

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Гавриченко Артур Владимирович

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ СИГНАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ Na^+,K^+ -
АТФАЗЫ В ДЕНЕРВАЦИОННО-РЕИННЕРВАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ
ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ И ПРИОБРЕТЕННЫХ НЕВРОГЕННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ.**

Специальность 03.03.01 – физиология

**Научный руководитель:
д.б.н., доцент Лопатина Е.В.**

**Санкт-Петербург
2021**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности.

Клинические заболевания нервно-мышечной системы всегда сопровождаются нарушением трофики скелетных мышц и повышением их утомляемости вне зависимости от локализации патологического процесса (миопатии, невропатии, болезни передних рогов спинного мозга, нарушения нервно-мышечной передачи) (Martignago, Fanin 2009). Ацетилхолин (АХ) – главный нейромедиатор в нервно-мышечном соединении, способный выделяться в синаптическую щель не только в квантовом виде (концентрация 10^{-4} М), но и в виде «неквантовой утечки» (концентрация 10^{-8} - 10^{-9} М). (Митчелл, Сильвер, 1963 г). Вклад неквантового ацетилхолина в модуляцию нервно-мышечной передачи изучен достаточно подробно (Nikolsky et al., 1996; Krivoi et al., 2006; Malomouzh, Nikolsky 2018) В 2020 году вышла работа о том, что квантовый ацетилхолин, взаимодействуя с никотиновым холинорецептором (Н-холинорецептором) вызывает не только деполяризацию мышечного волокна, но и обеспечивает трофический сигнал, который посредством посттранскрипционной модификации субстрата предотвращает механизмы коннексин-опосредованной мышечной атрофии (Cisterna. Vargas 2020).

Подробные механизмы холинергической миопротекции изучены не в полном объеме. Значительный интерес представляют трофические изменения, в основе которых лежит модуляция известной функциональной и структурной связи Н-холинорецепторов с трансмембранными насосными системами, в частности Na^+/K^+ -АТФазой (Elfman et al., 1982). Важнейшей группой природных регуляторов Na^+/K^+ -АТФазы являются сердечные гликозиды и эндогенные дигиталисоподобные факторы. Влияние дигиталисоподобных факторов на трофотропные свойства мышечного волокна неизвестно. (Hamlyn et al., 1991; Schoner, Scheiner-Bobis 2007).

Автоиммунная патология имеет значительный вес в современной неврологии. (Завалишина, Пирадова 2014). Общим в развитии всех аутоиммунных заболеваний нервной системы является наличие антител к тем или иным ее компонентам. Так при миастении обнаруживаются антитела к никотиновым холинорецепторам. То есть нервно-мышечный синапс является мишенью для собственной иммунной системы. Патологический процесс может затрагивать все звенья периферического нервно-мышечного аппарата: периферический нерв, нервно-мышечный синапс, мышечное волокно.

Таким образом, изучение фундаментальных физиологических механизмов, обеспечивающих регуляцию трофики иннервируемой, ткани или органа, является актуальной темой для современной физиологии и неврологии.

Цель исследования. Исследовать роль неквантового ацетилхолина в механизмах, препятствующих развитию миопатического процесса при ХВДП *in vitro*.

Задачи исследования.

1. Провести клинико-инструментальное обследование пациентов и здоровых добровольцев (неврологический осмотр, забор венозной крови, лабораторные исследования, выполнение электронейромиографии).
2. Сформулировать критерии включения пациентов и здоровых добровольцев в экспериментальную и контрольную группу. Сформировать контрольную и экспериментальную группы.
3. Оценить уровень антител к Н-холинорецепторам в плазме крови участников исследования.
4. Разработать методику органотипического культивирования ткани скелетной мышцы и модель ХВДП *in vitro*.

5. В условиях органотипического культивирования ткани скелетной мышцы оценить трофотропные эффекты ацетилхолина и оуабаина в норме и на модели ХВДП.
6. С помощью фармакологического анализа в опытах *in vitro* изучить вклад никотиновых холинорецепторов и сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы в механизмы, препятствующие развитию ХВДП.

Научная новизна.

Проведенное исследование позволило разработать методику органотипического культивирования ткани скелетной мышцы и модель ХВДП *in vitro*. С помощью иммуноферментного анализа в плазме крови пациентов с установленным диагнозом ХВДП впервые обнаружены антитела к никотиновым холинорецепторам. Зарегистрировано статистически значимое отличие уровня антител к никотиновым холинорецепторам в плазме крови больных ХВДП и здоровых добровольцев. В условиях органотипического культивирования ткани скелетной мышцы 10-12 дневных куриных эмбрионов обнаружены дозозависимые эффекты ацетилхолина и оуабаина. Максимальный миостимулирующий эффект ацетилхолин проявил в концентрации сопоставимой с неквантовым выбросом – 10^{-8} М, индекс площади экспериментальных эксплантов был выше контрольного значения на 70% ($p<0,05$). Оуабайн обнаружил трофотропный эффект в концентрациях, сопоставимых с эндогенными – 10^{-8} - 10^{-10} М. Индекс площади экспериментальных эксплантов был выше контрольного значения на 40 % и 20% соответственно. В диапазоне от 10^{-4} до 10^{-6} М зарегистрирован миотоксический эффект оуабаина. Фармакологический анализ показал, что трофотропный эффект неквантового ацетилхолина основан на модуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы при участии никотиновых холинорецепторов.

На модели ХВДП *in vitro* впервые продемонстрированы миотоксические свойства плазмы крови пациентов и отсутствие таковых у здоровых добровольцев.

В опытах *in vitro* на модели ХВДП с помощью фармакологического анализа доказан положительный вклад неквантового ацетилхолина в механизмы препятствующие развитию денервационных миопатических изменений при ХВДП.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные результаты в значительной мере расширяют имеющиеся представления о физиологических свойствах неквантового ацетилхолина и его функциональной роли в регуляции функциональной активности нервно-мышечного соединения. Получены экспериментальные доказательства, свидетельствующие о наличии у ацетилхолина, в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом, трофотропных свойств. Показано, что эти свойства реализуются через прямую модуляцию сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы в этом случае фермент может выполнять роль модулированного рецептора. С другой стороны нельзя исключать активацию неквантовым ацетилхолином ансамбля: Н-холинорецептор - Na^+/K^+ -АТФаза. То есть, обсуждается вопрос о возможности прямой и рецептор опосредованной модуляции сигнальной функции фермента неквантовым ацетилхолином.

Разработанная оригинальная авторская методика органотипического культивирования мышечной ткани и модель ХВДП *in vitro* могут быть использованы для тестирования лекарственных препаратов потенциально влияющих на трофику мышечной ткани.

Полученные результаты существенно расширяют имеющиеся представления о функционировании Na^+/K^+ -АТФазы в качестве трансдуктора

сигнала в скелетной мышце. Впервые получены данные о трофотропных свойствах неквантового ацетилхолина.

Обнаруженные достоверные отличия в уровне антител к никотиновым холинорецепторам в плазме крови больных ХВДП и здоровых добровольцев доказывают серьезный вклад холинергической регуляции в патогенез заболевания. Существенно расширены представления о патогенезе ХВДП как дизиммунном заболевании, вовлекающем в воспалительный процесс не только структуру нервного волокна, но и механизмы синаптической передачи.

Полученные экспериментальные данные могут дополнить развернутую иммунологическую диагностику хронических воспалительных полиневропатий, а также использоваться при коррекции клинических рекомендаций при оказании помощи пациентам с данным заболеванием.

