

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

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

ДИССЕРТАЦИЯ
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

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия.....	14
1.2 История изучения хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии.....	14
1.3 Этиология и патогенез хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии.....	16
1.4 Клиническая картина хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии.....	18
1.5 Электрофизиологические аспекты хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии.....	21
1.6 Лабораторные аспекты хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии.....	22
1.7 Современные подходы к лечению хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии	23
1.8 Морфология нервно-мышечной системы в эмбриогенезе.....	26
1.9 Синтез, хранение и транспорт ацетилхолина.....	28
1.10 Высвобождение ацетилхолина из пресинаптической терминали.....	29
1.11 Гидролиз ацетилхолина.....	33
1.12 Строение и функция никотинового холинорецептора.....	34
1.13 Участие никотинового холинорецептора в регуляции трофики скелетной мышцы	36
1.14 Участие Na^+/K^+ -АТФазы в поддержании функционального состояния скелетной мышцы	37
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1 Клиническая часть исследования.....	42
2.1.1Характеристика участников исследования.....	42
2.1.2 Методы исследования.....	43

2.1.2.1 Клинико-неврологический метод.....	43
2.1.2.2. Лабораторный метод.....	43
2.1.2.3 Нейрофизиологический метод.....	45
2.2 Экспериментальная часть исследования.....	46
2.2.1 Метод органотипического культивирования.....	46
2.2.2 Объект культивирования и состав среды.....	46
2.2.3 Препаровка ткани скелетной мышцы и процедура культивирования.....	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	51
3.1 Результаты клинической части исследования.....	51
3.1.1 Результаты клинико-неврологического обследования.....	51
3.1.2 Лабораторные результаты.....	55
3.1.3 Результаты нейрофизиологического исследования.....	56
3.2 Результаты экспериментальной части исследования.....	63
3.2.1 Влияние ацетилхолина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.....	63
3.2.2 Влияние оуабаина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.....	64
3.2.3 Участие неквантово выделяемого ацетилхолина в модуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы.....	65
3.2.4 Влияние d-тубокуарина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.....	66
3.2.5 Механизм трофотропного действия «неквантового» ацетилхолина в норме.....	67
3.2.6 Влияние плазмы крови участников исследования на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы.....	68
3.2.7 Вклад «неквантового» ацетилхолина в механизмы, препятствующие развитию мышечного компонента хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии	69
3.2.8 Оценка физиологической роли сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы в механизмах, препятствующих развитию мышечного компонента хронической	

воспалительной демиелинизирующей полиневропатии, модель <i>in vitro</i>	70
3.2.9 Участие никотиновых холинорецепторов в миопротекторном действии «неквантового» ацетилхолина на модели мышечного компонента хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии <i>in vitro</i>	71
3.2.10 Механизм миопротекторного действия «неквантового» ацетилхолина на модели мышечного компонента хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии <i>in vitro</i>	73
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	86
ВЫВОДЫ	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	89

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИГ - ацетилхолин-индуцированная гиперполяризация

АТФ - аденоzinтрифосфат

АХ - ацетилхолин

АХЭ - ацетилхолинэстераза

БуХЭ - бутирилхолинэстераза

ВВИГ - внутривенное инфузионное введение иммуноглобулина

ГКС - глюкокортикоиды

ИФА - иммуноферментный анализ

КФК - креатинфосфокиназа

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

МПКП - миниатюрный потенциал концевой пластиинки

НХР - никотиновый холинорецептор

ПДЕ-потенциалы двигательных единиц

СОЭ - скорость оседания эритроцитов

СПИ-скорость проведения импульса

СРБ - С-реактивный белок

TX1 - транспортера холина 1

ХАцТ - холинацетилтрансфераза

ХВДП - хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия

ЦАМФ - циклический аденоzinмонофосфат

ЦСЖ- цереброспинальная жидкость

ЭМГ - электромиография

ЭНМГ - электронейромиография

CNTN1 - структурный паранодальный комплекс контактин-1

Ig - иммуноглобулин

MAG - миелин-ассоциированный гликопротеин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Иннервация скелетной мышцы необходима для осуществления ее функции. Разрушение нервно-мышечного синапса приводит к падению мембранныго 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 регулировании 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 эксплантов 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 эксплантов 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 эксплантов 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 общепринятым 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 общепринятым 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 данных, 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 Инесы 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).

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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия

К аутоиммунным заболеваниям периферических нервов (полиневропатиям) относят острую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию (синдром Гийена-Барре), синдром Миллера-Фишера, ХВДП, мультифокальную моторную полиневропатию с блоками проведения, различные варианты полиневропатий, ассоциированных с моноклональной гаммапатией.

ХВДП - это аутоиммунная сенсо-моторная полиневропатия, патоморфологическим признаком которой является демиелинизация нервных волокон периферических нервов, имеющая длительное прогрессирующее, ремиттирующее или стабильное течение. Заболевание проявляется двигательными и чувствительными расстройствами, вторично отмечается развитие миопатического процесса, характеризующегося гипотрофией, а в дальнейшем атрофией мышечной ткани. ХВДП может встречаться в любом возрасте, чаще в 40-60 лет, мужчины болеют в 1,5 раза чаще женщин. Заболевание приводит к стойкой нетрудоспособности и имеет высокую частоту рецидивов (Жулев Н.М., 2005; Левин О.С., 2016). ХВДП является редким заболеванием с распространенностью от 0,81 до 1,90 случаев на 100 000 человек, но вместе с тем составляет 21% от всех полиневропатий с неуточненным диагнозом в дебюте заболевания (Mahdi-Rogers M., Hughes R.I.C., 2014; Левин О.С., 2016).

1.2 История изучения хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии

Впервые рецидивирующая воспалительная полиневропатия была описана Eichhorst в 1890 г. Hoestermann E. в 1914 г. опубликовал описание клинического

случая 50-летнего мужчины, испытавшего 6 эпизодов подострого полиневрита за период 1870-1900 гг. Все эти случаи отличались от синдрома Гийена-Барре подострым началом и ремитирующее-рецидивирующем характером течения. В 1931 г. Andre-Thomas M. впервые наблюдал у пациентов с полиневритом повышение уровня белка в спинномозговой жидкости без выраженного цитоза (белково-клеточная диссоциация). Ранее тот же самый феномен был обнаружен Жоржем Гийеном и Жаном Барре у пациентов с острой воспалительной полиневропатией (Burns T.M., 2004).

В 1955 и 1956 годах Waksman B.H. и Adams R.D. разработали модель острой аутоиммунной полиневропатии у животных, которая формировалась после инъекции гомогената периферического нерва. Несколько лет спустя так же была разработана модель хронической аутоиммунной полиневропатии. Данные работы предоставили неопровергимые доказательства того, что воспалительные полиневропатии имеют аутоиммунную этиологию, а не вызваны инфекционным или токсичным агентом (Waksman B.H., 1956; Waksman B.H., 1963). Это позволило понять патогенез данных заболеваний и начать применять глюкокортикоиды (ГКС) для лечения хронических воспалительных полиневропатий (Austin J.H., 1958).

В 1956 Henriksen J.D. и Lambert E.H. независимо друг от друга, используя метод электронейромиографии (ЭНМГ), впервые зарегистрировали снижение скорости проведения по нервному волокну у пациентов с синдромом Гийена-Барре и хронической воспалительной полиневропатией. Wilbourn A.J. удалось обнаружить специфические нейрофизиологические изменения - блоки проведения, типичные для воспалительных полиневропатий, которых не было у пациентов с наследственными моторно-сенсорными полиневропатиями (Burns T.M., 2004).

В 1970-х годах ХВДП окончательно сформировалась как отдельная нозология с четко определенными клиническими, гистопатологическими и электронейрофизиологическими критериями. В 1975 в работе Daikin P. et al. впервые использован термин «хроническая воспалительная

полирадикулоневропатия». Наблюдая 53 больных ХВДП, ученые предложили первые диагностические критерии: отмечалось, что данную патологию возможно идентифицировать, учитывая анамнез, электронейрофизиологические данные и анализ цереброспинальной жидкости (Dyck P.J., 1975). В 1984 г. Dyck P.J. и Ernaison G. предложили окончательное определение «хроническая воспалительная демиелинизирующая полирадикулоневропатия». Современные диагностические критерии сформулированы EFNS/PNS (European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline. Международное руководство европейской Федерации неврологических Обществ/Руководство Общества заболеваний периферических нервов) в 2010 году и включают в себя клинические, электрофизиологические, лабораторные и гистологические признаки ХВДП (Van den Bergh P.Y.K., 2010).

1.3 Этиология и патогенез хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии

Этиология заболевания остается неизвестной. Нет достоверных данных о предшествовавших развитию ХВДП инфекциях, травмах, укусов насекомых и прочих воздействиях. Однако, в работе Mc Combe P.A. (1987) приводятся сведения о том, что у 32% из 92 больных в анамнезе имелись данные о предшествовавших инфекциях, а при серологическом исследовании чаще, чем в популяции в целом, выявлялись указания на перенесенную цитомегаловирусную инфекцию.

Установлено, что в основе патогенеза ХВДП лежит - аутоиммунная воспалительная демиелинизация нервного волокна (Dyck P.J., Tracy A., 2018). Подтверждением аутоиммунной этиологии, при которой задействованы как гуморальные, так и клеточные механизмы, является обнаружение патологических антител в сыворотке крови пациентов, а также Т-клеточная инфильтрация, отложения иммуноглобулина и комплемента в образцах биопсии нервов (Dalakas M.S., 2015). Активированные Т-клетки, секретируя протеазы и хемокины

(интерферон- γ , интерлейкин-2, фактор некроза опухоли- β), разрушают гемато-невральный барьер, делая его проходимым для иммунокомпетентных клеток и аутоантител. Аутоантитела связываются с гликолипидами параузловых и узловых участков шванновских клеток, вызывая повреждение миелина и аксона (Жулев Н.М., 2005; Mathey E.K. et al., 2015). Остается актуальны вопросы пускового механизма активации Т-клеток и топографии повреждения гемато-неврального барьера.

Изучение аутоиммунной природы ХВДП ведется с начала 1980-х годов. Антитела выявлены как к компонентам перехватов Ранвье, так и к паранодальным антигенам (Dalakas M.S., Engel W.K., 1980; Zweiman B. et al., 1983). Отмечено, что более 40% пациентов с ХВДП имеют антитела против паранодальных белковых компонентов миелинизированных волокон (Kwa M.S.G., 2003; Querol L., et al., 2017). Роль аутоантител в патогенезе ХВДП подтверждается также положительной реакцией больных на терапию плазмаферезом и внутривенным иммуноглобулином G (Tackenberg B. et al., 2009; Berger M. et al., 2013).

Отмечено, что антитела против поверхностных компонентов шванновских клеток присутствуют у 25% пациентов с ХВДП, однако молекулярная мишень этих антител до конца не изучена (Kwa M.S.G., 2003; Querol L., 2017). Несмотря на клинические и экспериментальные доказательства роли аутоантител в патогенезе ХВДП, антитела к узловым и параузловым антигенам перехватов Ранвье были идентифицированы сравнительно недавно (Querol L., 2017).

Выделена группа антител, наиболее часто встречаемых при ХВДП: антитела к структурному паранодальному комплексу контактин-1 класса IgG4 (CNTN1), нейрофасцину 155 класса IgG4 (NF155), антитела класса IgM против ганглиозидов LM1, GM1, антитела класса IgM к миелин-ассоциированному гликопротеину (MAG) (Manso C., 2016; Querol L., 2017; Pascual-Goni E., 2019). Также отмечена роль антител класса IgG4 к компонентам узлов Ранвье таких как узловой нейрофасцину NF140 и NF186 (Pascual-Goni E., 2019). Повреждения данных структур нарушают аксоноглиальные связи в узловых и параузловых зонах, что приводит к демиелинизирующему повреждению нервного волокна и вторичной

аксонопатии (Tang L., 2021). Имеются данные об обнаружении у пациентов с ХВДП антител к нейронам задних рогов спинного мозга, а также к альфа-мотонейронам (Querol L. et al., 2017).

Описание клинических случаев больных с аутоиммунным поражением, как периферического нерва, так и постсинаптической мембранны дает основание предположить возможность одновременной атаки на структуры нервно-мышечного синапса (Kimura K. et. al., 1998; Mori M. et al., 2006; Bolz, Totzeck, 2018; Quan W., Xia J., 2018; Yuan J. et al., 2018; Cao Y. et al., 2019; Anagnostouli M. et al., 2020).

1.4. Клиническая картина хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии

Клиническая картина представлена поражением преимущественно моторных нервов на руках и ногах, симметричного характера с развитием клинической картины периферических параличей, чувствительных расстройств (Жулев Н.М., 2005). Феномен мышечной утомляемости также характерен для больных ХВДП (Lawley A., Abbas A., 2020).

В настоящее время ХВДП признана EFNS/PNS полиневропатией с типичным и атипичным вариантами течения. Для типичной формы ХВДП характерно развитие симметричной полирадикулоневропатии или полиневропатии, которая имеет ремиттирующее, ступенчатое прогрессирующее или неуклонно прогрессирующее течение. Симптомы развиваются медленно, и максимальный неврологический дефицит может развиться через 2-16 месяцев (не менее 8 недель) от начала заболевания. Классические проявления заболевания включают в себя слабость как дистальных, так и проксимальных мышц рук и ног, а также чувствительные расстройства.

Слабость мышц ног приводит к нарушениям походки, затруднениям при подъеме по лестнице, вставании из положения сидя. Слабость мышц рук проявляется преимущественно в кистях в виде нарушений мелкой и точной

моторики. Снижение или отсутствие глубоких рефлексов является обязательным клиническим признаком заболевания. Нарушения ходьбы, неустойчивость в позе Ромберга, нарушения тонких движений рук связаны также с нарушением проприоцептивной чувствительности и проявляются синдромом сенситивной атаксии. Пациенты испытывают различные по качеству парестезии, в некоторых случаях отмечается умеренно выраженный болевой синдром.

По данным McCombe P.A. et al. (1987), двигательные расстройства являлись самыми частыми и имелись у 94% пациентов, парестезии - у 64% и болевой синдром - у 20%. Расстройства чувствительности в виде онемения кистей и стоп встречались в 64-79%, гипестезия - в 68-86%. Глубокая чувствительность страдала в большей степени, чем поверхностная. Сенситивная атаксия наблюдалась в 2-24% случаев (Жулев Н.М., 2005).

Частота поражений краиальных нервов существенно различается - от 2% до 32%. Характерны офтальмопарезы (8%), отек соска зрительного нерва (7%), парезы лицевых мышц (2-16%), бульбарный синдром, изредка - вестибулярная дисфункция. Слабость дыхательных мышц развивается в 5% случаев. Могут наблюдаться умеренно выраженные нарушения функции тазовых органов, связанные с поражением крестцовых корешков и нервов (Dyck P.J. et al., 1975; McCombe P.A. et al., 1987).

При ХВДП в ряде случаев наблюдаются своеобразные неврологические симптомы, обычно не встречающиеся при других полирадикулоневропатиях. К их числу относятся наличие у пациента преимущественно двигательных расстройств, напоминающих спектр заболеваний двигательного нейрона, с выраженным атрофиями и фасцикуляциями, в совокупности с потерей глубокой чувствительности и грубой сенситивной атаксией, преимущественное поражение мышц ног, симулирующее множественный мононеврит и синдром, сходный с синдромом Гийена-Барре острым развитием мышечной слабости (Gorson K.S. et al., 1997).

Гипертрофия периферических нервов определяется лишь у небольшого числа больных, но при определенной ее локализации с ней могут быть связаны

некоторые синдромы - синдромы компрессии корешков или конского хвоста (Жулев Н.М., 2005).

Тремор различного вида (интенционный, атактический или постуральный), также характерен для больных ХВДП (50% больных). Причины его возникновения изучены не в полном объеме, однако имеются данные о том, что нарушение интеграции между волокнами глубокой чувствительности, мозжечком и базальными ганглиями является одним из механизмов возникновения тремора при ХВДП (Pyatka N. Et al., 2019; Жулев Н.М., 2005).

К атипичным формам относится:

ХВДП с мультифокальным распределением мышечной слабости и сенсорными нарушениями, которые обусловлены блоком проведения, как в двигательных, так и в чувствительных волокнах (синдром Льюиса-Самнера).

ХВДП с мультифокальным или региональным распределением мышечной слабости, с преимущественным поражением верхних или нижних конечностей. Заболевание, как правило, дебютирует асимметрично с развитием слабости и чувствительных нарушений в одной руке, кисти или в двух руках, напоминая туннельную невропатию, множественный мононеврит, или плечевую плексопатию.

ХВДП с признаками дисфункции автономной нервной системы (в том числе нарушение парасимпатической иннервации тазовых органов).

ХВДП с изолированным поражением сенсорных волокон.

ХВДП в детском возрасте. Данная группа пациентов отличается от взрослых высокой частотой случаев острого начала заболевания, нарушениями походки, значительными неврологическими расстройствами в начале заболевания и рецидивирующим течением. Прогноз у детей обычно благоприятный (Ikeda S., Koike H., 2019; Жулев Н.М., 2005; Климкин А.В. и др., 2016).

Кроме полиневритического синдрома описаны и другие клинические проявления: астения (75%), депрессия (69%), нейропатическая боль (20-30%), вегетативная дисфункция (25%) (Bjelica B. Et al., 2019; Жулев Н.М., 2005).

Таким образом, ХВДП следует подозревать во всех случаях симметричной полирадикулоневропатии, характеризующейся рецидивирующими, ступенчатым или прогрессирующим течением на протяжении более 2 месяцев. Значимым клиническим диагностическим критерием является также реакция больного на иммуномодулирующую терапию (Van den Bergh, P.Y.K et al., 2010).

1.5 Электрофизиологические аспекты хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии

Кроме клинических, при ХВДП выявляют характерные лабораторные и электрофизиологические особенности. Электрофизиологические изменения в проведении импульса по периферическому нерву являются ключевыми во всей инструментальной диагностике ХВДП. Выявляется демиелинизирующий паттерн, проявляющийся увеличением дистальной латентности и снижением скорости распространения возбуждения по моторным и сенсорным нервам; полифазными изменениями формы и увеличением длительности М-ответа; наличием блоков проведения импульса; выраженным увеличением латентности F-волн или их отсутствие.

Блок проведения импульса - падение амплитуды и площади М-ответа в проксимальной точке стимуляции по отношению к дистальной на 50 % и более. Демиелинизирующий характер повреждения нерва является обязательным условием в электрофизиологической диагностике ХВДП. Игольчатая ЭМГ в развернутых формах заболевания выявляет типичные неврогенные изменения в мышцах такие как: увеличение длительности потенциалов двигательных единиц (ПДЕ), наличие высокоамплитудных ПДЕ, сниженное рекрутование ПДЕ (Hausmanowa-Petrusewicz I., 1991; Van den Bergh P.Y.K. et al., 2010).

1.6 Лабораторные аспекты хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии

Среди лабораторных особенностей обращает на себя внимание повышение белка в церебро-спинальной жидкости (ЦСЖ), наблюдаемое в 80% случаев ХВДП (Illes Z., 2017). У большинства пациентов с ХВДП отмечаются также изменения в биохимической картине крови. Чаще всего встречается парапротеинемия (29%); повышение гликозилированного гемоглобина (28%); креатинфосфокиназы (КФК) (27%); снижение гемоглобина (19%); повышение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) (17%); повышение антител к цитоплазме нейтрофилов, антинуклеарных антител (11%); повышение ревматоидного фактора (11%); повышение тиреотропного гормона 11% (Abraham A. et al., 2016).

В плазме крови больных ХВДП также обнаруживаются патологические антитела к узловым и параузловым компонентам миелина. Наиболее часто обнаруживаются антитела к NF155 (5-10%), MAG и ганглиозиду GM1 (6%). Антитела к CNTN1 (5%) и NF140/NF186 (2%) обнаруживаются реже (Pascual-Goni P., 2019). В настоящий момент нет убедительных данных о наличии антител к компонентам нервно-мышечного синапса в плазме крови больных ХВДП.

Следует отметить, что обнаружение аномальных иммуноглобулинов (Ig) у пациентов с ХВДП требует проведения гематологического обследования пациента для исключения злокачественных лимфопролиферативных заболеваний таких как: миеломная болезнь, секретирующие лимфомы, макроглобулинемия Вальденстрёма, POEMS-синдром и другие. Если моноклональная секреция IgG или IgA носит доброкачественный характер, диагностируется ХВДП, ассоциированная с моноклональной гаммапатией неясного значения, наблюдалась в 23% всех случаев ХВДП (Bromberg M.B. et al., 1992). При доброкачественной секреции иммуноглобулина M устанавливается диагноз IgM-парапротеинемической демиелинизирующей полиневропатии (Гинзберг М.А. и др., 2015).

1.7 Современные подходы к лечению хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии

В настоящее время в основе лечения ХВДП лежит иммуномодулирующая терапия. К методам 1-й линии терапии относят ГКС, высокообменный плазмаферез и внутривенное введение иммуноглобулина IgG (ВВИГ), к методам 2-й линии относят цитостатическую терапию и моноклональные антитела (Супонева Н.А. и др., 2016). Зачастую предпочтение отдается кортикостероидам, однако при их назначении необходимо учитывать развитие побочных реакций, степень аутоиммунного воспалительного ответа, скорость прогрессирования заболевания, сопутствующую патологию и другие факторы. Единого мнения о схемах лечения ГКС в настоящее время не существует.

В ретроспективном исследовании van Lieverloo G.G.A. et al. (2018) сравнивали различные схемы и препараты ГКС (пероральный преднизолон, пульс-терапия перорального дексаметазона, пульс-терапия внутривенного метилпреднизолона у 125 пациентов с ХВДП. У 66% пациентов был положительный ответ на ГКС. Значимой разницы в безопасности и эффективности между этими схемами лечения не отмечалось. Наиболее распространенной схемой назначения ГКС является преднизолон в дозе 60 мг/сут. ежедневно на протяжении не менее 1 мес., с постепенным снижением до 5–20 мг через день.

ВВИГ при ХВДП применяется уже более 30 лет. Результаты мультицентровых рандомизированных плацебо-контролируемых исследований демонстрируют эффективность человеческого ВВИГ, аналогичную ГКС и высокообменному плазмаферезу. Отсутствие нежелательных побочных явлений, свойственных ГКС а также более длительное время ремиссии после курсовой терапии по сравнению с методами эфферентной терапии позволяют рекомендовать данный способ лечения и делают его наиболее предпочтительным (Elovara I. et al., 2008; Eftimov F. et al., 2009). Начальная доза ВВИГ при ХВДП 2

г/кг массы тела пациента. Вводят данную дозу ежедневно на протяжении 2-5 дней. Эффект от терапии развивается на протяжении 2-5 недель, что обусловлено кинетикой препарата. Количество курсов терапии ВВИГ, а также поддерживающие дозы, необходимые для достижения стойкой ремиссии строго не регламентированы и определяются характером течения заболевания в каждом конкретном случае. По данным Y. A. Rajabally et al., поддерживающие дозы составляют от 18 до 108 г. на курс, а интервал между введениями варьируется от 2 до 17 недель (Rajabally et al., 2006).

Средством первой линии также являются методы эфферентной терапии, а именно высокообменный плазмаферез. Еще в 1986 году P.J. Dyck et. al. провели двойное слепое, рандомизированное исследование с участием 29 пациентов, в ходе которого пациенты два раза в неделю в течение 3 недель получали высокообменный плазмаферез. По завершению курса лечения у пациентов наблюдалось значительное улучшение электронейрографических показателей проводимости по смешанному нерву (Dyck P. J. et. al., 1986). Эффект от высокообменного плазмафереза у большинства больных ХВДП достаточно быстрый, но непродолжительный. У многих пациентов отмечаются рецидивы заболевания через 1-2 недели после прекращения сеансов, однако большинство из них положительно реагируют на продолжение лечением эфферентной терапией. Стандартной схемой лечения является 1 процедура с интервалом 2-4 недели в течение 1 года. Объем эксфузии плазмы при лечении ХВДП: 30–40 мл/кг плазмы за 1 сеанс (Hahn A.F. et. al., 1996). По своей эффективности плазмаферез в качестве монотерапии уступает ВВИГ, ГКС и циклофосфану. Чаще всего плазмаферез комбинируют с последующей иммуносупрессорной терапией (возможны процедуры плазмафереза с последующим внутривенным введением ГКС) или ВВИГ (Hahn A.F. et al., 1996).

