На правах рукописи

Гавриченко Артур Владимирович

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ НЕКВАНТОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНА В МЕХАНИЗМАХ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИХ ПРОГРЕССИРОВАНИЮ ХРОНИЧЕСКОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩЕЙ ПОЛИНЕВРОПАТИИ.

1.5.5 – физиология человека и животных
3.1.24 – неврология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Е.В. Лопатина;
доктор медицинских наук, доцент
М.Г. Соколова.

Санкт-Петербург
2022

Работа выполнена в лаборатории физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук.

Научные руководители:

Лопатина Екатерина Валентиновна, доктор биологических наук, доцент

Соколова Мария Георгиевна, доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Маломуж Артем Иванович, кандидат биологических наук, Казанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН», лаборатория биофизики синаптических процессов, старший научный сотрудник

Скрипченко Наталья Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по научной работе

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2022 г. в __ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций 24.1.137.01 (Д002.020.01) при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте http://www.infran.ru/

Автореферат разослан «___» _____ 2022

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
доктор биологических наук Ордян Наталья Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности.

Иннервация скелетной мышцы необходима для осуществления ее функции. Разрушение нервно-мышечного синапса приводит к падению мембранного потенциала мышечного волокна, ионному дисбалансу и атрофии мышцы. Ацетилхолин (АХ) – главный нейромедиатор в нервно-мышечном соединении, способный выделяться в синаптическую щель из двигательной нервной терминали не только в виде порций (квантов), но и в «неквантовой» форме (активное тоническое выделение молекул) (Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., 2018). И если в случае квантового выделения АХ концентрация его в синаптической щели способна достигать сотен мкмоль/л, то в случае неквантового освобождения концентрация сигнальной молекулы в синапсе поддерживается на наномолярном уровне (Mitchell J.F., Silver A., 1963). Вклад «неквантового» АХ в модуляцию нервно-мышечной передачи изучен достаточно подробно (Nikolsky E.E. et al., 1996; Krivoi I.I. et al., 2006; Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., 2018). В 2020 году вышла работа, свидетельствующая о том, что АХ, взаимодействуя с никотиновым холинорецептором (НХР) вызывает не только деполяризацию мышечного волокна, но и обеспечивает трофический сигнал, предотвращающий механизмы коннексин-опосредованной мышечной атрофии (Cisterna B.A., Vargas A.A., 2020).

Подробные механизмы холинергической миопротекции изучены не в полном объеме. Значительный интерес представляют трофические изменения, в основе которых лежит модуляция функциональной и структурной связи НХР с трансмембранными насосными системами, в частности Na^+/K^+-АТФазой (Elfman G.I. et al., 1982). В опытах на френико-диафрагмальном препарате крысы было обнаружено, что «неквантовый» АХ повышает работоспособность непрерывно утомляемой скелетной мышцы. Фармакологический анализ показал, что данный эффект не связан с действием медиатора на НХР, а опосредован влиянием на Na^+/K^+-АТФазу (Kubasov I.V., 1994; Матюшкин Д.П. и др., 1999; Кривой И.И. и др., 2001; Кривой И.И. и др., 2006). Важнейшей группой природных регуляторов как насосной, так и сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы являются сердечные гликозиды и эндогенные дигиталисоподобные факторы. Продемонстрирована роль сигнальной функции Na+/K+-АТФазы в регулировании роста ткани сердца, сетчатки, сенсорных нейронов (Лопатина Е.В. и др., 2005; Lopatina E.V. et al., 2016; Пенниайнен, В.А. и др., 2005; Лопатина Е.В. и др., 2008). Вклад сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы и дигиталисоподобных факторов в регулирование трофических процессов скелетной мышцы не изучен (Hamlyn J.M. et al., 1991; Schoner W., Scheiner-Bobis G., 2007).

Ряд заболеваний нервной системы связан с аутоиммунным процессом (Завалишин И.А., Пирадов М.А., 2014). Патологический процесс может затрагивать все звенья

периферического нервно-мышечного аппарата: альфа-мотонейрон, нерв, нервно-мышечный синапс, мышечное волокно. Общим в развитии всех аутоиммунных заболеваний нервной системы является наличие антител к тем или иным ее структурам. К аутоиммунным болезням периферических нервов относится и хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия (ХВДП) - заболевание, характеризующееся двигательными и чувствительными расстройствами, развитием мышечных атрофий, имеющее хроническое и рецидивирующее течение, приводящее к длительной нетрудоспособности и инвалидизации больных (Mahdi-Rogers M., Hughes R.I.C., 2014). Известны как функциональные, так и морфологические изменения в скелетных мышцах при ХВДП (Hokkoku K. et al., 2017; Markvardsen L.K. et al., 2019; Gilmorea K.J. et al., 2020(1)). Так по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) мышц у пациентов с ХВДП наблюдается значительное уменьшение объема мышц голеней и бедер (Gilmorea K.J et al., 2020(1,2)). Имеются данные о том, что в поддержание трофических свойств скелетных мышц вносит вклад холинергическая регуляция в нервно-мышечном синапсе (Cisterna, B. A. 2020).

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

Цель исследования. Оценить роль «неквантового» ацетилхолина в механизмах, препятствующих развитию миопатического процесса на модели мышечного компонента ХВДП *in vitro.*

Задачи исследования:

1. Провести клинико-инструментальное обследование пациентов и здоровых добровольцев (неврологический осмотр, забор венозной крови, лабораторные исследования, выполнение ЭНМГ, ЭМГ). Сформулировать критерии включения пациентов и здоровых добровольцев в экспериментальную и контрольную группу.

2. Оценить уровень антител к НХР в плазме крови участников исследования.

3. Разработать методику органотипического культивирования ткани скелетной мышцы и модель миопатического компонента ХВДП *in vitro*.

4. В условиях органотипического культивирования ткани скелетной мышцы оценить трофотропные эффекты АХ и оуабаина в норме и на модели миопатического компонента ХВДП.

5. С помощью фармакологического анализа в опытах *in vitro* изучить вклад НХР и сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы в механизмы, препятствующие развитию миопатического процесса при ХВДП.

Научная новизна. В работе впервые зарегистрировано статистически значимое отличие уровня антител к НХР в плазме крови больных ХВДП и здоровых добровольцев.

Впервые разработана методика органотипического культивирования ткани скелетной мышцы и модель мышечного компонента ХВДП *in vitro*. В качестве объекта для данной методики была выбрана скелетная мышечная ткань 10-12 дневных куриных эмбрионов. С использованием данного экспериментального подхода были выявлены и описаны концентрационно-зависимые эффекты АХ и оуабаина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы. Максимальный миостимулирующий эффект АХ проявил в концентрации, сопоставимой с той, которая достигается в синаптической щели при его неквантовом выделении, а именно - 10^{-8} М. Индекс площади экспериментальных эксплантатов в данном случае был выше контрольного значения на 70% ($p<0,05$). Оуабаин, в свою очередь, обнаружил трофотропный эффект в концентрациях, сопоставимых с эндогенными - 10^{-8} - 10^{-10} М. Индекс площади экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на 40 % и 20%, соответственно. В диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-6} М зарегистрирован миотоксический эффект оуабаина. Фармакологический анализ показал, что трофотропный эффект АХ в наномолярных концентрациях основан на модуляции сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы при участии НХР.

