

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

ХАБИБРАХМАНОВ АЙДАР НАЗИМОВИЧ

**КЛИНИКО-МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИСФУНКЦИИ
НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСОВ И АКТИВНОСТИ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРИ БОКОВОМ АМИОТРОФИЧЕСКОМ
СКЛЕРОЗЕ У ЧЕЛОВЕКА И В МОДЕЛИ НА ЖИВОТНЫХ**

3.1.24 – Неврология

1.5.5 – Физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор Э.И. Богданов

доктор медицинских наук, доцент
М.А. Мухамедьяров

Казань - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Патогенез бокового амиотрофического склероза: общие сведения	14
1.2. «Восходящая» гипотеза патогенеза БАС	23
1.3. Молекулярные механизмы нервно-мышечной синаптической передачи	26
1.4. Нарушения функционирования нервно-мышечного синапса при БАС у человека и в модели на животных	29
1.5. Ацетилхолинэстераза и холинергическая дисфункция при боковом амиотрофическом склерозе	34
1.6. Биомаркеры бокового амиотрофического склероза	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1. Материалы исследования	39
2.1.1. Характеристика клинического материала	39
2.1.2. Моделирование бокового амиотрофического склероза.....	41
2.2. Методы исследования	44
2.2.1. Клинико-неврологический метод.....	44
2.2.2. Измерение активности ацетилхолинэстеразы в плазме крови и слюне .	46
2.2.3. Флуоресцентное исследование синаптических белков нервно-мышечного синапса	48
2.2.4. Статистическая обработка данных.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
3.1. Клиническая характеристика пациентов с боковым амиотрофическим склерозом	55
3.2. Результаты измерения активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови и слюны у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом	63
3.3. Результаты измерения активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови трансгенных мышцей с моделью бокового амиотрофического склероза	70

3.4. Флуоресценция ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечных синапсах диафрагмы трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза	71
3.5. Иммуноэкспрессия пре- и постсинаптических белков в нервно-мышечных синапсах диафрагмы трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза	75
3.5.1. Экспрессия пре- и постсинаптических белков у mSOD1-трансгенных мышей	75
3.5.2. Экспрессия пре- и постсинаптических белков у FUS-трансгенных мышей	79
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	106
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	107
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	108
БЛАГОДАРНОСТИ	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	113
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	150
ПРИЛОЖЕНИЯ	154
Приложение А - Схема иммунофлуоресцентного исследования	154
Приложение Б – Значения измерений активности АХЭ плазмы крови во всех исследованных группах	155
Приложение В – Значения измерений активности АХЭ слюны во всех исследованных группах	160

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В течение ряда десятилетий наблюдается рост заболеваемости населения нейродегенеративными заболеваниями [155], одним из наиболее тяжелых среди них является боковой амиотрофический склероз (БАС). БАС представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью мотонейронов головного и спинного мозга, проявляющееся в виде прогрессирующей мышечной слабости и амиотрофий [13]. Для БАС характерна высокая степень вариабельности возраста начала заболевания, его первых клинических проявлений, фенотипических вариантов, а также темпов прогрессирования [9]. Средняя продолжительность жизни с момента установления диагноза составляет 36 месяцев [258]. БАС принято считать гетерогенным заболеванием, развитие которого связано с комбинацией генетических факторов, факторов внешней среды, а также процессов естественного старения [2, 94, 199]. В патогенезе БАС важную роль играют нарушение метаболизма белков и рибонуклеиновых кислот (РНК), образование белковых агрегатов, окислительный стресс, нарушение аксонального транспорта, митохондриальная дисфункция, эксайтотоксичность, астроцитарная дисфункция, активация микроглии, нейровоспаление [2, 18, 19, 23, 45, 141, 247].

Фенотипическое разнообразие делает БАС исключительно трудным для диагностики заболеванием [286]. Его поздняя диагностика является серьезной проблемой, препятствующей эффективному поиску возможных методов лечения. В среднем задержка между появлением первых симптомов и постановкой диагноза составляет от 13 до 18 мес. [124]. Изучение специфичных биомаркеров может помочь в решении данной проблемы. На сегодняшний день хорошо изученными биомаркерами БАС являются легкие и фосфорилированные тяжелые цепи нейрофиламента, рецептор нейротрофина р75 (р75NTR), ряд микро-РНК [21, 334].

Одним из маркеров БАС, предположительно, может выступать ацетилхолинэстераза (АХЭ). АХЭ является важной составляющей

холинергической системы и неотъемлемым звеном эффективной нервно-мышечной передачи. Основным источником АХЭ в нервно-мышечном синапсе (НМС) является скелетная мышца, а синтез ее зависит от паттерна иннервации [292, 310].

Степень разработанности темы исследования

Ранее было показано, что у пациентов с БАС может отмечаться повышение активности АХЭ в плазме крови [38, 139]. Высвобождение АХЭ из пораженных НМС в результате денервации является возможным механизмом повышения активности АХЭ в плазме крови, что подтверждается исследованиями на денервационных моделях [70, 98]. В скелетной мышце также отмечается изменение экспрессии АХЭ у пациентов с БАС и в денервационных моделях [70, 98, 138]. Таким образом, имеются теоретические и экспериментальные предпосылки считать АХЭ плазмы крови потенциальным диагностическим биомаркером БАС, отражающим денервацию НМС скелетных мышц [224, 226]. АХЭ также обнаруживается в слюне. Ранее были проведены исследования АХЭ слюны у пациентов с болезнями Альцгеймера и Паркинсона, где было показано изменение ее активности (Sayer R. et al., 2004; Fedorova T. et al., 2015). Однако подобных исследований при БАС не проводилось.

Сама денервация НМС на сегодняшний день считается не вторичным процессом, а ранним и самостоятельным патогенетическим звеном в патогенезе БАС, что получило отражение в «восходящей гипотезе» (dying-back) развития заболевания [14, 94, 226]. Данная гипотеза подтверждается целым рядом наблюдений, в ходе которых было выявлено снижение базового выброса нейромедиатора, замедление процессов рециклирования синаптических везикул, а также развитие денервации НМС еще до появления признаков дегенерации мотонейронов спинного мозга [52, 59, 115, 119]. В норме синаптическую передачу обеспечивает работа ряда синаптических белков, участвующих в секреции и рецепции нейромедиатора, рециклирования синаптических везикул. К таким белкам относятся синаптофизин, синапсин I, SNAP-25, н-холинорецепторы и др. Синаптофизин является наиболее распространенным белком синаптических

везикул, функции которого связаны с их формированием, а также регуляцией экзоцитоза нейромедиатора и синаптогенезом [10]. Синапсин I участвует в формировании пулов синаптических везикул и в регуляции высвобождения нейротрансмиттера [300]. SNAP-25 (synaptosomal-associated protein 25-kD) – это пресинаптический мембранный белок, основной компонент белкового комплекса SNARE (soluble NSF attachment receptor), участвующий в слиянии синаптической везикулы с пресинаптической мембраной с последующим высвобождением нейротрансмиттера [167]. В рецепции ацетилхолина при синаптической передаче участвует трансмембранный лиганд-зависимый ионный канал - никотиновый ацетилхолиновый рецептор, основной маркер постсинаптической мембраны в НМС [93].

Несмотря на установленную важную роль НМС в патогенезе БАС, молекулярные события в ходе развития дисфункции НМС до конца не изучены [224]. Таким образом, актуальной задачей становится исследование диагностической значимости измерения активности АХЭ как потенциального биомаркера БАС и текущего денервационного процесса совместно с изучением молекулярных механизмов развития патологии НМС. При этом патологические изменения на уровне НМС могут носить гетерогенный характер, учитывая известную вариабельность БАС. Данные о молекулярных изменениях на уровне НМС могут быть учтены при разработке таргетной терапии, направленной на стабилизацию НМС. Проведение подобных исследований у пациентов на досимптомной стадии сопряжено с трудностями забора материала, однако данная проблема может быть решена путем использования лабораторных животных, экспрессирующих человеческие мутантные гены, ответственные за развитие БАС [222].

Цель исследования

Изучить клиничко-молекулярные характеристики НМС и активность АХЭ у человека с БАС и в моделях заболевания для оптимизации диагностических критериев клинических вариантов БАС.

Задачи исследования

1. Исследовать активность АХЭ слюны у пациентов с БАС и оценить ее корреляцию с клиническими характеристиками заболевания.
2. Провести измерение активности АХЭ плазмы крови пациентов с БАС и оценить ее корреляцию с клиническими характеристиками заболевания.
3. Провести измерение активности АХЭ плазмы крови в трансгенной модели БАС на досимптомной и симптомной стадии заболевания.
4. Изучить экспрессию синаптических белков, участвующих в механизмах секреции (синаптофизин, SNAP-25, синапсин I), рецепции (н-холинорецепторы), гидролиза (ацетилхолинэстераза) ацетилхолина в НМС в mSOD1- и FUS-трансгенных моделях БАС на досимптомной и симптомной стадии заболевания.

Научная новизна

Впервые проведено измерение активности АХЭ слюны у пациентов с БАС. Установлено, что у пациентов с бульбарной формой БАС в отличие от пациентов со спинальной формой БАС и здоровых лиц отмечается достоверное повышение активности АХЭ, что может быть использовано в диагностических и прогностических целях.

Установлено, что, несмотря на теоретические и экспериментальные предпосылки, исследование активности АХЭ плазмы крови не обладает доказанной диагностической ценностью в диагностике БАС у человека. Также активность АХЭ плазмы впервые была измерена в трансгенной модели БАС, в которой, как и у пациентов с БАС, не было выявлено ее достоверного изменения.

Впервые в ходе комплексного исследования экспрессии синаптических белков, вовлеченных в процессы секреции, рецепции, гидролиза ацетилхолина, в двух трансгенных моделях было показано, что развитие патологии на уровне НМС носит гетерогенный характер, который проявляется в виде разнонаправленного изменения экспрессии белков синапсина I и SNAP-25 на досимптомной стадии. По

мере развития признаков патологии в обеих моделях БАС отмечается общий паттерн изменения экспрессии АХЭ в виде ее увеличения, что может вносить вклад в патогенез заболевания.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость: установленный факт достоверного изменения активности АХЭ слюны у пациентов с бульбарной формой БАС может служить маркером степени вовлечения стволовых вегетативных центров в дегенеративный процесс у данной категории пациентов. Это подтверждается результатами ранее проведенных исследований, в которых было выявлено более грубое нарушение парасимпатического контроля сердечной деятельности у пациентов с бульбарной формой БАС в сравнении с пациентами со спинальной формой заболевания [203], а также нарушение функционирования слюнных желез, связанных с изменением вегетативного контроля [171]. Изменение активности АХЭ слюны у пациентов с бульбарной формой БАС, вероятно, обусловлено развитием вегетативной дисфункции вследствие реакции на нейродегенеративный процесс автономных нейронов ствола мозга.

Несмотря на теоретические и практические предпосылки, результаты диссертационного исследования свидетельствует о том, что активность АХЭ плазмы крови не отражает текущий хронический денервационный процесс при БАС.

В ходе диссертационной работы были получены данные о временном ходе нарушения экспрессии ряда синаптических белков. Изменения на досимптомной стадии носят гетерогенный характер, что должно учитываться при разработке таргетной терапии, направленной на стабилизацию НМС. Синаптические белки, подверженные наиболее значимым изменениям на досимптомной стадии (синапсин I и SNAP-25) могут рассматриваться в качестве потенциальных мишеней при разработке генно-клеточных терапевтических подходов. Также, полученные результаты изменения экспрессии ряда синаптических белков в двух трансгенных моделях дополняют и объясняют электрофизиологические данные о нарушении

синаптической передачи при БАС.

Выявленные достоверные лабораторные различия (активность АХЭ слюны) в двух клинических формах БАС (бульбарная и спинальная), а также данные о разнонаправленном характере изменения экспрессии синаптических белков в двух разных трансгенных моделях дополняют современные представления о гетерогенности БАС.

Практическая значимость: установленный факт достоверного повышения активности АХЭ слюны у пациентов с бульбарной формой БАС позволяет предложить измерение активности АХЭ слюны в качестве дополнительного метода подтверждения диагноза БАС у пациентов с изолированными бульбарными нарушениями, а также для дифференциальной диагностики с другими заболеваниями, сопровождающимися бульбарным синдромом в дебюте. Также, измерение активности АХЭ слюны может быть использовано в клинических и фундаментальных исследованиях в качестве маркера стволовой дисфункции при БАС и, соответственно, для стратификации пациентов, а также оценки течения заболевания и/или эффективности терапии. В то же время, измерение активности АХЭ плазмы крови как биомаркера БАС и текущего денервационного процесса не имеет подтвержденной диагностической значимости.

Методология и методы исследования

Объектом настоящей работы были пациенты с диагностированным согласно диагностическим критериям El Escorial и Awaji боковым амиотрофическим склерозом [126, 127]. Всего в исследование был включен 41 субъект. Из участников исследования была сформирована исследуемая группа, включавшая 17 пациентов с подтвержденным БАС без другой сопутствующей неврологической патологии. Также была сформирована группа сравнения (неврологический контроль), которая включала 9 пациентов, поступивших в неврологическое отделение ГАУЗ РКБ МЗ РТ с предположительным диагнозом «Болезнь мотонейрона?». У данных пациентов в ходе обследования были диагностированы имитирующие БАС альтернативные заболевания, такие как спондилогенная шейная миелопатия, сирингомиелия,

атипичная хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (ХВДП), спиноцеребеллярная дегенерация с сенсорно-моторной полинейропатией. Данные группы сравнивались со здоровой группой контроля, включавшая 15 добровольцев без органического поражения нервной системы. Обследование пациентов с БАС включало неврологический осмотр, электрофизиологическое исследование методом игольчатой электромиографии (иЭМГ) (не менее трех мышц с определением переднерогового поражения согласно критериям [126, 127], МРТ головного и спинного мозга для исключения заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), имитирующих БАС (нарушение спинального кровообращения, кистозные образования и др.). Также у пациентов с БАС проводилось определение степени тяжести БАС с помощью шкалы ALSFRS-R, определение стадии БАС с помощью шкалы Королевского колледжа Лондона (King's staging system) и Милано-Туринской шкалы (MiToS staging system) [32, 105]. У всех участников исследования производился забор венозной крови и слюны (методом «сплевывания»). Далее в полученных образцах проводилось измерение активности АХЭ с помощью метода Элмана (для плазмы крови) и модернизированного метода Элмана (для слюны) [29, 30].

Также объектом исследования были две трансгенные линии мышей с моделью БАС. В частности, были использованы mSOD1- и FUS-трансгенные модели. Данные трансгенные мыши экспрессируют человеческие мутантные гены SOD1 и FUS, приводящие к развитию БАС у человека. У данных модельных животных отмечается накопление характерных внутриклеточных белковых агрегатов, гибель мотонейронов, прогрессирующая денервация скелетных мышц с развитием мышечной слабости и атрофией, приводящей к смерти [222]. В качестве контроля были использованы мыши дикого типа соответствующих генетических линий и возраста. Всего было использовано 129 мышей: 20 трансгенных mSOD1-мышей и 20 мышей дикого типа соответствующего генотипа и возраста; 44 трансгенных FUS-мыши и 45 мышей дикого типа соответствующего генотипа и возраста. Исследование на мышах включало в себя измерение активности АХЭ плазмы методом Элмана [30]. Кровь у мышей была получена путем пункции

левого желудочка. Также, у трансгенных мышей проводилась оценка экспрессии синаптических белков синаптофизина, синапсина I, SNAP-25, АХЭ и н-холинорецепторов в нервно-мышечных синапсах диафрагмальной мышцы с помощью иммунофлуоресцентного метода и использованием конфокальной микроскопии. Иммунофлуоресценция исследовалась с применением первичных и вторичных антител к пресинаптическим белкам, альфа-бунгаротоксина к н-холинорецепторам и фасцикулина к АХЭ. Все проведенные исследования на человеке и животных были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 28.05.2019 и протокол №3 от 23.03.2021 г.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с бульбарной формой БАС отмечается достоверное повышение активности АХЭ в слюне в сравнении с пациентами со спинальной формой БАС и здоровыми лицами, что делает данный метод приемлемым для использования в диагностических и прогностических целях.

2. У пациентов с БАС активность АХЭ плазмы крови достоверно не отличается от таковой у контрольных групп пациентов, таким образом измерение активности АХЭ плазмы не имеет подтвержденной диагностической значимости.

3. У трансгенных мышей с моделью БАС по мере развития признаков патологии отмечается повышение экспрессии АХЭ в НМС при отсутствии значимых изменений активности АХЭ в плазме крови.

4. В mSOD1- и FUS-трансгенных моделях БАС на досимптомной стадии патологии наблюдаются разнонаправленные изменения экспрессии пресинаптических белков НМС – снижение экспрессии SNAP-25 и синапсина I у mSOD1-мышей и повышение экспрессии указанных белков у FUS-мышей в сравнении с мышами дикого типа. На симптомной стадии патологии наблюдаются однонаправленные изменения экспрессии пресинаптических белков НМС – снижение экспрессии SNAP-25, синапсина I и синаптофизина в обеих моделях.

Личный вклад автора

Автором разработан протокол исследования, определены цель и задачи данной работы, обоснованы выводы и практические рекомендации по результатам исследования. Все эксперименты с трансгенными мышами персонально выполнены автором. Самостоятельно сформированы группы исследованных пациентов, выполнен сбор анамнеза, неврологический осмотр, заполнение клинических шкал, сбор образцов крови и слюны пациентов. Автором выполнен статистический анализ всех полученных данных. Были подготовлены публикации, публично представлены результаты научно-исследовательской работы на научных конференциях.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность выполненной работы определяется протоколом исследования, размером выборок, критериями включения пациентов в исследование. Методы, которые были использованы в эксперименте, технические варианты их разрешения, а также методы статистического анализа можно считать современными, соответствующими мировому уровню и поставленным задачам.

Диссертация прошла процедуру предварительной экспертизы и была рекомендована к защите на заседании расширенной научно-проблемной комиссии «Неврология, нейрохирургия, психиатрия и реабилитация» с приглашенными членами научно-проблемной комиссии «Фундаментальные медицинские и биологические науки» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (Протокол № 09-23 от 15.09.2023 г.).

Материалы диссертации были публично представлены на Международной конференции «Актуальные проблемы нейробиологии» посвященной памяти академика Е.Е. Никольского (Казань, 2019 г.), IV Всероссийской научной конференции молодых ученых «Будущее неврологии» (Казань, 2020 г.), V Всероссийской (с международным участием) научной конференции молодых ученых «Будущее нейронаук» (Казань, 2022 г.), VI и VII Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2019 и 2020

гг.), VI Съезде неврологов и психиатров Средневолжского научно-образовательного кластера ПФО «Актуальные вопросы клинической неврологии и психиатрии» (Нижний Новгород, 2022 г.), VI Поволжском неврологическом форуме «Достижения клинической неврологии» (Казань, 2022 г.), 1-м виртуальном конгрессе Европейской Академии Неврологии (European Academy of Neurology 1st Virtual Congress, 2020 г.), 9-м конгрессе Европейской Академии Неврологии (9th Congress of the European Academy of Neurology, 2023 г., Будапешт, Венгрия).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 7 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 164 листах машинописного текста, содержит 12 таблиц и иллюстрирована 15 рисунками. Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы, методология и методы исследования, результаты исследования, обсуждения, заключение, выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, список литературы, список иллюстративного материала, приложения. Библиографический указатель содержит 23 отечественных и 320 зарубежных источников литературы, а также 5 собственных публикаций автора, подготовленных по теме диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Патогенез бокового амиотрофического склероза: общие сведения

БАС – это неврологическое заболевание с фатальным течением, характеризующееся гибелью мотонейронов (МН) головного и спинного мозга, что приводит к развитию мышечной слабости и атрофии [22, 51]. Гибель пациентов наступает в основном из-за осложнений, связанных с поражением дыхательной и бульбарной мускулатуры. БАС имеет низкую заболеваемость и распространенность, однако приводит к тяжелой инвалидизации с высоким уровнем летальности [13]. Так, заболеваемость в Европе составляет 1.47-2.43 случая на 100 000 населения в год, распространенность составляет 4.06-7.89 человек на 100 000 населения [154]. Общемировая заболеваемость достигает 1.68 случаев на 100 000 населения в год с различиями по разным регионам [331]. Общий риск развития БАС в течение жизни составляет 1:400 для женщин и 1:350 для мужчин [193]. Медиана выживаемости составляет в среднем 29,8 мес с момента развития первых симптомов и 15,8 мес с момента установления диагноза. [258]. По данным российских исследований, заболеваемость БАС составляет от 0,3 до 1,5 новых случаев в год на 100 000 населения, а распространенность БАС – от 1,1 до 3,3 пациентов на 100 000 населения [3, 17, 20].

Принято считать, что БАС является многофакторным заболеванием, в развитии которого лежит комбинация генетических факторов, факторов внешней среды, и процессов естественного старения [2, 199]. Точная этиология спорадических форм БАС до конца не изучена. Как и другие нейродегенеративные заболевания, БАС относится к протеинопатиям. Ключевым механизмом патогенеза считается накопление белковых агрегатов [18, 23, 45]. БАС относят к TDP-43-протеинопатии, что объединяет эту нозологию с лобно-височной дегенерацией (ЛВД) [324]. Внутриклеточные агрегаты TDP-43 обнаруживаются у 98% пациентов с классической формой БАС. Помимо TDP-43 в мотонейронах обнаруживаются внутриклеточные агрегаты убиквентина, FUS, SOD1 и других белков [71]. В

клеточных культурах и *in vitro* было показано, что белковые агрегаты обретают прионо-подобные свойства, в результате чего и нормальные белки вовлекаются в процесс образования этих агрегатов [23, 200].

В многочисленных исследованиях установлено, что в патогенез БАС вовлечены следующие механизмы: нарушение метаболизма белков и РНК, процессов аутофагии, аксонального транспорта и стабильности цитоскелета, окислительный стресс, нейровоспаление, митохондриальная дисфункция, нарушение липидного гомеостаза и гиперметаболизм, эксайтотоксичность, глиальная дисфункция, дефицит нейротрофических факторов [12, 18, 19, 45, 157, 174, 305]. Данные патогенетические механизмы тесно взаимосвязаны между собой и потенцируют друг друга.

Достигнуты определенные успехи в изучении генетики БАС. На 2017 год было установлено 46 генов, так или иначе связанных с развитием заболевания [152]. Основными генами, мутации которых приводят к БАС, являются SOD1, TARDBP, FUS и C9orf72. Первый открытый ген в 1993 году, SOD1 кодирует Cu/Zn-супероксиддисмутазу [218]. Мутации в этом гене обнаруживаются почти в 20% семейных и более чем в 1% спорадических форм БАС [150]. В случае мутации, SOD1 приобретает токсические свойства, что приводит к развитию окислительного стресса и гибели мотонейронов. Мутации в генах TARDBP (TAR DNA-binding protein) и FUS (fused in sarcoma), кодирующих РНК-связывающие белки TDP-43 и FUS соответственно, ответственны за развитие 3-5% семейных и менее 1% спорадических форм БАС [219, 306]. TDP-43 участвует в регуляции метаболизма РНК, включая сплайсинг мРНК, транспорт РНК, трансляцию и биогенез микро-РНК [47]. TDP-43, в норме локализующийся в ядре, в 98% случаев БАС обнаруживается в цитоплазме в виде фосфорилированных убиквитинированных агрегатов [113]. Таким образом, не только мутации в TARDBP приводят к TDP-43-протеинопатии. FUS белок в норме также локализуется в ядре, при БАС обнаруживается в цитоплазме. В норме FUS участвует в процессах восстановления ДНК и метаболизме РНК [47]. Наконец, в 30-50% семейных и 7-10% спорадических случаев БАС выявляется мутация в гене C9orf72 [134]. C9orf72 может играть роль

в процессах аутофагии и эндосомальном транспорте, регуляции стресса эндоплазматического ретикулума [45, 67]. Патогенез БАС в случае мутации *C9orf72* связан с токсическим действием образующихся патологических РНК-повторов и белков с дипептидными повторами (DPR) [34, 45].

Основные гены, связанные с развитием семейных и спорадических форм БАС, можно разделить на три группы, которые определяют три первичных базиса патофизиологии болезни. Это 1) конформационная нестабильность и агрегация белков (гены *SOD1*, *VCP*, *OPTN*, *UBQLN2*); 2) нарушение метаболизма и транспорта РНК (гены *C9orf72*, *TARDBP*, *FUS* и др.); и 3) нарушение стабильности цитоскелета (гены *PFN1*, *DCTN1*, *TUBA4A*, *ERHA4*). Эти первичные звенья патогенеза приводят к развитию таких вторичных патологических процессов, как стресс эндоплазматического ретикулума, нарушение функций митохондрий, замедление аксонального транспорта, изменение структуры дендритов, эксайтотоксичность, нейровоспаление [152].

В 2022 году было опубликовано исследование об обнаружении еще 22 новых генов и 23 мутаций в них, связанных с развитием спорадической формы БАС [238]. Эти мутации не встречаются в популяции здоровых людей. Наличие 1 мутации увеличивает риск развития БАС не менее, чем на 25%. При наличии мутаций в 17 генах, риск развития БАС повышается до 99%. Таким образом, данные мутации связаны с заболеванием у значительной части пациентов со спорадической формой БАС, при этом большинство этих пациентов имеют мутации по крайней мере в 17 из 22 открытых генов. Из найденных новых генов примечательны два: *NDUFS4* и *NCS-1* (нейрональный кальциевый сенсор-1). *NDUFS4* является частью антиоксидантной защитной системы клетки. Его подавление в животных моделях снижает продолжительность жизни нейронов и скелетных мышечных клеток [137]. *NCS-1* – высоко аффинный кальций-связывающий белок, участвующий в регуляции синаптической передачи [143]. На роль *NCS-1* в патогенезе БАС указывают данные о нарушении кальциевого гомеостаза при БАС [307].