В последнее время активно изучается эффективность эфгартигимода в лечении ХВДП (Нео Y-A., 2022). В 2021 году данный препарат был одобрен для лечения миастении. Механизм действия эфгартигимода при миастении основан на

блокировании неонатального Fc-рецептора, что приводит к снижению уровня аутоантител к НХР (Howard, J.F., 2021).

Несмотря на то, что идентифицированы и достаточно изучены основные патогенетические дизиммунные механизмы, ответственные за развитие демиелинизации нерва и денервации мышечного волокна, разработаны схемы иммуномодулирующей терапии, отмечаются случаи резистентных к лечению форм ХВДП. Вероятность эффективности лечения внутривенным иммуноглобулином, кортикоидами или плазмаферезом составляет около 50–80%, а 85% пациентов, которые первоначально реагируют на внутривенные иммуноглобулины, нуждаются в долгосрочном поддерживающем лечении. Кроме того, длительное использование ГКС ведет к нежелательным побочным эффектам (Hughes R.A. et al., 2017).

Использование иммуномодулирующих препаратов таких как азатиоприн, ритуксимаб и метотрексат может иметь положительные эффекты лишь у отдельных пациентов, в качестве дополнительного лечения, в том числе для снижения высоких доз кортикоидов или внутривенного иммуноглобулина (Bunschoten C. et al., 2019). ХВДП не только снижает качество жизни пациентов, но и наносит определенный экономический ущерб: 44% пациентов вынуждены прекратить свою профессиональную деятельность (Allen J.A. et al., 2021), а методы иммунотропной терапии, несмотря на свою эффективность, имеют высокую стоимость, и, учитывая ремиттирующий характер течения заболевания, зачастую недоступны всем пациентам.

Таким образом, наличие резистентных к лечению форм, осложнения глюкокортикоидной и цитостатической терапии, а также труднодоступность некоторых иммунотропных методов лечения заставляют более детально подходить к изучению патогенеза ХВДП и разработке новых элементов в тактике лечения этого заболевания (Lehmann H.C. et al., 2019). Несмотря на имеющиеся клинико-инструментальные данные повреждения мышечной системы, в настоящее время терапевтической мишенью в лечении ХВДП является только нервное волокно. Методы миопротективной терапии не разработаны.

Гипотетически можно предположить, что нервно-мышечный синапс может явиться мишенью для аутоиммунной атаки, так как строение периферического нерва имеет определенную общность эндоневральных пространств, а в клинической картине ХВДП наблюдается синдром мышечной утомляемости. Именно мышечная утомляемость и атрофии мышц являются наиболее частой причиной инвалидизации данной группы пациентов. Наличие атрофических изменений в мышцах больных ХВДП зарегистрировано при помощи нейровизуализации (Gilmorea K.J. et al., 2020(2)). Считается, что атрофии мышц при ХВДП носят вторичный характер и являются следствием денервационного процесса, наблюдавшегося у части пациентов по данным ЭМГ.

Гипотеза настоящего исследования подразумевает возможность наличия не только неврогенных признаков мышечной атрофии у пациентов, но и первично-мышечного повреждения. Предлагаемый подход к изучению нервно-мышечной системы больных ХВДП важен с точки зрения коррекции тактики лечения пациентов, страдающих данным заболеванием. Изучение роли холинергической регуляции в механизмах, препятствующих развитию мышечной атрофии, позволит уточнить патогенез ХВДП и в дальнейшем существенно расширить стратегию лечения.

1.8 Морфология нервно-мышечной системы в эмбриогенезе

Онтогенез эфферентной иннервации играет важнейшую роль в поддержании физиологических свойств нервно-мышечной системы будущего взрослого организма. Скелетные мышцы имеют мезодермальное происхождение и развиваются из дерматомиотомов во время эмбрионального развития. Клеточную дифференцировку на начальных стадиях миогенеза обеспечивают внеклеточные сигнальные каскады Wnt (регулирует эмбриональное развитие, самообновление, пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток) и Shh (регулирует развитие нервной и скелетно-мышечной систем) (Dorus S. et al., 2006; McCord M. et al., 2017). Клетки дерматомиотома дифференцируются в миобласты

скелетных мышц благодаря факторам транскрипции Pax3. Мигрируя и рассредотачиваясь, миобласти образуют миотом, который затем дифференцируется в миофибриллы (Endo T., 2015). 3-5-дневный эмбриональный миотом птиц и млекопитающих филогенетически не обладает сократительной функцией и продуцирует сигнальные молекулы для растущего нервного волокна. Для этого периода онтогенеза характерно диффузное распределение НХР на поверхности мышечной мембранны. На 8-й и 9-й дни мышцы в основном состоят из низкодифференцированных миобластов с выступающими ядрами и диффузными пучками миофибрилл. На данном этапе семейство факторов транскрипции MyoD играет ключевую роль в миогенной детерминации и дифференцировке миоцитов. Во время начинающейся иннервации миофибрилл НХР равномерно распределяются на поверхности мембранны, но затем агрегируют в первичные кластеры, которые вскоре рассредотачиваются. Точный механизм кластеризации неясен, но предполагается, что на данном этапе он независим от нервного волокна и требует передачи сигналов MuSK и LRP4, а также молекулы Wnt (Cetin H. Et. al., 2020).

Миотомные нервно-мышечные соединения у птиц обнаруживаются на 10-й день эмбрионального развития, у млекопитающих на 13-й день. В этот период под влиянием нервного волокна НХР группируются во вторичные кластеры вблизи нервно-мышечного контакта (Deries M. et al., 2008). Кластеризация рецепторов регулируется факторами, синтезируемыми мотонейроном, агрином и требует внутриклеточного каркасного белка, называемого рапсином (Lee Y. et al., 2009).

Нервные волокна на данной стадии развития имеют низкий уровень миелинизации и за счет отростков шванновских клеток образуют контакты с развивающимися миофибриллами в том числе за счет образования новых конусов роста. Имеются данные, что трофические факторы, выделяемые как нервом, так и сокращающейся мышцей, необходимы для полноценной дифференцировки мышечной ткани. В отсутствие собственной активности мышца замедляет рост и дифференцируется только до стадии миофибрилл и дальнейшее ее развитие требует присутствия нервного волокна или его трофических факторов (Sohal G.S.,

Holt R.K., 1980). В первые 2 недели постнатального периода отмечается элиминация синапсов, приводящая к полноценному формированию двигательных единиц, а электрическая активация и высвобождаемый первом агрин определяют дифференцировку эмбриональных НХР во взрослые (Cetin H. et al., 2020).

1.9 Синтез, хранение и транспорт ацетилхолина

Для холинергических нейронов характерна экспрессия ряда специфических белков с комбинированной активностью, обеспечивающих синтез, хранение, транспорт, высвобождение и разрушение АХ таких как: транспортера холина 1 (TX1), холинацетилтрансфераза (ХАцТ), везикулярный переносчик АХ.

Холинергические нейроны уникальны в своей экспрессии транспортера TX1: натрий-зависимого высокоаффинного транспортера холина, обеспечивающего захват холина из внеклеточного пространства в цитоплазму нейронов, проявляющего высокое сродство к холину. Активность TX1 является ключевым фактором, необходимым для синтеза АХ.

ХАцТ регулирует синтез АХ, используя холин и ацетил-СоА в качестве субстратов. ХАцТ продуцируется в теле нейрона и транспортируется к нервному окончанию, где её концентрация наиболее высока. Фермент присутствует в кинетическом избытке, и определяет скорость синтеза АХ.

Везикулярный переносчик упаковывает АХ, сформированный в цитоплазме, в секреторные синаптические везикулы (Brandon E.P. et al., 2004).

Субстраты, необходимые для синтеза АХ, транспортируются в пресинаптическую терминалль как из синаптической щели через TX1, так и посредством аксонального транспорта из тела нейрона. Ферментные системы, необходимые для синтеза и гидролиза АХ также доставляются в нервно-мышечный синапс посредством аксонального транспорта (Couraud J.Y. et al., 1985).

Многочисленные исследования подтверждают, что холинергические нейроны способны к быстрому антероградному транспорту везикул с АХ,

содержащих также молекулы АТФ. АХ в аксоне также может быть обнаружен и в свободном виде, поскольку везикула, транспортирующая нейромедиатор чрезвычайно неустойчива (Koike H., Nagata Y., 1979; Woodward W., Lindstrom S., 1977; Heilbronn E., Pettersson H., 1973; Heiwall P.O., Saunders N.R., 1976).

Описан ускоренный транспорт пустых везикул, в которые АХ упаковывается только в терминали аксона (Kiene M.L., Stadler H., 1987).

При ингибиовании аксонального транспорта винкристином, без вмешательства в структуру нервного волокна и синаптическую передачу, и при сохранении генерации потенциала действия, наблюдалась денервационная атрофия мышечного волокна (Maeda K., 1987). Следовательно, факторы, образуемые в нейронах, участвуют в поддержании трофики скелетных мышц. К этим факторам относят: АХ, аденоинтрифосфатазу, гамма-аминомасляную кислоту, нейротрофический фактор головного мозга, фактор роста нерва и другие (Lu B., 2003). Однако, соотношения АХ, транспортируемого аксонально и синтезируемого непосредственно в терминали аксона остаются предметом обсуждения (Espildora C., 1956; Gutmann E. et al., 1955; Birks R., 1960; Albuquerque et al., 1972; Katz B., Miledi R., 1987; Malomouzh A.I. et al., 2018).

1.10 Высвобождение ацетилхолина из пресинаптической терминали

Высвобождение АХ из пресинаптической терминали протекает по двум механизмам: квантовому и неквантовому. Квантовый выброс реализуется через экзоцитоз, при котором мембрана синаптического пузырька сливается с мембраной нервного окончания с последующим выбросом фиксированного количества молекул (около 10000) в синаптическую щель. Квантово-везикулярная теория передачи подразумевает наличие механизма везикулярного цикла (Sudhof T.S., 2004).

В ответ на потенциал действия из пресинаптической терминали посредством везикулярного экзоцитоза выделяется от единиц до нескольких сотен квантов нейромедиатора. Квант АХ, взаимодействующий с кластерами

постсинаптических НХР, расположенных рядом с зоной выброса везикулы, вызывает локальное изменение потенциала постсинаптической зоны - миниатюрный потенциал концевой пластинки (МПКП).

Кванты АХ способны высвобождаться из нервной терминали и в состоянии покоя. В отсутствие нервной импульсации частота возникновения МПКП варьирует, составляя в среднем порядка 1 сигнала в секунду. Принимая во внимание частоту спонтанного квантового высвобождения (у теплокровных животных 1 сигнал МПКП в секунду), количество молекул АХ в кванте (Kuffler S.W., Yoshikami D., 1975) и количество синапсов в исследуемой мышце, был сделан вывод, что только несколько процентов всего АХ, выделяющегося в покое из двигательного нервного окончания, обусловлены спонтанной квантовой секрецией. В 2020 году вышла работа, свидетельствующая о том, что АХ, взаимодействуя с 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).

Впервые предположение о том, что АХ способен выделяться из пресинаптической терминали не только в виде квантов было выдвинуто Mitchell J.F. и Silver A. в 1963 г. продемонстрировавшими отсутствие корреляции между количеством АХ, высвобождаемого из нервно-мышечного окончания, и частотой возникновения МПКП при изменении температуры и концентрация калия в инкубационной среде (Mitchell J.F., Silver A., 1963.). Дальнейшие работы продемонстрировали, что в отсутствие нервного возбуждения, только незначительная часть АХ выделяется в виде квантов, в то время как основная часть нейромедиатора в синаптической щели имеет иное происхождение (Fletcher P., Forrester F., 1975).

Katz B. и Miledi R. в 1977 г. впервые разработали метод электрофизиологической регистрации АХ, выделившегося в неквантовом виде, в нервно-мышечном синапсе. Данная методика была основана на оценке Н-эффекта - устранения деполяризации постсинаптической мембранны путем блокады НХР (Katz B., Miledi R. 1977; Vyskocil F., Illes P., 1977;). Последующие работы

доказали, что Н-эффект действительно является показателем интенсивности неквантовой секреции АХ при условии неизменности чувствительности постсинаптической мембраны к медиатору (Маломуж А.И., Никольский Е.Е., 2018; Vyskocil F., 2009).

Эксперименты с денервированными мышцами (Zemkova et al., 1987; Nikolsky et al., 1996) подтвердили, что нервная терминал является основным, но не единственным источником АХ, следовательно, в синаптическую щель АХ может проникать ретроградно из скелетной мышцы (Krnjevic K., Straughan D.W., 1964; Potter L.T., 1970).

Несмотря на 40-летнюю историю изучения неквантовой холинергической нейросекреции, ее механизмы изучены не в полном объеме (Маломуж А.И., 2014). Практически сразу после обнаружения неквантовой секреции АХ предположили, что данный феномен реализуется посредством простой диффузии молекул АХ через липидный бислой по концентрационному градиенту (Vyskocil F., Illes P., 1977). Долгое время полагали, что молекулы АХ неспособны преодолеть липидный барьер, тем не менее, возможность спонтанной секреции медиатора не отрицается (Edwards R.H. 2007).

Гипотеза везикулярных переносчиков АХ предполагает, что из нервного окончания АХ может проникать в синаптическую щель с помощью везикулярных транспортеров, которые встраиваются в пресинаптическую мембрану в процессе эзоцитоза везикул с квантом нейромедиатора, а также через транспортер, реализующий обратный захват холина из синаптической щели (Edwards C. et al., 1985; Nikolsky E.E. et al., 1991).

Альтернативная гипотеза предполагает, что в основе механизма неквантового выделения АХ лежит реверсивная работа транспортера, реализующего обратный захват холина из синаптической щели (Nikolsky et al., 1991).

Неквантовый выброс АХ также зависит от внеклеточного содержания ионов кальция и магния. Для функционирования механизма неквантового высвобождения медиатора необходимо наличие ионов кальция во внеклеточной

среде, а ионы магния угнетают данную секрецию. Следует отметить, что концентрация ионов магния, в значительной степени ингибирующая неквантовую секрецию АХ, практически не влияет на квантовое высвобождение медиатора (Маломуж А.И., Никольский Е.Е., 2010).

Ряд свидетельств доказывает нейротрофическую функцию неквантовой секреции АХ. Во-первых, после денервации мышцы, неквантовое высвобождение прекращается намного раньше, чем квантовое. И наоборот, неквантовая секреция восстанавливается в ходе реиннервации раньше, чем процесс самопроизвольного квантового высвобождения (Nikolsky E.E. et al., 1996). Во-вторых, неквантовый АХ является фактором нейрогенеза, необходимым для осуществления перехода от полинейрональному к мононейрональному характеру распределения аксонов на начальных этапах эмбриональной иннервации скелетных мышц (Vyskocil F., Vrbova G., 1993). В-третьих, обширные данные свидетельствуют о том, что в состоянии покоя неквантово выделяемый АХ контролирует поддержание мембранныго потенциала постсинаптического звена на должном уровне, характерном для иннервируемых мышц. Падение мембранныго потенциала покоя мышечных волокон - одно из первых постденервационных изменений и его развитие соответствует тем же временным рамкам, что и снижение интенсивности неквантовой утечки АХ (Bray J.J. et al., 1982; Urazaev A. et al., 2000).

Введение ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и прямых холиномиметиков в концентрациях, имитирующих действие «неквантового» АХ, уменьшает скорость снижения мембранныго потенциала мышечного волокна. Способность АХ в наномолярных концентрациях активировать Na^+/K^+ -АТФазу мышечных волокон - один из возможных механизмов, лежащих в основе такой холиномиметической активности (Nikolsky E.E., 1994; Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., 2018).

Таким образом, АХ, высвобождаемый в покое (как за счёт квантового, так и неквантового механизмов выделения), подготавливает мембрану мышечного волокна к деполяризации, увеличивает вероятность взаимодействия пар молекул

АХ с НХР, а также участвует в регуляции клеточного метаболизма (Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., 2018).

1.11 Гидролиз ацетилхолина

Длительность действия АХ ограничивается активностью локализованных в синаптической щели холинэстераз, гидролизующих АХ до холина и остатка уксусной кислоты. Семейство холинэстераз млекопитающих включает два близкородственных фермента, способных гидролизовывать нейротрансмиттер АХ и контролировать, таким образом, временные границы его действия в ходе синаптической передачи: ацетилхолинэстеразу (АХЭ) и бутирилхолинэстеразу (БуХЭ). Показано, что основная роль в гидролизе АХ, выделяющегося из нервного окончания, принадлежит АХЭ, тогда как основная функция БуХЭ - дублирование роли АХЭ в условиях функциональной недостаточности последней. (Петров К.А. и др., 2014). Холин, в свою очередь, посредством транспортного белка (системы захвата холина высокого сродства) возвращается в пресинаптическую терминал и используется для синтеза новых молекул АХ (Маломуж А.И., Никольский Е.Е., 2018). АХЭ важнейший компонент нервно-мышечного синапса, обеспечивающий прекращение нейротрансмиссии холинергическими двигательными нейронами. АХЭ экспрессируется в виде нескольких гомомерных и гетероолигомерных форм в нейронах и их мишенях, включая скелетные мышцы, эндокринные и экзокринные железы (Rotundo R.L., 2017). Специфичная форма АХЭ в скелетных мышцах была впервые продемонстрирована в опытах Z. W Hall. (1973). В данной работе обнаружено, что асимметричная форма фермента в наибольшей степени сконцентрирована в иннервируемых областях концевой пластинки волокон скелетных мышц (Hall, Z. W., 1973). Фермент состоит из трех тетramerов ковалентно связанных с трехцепочечным коллагеноподобным хвостом (ColQ), отвечающим за фиксацию молекулы к базальной пластинке нервно-мышечного синапса (Rotundo R.L., 2020). АХЭ обладает узкой специфичностью и высокой удельной активностью,

позволяющей ферменту работать со скоростью, близкой к скорости диффузии (Алибекова Д.М. и др., 2018). Гидролиз АХ является одной из самых быстрых ферментативных реакций в организме. В экспериментальных условиях АХЭ концевой пластинки человека гидролизует $1,21 \times 10^8$ молекул АХ за 1 мс. (Namba T., Grob D., 1970). Высокая скорость гидролиза холинэстеразой одной молекулы АХ (100 мкс.) гарантирует низкую вероятность повторной активации НХР одной и той же молекулой медиатора (Петров К.А. и др., 2014).

Описано участие АХЭ в процессах стресс-реакции, клеточной пролиферации и адгезии, а также в механизмах апоптоза (Алибекова Д.М. и др., 2018).

1.12. Строение и функция никотинового холинорецептора

НХР представляет собой лиганд-зависимый катионный канал, на поверхности которого имеются сайты связывания для агонистов и антагонистов, а также участки для связывания с модуляторами работы канала. В волокнах скелетных мышц постсинаптические НХР встречаются с высокой плотностью в нервно-мышечных соединениях на гребнях складок концевой пластинки, формируя кластеры, но практически отсутствуют вдоль остальной части волокна. Денервация мышцы резко меняет это распределение: мышечные волокна экспрессируют НХР равномерно по всей своей длине (Lomo T., 2016).

Белку рапсину отводят ведущую роль в поддержании стабильности постсинаптического каркаса кластеров НХР (Bruneau E., Akaaboune M., 2007; Lee Y., 2009). Более того, взаимодействие рапсина с кластерами НХР способствует более быстрому восстановлению нервно-мышечной передачи после десенситизации рецептора. Повышенная экспрессия рапсина в мышцах предотвращает деградацию НХР при экспериментальной аутоиммунной миастении (Cetin H. et al., 2019).

Встраивание рецептора в мембрану зависит от протеинкиназной активности мышечного волокна. Ингибирирование протеинкиназы С значительно уменьшает

количество рецепторов, но не влияет на вставку рапсина (Losen M. et al. 2005). Кроме того, еще в 1972 году T. Lomo и J. Rosenthal доказали, что прямая электрическая стимуляция денервированной мышцы восстанавливает чувствительность мышечных волокон к АХ. Из этого следует, что нервная и мышечная активность контролирует экспрессию НХР вне нервно-мышечного соединения (Lomo T., Rosenthal J., 1972).

По своей структуре рецептор представляет собой гетерологичный пентамер, состоящий из полипептидных цепей со стехиометрией $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (у взрослых позвоночных) и $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (у плода) (Grutter T., Changeux J., 2001; Tzartos C.J., Changeux J., 1983). γ -изоформа присутствует на эмбриональных стадиях онтогенеза и участвует в развитии нервно-мышечного синапса, в то время как ϵ -изоформа превалирует во взрослой мышце, за исключением, когда мышца денервирована. При этом γ -изоформа повторно экспрессируется в НХР на всем протяжении мембранны (Cetin H. et al., 2020). НХР способен менять свои свойства: мобильность, регулирование пропускной способности, группировка в кластеры, степень сенсибилизации к АХ. Фосфорилирование НХР *Torpedo* катализируется минимум четырьмя различными протеинкиназами (Gordon A.S. et al., 1977). Эти киназы представляют собой тирозин-специфическую протеинкиназу (сайты связывания: β Tyr-355, γ Tyr-364, δ Tyr-372), цАМФ-зависимую протеинкиназу (сайты связывания: γ Ser-354, δ Ser-361) и протеинкиназу С (сайты связывания: α Ser-333, δ Ser-377) (Huganir et al., 1984). Главным иммуногенным доменом в НХР, взаимодействующим с антителами, является внеклеточная последовательность, расположенная в районе N-конца α -субъединицы (последовательность α 63-80). Данные подтверждены экспериментально на животных моделях с использованием моноклональных антител (Tzartos C.J., Lindstrom J., 1980), а также методом с использованием протеолитических пептидов (Ratnam M. et al., 1986а) и фузионных белков (Barkas T., 1986).

Изучение структурно-функциональных свойств НХР необходимо для понимания механизмов, лежащих в основе трофических свойств холинергической нейросекреции в норме и при патологии, поскольку постоянно присутствующая

вследствие неквантового выброса наномолярная концентрация АХ в синаптической щели считается важнейшим условием для формирования, поддержания и модуляции синаптического нервно-мышечного взаимодействия.

1.13 Участие никотинового холинорецептора в регуляции трофики скелетной мышцы

Долгое время считалось, что функция НХР заключается исключительно в его роли в развитии деполяризации мембранны мышечного волокна, однако на сегодняшний день вклад НХР в систему регуляции трофических процессов в скелетных мышцах не вызывает сомнений. В миофибриллах, обработанных блокатором этих рецепторов панкуронием, отмечается увеличение проницаемости мембранны, снижение мембранного потенциала покоя, снижение интенсивности токов кальция и натрия. Данные изменения очевидны уже через 24 ч культивирования и отражаются на трофических свойствах мышечной ткани. Имеются свежие данные о том, что АХ, взаимодействуя с НХР, обеспечивает трофический сигнал, который посредством посттранскрипционной модификации субстрата предотвращает механизмы коннексин-опосредованной мышечной атрофии: а именно ингибирование синтеза и уменьшение активации *de novo* полуканального коннексина (CxHCs) в сарколемме. Встраивание данного протеина в мембранны мышечного волокна обеспечивает повышение проницаемости мембранны для внутриклеточного кальция и натрия, активацию ферментных систем, приводящих к катаболизму белков (системы Fbox32 и Trim63) и генов аутофагии (*Bnip3*) (Cisterna, B. A. et al., 2020).

В настоящее время изучение механизмов холинергической миопротекции представляется актуальным, поскольку позволяет заложить основы новых подходов в терапии заболеваний нервно-мышечного звена.

Именно в этом аспекте значительный интерес представляет исследование трофических изменений, в основе которых лежит функциональная и структурная связь НХР с трансмембранными насосными системами.