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

В опытах *in vitro* на модели мышечного компонента ХВДП с помощью фармакологического анализа доказан положительный вклад «неквантового» АХ в механизмы, препятствующие развитию мышечных атрофий при ХВДП.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены экспериментальные доказательства, свидетельствующие о наличии трофотропных свойств у АХ в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом. Показано, что эти свойства медиатора 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» АХ ансамбля: НХР - Na^+/K^+-АТФаза, обсуждая вопрос о возможности прямой и рецептор опосредованной модуляции сигнальной функции фермента АХ в наномолярных концентрациях. Полученные результаты существенно расширяют имеющиеся представления о функционировании Na^+/K^+-АТФазы в качестве трансдуктора сигнала в скелетной мышце.

Разработанная оригинальная авторская методика органотипического культивирования мышечной ткани и модель мышечного компонента ХВДП *in vitro* могут быть использованы для тестирования лекарственных препаратов, регулирующих трофику мышечной ткани.

Обнаруженные достоверные отличия в уровне антител к НХР в плазме крови больных ХВДП и здоровых добровольцев доказывают серьезный вклад холинергической регуляции в формирование мышечной атрофии у больных.

Результаты клинико-экспериментального исследования 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:

В плазме крови больных ХВДП и здоровых добровольцев есть существенные различия по уровню антител к НХР.

Плазма крови больных ХВДП может проявлять миотоксические свойства и ингибирует рост эксплантатов ткани скелетной мышцы.

АХ и оуабаин дозозависимо регулируют рост эксплантатов ткани скелетной мышцы.

АХ в концентрации, сопоставимой с неквантовой, проявляет трофотропные свойства, регулируя рост эксплантатов ткани скелетной мышцы посредством модуляции сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы.

АХ в концентрации, сопоставимой с неквантовой, нивелирует миотоксический эффект плазмы крови больных ХВДП за счет модуляции сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы как прямо, так и рецептор опосредовано.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач проведено комплексное клинико-экспериментальное исследование. Клиническая часть работы включала клинико-неврологический, нейрофизиологический (электронейромиография (ЭНМГ), электромиография (ЭМГ)), лабораторный методы обследования. Клинико-неврологическое обследование проводили по общепринятому протоколу с учетом особенностей сбора анамнеза и оценки неврологического статуса у пациентов с полиневропатией (Левин О.С., 2016; Скромец А.А., 2017). Трофические свойства фармакологических веществ и плазмы крови участников исследования изучали в условиях органотипического культивирования ткани скелетной мышцы. Для проведения лабораторных и экспериментальных исследований у больных производили забор венозной крови натощак в утренние часы в объеме 5 мл. Стимуляционную электронейромиографию (ЭНМГ) выполняли по общепринятому международному протоколу обследования больных с подозрением на ХВДП (EFNS/PNS) (Van den Bergh P.Y.K. et al., 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 степень изменения процессов клеточного роста и пролиферации в плоскости.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов, обусловлена строгим соблюдением диагностических критериев EFNS/PNS 2010, стандартизацией условий культивирования мышечной ткани, анализом значительного фактического клинического и экспериментального материала, а также 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 Инессы Бенедиктовны Козловской «Новые подходы к изучению проблем физиологии экстремальных состояний» (Москва, 2021); V Российском симпозиуме с международным участием «Клеточная сигнализация: итоги и перспективы» (Казань, 2021); Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, 2021).

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.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 111 машинописных страницах, состоит из списка сокращений, введения и четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждение результатов), заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация содержит 10 таблиц и 17 рисунков. Библиографический список включает 46 работ отечественных и 135 зарубежных авторов.

Клиническая часть работы выполнена в отделении неврологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный Государственный Медицинский Университет имени И.И. Мечникова» МЗ РФ и отделении неврологии №2 ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ. Экспериментальная часть работы выполнена в лаборатории физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем

Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Исследования выполнены в рамках Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019-2030), тема 0134-2019-0001.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клинико-неврологический метод

Клинико-неврологическое исследование проводили по общепринятому протоколу с учетом особенностей сбора анамнеза и оценки неврологического статуса у пациентов с полиневропатией (Левин О.С.,2016; Скоромец А.А. и др., 2017). Оценивали жалобы пациентов, данные анамнеза (возраст дебюта заболевания, сопутствующая патология и неврологического статуса. Инвалидизацию пациентов оценивали по шкале ODSS INCAT. Тяжесть состояния пациентов оценивали по Шкале невропатических нарушений (Neuropathy Impairment Scale, NIS) (Dyck P.J. et. al., 1997). Мышечную силу оценивали по пятибальной шкале мышечной силы (Medical Research Council Weakness Scale – MRC).

Анамнестические сведения пациентов подтверждали данными соответствующих документов из других медицинских учреждений и фиксировали в карте стационарного пациента.

Пациенты, которым в ходе клинико-инструментального и лабораторного обследования был подтвержден диагноз ХВДП (диагноз достоверный по критериям EFNS/PNS от 2010 года) были включены в экспериментальное исследование. Пациенты, у которых в ходе клинико-лабораторного исследования диагноз ХВДП не был подтвержден, были исключены из экспериментального исследования.

Лабораторный метод

Для проведения лабораторных и экспериментальных исследований у больных производили забор венозной крови натощак в утренние часы в объеме 5 мл. Венозную кровь центрифугировали (лабораторная центрифуга «Армед» LC-04A) с частотой вращения 2500 об/мин в течение 10 мин для получения плазмы крови. Лабораторно в плазме крови исследовали уровни гемоглобина (г/л), лейкоцитов (х10^9/л), тромбоцитов (х10^9/л), скорости оседания эритроцитов (СОЭ) (мм/ч), С-реактивного белка (СРБ) (мг/л), общего белка (г/л), уровень глюкозы (ммоль/л), уровни креатинфосфокиназы (КФК) (ЕД/л), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (ЕД/л). Пациентам проводили люмбальную пункцию по общепринятому протоколу с последующим анализом цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) (белок (г/л), цитоз). Методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих иммуноферментных наборов (ELISA Kit) фирмы RayBiotech, Inc. в соответствии с инструкциями производителя в плазме крови больных ХВДП и здоровых

добровольцев определяли уровень антител к никотиновым холинорецепторам (нмоль/л). Пороговая величина определения 0,01 нмоль/л.