Помимо внутренних факторов, немаловажную роль в развитии заболевания играют факторы окружающей среды. К внешним факторам риска развития БАС

относят тяжелые физические нагрузки, низкий индекс массы тела, травмы головы, воздействие пестицидов, формальдегида, тяжелых металлов, магнитных полей, курение, вирусные инфекции [53, 268, 285, 321]

На основании анализа сведений о начале и прогрессировании заболевания, предложены гипотезы развития патогенеза БАС. В зависимости от того, верхний или нижний мотонейрон (ВМН и НМН соответственно) поражается в первую очередь, выделяют «нисходящую» и «восходящую» гипотезы. Согласно «нисходящей» гипотезе одним из начальных событий является усиление возбудимости ВМН, что далее ведет к глутаматной эксайтотоксичности и вовлечению в патологический процесс НМН [35, 125]. Согласно «нисходящей гипотезе», заболевание начинается с нервно-мышечного синапса и/или скелетной мышцы, а затем уже ретроградным путем поражаются НМН, а затем и ВМН [55]. Альтернативная гипотеза предполагает, что верхний и НМН поражаются независимо друг от друга, что согласуется с патоморфологическими данными, которые не показывают корреляции между нейродегенерацией МН разного уровня [191, 243, 259].

Болезнь обычно имеет фокальное начало с развитием симптомов в ограниченной группе мышц с последующим распространением на соседние миотомы. Развитие клинической картины заболевания согласуется с данными патоморфологического исследования соответствующих сегментов спинного мозга. Наиболее выраженная нейродегенерация наблюдается на том уровне спинного мозга, которому соответствует локализация первых симптомов, и выраженность дегенеративного процесса уменьшается в дистальном направлении [173]. Подобное фокальное начало патологии с радиальным распространением на соседние области может быть обусловлено прионоподобным механизмом. Так, для нерастворимых белковых агрегатов SOD1, TDP-43, FUS, которые обнаруживаются в цитоплазме мотонейронов при БАС, показана способность к формированию новых нерастворимых агрегатов из их нормальных растворимых аналогов [33, 181, 182, 212]. Дальнейшее распространение на другие нейроны обусловлено высвобождением агрегатов из погибших клеток или экзоцитозом внеклеточных

везикул [84].

БАС является гетерогенным заболеванием со значимой вариабельностью возраста начала заболевания, темпов прогрессирования, локализации начальных симптомов, степени вовлечения ВМН и НМН, наличия немоторных симптомов [9, 83, 298]. Основным клиническим проявлением БАС являются моторные симптомы – различной степени выраженности спастический и вялый парезы. В зависимости от степени вовлечения ВМН и НМН выделяют различные двигательные фенотипы БАС, на чем основана одна из принятых классификаций БАС. В зависимости от соотношения признаков поражения МН выделяют БАС с изолированным поражением ВМН, преимущественным поражением ВМН, комбинированным поражением ВМН и НМН (классическая форма), преимущественным поражением НМН и изолированным поражением НМН [298]. Как правило, начало заболевания носит фокальный характер с вовлечением одного из уровней цереброспинальной оси. В зависимости от первоначальной локализации симптомов выделяют бульбарную и спинальную формы (шейно-грудная, пояснично-крестцовая) [1, 22, 298].

Классическая форма БАС (вариант Шарко) характеризуется комбинированным поражением верхнего и нижнего мотонейронов на одном или нескольких уровнях цереброспинальной оси. Чаще всего заболевание дебютирует с фокальной мышечной слабости и гипотрофии с последующим распространением на соседние миотомы. Примерно в трети случаев заболевание начинается с поражения бульбарной мускулатуры, в двух третях случаев – с поражения мышц конечностей [22, 240, 337].

При изолированном поражении ВМН говорят о наиболее сложном для диагностики прогрессирующем боковом склерозе (ПБС), протекающим без амиотрофий в первые годы развития заболевания. Основным клиническим проявлением являются спастичность и гиперрефлексия, по мере прогрессирования заболевания развивается спастический тетрапарез и псевдобульбарный паралич [255]. Распространенность 1-4% среди всех болезней двигательного нейрона [257]. Главным диагностическим критерием ПБС является наличие симптомов

изолированного поражения ВМН более 4х лет [257]. У части пациентов с изначальным изолированным поражением ВМН в течение 4х лет развиваются клинические признаки поражения НМН [82, 110]. ПБС характеризуется медленным прогрессированием и более длинной продолжительностью жизни в сравнении с классической формой БАС [256]. Несмотря на то, что при ПБС отсутствуют симптомы поражения НМН, у 20% пациентов с ПБС после 4 лет болезни выявляются признаки их поражения с помощью иЭМГ [313]. При генетическом исследовании у 0,9-2,9% пациентов с ПБС выявляются мутации C9orf72 [166, 248].

Прогрессирующая мышечная атрофия (ПМА) составляет 2,5-11% от всех случаев болезней мотонейрона (БМН) и характеризуется изолированным поражением НМН [272]. Отдельные авторы обозначали этот вариант БМН как «полиомиелитическая» форма БАС или подострый передний полиомиелит [11, 22]. При ПМА развивается прогрессирующий вялый паралич, амиотрофии, фасцикуляции и гипо-/арефлексия [192]. ПМА характеризуется относительно доброкачественным течением в сравнении с классической формой БАС. У 22-35% пациентов в течение 5 лет появляются признаки поражения ВМН, выявляемые при неврологическом обследовании пациента или с помощью ТМС [296]. При аутопсии у пациентов с ПМА помимо поражения НМН в 50-85% случаев выявляется дегенерация кортикоспинальных трактов, при этом не зависимо от темпов прогрессирования заболевания, а также наличия или отсутствия субклинических признаков поражения ВМН [109]. В 84,5% патоморфологически выявляются внутриклеточные агрегаты TDP-43, в 15,5% - внутриклеточные агрегаты FUS. Клиническая картина ПМА может развиваться при мутациях в генах C9orf72, FUS, SOD1, TARDBP [151, 166]

Учитывая наличие общих генов, внутриклеточных включений, субклинического вовлечения ВМН и НМН, ПБС и ПМА предлагается рассматривать в рамках единого спектра БАС.

Выделяют несколько характерных клинических фенотипов БАС на основании типичной локализации поражения без значимой генерализации процесса. Синдром свисающих рук характеризуется развитием верхнего вялого

парапареза без признаков генерализации [80, 220]. Синдром свисающих ног характеризуется развитием нижнего, преимущественно дистального, вялого парапареза [220]. Для этих форм развитие явных симптомов вовлечения ВМН не характерно. Эпидемиологические исследования показывают прогрессирующее, но относительно медленное течение данных форм с заметно большей продолжительностью жизни в сравнении с типичными формами БАС [81].

Помимо моторных проявлений, у пациентов с БАС развиваются симптомы, не связанные с поражением двигательной сферы. Так, у пациентов с БАС отмечена более высокая частота нарушений обоняния и вкуса, усиленного потоотделения, нарушений сна, апатии [236]. Также у пациентов отмечается развитие вегетативных нарушений в виде сердечно-сосудистой и гастроинтестинальной дисфункции, нарушения слюно- и слезоотделения [60]. В 35-40% случаях БАС у пациентов наблюдаются умеренные когнитивные и/или поведенческие расстройства, у 10-15% с БАС выявляемые когнитивные и поведенческие расстройства соответствуют критериям ЛВД [50, 250]. Мутации таких генов, как C9orf72, FUS, TARDBP, VCP, UBQLN2, PFN, TBK1 обуславливают развитие как изолированных нозологий БАС и ЛВД, так и комбинацию БАС-ЛВД [50]. Учитывая в некоторых случаях общие гены, схожие пути патогенеза, данные патоморфологии, некоторые ученые предлагают рассматривать БАС и ЛВД как варианты одного спектра форм с различной выраженностью поражения моторной и когнитивной сферы с крайними вариантами исключительно моторных проявлений (БАС), исключительно когнитивных проявлений (ЛВД), и смешанных форм (БАС-ЛВД) [210].

Диагностика БАС основывается на выявлении клинических признаков поражения верхнего и нижнего мотонейронов, выявлении электрофизиологических признаков поражения нижнего мотонейрона, установления факта прогрессирующего распространения симптомов, с исключением электрофизиологических и нейровизуализационных признаков иного заболевания. Данные критерии предложены в 2000 году в результате первоначального пересмотра общепринятых критериев El-Escorial [126]. С целью дальнейшего развития и повышения чувствительности критериев El-Escorial в 2008 г были

сформулированы критерии Awaji, согласно которым, во-первых, клинические и электромиографические признаки поражения НМН обладали одинаковой диагностической значимостью, а во-вторых, потенциалы фасцикуляций рассматривались как убедительные признаки денервации, эквивалентные потенциалам фибрилляций и положительным острым волнам [127]. Было показано, что применение Awaji критерия повышает точность диагностики БАС [58, 88]. Однако, подобные критерии обладают высокой чувствительностью и специфичностью только при классической форме БАС, и не позволяет вовремя устанавливать диагноз при атипичных формах БАС. Потому были предложены новые критерии, Gold Coast [31, 156]. Согласно этим критериям для постановки диагноза БАС достаточно: 1 – установленный факт прогрессирующего течения заболевания; 2 – наличие признаков поражения верхнего и нижнего МН хотя бы в одном сегменте (бульбарный, шейный, грудной, пояснично-крестцовый); 3 – наличие данных исследований, исключающие другой патологический процесс. Преимущество данных критериев заключается в высокой чувствительности и специфичности не только при классической форме БАС, но и при атипичных формах БАС [106, 319].

Для оценки прогрессирования заболевания в 1997 была предложена шкала оценки функционального состояния пациентов ALSFRS, пересмотренная в 1999 [72, 309]. Шкала ALSFRS-R содержит 12 пунктов по 4 сферам: передвижение и уход за собой, речь, питание, дыхание. По каждому из пунктов можно получить от 0 до 4 баллов.

Имеется две системы оценок, позволяющие оценить стадии БАС. В 2012 году предложена система стадирования Королевского Колледжа в Лондоне (King's staging system), согласно которой стадия заболевания определяется количеством клинически вовлеченных уровней цереброспинальной оси (бульбарный, шейно-грудной, пояснично-крестцовый) [32]. Это 5-стадийная система, в которой 1 стадия - появление первых симптомов в одном регионе, 2 стадия - вовлечение второго региона, 3 стадия - вовлечение третьего региона, 4А стадия - необходимость в установке гастростомы, 4Б стадия - необходимость в неинвазивной ИВЛ, 5 стадия

– летальный исход. Позже была предложена 6-стадийная Милано-Туринская система оценки стадии. Стадии определяются по степени потери независимости в 4 сферах шкалы ALSFRS-R (передвижение и уход за собой, речь, глотание, дыхание), в которой 0 стадия - наличие симптомов с сохранением самостоятельности во всех сферах, 1 стадия - потеря самостоятельности в одной сфере, 2 стадия - в двух сферах, 3 стадия - в трех сферах, 4 стадия - во всех сферах, 5 стадия – летальный исход [105].

Большое количество потенциальных лекарственных средств, показавших свою эффективность на клеточных и животных моделях БАС, не смогли доказать свою эффективность в рандомизированных клинических исследованиях [207]. На сегодняшний день всего лишь два препарата одобрены для патогенетической терапии БАС – рилузол и эдаравон. Рилузол доказал свою эффективность в двух рандомизированных клинических исследованиях [62, 114]. Рилузол является антагонистом глутамата, тем самым влияя на эксайтотоксичность, один из основных механизмов патогенеза [185]. Изначально было показано, что рилузол увеличивает продолжительность жизни у пациентов с БАС в среднем на 3 месяца, продлевая последнюю стадию болезни (стадия 4В по King's), не влияя на продолжительность ранних стадий [62, 114]. Однако последующие исследования показали, что рилузол может продлевать жизнь пациентов с БАС на более длительный срок – от 6 до 19 месяцев [261]. Эдаравон является антиоксидантом, нейтрализующим свободные радикалы [246]. Препарат уменьшает выраженность окислительного стресса, еще одного важного патогенетического звена БАС. Эдаравон показал свою эффективность при назначении пациентам с длительностью болезни менее двух лет и невыраженными симптомами [87, 252].

В комбинации с рилузолом препарат маситиниб показал свою эффективность для пациентов с умеренным темпом прогрессирования БАС [198]. Перспективными терапевтическими подходами, требующими дальнейшего изучения, считаются применение стволовых клеток, антисмысловых олигонуклеотидов, малых интерферирующих РНК, вирусных векторов [149, 299, 304].

1.2. «Восходящая» гипотеза патогенеза БАС

В «восходящей» гипотезе патогенеза БАС важная роль отводится НМС и двигательной единице [94]. НМС является классическим химическим трехчастным синапсом («tripartite synapse»), в котором в передаче возбуждения участвуют пре- и постсинаптическая мембрана, а также перисинаптические Шванновские клетки [16]. В НМС происходит передача импульсов от мотонейрона к скелетной мышце, что инициирует мышечное сокращение и выполнение произвольных движений. Нервным окончанием в НМС секретируются такие ключевые факторы, как агрин и LRP4 (lipoprotein receptor-related protein 4; белок 4, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности), в то время как скелетной мышцей синтезируются рапсин, MuSK (muscle-specific kinase, мышечная специфическая тирозин-киназа) и Dok-7. Взаимодействие этих факторов (сигнальная система «агрин-LRP4-MuSK») обеспечивает нормальную структуру и адекватное функционирование пре- и постсинаптических мембран НМС [235].

Мотонейрон и иннервируемые им мышечные волокна вместе формируют единую функциональную структуру – двигательную единицу (ДЕ) [161]. В зависимости от скорости сокращения мышечного волокна и его устойчивости к утомлению, двигательные единицы подразделяют на медленные (slow, S), быстрые неутомляемые (fast-twitch fast-resistant, FR), быстрые утомляемые (fast-twitch fast-fatigable, FF) [66, 163]. FR и FF волокна иннервируются быстрыми мотонейронами, S волокна – медленными мотонейронами. Быстрые мотонейроны имеют больший размер сомы и диаметр аксона, более разветвленное дендритное дерево, меньшую возбудимость, высокую частоту генерации потенциала действия, более быструю проводимость по аксону [26, 190, 201, 202]. Мотонейроны спинного мозга оказывают влияние на фенотип скелетных мышечных волокон [6]. В рамках патогенеза БАС данное разделение имеет важное значение. В ряде исследований было показано, что разные типы ДЕ обладают разной уязвимостью при БАС. Поражение FF ДЕ выявляется уже на досимптомной стадии, признаки поражения FR ДЕ отмечаются при развитии клинической картины, в то время как S ДЕ

поражаются только поздней стадии БАС [74, 118, 162, 283, 323]. Накопление патологических белковых агрегатов, развитие стресса эндоплазматического ретикулума и дегенерация наблюдаются у быстрых мотонейронов на более ранних сроках в сравнении с медленными мотонейронами [277, 282].

Ряд исследований показывает, что различная уязвимость популяций мотонейронов при БАС обусловлена размерами сомы нейрона и диаметром аксона, степенью возбудимости, кальциевой буферной емкостью, степенью экспрессии ряда факторов, влияющих на кальциевую проницаемость и модулирующих стресс эндоплазматического ретикулума, различиями в протеомах [159, 183, 197, 228, 229, 234, 262, 318].

Важная роль раннего поражения НМС и ДЕ может быть обусловлена особенностями взаимодействия мотонейрона и скелетной мышцы. Это взаимодействие оказывает ключевое влияние на функционирование нервной клетки, НМС и мышечного волокна. Когда мотонейрон и мышечное волокно формируют функционирующие синапсы, то образованная ДЕ секретирует ряд нейротрофических и ростовых факторов, которые в совокупности оказывают различные эффекты на все ее части. Эти факторы обеспечивают выживаемость мотонейронов, рост и регенерацию аксонов, структурную и функциональную стабильность НМС, дифференцировку и сократительные свойства мышечных волокон. Секретом сформированных двигательных единиц *in vitro* содержит значительно большее количество ряда трофических факторов, чем секретом отдельных мышечных волокон, не иннервированных мотонейроном [91]. Среди этих факторов – фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротрофический фактор мозга (BDNF) нейротрофины 3 и 4 (NT-3, NT-3), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) и белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста 3 (IGFBP-3).

IGF-1, синтезируемый скелетной мышцей, улучшает выживаемость мотонейронов и работу НМС [215]. IGFBP-3 является переносчиком IGF-1 и потенцирует его действие [253]. GDNF экспрессируется скелетной мышцей, а его рецепторы в мотонейронах [265]. GDNF оказывает влияние на стабильность НМС

и выживание мотонейронов [104, 153, 263]. VEGF является ростовым фактором, обеспечивающим рост, миграцию и выживаемость мотонейронов [268, 269]. NT-3 и NT-4 являются важными модуляторами синаптической функции и необходимы для поддержания стабильности пре- и постсинаптических мембран НМС [111, 223]. BDNF улучшает выживаемость мотонейронов и функционирование НМС [343].

Также к факторам, секретлируемым скелетной мышцей и оказывающим влияние на мотонейроны и НМС, относятся кариотрофин-1, фактор роста гепатоцитов и нейртуриин [69, 164, 165, 230]. Эти факторы, вероятно, секретлируются в составе внеклеточных везикул [135]. Также показано, что иннервированная скелетная мышца экспрессирует мышечно-специфическую микро-РНК, miR-206. Считается, что miR-206 играет протективную роль, обеспечивая выживаемость синаптических контактов и активность спрутинга [205]. Было установлено, что высокий уровень экспрессии miR-206 связан с более медленным темпом прогрессирования БАС [28].

Мотонейрон, иннервирующий мышечные волокна, оказывает протективный эффект на мышцу, заключающийся в подавлении экспрессии ряда коннексинов, белков, формирующих щелевые контакты. Повышенная экспрессия коннексинов в денервированной мышце напрямую связана с развитием амиотрофии [97].

Скелетная мышца может оказывать не только нейропротективный эффект. Было показано, что мышечные волокна пациентов с БАС секретлируют внеклеточные везикулы, оказывающие нейротоксический эффект, снижающий выживаемость мотонейронов и рост аксонов [214, 316]. Также, у пациентов с БАС в скелетной мышце обнаруживается высокий уровень экспрессии Nogo-A, который прямо коррелирует с выраженностью дегенерации НМС и темпами прогрессирования БАС [128]. Эти данные согласуются с результатами исследования, где было показано, что сверхэкспрессия Nogo-A в нормальных мышечных волокнах приводит к денервации концевой пластинки и фрагментации постсинаптической мембраны [315]. При этом применение анти-Nogo-A антител в модели БАС замедляет наступление болезни [322]. Таким образом, высокая экспрессия Nogo-A в скелетной мышце при БАС нарушает целостность НМС.

Даже в отсутствие каких-либо негативных воздействий на двигательную единицу, естественные процессы старения приводят к ремоделированию НМС, что влияет на его функцию и стабильность [42, 186, 330]. Учитывая, что стабильность НМС необходима для нормальной секреции ряда трофических факторов, обеспечивающих выживания как мотонейрона, так и скелетной мышцы, дестабилизация НМС из-за процессов старения может быть одним из инициирующих факторов в патогенезе БАС. Это согласуется с тем фактом, что возраст является ключевым фактором риска развития БАС [44].

Таким образом, повреждение НМС и скелетной мышцы может быть не следствием нейродегенерации мотонейронов, а самостоятельным и первичным звеном в патогенезе БАС. Это также подтверждается тем, что выживаемость мотонейронов не влияет на денервацию скелетных мышц при БАС. В модели БАС неоднократно было показано, что предотвращение гибели мотонейронов спинного мозга не оказывает положительного эффекта на дегенерацию НМС и денервацию скелетной мышцы [86, 178].

1.3. Молекулярные механизмы нервно-мышечной синаптической передачи

НМС является классическим химическим синапсом, в котором односторонняя передача сигнала от пресинаптической к постсинаптической мембране осуществляется путем экзоцитоза нейромедиатора – ацетилхолина (АХ). АХ в пресинаптической мембране упакован в синаптические везикулы (СВ). В пресинаптической части НМС имеется комплекс специальных белков, обеспечивающих транспорт и рециклирование СВ, прикрепление их в пресинаптической мембране, слияние с ней и последующий эндоцитоз.

Предшественники СВ образуются в теле нейрона и транспортируются быстрым аксональным транспортом в синапс [260]. После нескольких циклов экзо- и эндоцитоза в синапсе происходит перестройка белкового состава везикулярной мембраны и формирование зрелой СВ [132, 333]. Выделяют периферические белки

СВ, к которым относятся синапсины и рабфилин, белки, прикрепленные с помощью липидного якоря (Rab3), и интегральные белки (синаптофизины, синаптотагмины, синаптобревины, SV2s и пр.) Белки везикулярной мембраны также можно разделить на белки-транспортёры, которые ведут захват медиатора и ионов в полость везикулы, и моторные транспортные белки, ответственные за перемещение везикул внутри клетки [5].

Самый большой везикулярный белок – протонный насос, осуществляющий транспорт протонов в везикулу и формирование электрохимического градиента ионов водорода, необходимый для захвата медиатора. Транспортёр медиатора осуществляет обмен 2 ионов водорода на одну молекулу АХ [5].

В нервном окончании СВ формируют везикулярные пулы [4, 89]. Выделяют готовый к освобождению пул, который составляют СВ, прикрепленные к пресинаптической мембране и готовые к слиянию с ней. Рециклирующий пул сформирован высокомолекулярными СВ, которые легко пополняют немедленно готовый к освобождению пул по мере его расходования [213]. Резервный пул (самый большой пул) состоит из везикул, которые освобождаются после истощения мобилизационного пула.

В пресинаптической мембране СВ распределены неравномерно и сконцентрированы в определенных участках – активных зонах [213]. Активные зоны представляют собой специализированные участки пресинаптической мембраны, с которыми сливается мембрана СВ при входе ионов Са [131, 279].

Освобождение нейромедиатора в синаптическую щель происходит путем экзоцитоза. В активной зоне осуществляются четыре основных процесса с участием СВ, ведущих к экзоцитозу [5]:

1. Транспорт СВ рециклирующего пула к активной зоне и сцепление СВ с цитоматриксом активной зоны.
2. Докирование, т.е. прочная стыковка СВ с местом освобождения медиатора в активной зоне. СВ располагается строго напротив белков, осуществляющих слияния мембран.
3. Подготовка СВ к экзоцитозу – прайминг. Происходит трансформация

белкового комплекса экзоцитоза, СВ готова к экзоцитозу и ожидает входа ионов Са.

4. Экзоцитоз – слияние мембраны СВ с пресинаптической мембраной.

На этапе сцепления СВ прикрепляются к белкам, которые образуют возвышения над активной зоной. К таким белкам относятся RIM1 и синапсин I. RIM1 взаимодействует с СВ путем связывания с везикулярным белком Rab3a и везикулярным белком синаптотагмином-1 [25, 266]. Синапсин I взаимодействует с опорными белками цитоматрикса активной зоны. Синапсин I относится к семейству белков – синапсинов, участвующих в организации активной зоны, доставке к ней СВ, а также в удержании СВ в кластере рядом с активной зоной. Синапсины связываются с СВ и фиксируют их к белкам цитоматрикса активной зоны [241].

Докирование – это процесс стыковки СВ с активной зоной, который протекает при взаимодействии между белками мембраны СВ и белками пресинаптической мембраны [61].

Прайминг – этап предслияния мембран, в котором формируется SNARE (рецепторы растворимого NSF присоединяющего белка)-комплекс [76, 184]. SNARE белки в своей структуре имеют 4 класса определенных последовательностей аминокислот – мотивов (R, Qa, Qb, Qc). При взаимодействии всех 4-х мотивов образуется плотный SNARE-комплекс, который стягивает мембрану СВ и пресинаптическую мембрану до полного слияния [5]. Главную роль в экзоцитозе СВ играют три белка SNARE: два пресинаптических белка синтаксин-1 (с Qa-мотивом) и SNAP-25 (Qb- и Qc-мотивами), и один везикулярный белок синаптобrevин (R-мотивом) [291]. Наиболее распространенный белок СВ – синаптофизин, связывается напрямую с синаптобrevином, что предотвращает участие синаптобrevина в формировании SNARE-комплекса [78].

Следующим после прайминга этапом следует экзоцитоз СВ – стадия непосредственного слияния мембраны везикулы с мембраной нервного окончания. Необходимым стимулом для инициации экзоцитоза праймированной везикулы является повышение внутриклеточной концентрации Са, поступающего через потенциал-зависимые Са-каналы. Синаптотагмины, белки везикулярной

мембраны, являются главными Са-сенсорами экзоцитоза. Связывание Са с синаптотагмином приводит к взаимодействию синаптотагмина с другим участком SNARE-комплекса, в результате чего SNARE-комплекс переходит в нестабильное состояние [63]. Также связанный с ионами Са синаптотагмин взаимодействует с анионными фосфолипидами пресинаптической мембраны, что вызывает ее дополнительное механическое напряжение и запускает слияние [24, 320].

После экзоцитоза высвободившийся АХ диффундирует к постсинаптической мембране. В районе устья постсинаптических складок сосредоточены никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (АХР), которые представляют собой ионные каналы [288]. Такая кластеризация достигается за счет функционирования агрин-LRP4-MuSK сигнальной системы [339].

При связывании АХ с АХР, открывается ионный канал, способный пропускать ионы Na и K, что приводит к деполяризации постсинаптической мембраны [231]. Деполяризация постсинаптической мембраны НМС, возникающая при вызванном экзоцитозе множества СВ, называется потенциалом концевой пластинки (ПКП). При спонтанном экзоцитозе одной или нескольких СВ в НМС возникает значительно меньшая по амплитуде деполяризация постсинаптической мембраны – миниатюрный потенциал концевой пластинки (МПКП).

1.4. Нарушения функционирования нервно-мышечного синапса при БАС у человека и в модели на животных

Изучение НМС человека представляет большие сложности, включая сбор образцов, надлежащий контроль с учетом возраста, пола или продолжительности заболевания, а также привязка к данным анамнеза болезни. Оценка прогрессирования заболевания практически невозможна, поскольку невозможно провести предварительный сбор образцов до развития клинической картины, а многократный сбор проб на протяжении прогрессирования болезни затруднен. Однако, несмотря на эти проблемы и ограничения, были достигнуты определенные успехи. Данные, полученные при электрофизиологических исследованиях,

изучении биоптатов мышц, посмертного материала, показали, что дисфункция НМС играет критическую, раннюю роль в прогрессировании БАС.