Положения, выносимые на защиту:

1. В плазме крови больных ХВДП и здоровых добровольцев есть существенные различия по уровню антител к Н-холинорецепторам.
2. Ацетилхолин и оуабаин дозозависимо регулируют рост эксплантатов ткани скелетной мышцы.
3. Ацетилхолин в концентрации сопоставимой с неквантовой, проявляет трофотропные свойства, регулируя рост эксплантатов ткани скелетной мышцы посредством модуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы.
4. Плазма крови больных ХВДП может проявлять миотоксические свойства и ингибирует рост эксплантатов ткани скелетной мышцы.
5. Ацетилхолин в концентрации сопоставимой с неквантовой нивелирует миотоксический эффект плазмы крови больных ХВДП за счет модуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы как прямо, так и receptor опосредовано.

Методология и методы исследования.

Для решения поставленных задач проведено комплексное клинико-экспериментальное исследование. В клинической части работы использованы клинико-неврологический, нейрофизиологический (ЭНМГ), лабораторный методы исследования. Трофические свойства фармакологических веществ и плазмы крови участников исследования изучали в условиях органотипического культивирования ткани. Клинико-неврологическое исследование проводили по общепринятым протоколу (Скоромец и др., 2007; Однак и др., 2014; Михайленко и др., 2017). Для проведения лабораторных и экспериментальных исследований у больных производили забор венозной крови натощак в утренние часы в объеме 5 мл. до начала процедур плазмафереза и внутривенных инфузий иммуноглобулина G (ВВИГ). Стимуляционную электронейромиографию (ЭНМГ) выполняли по общепринятым международному протоколу обследования больных с подозрением на ХВДП. (EFNS/PNS 2010).

Экспериментальная часть работы выполнена с использованием метода органотипического культивирования ткани скелетной мышцы. Метод является адекватной моделью для изучения трофотропных свойств физиологически активных веществ и лекарственных препаратов. Применение органотипического культивирования позволяет стандартизировать условия эксперимента, исключить системные влияния организма на изучаемые процессы, сохранить клеточное сообщество мышечной ткани. Морфометрический метод оценки данных с расчетом индекса площади, позволяет оценить изменение процессов клеточного роста и пролиферации в плоскости.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность полученных результатов обусловлена строгим соблюдением диагностических критериев EFNS/PNS 2010 при включении пациентов в экспериментальную группу, стандартизацией условий

культивирования мышечной ткани, анализом значительного фактического клинического и экспериментального материала данных, адекватным выбором методов статистической обработки.

Материалы работы были представлены в виде устных докладов на Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2018, 2020, 2021). Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященная 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2020), X Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной памяти Инесы Бенедиктовны Козловской «Новые подходы к изучению проблем физиологии экстремальных состояний» (Москва, 2021). V Российский симпозиум с международным участием Клеточная сигнализация: итоги и перспективы Cell signaling: conclusions and perspectives 14-17 сентября 2021 г. Казань,

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, включая 6 статей в рецензируемых журналах из перечня ВАК.

Личное участие автора в получении результатов. Все клинические манипуляции, экспериментальные процедуры, обработка, анализ полученных результатов, подготовка материалов для опубликования выполнены автором лично.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

1. Клинико-неврологический метод.

Всего под наблюдением находились 32 больных. Возраст больных составил от 47 до 66 лет (медиана возраста 54,3 лет). Всем пациентам в ходе клинического исследования был выставлен диагноз ХВДП, достоверная по

критериям EFNS / PNS от 2010 года. От каждого больного было получено письменное информированное согласие. Утверждение формы и содержания информированного добровольного согласие на участие в исследовании было получено на заседании Локального Этического комитета ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова от 22.11.2017 г. Контрольную группу составили 25 здоровых добровольцев в возрасте от 42 от 60 лет (медиана возраста 56,3 лет). Клинико-неврологическое исследование проводили по общепринятым протоколу (Скоромец и др., 2007; Однак и др., 2014; Михайленко и др., 2017). Оценивали данные анамнеза (возраст дебюта заболевания, сопутствующая патология, реакция на иммуномодулирующую терапию) и неврологического статуса: общемозговая симптоматика, дисфункции черепномозговой иннервации, двигательной сферы, чувствительные расстройства, нарушения координации, экстрапирамидная симптоматика. Инвалидизация пациентов оценивалась по шкале EDSS. Анамнестические сведения пациентов подтверждались данными соответствующих документов из других медицинских учреждений (возраст дебюта заболевания, сопутствующая патология, результаты лабораторных и инструментальных методов исследований на догоспитальном этапе и т.д.) и фиксировались в карте стационарного пациента.

2. Лабораторный метод.

Для проведения лабораторных и экспериментальных исследований у больных производили забор венозной крови натощак в утренние часы в объеме 5 мл. до начала процедур плазмафереза и инфузий ВВИГ.

Лабораторно исследовали уровни гемоглобина (г/л), лейкоцитов ($\times 10^9/\text{л}$), тромбоцитов ($\times 10^9/\text{л}$), СОЭ (мм/ч), С-реактивного белка (мг/л), Общего белка (г/л). Для уточнения степени миопатического процесса определяли уровни КФК (ЕД/л), ЛДГ (ЕД/л). Пациентам проводилась лumbальная пункция с последующим анализом спинномозговой жидкости (белок (г/л), цитоз). С

целью проведения дифференциального диагноза определен уровень глюкозы (ммоль/л), ТТГ (мМЕ/л), фолиевой кислоты (нмоль/л), витамина В12 (пкмоль/л). Для оценки уровня антител в плазме крови всех участников исследования использовали иммуноферментный анализ по стандартному протоколу кит ELISA.

3. Нейрофизиологический метод.

Стимуляционную электронейромиографию (ЭНМГ) выполняли по общепринятым протоколу обследования больных с подозрением на ХВДП. Вначале исследования проводилось на одной половине тела, анализировались срединный, локтевой (точка стимуляция ниже локтя), глубокий малоберцовый (точка стимуляция ниже головки малоберцовой кости) и большеберцовый нервы. Если результаты не удовлетворяли диагностическим критериям, тестирование выполняли на другой половине тела, исследуя те же нервы. (EFNS/PNS 2010) Для выявления типичных нейрофизиологических паттернов демиелинизации исследовали следующие нейрофизиологические характеристики: скорость распространения импульса (СПИ) по моторным и сенсорным волокнам, дистальную латентность М-ответа, латентность F-волн, темпоральную дисперсию М-ответа, наличие блоков проведения по моторным волокнам.

СПИ – количественная оценка (м/сек.). Дистальная латентность М-ответа, латентность F-волн – количественная оценка (мсек.). Патологическая темпоральная дисперсия М-ответа – увеличение длительности проксимального М-ответа к дистальному на более чем на 30% (качественная оценка – есть, нет). Наличие блоков проведения – снижение амплитуды проксимального М-ответа по сравнению с дистальным на более чем на 50 % (качественная оценка – есть, нет).

Игольчатую ЭМГ выполняли для выявления денервационно-реиннервационного процесса, процедура включала в себя оценку следующих показателей: оценка спонтанной активности (качественная оценка – есть,

нет), увеличение длительности потенциалов двигательных единиц (ПДЕ) (мсек), наличие высокоамплитудных ПДЕ (качественная оценка – есть, нет), сниженное рекрутирование ПДЕ (качественная оценка – есть, нет). Для выявления признаков реиннервации исследовалось наличие полифазных ПДЕ (качественная оценка – есть, нет). Исследовали следующую группу мышц: *m. tibialis anterior*, *m. gastrocnemius*, *m. quadriceps femoris (caput lat.)*, *m. interosseus dorsalis I*, *m. brahioradialis*.

4. Метод органотипической культуры ткани.