Нейрофизиологический метод

Стимуляционную электронейромиографию (ЭНМГ) выполняли согласно международному протоколу нейрофизиологического обследования больных ХВДП (EFNS/PNS 2010). Вначале исследование проводили на одной половине тела, анализировали 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 (Van den Bergh, R.D.M. et al. 2010; Супонева Н. А., и др. 2016). Для выявления типичных нейрофизиологических паттернов демиелинизации исследовали следующие нейрофизиологические характеристики: скорость распространения импульса (СПИ) по моторным и сенсорным волокнам (м/сек), дистальная латентность М-ответа (мсек), латентность F-волн (мсек), темпоральная дисперсия М-ответа - увеличение длительности проксимального М-ответа к дистальному на более чем на 30% (качественная оценка - есть, нет), наличие блоков проведения по моторным волокнам - снижение амплитуды проксимального М-ответа по сравнению с дистальным на более чем на 50 % (качественная оценка – есть, нет).

Первоначальный протокол нейрофизиологического обследования пациента с подозрением на ХВДП включает 4 двигательных нерва. Однако чувствительность международных критериев можно повысить путем расширения объема исследования до 5 и более двигательных нервов, а также анализа сенсорных ответов и коротких ветвей плечевого сплетения. Следует отметить, что в диагностике ХВДП, выполнение игольчатой электромиографии (ЭМГ) не является обязательным (Супонева Н. А., и др. 2016).

Игольчатую ЭМГ выполняли для выявления денервационно-реиннервационного процесса. Исследование включало оценку следующих показателей: спонтанной активности (качественная оценка - есть, нет), увеличение длительности ПДЕ (мсек), наличие высокоамплитудных ПДЕ (качественная оценка - есть, нет), сниженное рекрутирование ПДЕ (качественная оценка – есть, нет). Для выявления признаков реиннервации определяли наличие полифазных ПДЕ (качественная оценка – есть, нет). В анализ вошла мышечная группа: *m. tibialis anterior, m. gastrocnemius, m. quadriceps femoris (caput lat.), m. interosseus dorsalis I, m. brahioradialis*.

Метод органотипической культуры ткани

В настоящем исследовании разработаны модели органотипического культивирования ткани скелетной мышцы и мышечного компонента ХВДП *in vitro*. Термин миопатический или мышечный компонент ХВДП описывает состояние первично-мышечного повреждения

скелетной мышцы, которым, согласно нашей рабочей гипотезе, может сопровождаться развитие ХВДП *in vivo*. Объектами исследования являлись культивируемые эксплантаты ткани скелетной мышцы голени 10-12-дневных куриных эмбрионов. Эксплантаты размером 0.5-1 мм помещали в отдельные стерильные чашки Петри диаметром 40 мм на коллагеновую подложку. Каждая чашка Петри содержала 20 эксплантатов ткани скелетной исследуемой ткани. Для прикрепления эксплантатов к коллагеновой подложке чашки Петри помещали в термостат при температуре 37^0 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 ципрофлоксацина (2 мг/мл). Затем чашки ставили в термостат на 30 минут, далее в них добавляли исследуемые вещества (ацетилхолин, оуабаин, d-тубокурарина 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 37^0 С и 5% CO_2 в течение 72 часов в CO_2 инкубаторе («Binder», Германия). Через трое суток культивирования чашки Петри извлекали из CO_2 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

ХВДП (диагноз достоверный по критериям EFNS\PNS 2010) была подтверждена у 32 пациентов (мужчин 20, женщин 12). Средний возраст больных 54 года (от 36 до 66 лет). Длительность заболевания пациентов на момент осмотра составила от 1 до 10 лет (среднее время 3,4 года, средний возраст начала заболевания 51 год.).

При неврологическом обследовании у больных ХВДП были выявлены следующие неврологические синдромы: синдром двигательных расстройств по полиневритическому

типу (96,8%), синдром чувствительных расстройств по полиневритическому типу (86,8%), атактический синдром (77,5%), синдром экстрапирамидных нарушений гиперкинетического типа (43,6%), астено-невротический синдром (29,7), невропатия тройничного нерва (15,5%), цефалгический синдром (12,4%). По шкале инвалидизации ODSS INCAT в руках медиана составила 2 балла: у пациентов выявлялись умеренные нарушения в одной или двух руках, нарушающие любую из базовых функций (одевание одежды верхней части тела, мытье и расчесывание волос, поворот ключа в замке, пользование столовыми приборами), но выполнение функции сохранено. В ногах медиана составила 3 балла: обследованным больным требовалось использование вспомогательных средств опоры с одной стороны при ходьбе на 10 м (25 шагов) и более. По Шкале невропатических нарушений (NIS - Neuropathy Impairment Score) средний балл пациентов составил 30,5 балла.

По результатам лабораторного исследования плазмы крови больных ХВДП выявлено: среднее значение уровня гемоглобина составило 138 г/л; лейкоцитов 4×10^9/л; тромбоцитов 255×10^9/л; СОЭ 7 мм/ч; СРБ 6 мг/л; общего белка 70,7 г/л; глюкозы 5,2 ммоль/л, КФК 129 ЕД/л, ЛДГ 301 ЕД/л. По результатам лабораторного исследования ЦСЖ пациентов средний уровень белка составил 704 г/л, средний уровень цитоза 4 кл/мкл.

Уровень антител к НХР в сыворотке крови пациентов и здоровых добровольцев оценивали с помощью ИФА. Обнаружено, что уровень антител к данным рецепторам в сыворотке крови больных ХВДП (0,47±0,087 нмоль/л) статистически выше, чем в контрольной группе здоровых добровольцев (0,02±0,004 нмоль/л) ($p<0,01$). Уровень антител к НХР в сыворотке крови группы контроля варьировал от 0 нмоль/л до 0,09 нмоль/л, в то время как у пациентов с ХВДП был в интервале от 0,1 нмоль/л до 1,8 нмоль/л

В ходе нейрофизиологического обследования у пациентов с ХВДП были выявлены типичные признаки демиелинизации нервного волокна. В наибольшей степени в демиелинизирующий процесс были вовлечены моторные волокна малоберцовых (93%), большеберцовых (83,7%) и срединных (74,4%) нервов. Игольчатая ЭМГ выявила денервационные изменения у 93% пациентов в следующих мышцах: m. tibialis anterior (62%), m. gastrocnemius (37,2%), m. quadriceps femoris (caput lat.) (21,7%), m. interosseus dorsalis I (12,4%), m. brahioradialis (9,3%).

На основании соответствующих результатов клинического, лабораторного и нейрофизиологического обследования в ходе проведения дифференциальной диагностики из исследования были исключены пациенты с подтвержденными диагнозами: бульбоспинальная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди) (n=2), последствие перенесенной острой воспалительной демиелинизирующей полиневропатии (синдром Гийена-Барре) (n=1), синдром Миллера-Фишера (n=1), наследственная моторно-сенсорная полиневропатия 1А

типа (n=1), мультифокальная моторная полиневропатия (n=1) (Соколова М.Г. и др., 2020; Беденко А.С. и др., 2018 ; Гавриченко А.В. и др., 2019).