Ранние исследования мышечных биоптатов показали заметную фрагментацию концевых пластин и их денервацию [64]. С помощью электронной микроскопии было показано уменьшение размеров пре- и постсинаптических областей, а также уменьшение количества митохондрий в нервных окончаниях у пациентов с БАС [313]. Дисфункция НМС у пациентов с БАС также включает в себя изменения в экспрессии субъединиц ацетилхолиновых рецепторов [37], и изменения в экспрессии субъединиц потенциал-зависимых кальциевых каналов в пресинаптической мембране [108]. Помимо изменений в пре- и постсинаптических отделах НМС, у пациентов с БАС также отмечаются патологические изменения терминальных перисинаптических Шванновских клеток [128]. При изучении мышечных биоптатов также было показано изменение соотношения мышечных волокон в виде преобладания медленных, что свидетельствует об избирательной уязвимости двигательных единиц [172]. Электрофизиологические исследования также подтверждают данное явление [54]. Исключением являются экстраокулярные мышцы, которые интактны при БАС [234].

Установлено, что у пациентов с БАС нарушена работа сигнальной системы «агрин-LRP4-MuSK», обеспечивающей стабильность НМС [172]. При этом было показано, что причиной нарушения данной сигнальной системы, вероятно, являются внутренние процессы, происходящие в скелетной мышце, и не зависят от мотонейронов. Так, мышечные волокна, выращенные из индуцированных плюрипотентных клеток, полученных от пациентов с БАС, не формируют функциональные НМС с аксонами здоровых мотонейронов, а в ответ на секретируемый агрин не происходит кластеризации АХР на постсинаптической мембране. Это может объяснить результаты исследований, в которых, несмотря на ингибирование апоптоза мотонейронов и их выживание, все равно наблюдалась денервация НМС и развитие БАС-подобного фенотипа [86, 178].

Электрофизиологические исследования, проведенные на мышечных биоптатах пациентов с БАС, показали снижение амплитуды МПКП и снижение

квантового состава [227]. Доказательства того, что дисфункция НМС развивается до дегенерации мотонейрона, были представлены L.R. Fisher и коллегами. У внезапно скончавшегося пациента с установленной спорадической формой БАС при аутопсии наблюдались денервационно-реиннервационные изменения в скелетной мускулатуре, при этом мотонейроны передних рогов спинного мозга и передние корешки были морфологически интактными [52]. Также, электрофизиологическим методом была установлена избирательная уязвимость двигательных единиц

Таким образом, результаты ряда исследований показывают, что основные морфологические дефекты присутствуют в НМС пациентов с БАС уже на ранних стадиях, и подтверждают ключевую роль дегенерации НМС в патогенезе заболевания [46, 112, 128, 172].

Изучение ранней дисфункции и деструкции НМС у пациентов с БАС имеет ограничения, связанные с невозможностью проведения исследований на досимптомной стадии. С целью изучения БАС был создан целый ряд мышинных моделей с мутациями в основных генах, связанных с развитием БАС – SOD1, C9orf72, TARDBP и FUS. Конечно, исследования на мышинных моделях тоже имеют ряд ограничений. Например, человеческие НМС морфологически отличны от мышинных, тем самым наблюдаемые изменения НМС в мышинных моделях сложно транслировать на пациентов с БАС [73]. Также гетерогенность генетических и средовых факторов, обуславливающих патогенез БАС у человека, не позволяет мышинным моделям в полной мере воспроизвести механизмы развития и прогрессирования заболевания. Первая созданная трансгенная мышшь сверхэкспрессировала человеческий ген SOD1, продуктом которого был белок с заменой глицина на аланин в 93 позиции (G93A) [209]. Данная модель на сегодняшний день является одной из самых изученных, активно используется в доклинических исследованиях, а также способствовала внедрению рилузола и эдававона в терапию БАС [222]. SOD1(G93A)-модель четко воспроизводит большинство механизмов патогенеза БАС у людей, демонстрирует прогрессирующую дегенерацию мотонейронов, приводящую к параличу и смерти

в течение 4-5 месяцев [209]. Трансгенные FUS-мышцы также воспроизводят такие патологические процессы при БАС у человека, как накопление внутриклеточных FUS-агрегатов, прогрессирующая гибель мотонейронов, денервация скелетных мышц с развитием параличей и атрофий [146]. Таким образом, существующие трансгенные мышечные модели адекватно воспроизводят клиническую картину БАС, основные патогенетические механизмы, и являются отличным инструментом для изучения болезни [2, 175, 222].

Одной из наиболее популярных мышечных моделей являются SOD1-трансгенные мышцы, экспрессирующих мутантные человеческие гены супероксиддисмутазы-1. В SOD1-модели поражение НМС наблюдается уже на досимптомной стадии, опережая появление первых признаков патологии в мотонейронах [74, 86, 120]. В первую очередь признаки денервации НМС наблюдаются в быстрых двигательных единицах, в то время как медленные двигательные единицы остаются интактными [74, 86, 254]. Отмечается уменьшение количества двигательных единиц и силы мышечного сокращения быстрых мышечных волокон [162]. На досимптомной стадии выявляются явные признаки нарушения нервно-мышечной синаптической передачи [119]. Также отмечается нарушение докинга синаптических везикул к пресинаптической мембране при сохранении общего числа везикул [74, 86] и замедление процессов рециклирования синаптических везикул [115].

Более детальное исследование развития дисфункции нервно-мышечной синаптической передачи было проведено Tremblay и коллегами. Было показано, что изменения синаптической передачи для каждого типа двигательной единицы специфичны на разных стадиях патологии [323]. В FF-двигательных единицах на досимптомной стадии отмечается значительное снижение базового выброса нейромедиатора, на симптомной стадии – уменьшение амплитуды и увеличение частоты МПКП. В FR-двигательных единицах на досимптомной стадии увеличивается частота МПКП, на симптомной стадии уменьшается амплитуда МПКП и базовый выброс нейромедиатора. В S-двигательных единицах на досимптомной стадии увеличивается базовый выброс нейромедиатора, который

возвращается к норме на симптомной стадии. Также, в НМС FF-двигательных единиц менее выражены процессы спрутинга, полииннервации, разрастания отростков перисинаптических Шванновских клеток, что отражает меньший регенеративный потенциал [323].

«Восходящий» паттерн нейродегенерации наблюдается и в некоторых TDP-43-трансгенных моделях. Было показано, что денервация НМС наблюдается еще до начала гибели мотонейронов спинного мозга [144]. Также, задолго до появления первых симптомов отмечаются признаки дисфункции НМС в виде увеличения амплитуды и снижения частоты МПКП, к которым далее присоединяется нарушение везикулярного цикла и уменьшение числа синаптических везикул [102].

FUS-модели также воспроизводит восходящий паттерн нейродегенерации. Одни из первых признаков патологии НМС – это снижение амплитуды вызванных моторных ответов, наблюдаемые на досимптомной стадии. Позже становятся явными морфологические изменения пре- и постсинаптических мембран НМС и аксонов, за которыми следует гибель мотонейронов [49]. В дополнение была показана избирательная уязвимость FF-двигательных единиц. Нарушение синаптической передачи и морфологии НМС были также подтверждены в других FUS-моделях [101, 206].

Сложно судить о восходящем паттерне нейродегенерации в C9orf72-моделях БАС. В некоторых моделях отмечается дегенерация НМС на досимптомной стадии, однако данные изменения скорее обусловлены развитием миопатии, так как отсутствуют признаки поражения мотонейронов на всем протяжении болезни [176]. В других C9orf72-моделях отмечается выраженная нейродегенерация на ранних стадиях патологии [46]. Электрофизиологические исследования нервно-мышечной синаптической передачи у данных моделей отсутствуют.

Таким образом, целый ряд различных моделей БАС показывает ранее развитие дисфункции нервно-мышечной синаптической передачи и деструкции НМС на досимптомной стадии, тем самым воспроизводя восходящий паттерн нейродегенерации [46]. Однако молекулярные механизмы нарушения синаптической передачи до конца не изучены.

1.5. Ацетилхолинэстераза и холинергическая дисфункция при боковом амиотрофическом склерозе

АХЭ – это гидролитический фермент, катализирующий расщепление ацетилхолина до холина и остатка уксусной кислоты в синаптической щели, что необходимо для прекращения синаптической передачи и расслабления мышечного волокна [15]. АХЭ является частью холинергической системы. АХЭ обычно представлена в виде белкового комплекса, который состоит из каталитических тетрамеров, ковалентно связанных с некаталитическим доменом – коллаген-подобным хвостом (collagen-like tail, ColQ) [271]. ColQ в свою очередь связан с MuSK и перлеканом, белком внеклеточного матрикса синаптической щели [39, 216]. Основная форма АХЭ в НМС – асимметричная, состоящая из одного или трех тетрамеров (G₄) АХЭ, связанных с ColQ [311].

Помимо классической каталитической функции, предполагается, что АХЭ может выполнять ряд неклассических (несинаптических) функций. Так, АХЭ начинает экспрессироваться в отсутствие ацетилхолина, задолго до начала синаптогенеза [77]. Показано, что АХЭ участвует в клеточной адгезии, росте аксонов и формировании нервных сетей, а также оказывает протективный эффект на клетки черной субстанции [158, 239]. Вероятно, это возможно за счет того, что АХЭ имеет схожие аминокислотные последовательности с некоторыми белками клеточной адгезии [295]. АХЭ, вероятно, принимает участие в формировании постсинаптической мембраны. Мутации в гене АХЭ в животных моделях приводят к уменьшению количества и фрагментации кластеров ацетилхолиновых рецепторов [40, 264]. При мутациях, приводящих к дефициту ColQ, отмечается нарушение дифференциации постсинаптической части НМС и его созревания, что проявляется в виде уменьшения кластеров ацетилхолиновых рецепторов, дизрегуляции некоторых мРНК внеклеточного матрикса, дефицита ряда гликопротеинов базальной мембраны НМС [85, 225]. У людей мутации в гене ColQ приводят к значимому снижению АХЭ в нервно-мышечных синапсах и являются одной из

причин врожденного миастенического синдрома [168, 217]. Таким образом, АХЭ отвечает за формирование и выживание нервно-мышечного синапса, нормальное функционирование ацетилхолиновых рецепторов, тем самым выполняя ряд ферментативных функций [15].

Основным источником АХЭ в НМС является скелетная мышца. Экспрессия АХЭ в мышечных волокнах начинается уже до формирования НМС и носит диффузный характер по всей клеточной мембране. Однако после формирования НМС АХЭ аккумулируется только в синаптической щели [160]. Экспрессия АХЭ скелетной мышцей зависит от паттерна иннервации. Таким образом, экспрессия АХЭ в быстрых мышечных волокнах выше, чем в медленных [292, 310]. Также в быстрых мышечных волокнах экспрессия АХЭ заметно усиливается в ответ на увеличение мышечной активности, в то время как в медленных волокнах такого не наблюдается [160].

АХЭ также обнаруживается в мембране эритроцитов, плазме крови, спинномозговой жидкости (СМЖ) и слюне [95, 208, 237, 275]. В плазме крови также находится бутирилхолинэстераза, которые вместе обуславливают холинэстеразную активность плазмы [96]. Более половины АХЭ плазмы крови происходит из периферических структур с холинергической нейротрансмиссией – из НМС и вегетативных ганглиев [208]. Также было установлено, что одним из источников АХЭ слюны являются клетки слюнных желез [326].

Несколькими исследовательскими группами ранее уже было проведено исследование активности АХЭ плазмы крови у пациентов с БАС. Однако эти исследования проводились до появления современных диагностических критериев. В 1981, 1983 и 1999 годах радиометрическим и калориметрическим методами было установлено, что у пациентов с БАС активность АХЭ плазмы крови достоверно выше, чем у контрольной группы [38, 139, 232]. Эти работы дополняет исследование активности АХЭ в мышечных биоптатах пациентов с БАС, где было установлено достоверное ее снижение [138]. Было предположено, что наблюдаемые изменения активности АХЭ плазмы и мышечных биоптатов обусловлены высвобождением АХЭ из НМС при денервации [226]. Это подтверждается

исследованиями, где было показано быстрое снижение экспрессии АХЭ в скелетной мышце, а также ее усиленное высвобождение из НМС в денервационных моделях [70, 292, 335]. Несмотря на полученные данные, свидетельствующие об изменениях активности АХЭ в плазме крови при БАС, далее подобные исследования не проводились. Исследование активности АХЭ слюны при БАС также не проводилось. Тем не менее в последних обзорных работах, посвященных поражению НМС и АХЭ при БАС, авторы обсуждают тему возможного использования АХЭ в качестве биомаркера заболевания [224, 226].

1.6. Биомаркеры бокового амиотрофического склероза

Несмотря на последние достижения в изучении БАС в области генетики и молекулярной биологии, диагностика заболевания по-прежнему основывается на выявлении характерной клинической картины. Это является причиной поздней диагностики БАС, в среднем через 13-18 мес от фактического начала болезни [124]. Еще одной проблемой изучения БАС является большое количество неудачных клинических исследований потенциальных лекарственных средств. Одними из причин подобных неудач являются включение пациентов в исследования на поздних стадиях болезни и гетерогенность БАС [207]. Применение биомаркеров может помочь решить данные проблемы. Современные исследования АХЭ как маркера БАС на сегодняшний день отсутствуют. Однако ряд других биомаркеров хорошо изучены. К ним относятся цепи нейрофиламента, микро-РНК и рецептор нейротрофина р75 [21].

Наиболее изученными биомаркерами БАС являются фосфорилированные тяжелые цепи нейрофиламента (pNFH) и легкие цепи нейрофиламента (NFL). Нейрофиламенты — это структурные белки цитоскелета, экспрессирующиеся в нейронах. Агрегация и аккумуляция этих белков приводит к нарушению аксонального транспорта, морфологическим и функциональным изменениям мотонейронов и их массивной гибели, что является характерной чертой БАС [284]. Цепи нейрофиламента достаточно стабильны, потому с использованием

серологических методов исследования достаточно легко определять их концентрацию в таких биологических жидкостях, как СМЖ и кровь. В исследованиях было показано повышение концентрации рNFH в СМЖ и крови на ранних сроках при БАС в сравнении со здоровой группой и другими неврологическими заболеваниями, что говорит о достаточной специфичности для БАС [7, 92, 284]. В случае семейной формы БАС концентрация NFL повышается примерно за год до появления первых симптомов, что может использоваться в прогностических целях у носителей мутантных генов.

На сегодняшний день в ряде исследований установлена чувствительность и специфичность для рNFH в диагностике БАС. При определении рNFH в СМЖ чувствительность составляет от 77% до 97,3%, специфичность от 80% до 95%. При определении цепей нейрофиламента в крови, чувствительность и специфичность составляют 89-90% и 71-75% соответственно [334]. Показано, что высокий уровень концентрации рNFH коррелирует с более быстрым темпом прогрессирования заболевания и с меньшей продолжительностью жизни [7, 249, 251]. Также установлено, что повышение концентрации рNFH и NFL коррелирует со степенью поражения верхних мотонейронов [92].

Микро-РНК (miRNA) — это некодирующие цепочки РНК длиной в 20-25 нуклеотидов, которые участвуют в регуляции экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном этапе путем РНК-интерференции. Микро-РНК имеют ткане-специфичную экспрессию [75]. Микро-РНК могут быть обнаружены во многих физиологических жидкостях, в исследованиях БАС микро-РНК определяли в СМЖ, крови и мышечных биоптатах. Дизрегуляция в экспрессии микро-РНК играет важную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний в общем, и бокового амиотрофического склероза в частности [116].

Наиболее изученной микро-РНК при БАС является miR-206. Это специфичная для мышечной ткани микро-РНК, экспрессия которой увеличивается при развитии БАС [205]. При этом количество копий miR-206 обратно пропорционально темпам прогрессирования заболевания. [28]. Считается, что miR-206 играет протективную роль, обеспечивая стабильность НМС и активность

спрутинга, что снижает темпы денервации скелетной мышцы.

Рецептор нейротрофина р75 (p75NTR) экспрессируется в большом количестве в мотонейронах в период эмбрионального развития, а также при их повреждении в постнатальном периоде [340]. Данный белок опосредует два противоположных процесса - выживание и гибель нервных клеток в зависимости от наличия или отсутствия нейротрофинов. При БАС данный рецептор запускает процессы апоптоза в мотонейронах. Гистологически было показана сверхэкспрессия p75NTR в альфа-мотонейронах спинного мозга пациентов с БАС [293]. Внеклеточный домен рецептора нейротрофина выделяется с мочой, где его можно обнаружить у новорожденных и в значительно меньшем количестве у взрослых. При БАС отмечается увеличение концентрации p75NTR в моче, уровень которой прямо коррелирует с темпами прогрессирования заболевания. Исследование p75NTR в моче обладает высокой чувствительностью и специфичностью [312].

Гетерогенность БАС является характерной чертой данного заболевания. Изучение молекулярных механизмов развития нервно-мышечной синаптической дисфункции у разных трансгенных животных с моделью заболевания может расширить наше представление о патогенезе БАС. Актуальным является также изучение биомаркеров заболевания. Согласно литературным данным, АХЭ может быть потенциальным биомаркером БАС, отражающим текущий денервационный процесс. Таким образом, комплексное исследование синаптических белков, активности АХЭ в трансгенных моделях и у человека с БАС может расширить представление о широте вовлечения в патологический процесс невральные структур и гетерогенности различных форм БАС.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

2.1.1. Характеристика клинического материала

Работа проводилась на клинической базе кафедры неврологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, отделения неврологии ГАУЗ «Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан». От каждого испытуемого было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Из 41 человека, включенного в исследование, было сформировано три группы испытуемых - 17 пациентов с БАС (группа БАС), 9 пациентов с заболеваниями, имитирующих БАС (неврологический контроль), 15 здоровых лиц (здоровый контроль) (Таблица 1).

Таблица 1 – Демографическая характеристика исследованных групп

Группа	N	Пол, м/ж	Возраст, лет
БАС	17	6/11	65 [61; 66]
Неврологический контроль	9	6/3	59 [53; 62]
Здоровый контроль	15	8/7	56 [52,5; 65,5]

В первые две группы отбирались пациенты из числа поступающих в отделение с направительным диагнозом «Болезнь двигательного нейрона?» или «Синдром БАС?». У данных пациентов проводилось тщательное изучение клинической картины, данных анамнеза и медицинской документации. Всем пациентам проводились МРТ головного мозга (1,5 Т), позвоночника и спинного

мозга, стимуляционная и иЭМГ, биохимический и клинический анализ крови, рентгенография органов грудной клетки. В некоторых случаях проводились иммунологические исследования крови, люмбальная пункция с исследованием ликвора. Пациенты, у которых после детального обследования в соответствии с рекомендациями EFNS (European Federation of Neurological Societies) были исключены заболевания, имитирующие БАС [124], а также была исключена сопутствующая неврологическая патология, после получения согласия в участии в исследовании включались в группу БАС. Пациенты, у которых в ходе тщательного обследования, диагностировалось заболевание, имитирующее БАС, после получения согласия в участии в исследовании включались в группу неврологического контроля [124]. В группу неврологического контроля в итоге было включено 5 пациентов со спондилогенной шейной миелопатией, 1 пациент с сирингомиелией, 1 - с атипичной ХВДП, 1 – со спиноцеребеллярной дегенерацией с сенсорно-моторной полинейропатией, 1 – с дистрофической миотонией 1 типа. В группу здорового контроля включались лица без органического поражения нервной системы и тяжелой соматической патологии.

Общими критериями включения для всех участников исследования были: возраст от 30 до 80 лет и наличие добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерием включения в группу БАС было наличие диагноза БАС, выставленным в соответствии с пересмотренными критериями El Escorial [126].

Критерием включения в группу неврологического контроля было выявление альтернативного диагноза, имитирующего БАС.

Критериями исключения в группы неврологического и здорового контроля являлись:

1. занятие профессиональным спортом;
2. работа с агрохимикатами, формальдегидом;
3. занятие сварочными работами;
4. травмы головы и спины в анамнезе;

Таким образом, критериями исключения для контрольных групп были

общепризнанные факторы риска бокового амиотрофического склероза [199].

Общими критериями исключения для всех участников являлись:

1. тяжелая соматическая или психическая патология, системные заболевания;
2. другие заболевания нервной системы;
3. терапия препаратами, влияющими на активность ацетилхолинэстеразы (ингибиторы АХЭ);
4. терапия препаратами, влияющими на саливацию (ботулинотерапия и прочее);
5. различные заболевания органов полости рта (инфекционные, травматические, аутоиммунные и прочее);
6. тяжелое состояние, требующее поддержания витальных функций;
7. кормление через назогастральный зонд;
8. отказ от участия в исследовании.

Форма заболевания у пациентов группы БАС определялась на основании общепринятой классификации [55]. Длительность заболевания определялась в месяцах от начала первых симптомов до даты забора крови и слюны.

2.1.2. Моделирование бокового амиотрофического склероза

Для выполнения поставленных цели и задач в рамках диссертационной работы для моделирования бокового амиотрофического склероза были выбраны две трансгенные мышинные модели БАС, экспрессирующие гены, вовлеченные в патогенез БАС – SOD1 и FUS [218, 219]. В качестве первой модели использовались трансгенные мыши генотипа B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J. Это трансгенные мыши на генетическом фоне B6SJL, которые экспрессируют мутантный человеческий ген, кодирующий цитозольный фермент Cu/Zn-супероксиддисмутаза SOD1 (глицин замещён на аланин в позиции 93) (далее - mSOD1-мыши). Данные мыши впервые были получены в 1994 году [209]. У mSOD1-мышей выделяют три стадии болезни – досимптомную, симптомную и терминальную. mSOD1-мыши нормально развиваются до взрослого состояния и демонстрируют нормальный

фенотип до 90-100-дневного возраста. После становятся заметными двигательные нарушения, что указывает на манифестацию болезни и конец досимптомной стадии. При этом для моделей БАС на генетическом фоне B6SJL характерна вариабельность начала появления симптомов и выживаемости [122]. Двигательные нарушения прогрессируют на протяжении симптомной стадии и сопровождаются гибелью мотонейронов спинного мозга. Обычно, в возрасте около 6 месяцев mSOD1 мыши становятся парализованными на одну или более конечностей. На терминальной стадии потеря мотонейронов передних рогов спинного мозга достигает 50% [43].

Линия данных мышей была получена в Jackson Laboratory (США) и содержится в питомнике лабораторных животных «Пушино» (г. Пушино, Московская область). За неделю до начала экспериментов животные доставлялись в ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Для иммунофлуоресцентного исследования синаптических белков (синапсин I, синаптофизин, SNAP-25) были использованы трансгенные mSOD1-мыши на досимптомной стадии заболевания без каких-либо клинических проявлений БАС в возрасте от 10,57 до 13,71 нед (средний возраст $12,0 \pm 0,58$ нед, $n=5$) и на симптомной стадии заболевания с пlegией обеих задних конечностей в возрасте от 27,57 до 31,28 нед (средний возраст $29,65 \pm 0,81$ нед, $n=5$). В качестве контроля были использованы мыши дикого типа того же генетического фона соответствующих возрастов: 1 – мыши дикого типа в возрасте от 10,14 до 14 нед (средний возраст $12,56 \pm 0,89$ нед, $n=5$); 2 - мыши дикого типа в возрасте от 27,14 до 31,28 нед. (средний возраст $28,68 \pm 0,79$ нед, $n=5$).

Для флуоресцентного исследования АХЭ в НМС были использованы трансгенные mSOD1-мыши на досимптомной стадии в возрасте от 6,3 до 12,3 нед. (средний возраст $10,01 \pm 2,29$ нед, $n=5$) и на симптомной стадии в возрасте от 17,14 до 33,7 нед. (средний возраст $25,05 \pm 3,5$ нед, $n=5$). В качестве контроля были использованы мыши дикого типа в возрасте от 6,3 до 12,3 нед. (средний возраст $10,04 \pm 1,53$ нед, $n=5$), и мыши дикого типа в возрасте от 17,14 до 33,7 нед. (средний возраст $24,25 \pm 4,51$ нед, $n=5$).

В качестве второй модели бокового амиотрофического склероза использовались трансгенные мыши генотипа FUS¹⁻³⁵⁹ с эктопной нейроспецифической экспрессией укороченного гена FUS человека на генетическом фоне CD1 (далее – FUS-мыши). Данная модель выведена отечественными учеными в 2014 году [146]. У данной линии трансгенных мышей наблюдается формирование патологических агрегатов FUS в цитоплазме мотонейронов, что приводит к развитию нейродегенеративного процесса с избирательным поражением двигательных нейронов. У FUS-мышей двигательные нарушения развиваются в двухмесячном интервале в возрасте от 2,5 до 4,5 мес и очень быстро прогрессируют. В течение двух недель развивается тетраплегия и наступает смерть. Линия данных мышей содержится в питомнике Института физиологически активных веществ РАН (г. Черноголовка, Московская область). За неделю до начала экспериментов животные доставлялись в ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Для иммунофлуоресцентного исследования синаптических белков были использованы трансгенные FUS-мыши на досимптомной стадии заболевания без каких-либо клинических проявлений БАС в возрасте от 6,57 до 9,57 нед (средний возраст $8,08 \pm 0,65$ нед, $n=5$) и на симптомной стадии заболевания с плегией обеих задних конечностей в возрасте от 18,57 до 20,28 нед (средний возраст $19,56 \pm 0,34$ нед, $n=5$). Исследуемые группы сравнивались с группами контроля — мышами дикого типа генотипа CD1 в возрасте от 6,85 до 9,14 нед (средний возраст $8,31 \pm 0,48$ нед, $n=5$) и от 18,28 до 20,71 нед (средний возраст $19,19 \pm 0,6$ нед, $n=5$).

Для флуоресцентного исследования АХЭ в НМС было использовано такое же количество мышей таких же возрастов.

Для измерения активности АХЭ плазмы крови было использовано 24 трансгенных FUS-мышей, разделенных на две группы: 1 — трансгенные FUS-мыши на досимптомной стадии заболевания без каких-либо клинических проявлений БАС в возрасте от 7,28 до 8,71 нед (средний возраст $8,57 \pm 0,13$ нед, $n=15$); 2 - трансгенные FUS-мыши на симптомной стадии заболевания с плегией обеих задних конечностей в возрасте от 14,71 до 19,57 нед (средний возраст

16,1±0,61 нед, n=9). Исследуемые группы сравнивались с группами контроля — мышами дикого типа генотипа CD1 в возрасте от 7,42 до 9,85 нед (средний возраст 8,89±0,28 нед, n=15) и от 17,14 до 19,71 нед (средний возраст 18,6±0,4 нед, n=10). Эксперименты проводились в строгом соответствии с общепринятыми этическими нормами.