Исследования проводили на 10-12-дневных куриных эмбрионах. Объектами исследования являлись культивируемые эксплантаты ткани мышцы бедра. Эмбриональную мышечную ткань предварительно препарировали на отдельные эксплантаты размером 0,5-1 мм, которые помещали в отдельные стерильные чашки Петри диаметром 40 мм на коллагеновую подложку. Каждая чашка Петри содержала 15-20 эксплантатов ткани мышцы бедра. Для прикрепления эксплантатов к коллагеновой подложке чашки Петри помещали в термостат при температуре 37⁰ С на 6 минут. Далее заливали в чашки по 3 мл питательной среды, состоящей из раствора Хенкса (50% об.), среды Игла (40% об.), эмбриональной телячьей сыворотки (9,5% об.), глюкозы 40% (0,5% об.) и ципрофлоксацин (2 мг/мл). Затем чашки ставили в термостат на 30 минут, далее в них добавляли исследуемые вещества (ацетилхолин, оуабаин, d-тубокуарина хлорид) и плазму крови участников исследования. Трофические свойства веществ и плазмы крови изучали в различных комбинациях и в широком диапазоне концентраций. На каждую изучаемую концентрацию приходилось 540 эксплантатов.

Культивирование эксплантатов ткани скелетных мышц осуществляли при 37⁰ С и 5% CO₂ в течение 48 часов в CO₂ инкубаторе («Binder», Германия). Через двое суток культивирования чашки Петри извлекали из CO₂ инкубатора и исследовали.

Для оценки данных применяли морфометрический метод. Морфометрический критерий – индекс площади рассчитывали, как отношение площади всего эксплантата к площади центральной зоны. За условную единицу площади принимали квадрат оккуляр-сетки микроскопа, сторона квадрата при увеличении 3.5x10 равна 150 мкм. Значение ИП контрольных эксплантатов принимали за 100%.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 10.0. При сравнении контрольной и экспериментальной групп использовали параметрические (t-критерий Стьюдента для двух независимых выборок) и непараметрические (критерий Манн-Уитни) методы статистического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Результаты клинического обследования.

Длительность заболевания пациентов на момент осмотра составила от 1 до 10 лет (среднее время 3,6 года). Медиана возраста дебюта заболевания 55 лет. В неврологическом статусе у пациентов были выявлены следующие нарушения: дисфункция черепных нервов (16%), полиневритический синдром с симметричными двигательными нарушениями в виде нижнего дистального парапареза (73%) или дистального тетрапареза (28%) различной степени выраженности, атрофии (60%), фасцикуляции (44%), трепмор рук (40%), синдром сенситивной атаксии (84%), нарушения чувствительности по полиневритическому типу (84%), нарушения периферической вегетативной иннервации (32%), астено-невротический синдром (28%). У ряда пациентов обращала на себя внимание сопутствующая патология, снижающая качество жизни: гипертоническая болезнь (56%), дегенеративно-дистрофическое заболевание позвоночника (60%), аутоиммунный тиреоидит (20%), цереброваскулярная болезнь (20%), язвенная болезнь желудка (16%), остеопения (20%). Сопутствующие диагнозы были подтверждены

соответственными лабораторными и инструментальными методами. Все пациенты в ходе наблюдения положительно отреагировали на различные комбинации иммуномодулирующего лечения: мембраного плазмафереза (80%), ВВИГ (44%), глюкокортикоиды (24%). По шкале инвалидизации EDSS медиана составила 2,2 балла.

С целью верификации диагноза всем пациентам была проведена лумбальная пункция по стандартному протоколу и выполнен анализ концентрации белка и уровень цитоза в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). У 92% пациентов отмечалось повышение уровня белка в цереброспинальной жидкости, белково-клеточная диссоциация. Среднее значение уровня белка в ликворе 705 мг/л, уровня цитоза 6 кл/мкл. В ходе лабораторных исследований выявлены также признаки анемии I ст. (4%), нейтрофильный лейкоцитоз (16%). Выявлены системные признаки воспаления такие как: повышение СОЭ (28%), уровня СРБ (28%), ЛДГ (16%). Повышение КФК наблюдалось в 24% случаев. У 28% пациентов выявлен дефицит фолиевой кислоты, у 4% витамина В12. Лабораторные признаки гипотиреоза наблюдались у 8% обследуемых.

Пациентам был выполнен ИФА сыворотки крови на уровень антител к Н-холинорецепторам. Данные иммуноферментного анализа свидетельствуют о том, что уровень антител к Н-холинорецепторам в сыворотке крови больных ХВДП ($0,42 \pm 0,087$ нмоль/л) статистически выше, чем в контрольной группе здоровых добровольцев ($0,02 \pm 0,004$ нмоль/л) ($p < 0,01$). Уровень антител к Н-холинорецепторам в сыворотке крови группы контроля варьировал от 0 нмоль/л до 0,009 нмоль/л, в то время как у пациентов с ХВДП в интервале от 0,1 нмоль/л до 1,8 нмоль/л.

В ходе нейрофизиологического обследования у всех пациентов были выявлены типичные признаки демиелинизации нервного волокна. В наибольшей степени в демиелинизирующий процесс были вовлечены моторные волокна малоберцовых (90%), большеберцовых (85%) и срединных

(74%) нервов. Медиана СПИ по моторным волокнам малоберцового нерва составила 30 м/сек, большеберцового 27 м/сек, срединного 32 м/сек. Снижение СПИ по сенсорным волокнам отмечалось также в большеберцовом (68%), малоберцовом (60%) и локтевом (48%) нервах. Медиана дистальной латентности М-ответа при стандартном расстоянии 8 см. по волокнам большеберцового нерва составила 3,5 мсек. (регистрация с *m.abductor hallucis*), глубокого малоберцового 3,2 мсек.(регистрация с *m.tibialis ant.*), срединного 4,5 мсек. (регистрация с *m.abductor pollicis brevis*), локтевого 3,4 мсек. (регистрация с *m.abductor digiti minimi*).

Медиана латентности F-волн в волокнах большеберцового нерва на уровне стимуляции подколенной ямки составила 45,5 мсек, глубокого малоберцового в точке стимуляции головки малоберцовой кости 44,5 мсек, срединного в точке стимуляции запястья 29,2 мсек, локтевого в точке стимуляции локтевого сгиба 24,8 мсек. Патологическая темпоральная дисперсия М-ответа в волокнах большеберцового нерва обнаружена у 28% больных, малоберцового 20%, срединного 16%, локтевого 8%. Наличие блоков проведения по моторным волокнам большеберцовых нервов обнаружено у 8% обследуемых, малоберцовых 12%, срединных 4%, локтевых 4%.

Игольчатая ЭМГ выявила денервационные изменения у 64% пациентов в следующих мышцах: *m. tibialis anterior* (60%), *m. gastrocnemius* (36%), *m. quadriceps femoris* (*caput lat.*) (20%), *m. interosseus dorsalis I* (12%), *m. Brachioradialis* (8%). Денервационные изменения включали в себя наличие спонтанной активности мышечного волокна (24%), а также изменения морфологии ПДЕ таких как сниженное рекрутирование ПДЕ (44%), наличие высокоамплитудных ПДЕ (40%), увеличение длительности ПДЕ. Средняя длительность ПДЕ в денервированных мышцах составила 13,5 мсек.

Реиннервационные изменения мышечных волокон в виде наличия полифазных ПДЕ обнаружены у всех пациентов с денервационным процессом (64%).

Таким образом, у ряда пациентов выявлены нейрофизиологические признаки денервационно-реиннервационного процесса, клинически проявляющегося развитием неврогенного миопатического синдрома, обуславливающего степень тяжести течения заболевания и инвалидизации больных.

