиммунных заболеваниях, в том числе при генерализованной миастении, нарушение фагоцитарной функции часто приводит к неконтролируемому развитию бактериальной и вирусной инфекции. Прогрессирование мышечной слабости, а также характер и степень наблюдаемых морфо-функциональных изменений тимуса при миастении зависит от индивидуальных механизмов формирования иммунного дисбаланса организма. Нарушение первичной барьерной функции иммунитета при данной нозологической форме является значимой для дебюта и прогрессирования заболевания, так как определяет резистентность к вирусной и бактериальной инфекции. Оценка фагоцитарного звена иммунитета и наличие вирусной персистенции как триггерного фактора аутоиммунной патологии является важным для выбора тактики адресной иммунокоррекции [11, 20, 21].

Целое столетие прошло с момента создания фагоцитарной теории, за это время были детально изучены механизмы и стадийность этого процесса, разработаны различные методические подходы для оценки индивидуальных особенностей этого явления от световой микроскопии до проточной цитофлуориметрии.

Возможности световой микроскопии позволяют в динамике визуализировать стадии фагоцитоза от хемотаксиса, адгезии до завершенности эндоцитоза нейтрофилами.

А НСТ-тест используется для оценки ферментативной активности фагоцитов по инициации образования активных форм кислорода на стадии формирования фагосомы. Данный метод позволяет исследовать стадии кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, который оценивают по их способности поглощать нитросиний тетразолий (НСТ) и восстанавливать его до диформаза в виде гранул синего цвета под влиянием супероксиданиона, который образуется в НАДФ-оксидазной реакции, инициирующей процесс стимуляции фагоцитоза.

Наряду с этими методами оценки фагоцитоза, которые не всегда дают полноценную информацию о функциональном состоянии фагоцитирующих лейкоцитов целесообразно применение флуоресцентного метода с использованием акридинового оранжевого (АО), который позволяет анализировать наиболее важную переваривающую функцию фагоцитов по степени денатурации ДНК в динамике, так как наиболее патогенные микроорганизмы способны персистировать в функционально дефектных фагоцитирующих клетках. Для мономеров АО характерно излучение в зеленой

области спектра ($\lambda_{\text{макс}} = 530$ нм), тогда как димеры и агрегаты этого флуорохрома с ДНК обладают люминесценцией в красной области спектра ($\lambda_{\text{макс}} = 640$ нм). Попадая в фагоцитирующий нейтрофил АО может денатурировать ДНК *in situ*, переводя ее из двухспиральной в односпиральную форму. Нарастающее переваривание дрожжевых клеток лизосомными ферментами нейтрофилов дестабилизирует содержащуюся в ней ДНК и облегчает ее денатурацию с соответствующим изменением спектра люминесценции таких дрожжей – красная окраска ($\lambda_{\text{макс}} = 640$ нм). Непереваренные дрожжи сохраняют нативную форму своей ДНК, а значит и зеленую окраску [12].

Причиной нарушения филогенетически древней функции фагоцитоза могут быть как генетические так и эпигеномные средовые факторы, ослабляющие барьерные механизмы защиты. Такими факторами прежде всего могут быть бактериальные и вирусные инфекции. Выяснение триггерных факторов иммунного дисбаланса и особенностей нарушений первичного врожденного иммунитета при генерализованной миастении может быть использовано для разработки и обоснования индивидуальных лечебно-диагностических протоколов для пациентов с различными клиническими фенотипами миастении [17, 19].

Целью данной работы было исследование механизмов расстройства различных стадий барьерной фагоцитарной функции нейтрофилов и определение частоты встречаемости и различной степени выраженности вирусной персистенции у пациентов с миастенией.

Материалы и методы исследования. Обследовали 137 пациентов с миастенией и морфо-функциональными изменениями тимуса – гиперплазией и тимоматами, которые были распределены на группы в зависимости от клинического фенотипа данного заболевания. Первую группу составило 53 пациента с миастенией без морфо-функциональных изменений тимуса (М), во вторую группу вошли пациенты с миастенией на фоне гиперплазии (МГ) – 64 человек, третья группа – 20 пациентов с тимоматами на фоне миастении (МТ).

Использовали методические подходы, которые позволяют оценить стадии и эффективность фагоцитоза, так как для оценки фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов, которые завершают процессинг антигена собственным апоптозом, важным является изучение фазы завершения этого процесса по переваривающей способности нейтрофилов и по интенсивности образования апоптических телец.