1.14 Участие Na^+/K^+ -АТФазы в поддержании функционального состояния скелетной мышцы

Классическим объектом исследования трансмембранных ионных градиентов долгое время служил гигантский аксон кальмара. Было продемонстрировано, что утраты Na^+ -градиента можно достичь гораздо быстрее, если выдерживать клетку в присутствии сердечного гликозида - строфантина или оуабаина (Schatzmann H.J., 1953). Позже J.C. Skou в 1957 году в ходе своих экспериментов впервые описал существование в клеточной мембране белковой структуры перекачивающей ионы натрия из клетки и ионы калия в клетку и проявляющей при этом АТФазную активность (Skou J.C., 1965; Bagrov A.Y., 2009).

Na^+/K^+ -АТФаза является интегральным трансмембранным олигомерным белком, превращающим энергию АТФ в энергию градиента одновалентных катионов, содержащим центры связывания и гидролиза АТФ, ионные центры, участки связывания с кардиотоническими стероидами. Фермент обладает способностью принимать несколько устойчивых конформаций, различающихся по сродству к переносимым ионам и ориентации ион-связывающих центров.

Функциональная единица фермента представлена глобулой, состоящей из двух пептидных цепей, называемых α - и β -субъединицами и регуляторной группой со специфической аминокислотной последовательностью, называемой FXYD-белками (Bagrov A.Y., 2009).

α -субъединица (110 кДа) состоит из 10 трансмембранных сегментов и содержит сайты связывания для ионов натрия, калия, АТФ и дигиталисоподобных факторов. Регуляторная β -субъединица (50 кДа) состоит из одного трансмембранного домена и участвует в трансляции, транспорте и стабилизации α -субъединицы в плазматической мембране. FXYD-белки связываются со специфическими доменами α/β -субъединичного комплекса и модулируют каталитические свойства Na^+/K^+ -АТФазы (Bagrov A.Y., 2009).

У млекопитающих известны четыре изоформы α -субъединицы ($\alpha 1-\alpha 4$), три изоформы β -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, а также семь белков семейства FXYD. Изоформа $\alpha 1$, экспрессируемая клетками всех тканей, предположительно выполняет основную функцию поддержания ионных градиентов. В большинстве случаев $\alpha 1$ -изоформа коэкспрессируется с одной из изоформ $\alpha 2-\alpha 4$, которые выполняют специфические для данной клетки функции (Matchkov V.V., Krivoi I.I., 2016).

Плотность распределения Na^+/K^+ -АТФазы в сарколемме составляет порядка 1000/мкм², благодаря чему в скелетных мышцах содержится один из основных пулов Na^+/K^+ -АТФазы, что важно для поддержания гомеостаза натрия и калия во всем организме в целом (Clausen T., 2003).

В скелетных мышцах человека представлено три изоформы α -субъединицы ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) Na^+/K^+ -АТФазы (Cherniavsky L.M. et. al., 2015). Основной пул составляет $\alpha 2$ -изоформа (87%). Данное распределение уникально для скелетной мышцы, в отличие от большинства других тканей, в большей степени экспрессирующих $\alpha 1$ -изоформу (Radzyukovich T.L., 2013).

Важнейшей группой природных регуляторов Na^+/K^+ -насоса являются сердечные гликозиды. Эти лиганды растительного и животного происхождения в высоких концентрациях являются ингибиторами Na^+/K^+ -АТФазы, а в низких модуляторами ее сигнальной функции. Данные вещества имеют эндогенные циркулирующие структурные аналоги, получившие название эндогенные дигиталисоподобные факторы (Hamlyn J.M. et al., 1991; Blaustein, M.P., 2020). Наибольший интерес представляют эндогенные оуабаин-подобные соединения, синтезируемые в корковом веществе надпочечников и гипоталамусе, гипофизе. Концентрация эндогенного оуабаина в плазме крови человека колеблется в наномолярном диапазоне (от 0.6 до 1.2 нМ) (Hamlyn J.M. et al., 1991; Schoner W., Scheiner-Bobis G., 2007). Растительные дигиталисоподобные факторы применяются для лечения сердечной недостаточности и наджелудочных тахиаритмий. В кардиомиоцитах ингибирование активности Na^+/K^+ -АТФазы сердечными гликозидами приводит к увеличению внутриклеточного натрия, а он в свою

очередь, посредством функционального связывания с системой $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена повышает концентрацию внутриклеточного кальция. Следствием увеличения концентрации Ca^{2+} является положительный инотропный эффект. Кроме того, интересен тот факт, что у пациентов с кардиологической и нефрологической патологией также наблюдалось повышение эндогенных дигиталисоподобных факторов в плазме крови (Akera T., Brody T.M., 1976).

Чувствительность различных изоформ α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы к кардиотоническим стероидам может различаться, но у грызунов это различие выражено в наибольшей степени. У этих животных $\alpha 1$ -изоформа мало чувствительна к оуабаину (константа блокирования составляет десятки и сотни мкМ), напротив, изоформы $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ - высокочувствительны к оуабаину (константа блокирования составляет десятки и сотни нМ). У других млекопитающих, включая человека, чувствительность $\alpha 1$ -изоформы к оуабаину лежит в наномолярном диапазоне концентраций (Dobretsov M., Stimers J.R., 2005; Cherniavsky L. M., 2015). Классическим объектом при изучении свойств сердечных гликозидов является куриный и утиный эмбрион (Лазарев Н.В., 1961).

В настоящее время интенсивно изучается участие эндогенных оуабаин-подобных соединений в механизмах регуляции, реализуемых через сигнальную функцию Na^+/K^+ -АТФазы (Xie, Z., 2015). В условиях органотипической культуры ткани было продемонстрировано, что оуабаин регулирует рост нейритов сенсорных нейронов спинальных ганглиев, эксплантатов ткани сердца и сетчатки 10-12 дневных куриных эмбрионов. Действие гликозида является дозозависимым и тканеспецифичным. (Лопатина и др., 2005; Пенниайнен и др., 2005; Лопатина и др., 2008; Lopatina E.V., Penniyainen V.A., 2005).

Предполагается существование двух пулов Na^+/K^+ -АТФазы, один из которых функционирует как ионный насос. Другой пул, преимущественно локализованный в кавеолах, образует молекулярный комплекс с EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) и Src-киназой (Cui X., Xie Z., 2017; Yu H., Cui X., 2018; Li Z., 2009) и участвует в мембранный и внутриклеточной сигнальной трансдукции (Wang Y., 2014). Выявлен участок α -субъединицы (так называемая

NaKtide последовательность), отвечающий за реализацию сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы и предположительно специфичный для $\alpha 1$ -изоформы Na^+/K^+ -АТФазы в скелетной мышце (Cui X., Xie Z., 2017). Предполагается, что связывание молекулы дигиталисоподобных факторов с комплексом $\alpha 1\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы/Src вызывает конформационные изменения фермента, которые запускают ряд сигнальных внутриклеточных каскадов (ERK1/2 и др.), влияющих на процессы апоптоза, пролиферацию, синтез белка, сократительные свойства, оказывающих протекторное действие (Кравцова В. В., Кривой И. И., 2021).

Снижение экспрессии белка $\alpha 1$ -изоформы α субъединицы на 30-40 %, не влияя на насосную функцию Na^+/K^+ -АТФазы, вызывает значительное снижение мышечной массы на 10% в камбаловидной мышце, состоящей преимущественно из медленных окислительных волокон. Напротив, масса мышц, состоящих из быстрых мышечных волокон, при дефиците $\alpha 1$ -изоформы α субъединицы оставалась неизменной. Данный эффект авторы объясняют тем, что быстрые гликолитические волокна экспрессируют $\alpha 1$ -изоформу α субъединицы в гораздо меньшей степени. (Kutz L.C., Mukherji S.T., 2018).

$\alpha 2$ -изоформа α субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы распределена в сарколемме в виде двух основных пулов. Большая часть $\alpha 2$ -изоформы локализована в Т-системе, где она участвует в поддержании работоспособности мышцы при накоплении калия в условиях интенсивной двигательной нагрузки (Radzyukevich T.L., 2013). Меньший пул $\alpha 2$ -изоформы α субъединицы локализован в постсинаптической области мембранны на концевой пластинке (Kravtsova V.V., 2016). Особенности локализации, межмолекулярных взаимодействий, функционирования и регуляции данного постсинаптического пула $\alpha 2$ -изоформы исследованы в меньшей степени (Кравцова В. В., Кривой И. И., 2021).

Насосная функция $\alpha 2$ -изоформы α субъединицы в создании электрохимического градиента изучена в достаточном объеме (DiFranco M., 2015). Интересен тот факт, что вклад в электрохимический градиент потенциала покоя, осуществляемый посредством $\alpha 2$ -изоформы α субъединицы, составляет 4–5 мВ, в то время как электрогенерирующий вклад $\alpha 1$ -изоформы α субъединицы

составляет 15–18 мВ, однако только 5% всех изоформ α субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы участвуют в поддержании электрохимического градиента в состоянии покоя (Clausen, T., et.al. 1987; Chibalin, A. V., et. al. 2012).

Мыши с генно-модифицированным отсутствием экспрессии $\alpha 2$ -изоформы α субъединицы (мутация гена *Atp1a2*), демонстрируют худшую переносимость физических нагрузок: снижение мышечной силы и повышение мышечной утомляемости, однако масса исследуемых мышц при этом остается неизменной. Увеличение экспрессии $\alpha 1$ -изоформы α субъединицы не в состоянии полностью компенсировать функциональные нарушения скелетных мышц, вызванных потерей $\alpha 2$ изоформы. Данные нарушения затрагивали все типы мышечных волокон, а результаты подтверждены генотипированием и иммуногистохимическими методами (Radzyukovich T.L., 2013).

Все вышеизложенное позволяет говорить о том, что Na^+/K^+ -АТФаза участвует в поддержании функционального состояния скелетной мышцы.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Клиническая часть исследования

2.1.1. Характеристика участников исследования

Объектами клинической части исследования являлись пациенты с предварительным диагнозом ХВДП и здоровые добровольцы. Контрольную группу составляли 25 здоровых добровольцев (мужчин 14, женщин 11) в возрасте от 42 от 60 лет (средний возраст 55 лет).

Обследовано 38 пациентов (мужчин 22, женщин 16) экспериментальной группы, которые были госпитализированы в отделения неврологии ФБГУЗ ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова и ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова за период с 2017 по 2021 годы с целью подтверждения или исключения диагноза, обследования, прохождения курса консервативной терапии и реабилитационных мероприятий. Возраст больных составил от 36 до 66 лет (средний возраст 52 года). От каждого участника исследования было получено письменное информированное согласие. Форма и содержание информированного согласия утверждены на заседании Локального Этического комитета ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова от 22.11.2017 г. 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.

2.1.2 Методы исследования

В ходе работы проводились: клинико-неврологический осмотр, нейрофизиологическое обследование и лабораторное исследование. Влияние физиологически активных веществ и плазмы крови больных исследовали экспериментально в условиях органотипического культивирования ткани скелетной мышцы (см. раздел 2.2).

2.1.2.1 Клинико-неврологический метод

Клинико-неврологическое исследование проводили по общепринятым 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, сопутствующую патологию и неврологический статус. Инвалидизацию пациентов оценивали по шкале ODSS INCAT, тяжесть состояния по Шкале невропатических нарушений (Neuropathy Impairment Scale, NIS) (Dyck P.J. et. al., 1997). Мышечную силу оценивали по пятибалльной 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.

2.1.2.2 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-04А) с частотой вращения 2500 об/мин в течение 10 мин для получения плазмы крови. Лабораторно в плазме крови исследовали уровни гемоглобина (г/л),

лейкоцитов ($\times 10^9/\text{л}$), тромбоцитов ($\times 10^9/\text{л}$), СОЭ (мм/ч), С-реактивного белка (СРБ) (мг/л), общего белка (г/л), уровень глюкозы (ммоль/л), уровни КФК (ЕД/л), ЛДГ (ЕД/л).

Люмбальную пункцию проводили по общепринятому протоколу с последующим анализом ЦСЖ (белок (г/л), цитоз).

Для определения в плазме крови больных ХВДП и здоровых добровольцев уровня антител к НХР (нмоль/л) использовали метод иммуноферментного анализа (ИФА).

В настоящем исследовании был использован коммерческий иммуноферментный набор Medizym anti-AChR (ELISA Kit), фирмы «Medipan GMBH». Уровень антител измеряли в полном соответствии с протоколом и инструкцией производителя. В наборе Medizym anti-AChR (ELISA Kit) используется метод конкурентного ИФА с использованием антигена НХР и коньюгата AchRAb-HRP. Образец для анализа (плазма крови) и буферный раствор с коньюгатом AchRAb-HRP инкубировали совместно в предварительно подготовленном планшете, содержащем 96 ячеек, в течение одного часа. По истечении периода инкубации ячейки декантировали и пятикратно промывали. Продукт ферментативно-субстратной реакции образует комплекс синего цвета. Для остановки ферментативной реакции в образцы добавляли стоп-раствор, после чего содержимое ячеек окрашивалось в желтый цвет. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически в ридере для микропланшетов при длине волны 450 нм. (спектрофотометр Multiskan SkyHigh (200-1000 нм) фирмы Thermo Fisher Scientific) Интенсивность цвета была обратно пропорциональна концентрации антител к НХР, т.к. антитела из образцов и коньюгат AchRAb-HRP конкурировали за сайт связывания антигена НХР. Поскольку количество сайтов ограничено: чем больше сайтов занято антителами к НХР из образца, тем меньше сайтов остается для связывания коньюгата AchRAb-HRP. На основании полученных данных строили кривую, связывающую интенсивность окраски с концентрацией исследуемых антител. Пороговая величина определения составила - 0,01 нмоль/л.

2.1.2.3 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 оценивали 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 рекрутование 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. brachioradialis*.

2.2 Экспериментальная часть исследования

2.2.1 Метод органотипического культивирования ткани

Органотипическое культивирование ткани является классической методикой изучения трофотропных свойств лекарственных препаратов и физиологически активных веществ. Метод позволяет стандартизировать условия эксперимента, исключить системные влияния организма на изучаемые процессы, сохранить клеточное сообщество исследуемых тканей. В настоящем исследовании разработаны модели органотипического культивирования ткани скелетной мышцы и мышечного компонента ХВДП *in vitro*. Термин мышечный компонент ХВДП описывает состояние первично-мышечного повреждения скелетной мышцы, которым, согласно нашей рабочей гипотезе, может сопровождаться развитие ХВДП *in vivo*.

2.2.2 Объект культивирования и состав среды

Исследования проводили на 10-12-дневных куриных эмбрионах. Объектами исследования являлись культивируемые эксплантаты ткани мышцы голени. Трофические свойства веществ и плазмы крови изучали в различных комбинациях и в широком диапазоне концентраций. На каждую изучаемую концентрацию приходилось 540 контрольных и 540 экспериментальных

эксплантатов. В работе использовали среду с pH 7.2. Состав среды (Лопатина Е.В и др., 2005) представлен в таблице 1.

Таблица 1. Состав питательной среды.

Компонент	Производитель	Содержание в среде на 100 мл
Раствор Хенкса	Биолот, Россия	50 мл
Среда Игла МЕМ	Биолот, Россия	40 мл
Сыворотка эмбриональная телячья (FBS)	Thermo Fisher Scientific, США	8,5 мл
Глюкоза 40%	Новосибхимфарм, Россия	0,5 мл
Ципрофлоксацин (2 МГ/мл)	Кургансинтез, Россия	1 мл

В работе использовали следующие реагенты:

1. Ацетилхолин (Мосхимфармпрепараты, Россия)-неспецифический агонист холинорецепторов;
2. Оуабаина октагидрат (Sigma, США)-ингибитор Na^+/K^+ -АТФазы;
3. d-тубокуарина хлорид (Sigma, США)-антагонист НХР.

Исследуемые вещества и плазму крови больных ХВДП добавляли в экспериментальные чашки Петри в широком диапазоне концентраций и разведений. За контрольные принимали эксплантаты, культивируемые в условиях питательной среды стандартного состава.

Методика работы с плазмой крови пациентов с заболеваниями нервно-мышечного аппарата была отработана нами ранее (Соколова М.Г и др., 2014, Соколова М.Г и др., 2015, Соколова М.Г и др., 2016, Соколова М.Г., Гавриченко А.В., 2020).

2.2.3 Препаровка ткани скелетной мышцы и процедура культтивирования

Препарирование ткани скелетной мышцы проводили в ламинаре в стерильных условиях. Яичную скорлупу протирали 70% спиртом. Стерильным пинцетом разбивали скорлупу над воздушным мешком (с тупого конца яйца) и удаляли осколки скорлупы, скорлуповую и хориоаллантоисную мембранны. С помощью пинцета переносили эмбрион за шею на препаровальный столик. Эмбрион поворачивали на спинку и расправляли крылья. Ножницами ампутировали голени и помещали в чашку Петри диаметром 90 мм с небольшим количеством питательной среды, расположенную на хладагенте. Кожу отделяли от голени и осуществляли забор материала (фрагменты мышц голени размером 0,5-1 мм), который помещали в стерильные чашки Петри диаметром 40 мм на коллагеновую подложку.

Каждая чашка Петри содержала 20 эксплантатов ткани скелетной мышцы. Для прикрепления эксплантатов к коллагеновой подложке чашки Петри помещали в термостат при температуре 36,8⁰ С на 10 минут. Далее заливали в чашки по 3 мл питательной среды и ставили в термостат на 30 минут. Затем извлекали чашки Петри из термостата и добавляли в питательную среду исследуемые вещества. Культивирование эксплантатов осуществляли при 37⁰ С и 5% CO₂ в течение 48 часов в CO₂ инкубаторе («Binder», Германия). Спустя трое суток культивирования чашки Петри извлекали из CO₂ инкубатора и исследовали.

Учитывая неоднородность морфологической картины эксплантатов, с целью унификации конечных показателей степени роста исследуемой ткани, для ее количественной оценки использовали морфометрический относительный критерий - индекс площади (ИП), который рассчитывали, как отношение площади всего эксплантата к площади центральной зоны (рисунок 1).

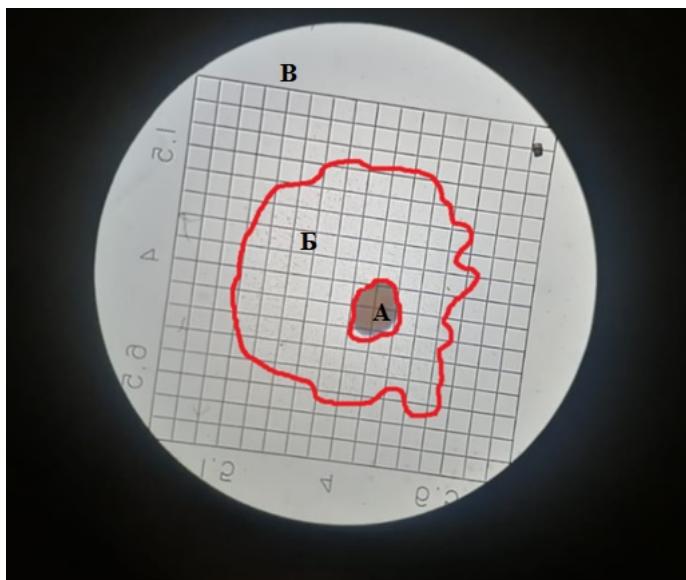


Рисунок 1. Морфометрический анализ эксплантата ткани скелетной мышцы. 3-и сутки культивирования в органотипической культуре. А – центральная зона, Б – зона роста, В-коллагеновая подложка.

За условную единицу площади принимали квадрат оккуляр-сетки микроскопа, сторона квадрата которого при увеличении 3.5×10 равна 150 мкм. Значение индекса площади контрольных эксплантатов принимали за 100%. Контрольными служили эксплантаты, развивающиеся в условиях питательной среды стандартного состава.

На эксплантатах ткани скелетной мышцы через трое суток культивирования выделяются две зоны – центральная (более плотная) и периферическая, которая расположена радиально в виде характерного ореола вокруг центральной зоны. Периферическая – зона роста представлена пролиферирующими миоцитами, а также некоторым количеством фибробластов. Миоциты зоны роста представляют собой веретенообразные одноядерные клетки. Фибробласты эксплантатов ткани скелетной мышцы – крупные полигональные клетки с большим овальным ядром и ножками (рисунок 2).

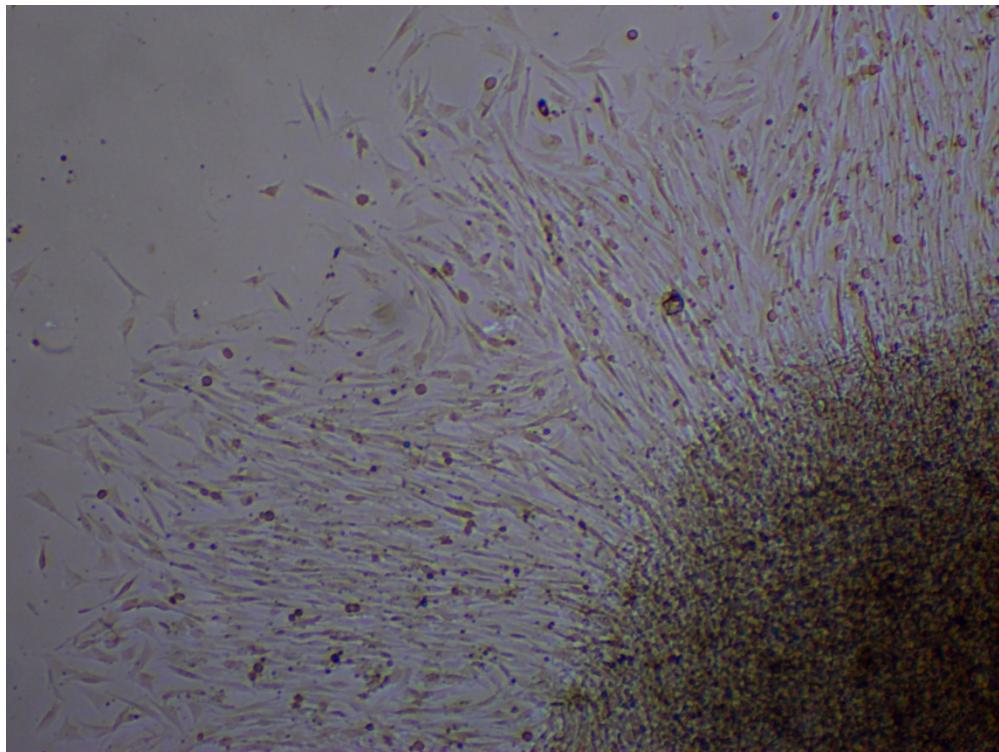


Рисунок 2. Микрофотография эксплантата ткани скелетной мышцы 10-12-дневного куриного эмбриона. 3-и сутки культивирования (ув. $\times 100$). Контроль. Проходящий свет. Метод световой микроскопии.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Результаты клинической части исследования

3.1.1 Результаты клинико-неврологического 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.). Все пациенты имели типичную форму заболевания. Прогрессирующее течение заболевания было у 9 больных, ступенчатое у 3-х, ремитирующее-рецидивирующее течение наблюдалось у 20 человек (рисунок 3).

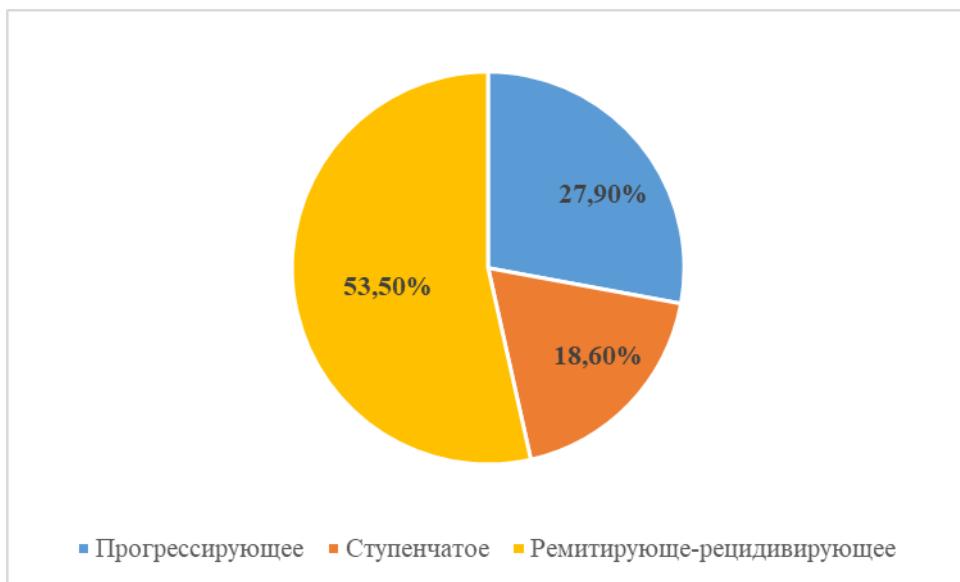


Рисунок 3. Характер течения заболевания обследованных пациентов с диагнозом ХВДП.