2.Данные экспериментального исследования

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

Влияние АХ на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы исследовали в диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-10} М. Добавление в питательную среду АХ в концентрации 10^{-10}М стимулировало рост эксплантатов ткани скелетной мышцы на 56% по сравнению с контрольным значением ($p<0,05$). Максимальный трофотропный эффект АХ проявил в концентрации 10^{-8} М: индекс площади экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на 70% ($p<0,05$). В концентрации 10^{-6} М АХ на рост экспериментальных эксплантатов не влиял. В дозе 10^{-4} М АХ ингибировал рост мышечной ткани на 35% ($p <0,05$) Действие АХ, направленное на регуляцию роста эксплантатов ткани скелетной мышцы, зависело от его дозы (рисунок 1). Впервые в прямых экспериментах обнаружен миостимулирующий эффект АХ в концентрациях, сопоставимых с его неквантовым выбросом.

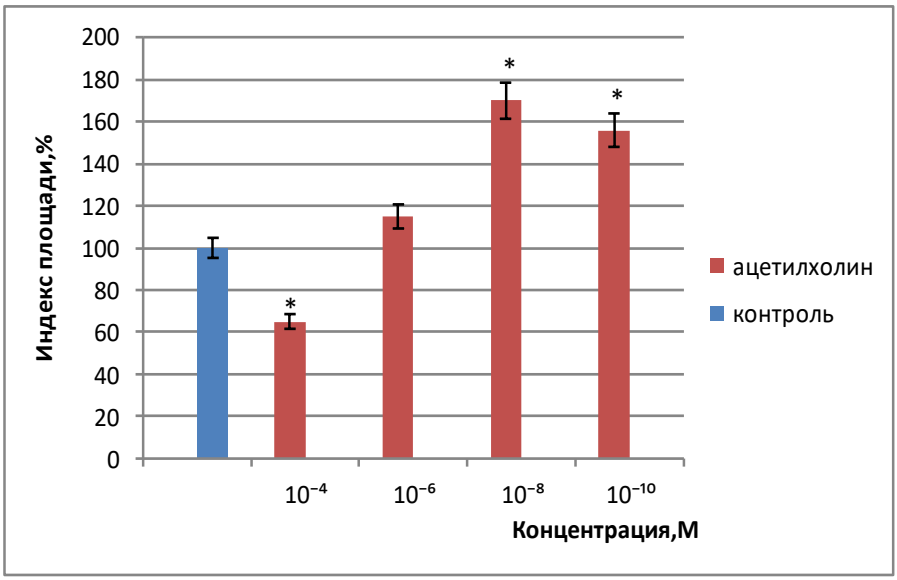

Рисунок 1. Ацетилхолин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани скелетной мышцы.
*– $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля.

2.2. Влияние оуабаина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов

Для того, чтобы оценить участие сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани скелетной мышцы была проведена отдельная серия экспериментов, в которой анализировали эффект оуабаина в диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-10} М. В концентрации 10^{-4} оуабаин практически полностью ингибировал рост экспериментальных эксплантатов. В концентрации 10^{-6} М препарат также проявил миотоксический эффект и индекс площади экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на 50%

($p<0,05$). Максимальный трофотропный эффект препарат обнаружил в концентрации 10^{-8} М: индекс площади экспериментальных эксплантатов был выше контрольных значений на 40% ($p<0,05$). В концентрации 10^{-10}М оуабаин стимулировал рост эксплантатов исследуемой ткани на 20% ($p<0,05$) (рисунок 2). Действие оуабаина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы было дозозависимым. В концентрациях, сопоставимых с эндогенными, гликозид обнаружил миостимулирующий эффект. Таким образом, были получены экспериментальные доказательства участия Na^+/K^+-АТФазы в качестве трансдуктора сигнала в регуляции роста эксплантатов ткани скелетной мышцы.

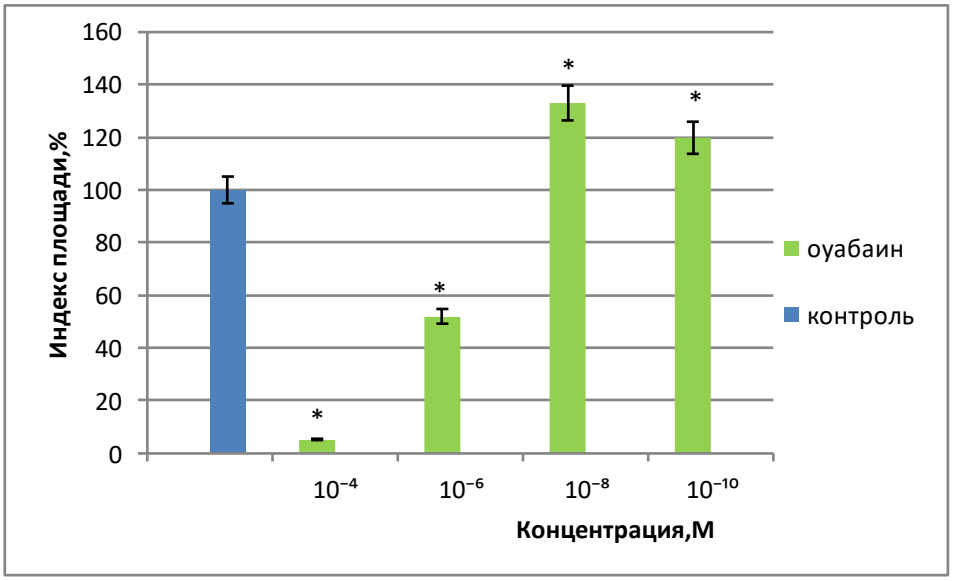

Рисунок 2. Оуабаин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани скелетной мышцы. *– $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля.

2.3. Участие неквантово выдеяемого ацетилхолина в модуляции сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы

Для установления возможности регуляции сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы АХ в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом, была поставлена отдельная серия экспериментов. Эксплантаты скелетной мышцы культивировали в питательной среде, содержащей совместно АХ 10^{-8} М и оуабаин 10^{-6} М. Обнаружено, что АХ нивелирует миотоксический эффект оуабаина. Индексы площади экспериментальных эксплантатов значимо не отличались от контрольных значений (рисунок 3).