Для классификации активированных фагоцитов, которые экспрессировали кластеры дифференцировки CD11+, CD18+ использовали ранее метод проточной цитофлюориметрии и реакцию иммунофлуоресценции [15, 22].

1. Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по поглощению и элиминации микробных тел *Saccharomyces cerevisiae* нейтрофильными гранулоцитами (НГ) с применением метода световой

микроскопии. Определяли фагоцитарную активность – адгезию и эндоцитоз микробного агента. На мазках, фиксированных этиловым спиртом 96%, окрашенных по Романовскому-Гимза проводили подсчет 200 клеток НГ, используя световой микроскоп при увеличении 10х90. Определяли фагоцитарный индекс (ФИ) как количество НГ, участвовавших в процессе фагоцитоза (в процентах от общего количества НГ крови), и фагоцитарное число (ФЧ) как среднее количество клеток *S. cerevisiae*, поглощенных одним НГ (в условных единицах). Для оценки интенсивности эндоцитоза инкубацию второй аналогичной пробы проводили в течение 120 минут при 37°C и рассчитывали индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) в условных единицах по соотношению ФЧ через 30 минут к ФЧ через 120 минут, определяя переваривающую способность НГ в различные временные интервалы [16].

2. Так же фагоцитарную активность определяли методом флуоресцентной микроскопии с использованием красителя акридинового оранжевого (АО). Особенностью метода является использование интактных дрожжевых клеток, которые имеют зеленую люминесценцию постоянной интенсивности при их флуорохромировании акридиновым оранжевым (АО) в низкой концентрации. Выявление дефекта фагоцитоза может свидетельствовать о потенциальной уязвимости иммунной защиты пациента. Видимые изменения в фагоцитах, поглотивших дрожжи, начинают проявляться через 15 минут инкубации в виде яркого зеленого свечения. При дальнейшей инкубации зеленая люминесценция поглощенных дрожжей меняется на желтую, а при полном переваривании (через 45 минут) – на ярко-оранжевую за счет денатурации ДНК при переходе ее из двухспиральной в односпиральную форму. В норме процесс переваривания завершается через 1,5 часа полным лизисом дрожжей. У дрожжей, непоглощенных активными фагоцитами люминесценция так и остается зеленой или внутри фагоцитирующих клеток встречаются дрожжи, находящиеся на различных стадиях переваривания – зеленая и оранжевая окраска. Под люминесцентным микроскопом подсчитывали в 100 нейтрофилах число поглощенных дрожжей, с измененным спектром люминесценции с зеленой на оранжево-красную ($\lambda_{\text{мах}} = 640$ нм) относительно дрожжевых клеток, не подвергшихся перевариванию и сохранивших зеленую люминесценцию постоянной интенсивности ($\lambda_{\text{мах}} = 530$ нм). Красная люминесценция была характерна для активно перевариваемых дрожжей [12].

3. Общую окислительно-восстановительную активность нейтрофилов определяли с помощью теста восстановления нитросинеготетразолия (НСТ-тест). С помощью световой микроскопии отмечали отложение синевато-фиолетовых гранул диформаза в фагоцитирующей клетке, что соответствует локализации НАДФ-Н-оксидазы. Степень антигенной активности неактивированных нейтрофилов рассчитывали путем вычисления процента положительных клеток,

поглотивших краситель НСТ (НСТ СП); активность его внутриклеточных ферментных систем (степень активации) путем вычисления среднего цитохимического коэффициента (СЦК СП) по формуле Астальди-Верга. Рассчитывали индекс стимуляции (ИС) как отношение поглотивших клеток в спонтанном тесте к количеству поглотивших краситель клеток в стимулированном НСТ-тесте [17]. Определение содержания антител типа иммуноглобулина G (IgG) к цитомегаловирусу (CMV) и к вирусу Эпштейна-Барра (ВЭБ) в сыворотке крови. Содержание антител к цитомегаловирусу и к вирусу Эпштейна-Барра определяли непрямым твердофазным иммуоферментным методом на иммуоферментном анализаторе STAT-FAX. Определяли связывание специфических антител, содержащихся в калибровочных пробах, контрольной сыворотке и исследуемых образцах с антигенами цитомегаловируса или вируса Эпштейна-Барра, выделенными из клеточной культуры и иммобилизованными на полистироловых шариках. Связавшиеся антитела выявляли во время инкубации с конъюгатом козьих антител к IgG человека с пероксидазой хрена. При взаимодействии фермента с рабочим раствором субстрата, содержащего перекись водорода и тетраметилбензидин (ТМБ), развивалась цветная реакция. Ферментативную реакцию останавливали добавлением серной кислоты.