Пациенты с ХВДП предъявляли следующие жалобы: слабость в стопах и голенях (100%), слабость в бедрах (31%), слабость в кистях и предплечьях (86,8%), повышенная утомляемость мышц при физической нагрузке (86,8%), похудание ног (83,7%), похудание рук (18,6%), онемение в ногах (100%),

онемение в руках (83,7%), шаткость и неустойчивость при ходьбе (86,8%), дрожание в руках (43,4%), головные боли (12,4%), общая слабость (27,9%).

При оценке неврологического статуса у пациентов с ХВДП были выявлены следующие симптомы: общемозговые симптомы – астения, эмоциональная лабильность, головная боль давящего характера; расстройства чувствительности: снижение глубокой (суставно-мышечной и вибрационной) чувствительности по полиневритическому типу, снижение болевой, температурной и тактильной чувствительности по полиневритическому типу, гипестезия кожи лица. Нарушения в двигательной сфере: симметричные двигательные нарушения в виде нижнего дистального парапареза или дистального тетрапареза, у пациентов отмечалось снижение мышечной силы от 4-х до 0 баллов по пятибалльной шкале мышечной силы (MRC), симметричные атрофии в мышцах проксимальных отделов ног и рук, симметричные атрофии в мышцах дистальных отделов ног и рук, симметричные атрофии в мышцах проксимальных отделов ног и рук, фасцикуляции в мышцах ног и рук. Экстрапирамидные нарушения в виде симметричного тремора рук. Координаторные нарушения: синдром сенситивной атаксии. Нарушения вегетативной иннервации: снижения красного дермографизма кожи кистей и стоп (таблица 2).

Таким образом, в неврологическом статусе у пациентов с ХВДП выделены следующие синдромы: синдром двигательных расстройств по полиневритическому типу, синдром чувствительных расстройств по полиневритическому типу, атактический синдром, синдром экстрапирамидных нарушений гиперкинетического типа, цефалгический синдром, астено-невротический синдром, невропатия тройничного нерва, цефалгический синдром (таблица 3).

Таблица 2. Выявленные неврологические нарушения у пациентов с диагностированной ХВДП.

Неврологическое нарушение симптомы	Доля (в %) от общего числа пациентов (n=32)
Астения	27,9%
Эмоциональная лабильность	27,9%
Головная боль	12,4%
Снижение глубокой чувствительности	77,5%
Снижение болевой, тактильной и температурной чувствительности	58,9%
Гипестезия кожи лица	15,5%
Симметричный нижний дистальный парапарез	74,4%
Симметричный дистальный тетрапарез	27,9%
Атрофии в мышцах проксимальных отделов ног	12,4%
Атрофии в мышцах проксимальных отделов рук	12,4%
Атрофии в мышцах дистальных отделов ног	83,7%
Атрофии в мышцах дистальных отделов рук	40,6%
Фасцикуляции в мышцах ног	43,6%
Фасцикуляции в мышцах рук	27,9%
Симметричный трепет рук	43,6%
Сенситивная атаксия	77,5%
Нарушения вегетативной иннервации	16,6%

Таблица 3. Выделенные синдромы у пациентов с диагностированной ХВДП.

Выявленный синдром	Доля (в %) от общего числа пациентов (n=32)
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%

У пациентов с ХВДП выявлена сопутствующая патология: гипертоническая болезнь (49,6%), дегенеративно-дистрофическое заболевание позвоночника (62%), цереброваскулярная болезнь (40,3%), язвенная болезнь желудка (15,5%).

По шкале инвалидизации у больных ХВДП 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 пациентом составил 30,5 балла.

3.1.2 Лабораторные результаты

По результатам лабораторного исследования плазмы крови больных ХВДП выявлено: среднее значение уровня гемоглобина составило 138 г/л; лейкоцитов $4 \times 10^9/\text{л}$; тромбоцитов $255 \times 10^9/\text{л}$; 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 ($0,47 \pm 0,087$ нмоль/л) статистически выше, чем в контрольной группе здоровых добровольцев ($0,02 \pm 0,004$ нмоль/л) ($p < 0,01$). Уровень антител к 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 (таблица 4).

Таблица 4. Уровень антител к никотиновым холинорецепторам (по результатам ИФА сыворотки крови) у больных ХВДП и здоровых добровольцев ($p < 0,01$).

	Количество антител к никотиновым холинорецепторам (нмоль/л)		
	min	max	Среднее значение
Контроль (n=25)	0	0,09	$0,02 \pm 0,004$
ХВДП (n=32)	0,1	1,8	$0,47 \pm 0,087$

Результаты лабораторных исследований свидетельствуют о наличии признаков воспалительных изменений в крови (относительный лимфоцитоз, повышение СРБ, СОЭ) и ЦСЖ (повышение уровня белка и белково-клеточная диссоциация в ликворе) у пациентов с ХВДП. У ряда пациентов с ХВДП имелись

лабораторные признаки активного атрофического процесса в скелетных мышцах (повышение уровня КФК и ЛДГ).

3.1.3 Результаты нейрофизиологического исследования

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. Медиана СПИ по моторным волокнам малоберцовых нервов составила 25 м/сек, большеберцовых 27 м/сек, срединных 29 м/сек, локтевых 32 м/сек. Снижение СПИ по сенсорным волокнам отмечалось также в большеберцовых (68%), малоберцовых (60%) и локтевых (48%) нервах. Медиана дистальной латентности М-ответа при стандартном расстоянии 8 см. по волокнам большеберцовых нервов составила 11,4 мсек. (регистрация с *m.abductor hallucis*), глубоких малоберцовых 12,9 мсек. (регистрация с *m.tibialis ant.*), срединных 9,5 мсек. (регистрация с *m.abductor pollicis brevis*), локтевых 10,4 мсек. (регистрация с *m.abductor digiti minimi*).

Патологическая темпоральная дисперсия М-ответа в волокнах большеберцовых нервов обнаружена у 27,9% больных, малоберцового у 21,7%, срединного у 15,5% и локтевого у 9,3%. Наличие блоков проведения по моторным волокнам большеберцовых нервов обнаружено у 9,3% обследуемых, малоберцовых у 12,4%, срединных у 3,1% и локтевых у 3,1%.

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%). Подострые денервационные изменения включали в себя наличие спонтанной активности мышечного волокна (93%), а также сниженное рекрутирование ПДЕ (77,5%). Хронические денервационно-реиннервационные изменения включали в себя изменения морфологии ПДЕ: наличие

высокоамплитудных ПДЕ (52,7%), увеличение длительности ПДЕ (46,5 %), наличие полифазных ПДЕ (68,2%). Медиана длительности ПДЕ в денервированных мышцах составила 13,5 мсек (таблица.5).

Таблица 5. Результаты игольчатой ЭМГ у пациентов с ХВДП.

Выявленные денервационно-реиннервационные изменения	Доля (в %) от общего числа пациентов (n=32)
Наличие спонтанной активности мышечного волокна	93%
Снижение рекрутования ПДЕ	77,5%
Наличие полифазных ПДЕ	68,2%
Увеличение длительности ПДЕ	46,5%
Наличие высокоамплитудных ПДЕ	52,7%

Таким образом, у большинства пациентов с ХВДП выявлены клинические и нейрофизиологические признаки денервационно-реиннервационного процесса, клинически проявляющегося развитием неврогенного атрофического синдрома, обуславливающего степень тяжести течения заболевания и инвалидизации больных.

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).

Пациентам с подтвержденным диагнозом ХВДП (диагноз достоверный по критериям EFNS/PNS 2010) был произведен забор венозной крови для последующего изучения трофических свойств плазмы в условиях органотипического культивирования. Приводим пример клинического наблюдения больного Х., с диагнозом ХВДП. Диагноз достоверный по критериям EFNS/PNS 2010. Типичная форма.

Пациент Х. 52 лет поступил в отделение неврологии №2 клиники НИИ неврологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» в удовлетворительном состоянии с жалобами на слабость в ногах, мышечную утомляемость, трудности при подъеме по лестнице, онемение стоп, ощущение непроизвольных подергиваний в мышцах рук и ног.

Анамнез заболевания. Пациент Х. считает себя больным с 2012 года, когда впервые отметил трудности при ходьбе. За медицинской помощью не обращался. В 2015 году впервые обратился к неврологу по месту жительства с жалобами на нарастание слабости в ногах, снижение мышечной массы, онемение ног. Диагноз: полиневропатия нижних конечностей неуточненная. Проводился курс консервативной терапии нейрометаболическими препаратами без значимой динамики. С 2015 по 2020 год за медицинской помощью не обращался, отмечал снижение мышечной силы в ногах. С 2020 года отмечает появление слабости в мышцах кисти.

Неврологический статус: сознание ясное, больной ориентирован в себе и в окружающей обстановке, контактен, эмоциональный фон ровный. Высшие мозговые функции не нарушены. Оценка функций черепных нервов: зрачки D=S, прямая и содружественная реакция зрачков на свет живая, симметричная. Движения глазных яблок в полном объеме. Диплопии и нистагма не выявлено. Пальпация точек выхода тройничного нерва безболезненна. Нарушения чувствительности на лице не выявлялись. Роговочный рефлекс средней живости D=S. Мимическая и жевательная мускулатура сохранна D=S. Надбровный, подбородочный рефлексы средней живости D=S. Слух сохранен. Дисфагии,

дисфонии, назолалии не выявлено. Мягкое нёбо подвижно. *Uvula* расположена по средней линии; глоточный рефлекс сохранен. Язык по средней линии. Рефлексы орального автоматизма не выявлены.

Чувствительная система. Симметричные нарушения поверхностной чувствительности: гипестезия в ладонях, стопах и голенях. Симметричные нарушения мышечно-суставной чувствительности в виде гипестезии в стопах и голенях. Симметричное снижение вибрационной чувствительности до 4 секунд в стопах (латеральные лодыжки), до 6 секунд в руках (шиловидные отростки лучевых костей).

Двигательная система. При осмотре выявлены гипотрофии мышц тенара на руках (рисунок 4) и гипотрофии мышц стоп, голеней и бедер (рисунок 5), умеренно выраженные фасцикуляции в мышцах рук (дельтовидных, бицепсах плеча, червеобразных, межкостных, коротких сгибателей и разгибателей пальцев) и ног (четырехглавых, икроножных, передних большеберцовых). Мышечный тонус симметрично снижен на руках и ногах. Значения мышечной силы в руках и ногах представлены в таблице 6 и таблице 7.

Таблица 6. Мышечная сила по пятибалльной шкале MRC в руках пациента X (52 г.) с диагнозом ХВДП.

Мышечная группа	Сила (балл)	
	Слева	Справа
Аддукторы плеча	5	5
Абдукторы плеча	5	5
Сгибатели предплечья	5	5
Разгибатели предплечья	5	5
Сгибатели кисти	4	4
Разгибатели кисти	4	4
Сгибатели пальцев	4	4
Разгибатели пальцев	4	4

Таблица 7. Мышечная сила по пятибалльной шкале MRC в ногах пациента X (52 г.) с диагнозом ХВДП.

Мышечная группа	Сила (балл)	
	Слева	Справа
Сгибатели бедра	5	5
Разгибатели бедра	5	5
Сгибатели голени	5	5
Разгибатели голени	5	5
Подошвенные сгибатели стопы	4	4
Тыльные сгибатели стопы	4	4
Подошвенные сгибатели пальцев стопы	3	3
Тыльные сгибатели пальцев стопы	3	3

Рефлекторная сфера. Глубокие рефлексы с рук: сгибательно-локтевой рефлекс D=S снижен, разгибательно-локтевой рефлекс D=S снижен, карпорадиальный рефлекс D=S, снижен. Патологические кистевые знаки: не выявлены. Глубокие рефлексы с ног: коленный рефлекс S=D отсутствует, ахиллов рефлекс D=S отсутствует. Патологические стопные знаки не выявлялись. Брюшные рефлексы: верхний, средний и нижний снижены с двух сторон.

Экстрапирамидная система. Мелкоразмашистый симметричный интенционный трепор в кистях.

Координаторные нарушения: в позе Ромберга неустойчив, признаки сенситивной атаксии; координаторные пробы выполняет уверенно.

Менингеальных знаков не выявлено. Функции тазовых органов не нарушены.

По шкале инвалидизации ODSS INCAT в руках результат составил 2 балла, в ногах 3 балла. По Шкале невропатических нарушений (NIS - Neuropathy Impairment Score) результат составил 30 баллов.



Рисунок 4. Атрофии межкостных мышц пациента X (52 г.) с диагнозом ХВДП.



Рисунок 5. Атрофии в ногах пациента X (52 г.) с диагнозом ХВДП.

Результаты инструментальных методов исследования (ЭНМГ, ЭМГ).

При выполнении стимуляционных проб нервов рук и ног дистальные латентности М-ответов увеличены, снижены скорости проведения по нервам рук и ног. СПИ по большеберцовому нерву слева 21 м/сек, справа 23 м/сек. (рисунок 6). СПИ по

малоберцовому нерву слева 23 м/сек, справа 22 м/сек. Локтевому нерву слева 28 м/сек, справа 29 м/сек. Отмечается дисперсия М-ответов. Латентности F-волн увеличены. Сенсорные ответы в нервах ног вызвать не удалось, снижена амплитуда сенсорных ответов в нервах рук. Признаки вторичного аксонального повреждения моторных и сенсорных волокон нервов ног. Снижение амплитуд М-ответов при дистальных стимуляциях малоберцовых (0,1 мВ слева, 0,1 мВ справа), большеберцовых (0,3 мВ слева, 0,2 мВ справа), локтевых (2,4 мВ слева, 3,1 мВ справа) нервов. При проведении игольчатой ЭМГ в *m. tibialis anterior*, *m. gastrocnemius*, *m. interosseus I* с двух сторон регистрируются денервационные изменения в виде увеличения амплитуды и длительности ПДЕ, снижения рекрутования ПДЕ, наличием спонтанной активности мышечного волокна. Заключение: признаки выраженного демиелинизирующего повреждения моторных и сенсорных волокон нервов ног и рук с умеренным вторичным аксональным повреждением.

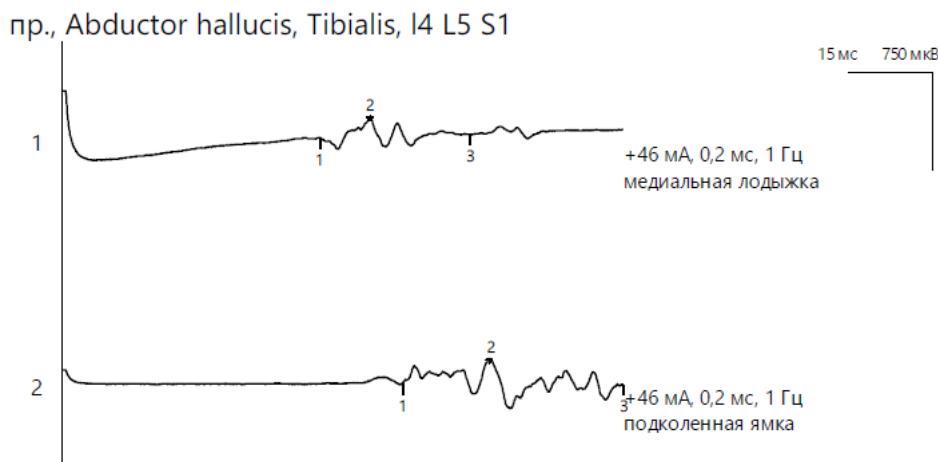


Рисунок 6. Больной Х. (52 г.) с диагнозом ХВДП. Результат стимуляционной ЭНМГ правого большеберцового нерва. Выраженное снижение СПИ и увеличение дистальной латентности М-ответа. Отмечается снижение амплитуды М-ответа, регистрируемого с *m. abductor hallucis*.

Магнитно-резонансная томография пояснично-крестцового отдела позвоночника с контрастным усилением. Выявлены признаки остеохондроза, спондилоартроза поясничного отдела позвоночника. Протрузии межпозвонковых

дисков в сегментах L4-L5, L5-S1, компрессии нервных структур не выявлено. Признаки утолщения конского хвоста. После введения контрастного препарата отмечается его накопление в нервах конского хвоста.

Ультразвуковое исследование нервов ног. Выявлено увеличением площади поперечного сечения седалищного и общего малоберцового нервов с двух сторон.

Результаты лабораторных исследований. Клинический анализ крови и общий анализ мочи в пределах нормы. В биохимическом анализе крови выявлено повышение КФК (243 Е/л) и ЛДГ (203 Е/л), умеренное повышение СРБ до 6 мг/л. В ЦСЖ отмечается повышение уровня белка (808 мг/л) при уровне цитоза 4 кл/мкл. Уровень антител к НХР в сыворотке крови составил 1,8 нмоль/л.

Клинический диагноз. На основании данных неврологического статуса, инструментальных и лабораторных исследований пациенту Х. выставлен диагноз: ХВДП. Типичная форма. Диагноз достоверный по критериям EFNS /PNS от 2010 года.

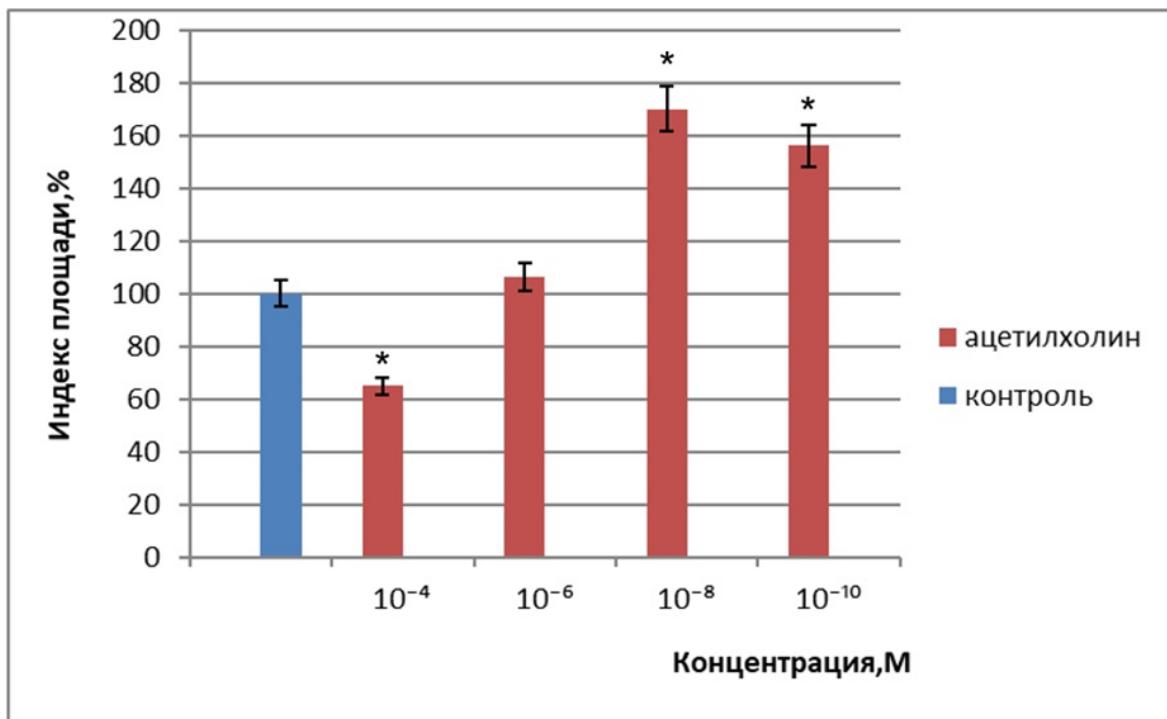
Результаты экспериментального исследования плазмы крови больного Х. в условиях органотипического культивирования совпали с данными других пациентов. Эти данные подробно будут описаны в разделе 3.2.6.

3.2 Результаты экспериментальной части исследования

3.2.1 Влияние ацетилхолина на рост эксплантов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов

Влияние АХ на рост эксплантов 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 эксплантов 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 эксплантов был выше контрольного значения на 70% ($p<0,05$). В концентрации 10^{-6} М АХ на рост экспериментальных эксплантов не

влиял. В дозе 10^{-4} М АХ ингибирировал рост мышечной ткани на 35% ($p < 0,05$). Действие АХ, направленное на регуляцию роста эксплантов ткани скелетной мышцы, зависело от его дозы (рисунок 7). Впервые в прямых экспериментах обнаружен миостимулирующий эффект АХ в концентрациях, сопоставимых с его неквантовым выбросом.



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

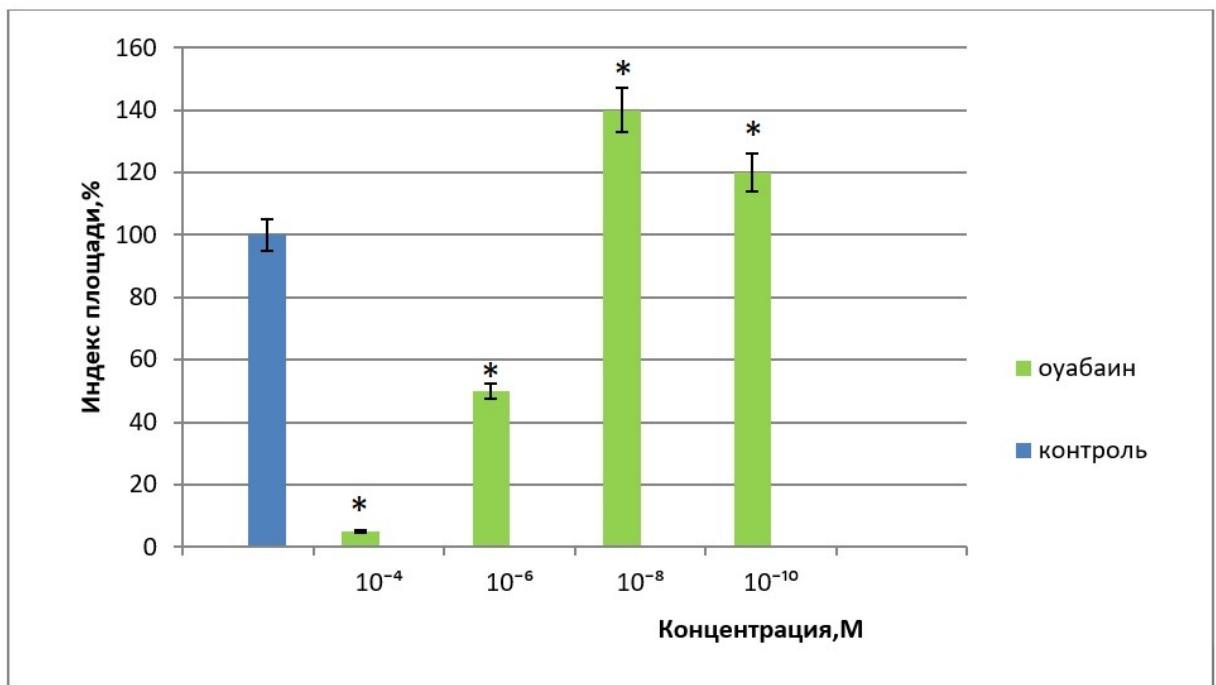
Рисунок 7. Ацетилхолин дозозависимо регулирует рост эксплантов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.

3.2.2 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, в которой анализировали эффект оуабаина в диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-10} М. В концентрации 10^{-4} оуабайн практически полностью ингибирировал рост экспериментальных эксплантов. В концентрации 10^{-6} М препарат также проявил миотоксический эффект и индекс площади экспериментальных эксплантов 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 8). 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.