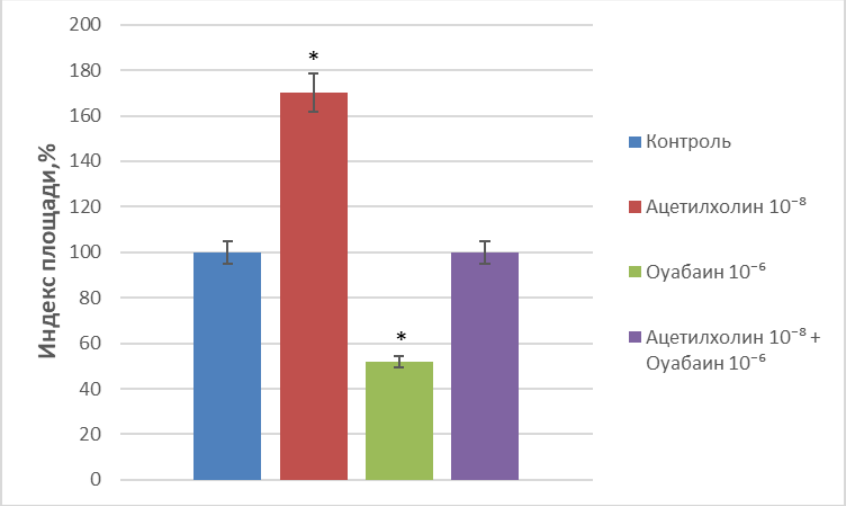

Рисунок 3. Ацетилхолин в концентрации 10^{-8} М нивелирует миотоксический эффект оуабаина (10^{-6} М). *– $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля.

2.4. Влияние d-тубокурарина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов

Для того, чтобы оценить вклад НХР в обнаруженный нами трофотропный эффект АХ провели серию экспериментов с использованием блокатора этих рецепторов d-тубокурарина. В концентрациях 10^{-6} М и 10^{-8} М препарат достоверно ингибировал рост эксплантатов ткани скелетной мышцы на 37% ($p < 0,05$). В концентрации 10^{-10} М d-тубокурарин не влиял на рост экспериментальных эксплантатов, индексы площади экспериментальных эксплантатов значимо не отличались от контрольных значений (рисунок 4).

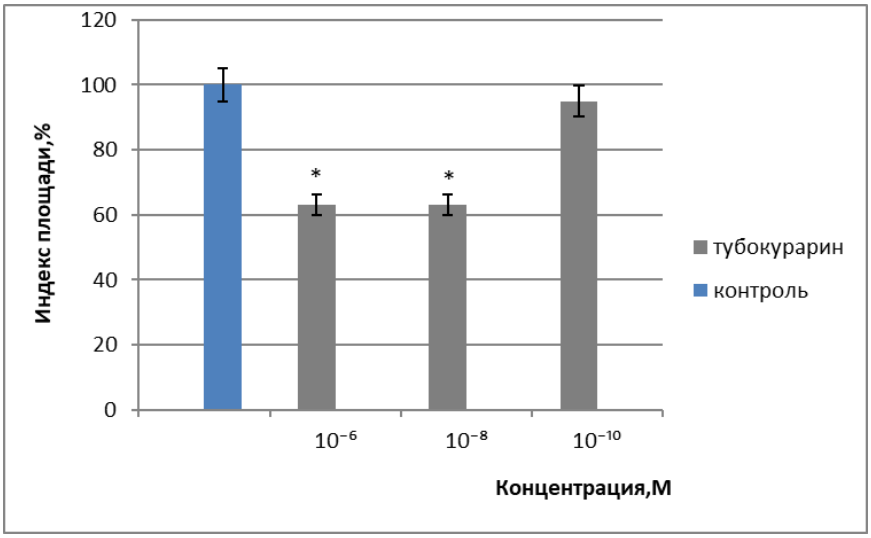

Рисунок 4. Влияние d-тубокурарина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.
*– $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля.

2.5. Механизм трофотропного действия «неквантового» ацетилхолина в норме

С целью определения механизма миостимулирующего действия «неквантового» АХ в питательную среду, содержащую АХ (10^{-8} М), оуабаин в ингибирующей концентрации (10^{-6} М) добавляли d-тубокурарин в дозе 10^{-10} М. При добавлении в питательную среду d-тубокурарина, АХ (10^{-8}М) полностью не устранял ингибирующее действие оуабаина (10^{-6}М). Индексы площади экспериментальных эксплантатов были достоверно ниже контрольных значений ($p<0.05$). Данная серия экспериментов демонстрирует, что АХ в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом, неспособен проявлять свои трофостимулирующие свойства в условиях одновременного ингибирования НХР и Na^+/K^+-АТФазы (Рисунок.5).

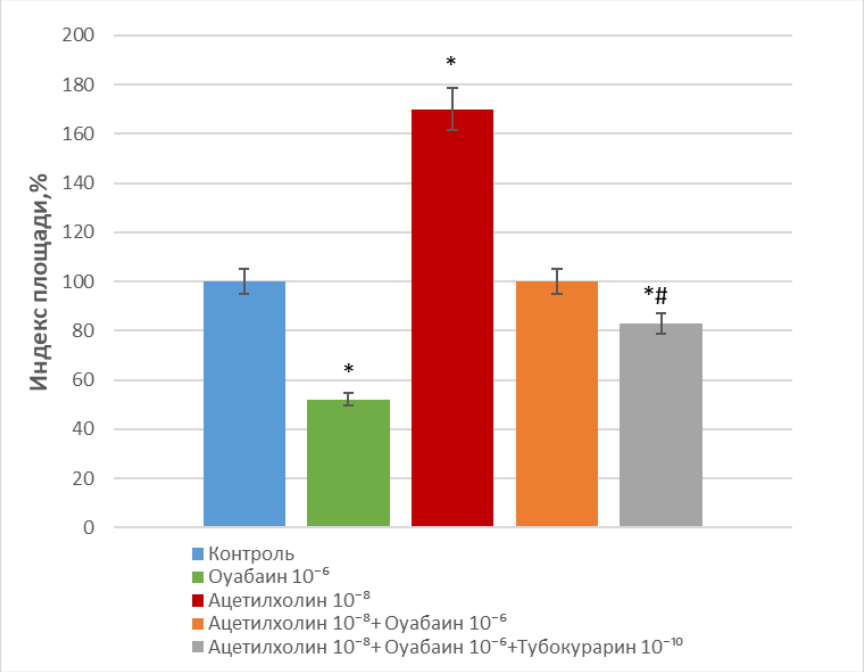

Рисунок 5. В условиях одновременного ингибирования НХР и Na^+/K^+-АТФазы трофотропный эффект ацетилхолина в концентрации 10^{-8} М отсутствует.
* – p<0.05, достоверные различия относительно контроля,
# – p<0.05, достоверные различия относительно оуабаина.

2.6. Влияние плазмы крови участников исследования на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы

В следующей серии экспериментов исследовали влияние плазмы крови больных ХВДП и здоровых добровольцев на рост эксплантатов 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 ингибировала рост экспериментальных эксплантатов на 12%, в 1:70 на 33% (p <0,05), а в 1:100 на 21% (p <0,05) соответственно (рисунок 6). Плазма крови здоровых добровольцев на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12 дневных куриных эмбрионов не влияла.