Интенсивность желтой окраски была пропорциональна количеству связанного фермента и, соответственно, концентрации анти-CMV IgG или концентрации анти-ВЭБ IgG в образце [13,14].

Результаты и обсуждение

Первый используемый нами метод визуальной оценки хемотаксиса, адгезии и эндоцитоза позволил оценить количество фагоцитирующих клеток. Фагоцитарный индекс был на уровне референтных значений при М и МГ. В группе с М максимальное количество клеток вступивших в фагоцитоз составило ($82,7 \pm 7,9$) %. Об эффективности фагоцитоза судили по конечной переваривающей способности нейтрофилов, которую определяли величиной индекса завершенности (ИЗФ). Данный показатель во всех обследованных группах был ниже контроля (табл. 1).

Минимальное значение эндоцитоза нейтрофильных гранулоцитов выявили в группе с МТ ($1,04 \pm 0,21$). Недостаточность переваривающей способности нейтрофилов может приводить к негативным последствиям, если нейтрофильные гранулоциты с непереваженными антигенами мигрируют в различные ткани организма.

Таблица 1. Фагоцитарная активность гранулоцитарных нейтрофилов у пациентов с различными клиническими фенотипами миастении

Показатели фагоцитирующей активности нейтрофилов	Референтные значения	М	МГ	МТ
ФИ, %	$85 \pm 5,1$	$82,70 \pm 7,9^*$	$77,04 \pm 8,1^*$	$81,71 \pm 8,5^*$
ФЧ	$3,2 \pm 0,2$	$3,33 \pm 0,9$	$2,85 \pm 0,6$	$3,51 \pm 0,9$
ИЗФ	$1,85 \pm 0,12$	$1,12 \pm 0,4$	$1,05 \pm 0,2$	$1,04 \pm 0,21$

Примечание. *- достоверность различия с контролем $P \leq 0,05$

Второй методический подход динамической оценки фагоцитоза по интенсивности денатурации ДНК захваченных фагоцитами микроорганизмов позволил плавно визуализировать все стадии эндоцитоза. Флуоресцентный краситель акридиновый оранжевый, взаимодействующий с ДНК при попадании в фагоцитирующую клетку приводил к денатурации ДНК *S. cerevisiae*, переводя ее из двухспиральной в односпиральную форму. Зеленое свечение характерное для нативных нуклеиновых кислот связанных с АО (рис. 1, фото 1а) изменялось при связывании красителя с денатурированной ДНК *S. cerevisiae* и цвет люминесценции меняется на красный (рис. 1, фото 1б). А интенсивность красной люминесценции характеризовала различные функциональные стадии активности лизосомальных ферментов нейтрофилов (рис. 1, фото 1б, 2б). Переход двухспиральной ДНК в односпиральную характеризует интенсивное переваривание антигена лизосомальными ферментами нейтрофилов, а непереваженные антигены сохраняют зеленую люминесценцию нативной ДНК (рис. 1, фото 2а).

Низкая переваривающая активность гранулоцитарных нейтрофилов была выявлена у пациентов с МТ (не подвергшиеся перевариванию дрожжи сохраняют нативную форму своей ДНК и, соответственно, зеленую люминесценцию постоянной интенсивности и слабо-оранжевую окраску (рис. 1, фото 1а, фото 2а). Результаты иммуофлюоресценции соответствуют данным визуального наблюдения адгезии и эндоцитоза фагоцитирующих нейтрофилов (первый методический подход – световая микроскопия). **Оценка фагоцитарной активности гранулоцитарных нейтрофилов по интенсивности окислительно-восстановительных реакций в НСТ-тесте** выявила низкую интенсивность образования активных форм кислорода в присутствии зимозана под действием ферментов нейтрофилов у всех обследованных больных миастенией. А количество формазанположительных клеток (СП) в спонтанном НСТ-тесте было в среднем в 4 раза выше референтных значений, что свидетельствует о низком окислительном резерве при активации. Максимальное увеличение данного показателя (СП) в 4,4 раза наблюдалось в группе с клиническим фенотипом МГ.