2.2. Методы исследования

Все протоколы исследования с участием лабораторных животных и человека были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол №5 от 28.05.2019 г., протокол №3 от 23.03.2021 г.).

2.2.1. Клинико-неврологический метод

При исследовании неврологического статуса у пациентов с БАС оценивалось признаки вовлечения верхнего и нижнего мотонейронов, и уровни цереброспинальной оси, на которых эти симптомы выявлялись [8].

При исследовании симптомов поражения верхнего мотонейрона оценивались наличие патологических рефлексов, клонусов, спастичности, насильственного плача и смеха, повышение сухожильных рефлексов. Также нормальные сухожильные рефлекссы при наличии выраженной амиотрофии и слабости расценивались как признаки поражения верхнего мотонейрона [13].

При исследовании симптомов поражения нижнего мотонейрона оценивалось наличие амиотрофий, фасцикуляций, мышечной слабости, гипотонии. Поражение нижнего мотонейрона у всех пациентов подтверждалось инструментальным методом – иЭМГ согласно критериям Awaji [127].

Тщательно исследовалась чувствительная сфера, координаторные пробы и признаки вовлечения экстрапирамидной системы для исключения альтернативного или сопутствующего неврологического заболевания.

Тяжесть заболевания у пациентов с БАС определялась при оценке

функционального состояния. Для этого использовалась Шкала функциональных нарушений при БАС, пересмотренная в 1999 году (ALS Functional Rating Scale Revised, ALSFRS-R) [309]. Данная шкала оценивает независимость пациента с БАС в 4 сферах (передвижение и уход за собой, речь, глотание, дыхание), разделенных на 12 показателей. По каждому показателю можно набрать от 0 баллов (полная зависимость в сфере) до 4 баллов (отсутствие каких-либо проблем и сложностей в сфере). Максимальный суммарный балл по данной шкале - 48. Исследования применения данной шкалы показало, что заболевание прогрессирует линейно и темпы прогрессирования на протяжении всего заболевания остаются неизменными [308].

Расчет темпов прогрессирования БАС. Темп прогрессирования заболевания оценивался как количество потерянных баллов ALSFRS-R в месяц. Расчет производился следующим образом: (48-балл по ALSFRS-R)/количество месяцев от начала заболевания. По такой формуле оценивалось снижение функционального состояния пациента от начала болезни и до постановки диагноза и включения в исследование. Такой подход более точно отражает темп прогрессирования БАС, чем оценка баллов ALSFRS-R по 4-х месячным интервалам уже после диагностирования БАС [308]. Также было показано, что заболевание прогрессирует линейно и темпы прогрессирования на протяжении всего заболевания остаются неизменными. В данной работе скорость прогрессирования $>1,4$ балла/мес. считалась быстрой, $<0,4$ балла/мес. считалась медленной, $0,4-1,4$ балла/мес. - умеренной [55].

Определение стадии БАС. В данной работе для определения стадии БАС использовалась шкала Королевского колледжа Лондона (King's clinical staging system, коротко – King's) [32]. В этой системе стадия болезни зависит от количества уровней цереброспинальной оси (бульбарный, шейный, поясничный), на которых выявляются признаки поражения верхнего и/или нижнего мотонейрона. Согласно этой шкале 1 стадия выставляется при наличии симптомов на одном из уровней цереброспинальной оси. 2А стадия соответствует постановке диагноза. 2В стадия выставляется при появлении симптомов болезни на втором уровне, а 3 стадия – при

поражении третьего уровня. После установки гастростомы пациенту выставляется 4А стадия, а при начале респираторной поддержки - 4Б стадия. 5 стадия соответствует летальному исходу.

Также для определения стадии БАС в данной работе использовалась Милано-Туринской шкала (MiToS staging system) [105]. Это 6 стадийная система, основанная на потере самостоятельности пациента в 4 сферах шкалы ALS-FRS-R (передвижение и уход за собой, речь, глотание, дыхание), в которой 0 стадия соответствует наличию симптомов с сохранением самостоятельности во всех сферах, 1 стадия - потере самостоятельности в одной сфере, 2 стадия - в двух сферах, 3 стадия - в трех сферах, 4 стадия - во всех сферах, 5 стадия – летальному исходу.

2.2.2. Измерение активности ацетилхолинэстеразы в плазме крови и слюне

Работы по измерению активности АХЭ в образцах были проведены на базе кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, отделения неврологии ГАУЗ РКБ МЗ РТ, лаборатории «Нейрофизиология» Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН¹.

Измерение активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови проводилось калориметрическим методом Элмана [30]. Измерение активности ацетилхолинэстеразы слюны проводилось модернизированным методом Элмана [29].

Суть метода Элмана заключается в следующем. Тиохалин, восстановленный из ацетилтиохалина ацетилхолинэстеразой, с DTNB (5,5'-дителиобис-(2-нитробензойная кислота, реактив Элмана) образует соединения, придающие реакционной смеси характерный желтый цвет. Активность АХЭ определяется измерением оптической плотности раствора при длине волны 412 нм,

¹ - совместно с руководителем лаборатории д.б.н. Петровым К.А., научным сотрудником к.б.н. Зуевой И.В.

пропорциональной гидролизованному ацетилтихолину.

1. Забор крови у пациентов. Забор крови производился путем пункции локтевой вены процедурной медсестрой отделения с обязательным соблюдением мер асептики и антисептики. Венозная кровь набиралась в пробирку, содержащую гепарин (пробирка для исследования коагулограммы). Объем крови - 3 мл. Забор крови осуществлялся утром после пробуждения, до приема пищи. С вечера предыдущего дня исключалось курение, прием алкоголя и напитков, за исключением воды.

2. Сбор слюны у пациентов. Слюна собиралась в стерильную чистую пластиковую пробирку без содержания каких-либо веществ (стандартная пробирка для сбора ликвора). Объем слюны - 5 мл. Время забора - утро, после пробуждения, до приема пищи, до или сразу после забора крови. С вечера предыдущего дня исключалось курение, прием алкоголя и напитков, за исключением воды. Перед сбором слюны пациент полоскал полость рта кипяченой водой дважды. Слюна собиралась методом «сплевывания» - пациент совершал несколько глотательных движений, после чего собирал слюну в полости рта не более 1 минуты и сплевывал в пробирку [221]. Данный способ является стандартной методикой сбора «не стимулированной» слюны. Собранный материал транспортировался в лабораторию в течение 1 часа в термосе с хладэлементами.

3. Измерение активности АХЭ методом Элмана проводилось в лаборатории «Нейрофизиология», ИОФХ им. А. Е. Арбузова. Кровь и слюну пациентов центрифугировали при температуре 4°C при 8000 об/мин 8 мин (центрифуга Eppendorf 5424r). Полученные образцы плазмы крови и слюны замораживали при -80°C.

В день исследования замороженные образцы плазмы и слюны размораживались, затем инкубировались с $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ iso-OMPA (тетра(моноизопропил)пирофосфортетрамид, ингибитор бутирилхолинэстеразы) в течение 20 минут. Реакционная смесь содержала 20 мкл плазмы крови, или 100 мкл слюны, 20 мкл 0,01 М реактива Элмана и 1940, или 1880 мкл 0,1 М фосфатного буфера (pH=8,00). Смесь инкубировали в течение 10-ти минут при температуре

25°C для достижения полной реакции матричных сульфгидрильных групп с реактивом Элмана перед добавлением субстрата. Ферментативную реакцию запускали добавлением 20 мкл 0,1 М ацетилтиохолина и измеряли скорость реакции в течение двух минут. Каждое измерение повторяли трижды. Активность АХЭ оценивали спектрофотометрическим методом, путем измерения интенсивности цвета при длине волны 412 нм (Спектрофотометр, Shimadzu UV-1800). Для измерения концентрации белка к 20 мкл плазмы крови/слюны добавляли 1980 мкл фосфатного буфера (0,1М, рН=8,00) и измеряли оптическую плотность при 280 и 260 нм. Концентрацию белка рассчитывали по формуле Калькара: $1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260} \times 100$ (мг/мл) [188]. Активность АХЭ была определена как количество мкмоль ацетилтиохолина, гидролизованного АХЭ в течение 1 минуты, в 1 мл образца, нормированная на концентрацию белка – U/мг белка.

4. У анестезированных с помощью хлоралгидрата мышей удалялась часть грудины и формировался доступ к сердцу. Инсулиновым шприцем производилась пункция левого желудочка и набиралась кровь (1,5-2,0 мл). Затем кровь помещалась в эппендорф. Кровь центрифугировалась при температуре +4 при 2500 об/мин 8 минут. После выпадения осадка плазма изолировалась и замораживалась в другом эппендорфе при -80°C. В день исследования активность АХЭ плазмы мышей измерялась тем же методом, что и плазма пациентов.

2.2.3. Флуоресцентное исследование синаптических белков нервно-мышечного синапса

Экспрессия синаптических белков исследовалась иммунофлуоресцентным методом. Объектом исследования была диафрагмальная мышца мыши, которая является смешанной мышцей с преобладанием быстрых мышечных волокон [281]. Суть метода заключалась в следующем: препараты диафрагмы мыши инкубировались с первичными антителами к конкретной мишени – пресинаптическим белкам синаптофизину, синапсину I или SNAP-25. Далее препараты инкубировались со вторичными антителами с флуоресцентной меткой к

первичным антителам. Таким образом, формировался комплекс «пресинаптический белок – первичное антитело – вторичное антитело с флуорофором». Данные комплексы визуализировались с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 MP (Leica, Германия), интенсивность флуоресценции соответствовала экспрессии мишени (Приложение А). Экспрессия АХЭ и никотиновых ацетилхолиновых рецепторов оценивалась флуоресцентным методом с использованием селективных белковых токсинов, конъюгированных с флуорофорами.

Данные работы были выполнены на базе кафедры нормальной физиологии и Института нейронаук ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, на базе лаборатории биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН².

В рамках цели и задач диссертационной работы проводилось исследование экспрессии пресинаптических белков синаптофизина, синапсина I и SNAP-25, никотиновых ацетилхолиновых рецепторов постсинаптической мембраны, а также АХЭ синаптической щели. Для оценки экспрессии синаптических белков вначале приготавливался препарат диафрагмы мышцы, который далее инкубировался с первичными и вторичными антителами [338]. Протокол исследования одобрен Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол №5 от 28.05.2019 г., протокол №3 от 23.03.2021 г.).

1. Мыши анестезировались с помощью инъекций 6,4% раствора хлоралгидрата в дозе 10 мкл/гр внутрибрюшинно. Умерщвление анестезированной мышцы осуществлялось путем декапитации острыми ножницами.

2. После этого вскрывалась брюшная и грудная полость, извлекалась целая диафрагма с нижними ребрами. Далее в чашке Петри в фосфатно-буферном растворе (PBS, pH 7,4) диафрагма отделялась от ребер, сопутствующих тканей, фасции. Затем диафрагма помещалась на 30 мин в 4% раствор параформальдегида (pH 7,4). После чего диафрагма переносилась в 30% раствор сахарозы (pH 7,4) с

² - совместно с руководителем лаборатории к.б.н., с.н.с. Самигуллиным Д.В., научным сотрудником к.б.н. Сибгатуллиной Г.В.

добавлением 0.02% азида натрия (1 мл на 100 мл раствора), в котором хранилась до последующей инкубации с антителами при 4°C (не более 1 недели).

3. Фиксированные препараты диафрагмы промывались в PBS в течение 30 мин, затем в течение 30 мин инкубировались в 0.5% растворе Triton-X100 на PBS (PBST, pH 7,4). Далее препараты инкубировались в течение 15 минут в блокирующей сыворотке (5% раствор ослиной сыворотки (NDS) и 1% раствор бычьего сывороточного антигена (BSA) на PBST, pH 7,4).

4.1. Далее препараты окрашивали для совместной визуализации экспрессии никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) и синаптофизина (SYP), либо nAChR, SNAP-25 и синапсина I (SYN-I). Сначала препараты инкубировались с первичными антителами к SYP, либо к SNAP-25 и SYN-I в соотношении 1:200 на PBST в течение ночи при 4°C. На следующий день препараты промывались в PBS в течение 30 минут, затем инкубировались с вторичными антителами в соотношении 1:800 и альфа-бунгаротоксином, конъюгированным с тетраметилродамином (TMR-ABT t1175, Life Technologies, USA) в соотношении 1:50 на PBST в течение 60 минут при комнатной температуре в темноте. Альфа-бунгаротоксин — это белковый нейротоксин, специфически связывающийся с nAChR скелетных мышц, используется в качестве метки постсинаптической мембраны. Спецификации использованных антител указаны в Таблице 2. TMR-ABT поглощает излучение с длиной волны 555 нм, излучает волны длиной 577 нм. После инкубации препараты повторно промывались в PBS в течение 60 минут при комнатной температуре в темноте. Окрашенные препараты затем заключались в среду Shandon Immu-Mount на предметном стекле.

4.2. Для совместной визуализации nAChR и АХЭ использовались TMR-ABT и фасцикулин-2. Фасцикулин-2 – это белковый токсин, селективный ингибитор АХЭ с высокой аффинностью к периферическому анионному участку данного фермента [189]. Сначала проводилась конъюгация фасцикулина-2 (Fascicullin II, ab 141801, ABCAM, USA) с флуорофором Alexa Fluor 647 с использованием набора Alexa Fluor 647 Microscale Protein Labeling Kit (A30009, Life Technologies, USA) согласно инструкции. Затем препараты диафрагмы инкубировались в растворе

PBST, содержащем фасцикулин-2, конъюгированный с флуорофором Alexa Fluor 647 (Alexa647-Fasc2) (1:1000) и TMR-ABT (1:50) в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Отмывку от красителей производили фосфатным PBS в течение 30 мин. Окрашенные препараты заключались в смоле для флуоресцентной микроскопии SubX (Leica, Германия) на предметном стекле.

5. Полученные препараты визуализировались при помощи конфокального сканирующего микроскопа. Использовался конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 MP (Leica, Germany), многолинейный аргон-неон-гелиевый лазер (Multiline Argon-Neon-Helium laser), фильтр аутоскопический настраиваемый под длины волн. Использовались длины волн возбуждения 488, 555, 647 нм. Длины волн эмиссии – 519, 577, 670 нм. Изображения фиксировались программой LAS (Leica Application Suite), с разрешением изображений 2048x2048 пикселей, частотой лазера 100 Герц. Для получения корректных значений все анализируемые микрофотографии были сняты при одинаковых настройках микроскопа (pinhole, gain, offset, мощность лазера).

Таблица 2 – Спецификации использованных антител

Мишень	Первичные АТ	Вторичные АТ	Длины волн поглощения и эмиссии (нм)
Синаптофизин (в исследовании на FUS-мышцах)	Anti-synaptophysin mouse monoclonal ab8049 (ABCAM, USA)	Alexa FL 647 Donkey anti-mouse A31571 (Life Technologies, USA)	Поглощение 647 Эмиссия 670
Синаптофизин (в исследовании на mSOD1-мышцах)	Anti-synaptophysin rabbit polyclonal ab14692 (ABCAM)	Alexa FL 488 Donkey anti-rabbit A21206 (Life Technologies)	Поглощение 488 Эмиссия 519

Продолжение таблицы 2

Мишень	Первичные АТ	Вторичные АТ	Длины волн поглощения и эмиссии (нм)
Синапсин I	Anti-synapsin-1 rabbit polyclonal ab64581 (ABCAM)	Alexa FL 488 Donkey anti-rabbit A21206 (Life Technologies)	Поглощение 488 Эмиссия 519
SNAP-25	Anti-SNAP-25 goat polyclonal ab31281 (ABCAM)	Alexa FL 647 Donkey anti-goat A21447 (Life Technologies)	Поглощение 647 Эмиссия 670

6. Полученные изображения анализировались в программе Imagej Fiji – специальной программе с открытым кодом для анализа и обработки изображений в биомедицинских исследованиях [140]. В ходе анализа полученных изображений каждый синапс в каждом цветовом канале выделялся вручную. Программа производила автоматический расчет уровня флуоресценции синаптической области с поправкой на фоновую флуоресценцию – рассчитывалось среднее значение серого (Mean gray value) пикселей, интенсивность которых была выше фоновой в выделенной области. Также определялась площадь области свечения в синаптической зоне (Area). Интенсивность флуоресценции выражалась в относительных единицах, площадь области свечения – в μm^2 . С помощью плагина JACoP измерялась ко-локализация иммунофлуоресценции пре- и постсинаптической мембраны путем оценки степени наложения областей иммуноэкспрессии SYP и nAChR при помощи коэффициента Мандэрса [196]. При этом высчитывался коэффициент M1 (доля площади свечения nAChR, перекрытая свечением SYP) и M2 (доля площади свечения SYP, перекрытая свечением nAChR).

Данный протокол позволяет визуализировать пре- и постсинаптическую мембрану НМС скелетной мышцы, что ранее было подтверждено при

иммунофлуоресцентном исследовании синаптических белков нервно-мышечного синапса локтевой мышцы пациента с бульбарной формой БАС 3 стадии (Рисунок 1; не опубликованные данные).

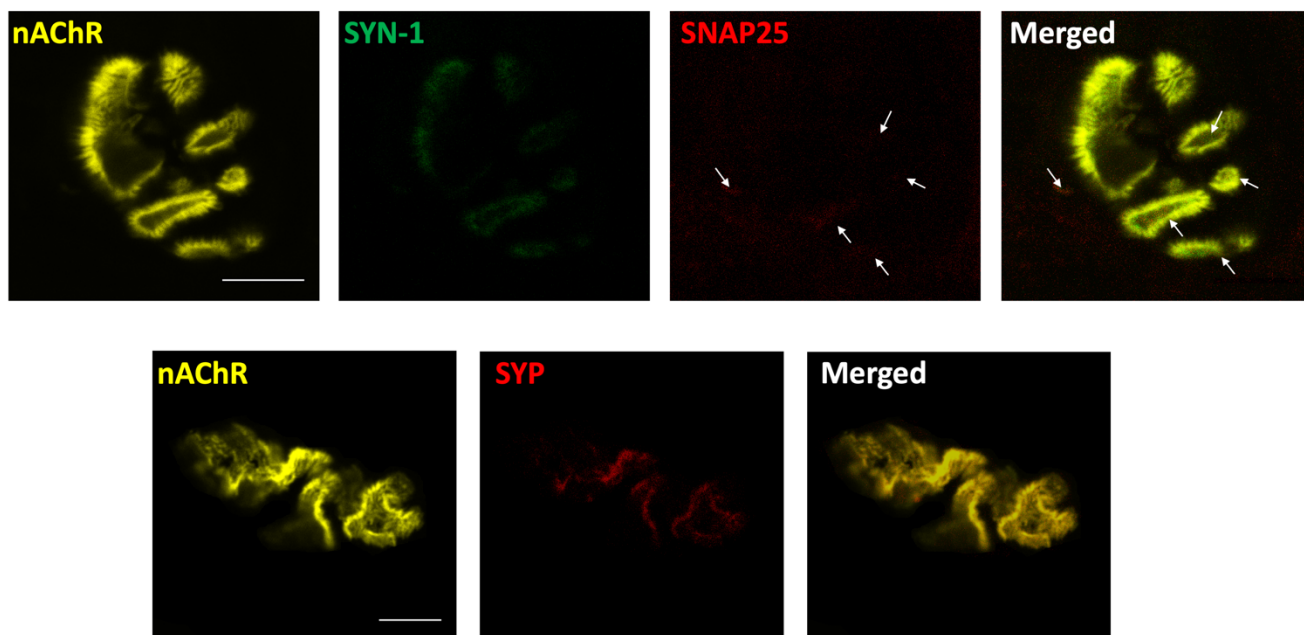


Рисунок 1 – Репрезентативные изображения нервно-мышечных синапсов локтевой мышцы пациента с установленным диагнозом БАС (женщина, 66 лет, БАС бульбарная форма, 3 стадия). nAChR – н-холинорецепторы, SYN-1 – синапсин I, SYP – синаптофизин, Merged – объединенное изображение. Стрелками указаны области экспрессии SNAP-25. Отмечается фрагментация нервно-мышечного синапса, слабый сигнал в канале синапсина-1 и почти полное отсутствие сигнала в канале SNAP-25. Шкала – 10 мкм. (Из личного архива автора).

2.2.4. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с применением программы «OriginPro 8» (OriginLab Corporation). С помощью критерия Шапиро-Уилка проверялась нормальность распределения количественных значений. Полученные данные активности АХЭ и экспрессии синаптических белков не подчинялись нормальному распределению. Значимость различий между выборками оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни и

Н-критерия Краскела-Уоллиса. Данные по экспрессии синаптических белков в тексте и таблицах представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки ($\text{Mean} \pm \text{SE}$), клинико-демографические данные участников исследования и данные активности АХЭ представлены в виде медианы, 1-го и 3-го квартилей (Me [Q1; Q3]). При помощи коэффициента Спирмена рассчитывалась корреляционная связь между показателями. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Клиническая характеристика пациентов с боковым амиотрофическим склерозом

В исследовании приняло участие 17 пациентов с диагностированным БАС, установленным в соответствии с пересмотренными критериями El Escorial (Таблица 3) [126]. Возраст пациентов составлял от 31 до 71 года (Me 65 [61; 66]). Среди пациентов было 6 мужчин и 11 женщин. В соответствии с диагностическими критериями у 7 пациентов (41,19%) был установлен диагноз «клинически достоверный БАС», у 5 пациентов (29,4%) – «клинически вероятный БАС», у 2 пациентов (11,76%) – «клинически вероятный – лабораторно подтвержденный БАС», у 3 пациентов (17,65%) – «возможный БАС».

Таблица 3 – Клиническая характеристика пациентов с БАС

Клиническая характеристика	Значение
El-Escorial-revisited, n (%)	
Клинически достоверный БАС	- 7 (41,19)
Клинически вероятный БАС	- 5 (29,4)
Клинически вероятный- лабораторно подтвержденный БАС	- 2 (11,76)
Клинически возможный БАС	- 3 (17,65)
Возраст, г. Me [Q1; Q3]	65 [61; 66]
Мужчины, n (%)	6 (35,3)
Длительность болезни от первых симптомов, мес. Me [Q1; Q3]	10 [6; 18]

Продолжение таблицы 3

Клиническая характеристика	Значение
Клинические формы (по Хондариан), n (%)	- 6 (35,3)
Бульбарная форма БАС	- 11 (64,7)
Спинальная форма БАС (шейно-грудная и пояснично-крестцовая формы)	
Вариант БАС, n (%)	
Классическая вариант БАС	- 12 (70,6)
Преимущественное поражение ВМН/ПБС	- 2 (11,8)
Преимущественное поражение НМН/ПМА	- 3 (17,6)
ALSFRS-R, Ме [Q1; Q3]	40 [34; 43]
Темп прогрессирования БАС балл/мес. Ме [Q1; Q3]	0,83 [0,45; 1,22]
Стадия БАС по King's, n (%)	
1	4 (23,5)
2В	6 (35,3)
3	7 (41,2)

Примечания. ВМН – верхний мотонейрон, НМН – нижний мотонейрон, ПБС – первичный боковой склероз, ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия.

На момент начала исследования длительность заболевания составляла от 3 до 60 мес. (Ме 10 мес. [6; 18]). Тяжесть заболевания по шкале ALSFRS-R варьировала от 27 до 46 баллов (Ме 40 [34; 43]). Скорость прогрессирования БАС

у пациентов составляла от 0,067 до 1,91 балла в месяц (Me 0,83 [0,45; 1,22]). У 4 пациентов (23,5%) наблюдался медленный темп прогрессирования (<0,4 балла/мес), у 2 пациентов (11,8%) – быстрый темп прогрессирования (>1,4 балла/мес), у 11 пациентов (64,7%) – умеренный темп.

Согласно системе стадирования King's стадия заболевания определялась по функциональному вовлечению (слабость, гипотрофия, спастичность, дизартрия, дисфагия) регионов цереброспинальной оси. У 7 пациентов (41,2%) была определена 3 стадия. У данных пациентов поражение выявлялось на трех уровнях. У 6 пациентов (35,3%) поражение выявлялось на 2 уровнях цереброспинальной оси, что соответствовало 2В стадии. У 4 пациентов (23,5%) была определена 1 стадия БАС, что соответствовало поражению одного уровня. В исследовании не принимали участие пациенты со стадией 4А или 4В согласно критериям невключения (необходимость в гастростоме или НИВЛ/ИВЛ).

Согласно системе стадирования MiToS, у 7 пациентов (41,2%) была определена 0 стадия (данные пациенты на момент осмотра сохраняли самостоятельность во всех сферах шкалы ALSFRS-R), у 9 пациентов (52,9%) - 1 стадия (у 7 пациентов потеря самостоятельности в передвижении и уходе за собой, у 1 пациента – потеря самостоятельности в сфере речи, у 1 пациента – в сфере глотания), у 1 пациента (5,9%) 2 стадия (потеря самостоятельности в сфере передвижения и речи).

У пациентов отмечалось достаточное разнообразие клинических проявлений БАС, включая первые проявления заболевания, распространение симптомов вдоль цереброспинальной оси, комбинацию признаков поражения ВМН и НМН, длительность болезни, темпы прогрессирования, степень тяжести заболевания (Рисунок 2).

Большинство пациентов страдало классической формой БАС (12 пациентов, 70,6%), то есть у данных пациентов при обследовании выявлялись клинические признаки поражения мотонейронов головного и спинного мозга.