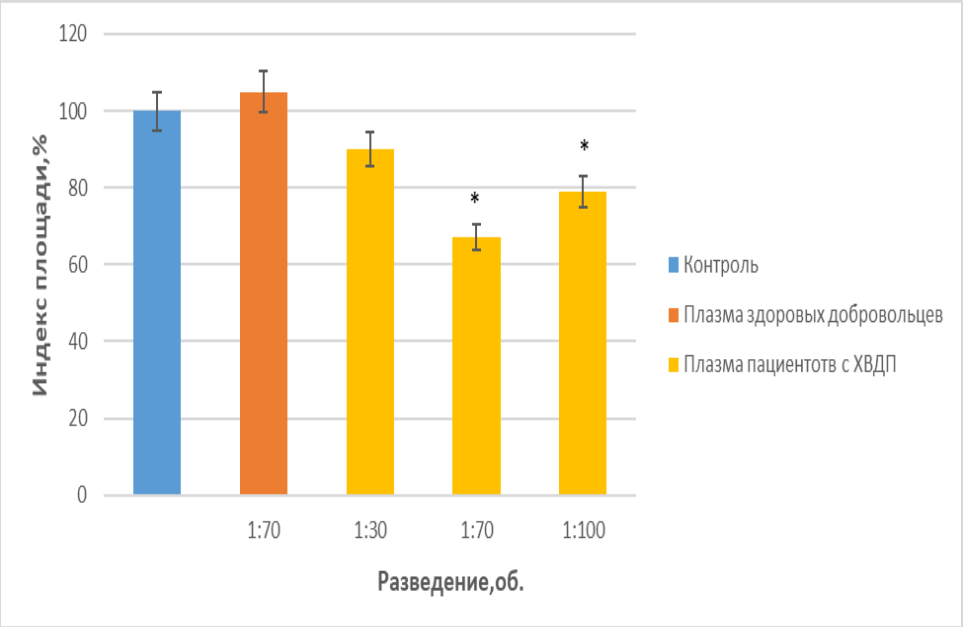

Рисунок 6. Миотоксическое действие плазмы крови пациентов с ХВДП.
* – p<0.05, достоверные различия относительно контроля.

2.7. Вклад «неквантового» ацетилхолина в механизмы, препятствующие развитию мышечного компонента хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии

Для установления возможного вовлечения холинергической регуляции в механизмы, препятствующие развитию мышечного компонента ХВДП, эксплантаты скелетной мышцы культивировали в питательной среде, содержащей совместно АХ 10^{-8} М и плазму крови больных ХВДП в разведении 1:70. Обнаружено, что АХ в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом, нивелирует миотоксический эффект плазмы крови пациентов. Индексы площади экспериментальных эксплантатов значимо не отличались от контрольных значений (рисунок 7).

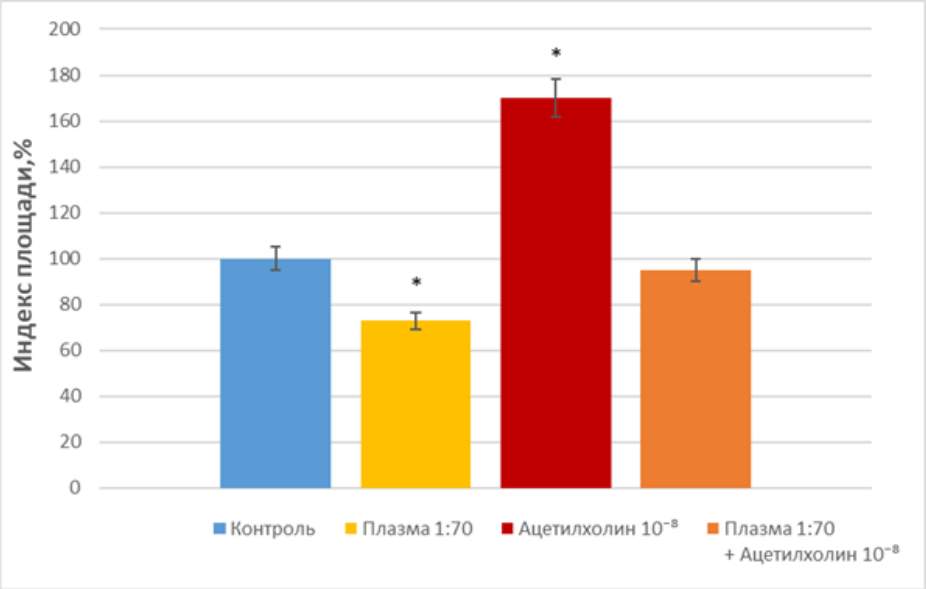

Рисунок 7. Ацетилхолин в концентрации 10^{-8} М нивелирует миотоксический эффект плазмы крови больных ХВДП.
*– $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля.

2.8. Оценка физиологической роли сигнальной функции Na^+/K^+ АТФазы в механизмах, препятствующих развитию мышечного компонента хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии, модель *in vitro*

С целью изучения возможной роли сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы в механизмах, препятствующих развитию мышечного компонента ХВДП, в питательную среду, содержащую плазму крови больных в разведении 1:70 добавляли оуабаин в концентрации 10^{-8}М. Проведенные исследования показали, что плазма крови больных ХВДП в разведении 1:70 ингибирует рост экспериментальных эксплантатов на 33%, в то время как добавление в питательную среду плазмы крови пациентов в разведении 1:70 и оуабаина в концентрации 10^{-8}М достоверно ингибировало рост эксплантатов на 20% относительно контрольных значений (рисунок 8).

Таким образом, обнаружено, что оуабаин частично нивелирует миотоксический эффект плазмы крови пациентов. Последнее прямо свидетельствует об участии Na^+/K^+-АТФазы в механизме, препятствующем развитию мышечного компонента ХВДП.

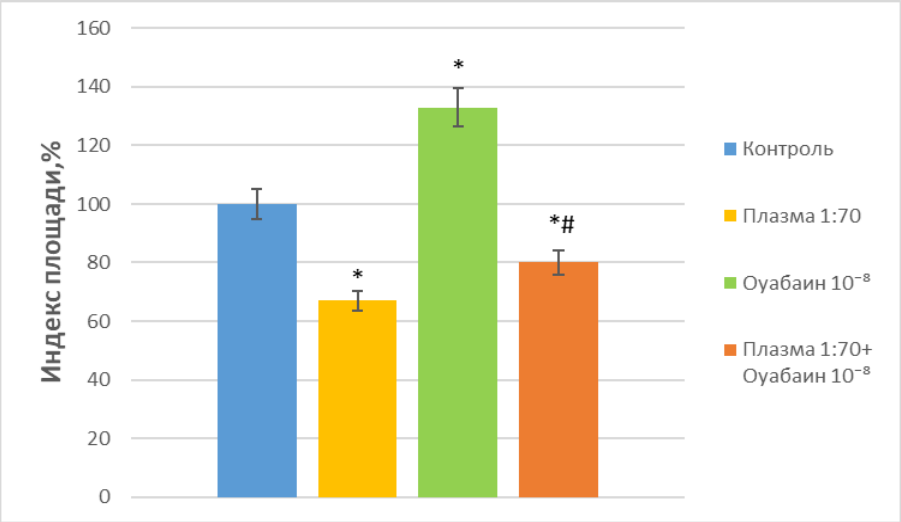

Рисунок 8. Na^+/K^+-АТФаза участвует в механизме, препятствующем развитию мышечного компонента ХВДП.
*– $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля,
– $p<0.05$, достоверные различия относительно плазмы.