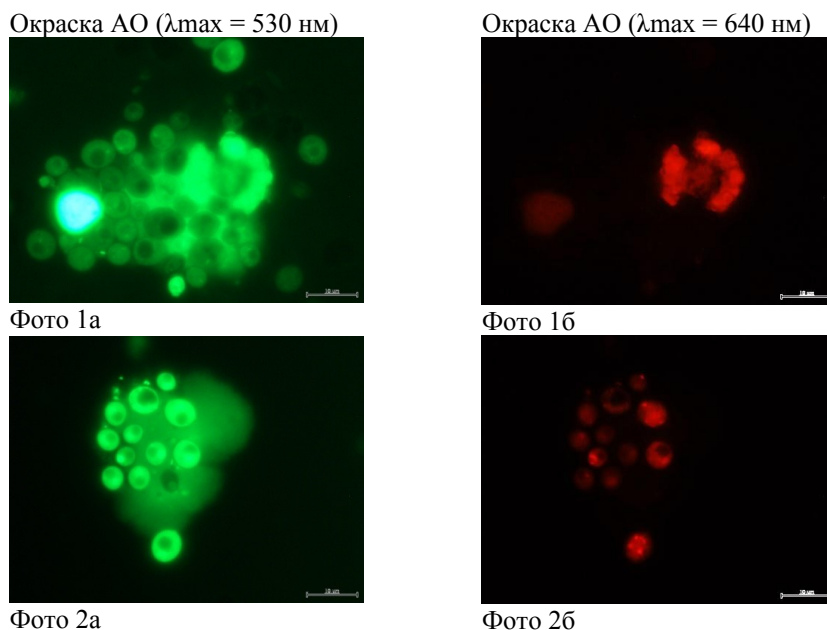


Рис.1 – Стадии денатурации ДНК *S. cerevisiae* на разных стадиях фагоцитоза гранулоцитарных нейтрофилов у больных с М (фото 1а, 1б) и МГ (фото 2а, 2б)

Также выявили достоверное снижение среднего цитохимического коэффициента (СЦК СП) в спонтанном НСТ-тесте, а максимальное снижение СЦК СП наблюдалось в группе М (на 30%) за счет изменения окислительно-восстановительной активности ферментов. Индекс стимуляции ИС был

достоверно снижен во всех исследуемых группах в среднем в 3,5 раза, что свидетельствует о недостаточности НАДФ-Н-оксидазной системы фагоцитов у пациентов с миастенией, что приводит к снижению эндоцитоза и завершенности фагоцитоза нейтрофилов (табл. 2).

Таблица 2. Метаболический окислительно-восстановительный резерв нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с различными клиническими фенотипами миастении

Показатели НСТ-теста	Референтные значения	М	МГ	МТ
СП,%	10 ± 1,1	39,23 ± 4,3*	44,48 ± 5,6*	43,62 ± 6,1*
СТ,%	57 ± 3,2	62,69 ± 7,2	65,39 ± 5,9	63,03 ± 7,8
СЦК СП, у.е.	1,5 ± 0,3	0,62 ± 0,08*	0,71 ± 0,3*	0,82 ± 0,31*
СЦК СТ, у.е.	1,5 ± 0,2	1,11 ± 0,2	1,11 ± 0,4	1,00 ± 0,1
ИС	7 ± 0,9	1,82 ± 0,4*	1,39 ± 0,6*	1,64 ± 0,3*

Примечание. * - достоверность различия с контролем $P \leq 0,05$

Исследование частоты вирусной персистенции у пациентов с миастенией на фоне морфо-функциональных изменений тимуса показало наличие сочетанной персистирующей вирусной инфекции цитомегаловируса и вируса Эпштейна-Барра у 88 %

пациентов с гиперплазией тимуса (МГ) и у 97 % пациентов с тимоматами (МТ) (рис. 2).



Рис. 2 – Частота встречаемости цитомегаловирусной инфекции и вируса Эпштейна-Барра у пациентов с МГ (2а) и МТ (2б).

При этом содержание IgG антител к цитомегаловирусу (CMV) у пациентов с миастенией без поражения тимуса составляло $(22,8 \pm 2,1)$ ед. Е,

при миастении на фоне гиперплазии тимуса (МГ) - $(18,7 \pm 3,7)$ ед. Е. (табл.3).