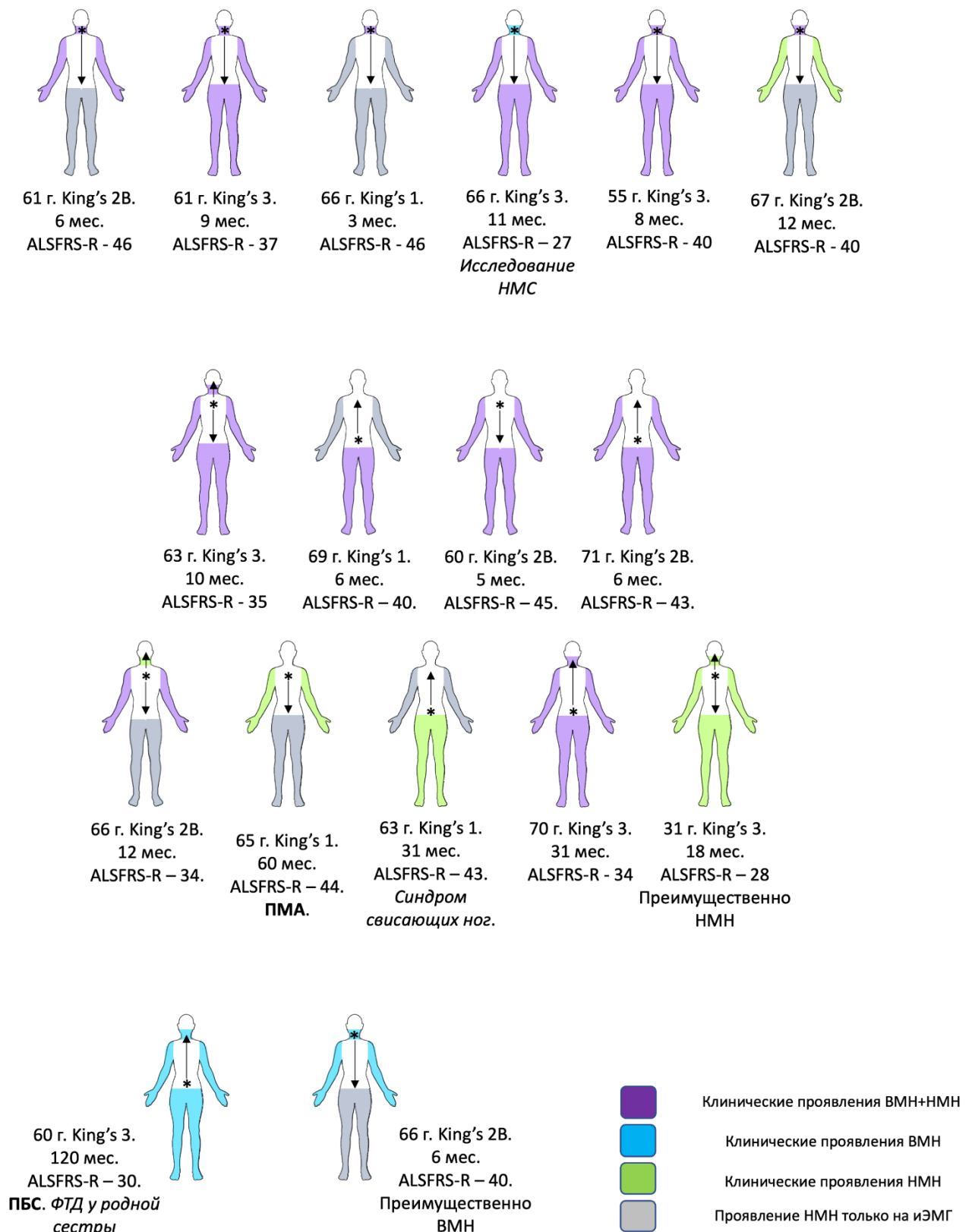


Рисунок 2 – Фенотипическая вариабельность пациентов с БАС. Отмечены возраст пациентов, стадия по King's, длительность болезни, тяжесть заболевания по ALSFRS-R. * - уровень дебюта заболевания. Верхний ряд – пациенты с бульбарной

формой БАС, средний ряд – пациенты со спинальной формой БАС, нижний ряд – отдельно выделены пациенты с преимущественным поражением ВМН. ВМН – верхний мотонейрон, НМН – нижний мотонейрон, ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия, ПБС – первичный боковой склероз, ФТД – фронто-темпоральная дегенерация.

У двух пациентов с классическим вариантом БАС было выявлено расширение центрального канала спинного мозга (Рисунок 3) фото больного в динамике. Клинически у пациентов выявлялись признаки поражения ВМН и НМН. Признаки НМН включали выраженные амиотрофии и фасцикуляции. У пациентов не было выявлено каких-либо проводниковых нарушений на уровне расширения канала и ниже, а также сегментарных нарушений на этом уровне (за исключением признаков поражения НМН, характерные для БАС). При этом признаки НМН выходили за границы сегментов гидромиелии. Таким образом, гидромиелия была расценена как признак атрофии спинного мозга вследствие дегенерации мотонейронов передних рогов. У одного пациента гидромиелия в грудном отделе спинного мозга была выявлена в дебюте заболевания, и изначально была интерпретирована как сирингомиелия и причина мышечной слабости в дебюте [79].

У 2-х пациентов форма заболевания была интерпретирована как БАС с преимущественным поражением НМН, у одного из которых был диагностирован синдром свисающих ног [337]. У второго пациента клиническая картина не соответствовала критериям синдрома свисающих рук в полной мере: у пациента в течение 12 месяцев от начала болезни появилась мышечная слабость и амиотрофии в нижних конечностях [220]. У одного пациента была диагностирована прогрессирующая мышечная атрофия, у которого на протяжении 5 лет от начала болезни отсутствовали признаки поражения ВМН.

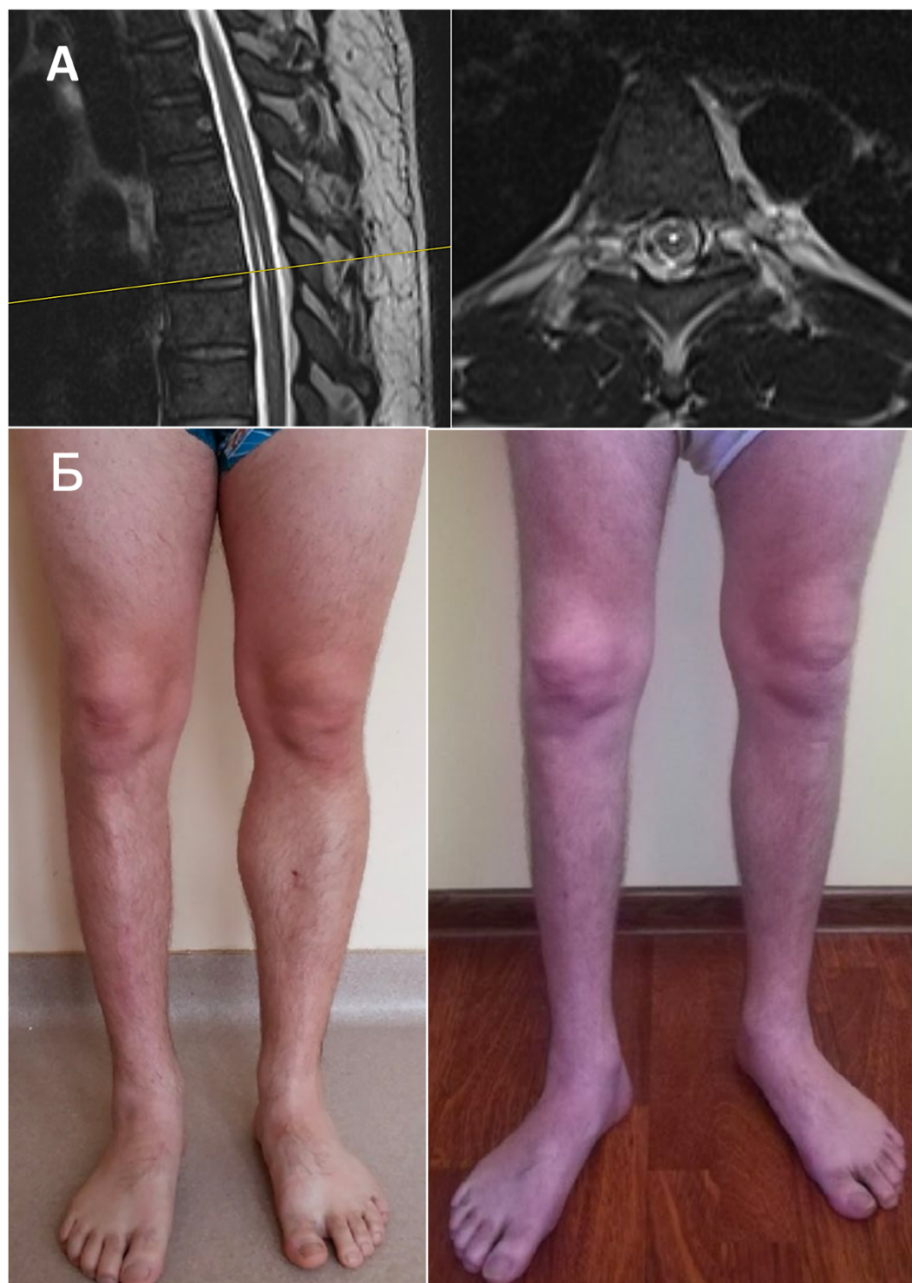


Рисунок 3 – Пациент с БАС и гидромиелией. А – МРТ, T2-взвешенные изображения, расширение центрального канала спинного мозга на уровне сегментов Th3 – Th9. Мальформации Киари или других экстрамедуллярных факторов развития сирингомиелии выявлено не было. Б – Прогрессирующие амиотрофии мышц нижних конечностей в динамическом наблюдении (разница 4 года).

Также один пациент страдал первичным боковым склерозом, у которого на протяжении 5 лет прогрессировали клинические признаки вовлечения верхнего мотонейрона, а методом иЭМГ были выявлены незначительные признаки

хронической денервации в виде увеличения амплитуды и длительности ПДЕ без потенциалов фибрилляций, фасцикуляций и острых волн. БАС с преимущественным поражением ВМН был выставлен также одному пациенту. У пациентов с синдромом свисающих ног, ПМА и ПБС отмечалось наиболее доброкачественное течение, что соответствует литературным данным [337].

У 6 пациентов (35,3%) болезнь начиналась с поражения бульбарного отдела (бульбарная форма БАС), что также соответствует литературным данным. У 11 пациентов (64,7%) болезнь была классифицирована как спинальная форма БАС, так как первые симптомы затрагивали шейно-грудной или пояснично-крестцовый уровень цереброспинальной оси [55].

Ни один пациент не получал рекомендованное при БАС лечение рилузолем, эдаваоном, а также ботулинотерапию для лечения гиперсаливации. Данные с показателями активности АХЭ в плазме и слюне, длительности, тяжести и стадии БАС по каждому пациенту представлены в Таблице 4.

Все первичные данные по измерениям АХЭ в плазме крови и слюне во всех трех группах исследуемых представлены в Приложении Б и В.

Таблица 4 – Клинико-лабораторные данные пациентов с БАС

Пациент	АХЭ плазмы	АХЭ слюны	Возраст	Длительность болезни (мес)	ALSF RS-r	Темп прогрессирования	Kin g's	MiT oS	Фенотип
1	0,91 53	0,05 104	61	6	46	0,3	2В	0	БАС БФ
2	0,71 2	0,01 257	63	10	35	1,3	3	1	БАС СФ
3	0,94 34	0,02 035	69	6	40	1,33	1	1	БАС СФ
4	0,84 02	0,17 868	60	120	30	0,15	3	2	ПБС

Продолжение таблицы 4

Пациент	АХЭ плазмы	АХЭ слюны	Возраст	Длительность болезни (мес)	ALSF RS-r	Темп прогрессирования	Kin g's	MiT oS	Фенотип
5	0,39 72	0,07 882	61	9	37	1,22	3	0	БАС БФ
6	0,28 63	0,02 888	60	5	45	0,6	2В	0	БАС СФ
7	0,11 57	0,06 777	66	3	46	0,6	1	0	БАС БФ
8	0,09 5	0,00 868	71	6	43	0,83	2В	1	БАС СФ
9	-	0,01 012	66	12	34	1,17	2В	1	БАС СФ
10	0,66 96	0,01 338	65	60	44	0,07	1	0	ПМА СФ
11	0,83 9	0,42 135	66	11	27	1,91	3	1	БАС БФ
12	0,15 72	0,01 133	55	8	40	1,0	3	0	БАС БФ
13	0,70 49	0,19 745	67	12	40	0,67	2В	1	БАС БФ
14	0,28 28	0,03 057	63	31	43	0,16	1	0	БАС- НМН СФ ССН
15	0,48 81	0,07 546	66	24	40	0,33	2В	1	БАС- ВМН

Продолжение таблицы 4

Пациент	АХЭ плазмы	АХЭ слюны	Возраст	Длительность болезни (мес)	ALSF RS-r	Темп прогрессирования	Kin g's	MiT oS	Фенотип
16	0,52 99	0,01 712	70	31	34	0,45	3	1	БАС СФ
17	0,54 2	0,03 591	31	18	28	1,11	3	1	БАС- НМН СФ

Примечания. БАС – классическая форма БАС, БАС-НМН – БАС с преимущественным поражением нижнего мотонейрона, БАС-ВМН – БАС с преимущественным поражением верхнего мотонейрона, БФ – бульбарная форма, СФ – спинальная форма, ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия, ПБС – первичный боковой склероз, ССН – синдром свисающих ног.

3.2. Результаты измерения активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови и слюны у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом

В ходе исследования было проведено измерение активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови и слюны методом Элмана (Таблица 5) [29, 30]. У пациента №9 в группе БАС по техническим причинам не удалось измерить активность АХЭ в плазме крови. Данные в таблице представлены в виде медианы и квартилей [Q1; Q3].

В ходе исследования медиана активности АХЭ плазмы в группе пациентов с БАС составила 0,589 U/мг белка плазмы и значимо не отличалась от значений активности АХЭ в плазме крови здорового контроля (медиана 0,607 U/мг белка плазмы, p-value 0,514). Также не было выявлено значимого отличия от значений активности АХЭ плазмы крови неврологического контроля (медиана 0,706 U/мг белка плазмы, p-value 0,63) (Рисунок 4). Между группами контроля достоверных

различий не было обнаружено (p-value 0,905).

Таблица 5 – Активность АХЭ в плазме крови и слюне в группе БАС и контролях

Группа	Активность АХЭ в плазме крови, U/мг белка плазмы	Активность АХЭ в слюне, U/мг белка слюны
Группа БАС	0,589 [0,284; 0,807] (n = 16)	0,0306 [0,013; 0,077] (n = 17)
Здоровый контроль	0,607 [0,264; 0,96] (n = 15)	0,0022 [0,0008; 0,071] (n = 14)
Неврологический контроль	0,706 [0,28; 0,767] (n = 9)	0,047 [0,0265; 0,0694] (n = 8)

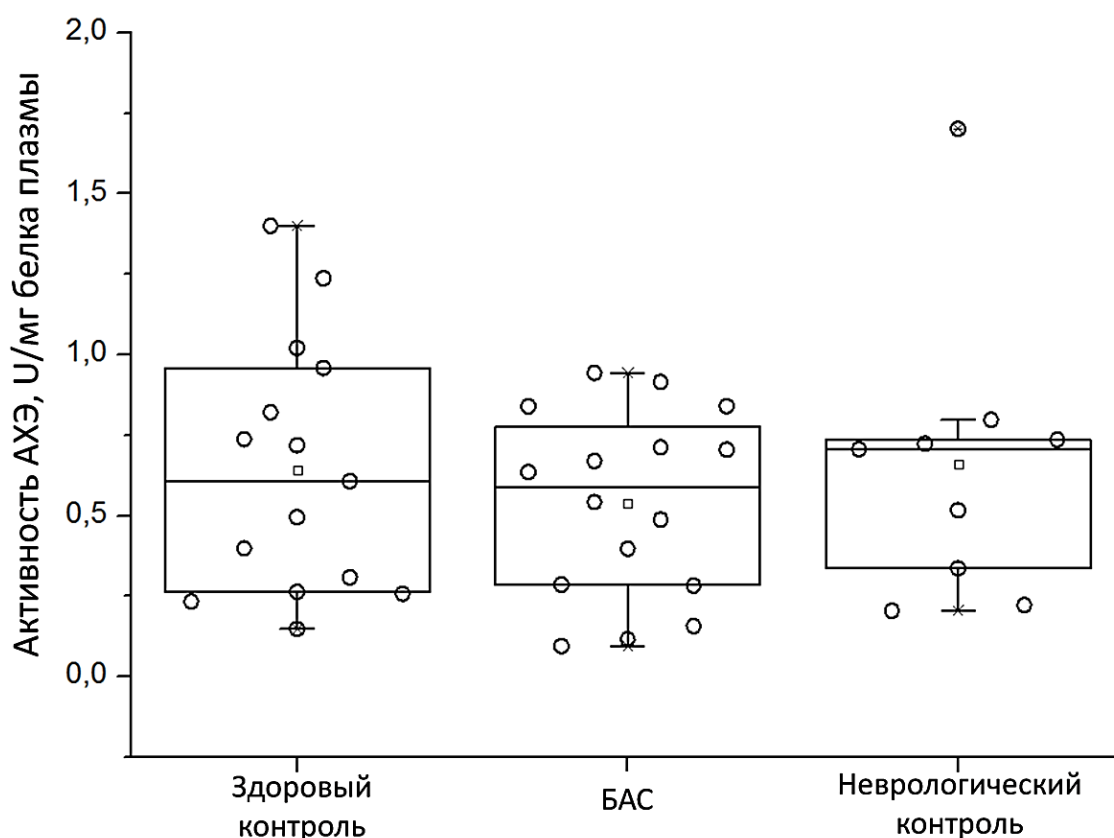


Рисунок 4 – Активность АХЭ плазмы крови. Отмечается широкая вариабельной значений активности АХЭ. U – количество микромоль ацетилтиохолина, гидролизованного в течение 1 мин в 1 мл образца плазмы.

При исследовании активности АХЭ в слюне было выявлено ее значимое повышение в сравнении со здоровым контролем (Рисунок 5). Так, в группе БАС активность слюны составила 0,0306 U/мг белка слюны. В группе здорового контроля активность АХЭ в слюне была достоверно ниже – 0,0022 U/мг белка слюны (p-value 0,0305). В группе неврологического контроля значения активности АХЭ слюны были несколько выше, чем в группе БАС, однако значимо не различались – 0,047 U/мг белка слюны (p-value 0,5047). Различия между группами контроля также были статистически незначимыми (p-value 0,16).

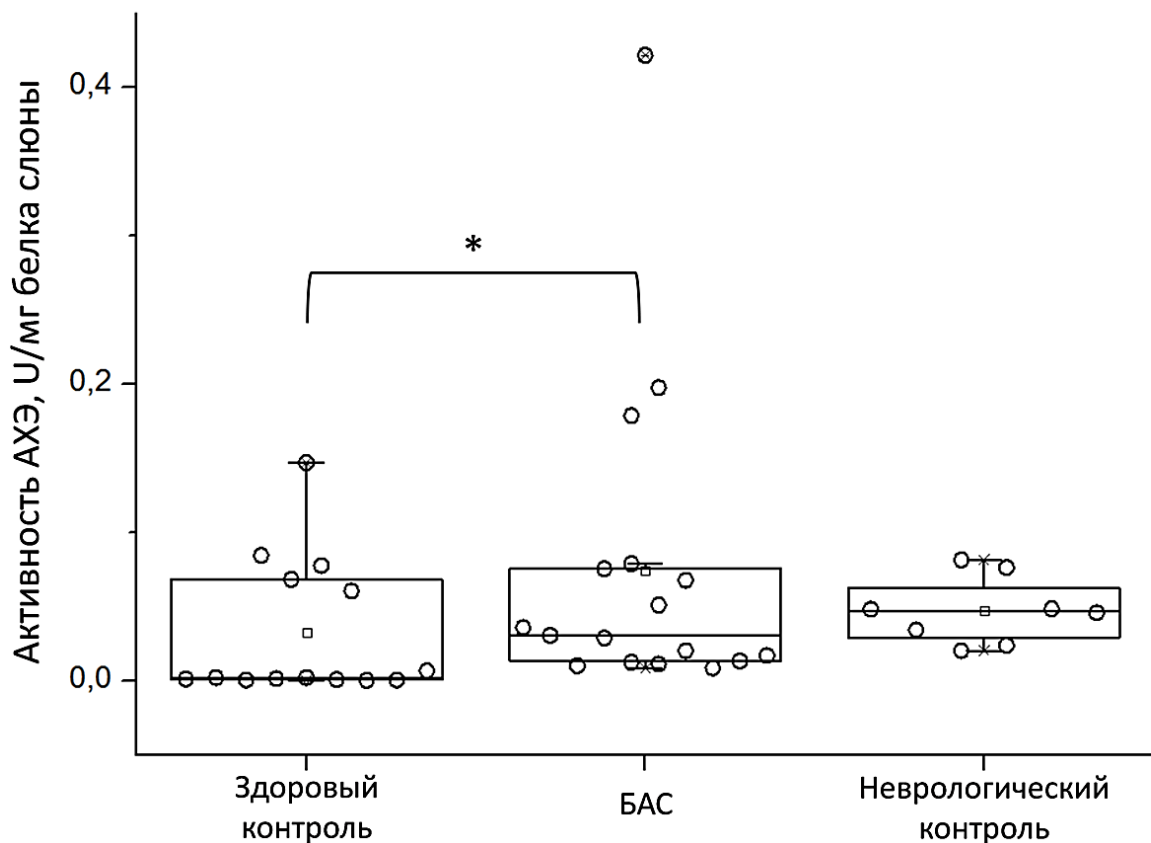


Рисунок 5 – Активность АХЭ слюны. * - p-value <0,05

Так как было выявлено значимое повышение активности АХЭ слюны у пациентов с БАС в сравнении со здоровым контролем, было решено разделить группу БАС на две подгруппы на основании формы БАС (бульбарная или спинальная) и оценить различия в активности АХЭ. Таким образом, было

сформировано уже 4 группы. В группу бульбарная форма БАС вошло 6 человек, в группу спинальная форма БАС вошло 9 человек (2 пациента с преимущественным поражением ЦМН в эти группы не вошли, так как отсутствуют клинические данные поражения периферических мотонейронов на бульбарном или спинальном уровне) Была проведена статистическая обработка данных двух подгрупп БАС (Таблица 6).

Медиана активности АХЭ плазмы у пациентов с бульбарной формой БАС составила 0,551 U/мг белка плазмы и была несколько ниже, чем у пациентов со спинальной формой БАС и групп контроля, однако значимо не различалась. При сравнении активности АХЭ слюны между четырьмя группами Н-критерий Краскела-Уоллиса составил 0,0328, что говорит о том, что группы принадлежат к разным генеральным совокупностям. Медиана активности АХЭ слюны у пациентов с бульбарной формой БАС составила 0,073 U/мг белка слюны и оказалась заметно выше, чем у других групп. Значимые различия были выявлены между группой здорового контроля и группой бульбарной формы БАС (p-value 0,035), и между подгруппами бульбарной и спинальной формы БАС (p-value 0,022) (Рисунок 6). От группы неврологического контроля значения АХЭ слюны пациентов с бульбарной формой достоверно не отличались (p-value 0,175). Таким образом, различия активности АХЭ слюны между группой БАС и здоровым контролем обусловлена за счет пациентов с бульбарной формой БАС.

Таблица 6 – Данные активности АХЭ плазмы крови и слюны в зависимости от формы БАС

АХЭ	Бульбарная форма БАС	Спинальная форма БАС	Здоровый контроль	Неврологический контроль	P*
Активность АХЭ плазмы	0,551 [0,147; 0,858]	0,589 [0,284; 0,701]	0,607 [0,264; 0,96]	0,706 [0,28; 0,767]	0,841

Продолжение таблицы 6

АХЭ	Бульбарная форма БАС	Спинальная форма БАС	Здоровый контроль	Неврологический контроль	P*
Активность АХЭ слюны	0,073 [0,041; 0,253]	0,0171 [0,0114; 0,0297]	0,002 [0,00078; 0,065]	0,047 [0,0165; 0,0694]	0,0328

Примечание. * - Н-критерий Краскела-Уоллиса

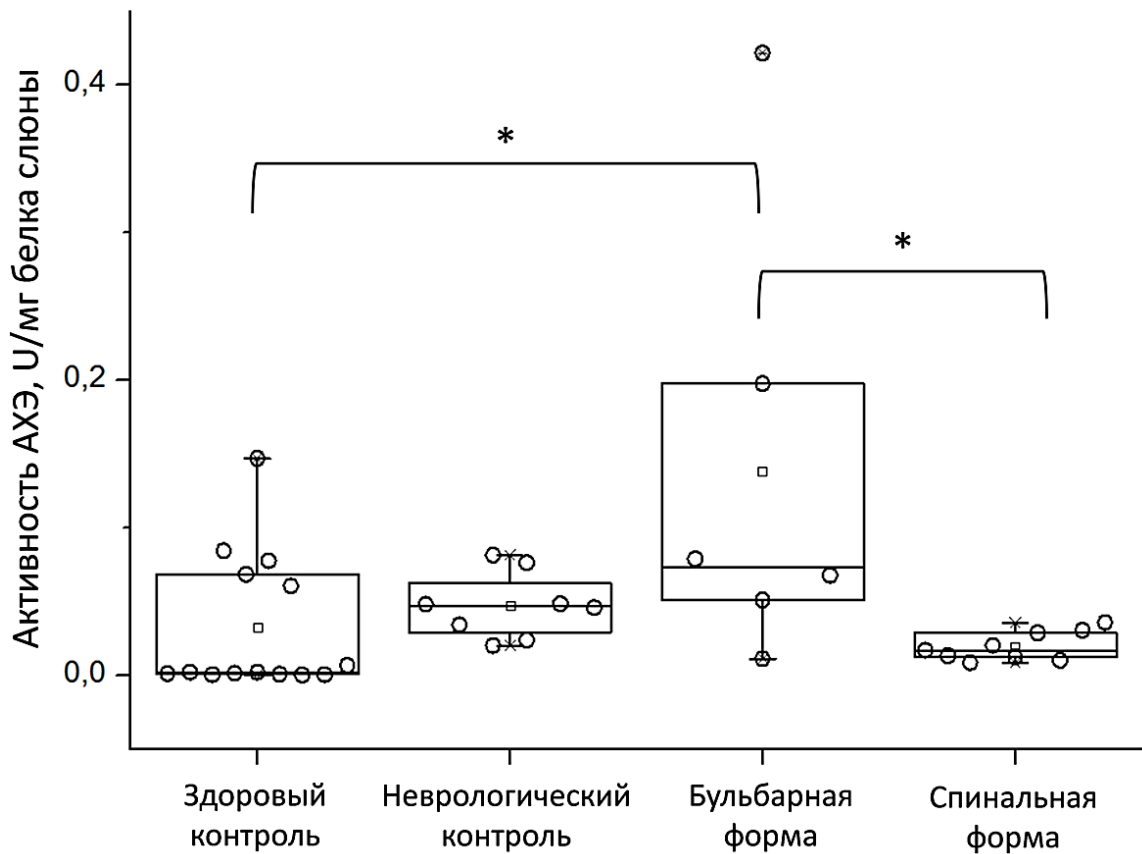


Рисунок 6 – Активность АХЭ слюны в зависимости от формы БАС. * - p-value <0,05

Далее была выполнена оценка корреляции между значениями активности АХЭ плазмы и слюны и другими измеряемыми параметрами в группе БАС: возраст, длительность болезни, темпы прогрессирования, тяжесть заболевания согласно ALSFRS-R, стадия болезни по King's и MiTos (Таблица 7). Для этого применялся

коэффициент ранговой корреляции r-Спирмена, так как значения не подчинялись нормальному распределению.