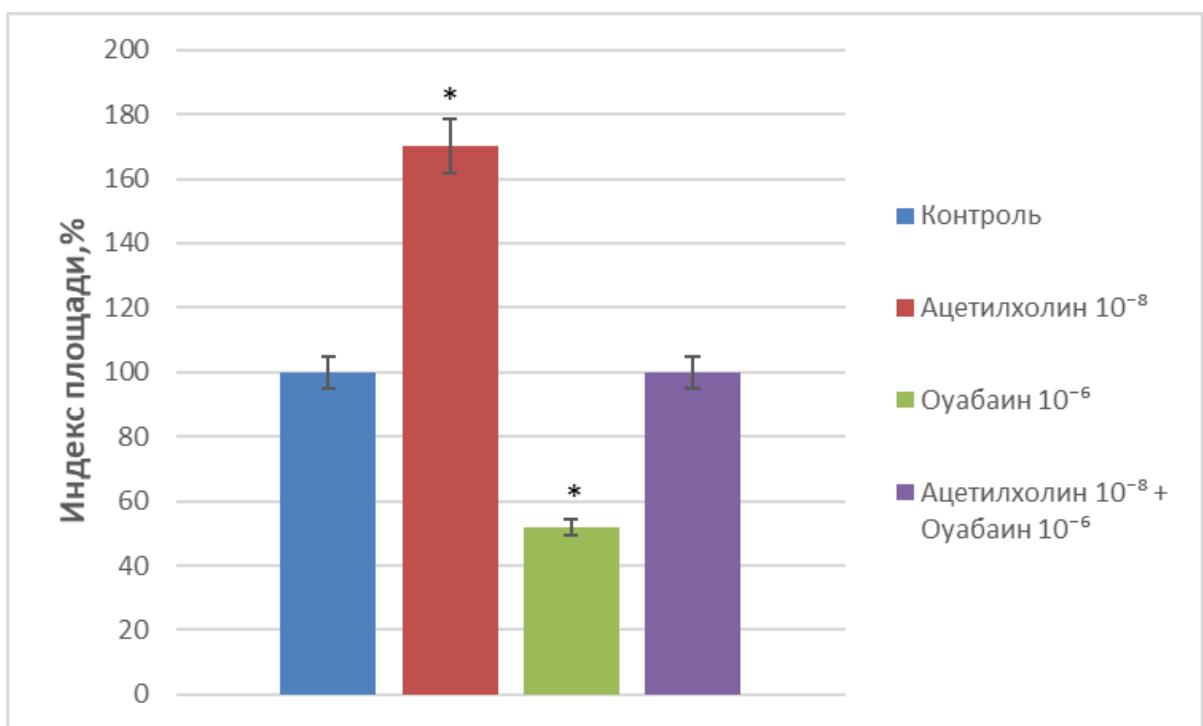
* – $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля

Рисунок 8. Оуабаин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.

3.2.3 Участие неквантово выделяемого 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 оуабайн 10^{-6} М. Обнаружено, что АХ нивелирует миотоксический эффект оуабайна. Индексы площади экспериментальных эксплантатов значимо не отличались от контрольных значений (рисунок 9).



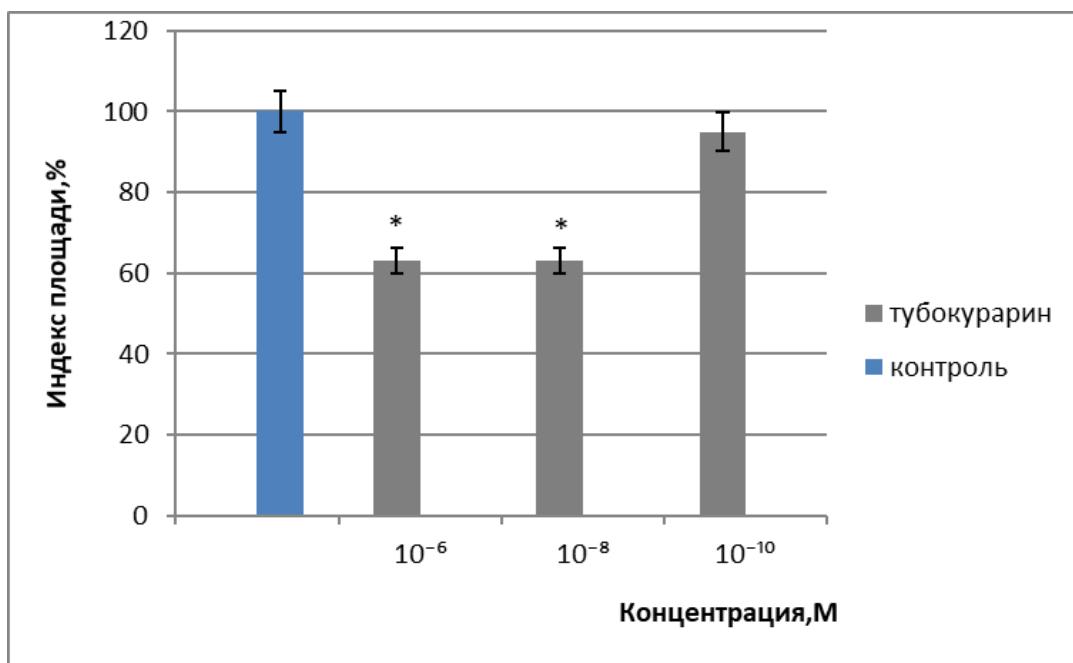
*- $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля

Рисунок 9. Ацетилхолин в концентрации 10^{-8} М нивелирует миотоксический эффект оуабайна (10^{-6} М).

3.2.4 Влияние d-тубокуарина 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-тубокуарина. 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-тубокуарин не влиял на рост

экспериментальных эксплантов, индексы площади эксплантов значимо не отличались от контрольных значений (рисунок 10).

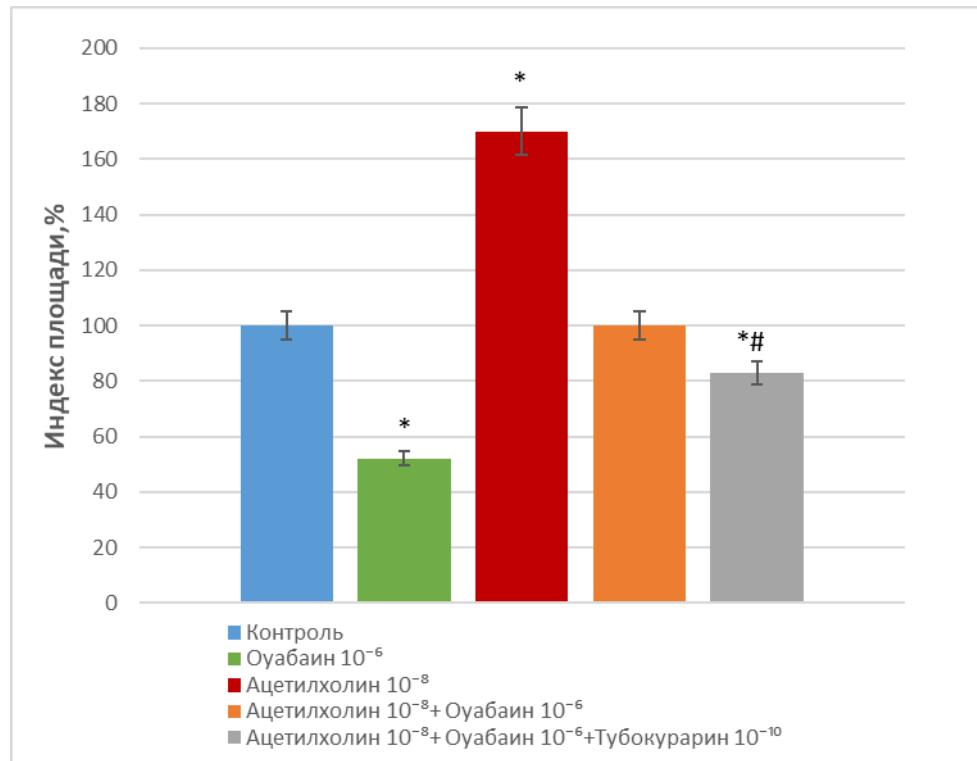


*- $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля

Рисунок 10. Влияние d-тубокуарина на рост эксплантов ткани скелетной мышцы 10-12-дневных куриных эмбрионов.

3.2.5 Механизм трофотропного действия «неквантового» ацетилхолина в норме

С целью определения механизма миостимулирующего действия «неквантового» АХ в питательную среду, содержащую АХ (10^{-8} М), ouабаин в ингибирующей концентрации (10^{-6} М) добавляли d-тубокуарин в дозе 10^{-10} М. При добавлении в питательную среду d-тубокуарина, АХ (10^{-8} М) полностью не устранил ингибирующее действие ouабаина (10^{-6} М). Индексы площади экспериментальных эксплантов 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.11).

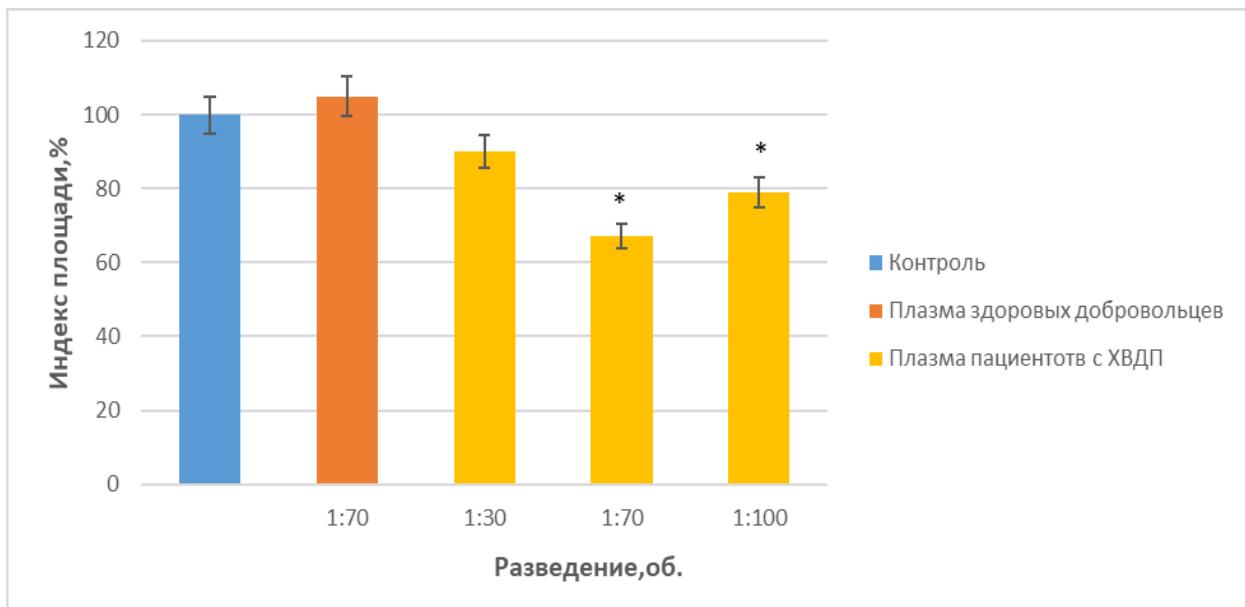


*– $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля
 #– $p<0.05$, достоверные различия относительно оуабаина 10^{-6}

Рисунок 11. В условиях одновременного ингибиования НХР и Na^+/K^+ -АТФазы трофотропный эффект ацетилхолина в концентрации 10^{-8} М отсутствует.

3.2.6 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 12). Плазма крови здоровых добровольцев не влияла на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы 10-12 дневных куриных эмбрионов.

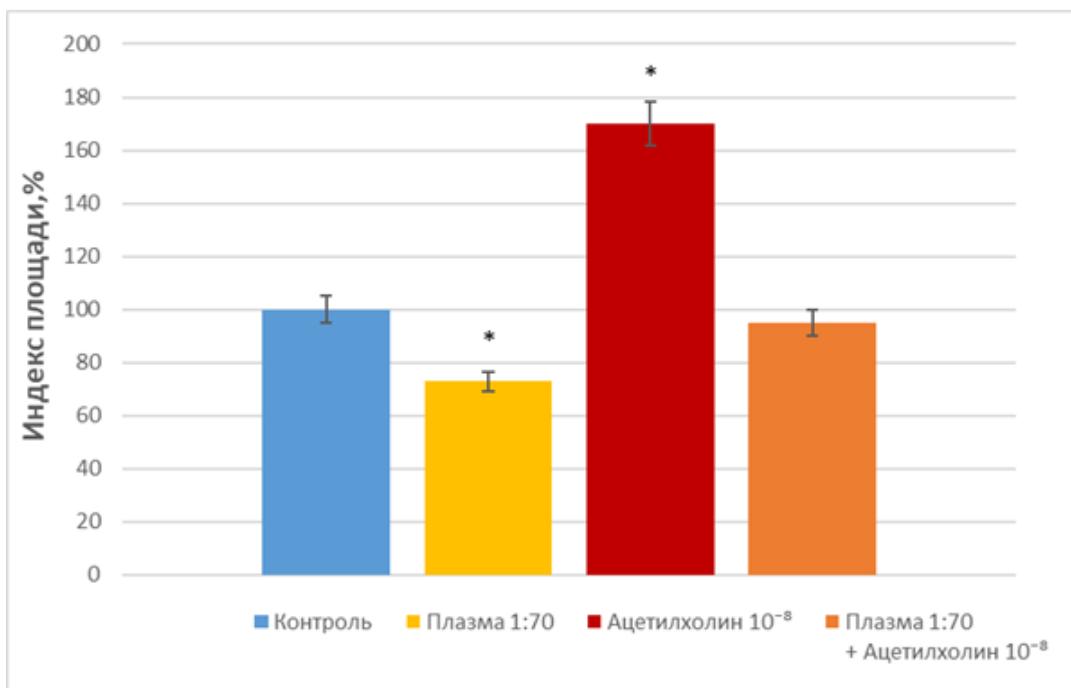


*- $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля

Рисунок 12. Миотоксическое действие плазмы крови пациентов с ХВДП.

3.2.7 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, экспланаты 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 экспланатов значимо не отличались от контрольных значений (рисунок 13).



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

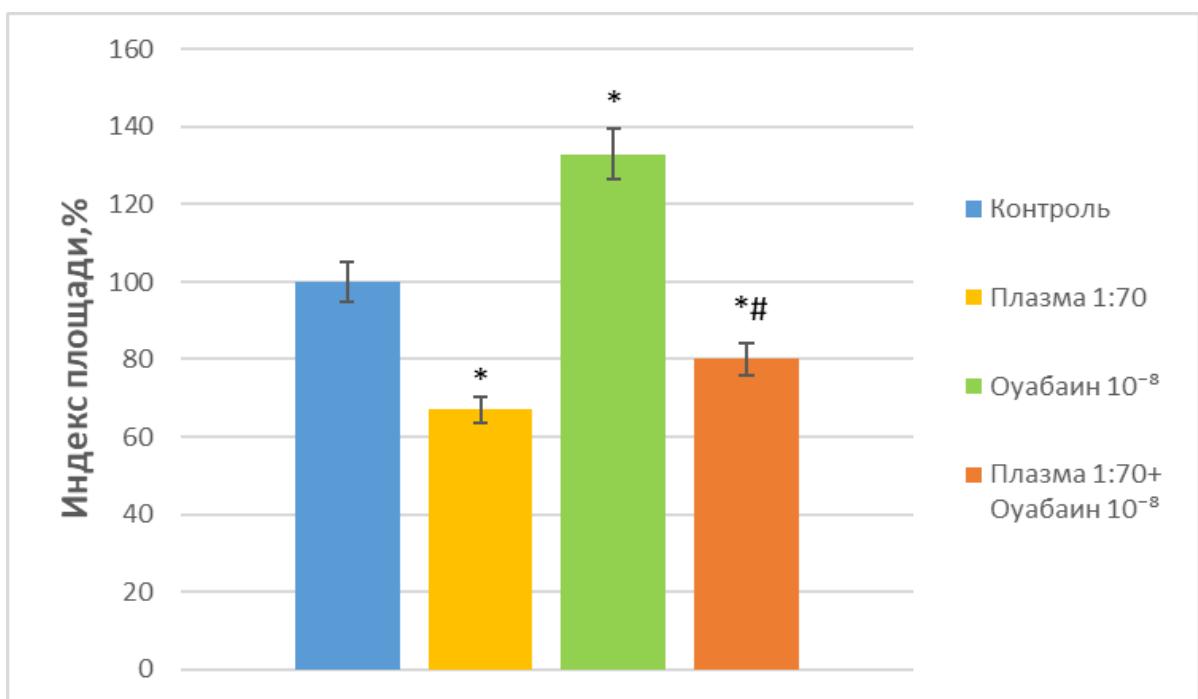
Рисунок 13. Ацетилхолин в концентрации 10^{-8} М нивелирует миотоксический эффект плазмы крови больных ХВДП

3.2.8 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 14).

Таким образом, обнаружено, что оуабаин частично нивелирует миотоксический эффект плазмы крови пациентов. Последнее прямо

свидетельствует об участии Na^+/K^+ -АТФазы в механизме, препятствующем развитию миопатического компонента ХВДП.



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

– $p < 0.05$, достоверные различия относительно плазмы

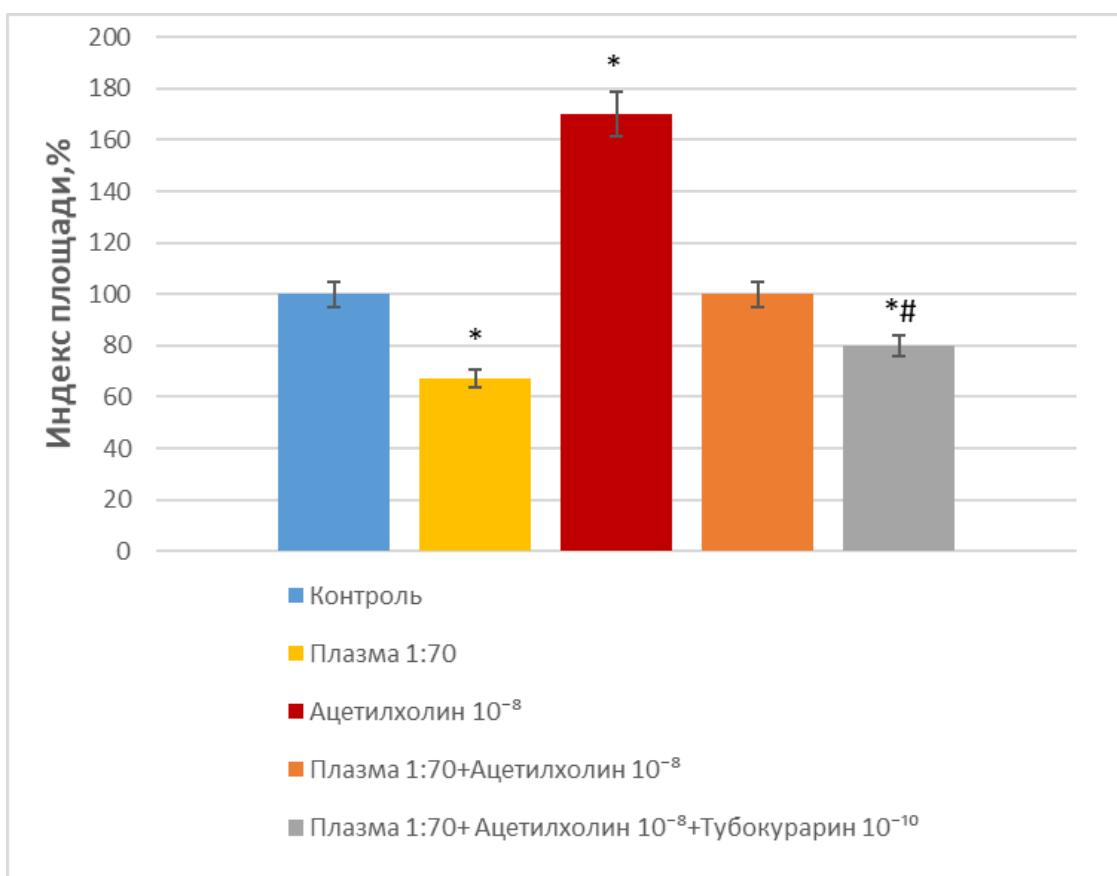
Рисунок 14. Na^+/K^+ -АТФаза участвует в механизме, препятствующем развитию миопатического компонента ХВДП

3.2.9 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}M , а также d-тубокуарин (10^{-10}M). Обнаружено, что индекс площади экспериментальных эксплантов достоверно отличается от контрольного значения и значения индекса площади эксплантов, культивируемых в питательной среде, содержащей плазму крови пациентов и АХ (10^{-8}M) (рисунок 15). Необходимо отметить, что d-тубокуарин полностью не

устранял миопротективное действие «неквантового» АХ. Обратил на себя внимание тот факт, что индекс площади эксплантатов практически не отличался от индекса площади эксплантатов, культивируемых в среде, содержащей плазму и оуабайн в дозе 10^{-8} М (рисунок 14 и рисунок.15).

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.



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

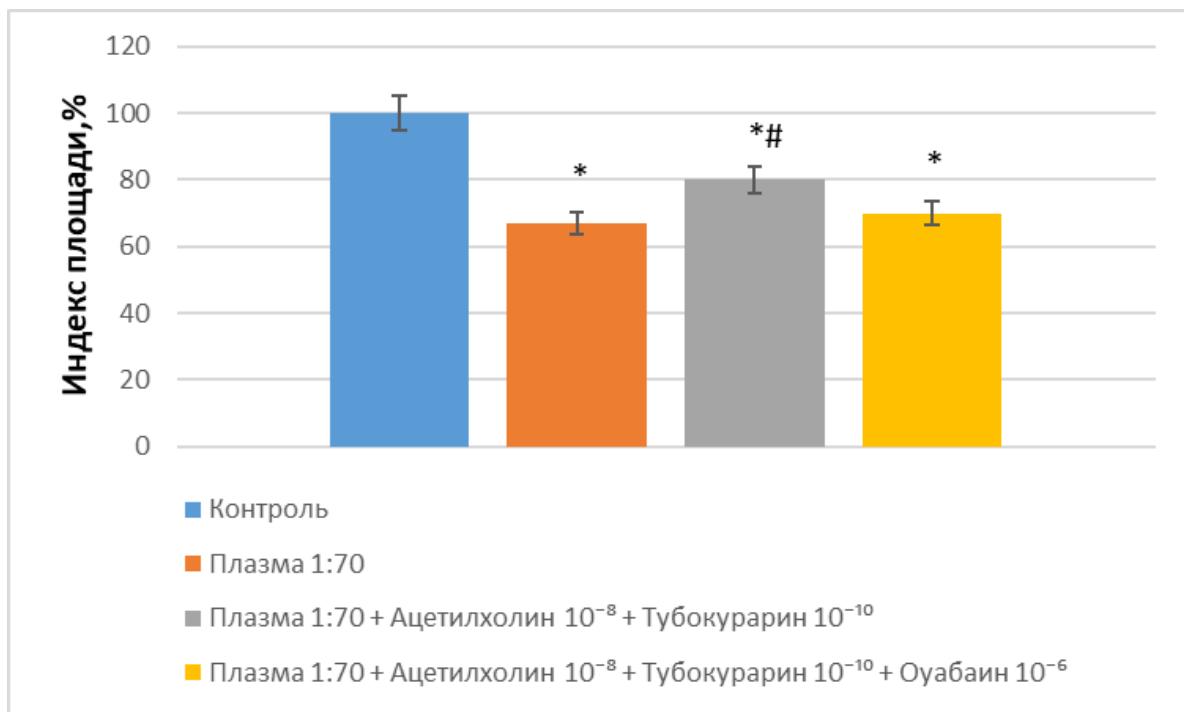
– $p < 0.05$, достоверные различия относительно плазмы

Рисунок 15. Никотиновые холинорецепторы вовлечены в механизм миопротективного действия «неквантового» ацетилхолина.

3.2.10 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), д-тубокуарин (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.16). 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.