Таблица 3. Концентрация IgG антител в сыворотке крови к вирусам у пациентов с миастенией на фоне морфо-функциональных изменений тимуса

Показатель	Контрольная группа	Обследованные группы		
		Миастения без поражения тимуса (М)	Миастения на фоне гиперплазии тимуса (МГ)	Миастения на фоне тимомы (МТ)
IgG к CMV	$0,80 \pm 0,05$	$22,8 \pm 2,1^*$	$18,7 \pm 3,7^*$	$23,1 \pm 1,6^*$
IgG к ВЭБ	$0,24 \pm 0,03$	$2,01 \pm 0,18^*$	$2,94 \pm 0,09^*$	$2,36 \pm 0,11^*$

Примечание: * - $p < 0,05$

У пациентов с миастенией на фоне тимомы (МТ) содержание IgG антител к CMV было выше чем в предыдущих группах и составляло $(23,1 \pm 1,6)$ ед. Е. Так же у пациентов всех групп было выявлено значительное повышение концентрации IgG антител к ВЭБ, максимальное повышение титра антител к ВЭБ выявили при МГ $(2,94 \pm 0,09)$ ед. Е. Высокая частота встречаемости вирусной персистенции и значительный титр специфических антител может служить основанием для рассмотрения вирусной инфекции как триггерного фактора данного заболевания, ассоциированного с угнетением эндоцитоза гранулоцитарных нейтрофилов за счет сниженного резерва индуцированной ферментативной активации.

Таким образом, при исследовании особенностей процессинга антигенов, завершенности фагоцитоза и функциональной активности ферментов нейтрофилов выявили различную степень нарушений барьерной функции фагоцитирующих клеток, а также изменение титра и частоты встречаемости герпетических вирусов при различных клинических фенотипах миастении. Использование эволюционной научной методологии И.И. Мечникова в синтетическом подходе к диагностике триггерных факторов и мониторинг стадийности формирования патологического процесса позволяет обосновать индивидуальный лечебно-диагностический алгоритм для иммунокоррекции различных клинических форм аутоиммунных заболеваний. Проведенные исследования позволили обосновать адресную терапию при различных клинических фенотипах миастении [23,24]. При незавершенности фагоцитоза на фоне вирусной персистенции целесообразным является проведение многоэтапной монолигандной терапии пептидами и ферментами, направленной на активацию внутриклеточных ферментов, и применение иммуноглобулинов, специфичных к герпетическим вирусам.

References

1. Gordon S. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity [Text] / S. Gordon // Eur. J. Immunol. – 2008. – 38. – P. 3257–3264.

2. Mogilevsky B. L. Ilya Ilyich Mechnikov [Text] / B.L. Mogilevsky - Moscow: Publishing house "Young guard", 1958. – 350 p.
3. Metchnikoff O. N. Life of Ilya Ilyitch Metchnikoff [Text] / O.N. Metchnikoff – Moscow, Leningrad: State Publishing House, 1926.
4. Karnovsky M. L. Phagocytosis past and future [Text] / M. L. Karnovsky, L. Bolis (Ed.). – London: Academic Press, 1982.
5. Metchnikoff O. Life of Elie Metchnikoff 1845– 1916 [Text] / O. Metchnikoff – Boston, New York: Houghton Mifflin, 1921.
6. Metchnikoff E. Lectures on the Comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891, Starling, F. A. and Starling, E. H. (transl.) / E. Metchnikoff – New York: Dover Publications Inc., 1968.
7. Petruk P. T. Ilya Ilyich Mechnikov: biographical, scientific and psychiatric aspects (to the 165th anniversary of the birthday) [Text] / P. T. Petruk, I. J., Kuchma, V. I. Resnick // Annals of Mechnikov Institute. - 2010. - 2. - P. 53 - 62.
8. Belotsky S. M. Essays on phagocytosis [Text] / S. M. Belotsky, N. Ya. Spivak. - Kiev: Fitosotsiotsentr, 2009. - 304 p.
9. Spivak N. I. The interferon system of mononuclear phagocytes [Text] / N. Ya. Spivak, L. N. Lazarenko, O. N. Mikhaïlenko.- Kiev: Fitosotsiotsentr, 2002. - 164 p.
10. Shmarakov I.O. Fundamentals of virology [Text] / I. O. Shmarakov, M. M. Marchenko, M. Ya. Spivak - Chernovzi: Chernovezky national University, 2011. - 320 p.
11. Klimova E. M. Correlation of different HLA-DR antigens, level immunogenetic indices and morphological changes of the thymus in infants [Text] / E. M. Klimova // Biopolymers and cell. - 2001. - Vol. 17 – N 5. P. 434 - 440.
12. Method for comprehensive assessment of phagocytic activity of blood neutrophils. Instructions for use [Text]: guidelines / Institute of environmental and occupational pathology. – Belarus, 2003. - 15 p.
13. Cavalcante P. Epstein-Barr virus persistence and reactivation in myasthenia gravis thymus [Text] / P. Cavalcante, B. Serafini, B. Rosicarelli et al. // Annals of Neurology. – 2010. – Vol. 67. – N 6. – P. 726–738.
14. Jing F. Lack of Epstein-Barr virus infection in Chinese myasthenia gravis patients [Text] / F. Jing, D.