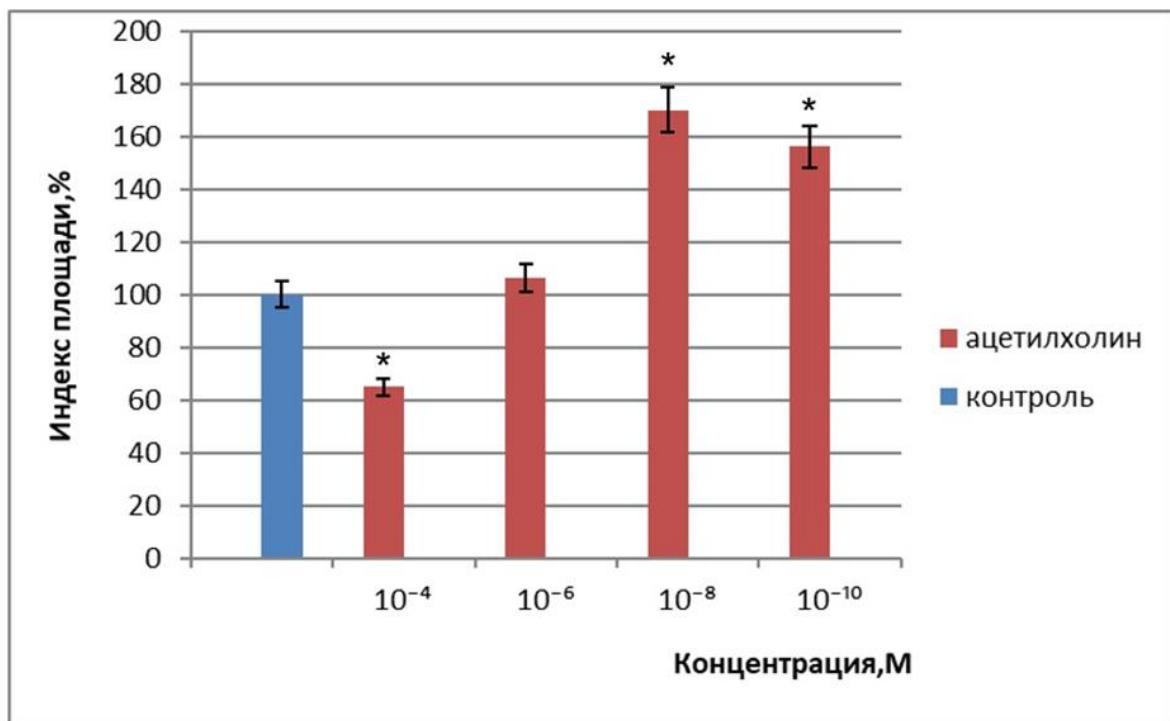
На основании результатов клинико-неврологического обследования из экспериментальной группы были исключены пациенты с подтвержденными диагнозами: бульбоспинальная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди), последствие перенесенной острой воспалительной демиелинизирующей полиневропатии (синдром Гийена-Барре), синдром Миллера-Фишера, наследственная моторно-сенсорная полиневропатия 1А типа. Пациенты с установленным диагнозом ХВДП (достоверная по критериям EFNS/PNS 2010) в соответствии с критериями включения вошли в экспериментальную группу.

2. Влияние ацетилхолина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.

Влияние ацетилхолина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы исследовали в диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-10} М.

Действие ацетилхолина было дозозависимым. Концентрации ацетилхолина, сопоставимые с неквантовым выходом (10^{-8} М, 10^{-10} М), обнаружили трофотропные свойства. Добавление в питательную среду ацетилхолина в концентрации 10^{-10} М стимулировало рост эксплантатов ткани скелетной мышцы на 56% по сравнению с контрольным значением ($p < 0,05$). Максимальный трофотропный эффект ацетилхолина проявил в концентрации 10^{-8} М: индекс площади экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на 70% ($p < 0,05$). В концентрации 10^{-6} М ацетилхолин на рост экспериментальных эксплантатов не влиял.

Концентрация 10^{-4} М достоверно ингибировала рост мышечной ткани на 35% ($p < 0,05$). (рис. 1).



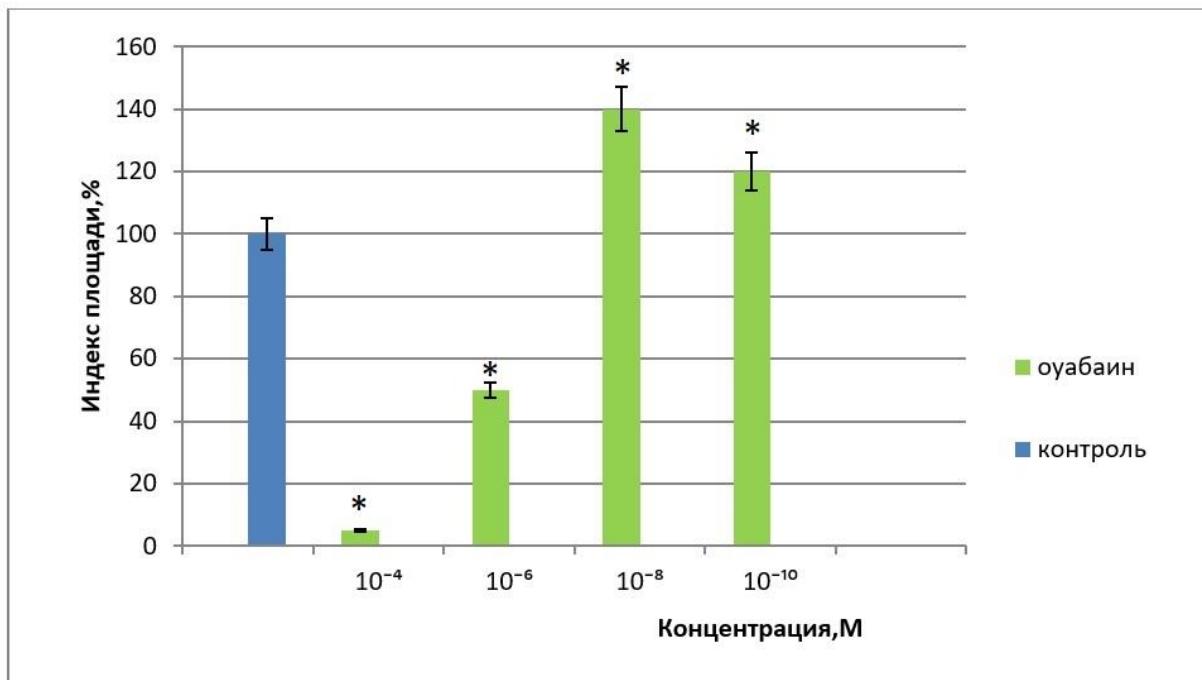
* – $p < 0,05$, достоверные различия относительно контроля

Рисунок 1. Ацетилхолин дозозависимо регулирует рост эксплантов ткани скелетной мышцы.

3. Влияние оуабаина на рост эксплантов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.