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

#— $p<0.05$, достоверные различия относительно плазмы

Рисунок 16. Токсический эффект плазмы крови больных ХВДП в разведении 1:70 сохраняется в условиях одновременного блокирования никотинового холинорецептора и Na^+/K^+ -АТФазы.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Среди обследованных пациентов преобладали мужчины (62% мужчин, 38% женщин). Полученные результаты соответствуют популяционным данным. Более тяжелое течение заболевания наблюдалось у женщин. Средний балл по шкале невропатологических нарушений NIS у мужчин составил 28,5 балла, у женщин 32,5. По шкале инвалидизации ODSS INCAT значимых гендерных отличий не выявлено.

По результатам клинико-неврологического обследования пациентов следует отметить, что тяжесть клинических и электрофизиологических проявлений соответствовала длительности течения заболевания. У 15,50% больных длительность заболевания составила менее 1 года (первая группа), у 41,10% от 1 года до 3-х лет (вторая группа), у 43,40% более 3 лет (третья группа) (рисунок 17).

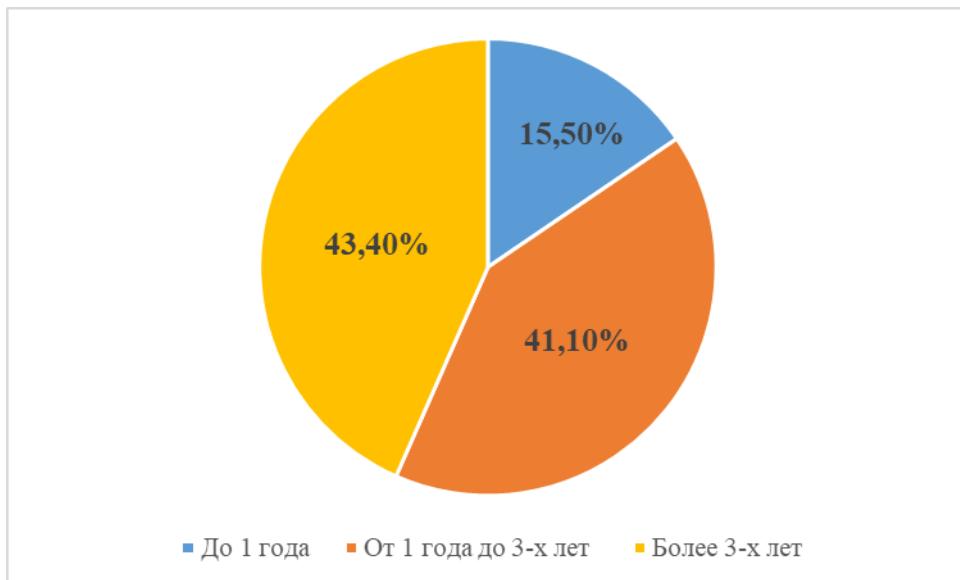


Рисунок 17. Длительность течения заболевания обследованных больных до постановки диагноза.

У пациентов первой группы атрофии мышц отмечались в 3,1% случаев, второй группы в 37,2%. Среди пациентов третьей группы в 43,4% случаев обнаруживались атрофические изменения мышц, подтвержденные электрофизиологическими методами исследования. У ряда пациентов, не

имеющих атрофических изменений мышц, в клинически значимых мышечных группах выявлялись денервационные изменения (таблица 8).

Таблица 8. Распределение пациентов с диагнозом хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия на группы в зависимости от длительности течения заболевания.

Группа	Длительность заболевания (лет)	Доля (в %) от общего числа пациентов (n=32)	Атрофии мышц. Доля (в %) от общего числа пациентов (n=32)	Денервационные изменения в мышцах. Доля (в %) от общего числа пациентов (n=32)
1	до 1 года	15,7% (n=5)	3,1% (n=1)	12,4% (n=4)
2	от 1 года до 3-х лет	40,5% (n=13)	37,2% (n=12)	37,2% (n=12)
3	более 3-х лет	43,4% (n=14)	43,4 (n=14)	43,4% (n=14)

Всего атрофические изменения скелетных мышц выявлены у 83,7 % обследуемых больных. У большинства пациентов первой группы электрофизиологическое исследование (игольчатая ЭМГ) клинически значимых скелетных мышц выявило признаки подострого денервационного процесса. У больных второй группы в исследуемых мышцах в большей степени выявлены признаки подострого денервационного процесса (наличие спонтанной активности, сниженное рекрутование ПДЕ) и в меньшей степени хронического денервационно-реиннервационного процесса. У всех пациентов третьей группы выявлены признаки хронического денервационно-реиннервационного процесса (изменение морфологии ПДЕ: увеличение амплитуды, длительности, наличие полифазии) в клинически значимых мышцах. Анализ уровня КФК у пациентов с атрофическими изменениями скелетных мышц отметил, что у больных первой группы повышение данного фермента в плазме крови не наблюдалось. У пациентов второй и третьей группы наблюдалось повышение КФК в 15,5% и 31% случаев соответственно. Степень инвалидизации пациентов коррелировала с выраженностью атрофических изменений в скелетных мышцах. Средний балл инвалидизации по шкале ODSS INCAT у пациентов третьей группы в руках составил 3 балла, в ногах 4 балла. У пациентов наблюдались выраженные

нарушения в одной или двух руках, невозможность выполнения как минимум одной из базовых функций: одевание одежды верхней части тела, мытье и расчесывание волос, поворот ключа в замке. При передвижении больным требовалось использование вспомогательных средств с двух сторон при ходьбе на 10 м (25 шагов) (таблица 9).

Таблица 9. Выявленные атрофические изменения в скелетных мышцах у пациентов в исследуемых группах.

Группа	Атрофии мышц. Доля (в %) от общего числа пациентов (n=32)	Денервационные изменения в мышцах.		Повышение КФК.	Средний балл ODSS INCAT (в руках; в ногах)
		Подострые изменения	Хронические изменения		
1	3,1% (n=1)	12,4% (n=4)	0% (n=0)	6,2% (n=2)	1;1
2	37,2% (n=12)	31,0% (n=12)	9,3% (n=3)	18,6% (n=6)	2;3
3	43,6% (n=14)	43,6% (n=14)	43,6% (n=14)	21,7% (n=7)	3;4

По результатам лабораторных данных у ряда пациентов выявлены характерные для ХВДП признаки воспалительных изменений. В ходе анализа лабораторных исследований плазмы крови больных ХВДП у ряда пациентов обнаружены: относительный лимфоцитоз, повышение СОЭ, уровня СРБ. Повышение КФК и ЛДГ наблюдалось у 15 и 5 пациентов соответственно. Уровень гемоглобина, тромбоцитов, общего белка, глюкозы у всех обследованных пациентов был в пределах нормы. В ходе исследования ЦСЖ у большинства пациентов отмечалось повышение уровня белка, а также белково-клеточная диссоциация (таблица 10).

В исследуемых группах был проведен анализ клинических и экспериментальных данных. Отмечено, что максимальный миотоксический эффект проявляла плазма крови больных с уровнем антител более 0,8 нмоль/л. Наибольший уровень антител в концентрации 1,8 нмоль/л обнаружен у больной С. 55 лет. Плазма крови больной С. проявляла миотоксические свойства: минимальный индекс площади экспериментальных экспланаторов наблюдался при разведении 1:70 и составил 65%.

Таблица 10. Результаты лабораторных исследований цереброспинальной жидкости и плазмы крови пациентов с диагностированной ХВДП.

Выявленные изменения	Доля (%) от общего числа пациентов (n=32)
Повышение уровня белка в ЦСЖ	93%
Белково-клеточная диссоциация в ЦСЖ	93%
Повышение СРБ	27,9%
Повышение КФК	46,5%
Повышение СОЭ	21,7%
Относительный лимфоцитоз	15,5%
Повышение лактатдегидрогеназы	15,5%

Следует отметить, что более концентрированная плазма (1:30 об.) оказывала менее выраженные миотоксические свойства на культивируемую ткань. Повидимому, данное явление объясняется наличием трофических факторов в плазме крови, частично нивелирующих токсическое действие антител к НХР. Этот вопрос требует более детального изучения.

Полученные клинико-экспериментальные данные указывают на вовлечение мышечного звена в патогенез данного заболевания. В настоящее время проблеме первично-мышечного повреждения при ХВДП не уделяется достаточного внимания неврологами-клиницистами не только с позиции физических методов лечения, но и со стороны фармакологической миопротекции. Настоящее исследование дает основание для комплексного подхода к изучению патогенеза мышечных атрофий и синдрома мышечной утомляемости, наблюдавшихся у пациентов с ХВДП.

Фундаментальный вопрос о физиологической роли «неквантового» АХ в механизмах миорегуляции привел нас к необходимости разработать методику органотипического культивирования ткани скелетной мышцы. Поскольку только в строго контролируемых условиях существует возможность оценить прямые эффекты АХ в концентрациях, сопоставимых с неквантовым выбросом.

Оказалось, что «неквантовый» АХ не только участвует в регуляции электрогенеза на постсинаптической мемbrane и повышает работоспособность непрерывно утомляемой скелетной мышцы, как было известно ранее (Kubasov I.V. et al., 1994; Кривой И.И. и др. 2001), но и проявляет трофотропные свойства. Нам удалось показать, что действие АХ на рост эксплантатов скелетной мышцы было дозозависимым. Максимальный миостимулирующий эффект АХ проявил в концентрации 10^{-8} М. В условиях органотипического культивирования ткани сердца было обнаружено аналогичное действие препарата. Также АХ в концентрации 10^{-8} М устранил кардиотоксическое действие ouабаина 10^{-8} М (Лопатина Е.В. и др., 2005).

Таким образом, были существенно расширены представления о физиологической роли «неквантового» АХ. Полученные результаты создают перспективу для более детального изучения свойств неквантово выделяемого АХ и эндогенных дигиталисоподобных факторов в механизмах миопротекции при ХВДП *in vivo*.

В настоящее время известны несколько моделей для изучения процессов, лежащих в основе патогенеза ХВДП. Экспериментальный аутоиммунный неврит провоцируется у животных иммунизацией гомогенатом периферических нервов или белками миелина. Электрофизиологические и морфометрические изменения состояния периферических нервов, регистрируемые у животных с экспериментальным аутоиммунным невритом сходны с клиническими проявлениями у пациентов с синдромом Гиена-Барре и ХВДП. У крыс периваскулярные Т-клеточные инфильтраты появляются примерно через 10–12 дней после иммунизации и за 2–3 дня до разрушения миелина и начала паралича (Soliven B., 2014). Тяжесть клинических проявлений и патологий экспериментального аутоиммунного неврита коррелируют с дозой и типом антигена, использованной для иммунизации. У крыс агути двухфазная форма экспериментального аутоиммунного неврита индуцируется однократной иммунизацией миелином периферических нервов быка в полном адьюванте Фрейнда. Данная модель может использоваться для анализа иммунных факторов,

определяющих рецидивы заболевания, и оценки экспериментальных методов иммунотерапии (Jung S. et al., 2004).

Не смотря на полученные ценные данные об иммунных механизмах, способствующих воспалительному процессу, исследования, проведенные на вышеуказанных модельных объектах, не позволили идентифицировать антигенные мишени (мишень) аутореактивных Т-клеток при ХВДП. Предполагают, что динамика и сила гуморального ответа являются важными факторами, влияющими на развитие воспалительных демиелинизирующих заболеваний (Lonigro A., Devaux J.J., 2008). В работах A. Joshi et al. (Joshi A. et al., 2016) предложена модель хронической денервации, наблюданной при ХВДП: шванновские клетки человека и грызунов обрабатывали сывороткой пациентов с ХВДП или здоровых добровольцев, трансплантировали интраневрально и оценивали их способность поддерживать регенерацию аксонов электрофизиологическим и морфометрическим методами (Joshi A., 2016). Обнаружено, что кондиционированные сывороткой крови пациентов с ХВДП шванновские клетки не способны поддерживать регенерацию аксонов. Дальнейшие исследования *in vitro* показали, что отсутствие гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в сыворотке крови пациентов, наряду со значительным снижением экспрессии нейротрофического фактора мозга шванновскими клетками, является возможными причинами этого эффекта (Joshi A., 2016).

Наша модель мышечного компонента ХВДП *in vitro* имеет серьезное преимущество, поскольку позволяет оценить непосредственное влияние плазмы крови пациентов с ХВДП на состояние скелетной мышцы в строго контролируемых экспериментальных условиях, исключая системные влияния со стороны организма. Методика работы с плазмой крови пациентов с заболеваниями нервно-мышечного аппарата была отработана нами ранее (Sokolova et al., 2015). Миотоксический эффект плазмы крови пациентов с установленным диагнозом ХВДП, по-видимому, основан на наличии АТХР и нивелируется АХ в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом.

Данные, полученные на модели мышечного компонента ХВДП *in vitro*, свидетельствуют о том, что АХ, выделяющийся в неквантовом виде, может препятствовать развитию заболевания благодаря трофотропным свойствам.

Наличие антител к НХР постсинаптической мембраны нервно-мышечного синапса, а также антител к мышечно-специфической тирозин-киназе является основой патогенеза другого аутоиммунного заболевания-миастении. У больных миастенией может наблюдаться миопатический синдром с признаками дистрофии мышц, причем более выраженный при формах миастении с наличием антител к НХР. Биопсия мышц пациентов с антителами к мышечно-специфической тирозин-киназе выявила первично-мышечные дистрофические изменения с выраженным митохондриальными дисфункциями мышечного волокна (Martignago S., Fanin M., 2009).

Описание многочисленных клинических случаев развития миастении и аутоиммунных полиневропатий (ХВДП, синдрома Гийена-Барре, синдром Миллера-Фишера) у одних и тех же больных дает основание предположить возможность одновременного поражения, как периферического нерва, так и нервно-мышечного синапса в рамках возможного общего иммунопатогенеза данных заболеваний (Quan W., Xia J., 2018; Yuan J. et al., 2018; Cao Y. et al., 2019; Anagnostouli M. et al., 2020; Bolz S. et al., 2018; Kimura K. et. al., 1998; Mori M. et al., 2006). Наличие в плазме крови больных ХВДП АТХР позволяет расширить представление о патогенезе и дополнить лабораторный поиск, применяемый при диагностике данной патологии. Возможность одновременной аутоиммунной атаки, как на периферический нерв, так и на нервно-мышечный синапс позволяет более точно объяснить синдром мышечной утомляемости, зачастую наблюдаемый у пациентов с ХВДП (Lawley A. et al., 2020 (1,2)). В экспериментах на френико-диафрагмальном препарате белой крысы был обнаружен антиутомляющий эффект АХ в концентрации, сопоставимой с «неквантовой». Исследования показали, что действие АХ (10^{-8} М) опосредовано модуляцией Na^+/K^+ -АТФазы (Kubasov I.V., 1994; Матюшкин Д.П. и др., 1999; Кривой И.И. и др., 2001; Кривой И.И. и др., 2006). Именно поэтому было логичным изучить возможную

вовлеченность Na^+/K^+ -АТФазы в миопротективный эффект АХ на модели мышечного компонента ХВДП *in vitro*.

На функциональную гетерогенность Na^+/K^+ -АТФазы в возбудимых и не возбудимых тканях оказывают влияние различные факторы. Прежде всего, это факторы, обусловленные специфической мембранный локализацией, особенностями регуляции, а также молекулярным и функциональным взаимодействием с белковым и липидным окружением (Blaustein M.P., Hamlyn J.M., 2020). Есть ряд указаний на то, что Na^+/K^+ -АТФаза может образовывать ансамбли с рецепторами и ионными каналами (Лопатина Е.В, Поляков Ю.И., 2011).

Одними из первых были выявлены структурно-функциональные взаимодействия между Na^+/K^+ -АТФазой и НХР (Matchkov V.V., Krivoi I.I., 2016; Krivoi I.I., Drabkina T.M., 2006). Данное взаимодействие осуществляется либо напрямую через стерическое взаимодействие или косвенно через другие связующие их белки (Carr C., 1989). Определен регуляторный механизм, индуцированный АХ, посредством которого НХР и Na^+/K^+ -АТФаза вызывают гиперполяризацию постсинаптической мембраны на уровне 2-4 мВ. Так же есть указания на то, что АХ напрямую не влияет на активность Na^+/K^+ -АТФазы, если она не представлена в едином комплексе с НХР (Heiny J.A. et al., 2010).

Результаты по изучению структурно-функциональной связи между НХР и Na^+/K^+ -АТФазой в основном получены с помощью электрофизиологических методов исследования. Возможным механизмом АХ-индуцированной гиперполяризации может явиться активация Na^+/K^+ -АТФазы за счет входа натрия или выхода калия через открытый в НХР канал. Фактически, небольшая часть НХР открывается и при наномолярных концентрациях АХ, что видно из-за незначительной деполяризации, которая развивается изначально до АХ-индуцированной гиперполяризации, однако блокирование НХР проадифеном (действует только как аллостерический блокатор открытого ионного канала) не влияет на АХ-индуцированную гиперполяризацию. Таким образом, поток ионов через открытые НХР, не является основной причиной, АХ-индуцированной

гиперполяризации. По мнению авторов, ионы кальция, проникая через открытый НХР, способны вызывать ток калия из клетки путем открытия Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов. АХ-индуцированную гиперполяризацию подавляли специфические ингибиторы Na^+/K^+ -АТФазы. Оуабайн ингибировал АХ-индуцированную гиперполяризацию в наномолярном диапазоне при участии $\alpha 2$ изоформы α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы. (Krivoi I.I., Drabkina T.M., 2006). В скелетных мышцах, в отличие от тканей другого типа эта изоформа α -субъединицы выполняет насосную функцию.

Следует отметить, что различия в локализации $\alpha 2$ изоформ α -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы также могут заключаться в функциональном и молекулярном взаимодействии между $\alpha 2$ -изоформой α -субъединицы, расположенной на постсинаптической мембране, и НХР (Heiny J.A., Kravtsova V.V., 2010; Matchkov V.V., Krivoi I.I., 2016).

Хроническое воздействие негидролизуемого аналога АХ карбахола вызывает гиперполяризацию мембранны мышечного волокна из-за значительного увеличения содержания $\alpha 2$ изоформ α -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы, опосредованного активацией НХР. (Kragenbrink R. et al., 1996). В эксперименте показано, что взаимное связывание дансил-С6-холина (флюоресцентный агонист НХР) с НХР влияет на связывание оуабайна с Na^+/K^+ -АТФазой и наоборот. Эти результаты показывают, что конформационный переход одного из этих белков при специфическом связывании лиганда индуцируют изменение лиганд-связующих свойств другого ассоциированного с ним белка. Кроме того, они могут взаимодействовать из-за изменения текучести мембранны при конформационном переходе одного из белков (Fossier P. et al., 1985). Существуют данные о роли β -спектрина (компоненты мембранны мышечного волокна, связанного структурно с клеточным цитоскелетом) в формировании структурного единства этих ферментов в нервно-мышечном синапсе (Bloch R.J., Morrow J.S., 1989). Этот эффект требует длительного воздействия наномолярных концентраций АХ или его агонистов, в то время как микромолярные

концентрации открывают катионные каналы НХР, вызывая деполяризацию мышечного волокна (Akk G., Auerbach A., 1999).

Количество АХ, необходимого для активации Na^+/K^+ -АТФазы, сопоставимы с остаточными наномолярными концентрациями АХ после нервного возбуждения, а также с концентрацией, возникающей в нервно-мышечном соединении при неквантовом выбросе медиатора. На основании этого можно сделать вывод, что именно «неквантовый» АХ ответственен за поддержание гиперполяризации мембранныго потенциала покоя на уровне 4 мВ, несмотря на то, что механизм, с помощью которого «неквантовый» АХ стимулирует Na^+/K^+ -АТФазу, не требует протекания тока Na^+ через открытый НХР (Vyskocil F. et al., 1983; Nikolsky E.E. et al., 1994).

Физиологическая роль данной гиперполяризации заключается в тонкой настройке мембранныго электрогенеза, а, следовательно, более эффективной нервно-мышечной передаче возбуждения. Поскольку данное явление наблюдается в местах наибольшего скопления конформационно измененных медленно инактивирующихся НХР, доступность катионных каналов возрастает в 3 раза на каждые 6 мВ изменения мембранныго потенциала покоя (Ruff R.L. et al., 1988). В нашем исследовании структурно-функциональная связь между НХР и Na^+/K^+ -АТФазой доказана с помощью сочетания методов органотипической культуры ткани и ингибиторного анализа.

Таким образом, НХР и Na^+/K^+ -АТФаза способны к функциональному взаимодействию при связывании своих специфических лигандов. Учитывая, что активация Na^+/K^+ -АТФазы играет решающую роль в поддержании эффективной мышечной активности, функциональное взаимодействие данного рецепторного комплекса имеет особую важность в условиях, приводящих к потере ионных градиентов и возбудимости мышц. К данным патологическим состояниям относится интенсивная мышечная работа, гиперкалиемия (гиперкалиемический периодический паралич), мышечная дистрофия, миастения, неврогенные патологии нервно-мышечного аппарата.

Результаты нашей работы доказывают, что АХ в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом, в норме и на модели мышечного компонента ХВДП *in vitro* проявляет миотрофические и миопротективные свойства. Данный механизм реализуется как путем прямой модуляции сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы АХ в наномолярных концентрациях, так и рецептор-опосредованно через НХР. Результаты согласуются с данными других авторов о модуляции активности Na^+/K^+ -АТФазы агонистами НХР. A. Chibalin et al. (Chibalin A., et al. 2012) продемонстрировали, что длительно циркулирующий никотин способен регулировать структурно-функциональное взаимодействие НХР с Na^+/K^+ -АТФазой с последующим изменением мембранного потенциала постсинаптической мембраны мышечного волокна. Хроническое пероральное введение никотина крысам в дозе 2–4 мг / кг в сутки вызывает устойчивую деполяризацию мембраны в 3 мВ в диафрагмальной мышце. Данное изменение является результатом изменения электротранспорта $\alpha 2$ и $\alpha 1$ изоформами α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы (Chibalin A., 2012).

Рядом авторов описана роль Na^+/K^+ -АТФазы в регуляции метаболизма скелетной мышцы, однако данный вопрос изучен не в полном объеме. В опытах на скелетных мышечных клетках человека показана возможность Src-зависимой регуляции синтеза гликогена наномолярными концентрациями оуабаина (Kotova O. et al., 2006) и обсуждается участие Src-киназы в реализации сигнальной функции оуабаин-чувствительной $\alpha 1$ -изоформы α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы в мышцах (Pirkmajer S. et al., 2020). Участие $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформ α -субъединицы в сигнальной трансдукции в ткани скелетной мышцы подвергается сомнению (Cui X., et al., 2017; Yu H., et al., 2018; Кравцова В.В., Кривой И.И., 2021). Результаты других исследований демонстрируют, что функционирование скелетных мышц необходимо для поддержания насосной функции $\alpha 2$ -изоформы α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, а изменение ее активности в свою очередь предшествуют атрофии мышц, индуцированной краткосрочным обездвиживанием камбаловидной мышцы (Kravtsova V.V. et al., 2015). В электрофизиологических исследованиях обнаружено структурно-функциональное взаимодействие между

Na^+/K^+ -АТФазой и НХР в котором участвует именно $\alpha 2$ -изоформа α – субъединицы фермента, обеспечивающая модуляцию электрогенеза постсинаптической мембранны (Кравцова В.В., Кривой И.И., 2021). Наши данные существенно расширяют представления о функционировании субъединичного состава α -изоформ α –субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы в скелетной мышце: продемонстрирована возможность модуляции комплекса Na^+/K^+ -АТФаза - НХР, модулирующего трофику скелетной мышцы в норме и при патологии. При этом, в реализации трофотропных эффектов «неквантового» АХ может лежать модуляция высокочувствительной к ouabainу $\alpha 1$ -изоформы α –субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы. Этот вопрос требует дальнейшего детального изучения.

Клинико-неврологические, нейрофизиологические, лабораторные и экспериментальные данные выявляют повреждение мышечной системы пациентов с ХВДП и указывают на необходимость комплексного терапевтического воздействия, направленного не только на восстановление нервов, но и скелетных мышц. Одним из таких возможных фармакологических механизмов является прямая или рецептор-опосредованная модуляция сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы. Фармакологическими препаратами могут являться вещества, имитирующие действие наномолярных концентраций АХ, а также ингибиторы Na^+/K^+ -АТФазы в концентрациях, сопоставимых с эндогенными.