Wei, D. Wang et al. // Acta Neurologica Scandinavica – 2013. – Vol. 128. – N 5. – P. 345–350.

15. Maslennikov A. B. Molecular biological technologies in medical practice [Text] / A.B. Maslennikov. - Novosibirsk: Alpha Vista, 2006. - p. 208.

16. Muniz-Junqueira M.I. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes [Text] / M.I. Muniz-Junqueira, L.M. Peçanha, V.L. Silva-Filho et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2003. - Vol.10. – P.1096 - 1102.

17. Park B.H. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils: A diagnostic acid [Text] / B.N. Park, S.M. Fikrig, E.M. Smithwick // Lancet. – 1968. – Vol.2. - P.532-534.

18. Boyko V.V. Association between immunologic factors and various structural and morphological types of thymoma [Text] / V.V. Boyko, E.M. Klimova, A.N. Kudrevich // Medical practice. – 2005. – Vol. 5. - P. 43 – 47.

19. Klimova E.M. Persistent viral infection, serum antibodies and chromosomal instability in myasthenia [Text] / E.M. Klimova, V.V. Boyko, I.A. Krivoruchko et al. // Clinical surgery. – 2000. – N 7. – P.14 –16.

20. Klimova E.M. On the role of immunogenesis mediators and antibodies in patients with myasthenia in persistent viral infection [Text] / E.M. Klimova // Immunology and Allergology. - 1999. – N 3. – P.49 – 50.

21. Klimova E.M. Changes in immunophysiological parameters and persistent viral infections in myasthenia and thymus lesion [Text] / E.M. Klimova // Physiological Journal. – 1998. – Vol. 44. – N 3. – P.189.

22. Klimova E.M. Diagnostic and prognostic markers of myasthenic and cholinergic crises and their prevention at different phenotypes of myasthenia gravis [Text] / E.M. Klimova, V.V. Boyko, L.A. Drozdova et al. // Kharkov surgery school. – 2015. – N 3. – P. 6 – 11.

23. Patent 32556 UA, A61B 5/00 The method of differential diagnosis and prognosis of multipleoptions diseases [Text] / Boyko V.V., Klimova E.M., Drozdova L.A., Kudrevich A.N.; State institution «Zaycev V.T. Institute of general and urgent surgery of National Academy of medical sciences of Ukraine». - 26.05.2008, Bull.2008. – N 10.

24. Patent 38004UA. A 61 B 5/00 The method of choice of treatment of patients with different clinical phenotypes of myasthenia [Text] / Boyko V.V. / Boyko V.V., Klimova E.M.; State institution «Zaycev V.T. Institute of general and urgent surgery of National Academy of medical sciences of Ukraine». - 25.12.2008. Bull.2008. – N 24.

UDC 576.858:616.74-009.17:616.155.3-008.13

INTEGRATED METHODOLOGY OF I.I.

MECHNIKOV AND MODERN ADDRESS

IMMUNOCORRECTION AT MYASTHENIA

Klimova E.M., Drozdova L.A., Lavinskaya E.V., Bychenko E.A.

Introduction. There is carried out reconstruction of the past in the field of integrated discoveries of well-known scientist I.I. Mechnikov for research of aspects of

phagocytic function of immune cells and infectious factors in etiology and pathogenesis of progressing myasthenia. There are analyzed the leading factors which have generated scientific outlook and integrated analytical methodology of knowledge of I.I. Mechnikov – the native of the Kharkov province, the graduate student of the Kharkov Imperial University of 1864, the Nobel prize winner of 1908 for creation of the theory of phagocytosis and the author of set of works in the field of microbiology, immunology and virology.