Для того, чтобы оценить участие сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы в регуляции роста эксплантов ткани скелетной мышцы была проведена отдельная серия экспериментов. Действие оуабаина изучали в диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-10} М. В концентрации 10^{-4} оуабаин практически полностью ингибировал рост экспериментальных эксплантов. В дозе 10^{-6} М препарат также проявлял миотоксический эффект, индекс площади экспериментальных эксплантов был на 50% ниже контрольного значения ($p < 0,05$). Максимальный трофотропный эффект препарат проявлял в концентрации 10^{-8} М: индекс площади экспериментальных эксплантов был

выше контрольных значений на 40% ($p < 0,05$). В концентрации 10^{-8} М оуабаин также достоверно стимулировал рост на 20% ($p < 0,05$). (рис. 2)



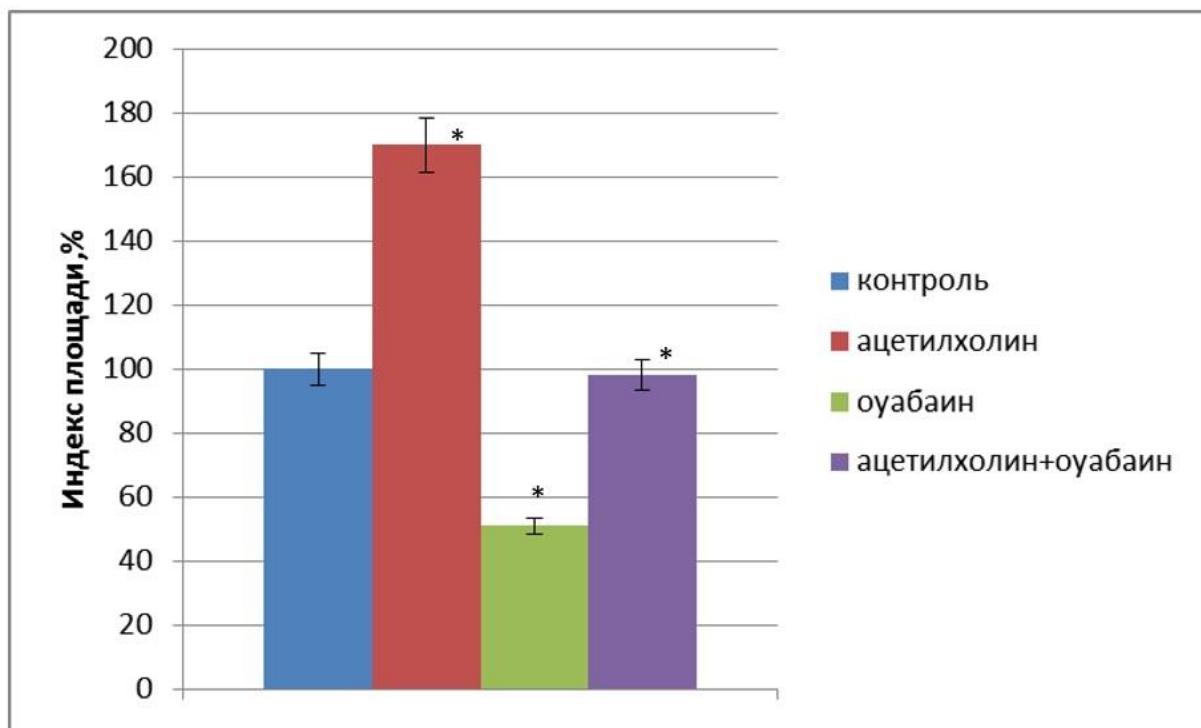
* – $p < 0,05$, достоверные различия относительно контроля

Рисунок 2. Оуабаин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани скелетной мышцы.

4. Участие неквантового ахетилхолина в модуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы.

Для установления возможности регуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы ацетилхолином в концентрации, сопоставимой с неквантовым выходом, была поставлена отдельная серия экспериментов. Эксплантаты скелетной мышцы культивировали в питательной среде, содержащей совместно ацетилхолин 10^{-8} М и оуабаин 10^{-6} М. Обнаружено, что ацетилхолин нивелирует миотоксический эффект оуабаина. Индексы

площади экспериментальных эксплантатов значимо не отличались от контрольных значений. (рис. 3)



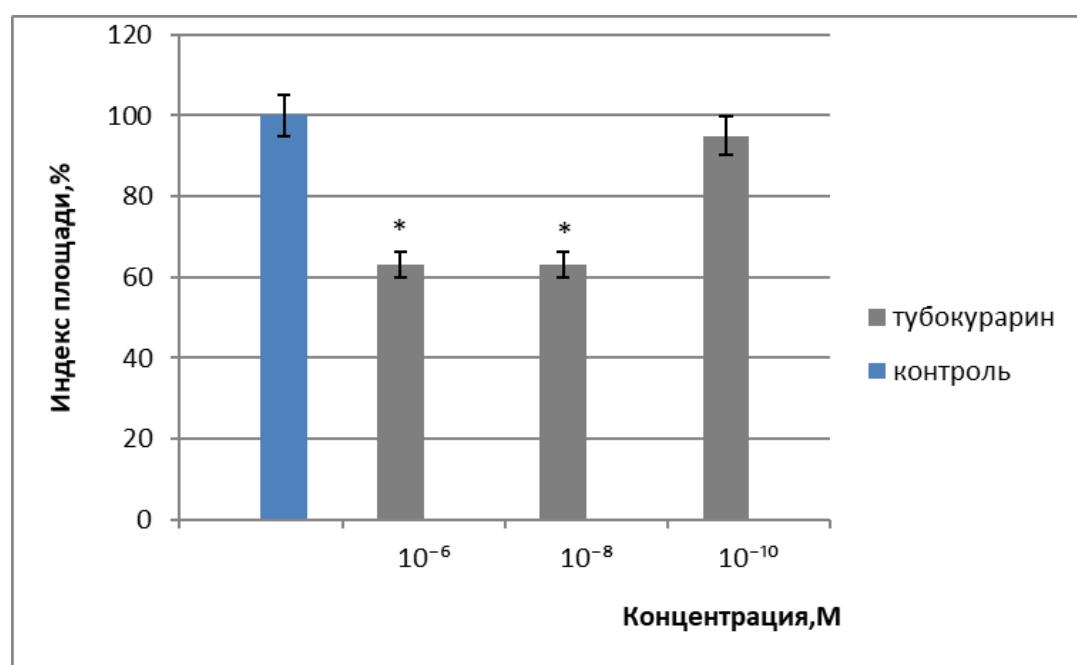
* – $p < 0.05$, достоверные различия относительно контроля

Рисунок 3. Ацетилхолин в концентрации, сопоставимой с неквантовым выходом ($10^{-8} M$), нивелирует миотоксический эффект оуабаина ($10^{-6} M$)

5. Влияние d-тубокуарина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.

Для того, чтобы оценить вклад Н-холинорецепторов в обнаруженный нами трофотропный эффект ацетилхолина поставили отдельную серию экспериментов по изучению свойств блокатора Н-холинорецепторов d-тубокуарина. Проведенные исследования показали, что в концентрации $10^{-6} M$ и $10^{-8} M$ препарат достоверно ингибировал рост эксплантатов ткани скелетной мышцы на 37% ($p < 0.05$). В концентрации $10^{-10} M$ d-тубокуарин не влиял на рост экспериментальных эксплантатов, индексы

площади экспериментальных эксплантов значимо не отличались от контрольных значений (рис.4).



* – $p < 0.05$, достоверные различия относительно контроля

Рисунок 4. d-Тубокуарин в концентрации $10^{-10} M$ не оказывает достоверного влияния на рост экспериментальных эксплантов.

6. Влияние плазмы крови больных ХВДП на рост эксплантов скелетной мышцы.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние плазмы крови больных ХВДП и здоровых добровольцев на эксплантаты ткани скелетной мышцы в разведениях 1:30 об., 1:70 об., 1:100 об. Проведенные исследования показали, что плазма крови пациентов в разведении 1:30 ингибирует рост экспериментальных эксплантов на 12%, в 1:70 на 27% ($p < 0.05$), а в 1:100 на 21% ($p < 0.05$) (рис. 5) соответственно. Плазма крови здоровых добровольцев не оказывала влияния на рост эксплантов ткани скелетной мышцы 10-12 дневных куриных эмбрионов.