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 нейрофизиологическими 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 ($0,42 \pm 0,087$ 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 проявляется 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 receptor-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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алибекова, Д.М. Современные представления о структуре и функциях ацетилхолинэстеразы / Д.М. Алибекова, М.Б. Саидов, М.Р. Абдулханов // Вестник Дагестанского государственного университета. Серия 1. Естественные науки. – 2018. – Т.33. – № 2. – С. 81-94.
2. 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 / 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.
3. 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 // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова. – 2019. – Т.26. – № 3. – С. 86-93.
4. Гинзберг М.А., Клинико- нейрофизиологическое исследование хронической демиелинизирующей полиневропатии, ассоциированной с моноклональной секрецией / М.А. Гинзберг, Е.Ю. Варламова, В.В. Рыжко, Н.А. Супонева, М.А. Пирадов // Медицинский совет. – 2015. – № 10. – С. 93-96.
5. Жулев, Н.М. Невропатии: руководство для врачей / Н.М. Жулев, Б.А. Осетров, С.Н. Жулев, Т.В. Лалаян // СПб.: «СПбМАПО», 2005.– С.90-101.
6. Завалишин, И.А. Аутоиммунные заболевания в неврологии. Клиническое руководство. / И.А. Завалишин // М.: «РООИ Здоровье человека», 2014. – 400 с.
7. Климкин А.В. Воспалительные демиелинизирующие полиневропатии у детей / А.В. Климкин, В.Б. Войтенков, Н.В. Скрипченко // Российский педиатрический журнал. – 2016. – Т.19. – № 3. – С. 183-191.

8. Кравцова, В.В. Молекулярная и функциональная гетерогенность Na^+ , K^+ -АТФазы в скелетной мышце / В.В. Кравцова, И.И. Кривой / Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2021. – Т.107. – № 6–7. – С. 695-716.
9. Кривой И.И., О роли уабаин-чувствительной изоформы $\alpha 2$ Na^+/K^+ -АТФазы в скелетной мышце крысы / И.И. Кривой, Т.М. Драбкина, А.Н. Васильев, В.В. Кравцова // Биологические мембранны. – 2006. – Т.23. – № 2. – С. 139-147.
10. Кривой И.И., Роль K^+ каналов и Na^+/K^+ -АТФазы в ацетилхолин-индуцированной гиперполяризации скелетных мышечных волокон / И.И. Кривой, Е.В. Лопатина, В.В. Кравцова // Биологические мембранны. – 2001. – Т.18. – № 1. – С. 10-15.
11. Левин, О.С. Полиневропатии. Клиническое руководство / О.С. Левин // – М.: «Медицинское информационное агентство», 2016. – С.57-69.
12. Лопатина Е.В. Синтетический аналгетик аноцептин: результаты доклинических и клинических исследований / Е.В. Лопатина, Ю.И. Поляков // Эфферентная терапия. – 2011. – Т.17. – № 3. – С. 79-81.
13. Лопатина Е.В. Участие сердечных гликозидов в регуляции роста эксплантатов ткани сетчатки / Лопатина Е.В., Карецкий А.В., Пеннийнен В.А., Виноградова Т.В // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т.144. – № 12. – С. 651-653.
14. Лопатина, Е.В. Исследование участия Na^+,K^+ -АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре / Е.В. Лопатина, В.А. Пеннийнен, А.А. Зайка // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2005. – Т. 140. – №8. – С. 150-153.
15. Маломуж, А. И. Неквантовое выделение ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе млекопитающего: зависимость от внеклеточной концентрации ионов магния и кальция / А. И. Маломуж, Е.Е. Никольский // Доклады академии наук. – 2010. – Т.430. – № 2. – С. 277-280.

16. Маломуж, А.И. Влияние блокатора динаминзависимого эндоцитоза динасора на процессы спонтанной квантовой и неквантовой секреции ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе мыши / А. И. Маломуж, А. Р. Мухитов, С. Е. Прокурина, Ф. Выскочил, Е. Е. Никольский // Доклады академии наук. – 2014. – Т.459. – № 4. – С. 512-515.
17. Маломуж, А.И. Современные представления о холинергической нейротрансмиссии в моторных синапсах / А.И. Маломуж, Е.Е. Никольский // Биологические мембранны. – 2018. – Т.35. – № 3. – С. 169-185.
18. Матюшкин Д.П., Исследование синаптических факторов, противодействующих утомлению нервно-мышечного аппарата / Д.П., Матюшкин, М.Л. Антопольский, А.А. Азьмуко, А.С. Молокоедов, Т.М. Драбкина, И.И. Кривой, И.В. Кубасов, Т.П. Сей, Д.Ю. Романовский, Е.В. Лопатина, Отчет о НИР № 97-04-49555 (Российский фонд фундаментальных исследований). – 1999.
19. Пеннияйнен, В.А., Лопатина Е.В. Исследование роли Na/K-АТФазы в регуляции роста нейритов сенсорных нейронов / В.А. Пеннияйнен, Е.В. Лопатина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т.139. – № 2. – С. 157-159.
20. Петров, К.А. Холинэстеразы: взгляд нейрофизиолога / К.А. Петров, А.Д. Харламова, Е.Е. Никольский // Гены и клетки. – 2014. – Т.9. – № 3. – С. 160-167.
21. Руководство по фармакологии. В 2т/Под ред. Н.В.Лазарева. – М.: Медгиз, 1961. – Т.2 – 612с.
22. Скоромец А.А. Топическая диагностика заболеваний нервной системы / А.А. Скоромец, А.П. Скоромец, Т.А. Скоромец. - 9-е изд. - Спб.: Политехника, 2017. – 633 с.
23. 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.
24. Соколова М.Г., Гавриченко А.В. Изучение активности терминального спрутинга у больных наследственной моторной и сенсорной невропатией i типа в клинико-экспериментальном исследовании в книге: актуальные проблемы биомедицины - 2020. сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. Санкт-Петербург, 2020. С. 234-236.
25. Соколова, М.Г. Оценка реиннервационного процесса у больных спинальной мышечной атрофией 2 типа: комплексное клинико-экспериментальное исследование / М.Г. Соколова, В.А. Пеннияйнен, М.В. Резванцев, С.В. Лобзин, Н.Ю. Александров // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 45–51.
26. Соколова, М.Г. Моделирование биохимических условий внутриорганный среды при спинальной мышечной атрофии 2 типа в органотипической культуре ткани / М.Г. Соколова, С.В. Лобзин, В.А. Пеннияйнен, А.В. Кипенко, Е.В. Лопатина, М.В. Резванцев // Вестник Московского государственного областного университета: Естественные науки. – 2016. – № 4. – С. 47–56
27. Супонева, Н.А. Хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия у взрослых: принципы диагностики и терапия первой линии / Н.А. Супонева, Е.С. Наумова, Е.В. Гнедовская // Нервно-мышечные болезни. – 2016. – Т.6. – № 1. – С. 44-53.
28. Abraham, A. Frequent laboratory abnormalities in CIDP patients / A. Abraham, H. Albulaihe, M. Alabdali, M. Qrimli, A. Breiner, C. Barnett, H.D. Katzberg, L.E. Lovblom, B.A. Perkins, V. Bril // Muscle Nerve. –2016.– Vol.53(6).– P.862–865.
29. Akera, T. Inotropic action of digitalis and ion transport /T. Akera, T. M. Brody // Life Sciences. –1976. – Vol. 18(2).– P.135–144.

30. Akk, G. Activation of muscle nicotinic acetylcholine receptor channels by nicotinic and muscarinic agonists / G. Akk, A. Auerbach // British Journal of Pharmacology. –1999.– Vol.128(7).– P.1467–1476.
31. Albuquerque, E.X. Effects of Vinblastine and Colchicine on neural regulation of the fast and slow skeletal muscles of the rat / E.X. Albuquerque, J.E. Warnick , J.R. Tasse, F.M. Sansone // Experimental Neurology. –1972.– Vol.37(3). – P. 607-634.
32. Allen, J.A. Correction to: A Global Survey of Disease Burden in Patients Who Carry a Diagnosis of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy / J.A. Allen, L. Butler, T. Levine, A. Haudrich // Advances in Therapy. –2021.– Vol.38(2).–P.1364–1367.
33. Anagnostouli, M. Myasthenia gravis, atypical polyneuropathy and multiple autoimmune phenomena in the same patient, with HLA-immunogenetic profile expectable for Greek chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a case report / M. Anagnostouli, A.G. Vakrakou, T. Zambelis, F. Boufidou, C. Nikolaou, N. Karandreas, C. Kilidireas // International Journal of Neuroscience. –2020.–P.1–5.
34. Austin, J.H. Recurrent polyneuropathies and their corticosteroid treatment; with five-year observations of a placebo-controlled case treated with corticotrophin, cortisone, and prednisone / J.H. Austin // Brain. –1958. – Vol.82(2).– P. 157–192.
35. Bagrov, A.Y. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets / A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro, O.V. Fedorova // Pharmacol Rev. – 2009. – V. 61. – P. 9-38.
36. Barkas, T. Localisation of the main immunogenic region of the nicotinic acetylcholine receptor / T.Barkas, J.M. Gabriel, M. Juillerat, A. Kokla, S.J. Tzartos // FEBS Letters. –1986. – Vol. 196(2).– P.237–241.
37. Barkas, T. Mapping the main immunogenic region and toxin-binding site of the nicotinic acetylcholine receptor / T. Barkas, A. Mauron, B. Roth, C. Alliod, S.J. Tzartos, M. Ballivet // Science. –1987. – Vol. 235(4784).– P.77–80.

38. Berger, M. Lin Rapid and reversible responses to IVIG in autoimmune neuromuscular diseases suggest mechanisms of action involving competition with functionally important autoantibodies / M. Berger, D.E. McCallus, C.S.Y. Lin // Journal of the Peripheral Nervous System. –2013. – Vol.18(4).– P. 275–296.
39. Birks, R. Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration / R. Birks, B. Katz, R. Miledi // The Journal of Physiology. –1960.– Vol. 150. – P. 145-168.
40. Bjelica, B. One-year follow-up study of neuropathic pain in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy / B. Bjelica, S. Peric, I. Bozovic, A. Kacar, M. Cobeljic, I. Dejanovic, Z. Stevic, I. Basta // Journal of the Peripheral Nervous System. –2019. – Vol.24(2).– P.180–186.
41. Blaustein, M.P. Ouabain, Endogenous Ouabain and Ouabain-like Factors: The Na^+ Pump/Ouabain Receptor, its linkage to NCX, and its Myriad Functions / M.P. Blaustein, J.M. Hamlyn // Cell Calcium. –2020.– Vol.86.– P.1–13.
42. Bloch, R.J. An unusual β -spectrin associated with clustered acetylcholine receptors / R.J. Bloch, J.S. Morrow // Journal of Cell Biology. –1989. – Vol.108(2).– P. 481–493.
43. Bolz, S. CIDP, myasthenia gravis, and membranous glomerulonephritis - three autoimmune disorders in one patient: a case report / S. Bolz, A. Totzeck, K. Amann, M. Stettner, C. Kleinschnitz, T. Hagenacker // BMC Neurology. –2018. – Vol.18 (1).– P. 1–4.
44. Brandon, E.P. Choline Transporter 1 Maintains Cholinergic Function in Choline Acetyltransferase Haploinsufficiency / E.P. Brandon, T.Mellott , D.P. Pizzo , N. Coufal, K.A.D. Amour, K. Gobeske // Journal of Neuroscience. –2004.– Vol. 24(24). –P.5459–5466.
45. Bray, J.J. Evidence for the role of non-quantal acetylcholine in the maintenance of the membrane potential of rat skeletal muscle / J.J. Bray, J. W. Forrest, J.I.Hubbard // The Journal of Physiology. –1982. – Vol. 326. – P. 285–296.
46. Bromberg, M.B. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: comparison of patients with and without an associated monoclonal gammopathy

- // M.B. Bromberg, E.L. Feldman, J.W. Albers // Neurology. –1992.– Vol.42(6).– P.1157–1163.
47. Bruneau, E. The dynamics of the rapsyn scaffolding protein at individual acetylcholine receptor clusters / E. Bruneau, M. Akaaboune // Journal of Biological Chemistry. –2007. – Vol. 282(13). – P.9932–9940.
48. Bunschoten, C. Progress in diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy / C. Bunschoten, B.C. Jacobs, P.Y.K Van den Bergh, D.R. Cornblath, P.A.V. Doorn // The Lancet Neurology.–2019.– Vol.18(8).–P.784–794.
49. Burns, T.M. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy / T.M.Burns // Archives of neurology. –2004. – Vol.61(6).– P. 973–975.
50. Cao, Y. Guillain-Barre syndrome associated with myasthenia gravis: Three cases report and a literature review / Y. Cao, M. Gui, S. Ji, B. Bu // Medicine (Baltimore).–2019.–Vol.98(47).–P.1–5.
51. Carr, C. A novel 87,000-Mr protein associated with acetylcholine receptors in Torpedo electric organ and vertebrate skeletal muscle / C. Carr, G.D. Fischbach, J.B. Cohen // Journal of Cell Biology.–1989. – Vol.109(4 Pt 1).– P. 1753–1764.
52. Cetin, H. Rapsyn facilitates recovery from desensitization in fetal and adult acetylcholine receptors expressed in a muscle cell line / H. Cetin, W. Liu, J. Cheung, J. Cossins, A. Vanhaesebrouck , S. Maxwell, A.Vincent, D. Beeson, R. Webster // The Journal of Physiology. –2019. – Vol. 597(14).– P.3713–3725.
53. Cetin, H. The Structure, Function, and Physiology of the Fetal and Adult Acetylcholine Receptor in Muscle / H. Cetin, D. Beeson, A. Vincent, R. Webster //Frontiers in Molecular Neuroscience. –2020. – Vol. 13. – P.1–14.
54. Cherniavsky, L.M. Cardiac glycosides induced toxicity in human cells expressing α 1-, α 2-, or α 3-isoforms of Na-K-ATPase / L.M. Cherniavsky, S.J. Karlish, H. Garty // American Journal of Physiology-Cell Physiology. –2015.– Vol.309(2).– P.126–135.
55. Chibalin, A. V. Chronic nicotine modifies skeletal muscle Na,K-ATPase activity through its interaction with the nicotinic acetylcholine receptor and

- phospholemman / A.V. Chibalin, J.A. Heiny, B. Benziane, A.V. Prokofiev, A.V. Vasiliev, V.V. Kravtsova, I.I. Krivoi // PLoS One. – 2012. – V. 7(3). – P. 1-9.
56. Cisterna, B. A. Active acetylcholine receptors prevent the atrophy of skeletal muscles and favor reinnervation / B.A. Cisterna , A. A. Vargas, C. Puebla , P. Fernandez, R. Escamilla, C. F. Lagos , M. F. Matus, C. Vilos , L. A. Cea, E. Barnaf1, H. Gaete, D. F. Escobar, C. P. Cardozo, J. C. Saez // Nature Communications. –2020. – Vol. 11(1).– P.1–13.
57. Clausen, T. $\text{Na}^+–\text{K}^+$ pump regulation and skeletal muscle contractility / T. Clausen // Physiological Reviews. –2003.– Vol.83.– P.1269–1324.
58. Clausen, T. Quantification of the maximum capacity for active sodium-potassium transport in rat skeletal muscle / T. Clausen, M.E. Everts, K.J. Kjeldsen // The Journal of Physiology. –1987.– Vol.388.– P.163–181.
59. Couraud, J.Y. Rapid axonal transport of three molecular forms of acetylcholinesterase in the frog sciatic nerve / J.Y. Couraud, M. Nicolet, R. Hassig // Neuroscience. –1985.– Vol.14. – P. 1141-1147.
60. Cui, X. Protein Interaction and Na/K -ATPase-Mediated Signal Transduction / X. Cui, Z. Xie // Molecules. –2017.– Vol.22(6).– P.1–20.
61. Dalakas, M.C. Pathogenesis of immune-mediated neuropathies / M.C. Dalakas // Biochimica et Biophysica Acta .–2015. – Vol.1852(4).– P. 658–666.
62. Dalakas, M.C. Immunoglobulin and complement deposits in nerves of patients with chronic relapsing polyneuropathy / M.C. Dalakas, W. K. Engel // Archives of neurology.–1980. – Vol.37(10).– P. 637–640.
63. Deries, M. The mammalian myotome: a muscle with no innervation / M. Deries, J. J. P. Collins, M. J. Duxson // Evolution and Development. –2008. – Vol.10. – №. 6 – P.746-755.
64. DiFranco, M. Na,K -ATPase $\alpha 2$ activity in mammalian skeletal muscle T-tubules is acutely stimulated by extracellular K^+ / M. DiFranco, H. Hakimjavadi, J.B. Lingrel, J.A. Heiny // The Journal of General Physiology. –2015. – Vol. 146(4).– P.281–294.

65. Dobretsov, M. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase / M. Dobretsov, J.R. Stimers // *Frontiers in Bioscience*.—2005.— Vol.10.— P.2373–2396.
66. Dorus S., Hedgehog, a key development gene, experienced intensified molecular evolution in primates /S. Dorus, J.R. Anderson, E.J. Vallender, S.L. Gilbert, L. Zhang, L.G. Chemnick, O.A. Ryder, W. Li, B. Lahn, T. Sonic // *Human Molecular Genetics journal*.—2006.—Vol.15(13).—P.2031–2037.
67. Dyck, P.J. Longitudinal assessment of diabetic polyneuropathy using a composite score in the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort / P.J. Dyck, J.L. Davies, W.J. Litchy, P.C. O'Brien // *Neurology*.—1997.—Vol.49(1).—P.229–239.
68. Dyck, P.J. Chronic inflammatory polyradiculoneuropathy / P.J. Dyck, A.C. Lais, M. Ohta, J.A. Bastron, H. Okazaki, R.V. Groover // *Mayo Clinic Proceedings*.—1975. — Vol.50(11).— P. 621–637.
69. Dyck, P.J. Plasma exchange in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy / P.J. Dyck, J. Daube, P. O'Brien, A. Pineda, P.A. Low, A.J. Windebank, C. Swanson // *The New England Journal of Medicine*.—1986.— Vol.314(8).—P.461–465.
70. Dyck, P.J.B. History, Diagnosis, and Management of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy / P.J.B. Dyck, J.A. Tracy // *Mayo Clinic Proceedings*.—2018. — Vol.93(6).— P. 777–793.
71. Edwards R.H. The neurotransmitter cycle and quantal size / R.H. Edwards // *Neuron*.—2007.— Vol.55(6).— P.835–858.
72. Edwards, C. Is an acetylcholine transport system responsible for nonquantal release of acetylcholine at the rodent myoneural junction? / C. Edwards, V. Dolezal, S. Tucek, H. Zemkova, F. Vyskocil // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. —1985. — Vol. 82(10). — P. 3514-3518.
73. Eftimov, F. Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy / F. Eftimov, J.B. Winer, M. Vermeulen, R.D. Haan, I.N.V. Schaik // *Cochrane Systematic Reviews*.—2009.—Vol.21(1).—P.1–51.

74. Elfman, L. Fractionation of protein components of plasma membranes from the electric organ of *Torpedo marmorata* / L. Elfman, E. Heilbronn, P.L. Jorgensen // *Biochimica et Biophysica Acta*.—1982.—Vol.693(2).—P.273–279.
75. Elovaara, I. EFNS guidelines for the use of intravenous immunoglobulin in treatment of neurological diseases: EFNS task force on the use of intravenous immunoglobulin in treatment of neurological diseases / I. Elovaara, S. Apostolski, P. Van Doorn, N.E. Gilhus, A. Hietaharju, J. Honkaniemi, I.N. Van Schaik, N. Scolding, P.S. Sorensen, B. Udd, EFNS // *European Journal of Neurology*.—2008.—Vol.15(9).—P.893–908.
76. Endo, T. Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion / T. Endo // *Bone*.—2015.—Vol.80.—P.2–13.
77. Espildora C. Alterations of neuromuscular synapsis during Wallerian degeneration / C. Eyzaguirre, J. Espildora, J.V. Luco // *Acta Physiologica*. – 1956.— Vol. 2 (27). – P. 213–227.
78. Fletcher, P. The effect of curare on the release of acetylcholine from mammalian motor nerve terminals and an estimate of quantum content / P. Fletcher, T. Forrester // *The Journal of Physiology*. –1975. – Vol.251(1). – P. 131-144.
79. Fossier, P. Neural mechanisms of conditioning. Acetylcholinesterase and synaptic efficacy. Neural mechanisms of conditioning / P. Fossier, G. Baux, L. Tauc // *Plenum Press*.—1985.— P. 341– 354.
80. Gilmorea K.J., Abnormal motor unit firing rates in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy / K.J. Gilmorea, E.A. Kirk, T.A. Doherty // *Journal of the Neurological Sciences*.—2020(1). – Vol.15(414).– P. 1–7.
81. Gilmorea K.J., Nerve dysfunction leads to muscle morphological abnormalities in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy assessed by MRI / K.J. Gilmorea, J. Fanous, T.J. Doherty // *Clinical Anatomy*. –2020(2).–Vol.33(1).– P.77–84.
82. Gordon, A.S. Phosphorylation of acetylcholine receptor by endogenous membrane protein kinase in receptor-enriched membranes of *Torpedo californica*

- / A.S. Gordon, C.G. Davis, D. Milfay, I. Diamond // *Nature*. –1977. – Vol. 267(5611).– P.539–540.
83. Gorson, K.C. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: clinical features and response to treatment in 67 consecutive patients with and without a monoclonal gammopathy / K.C. Gorson, G. Allam, A.H. Ropper // *Neurology*. – 1997. – Vol.48 (2).– P.321–328.
84. Grutter, T. Nicotinic receptors in wonderland / T. Grutter, J.P. Changeux // *Trends in Biochemical Sciences*. –2001. – Vol. 26(8). – P.459–462.
85. Gutmann, E. Veranderungen in quergestreiften Muskel bei Durchtrennung in Abhangigkeit von der Lange des peripheren Stumpfes / E. Gutmann, Z. Vodicka, J. Zelena // *Physiol. Bohemoslov*. –1955.– Vol. 4 (28). – P. 200-204.
86. Hahn, A.F. Plasma-exchange therapy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, sham-controlled, cross-over study / A.F. Hahn, C.F. Bolton, N. Pillay, C. Chalk, T. Benstead, V. Bril, K. Shumak, M.K. Vandervoort, T.E. Feasby // *Brain*. –1996.–Vol.119(4).–P.1055–1066.
87. Hall, Z. W. Multiple Forms of Acetylcholinesterase and their distribution in Endplate and Non-Endplate Regions of Rat Diaphragm Muscle / Z. W. Hall // *Journal of Neurobiology*. –1973.– Vol.4(4).– P.343–361.
88. Hamlyn, J.M. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma / J.M. Hamlyn, M.P. Blaustein, S. Bova, D.W. DuCharme, D.W. Harris, F. Mandel, W.R. Mathews, J.H. Ludens // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – V. 88. – №. 14. – P. 6259-6263.
89. Hausmanowa-Petrusewicz, I. Chronic acquired demyelinating motor neuropathy / I. Hausmanowa-Petrusewicz, K. Rowinska-Marcinska, A. Kopec // *Acta Neurologica Scandinavica*. –1991.– Vol.84(1).– P.40–45.
90. Heilbronn, E. Acetylcholine and related enzymes in normal and ligated cholinergic nerves from *Torpedo marmorata* / E. Heilbronn, H. Pettersson // *Acta Physiologica*. –1973.– Vol.88. – P.590- 592.
91. Heiny, J. A. The Nicotinic Acetylcholine Receptor and the Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 2$ Isoform Interact to Regulate Membrane Electrogenesis in Skeletal Muscle / A. J.