Для оценки силы связи коэффициента корреляции использовалась шкала Чеддока. Между большинством показателей не было выявлено достоверной корреляции. Умеренная сила корреляции выявлена между активностью АХЭ плазмы и тяжестью неврологического дефицита БАС по шкале ALSFRS-R, темпами прогрессирования, стадией БАС по шкале MiToS, однако корреляция оказалась не значимой ($p > 0,05$).

Таблица 7 – Корреляция активности АХЭ с измеряемыми клиническими показателями

АХЭ	АХЭ плаз мы	АХЭ слюны	Возра с т	Длите льност ь болез ни	ALS- FRS-r	Темп прогре сиров ания	King's	MiToS
АХЭ плазмы		-0,006	-0,01	0,14	-0,35	0,34	0,13	0,44
АХЭ слюны	-0,006		-0,02	-0,09	0,17	-0,13	-0,21	-0,11

В зависимости от скорости прогрессирования заболевания пациенты с БАС были поделены на 3 подгруппы. В подгруппу медленно прогрессирующий БАС попали пациенты со скоростью нарастания неврологического дефицита по шкале ALSFRS-R менее 0,4 балла в месяц ($n=4$), в подгруппу быстро прогрессирующий БАС – более 1,4 балла в месяц ($n=2$), остальные пациенты были распределены в группу умеренно прогрессирующий БАС ($n=11$) [55]. Значимых различий в активности АХЭ плазмы крови и слюны между подгруппами выявлено не было (Таблица 8).

Таблица 8 – Активность АХЭ плазмы и слюны у пациентов с разной скоростью прогрессирования БАС

АХЭ	Медленно прогрессирующий БАС (n=4)	Умеренно прогрессирующий БАС (n=11)	Быстро прогрессирующий БАС (n=2)	P*
АХЭ плазмы	0,579 [0,334; 0,854]	0,464 [0,147; 0,707]	0,8396 [0,839; 0,84]	0,236
АХЭ слюны	0,041 [0,018; 0,329]	0,0196 [0,0076; 0,079]	0,047 [0,029; 0,0656]	0,65

Примечание. * - Н-критерий Краскела-Уоллиса

Таким образом, в ходе исследования активности АХЭ плазмы крови у пациентов с БАС не было выявлено достоверных различий в сравнении с контрольными группами. Корреляции между значениями активности АХЭ плазмы и параметрами заболевания также выявлено не было. Однако было выявлено достоверное повышение активности АХЭ слюны у пациентов с БАС в сравнении со здоровыми субъектами контрольной группы. При разделении группы БАС на подгруппы в соответствии с локализацией первых симптомов болезни (бульбарное или спинальное начало БАС) выявляется достоверное повышение активности АХЭ слюны у пациентов с бульбарной формой БАС в сравнении с пациентами со спинальной формой БАС и здоровыми лицами. Однако статистически значимых различий в сравнении с неврологическим контролем не отмечается. Также не было выявлено достоверных корреляций между значениями активности АХЭ слюны и параметрами заболевания.

3.3. Результаты измерения активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза

Активность АХЭ была измерена в плазме крови FUS-трансгенных мышей и мышей дикого типа генотипа CD1 соответствующего возраста методом Элмана (Рисунок 7). Было использовано 15 трансгенных мышей на досимптомной стадии (FUS-Presymp), 9 трансгенных мышей на симптомной стадии (FUS-Symp), 15 мышей дикого типа в качестве контроля для FUS-Presymp и 10 мышей дикого типа в качестве контроля для FUS-Symp. Средний возраст FUS-Presymp мышей составил $8,57 \pm 0,13$ нед. (7,28 – 8,71), средний возраст их контроля составил $8,89 \pm 0,28$ нед. (7,42 – 9,85). Средний возраст FUS-Symp мышей составил $16,1 \pm 0,61$ нед. (14,71 – 19,57), средний возраст их контроля – $18,6 \pm 0,4$ нед. (17,14 – 19,71).

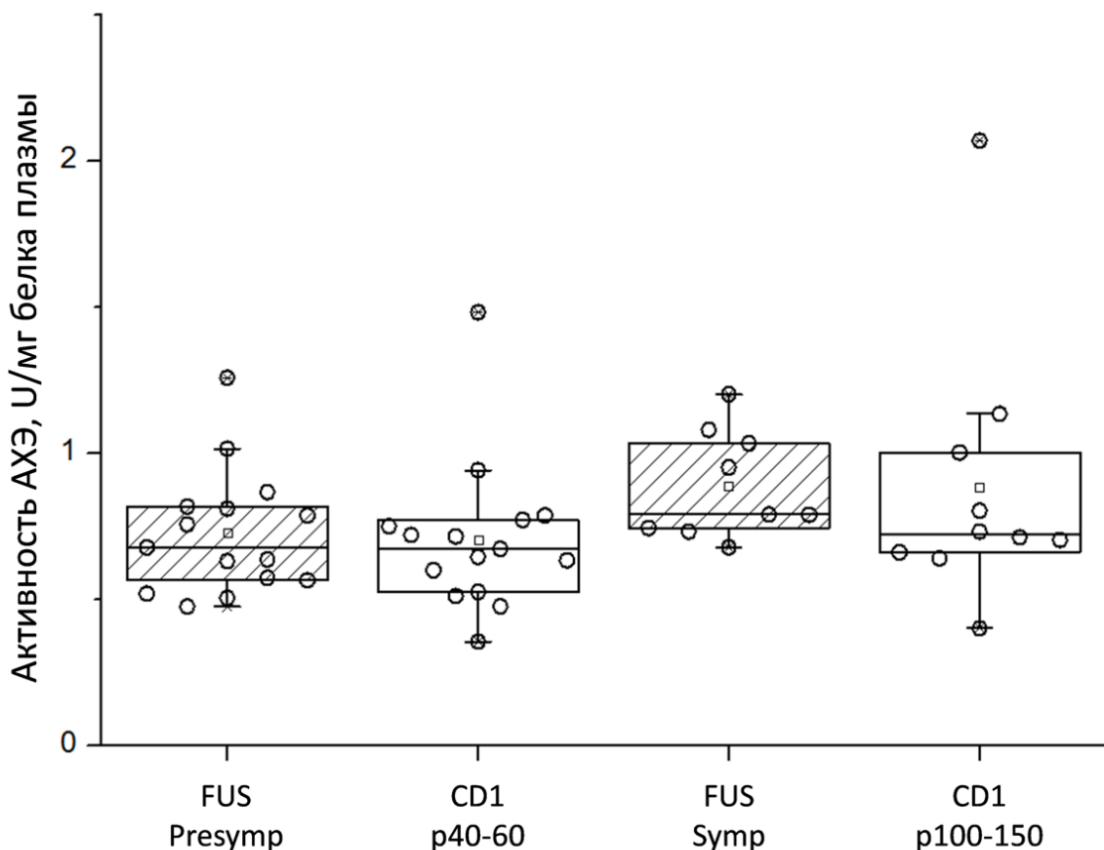


Рисунок 7 – Активность АХЭ плазмы крови трансгенных FUS-мышей и их контроля

Активность АХЭ плазмы крови для FUS-Presymp составила $0,726 \pm 0,057$ U/мг белка, для FUS-Symp – $0,889 \pm 0,065$ U/мг белка. Для мышей дикого типа

соответствующего возраста активность АХЭ плазмы составила $0,706 \pm 0,069$ и $0,886 \pm 0,154$ U/мг белка соответственно. Значимых различий между исследуемыми группами выявлено не было.

3.4. Флуоресценция ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечных синапсах диафрагмы трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза

У мышей исследование экспрессии АХЭ в НМС включало измерение интенсивности и площади флуоресценции синаптических областей, окрашенных селективным белковым токсином, конъюгированным флуорофором, Alexa647-Fasc2. Для визуализации постсинаптической мембраны все препараты окрашивались TMR-АВТ, являющимся селективным нейротоксином к nAChR, имеющим отличные от Alexa658-Fasc2 длины волн поглощения и эмиссии.

Исследование флуоресценции АХЭ проводилось на двух трансгенных моделях – mSOD и FUS. НМС диафрагмы исследовались на досимптомной стадии (mSOD1-Presymp мыши, n=5; FUS-Presymp мыши, n=5) и на симптомной стадии (mSOD1-Symp мыши, n=5; FUS-Symp мыши, n=5). В качестве контроля были использованы мыши дикого типа соответствующей генетической линии (B6SJL для mSOD1-модели и CD1 для FUS-модели, соответственно) и возраста.

После окраски НМС диафрагмы трансгенных мышей и мышей дикого типа визуализировались синапсы в виде округлых пятен в двух цветовых каналах (Рисунок 8 и 9). После обработки изображений были получены значения интенсивности и площади свечения областей, соответствующих АСhE. Количество исследованных терминалей для mSOD1-Presymp составило 100, для WT(1,5-3) - 119, для mSOD1-Symp - 269, для WT(4-8) - 82. Количество исследованных терминалей для FUS-Presymp составило 119, WT(p40-60) - 96, FUS-Symp - 127, WT(p100-150) - 92.

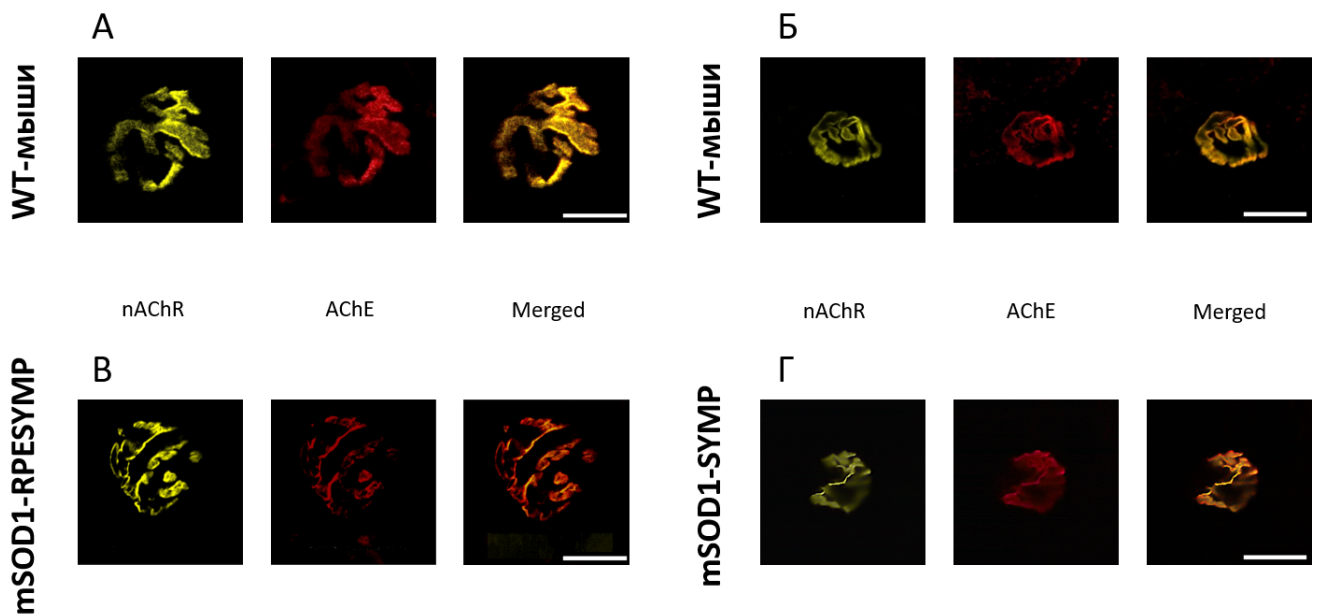


Рисунок 8 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы mSOD1-трансгенной модели на разной стадии патологии и мышечей дикого типа соответствующих возрастов. А, Б – НМС мышечей дикого типа. В – НМС mSOD1-трансгенных мышечей на досимптомной стадии, Г – НМС mSOD1-трансгенных мышечей на симптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), ацетилхолинэстеразу (AChE). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм. Отмечается снижение интенсивности флуоресценции областей AChE в mSOD1-трансгенной модели.

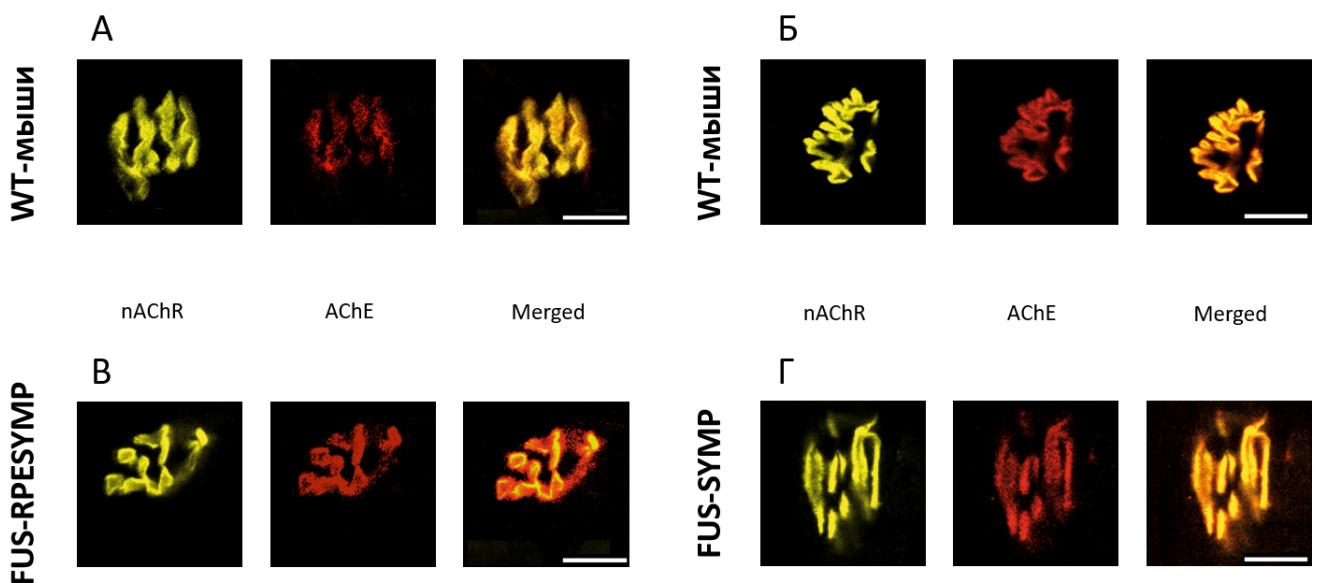


Рисунок 9 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы FUS-трансгенной модели на разной стадии патологии и мышечей дикого типа

соответствующих возрастов. А, Б – НМС мышей дикого типа. В – НМС FUS-трансгенных мышей на досимптомной стадии, Г – НМС FUS-трансгенных мышей на симптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), ацетилхолинэстеразу (AChE). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм.

У mSOD1-Presymp площадь и интенсивность свечения AChE составили $163,41 \pm 7,2$ мкм² и $16,83 \pm 0,88$ отн.ед. соответственно. У WT(1,5-3) значения площади и интенсивности свечения оказались статистически значимо выше и составили $260,64 \pm 13,26$ мкм² ($p < 0,01$) и $29,79 \pm 0,8$ отн.ед. ($p < 0,0001$) соответственно.

У mSOD1-Symp площадь и интенсивность свечения AChE составили $142,0 \pm 4,12$ мкм² и $22,79 \pm 0,67$ отн.ед. соответственно. У WT(4-8) значения площади и интенсивности свечения также оказались статистически значимо выше и составили $211,05 \pm 5,37$ мкм² ($p < 0,001$) и $29,06 \pm 1,42$ отн.ед. ($p < 0,01$) соответственно. При этом интенсивность AChE у mSOD1-Symp было достоверно выше чем у mSOD1-Presymp ($p < 0,01$). Также были выявлены изменения между мышами дикого типа разных возрастов. Так, у WT(1,5-3) площадь флуоресценции AChE была достоверно выше, чем у WT(4-8) ($p < 0,01$) (Рисунок 10, А).

У FUS-Symp мышей площадь и интенсивность свечения AChE составили $249,04 \pm 20,78$ мкм² и $18,13 \pm 1,58$ отн.ед. соответственно. У контроля соответствующего возраста площадь и интенсивность свечения AChE составили $169,52 \pm 10,72$ мкм² и $20,9 \pm 1,43$ отн.ед. соответственно. Было выявлено статистически значимо более высокие значения площади свечения AChE у FUS-Symp мышей в сравнении с контролем ($p < 0,01$). Также было выявлено достоверное различие по площади флуоресценции у FUS-мышей на разной стадии патологии. Так, у FUS-Symp отмечалось статистически значимо более высокие значения площади флуоресценции AChE, чем у FUS-Presymp ($p < 0,05$). В свою очередь, у WT(p40-60) площадь флуоресценции AChE была достоверно выше, чем у WT(p100-150) ($p < 0,01$) (Рисунок 10, Б).

Таким образом, еще на досимптомной стадии в *mSOD1*-трансгенной модели отмечается снижение экспрессии АХЭ, которое сохраняется на симптомной стадии. В *FUS*-трансгенной модели на симптомной стадии отмечается достоверное повышение экспрессии АХЭ. Также в обеих моделях был выявлен схожий паттерн в виде достоверного повышения АХЭ у симптомных мышей по сравнению с досимптомными. При этом у мышей дикого типа по мере старения отмечается достоверное снижение экспрессии АХЭ в НМС диафрагмы.

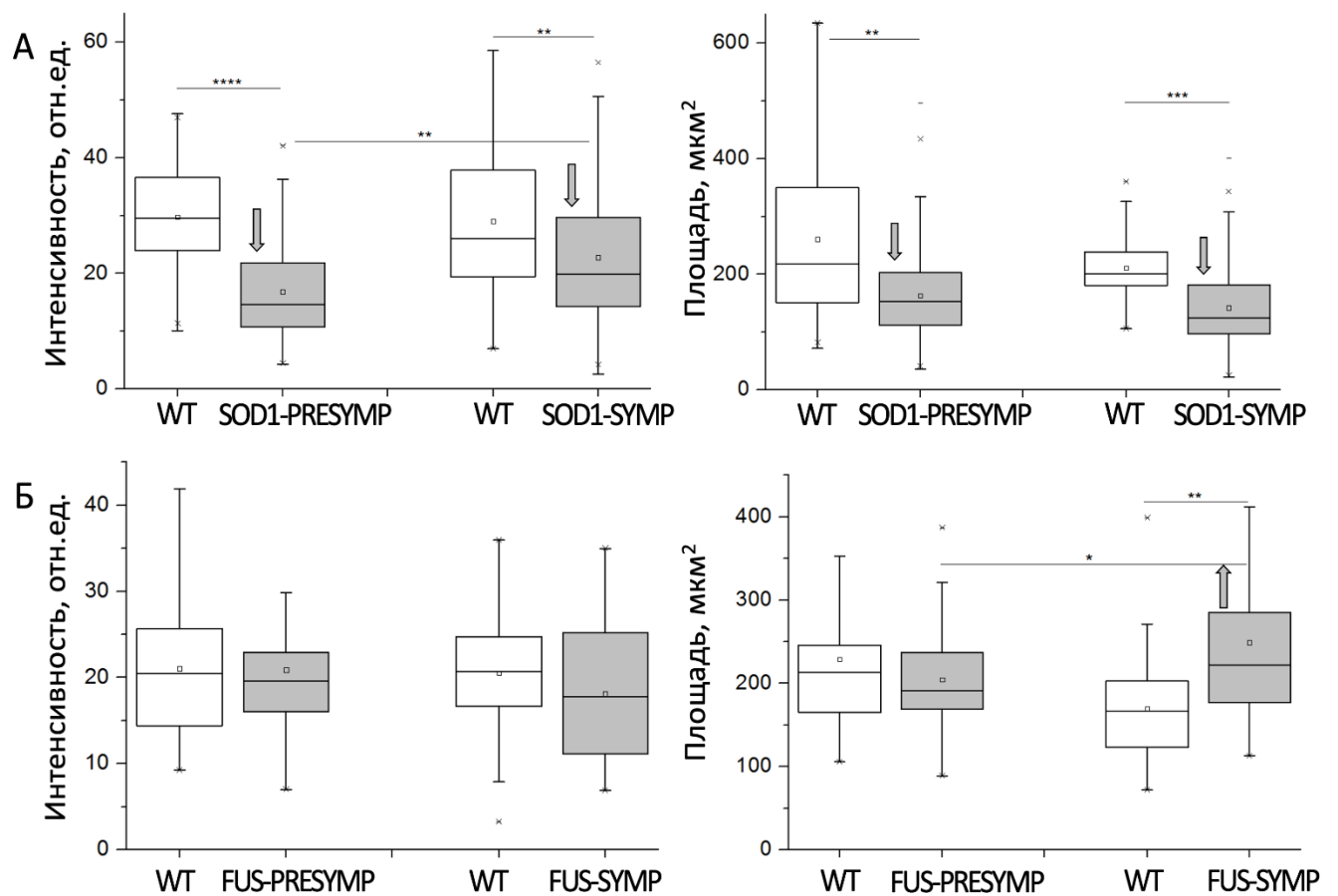


Рисунок 10 – Площадь и интенсивность флуоресценции АХЭ в НМС трансгенных моделей. А - *mSOD1*-модель. Б – *FUS*-модель. * - $p < 0,05$. ** - $p < 0,01$. *** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$.

3.5. Иммуноэкспрессия пре- и постсинаптических белков в нервно-мышечных синапсах диафрагмы трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза

У мышей исследование экспрессии синаптических белков включало измерение интенсивности и площади флюоресценции синаптических областей диафрагмальной мышцы, окрашенных специфическими антителами, помеченными флуоресцентными метками, против таких белков, как синаптофизин (SYP), синапсин I (SYN-I) и SNAP-25. Препараты диафрагмы были поделены на две группы. Первая группа окрашивалась первичными антителами к синаптофизину, вторая – первичными антителами к синапсину I и SNAP-25. Вторичные антитела к первичным имели флуоресцентные метки с разными длинами волн поглощения и эмиссии, таким образом, флуоресценция от одной метки не накладывалась на флуоресценцию другой метки в одном препарате. Для визуализации постсинаптической мембраны все препараты окрашивались TMR-ABT, являющимся селективным нейротоксином к nAChR, имеющим отличные от вторичных антител длины волн поглощения и эмиссии (см. таблицу 2).

3.5.1. Экспрессия пре- и постсинаптических белков у mSOD1-трансгенных мышей

Данная часть работы была проведена на 10 трансгенных mSOD1-мышях. НМС диафрагмы у 5 мышей исследовались на досимптомной стадии (mSOD1-Presymp мыши) и у 5 мышей на симптомной стадии (mSOD1-Symp мыши). По 5 мышей дикого типа было использовано в качестве контроля. Мыши дикого типа были той же генетической линии и соответствующего трансгенным мышам возраста.

С помощью конфокального микроскопа в препаратах диафрагмы визуализировались синапсы в виде округлых пятен в различных цветовых каналах. Обработке и анализу подвергались изображения только поверхностных синапсов,

попавших в поле зрения целиком, лежащих «горизонтально» (перпендикулярно оси объектива). После обработки изображений были получены значения интенсивности и площади свечения синапсов в трех цветовых каналах, соответствующих различным синаптическим белкам.

У mSOD1-мышей на досимптомной стадии патологии достоверных отличий значений площади и интенсивности свечения как SYP, так и nAChR от таковых у WT-мышей выявлено не было (Таблица 9, Рисунок 11).

Таблица 9 – Иммунофлуоресценция синаптических белков у трансгенных mSOD1-мышей на досимптомной стадии и их контроля

Белок	WT(3-4) Площадь	mSOD1-Presymp Площадь	P*
nAChR	83,2±5,97 мкм ² (n=71)	82,68±4,1 мкм ² (n=67)	0,83
SYP	89,47±5,2 мкм ² , (n=71)	83,76±4,24 мкм ² (n=67)	0,762
SYN-I	51,05±2,9 мкм ² (n=52)	40,06±3,02 мкм ² и (n=48)	0,0046
SNAP-25	40,3±1,62 мкм ² (n=52)	24,6±1,3 мкм ² (n=54)	1,73e-09
M1	0,70±0,02	0,68±0,04	0,623
M2	0,71±0,01	0,72±0,04	0,86
Белок	WT(3-4) Интенсивность	mSOD1-Presymp Интенсивность	P*
nAChR	59,3±3,5 отн.ед. (n=71)	54,8±1,86 отн.ед. (n=67)	0,98
SYP	97,04±2,4 отн.ед., (n=71)	90,86±2,6 отн.ед. (n=67)	0,069
SYN-I	135,12±5,98 отн.ед. (n=52)	122,17±4,8 отн.ед. (n=48)	0,074
SNAP-25	83,24±3,4 отн.ед. (n=52)	45,6±3,2 отн.ед. (n=54)	5,11e-11

Примечание. * - U-критерий Манна-Уитни. n – количество исследованных терминалей.

Достоверных отличий коэффициентов M1 и M2 у mSOD1-мышей досимптомной стадии от WT-мышей также не наблюдалось. При этом отмечалось достоверно более низкие значения площади свечения SYN-I ($p < 0,01$), и достоверно более низкие значения площади и интенсивности свечения SNAP-25 ($p < 0,0001$).