2.9. Участие никотиновых холинорецепторов в миопротекторном действии «неквантового» ацетилхолина на модели мышечного компонента хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии *in vitro*

С целью выявления возможного участия НХР в миопротекторном действии «неквантового» АХ на модели мышечного компонента ХВДП *in vitro*, в питательную среду, содержащую плазму крови больных ХВДП в разведении 1:70, добавляли АХ в концентрации 10^{-8}М, а также d-тубокурарин (10^{-10}М). Обнаружено, что индекс площади экспериментальных эксплантатов достоверно отличается от контрольного значения и значения индекса площади эксплантатов, культивируемых в питательной среде, содержащей плазму крови пациентов и АХ (10^{-8}М) (рисунок 15). Необходимо отметить, что d-тубокурарин полностью не устранял миопротективное действие «неквантового» АХ. Обратил на себя внимание тот факт, что индекс площади экспериментальных эксплантатов практически не отличался от индекса площади эксплантатов, культивируемых в среде, содержащей плазму и оуабаин в дозе 10^{-8}М (рисунок 8 и рисунок 9).

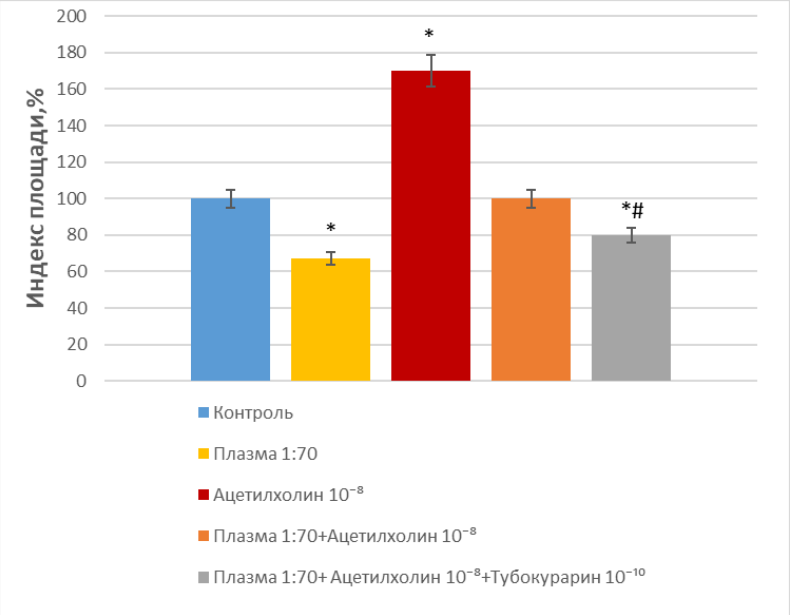

Рисунок 9. Никотиновые холинорецепторы вовлечены в механизм миопротективного действия «неквантового» ацетилхолина.
*– $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля,
– $p<0.05$, достоверные различия относительно плазмы.

Полученные результаты позволили выдвинуть предположение о том, что механизм миопротекции, запускаемый «неквантовым» АХ, реализуется путем как прямой, так и рецептор-опосредованной (через НХР) модуляции сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы.

2.10. Механизм миопротекторного действия «неквантового» ацетилхолина на модели мышечного компонента хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии *in vitro*

Для изучения механизма миопротекторного действия «неквантового» АХ на модели мышечного компонента ХВДП *in vitro* в чашки Петри, содержащие АХ (10^{-8} М), d-тубокурарин (10^{-10} М) и плазму крови больных ХВДП в разведении 1:70 добавляли оуабаин (10^{-6} М). Установлено, что в условиях одновременного ингибирования НХР и Na^+/K^+-АТФазы, АХ в наномолярной концентрации не способен нивелировать миотоксические свойства плазмы крови больных ХВДП (рисунок.10). Таким образом, миопротективный эффект АХ 10^{-8} М в условиях модели мышечного компонента ХВДП реализуется за счет модуляции сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы при участии НХР.

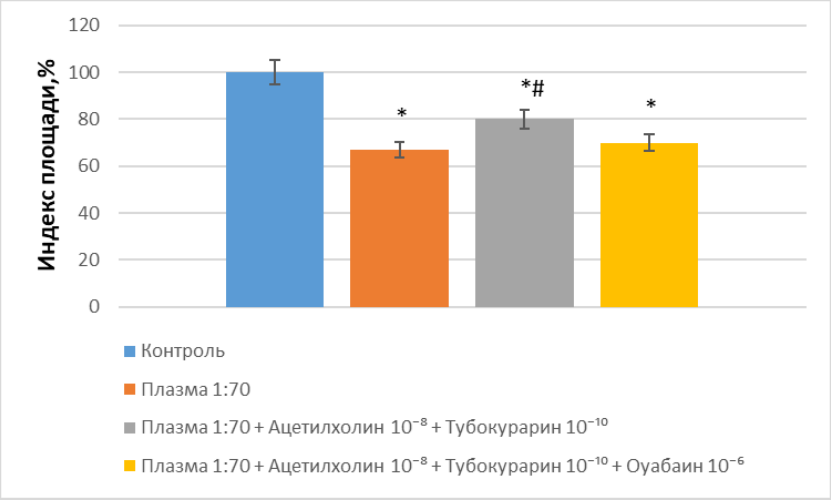

Рисунок 10. Токсический эффект плазмы крови больных ХВДП в разведении 1:70 сохраняется в условиях одновременного блокирования никотинового холинорецептора и Na^+/K^+-АТФазы.
*– $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля,
– $p<0.05$, достоверные различия относительно плазмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях органотипического культивирования экспериментально доказана возможность модуляции сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы в ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов оуабаином в концентрации, сопоставимой с эндогенной. В норме АХ в наномолярных концентрациях проявляет свои трофотропные свойства прямо за счет активации сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы и рецептор-опосредованно при участии НХР. Миотоксический эффект плазмы крови пациентов с установленным диагнозом ХВДП, по-видимому, основан на наличии антител к НХР.