Material & methods. The work studied the mechanisms of disorder of various stages of barrier phagocytic function of neutrophils and frequency of occurrence and various degree of expression of virus persistence at patients with myasthenia is determined. Phagocytosis disturbance leads to uncontrollable development of infections at myasthenia. Advance of muscular delicacy and morph-functional disturbances in thymus, obviously, depend on the individual mechanisms which affect various stages of immune disbalance. The whole century has passed from the moment of creation of the phagocytic theory. For this time all stages of this process have been studied, methodical approaches are developed for an estimation of specific features of this phenomenon, from light microscopy to flowing cytofluorometry. Possibilities of light microscopy allow to visualize the stages of phagocytosis from chemotaxis and adhesions to completeness of digestion by neutrophils in dynamics. And Nitro Blue Tetrazolium Reduction Test (NBTR) is used for an estimation of enzymatic activity of phagocytes for initiation of formation of active forms of oxygen at the phagosoma formation stage. The given method allows to investigate stages of oxygen-dependent metabolism of neutrophils. Along with these methods of estimation of phagocytosis, which don't always give the high-grade information about functional condition of phagocyte leucocytes, it is expedient to apply a fluorescent method with use of acridine orange (AO).

Results & discussion. Accruing digestion of yeast cells by lysosomal enzymes of neutrophils destabilizes DNA and facilitates its denaturation with respective alteration of a spectrum of a luminescence of yeast – red colour ($\lambda_{max} = 640$ nanometers). Undigested yeast keeps the native form of DNA, that is green colour. The visual estimation of chemotaxis, adhesion and endocytosis has allowed to estimate quantity of phagocyte cells. The phagocytic index was up-to-date of referential values at M and MT. The minimum value of endocytosis of neutrocytes was revealed in MG group. Insufficiency of digesting ability of neutrophils can lead to negative consequences, if neutrocytes migrate in various tissues of an organism with undigested antigens. The low digesting activity of granulocytic neutrophils has been revealed at patients with MT (the yeast, which didn't expose digestion, kept the native form of DNA and, accordingly, they have green luminescence of constant intensity and light-orange colour). Results of immunofluorescence correspond to data of visual observation of adhesion and endocytosis of phagocyte neutrophils (the first methodical approach – light microscopy). The low intensity of formation of active forms of oxygen has been revealed in the NBTR-test according to intensity of oxidation-

reduction reactions. The low oxidising reserve of enzymes of neutrophils has been revealed in induced NBTR-test at MG because at this category of patients the spontaneous level of oxidation was in 4 times more than induced one. High frequency and antigenic virus load (CMV) has been revealed at patients with MT, and maximum persistence VEB has been revealed at MG. Research of presence and processing of antigens, functional oxygen-dependent activity of enzymes of neutrophils and completeness of phagocytosis has revealed various degree of disturbances of barrier function of phagocyte cells, and also change of the titer and frequencies of occurrence of herpes viruses CMV and VEB at various clinical phenotypes of myasthenia.

Conclusion. It is shown, that degree of expression and frequency of occurrence of persistence of cytomegalovirus and Epstein-Barra virus are interconnected with defects of various stages of phagocytosis, its completeness and activity of the intracellular enzymes which participate in formation of active forms of oxygen, and intensity of formation of monomers of DNA of the microorganisms which are grasped by phagocytes. Disturbance of barrier function of immunity at myasthenia is significant for a debut and disease advance. An estimation of phagocytosis and virus persistence, as trigger factor of myasthenia, is important for a choice of target therapy. Use of evolutionary scientific methodology of I.I. Mechnikov in the synthetic approach for diagnostics of trigger factors and monitoring of stage of formations of pathological process allows to prove individual medical-diagnostic algorithm for correction of various clinical forms of autoimmune diseases. The approaches for address therapy are proved at various clinical phenotypes of myasthenia which includes carrying out of staged monoligand therapy by peptides and enzymes. This therapy referred on activation of intracellular enzymes of neutrophils at incompleteness of phagocytosis, and application of the immunoglobulins which are specific to herpes viruses.

Key words: myasthenia, barrier function, viral persistence, immunotherapy