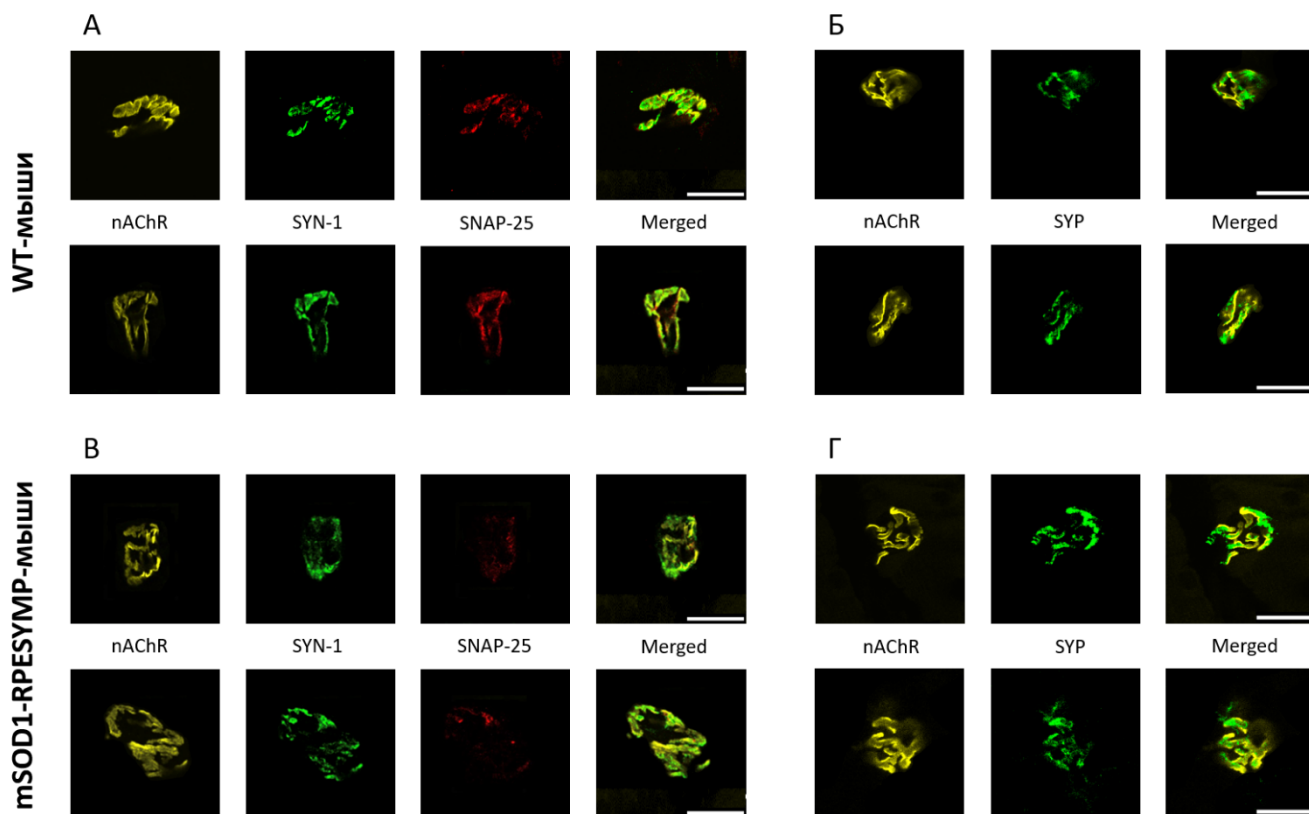


Рисунок 11 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы мышей. А, Б – НМС мышей дикого типа. В, Г – НМС mSOD1-трансгенных мышей на досимптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), синапсин I (SYN-1), SNAP-25, синаптофизин (SYP). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм. Отмечается снижение интенсивности флуоресценции SNAP-25 у трансгенных мышей.

У mSOD1-мышей уже на симптомной стадии были выявлены достоверно более низкие значения площадей и интенсивности иммуноэкспрессии синаптических белков SYN-I и SNAP-25 ($p < 0,001$), а также достоверное снижение интенсивности иммуноэкспрессии SYP ($p < 0,0001$) (Таблица 10, Рисунок 12). Также

достоверно ниже в сравнении с WT-мышами и mSOD1-мышами на досимптомной стадии оказался M2 коэффициент ко-локализации ($p < 0,05$).

Таблица 10 – Иммунофлуоресценция синаптических белков у трансгенных mSOD1-мышей на симптомной стадии и их контроля

Белок	WT(6-7) Площадь	mSOD1-Symp Площадь	P*
nAChR	80,28±5,4 мкм ² (n=72)	79,84±4,7 мкм ² (n=70)	0,97
SYP	77,73±4,7 мкм ² (n=65)	73,2±6,4 мкм ² (n=63)	0,186
SYN-I	50,84±3,5 мкм ² (n=55)	35,32±3,73 мкм ² (n=49)	2,86e-04
SNAP-25	40,0±2,0 мкм ² (n=60)	24,72±1,2 мкм ² (n=54)	3,37e-08
M1	0,65±0,028	0,63±0,05	0,84
M2	0,68±0,02	0,52±0,035	0,012
Белок	WT(6-7) Интенсивность	mSOD1-Symp Интенсивность	P*
nAChR	58,5±3,3 отн.ед. (n=72)	53,4±2,4 отн.ед. (n=70)	0,34
SYP	92,5±2,26 отн.ед. (n=65)	68,0±1,8 отн.ед. (n=63)	3,45e-09
SYN-I	135,9±6,83 отн.ед. (n=55)	100,0±5,2 отн.ед. (n=49)	8,74e-05
SNAP-25	85,05±4,26 отн.ед. (n=60)	42,3±2,73 отн.ед. (n=54)	2,45e-10

Примечание. * - U-критерий Манна-Уитни. n – количество исследованных терминалей.

Таким образом, было выявлено достоверное снижение иммунофлуоресценции исследованных пресинаптических белков в mSOD1-модели БАС. Наиболее выраженное снижение экспрессии характерно для пресинаптического белка SNAP-25, интенсивность и площадь флуоресценции которого снижается почти на 50% как на досимптомной, так и на симптомной стадии. Для синапсина I и синаптофизина характерно менее выраженное, но также достоверное снижение показателей иммунофлуоресценции на симптомной стадии.

При этом показатели флуоресценции nAChR постсинаптической мембраны достоверно не изменяются в ходе прогрессирования патологии.

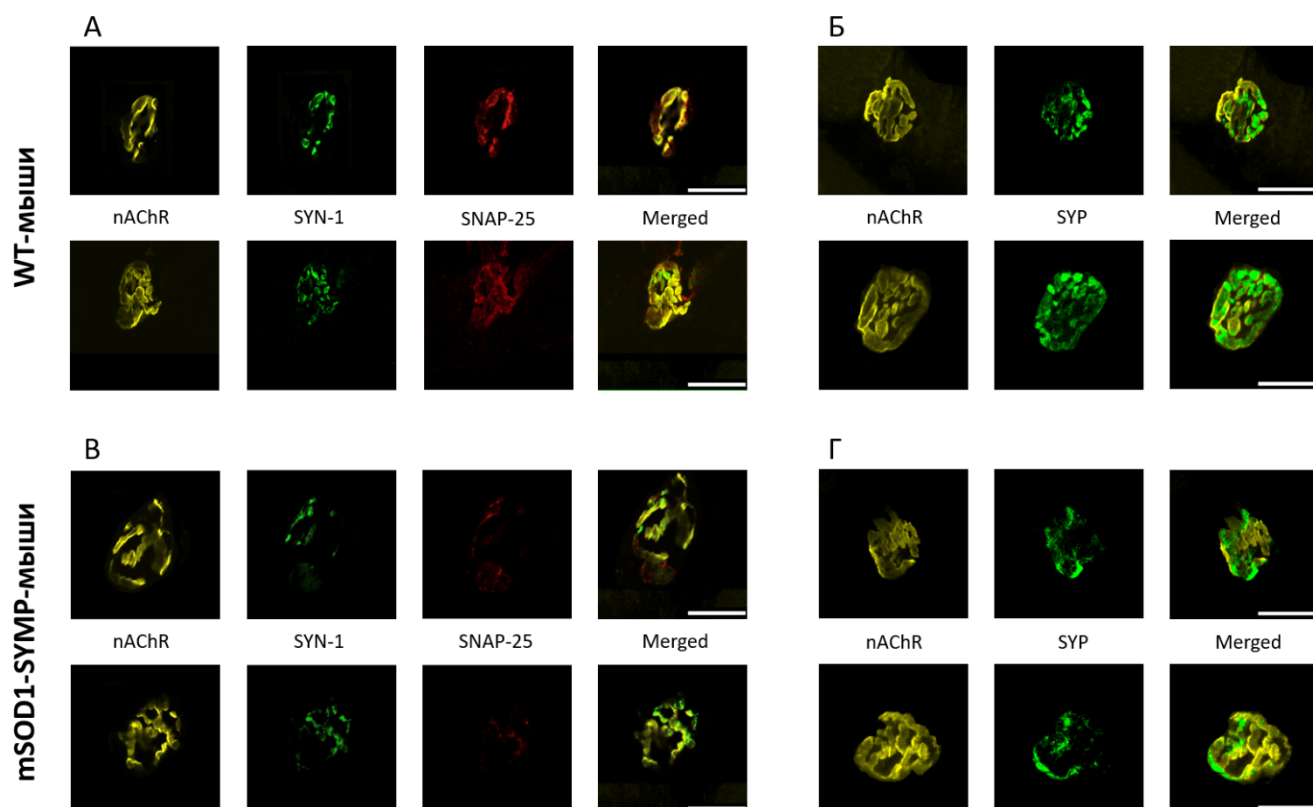


Рисунок 12 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы мышей. А, Б – НМС мышей дикого типа. В, Г – НМС mSOD1-трансгенных мышей на симптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), синапсин I (SYN-1), SNAP-25, синаптофизин (SYP). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм. Отмечается снижение интенсивности флуоресценции SNAP-25, синапсина I и синаптофизина у трансгенных мышей.

3.5.2. Экспрессия пре- и постсинаптических белков у FUS-трансгенных мышей

Данная часть работы была проведена на 10 трансгенных FUS-мышях. НМС диафрагмы у 5 мышей исследовались на досимптомной стадии (FUS-Presymp мышы) и у 5 мышей на симптомной стадии (FUS-Symp мышы). В качестве контроля были использованы мышы дикого типа той же генетической линии (CD1), по 5

соответствующего возраста для групп FUS-Presymp и FUS-Symp. У данной трансгенной модели симптомы заболевания развивались на более ранних сроках и прогрессировали быстрее, чем у mSOD1-мышей. При развитии плегии задних конечностей мыши считались симптомными и выводились из эксперимента. После окраски в препаратах диафрагмы трансгенных мышей и мышей дикого типа визуализировались синапсы в виде округлых пятен в трех цветовых каналах. После обработки изображений были получены значения интенсивности и площади свечения синапсов в каждом из цветовых каналов, соответствующих различным синаптическим белкам.

У FUS-мышей на досимптомной стадии патологии в возрасте P40-60 достоверных различий значений площади и интенсивности свечения как SYP, так и nAChR от таковых у WT-мышей того же возраста не отмечалось (Таблица 11, Рисунок 13). Достоверных отличий коэффициентов M1 и M2 у FUS-мышей на досимптомной стадии от WT-мышей также не наблюдалось. При этом отмечалось достоверно более высокие значения интенсивности и площади флуоресценции SYN-I ($p < 0,05$), а также интенсивности флуоресценции SNAP-25 ($p < 0,01$).

Таблица 11 – Иммунофлуоресценция синаптических белков у трансгенных FUS-мышей на досимптомной стадии и их контроля

Белок	WT(P40-60) Площадь	FUS-Presymp Площадь	P*
nAChR	205,98±9,19 мкм ² (n=81)	196,7±8,4 мкм ² (n=78)	0,54
SYP	117,15±5,52 мкм ² (n=73)	113,19±4,79 мкм ² (n=60)	0,88
SYN-I	80,87±6,67 мкм ² (n=63)	101,28±8,7 мкм ² (n=47)	0,03
SNAP-25	89,51±6,3 мкм ² (n=52)	78,75±7,02 мкм ² (n=51)	0,19
M1	0,55±0,13	0,51±0,013	0,362
M2	0,32±0,7	0,36±0,09	0,208

Продолжение Таблицы 11

Белок	WT(P40-60) Интенсивность	FUS-Presymp Интенсивность	P*
nAChR	91,6±3,85 отн.ед. (n=81)	98,17±3,67 отн.ед. (n=78)	0,55
SYP	94,65±4,97 отн.ед., (n=73)	107,39±5,3 отн.ед. (n=60)	0,102
SYN-I	115,99±4,4 отн.ед. (n=63)	130,16±4,76 отн.ед. (n=47)	0,027
SNAP-25	51,28±4,2 отн.ед. (n=52)	63,22±3,72 отн.ед. (n=51)	0,0048

Примечание. * - U-критерий Манна-Уитни. n – количество исследованных терминалей

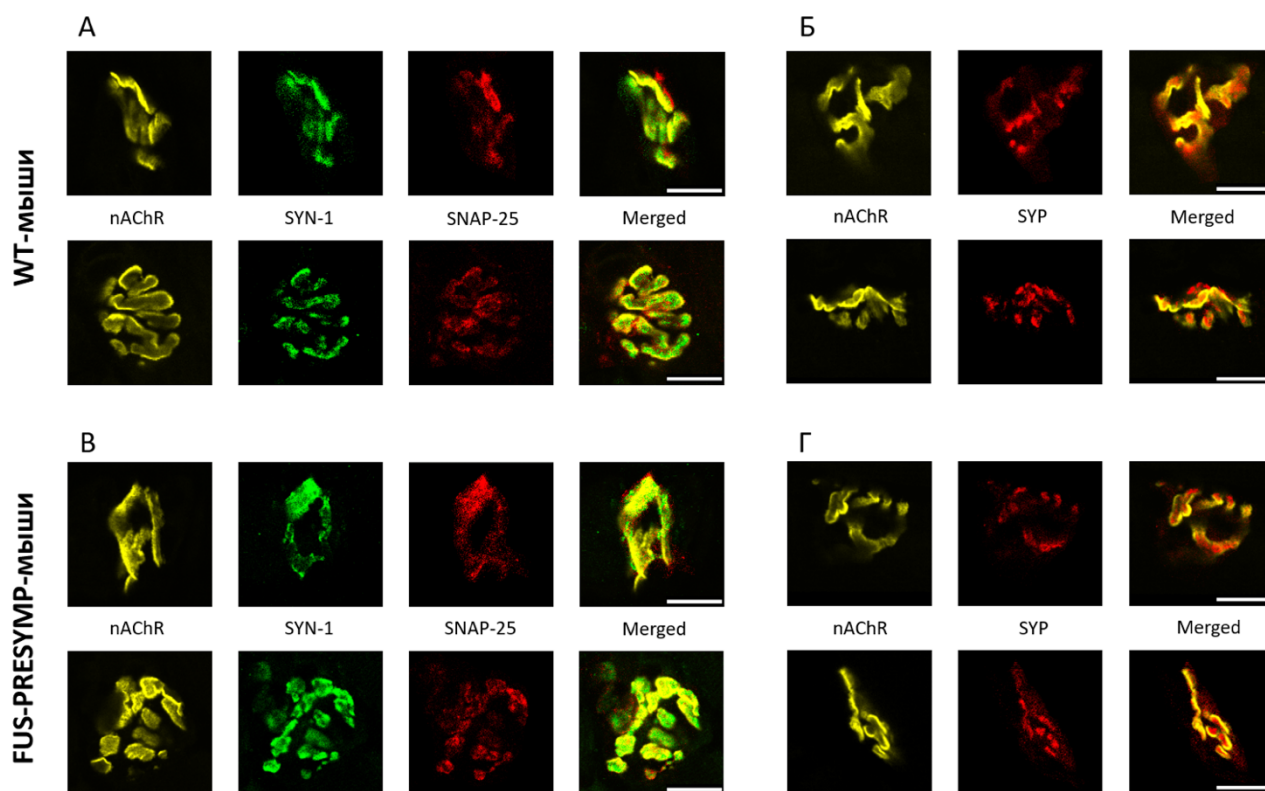


Рисунок 13 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы мышцей. А, Б – НМС мышцей дикого типа. В, Г – НМС FUS-трансгенных мышцей на досимптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), синапсин I (SYN-1), SNAP-25, синаптофизин (SYP). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм.

У FUS-мышей на симптомной стадии в возрасте P100-150 в сравнении с WT-мышцами того же возраста отмечались достоверно более низкие значения площади флуоресценции nAChR ($p < 0,05$), а также SYP и SYN-I ($p < 0,01$) (Таблица 12, Рисунок 14). От WT-мышей у FUS-мышей отмечалось достоверно более низкие значения интенсивности флуоресценции SYP ($p < 0,01$), SNAP-25 ($p < 0,001$), а также SYN-I ($p < 0,0001$). Коэффициент ко-локализации M1 также оказался достоверно ниже в сравнении с контролем.

Таблица 12 – Иммунофлуоресценция синаптических белков у трансгенных FUS-мышей на симптомной стадии и их контроля

Белок	WT(P100-150) Площадь	FUS-Symp Площадь	P*
nAChR	189,43±8,3 мкм ² (n=80)	145,16±7,58 мкм ² (n=72)	0,037
SYP	118,31±10,8 мкм ² (n=60)	80,08±7,58 мкм ² (n=66)	0,0024
SYN-I	83,13±5,8 мкм ² (n=68)	67,29±3,53 мкм ² (n=80)	0,0074
SNAP-25	72,46±5,73 мкм ² (n=60)	66,15±4,86 мкм ² (n=61)	0,28
M1	0,49±0,13	0,35±0,12	0,067
M2	0,32±0,06	0,22±0,08	0,024
Белок	WT(P100-150) Интенсивность	FUS-Symp Интенсивность	P*
nAChR	73,79±3,13 отн.ед. (n=80)	77,41±3,46 отн.ед. (n=72)	0,503
SYP	107,75±6,76 отн.ед. (n=60)	82,57±5,58 отн.ед. (n=66)	0,0019
SYN-I	114,46±5,95 отн.ед. (n=68)	76,89±3,85 отн.ед. (n=80)	1,04e-05
SNAP-25	63,64±6,34 отн.ед. (n=60)	48,67±3,27 отн.ед. (n=61)	0,00026

Примечание. * - U-критерий Манна-Уитни. n – количество исследованных терминалей.

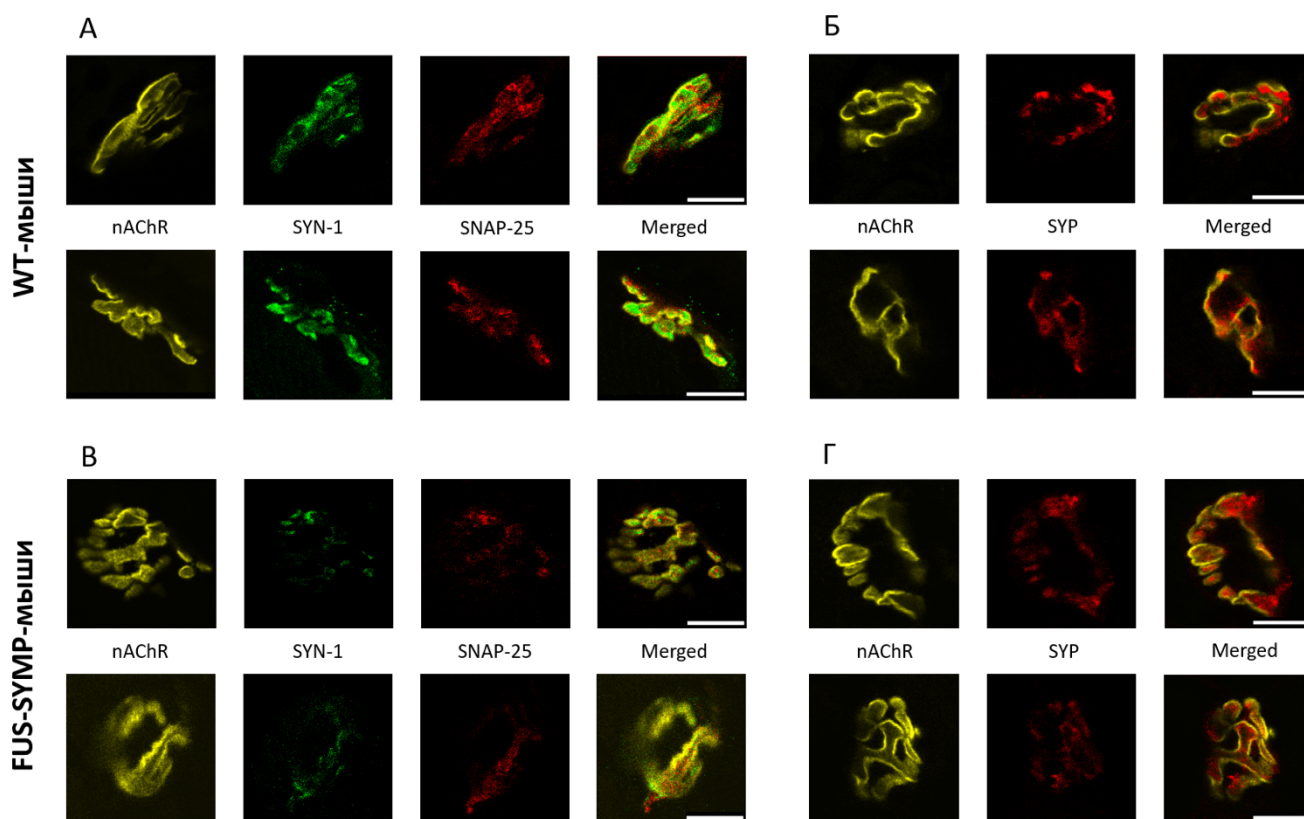


Рисунок 14 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы мышеч. А, Б – НМС мышеч дикого типа. В, Г – НМС FUS-трансгенных мышеч на симптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), синапсин I (SYN-1), SNAP-25, синаптофизин (SYP). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм. Отмечается снижение интенсивности флуоресценции SNAP-25, синапсина I и синаптофизина у трансгенных мышеч.

У FUS-трансгенных мышеч на досимптомной и симптомной стадии отмечается разнонаправленное изменение иммунофлуоресценции исследованных синаптических белков. На досимптомной стадии было выявлено достоверное повышение показателей иммунофлуоресценции синапсина I и SNAP-25, в то время как на симптомной стадии было выявлено достоверное снижение экспрессии всех исследованных пресинаптических синаптических белков. Также на симптомной стадии было выявлено снижение площади флуоресценции nAChR постсинаптической мембраны у FUS-трансгенных мышеч, что не наблюдалось в mSOD1-модели.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

За все время исследований механизмов патогенеза БАС было получено большое количество данных в подтверждение как «нисходящей», так и «восходящей» гипотез развития болезни [35, 51, 125, 224, 259]. Суммируя все данные, можно предположить, что при БАС одновременно и, возможно, независимо друг от друга протекают процессы в рамках обеих гипотез. Развитие нервно-мышечной синаптической дисфункции и дегенерации НМС на сегодняшний день признается самостоятельным и одним из ранних этапов патогенеза БАС [94, 224]. Работы по изучению развития нарушений синаптической передачи и деструкции НМС включали в себя электрофизиологические и морфологические методы исследования. К настоящему времени такие работы были проведены на образцах, полученных от пациентов, а также на многих моделях БАС, включавших в себя различные варианты SOD1-, FUS-, TDP-43- и C9orf72-трансгенных животных [46, 112, 128, 172, 224]. Несмотря на это, молекулярные механизмы развития нервно-мышечной синаптической дисфункции остаются до конца не изученными.

Настоящее исследование объединяет изучение молекулярных механизмов дисфункции НМС через оценку экспрессии синаптических белков, вовлеченных в процессы секреции, рецепции и гидролиза АХ, и возможности применения АХЭ как маркера поражения НМС и ДЕ при БАС с возможностью транслирования полученных данных на пациентов. Исследование и внедрение биомаркеров БАС в клинической и научной практике имеет большое значение и является актуальной проблемой [21, 334].

В настоящей работе было проведено комплексное исследование экспрессии ряда синаптических белков с использованием флуоресцентной микроскопии, участвующих в нервно-мышечной передаче, на досимптомной и симптомной стадиях патологии в двух трансгенных моделях бокового амиотрофического склероза.

К настоящему времени в работах с использованием электрофизиологических методов исследования было показано раннее развитие синаптической дисфункции

при БАС, которая проявляется в виде изменений амплитуд и частоты МПКП, квантового состава, скорости рециклирования синаптических везикул [102, 115, 117, 119, 206, 227, 323]. Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод о том, что в НМС при БАС нарушается функционирование ряда белков, вовлеченных в процессы циркуляции, докинга, слияния и экзоцитоза синаптических везикул. К данным белкам относятся синапсин I, синаптофизин и SNAP-25, экспрессия которых была исследована в настоящей работе. В предыдущих работах по изучению НМС при БАС в качестве морфологических коррелятов поражения НМС использовались белки SV2, нейрофиламент и S100, которые отражали морфологическое состояние нервной терминали (денервация, спрутинг, полииннервация) и перисинаптических Шванновских клеток [74, 254, 283, 323].

В данной работе экспрессия синаптических белков оценивалась путем измерения показателей их флуоресценции. Для этого были использованы первичные и вторичные антитела с флуоресцентными метками для SNAP-25, синапсина I и синаптофизина, а также белковые токсины с флуоресцентными метками, специфично связывающиеся с АХЭ и н-ацетилхолиновыми рецепторами. Таким образом, была проведена оценка экспрессии данных белков в сохраненных НМС.

В ходе исследования экспрессии синаптических белков в НМС mSOD1-мышей на досимптомной стадии было выявлено достоверное снижение площади и интенсивности флуоресценции SNAP-25 и площади флуоресценции синапсина I. На симптомной стадии было выявлено достоверное снижение площади и интенсивности флуоресценции SNAP-25 и синапсина I, а также площади флуоресценции синаптофизина, что свидетельствует о сниженной экспрессии данных белков в пресинаптической мембране НМС. Из трех исследованных пресинаптических белков, у SNAP-25 отмечалось более грубое снижение экспрессии (~ на 45% и 50% на досимптомной и симптомной стадии соответственно, в сравнении с ~ 25-30% снижением у синаптофизина и синапсина

Г), что позволяет сделать вывод о большей уязвимости данного белка к тем патологическим процессам, которые протекают в НМС.