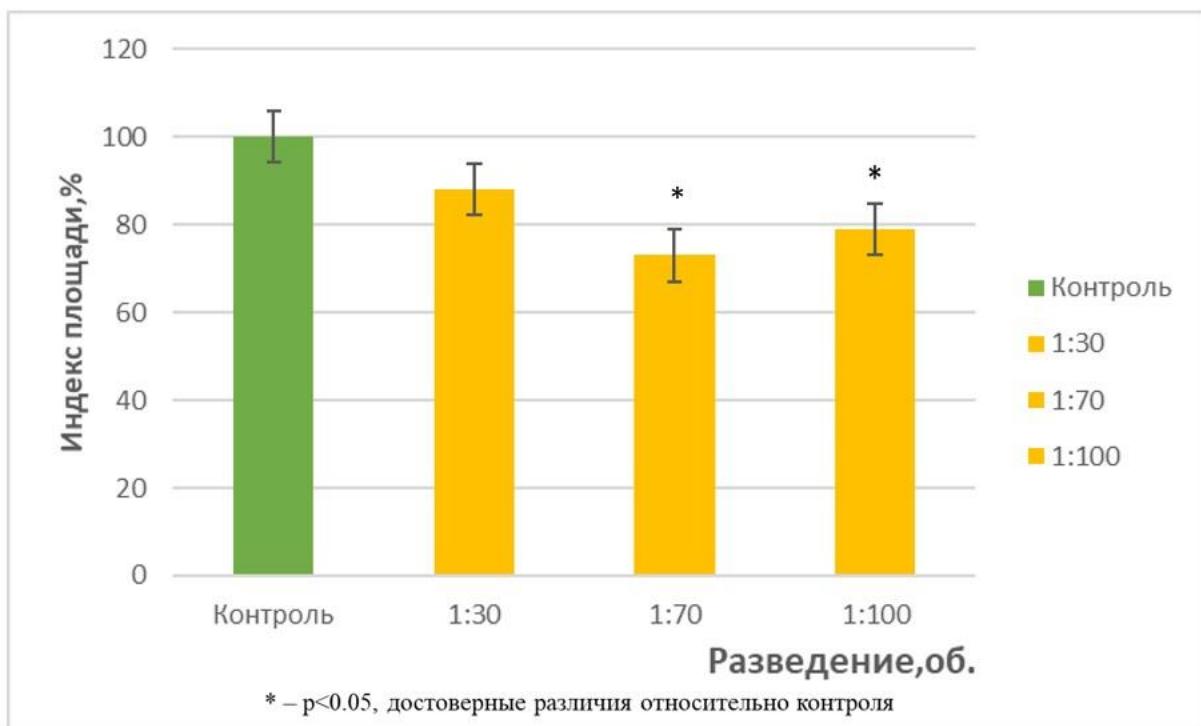
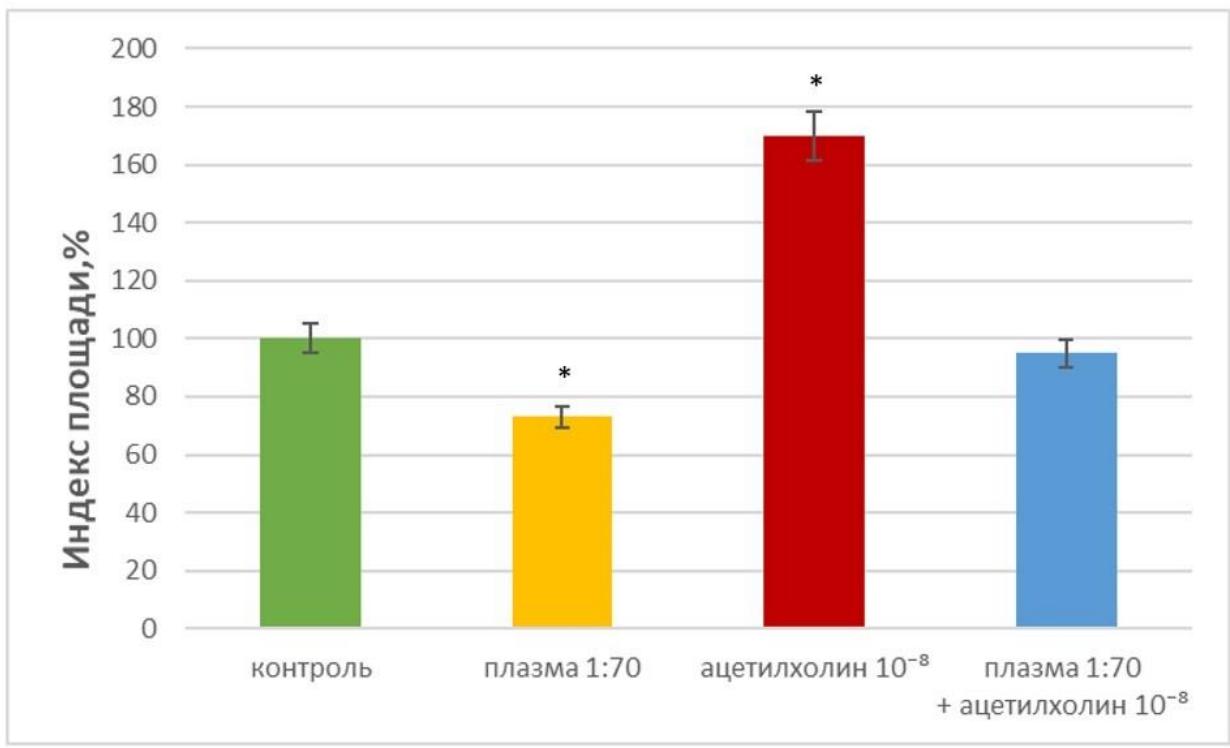


Рисунок 5. Плазма крови больных ХВДП обладает миотоксическим действием

7. Оценка вклада неквантового ацетилхолина в механизмы, препятствующие развитию ХВДП.

Для установления возможного вовлечения неквантовой холинергической регуляции в механизмы, препятствующие развитию ХВДП, эксплантаты скелетной мышцы культивировали в питательной среде, содержащей совместно ацетилхолин 10^{-8} М и плазму крови больных ХВДП в разведении 1:70. Обнаружено, что ацетилхолин в дозе, близкой к неквантовому выбросу, нивелирует миотоксический эффект плазмы крови пациентов. Индекс площади экспериментальных эксплантатов значимо не отличался от контрольного значения (рис. 6).