- Heiny, V. V. Kravtsova, F. Mandel, T.L. Radzyukevich, B. Benziane, A.V. Prokofiev, S.E. Pedersen, A. V. Chibalin, I. I. Krivoi // The Journal of Biological Chemistry .–2010. – Vol.285(37).– P. 28614–28626.
92. Heiwall, P.O. The effect of local application of vinblastine or colchicine on acetylcholine accumulation in rat sciatic nerve / P.O. Heiwall, N.R. Saunders, A. Dahlstrom, J. Haggendal // Acta Physiologica . –1976.– Vol.96. – P.478-485.
93. Heo Y-A., Efgartigimod: First Approval / Y-A. Heo // Drugs. –2022. – Vol.82(3). – P. 341–348.
94. Hokkoku K., Quantitative muscle ultrasound is useful for evaluating secondary axonal degeneration in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. / K. Hokkoku ,K Matsukura, Y Uchida // Brain and Behavior. – 2017. – Vol.7(10).– P. 1–10.
95. Howard, J.F. Safety, efficacy, and tolerability of efgartigimod in patients with generalised myasthenia gravis (ADAPT): a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial / J.F. Howard, V. Bril, T. Vu, C. Karam, S. Peric, T. Margania, H. Murai, M. Bilinska, R. Shakarishvili, M. Smilowski, A. Guglietta, P. Ulrichs, T. Vangeneugden, K. Utsugisawa, J. Verschueren, R. Mantegazza, ADAPT Investigator Study Group // The Lancet Neurology. –2021. – Vol.20(7). – P. 526–236.
96. Huganir, R.L. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by an endogenous tyrosine-specific protein kinase / R. L. Huganir, K. Miles, P. Greengard // Proceedings of the National Academy of Sciences.–1984. – Vol. 81(22).– P.6968–6972.
97. Hughes, R.A. Corticosteroids for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy /R.A. Hughes, M.M. Mehendiratta, Y.A. Rajabally // Cochrane database of systematic reviews. –2017. – Vol.11(11). – P. 1–42.
98. Ikeda, S. Clinicopathological characteristics of subtypes of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy / S. Ikeda, H. Koike, R. Nishi, Y. Kawagashira, M. Iijima, M. Katsuno, G. Sobue // Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry. –2019. – Vol.90(9).– P.988–996.

99. Illes, Z. Cerebrospinal fluid findings in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies / Z. Illes, M. Blaabjerg // *Handbook of Clinical Neurology*. –2017.– Vol.146.– P.125–138.
100. Joshi, A.R. Loss of Schwann cell plasticity in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) / A.R. Joshi, L.Holmann, I. Bobylev, C. Schneider, C. Ritter, J. Weis, H.C. Lehmann // *Journal of Neuroinflammation*.– 2016.–Vol.13(1).–P.1–9.
101. Jung, S. Biphasic form of experimental autoimmune neuritis in dark Agouti rats and its oral therapy by antigen-specific tolerization / S. Jung, S. Gaupp, T. Korn, G. Köllner, H.P. Hartung, K.V. Toyka // *Journal of Neuroscience Research*.– 2004.–Vol.75(4).–P.524–535.
102. Katz, B. Transmitter leakage from motor nerve endings / B. Katz, R. Miledi // *Proceedings of the Royal Society*. –1977.– Vol.196(1122). – P. 57-72.
103. Kiene, M. L. Synaptic vesicles in electromotoneurones: Axonal transport, site of transmitter uptake and processing of a core proteoglycan during maturation /M.L. Kiene , H. Stadler // *The EMBO Journal*. –1987.– Vol.6 .– P.2217 – 2221.
104. Kimura, K. A case of myasthenia gravis in childhood associated with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy / K. Kimura, A. Nezu, S. Kimura, N. Otsuki, T. Kobayashi, Y. Nomura, M. Segawa // *Neuropediatrics*.– 1998.–Vol.29(2).–P.108–12.
105. Koike, H. Intra-axonal diffusion of [3H]acetylcholine and [3H]gamma-aminobutyric acid in a neurone of Aplysia / H. Koike ,Y. Nagata // *The Journal of Physiology*. –1979.– Vol.295. – P.397-417.
106. Kotova, O. Cardiotonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src- and ERK1/2-dependent mechanism / O. Kotova, L. Al-Khalili, S. Talia, C. Hooke, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov, A.V. Chibalin // *Journal of Biological Chemistry*.–2006.–Vol.281.–P.20085–20094.
107. Kragenbrink, R. Chronic stimulation of acetylcholine receptors: differential effects on Na,K-ATPase isoforms in a myogenic cell line / R. Kragenbrink, S.C.

- Higham, S.C. Sansom, T.A. Pressley // *Synapse* .–1996. – Vol.23(3).– P. 219–223.
108. Kravtsova, V.V. Isoform-specific Na,K-ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle / V.V. Kravtsova, V.V. Matchkov, E.V. Bouzinova, A.N. Vasiliev, I.A. Razgovorova, J.A. Heiny, I.I. Krivoi // *BioMed Research International*.–2015.–Vol.2015.–P.1–11.
109. Kravtsova, V.V. Distinct α 2 Na,K-ATPase membrane pools are differently involved in early skeletal muscle remodeling during disuse / V.V. Kravtsova, A.M. Petrov, V.V. Matchkov, E.V. Bouzinova, A.N. Vasiliev, B. Benziane, A.L. Zefirov, A.V. Chibalin, J.A. Heiny, I.I. Krivoi // *The Journal of General Physiology*.–2016.– Vol.147(2).– P.175–188.
110. Krivoi, I.I. On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and Na⁺,K⁺-ATPase / I.I. Krivoi, T.M. Drabkina, V.V. Kravtsova, A.N. Vasiliev, M.J. Eaton, S.N. Skatchkov, F. Mandel // *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*.–2006.–Vol.452(6).–P.756–765.
111. Krnjevic, K. The release of acetylcholine from the denervated rat diaphragm / K. Krnjevic, D.W. Straughan // *The Journal of Physiology*. –1964. – Vol. 170(2). – P. 371-378.
112. Kubasov I.V., Effect of exogenous acetylcholine on neuromuscular transmission in the stimulated rat diaphragm / I.V. Kubasov, I.I. Krivoi, E.V. Lopatina // *Bulletin of experimental biology and medicine*. –1994.– Vol.118(5). – P.1153-1155.
113. Kuffler, S.W. The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse / S.W. Kuffler, D. Yoshikami // *The Journal of Physiology*. –1975.– Vol.251(2). – P. 465-482.
114. Kutz L.C. Isoform-specific role of Na/K-ATPase α 1 in skeletal muscle / L.C. Kutz, S.T. Mukherji // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*.–2018.–Vol.314(6).–P.620–629.

115. Kwa, M.S.G. Autoimmunoreactivity to Schwann cells in patients with inflammatory neuropathies / M.S.G Kwa, I.N.V. Schaik, R.R. De Jonge, A. Brand, L. Kalaydjieva, N.V. Belzen, M. Vermeulen, F. Baas // *Brain*. –2003. – Vol.126(2).– P. 361–375
116. Lawley, A. Clinical correlates of fatigue in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy / A. Lawley, A. Abbas, S. Seri, Y.A. Rajabally // *Muscle and Nerve*. –2020(1). – Vol.62 (2).– P.226–232.
117. Lawley, A. Peripheral nerve electrophysiology studies in relation to fatigue in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy / A. Lawley, A. Abbas, S. Seri, Y.A. Rajabally // *Clinical Neurophysiology*. –2020(2). – Vol.131 (12).– P.2926–2931.
118. Lee, Y. Rapsyn interacts with the muscle acetylcholine receptor via alpha-helical domains in the alpha, beta, and epsilon subunit intracellular loops / Y. Lee, J. Rudell, M. Ferns // *Neuroscience*. –2009. – Vol. 163(1). –P.222-32.
119. Lehmann, H.C. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: update on diagnosis, immunopathogenesis and treatment / H.C. Lehmann, D. Burke, S. Kuwabara // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*.–2019.– Vol.90(9).–P.981–987.
120. Li, Z. NaKtide, a Na/K-ATPase-derived peptide Src inhibitor, antagonizes ouabain-activated signal transduction in cultured cells / Z. Li, T. Cai, J. Tian, J. Xie, X. Zhao, L. Liu, J.I. Shapiro, Z. Xie // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol.284(31).– P. 21066–21076.
121. Lomo, T. Control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat / T. Lomo, J. Rosenthal // *The Journal of Physiology*. –1972. – Vol. 221(2). – P.493–513.
122. Lomo, T. Scientific Discoveries: What Is Required for Lasting Impact / T. Lømo // *Annual Review of Physiology*. –2016. – Vol. 78 .– P. 1–21.
123. Lonigro, A. Disruption of neurofascin and gliomedin at nodes of Ranvier precedes demyelination in experimental allergic neuritis / A. Lonigro, J.J. Devaux // *Brain*.–2009.–Vol.132(1).–P.260–273.

124. Lopatina E.V., Modulation of the transducer function of Na^+,K^+ -ATPase: new mechanism of heart remodeling / E.V. Lopatina, A.V. Kipenko, N.A. Pasatetskaya, V.A. Penniyaynen, B.V. Krylov // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 2016. – V. 94(10). – P. 1110-1116.
125. Lopatina, E.V. Role of Na/K-ATPase in regulation of neurite growth in sensory neurons / E.V. Lopatina, V.A. Penniyainen // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2005. – Vol.139(2). – P.190–192.
126. Losen, M. Increased expression of rapsyn in muscles prevents acetylcholine receptor loss in experimental autoimmune myasthenia gravis / M. Losen, M.H.W. Stassen, P. Martinez-Martinez, B. M. Machiels, H. Duimel, P. Frederik, H. Veldman, J. H. J. Wokke, F. Spaans, A. Vincent, M. H. De Baets // Brain. – 2005. – Vol. 128(10). – P.2327–2337.
127. Lu, B. Neurotrophic regulation of the development and function of the neuromuscular synapses / B. Lu, H.S. Je // Journal of Neurocytology. – 2003. – Vol. 32(5–8). – P. 931–941.
128. Maeda, K. A massive dose of vincristine // K. Maeda, M. Ueda, H. Ohtaka, Y. Koyama, M. Ohgami, H. Miyazaki // Japanese Journal of Clinical Oncology. – 1987. – Vol.17(3). – P. 247-253.
129. Mahdi-Rogers, M. Epidemiology of chronic inflammatory neuropathies in southeast / M. Mahdi-Rogers , R.A.C. Hughes // European Journal of Neurology. – 2014. – Vol.21(1).– P. 28–33.
130. Malomouzh, A.I. Modern concepts of cholinergic neurotransmission at the motor synapse / A.I. Malomouzh, E.E. Nikolsky // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A Membrane and Cell Biology. –2018. – Vol. 12 (3). – P. 209–222.
131. Manso, C. Contactin-1 IgG4 antibodies cause paranode dismantling and conduction defects / C. Manso, L. Querol, M. Mekaouche, I. Illa, J.J. Devaux // Brain. –2016. – Vol.139(6).– P. 1700–1712.
132. Markvardsen L.K., Muscle Strength and Aerobic Capacity in Patients with CIDP One Year after Participation in an Exercise Trial / L.K. Markvardsen, A.K.R.

- Carstens, K.L. Knak // Journal of Neuromuscular Diseases. –2019.–Vol.6(1).–P.93–97.
133. Martignago, S. Muscle histopathology in myasthenia gravis with antibodies against MuSK and AChR. / S. Martignago, M. Fanin, E. Albertini, E. Pegoraro, C. Angelini // Neuropathology and Applied Neurobiology.–2009.–Vol.35(1).–P.103–10.
134. Matchkov, V.V. Specialized functional diversity and interactions of the Na,K-ATPase / V.V. Matchkov, I.I. Krivoi // Frontiers in Physiology –2016.–Vol.7(179).–P.1–21
135. Mathey, E.K. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype / E.K. Mathey, S.B. Park // Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.–2015. – Vol.86(9).– P. 973–985.
136. McCombe, P.A. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. A clinical and electrophysiological study of 92 cases / P.A. McCombe, J.D. Pollard, J.G. McLeod // Brain.–1987. – Vol.110(6).– P. 1617–1630.
137. McCord M., Targeting WNT signaling for multifaceted glioblastoma therapy / M. McCord, Y. Mukouyama, M.R. Gilbert, S. Jackson // Frontiers in Cellular Neuroscience. –2017.–Vol.11(318).–P.1–10.
138. Mitchell, J.F. The spontaneous release of acetylcholine from the denervated hemidiaphragm of the rat / J.F. Mitchell, A. Silver // The Journal of Physiology. – 1963.– Vol.165(1). – P. 117-129.
139. Mori, M. Concomitant chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and myasthenia gravis following cytomegalovirus infection / M. Mori, S. Kuwabara, Y. Nemoto, N. Tamura, T. Hattori // Journal of the Neurological Sciences.– 2006.–Vol.240(1-2).–P.103–106.
140. Namba, T. Cholinesterase activity of motor end plate in human skeletal muscle / T. Namba, D. Grob // Journal of Clinical Investigation. –1970.– Vol.49(5).– P.936–942.

141. Nikolsky, E.E. Nonquantal acetylcholine release in the mouse diaphragm after phrenic nerve crush and during recovery / E.E.Nikolsky, T.I. Oranska, F. Vyskocil // Experimental Physiology.–1996. – Vol. 81(3). – P. 341–348.
142. Nikolsky, E.E. Role of non-quantal acetylcholine release in surpluspolarization of mouse diaphragm fibres at the endplate zone / E.E. Nikolsky, H. Zemkova, V.A. Voronin, F. Vyskocil // The Journal of Physiology. –1994. – Vol. 477 (3). – P. 497–502.
143. Nikolsky, E.E. The dependence of non-quantal acetylcholine release on the choline-uptake system in the mouse diaphragm // E.E. Nikolsky, V.A. Voronin , T.I. Oranska ,F. Vyskocil // Pflügers Archiv: European Journal of Physiology. – 1991. – Vol. 418(1–2). – P. 74-78.
144. Pascual-Goni, E. Autoantibodies in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy / E. Pascual-Goni, L. Martin-Aguilar, L. Querol // Current Opinion in Neurology. –2019 . – Vol.32 (5).– P. 651–657.
145. Pirkmajer, S. Ouabain Suppresses IL-6/STAT3 Signaling and Promotes Cytokine Secretion in Cultured Skeletal Muscle Cells / S. Pirkmajer, K. Bezjak, U. Matkovic, K. Dolinar, L.Q. Jiang, K. Mis, K. Gros, K. Milovanova, K.P. Pirkmajer, T. Mars, L. Kapilevich, A.V. Chibalin // Frontiers in Physiology.– 2020.–Vol.11.–P.1–50.
146. Potter, L.T. Synthesis, storage and release of [14C]acetylcholine in isolated rat diaphragm muscles / L.T. Potter // The Journal of Physiology. –1970. – Vol. 206(1). – P. 145-166.
147. Pyatka, N. Tremor in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: Proof of unifying network model for dystonia / N. Pyatka, A. Sedov, B.L. Walter, H.A. Jinnah, A.G. Shaikh // Progress in Brain Research. –2019. – Vol.249.– P.285–294.
148. Quan, W. Myasthenia gravis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in the same patient - a case report / W. Quan, J. Xia, Q. Tong, J. Lin, X. Zheng, X. Yang, D. Xie, Y. Weng, X. Zhang // International Journal of Neuroscience. –2018. – Vol.128 (6).– P. 570–572.

149. Querol, L. Autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies: diagnostic and therapeutic implications / L. Querol, J. Devaux, R. Rojas-Garcia, I. Illa // *Nature Reviews Neurology*. –2017. – Vol.13(9).– P. 533–547.
150. Radzyukevich, T.L. Tissue-specific role of the Na,K-ATPase α 2 isozyme in skeletal muscle // T. L. Radzyukevich, J.C. Neumann, T.N. Rindler, N. Oshiro, D.J. Goldhamer, J.B. Lingrel, J.A. Heiny // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288(2).– P.1226–1237.
151. Rajabally, Y.A. Dose of intravenous immunoglobulins in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy / Y.A. Rajabally, H. Seow, P. Wilson // *Journal of the Peripheral Nervous System*.–2006.–Vol.11(4).–P.325–329.
152. Ratnam, M. Transmembrane topology of nicotinic acetylcholine receptor: immunochemical tests contradict theoretical predictions based on hydrophobicity profiles / M. Ratnam, D.L. Le Nguyen, P.B. Sargent, J. Lindstrom // *Biochemistry*. –1986a. – Vol. 25(9).– P.2633–2643.
153. Rotundo, R.L. The NMJ as a model synapse: New perspectives on formation, synaptic transmission and maintenance: Acetylcholinesterase at the neuromuscular junction / R.L. Rotundo // *Neuroscience Letters*. –2020.– Vol.735.– P.1–23.
154. Ruff, R.L. Slow sodium channel inactivation in mammalian muscle: a possible role in regulating excitability / R.L. Ruff, L. Simoncini, W. Stühmer // *Muscle and Nerve*.–1988.–Vol.11(5).–P.502–510.
155. Schatzmann, H. J. Effect of Cardiac Glycosides on Active Na-K-Transport / H. J. Schatzmann // *Protoplasma*. –1953. – Vol. 63(1).– P.136 – 142.
156. Schoner, W. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action / W. Schoner, G. Scheiner-Bobis // *American Journal of Cardiovascular Drugs*. –2007. – Vol. 7(3).– P.173–189.
157. Skou J.C. Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane / J.C. Skou // *Physiological Reviews*. – 1965. – V. 45. – P. 596-617.

158. Sohal, G. S. Role of innervation on the embryonic development of skeletal muscle / G. S. Sohal, R. K. Holt // *Cell and Tissue Research.* –1980.– Vol. 210(3). –P.383-393.
159. Sokolova M. et al. Study of reinnervation process in patients with 2 type of spinal muscular atrophy: clinical experimental study // *Activitas Nervosa Superior Rediviva.* – 2015. – T. 5. – №. 4. – C. 101-104.
160. Soliven, B. Animal models of autoimmune neuropathy / B. Soliven // *ILAR Journal.* –2014.–Vol.54(3).–P.282–290.
161. Sudhof, T.C. The synaptic vesicle cycle / T.C Sudhof // *Annual Review of Neuroscience.* –2004.– Vol.27. – P. 509-547.
162. Tackenberg, B. Impaired inhibitory Fcgamma receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy / B. Tackenberg, I. Jelcic, A. Baerenwaldt, W.H. Oertel, N. Sommer, F. Nimmerjahn, J.D. Lünemann // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* –2009. – Vol.106(12).– P. 4788–4792.
163. Tang, L. Distinguish CIDP with autoantibody from that without autoantibody: pathogenesis, histopathology, and clinical features / L. Tang, Q. Huang, Z. Qin, X. Tang // *Journal of Neurology.* –2021. – Vol.268 (8).– P. 2757–2768.
164. Tzartos, S.J. High affinity binding of alpha-bungarotoxin to the purified alpha-subunit and to its 27000-dalton proteolytic peptide from *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor requirement for sodium dodecyl / S.J. Tzartos, J.P. Changeux // *The EMBO Journal.* –1983. – Vol. 2(3). – P.381–387.
165. Tzartos, S.J. Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits / S.J. Tzartos, J. Lindstrom // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* –1980. – Vol. 77(2).– P.755–759.
166. Urazaev, A. Carbachol and acetylcholine delay the early postdenervation depolarization of muscle fibres through M1-cholinergic receptors / A. Urazaev,

- N. Naumenko, A. Malomough, E. Nikolsky, F. Vyskocil // Journal of Neuroscience Research. –2000. – Vol. 37 (4). – P. 255–263.
167. Van den Bergh, P.Y.K. European Federation of Neurological Societies; Peripheral Nerve Society. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision / P.Y. K. Van den Bergh, R.D.M. Hadden, P. Bouche, D.R. Cornblath, A. Hahn, I. Illa, C.L. Koski, J.M. Leger, E. Nobile-Orazio, J. Pollard, C. Sommer, P.A. van Doorn, I.N. van Schaik // European Journal of Neurology. – 2010. – Vol.17(3).– P.356–363.
168. Van Lieverloo, G.G.A. Corticosteroids in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy : A retrospective, multicentre study, comparing efficacy and safety of daily prednisolone, pulsed dexamethasone, and pulsed intravenous methylprednisolone / G.G.A. Van Lieverloo, S. Peric, P.E. Doneddu, F. Gallia, A. Nikolic, L. Wieske, C. Verhamme, I.N. Van Schaik, E. Nobile-Orazio, I. Basta, F. Eftimov // Journal of Neurology. –2018.–Vol.265(9).–P.2052–2059.
169. Vyskocil, F. An analysis of the mechanisms underlying the non-quantal release of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction / F. Vyskocil, E. Nikolsky, C. Edwards// Neuroscience –1983. – Vol.9(2). – P. 429–435.
170. Vyskocil, F. Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction / F. Vyskocil, A.I. Malomouzh, E.E. Nikolsky // Physiological Research. –2009.– Vol.58(6).– P.763–784.
171. Vyskocil, F. Non-quantal release of acetylcholine affects polyneuronal innervation on developing rat muscle fibres / F.Vyskocil, G. Vrbova // European Journal of Neuroscience. –1993. – Vol. 5(12). – P. 1677–1683.
172. Vyskocil, F. Non-quantal release of transmitter at mouse neuromuscular junction and its dependence on the activity of Na^+ - K^+ ATP-ase / F. Vyskocil, P. I. Pflügers // Pflügers Archiv: European Journal of Physiology. –1977.– Vol.370(3). – P. 295-297.

173. Waksman, B.H. A comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig, and mouse / B.H. Waksman, R.D. Adams // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. –1956. – Vol.15(3). – P. 293–334.
174. Waksman, B.H. The cellular basis of the immune response / B.H. Waksman // Annales de l'Institut Pasteur (Paris). –1963. – Vol.105. – P. 465–475.
175. Wang, Y. Involvement of Na/K-ATPase in hydrogen peroxide-induced activation of the Src/ERK pathway in LLC-PK1 cells / Y. Wang, Q. Ye, C. Liu, J.X. Xie, Y. Yan, F. Lai, Q. Duan, X. Li, J. Tian, Z. Xie // Free Radical Biology and Medicine. –2014. – Vol.71(31). – P. 415–426.
176. Woodward, W.R. A potential screening technique for neurotransmitters in the CNS: model studies in the cat spinal cord / W.R. Woodward, S.H. Lindstrom // Brain Research. –1977. – Vol.137. – P.37-52.
177. Xie, Z. The Na/K-ATPase-mediated signal transduction as a target for new drug development / Z. Xie, J. Xie // Frontiers in Bioscience. –2015. – Vol.10. – P. 3100–3109.
178. Yu, H. Heterogeneity of signal transduction by Na-K-ATPase alpha-isoforms: role of Src interaction / H. Yu, X. Cui, J. Zhang, J.X. Xie, M. Banerjee, S.V. Pierre, Z. Xie // American Journal of Physiology-Cell Physiology. –2018. – Vol.314(2). – P.202–210.
179. Yuan, J. The clinical features of patients concurrent with Guillain-Barre syndrome and myasthenia gravis / J. Yuan, J. Zhang, B. Zhang, W. Hu // Neurosciences Journal. –2018. –Vol.23(1). –P.66–70.
180. Zemkova, H. A study on early post-denervation changes of non-quantal and quantal acetylcholine release in the rat diaphragm / H. Zemkova, F. Vyskocil, C. Edwards // Pflügers Archiv: European Journal of Physiology. –1987. – Vol. 409(4-5). – P. 540-546.
181. Zweiman, B. Immune reactions to P2 protein in human inflammatory demyelinative neuropathies / B. Zweiman, A. Rostami, R.P. Lisak, A.R. Moskovitz, D.E. Pleasure // Neurology. –1983. – Vol.33(2). – P. 234–237.

Автор выражает глубокую признательность научным руководителям Екатерине Валентиновне Лопатиной и Марии Георгиевне Соколовой, благодарит своих коллег: Наталью Анатольевну Пасатецкую, Святослава Игоревича Климшина, а также всех сотрудников кафедры физиологии нормальной ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова.

За всестороннюю поддержку отдельная благодарность сотрудникам неврологического отделения №2 ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова: зав. отделением Алексею Александровичу Яковлеву, докторам Михаилу Сергеевичу Пушкареву и Евгении Андреевне Гавриловой.