Данные, полученные на модели мышечного компонента ХВДП *in vitro*, свидетельствуют о том, что модуляция «неквантовым» АХ сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы, может быть одним из механизмов, препятствующих развитию миопатического синдрома при ХВДП. Миопротекторный эффект «неквантового» АХ, реализуется прямо - через модуляцию сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы и рецептор-опосредованно через ансамбль НХР - Na^+/K^+-АТФаза. Фармакологические эффекты АХ и оуабаина, обнаруженные в ходе данного исследования, имеют перспективы для дальнейшего изучения и применения их в клинической практике для лечения нервно-мышечной патологии.

ВЫВОДЫ

1. У больных ХВДП были выявлены поражения периферической нервной системы в виде полиневритического синдрома (100%) и синдрома мышечных атрофий (87%), подтвержденные лабораторными и нейрофизологическими показателями, сопровождающиеся умеренной (57,3 %) и выраженной (43,6 %) степенью инвалидизации по шкале (ODSS INCAT).
2. Плазма крови больных ХВДП имеет повышенный уровень антител к НХР (0,42±0,087 нмоль/л) по данным иммуноферментного анализа и в разведениях 1:70 и 1:100 ингибирует рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневного куриного эмбриона.
3. АХ и оуабаин 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 АХ проявляет в концентрации, сопоставимой с неквантовой (10^{-8} М), оуабаин в концентрации, сопоставимой с эндогенной (10^{-8} М). Индекс площади экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на 70% и 40 % соответственно.
4. В условиях органотипического культивирования ткани скелетной мышцы АХ в концентрации, сопоставимой с неквантовой полностью, а оуабаин в дозе 10^{-8} М частично нивелируют миотоксический эффект плазмы крови больных ХВДП в разведении 1:70.
5. Миопротекторный эффект «неквантового» АХ в норме и на модели мышечного компонента ХВДП *in vitro* реализуется прямо за счет активации сигнальной функции Na^+/K^+-АТФазы и рецептор-опосредованно за счет модуляции внутриклеточного сигнала в ансамбле НХР - Na^+/K^+-АТФаза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

Результаты проведенного клинико-экспериментального исследования могут дополнить развернутую иммунологическую диагностику хронических воспалительных полиневропатий, а также использоваться при коррекции клинических рекомендаций при оказании помощи пациентам с данным заболеванием.

Сформулирован новый подход к лечению синдрома мышечных атрофий у больных ХВДП, в основе которого будет лежать не только иммуномодулирующая терапия, направленная на устранение воспалительных изменений нервов, но и воздействие на мышечное волокно, что позволит сократить сроки восстановительного периода. Настоящее исследование создает основу для разработки и клинического изучения лекарственных препаратов, регулирующих активность Na^+/K^+-АТФазы и прямых холиномиметиков.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК

1. Гавриченко А.В., Бульбоспинальная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди): описание клинического случая / А.В. Гавриченко, А.И. Куляхтин, А.А. Яковлев, М.Г. Соколова, А.Г. Смочилин, В.С. Федорова, Р.А. Гапешин Р.А. // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова.– 2019. – Т.26. – № 3. – С. 86-93.
2. Соколова М.Г., Роль ростовых полипептидных соединений в механизме пластичности ЦНС у больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона / М.Г. Соколова, С.В. Лобзин, В.А. Пеннияйнен, А.В. Кипенко, Е.В. Лопатина, М.В. Резванцев, А.В. Гавриченко // Биомедицинская химия.– 2017. – Т.63. – № 5. – С. 453-456.
3. Беденко А.С., Случай развития синдрома Миллера Фишера во время беременности / А.С. Беденко, М.Г. Соколова, Т.В. Сергеева, Ю.А. Щербук, Д.Ю. Бутко, А.В. Гавриченко // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2018. – Т.10. – № 3. – С. 76-80.
4. Гапешин Р.А., Астения у пациентов, страдающих хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатией / Р.А. Гапешин, Е.Р. Баранцевич, Д.И. Руденко, А.В. Гавриченко // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2021. – Т.13. – № 1. – С. 51-56.

5. Соколова М.Г., К вопросу дифференциальной диагностики мультифокальной моторной невропатии / М.Г. Соколова, С.В. Лобзин, А.А. Зуев, В.Г. Пустозеров, Н.Ю. Александров, А.В. Гавриченко // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2020. – Т.12. – № 1. – С. 89-96.
6. Соколова М.Г., Биотехнологический подход для обоснования дифференцированного применения нейропротективной терапии у больных наследственными нервно- мышечными заболеваниями / М.Г. Соколова, Е.В. Лопатина, С.В. Лобзин, С.Н. Давиденкова, А.В. Гавриченко, А.А. Зуев, О.С. Рощина // Медицинский алфавит. – 2020. – Т 3. – № 22. – С. 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 // Материалы IX Всероссийского съезда неврологов и IV конгресса национальной ассоциации по борьбе с инсультом. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова,Санкт-Петербург, 2019 г., – Т 119. – № 5. – С. 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, Москва, 18-19 октября 2019 г., – С.8.
9. Лопатина Е.В. Соколова М.Г. Гавриченко А.В. Исследование уровня нейротрофинов у детей с наследственной моторной и сенсорной полиневропатией 1А типа // Материалы IX Всероссийского съезда неврологов и IV конгресса национальной ассоциации по борьбе с инсультом Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, Санкт-Петербург, 2019 г., – Т 119. – № 5. – С.202.
10. Соколова М.Г., Лопатина Е.В., Пеннияйнен В.А., Гавриченко А.В. Органная культура нервной ткани – тест система для изучения особенностей патогенеза нейродегенеративных заболеваний // Материалы III-го национального конгресса по регенеративной медицине. Гены и клетки, Москва, 15-18 ноября 2017 г., – Т 12. – № 3. – 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 // Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2018», Санкт-Петербург, 12-13 апреля 2018 г., – С. 64.

12. Lopatina E., Sokolova M., Penniyaynen V., Kipenko A., Pasatetskaya N., Gavrichenko A., Lopatin A. Sodium pump and it's 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. Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021», Санкт-Петербург, 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, Санкт-Петербург, 9-11 декабря 2020 г., – С. 155-156.
15. Гавриченко А.В., Лопатина Е.В., Соколова М.Г. Сопоставление нейрофизиологческих и лабораторных данных при изучении активного аутоиммунного процесса у больных хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатией // Всероссийский терапевтический конгресс с международным участием «Боткинские чтения», Санкт-Петербург, 23-24 апреля 2021 г., – С. 56.
16. Гавриченко А.В. Определение мозгового нейротрофического фактора у больных хроничесой воспалительной демиелинизирующей полиневропатией // «Алмазовский молодежный медицинский форум — 2021». Сборник тезисов, Санкт-Петербург, 12-15 мая 2021 г., – С. 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». Сборник тезисов, Казань, 14-17 сентября 2021 г., – С.57-59.