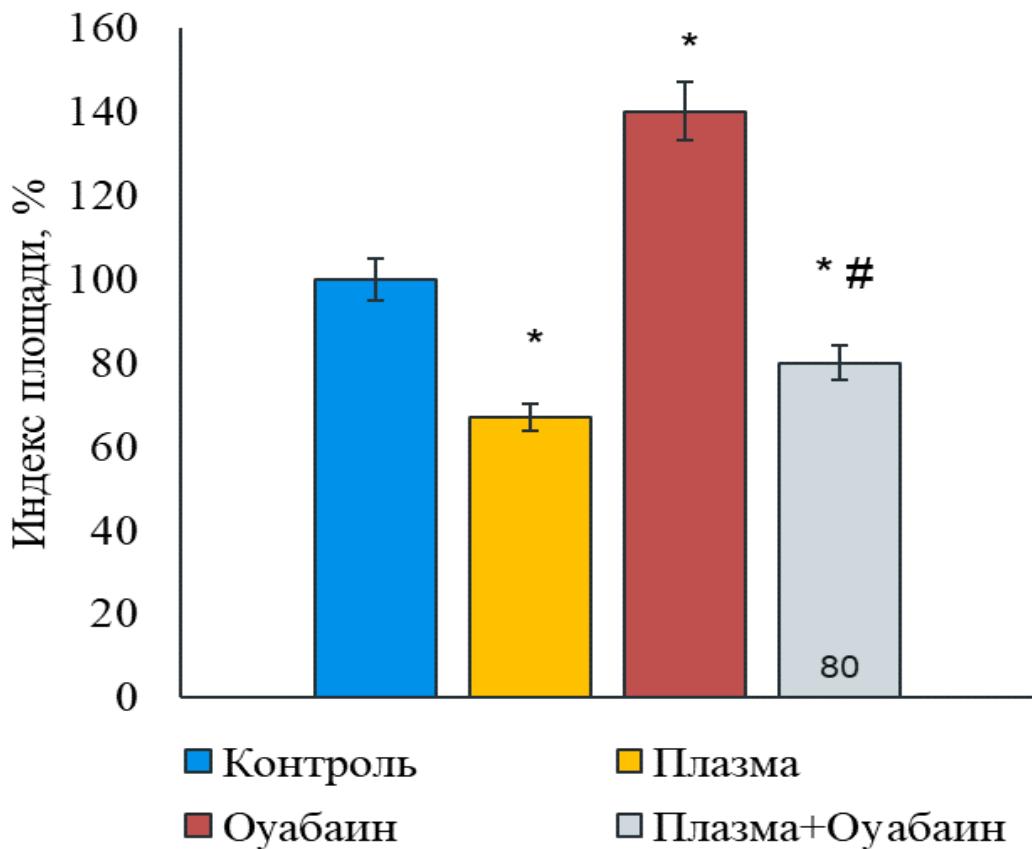
* – $p < 0.05$, достоверные различия относительно контроля

Рисунок 6. Ацетилхолин в концентрации, сопоставимой с некватновым выбросом (10^{-8} M), нивелирует миотоксический эффект плазмы крови больных ХВДП.

8. Оценка физиологической роли сигнальной функции

Na^+/K^+ -АТФазы в механизмах, препятствующих развитию ХВДП.

С целью демонстрации физиологической роли сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы в механизмах, препятствующих развитию ХВДП, в питательную среду, содержащую плазму крови больных в разведении 1:70 добавляли оуабайн в концентрации близкой к эндогенной (10^{-8} M). Оуабайн в концентрации 10^{-8} M нивелирует миотоксическое действие плазмы крови. Плазма крови больных ХВДП в разведении 1:70 ингибирует рост экспериментальных эксплантов на 27%, в то время как добавление в питательную среду плазмы крови пациентов в разведении 1:70 и оуабайна в концентрации 10^{-8} M достоверно ингибирует рост эксплантов на 20% относительно контрольных значений (рис. 7).



* – $p < 0.05$, достоверные различия относительно контроля
– $p < 0.05$, достоверные различия относительно плазмы

Рисунок 7. Оуабаин в концентрации близкой к эндогенной ($10^{-8}M$) частично нивелирует миотоксический эффект плазмы крови больных ХВДП.

9. Участие Н-холинорецепторов в миопротекторном действии неквантового ацетилхолина

С целью выявления возможного участия Н-холинорецепторов в миопротекторном действии неквантового ацетилхолина, в питательную среду, содержащую плазму крови больных в разведении 1:70 добавляли ацетилхолин в концентрации близкой к неквантовой ($10^{-8}M$) а также д-тубокуарин ($10^{-10}M$), в концентрации не оказывающей прямого эффекта на рост эксплантатов скелетной мышцы. Обнаружено, что индекс площади экспериментальных эксплантатов достоверно отличался от контрольного значения и значения индекса площади эксплантатов, культивируемых в

питательной среде, содержащей плазму и ацетилхолин (10^{-8} М) (рис.8). Однако, введение в питательную среду *d*-тубокуарина полностью не устранило миопротективное действие неквантового ацетилхолина. Индекс площади эксплантатов практически не отличался от индекса площади эксплантатов, культивируемых в среде, содержащей плазму и оуабаин в дозе 10^{-8} М (см.рис.7 и рис.8).

Полученные результаты позволяют выдвинуть предположение о том, что механизм миопротекции, запускаемый неквантовым ацетилхолином реализуется путем как прямой, так и рецептор-опосредованной (через Н-холинорецепторы) модуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы.

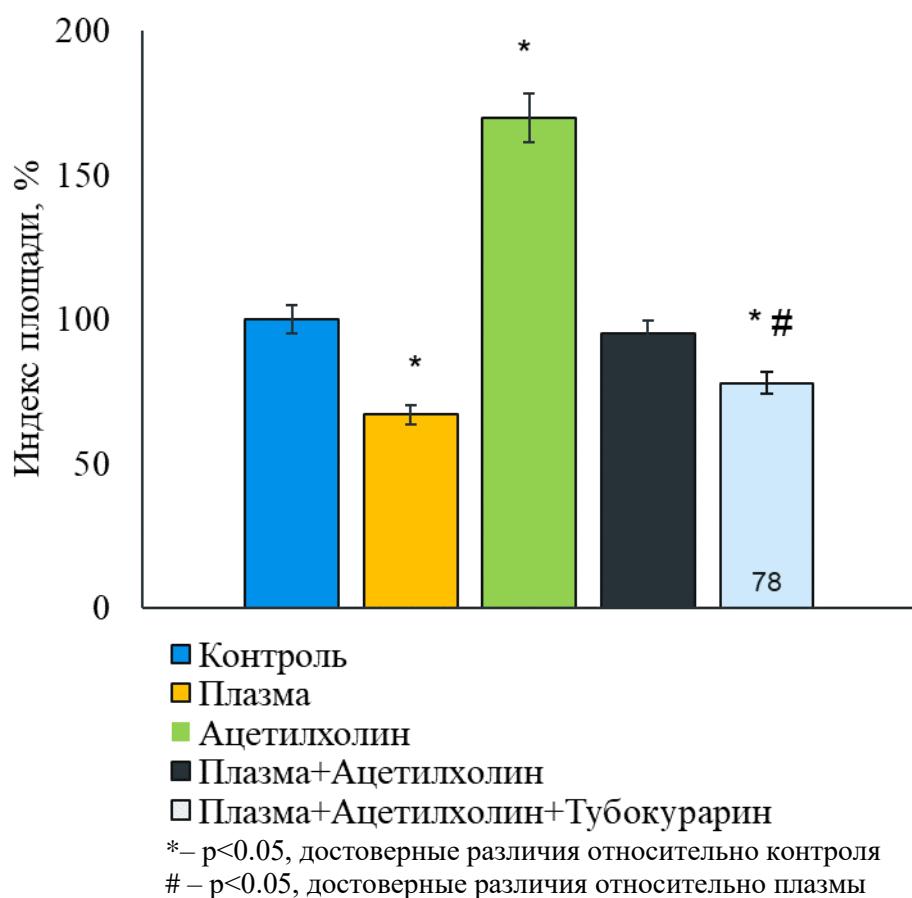


Рисунок 8. Ацетилхолин в концентрации близкой к неквантовой напрямую и рецептор-опосредованно (через Н-холинорецептор) модулирует сигнальную функцию Na^+/K^+ -АТФазы в механизме, препятствующим развитию ХВДП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют полагать, что ацетилхолин, выделяющийся в неквантовом виде не только участвует в регуляции электрогенеза на постсинаптической мемbrane, как было известно ранее, но и проявляет трофотропные свойства. В условиях органотипического культивирования ткани экспериментально доказана возможность прямой модуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы в ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов оубаином в концентрации, сопоставимой с эндогенной. Неквантовый ацетилхолин проявляет свои трофотропные свойства посредством активации сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы .

Миотоксический эффект плазмы крови пациентов с установленным диагнозом ХВДП, по-видимому, основан на наличии антител к Н-холинорецепторам.

Данные, полученные на модели ХВДП *in vitro*, свидетельствуют о том, что модуляция неквантовым АХ сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы, может быть одним из механизмов, препятствующих развитию ХВДП. Миопротекторный эффект неквантового ацетилхолина, по-видимому, реализуется прямо – через модуляцию сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы и receptor-опосредованно через ансамбль Н-холинорецептор - Na^+/K^+ -АТФаза.

Фармакологические эффекты ацетилхолина и оубаина, обнаруженные в ходе данного исследования, имеют перспективы для дальнейшего изучения и применения их в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. С помощью иммуноферментного анализа в плазме крови больных ХВДП обнаружены статистически значимые отличия уровня антител к

никотиновым холинорецепторам: $0,42 \pm 0,087$ нмоль/л у больных ХВДП и $0,02 \pm 0,004$ нмоль/л у здоровых добровольцев ($p < 0,01$).

2. Ацетилхолин и оуабайн в широком диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-10} М дозозависимо регулируют рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов. Максимальный трофотропный эффект ацетилхолин проявлял в концентрации, сопоставимой с неквантовой (10^{-8} М). оуабайн в концентрации, сопоставимой с эндогенной (10^{-8} М). Индекс площади экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на 70% и 40 % соответственно.
3. Ингибиторный анализ показал, что в условия органотипического культивирования ткани скелетной мышцы ацетилхолин в концентрации сопоставимой с неквантовой проявляет свои трофотропные свойства посредством модуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы.
4. В условиях органотипического культивирования ткани скелетной мышцы ацетилхолин в концентрации, сопоставимой с неквантовой полностью, а оуабайн в дозе 10^{-8} М частично нивелировали миотоксический эффект плазмы крови больных ХВДП в разведении 1:70.
5. Миопротекторный эффект неквантового ацетилхолина реализуется прямо за счет активации сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы. и рецептор-опосредованно за счет модуляции внутриклеточного сигнала в ансамбле Н-холинорецептор - Na^+/K^+ -АТФаза.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК

1. Гавриченко А.В., Куляхтин А.И., Яковлев А.А., Соколова М.Г., Смочилин А.Г., Федорова В.С., Гапешин Р.А. Бульбоспинальная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди): описание клинического случая. Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова. 2019;26(3):86-93.
2. Соколова М.Г., Лобзин С.В., Пеннияйнен В.А., Кипенко А.В., Лопатина Е.В., Резванцев М.В., Гавриченко А.В. Роль ростовых полипептидных соединений в механизме пластичности ЦНС у больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона, Биомедицинская химия, 2017, том: 63(5), 453-456.
3. Беденко А.С., Соколова М.Г., Сергеева Т.В., Щербук Ю.А., Бутко Д.Ю., Гавриченко А.В. Случай развития синдрома Миллера Фишера во время беременности. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2018;10(3):76-80.
4. Гапешин Р.А, Баранцевич ЕР, Руденко ДИ, Гавриченко А.В. Астения у пациентов, страдающих хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатией. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2021;13(1):51–56. DOI: 10.14412/2074-2711-2021-1-51-56.
5. Соколова М.Г., Лобзин С.В., Зуев А.А., Пустозеров В.Г., Александров Н.Ю., Гавриченко А.В. К вопросу дифференциальной диагностики мультифокальной моторной невропатии. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2020;12(1):89- 96.
6. М. Г. Соколова, Е. В. Лопатина, С. В. Лобзин, С.Н. Давиденкова, А. В. Гавриченко, А. А. Зуев, О. С. Роцина. Биотехнологический подход для обоснования дифференцированного применения нейропротективной терапии у больных наследственными нервно- мышечными заболеваниями. Медицинский алфавит №22/2020. Неврология и психиатрия (3) 2020 год. Стр. 48-51.

Публикации в журналах и материалах конференций

7. Соколова М.Г. Лопатина Е.В. Кипенко А.В. Александров Н.Ю. Гавриченко А.В. «Оценка процесса компенсаторной реиннервации у больных наследственной моторной и сенсорной полиневропатией 1А типа в клинико-экспериментальном исследовании». Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Материалы IX Всероссийского съезда неврологов и IV конгресса национальной ассоциации по борьбе с инсультом. Том 119. №5 2019 год. Стр. 523.
8. Гавриченко А.В. , Соколова М.Г. ,Александров Н.Ю., Куляхтин А.И. Клиническое наблюдение больной с делецией в гене pmp22, проявляющейся полиневропатией со склонностью к параличам от сдавления. «Болезни периферических нервов и мышц: необходимый и достаточный объем исследования» Российская научно-практическая конференция 18-19 октября 2019, Москва. Сборник тезисов. Стр. 8.
9. Лопатина Е.В. Соколова М.Г. Гавриченко А.В. «Исследование уровня нейротрофинов у детей с наследственной моторной и сенсорной полиневропатией 1А типа». Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Материалы IX Всероссийского съезда неврологов и IV конгресса национальной ассоциации по борьбе с инсультом. Санкт-Петербург. Том 119. №5 2019 год. Стр. 202.
10. Соколова М.Г., Лопатина Е.В., Пенниайнен В.А., Гавриченко А.В. Органная культура нервной ткани – тест система для изучения особенностей патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Гены и клетки. – 2017. – Т. XII, № 3 (Материалы III-го нац. конгр. по регенератив. медицине). – С. 229.
11. Гавриченко А.В. , Соколова М.Г. , Александров Н.Ю. , Лопатина Е.В. Изучение процесса спрутинга у больных наследственной моторной и сенсорной невропатией I типа в клинико-экспериментальном исследовании. Актуальные проблемы биомедицины 2018. Сборник тезисов. Стр. 64.

12. Ekaterina .Lopatina, Maria Sokolova, Valentina Penniyaynen, Anna Kipenko, Natalia Pasatetskaya , Artur Gavrichenko, Alexey Lopatin Sodium pump and its role as signal transducer in brain disorders. FENS regional Meeting. Belgrade. Serbia. July 10-13. 2019. P.124.
13. Гавриченко А.В., Климшин С.И., Пасатецкая Н.А.Участие ацетилхолина в регуляции роста эксплантатов ткани скелетной мышцы. Актуальные проблемы биомедицины 2021. Сборник тезисов. 28-29 марта 2021 г., – С. 155-156.
14. Лопатина Е.В. ,Соколова М.Г., Гавриченко А.В. , Пасатецкая Н.А. Физиологические основы лечения нервно-мышечной патологии: функциональный вклад Na/K-АТФазы. Всероссийская конференция с международным участием «Интегративная физиология», посвященная 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Сборник тезисов. Стр. 155-156.
15. Гавриченко А. В. , Лопатина Е. В. , Соколова М.Г Сопоставление нейрофизиологических и лабораторных данных при изучении активного аутоиммунного процесса у больных хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатией. Боткинские чтения 2021. Сборник тезисов. Стр. 56.
16. Гавриченко А.В. Определение мозгового нейротрофического фактора у больных хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатией. Алмазовский молодежный медицинский форум — 2021. Сборник тезисов. Стр. 179.
17. Лопатина Е.В., Гавриченко А.В., Пасатецкая Н.А., Соколова М.Г. Трофотропный эффект неквантового ацетилхолина в норме и на модели хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии V Российский симпозиум с международным участием. Клеточная сигнализация: итоги и перспективы Cell signaling: conclusions and perspectives 14-17 сентября 2021 г. Казань Сборник тезисов С.57-59..