Причиной большей уязвимости SNAP-25 в mSOD1-модели может быть чувствительность данного белка к развитию окислительного стресса и воздействию активных форм кислорода (АФК). В исследовании А.Р. Гиниатуллина с коллегами было изучено влияние АФК на процессы экзоцитоза в НМС [290]. В данной работе было показано, что АФК подавляет спонтанную и вызванную активность НМС, воздействуя на SNARE-комплекс. При более детальном исследовании оказалось, что процесс формирования SNARE-комплекса грубее всего нарушался при инкубации SNAP-25 с АФК.

Мутации в гене SOD1 и накопление патологических агрегатов SOD1 приводят к повреждению митохондрий с развитием окислительного стресса [289]. У mSOD1(G93A)-трансгенных мышей уже на досимптомной стадии отмечается вакуолизация и набухание митохондрий в нервной терминали [86, 283]. Также отмечается скопление данных митохондрий, доставленных ретроградным аксональным транспортом из НМС, в мотонейронах спинного мозга с повышенным образованием АФК. Повреждение митохондрий и накопление АФК также отмечается в скелетной мышце mSOD1(G93A)-трансгенных мышей на досимптомной стадии [99, 242, 270]. Таким образом, в НМС mSOD1-трансгенных мышей и пресинаптическая, и постсинаптическая мембрана являются источником АФК, которые избирательно повреждают SNAP-25.

Стоит отметить, что у mSOD1-трансгенных мышей отмечается нарушение докинга (прикрепления к пресинаптической мембране) синаптических везикул, уменьшение размера готового к высвобождению пула при сохранении общего числа синаптических везикул [86, 148]. Также отмечается нарушение высвобождения нейротрансммиттера в НМС у mSOD1-мышей на досимптомной стадии в виде снижения вероятности успешной нервно-мышечной передачи при стимуляции [100]. Данные наблюдения могут быть объяснены снижением экспрессии SNAP-25 в НМС.

Синапсин I – это пресинаптический белок, участвующий в процессах роста

нервного окончания, созревания НМС, формировании пулов синаптических везикул, а также в регуляции высвобождения нейротрансмиттера [36, 134, 300]. Синапсин I в нервном окончании формирует жидкие биомолекулярные конденсаты, которые улавливают синаптические везикулы и образуют резервный пул, представляющий собой отдельную жидкую фазу [27, 204, 332]. Путем фосфорилирования и дефосфорилирования синапсина I регулируется размер резервного пула и высвобождение из него синаптических везикул [27]. В настоящем исследовании было выявлено снижение площади флуоресценции на досимптомной стадии, и снижение интенсивности и площади флуоресценции синапсина I на симптомной стадии. Выявленное снижение экспрессии синапсина I в пресинаптической мембране, вероятно, вносит вклад в изменение динамики везикулярного цикла, наблюдаемое на симптомной стадии в mSOD1-трансгенной модели [115]. Ранее было показано, что при добавлении антител к синапсину I в синапс или же выключение гена синапсина I приводит к значительному уменьшению размера резервного пула и снижению динамики экзоцитоза [107, 303, 324].

Синаптофизин является наиболее распространенным белком синаптических везикул и используется в качестве их маркера. Основные функции синаптофизина связаны с формированием синаптических везикул, регуляцией экзоцитоза нейромедиатора, а также синаптогенезом [10]. В ходе данного исследования у mSOD1-трансгенных мышей на досимптомной стадии не было выявлено достоверного изменения флуоресценции синаптофизина. На симптомной стадии в свою очередь было зарегистрировано значимое снижение площади флуоресценции в сравнении с мышами дикого типа того же возраста. Выявленные изменения вероятнее всего отражают снижение количества синаптических везикул в нервных терминалях на симптомной стадии патологии. Ранее с помощью электронной микроскопии также было показано уменьшение количества синаптических везикул на симптомной стадии в той же трансгенной модели БАС [56]. При этом, размеры и морфология везикул, а также организация синаптических пулов в нервных терминалях не изменяется.

Вероятной причиной снижения экспрессии синапсина I и синаптофизина в нервной терминали является нарушенный аксональный транспорт. При мутациях в гене SOD1 отмечается нарушение быстрого аксонального транспорта везикул по причине взаимодействия агрегатов SOD1 с динеин-динактиновым комплексом [123, 136, 179].

Временной ход нарушения экспрессии пресинаптических белков, установленный в данном исследовании, соотносится с временным ходом развития нарушений нервно-мышечной синаптической передачи, выявленными в серии электрофизиологических исследований [115, 119, 290, 323]. Зарегистрированное грубое снижение экспрессии SNAP-25 на досимптомной стадии может быть причиной синаптической дисфункции, которая проявляется в виде снижения вероятности успешной синаптической передачи (probability of neuromuscular transmission), а также снижения квантового состава у mSOD1-мышей на досимптомной стадии [100, 323]. Сниженная экспрессия синапсина I на досимптомной и симптомной стадиях может обуславливать замедление рециклирования синаптических везикул в нервной терминали [115]. Снижение экспрессии синаптофизина на симптомной стадии отражает сниженное количество синаптических везикул в оставшихся НМС вследствие нарушенного аксонального транспорта и объясняет снижение амплитуд МПКП и ПКП, а также снижение квантового состава, выявляемые на симптомной стадии у mSOD1-трансгенных мышей [115, 119, 323].

В ходе исследования экспрессии синаптических белков в FUS-модели БАС на досимптомной стадии были обнаружены противоположные изменения в сравнении с mSOD1-моделью. В частности, было зарегистрировано статистически значимо более высокая интенсивность флуоресценции синапсина I и SNAP-25 в сравнении с мышами дикого типа. На симптомной стадии в данной модели БАС наблюдаемые изменения были схожи с наблюдениями в mSOD1-модели, а именно было обнаружено достоверное снижение экспрессии синаптофизина, синапсина I и SNAP-25.

В норме FUS является преимущественно нуклеарным белком, участвующим

в процессинге РНК [329]. Помимо ядра клетки, в норме FUS также обнаруживается в отростках нейронов и синаптических контактах, где FUS участвует в регуляции транспорта, сплайсинга и транскрипции синаптических мРНК, вовлеченных в локальную трансляцию белка в синапсе [194, 302]. Мишенями FUS в пресинаптической мембране является целый ряд мРНК, в том числе кодирующие белки SNAP-25 и синапсин I [301]. Помимо синапсов в ЦНС, FUS присутствует в НМС, и, вероятно, играет важную роль в формировании и созревании НМС [206]. Также FUS взаимодействует с митохондриальными белками, влияет на синаптический транскриптом и стабильность синапса [169, 301].

При мутациях FUS отмечается нарушение его локализации в виде накопления и агрегации в цитоплазме и отсутствия в ядре клетки [48]. Также в модели БАС отмечается усиленное накопление мутантного FUS в пресинаптической мембране, которое коррелирует с усиленной или ослабленной экспрессией ряда синаптических мРНК [301]. Показано, что разные мутации FUS приводят к развитию разных паттернов изменения транскриптома и трансляции белка в нервных отростках и синапсах [169]. Например, в модели FUS^{R514G} отмечается более интенсивный синтез белка в нервных отростках и более активный аксональный транспорт в сравнении с диким типом. В клеточных культурах мотонейронов, полученных от пациентов с БАС, также было отмечено накопление мутантного FUS в синапсах, а также накопление и агрегация некоторых белков пре- и постсинаптической мембраны (Bassoon и Homer1) [302]. Вероятно, в используемой FUS-модели БАС на досимптомной стадии усиленная экспрессия синапсина I и SNAP-25 отражает локальную стабилизацию РНК в синапсе на досимптомной стадии.

В НМС трансгенных FUS-мышей на симптомной стадии наблюдались те же изменения, что и в mSOD1-модели в виде достоверного снижения флуоресценции пресинаптических белков синапсина I, синаптофизина, SNAP-25. Данные наблюдения, вероятнее всего, обусловлены так же, как и в mSOD1-модели, замедлением аксонального транспорта и гибелью мотонейронов. Помимо изменения экспрессии пресинаптических белков в FUS-модели БАС было выявлено

достоверное снижение площади экспрессии н-холинорецепторов. Эти изменения постсинаптической мембраны могут объясняться токсическим действием мутантного FUS и снижением способности нормального белка FUS в подсинаптических ядрах регулировать экспрессию ряда генов, важных для стабильности постсинаптической мембраны и НМС в целом [147].

Временной ход нарушения экспрессии пресинаптических белков в FUS-модели БАС соотносится с временным ходом развития нарушений нервно-мышечной синаптической передачи в данной модели. Повышенная экспрессия синапсина I на досимптомной стадии может объяснить наблюдающееся в данной модели угнетение экзоцитоза и компенсаторного эндоцитоза везикул при интенсивной синаптической передачи в НМС [117]. При этом повышенная экспрессия белка SNAP-25, влияющего на кратковременную пластичность, может объяснить более выраженное облегчение синаптической передачи при парной стимуляции [117]. Уже на симптомной стадии в данной модели отмечается увеличение квантового состава, несмотря на сниженную экспрессию синаптофизина и SNAP-25. Вероятно, сниженная экспрессия синапсина I может приводить к увеличению размера доступного к высвобождению пула синаптических везикул [342].

После исследования экспрессии пресинаптических белков следующим этапом было проведение оценки экспрессии АХЭ в НМС диафрагмы в тех же трансгенных моделях БАС. При исследовании экспрессии АХЭ в НМС mSOD1-модели было выявлено достоверное снижение экспрессии АХЭ у трансгенных мышей на досимптомной стадии. В частности, было зарегистрировано снижение площади и интенсивности флуоресценции АХЭ в сравнении с мышами дикого типа. При исследовании данных показателей у трансгенных мышей на симптомной стадии, также отмечалось снижение экспрессии АХЭ. В то же самое время при сравнении досимптомных и симптомных mSOD1-мышей между собой было выявлено достоверное увеличение интенсивности флуоресценции АХЭ на симптомной стадии. Общее снижение экспрессии АХЭ в скелетной мышце, выявленное в mSOD1-модели, соответствует наблюдениям у пациентов с БАС, где

также регистрируется снижение уровня АХЭ [138, 327].

У трансгенных FUS-мышей на досимптомной стадии достоверных различий в экспрессии АХЭ в НМС в сравнении с мышами дикого типа выявлено не было. На симптомной стадии у трансгенных FUS-мышей было выявлено достоверное повышение экспрессии АХЭ. При этом в обеих трансгенных моделях по мере развития симптомной стадии отмечалось повышение экспрессии АХЭ в НМС.

Наблюдаемые изменения экспрессии АХЭ в НМС могут быть связаны с изменениями в синаптической передаче. В исследованиях было установлено, что в норме экспрессия АХЭ в НМС скелетных мышц зависит от паттерна иннервации [41, 163]. В быстрых мышечных волокнах паттерн иннервации быстрых мотонейронов стимулирует экспрессию АХЭ [180]. При увеличении интенсивности синаптической передачи экспрессия АХЭ в них также усиливается [160]. Нарушение иннервации быстрых мышечных волокон в свою очередь приводит к значительному снижению в них уровня АХЭ [287, 292, 310]. Также, экспрессия АХЭ в них снижается при нарушении аксонального транспорта [177]. В медленных мышечных волокнах наблюдается противоположная картина. Тонический паттерн иннервации медленных мотонейронов подавляет экспрессию мРНК АХЭ, в результате чего в норме уровень АХЭ в медленных волокнах значительно ниже, чем в быстрых, а усиление активности синаптической передачи не приводит к увеличению уровня АХЭ [160, 180, 287]. При денервации S ДЕ подавляющее действие медленных мотонейронов прекращается, и экспрессия АХЭ в них возрастает [287].

В электрофизиологических исследованиях синаптической передачи в НМС диафрагмальной мышцы было выявлено снижение квантового состава в mSOD1-модели БАС [115], в то время как в FUS-модели БАС отмечается повышение квантового состава [117]. Данные различия в синаптической передаче могут обуславливать выявленные различия в экспрессии АХЭ в НМС в двух вышеуказанных моделях заболевания. Также, разные патогенетические механизмы в двух моделях (окислительный стресс в mSOD1-модели, нарушение метаболизма РНК в FUS-модели) могут вносить вклад в экспрессию АХЭ. Выявленное по мере

развития симптомной стадии повышение экспрессии АХЭ в обеих трансгенных моделях может вносить вклад в патогенез заболевания. На симптомной стадии при электрофизиологических исследованиях в моделях БАС, а также у пациентов с БАС, отмечается снижение квантового состава и вероятность успешной синаптической передачи [224, 323]. Повышение экспрессии АХЭ в НМС в данном случае будет усугублять дисфункцию НМС и способствовать нарушению нервно-мышечной синаптической передачи. Роль АХЭ в патогенезе БАС подтверждается тем фактом, что ингибирование экспрессии АХЭ антисмысловыми олигонуклеотидами увеличивает продолжительность жизни и уменьшает гибель мотонейронов у SOD1-трансгенных мышей [224].

Таким образом, в двух моделях наблюдаются разные молекулярные изменения на уровне НМС, сопровождающиеся разными изменениями в синаптической передаче. Это в очередной раз подтверждает гетерогенный характер заболевания. В то же самое время полученные данные позволяют сделать заключение, что пресинаптическая мембрана является более уязвимой частью НМС при развитии БАС. В обеих моделях в данном исследовании достоверно наблюдались изменения экспрессии пресинаптических белков на досимптомной стадии, в то время как достоверное нарушение экспрессии н-холинорецепторов, маркера постсинаптической мембраны, наблюдалось только в FUS-модели на симптомной стадии. Преимущественное и более грубое поражение пресинаптической мембраны может быть характерной чертой БАС, так как, например, в модели СМА наблюдается одновременное грубое поражение пре- и постсинаптических мембран НМС [90].

Изменения экспрессии АХЭ в НМС, выявленные в обеих моделях, теоретически могут отражаться на ее активности в плазме крови. Основанием для такого предположения может служить тот факт, что более половины АХЭ плазмы крови происходит из периферических холинергических структур, к которым относится НМС [208]. Таким образом, активность АХЭ плазмы крови может служить биомаркером БАС. Такие же предположения выдвигаются в последних обзорных работах, посвященных патологии НМС при БАС [224, 226].

Исследование и применение биомаркеров при БАС имеет большое значение, так как это определенно повлияет на разные аспекты данного заболевания. Помимо более ранней диагностики и прогностических возможностей, это позволит лучше стратифицировать пациентов на различные подгруппы, учитывая значительную гетерогенность заболевания [207, 334]. Также это может улучшить качество проводимых РКИ, так как будет способствовать формированию более однородных выборок пациентов, а также позволит лучше оценивать фармакодинамику потенциальных лекарственных средств [207, 334]. Например, к настоящему времени в текущих РКИ для оценки эффективности исследуемых лекарственных средств используются биомаркеры наряду с клиническими показателями (*ClinicalTrials.gov*).

В связи с этим, было проведено исследование активности АХЭ плазмы у FUS-трансгенных мышей на досимптомной и симптомной стадиях патологии с целью выявления достоверных изменений (по техническим причинам проведение исследования на mSOD1-мышцах было невозможным). Несмотря на результаты вышеописанных исследований, статистически значимых различий в активности АХЭ плазмы между FUS-мышцами и диким типом в данной не наблюдалось, вне зависимости от стадии болезни. Стоит отметить, что достоверное увеличение активности АХЭ плазмы было показано в работе 1983 г. с использованием одной из первых мышинных моделей БАС [38]. В данной работе использовались мыши Вобблер, у которых наблюдается мутация в гене Vsp54, приводящая к нарушению работы аппарат Гольджи и в конечном итоге к нейродегенерации [278]. Однако данная модель не отражает в полной мере клиническую картину и патогенетические механизмы БАС [65], а мутаций в гене Vsp54 или его аналогах среди пациентов с БАС выявлено не было [130].

Помимо исследования активности фермента у мышей Вобблер, в той же самой работе исследователи оценили активность АХЭ плазмы у пациентов с БАС и сравнили с результатами здорового и неврологического контролей [38]. В данной работе было выявлено значимое увеличение активности фермента при БАС, однако значимых корреляций с тяжестью и длительностью болезни выявлено не было.

Впервые же подобное исследование было проведено немного ранее, в 1981 г., где также отмечалось достоверное повышение активности АХЭ плазмы у пациентов с БАС почти в два раза в сравнении со здоровым контролем [139]. Исследователи в обеих работах применяли радиометрический метод. Позже, в 1999 г. уже спектрофотометрическим методом Элмана было подтверждено увеличение активности АХЭ плазмы при БАС [232]. Во всех трех работах достоверных корреляций между уровнем АХЭ, тяжестью и длительностью БАС выявлено не было.

Одними из этих авторов было предположено, что источником повышенной АХЭ плазмы могут являться мотонейроны спинного мозга [38]. На это указывало то, что в культурах мотонейроны высвобождают АХЭ в окружающую среду [187]. Однако вряд ли источником АХЭ плазмы являются клетки ЦНС [208]. Снижение активности АХЭ в СМЖ при ее увеличении в плазме крови у пациентов с БАС косвенно подтверждает это [232]. Другие авторы предположили, что причиной повышения активности АХЭ в плазме может являться ее высвобождение из НМС, усиливающееся при денервации [139, 226]. Усиленное высвобождение АХЭ из НМС было показано в денервационных моделях [70, 177]. В случае с БАС считается, что высвобождение АХЭ из НМС может усиливаться за счет металлопротеиназ во внеклеточном матриксе, активация которых отмечается в денервированной скелетной мышце человека и у пациентов с БАС [280, 317].

В настоящей работе было исследовано 17 пациентов с БАС, 12 из которых страдали классической формой с вовлечением центрального и периферического мотонейрона. У 6 пациентов заболевание дебютировало с поражения бульбарного отдела. У пациентов была проведена оценка тяжести функционального дефицита (медиана ALSFRS-R составила 40 баллов), темпов прогрессирования (медиана 0,83 балла ALSFRS-R/мес), а также оценка стадии заболевания по шкалам King's и MiToS. У данных пациентов было проведено исследование активности АХЭ плазмы и слюны, полученные данные сравнивались с результатами здорового и неврологического контролей. Для исключения возможных ошибок в исследование не включались пациенты с различными заболеваниями органов полости рта, а

также принимающие лекарственные препараты, влияющие на саливацию и активность АХЭ (например, ботулинотерапия и ингибиторы АХЭ).

Несмотря на результаты предыдущих работ, в настоящем исследовании не было выявлено значимого изменения активности АХЭ в плазме крови (см. Рисунок 10). Стоит отметить, что во всех группах отмечалась высокая вариабельность полученных значений. Оценка корреляции с помощью коэффициента Спирмена выявила корреляционную связь умеренной силы между значениями активности АХЭ плазмы и тяжестью неврологического дефицита по шкале ALSFRS-R, темпами прогрессирования заболевания, стадией БАС по шкале MiToS (Таблица 11). Однако данные корреляции оказались статистически не значимыми ($p > 0,05$).

Работ по исследованию активности АХЭ плазмы у пациентов с БАС было опубликовано всего три: в 1981, 1983 и 1999 гг. [38, 139, 232]. Несмотря на схожие результаты в виде увеличения активности АХЭ в плазме, в дальнейшем подобных исследований проведено не было. В данных работах пациенты с БАС отбирались без использования современных пересмотренных критериев El-Escorial и критериев Awaji, установивших диагностическую значимость потенциалов фасцикуляций [126, 127]. Настоящая работа является первой с тех времен, в которой применялись данные диагностические критерии. Если сравнивать количество испытуемых, то количество исследованных пациентов с БАС в каждой работе сопоставимо с данным исследованием. В двух работах для оценки активности АХЭ использовался радиометрический метод, в одной – метод Элмана. Обращает на себя внимание тот факт, что при статистическом анализе значимость различий во всех трех предыдущих работах оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента, при этом не была указана нормальность распределения полученных значений. В данной работе использовался U-критерий Манна-Уитни, так как полученные данные были непараметрическими. Вышеупомянутые различия могут быть одной из причин, по которой полученные результаты отличаются от предыдущих работ. Также стоит отметить, что в данной диссертационной работе не было пациентов на терминальной стадии БАС.

Но должна ли активность АХЭ увеличиваться в плазме крови при развитии

БАС? При денервации в скелетной мышце уровень АХЭ снижается. Это отмечается у пациентов с БАС [138, 327], а также подтверждается многими исследованиями в денервационных моделях [70, 177, 292, 310, 335]. При этом денервация усиливает высвобождение АХЭ в абсолютных значениях на непродолжительное время [70]. В дальнейшем снижение экспрессии фермента в мышце может нивелировать усиленное высвобождение АХЭ из НМС, что было зарегистрировано в двух исследованиях [70, 177]. В свою очередь хроническая денервация при БАС сопровождается процессами спрутинга и реиннервации, что может восстанавливать уровень экспрессии АХЭ мышцей [292, 310]. По данной причине может не наблюдаться изменение активности АХЭ плазмы при БАС. Все вышеперечисленные факты объясняют отсутствие в данной работе достоверных изменений активности АХЭ плазмы крови как у пациентов с БАС, так и в FUS-модели. В целом это позволяет сделать вывод о том, что активность АХЭ плазмы не может служить диагностическим биомаркером БАС.

Подтверждением полученных результатов может служить исследование активности АХЭ плазмы, проведенное у пациентов со спинальной мышечной атрофией (СМА). Данное заболевание, как и БАС, является болезнью двигательного нейрона, характеризующееся прогрессирующей гибелью мотонейронов и денервацией скелетных мышц [294]. Так, было показано, что у пациентов со СМА 1, 2 и 3 типа активность АХЭ плазмы в большинстве случаев достоверно не отличалась от здоровых лиц [233]. Это свидетельствует в пользу того, что хронический денервационно-реиннервационный процесс не приводит к какому-либо значимому изменению активности АХЭ в плазме крови.

Далее задачей диссертационной работы была оценка активности АХЭ слюны у пациентов с БАС. Стоит отметить, что ранее подобных работ при БАС не проводилось. В отличие от активности АХЭ в плазме крови, в ходе исследования было выявлено достоверное повышение активности данного фермента в слюне у пациентов с БАС в сравнении со здоровым контролем. В группах контролей полученные значения были более однородными, чем в группе БАС. Корреляционных связей между значениями АХЭ слюны и различными

клиническими показателями в группе БАС выявлено не было. Также стоит отметить, что не было установлено корреляции между значениями активности фермента в плазме и слюне.

Далее было решено разделить группу БАС на две подгруппы в зависимости от первоначальной локализации симптомов – на подгруппу с бульбарным началом и подгруппу со спинальным началом. Деление пациентов со спинальным началом на подгруппы с шейно-грудной и пояснично-крестцовой формой решено было не проводить. Также из данных групп были исключены пациенты без явных признаков вовлечения периферического нейрона (1 пациент с ПБС и 1 пациент с преимущественным поражением ЦМН), то есть без явных признаков поражения сегментоядерного аппарата спинного мозга и ствола мозга. При таком разделении пациентов при статистическом анализе подгруппа пациентов с бульбарным началом выделялась на фоне остальных выборок. У пациентов с бульбарным началом активность АХЭ слюны была достоверно выше, чем в подгруппе пациентов со спинальным началом БАС и в группе здорового контроля. Также в подгруппе БАС с бульбарным началом отмечалось более высокое значение активности фермента в сравнении с неврологическим контролем, однако статистическая значимость различий не была достигнута. Таким образом, повышение активности АХЭ в общей группе БАС было обусловлено частью пациентов с бульбарным началом заболевания.

Причиной наблюдаемых различий может быть вовлечение в патологический процесс слюнных желез или иннервирующих их структур у пациентов с бульбарной формой заболевания. Однако данных о патоморфологических изменениях слюнных желез или вегетативных ядер ствола мозга в литературе обнаружено не было. В свою очередь подобные изменения обнаруживались у пациентов с болезнями Альцгеймера (БА) и Паркинсона (БП). У данных пациентов в нескольких исследованиях было показано изменение активности АХЭ слюны. В частности, у пациентов с БП отмечается увеличение активности АХЭ [274]. У пациентов с БА в некоторых исследованиях выявлялись изменения активности АХЭ, однако данные этих работ противоречивы [57, 68, 103, 129]. При

патоморфологических исследованиях у пациентов с БП выявлялись агрегаты альфа-синуклеина в нижнем слюноотделительном ядре, поднижнечелюстном ганглии и поднижнечелюстной слюнной железе [211, 244, 297, 336]. У пациентов с БА обнаруживаются агрегаты бэта-амилоида и тау-белка в биоптатах слюнных желез, а также нарушенный окислительного-восстановительный баланс в них [273, 276].

В свою очередь при БАС имеются неоднократные свидетельства о развитии вегетативной дисфункции. У пациентов с БАС показано развитие таких неоторных нарушений, как сердечно-сосудистая и гастроинтестинальная дисфункция, нарушение работы мочевого пузыря, нарушение слюно- и слезоотделения [60, 145, 171, 203, 245, 328]. При исследовании функционирования слюнных желез методом сцинтиграфии у пациентов с БАС было выявлено нарушение захвата радиоактивного вещества [171]. Выявленная дисфункция слюнных желез не была связана ни со структурными нарушениями желез, ни с наличием гиперсаливации или дисфагии у ряда пациентов. Было предположено, что данная дисфункция вызвана нарушением вегетативной иннервации слюнных желез. Это подтверждается тем, что у пациентов с БАС скорость слюноотделения стимулируется воздействием холиномиметиков, в то время как непрямая стимуляция не влияет на функцию слюнных желез [145]. В работе Н. В. Коновалова есть данные о поражении X пары у пациента с БАС, выявленные при гистологическом исследовании аутопсийного материала [11].

В диссертационном исследовании было выявлено достоверное повышение АХЭ у пациентов с бульбарной формой БАС. Вероятно, полученные результаты отражают нарушение вегетативной иннервации слюнных желез у данных пациентов. При БАС показано, что клиническая картина заболевания согласуется с данными патоморфологического исследования спинного мозга и ствола, где более выраженная нейродегенерация наблюдается на том уровне цереброспинальной оси, которая соответствует возникновению первых симптомов [173]. Таким образом, у пациентов с бульбарной формой БАС в стволе мозга будет наблюдаться более выраженная нейродегенерация, чем у пациентов со спинальной формой, что может

оказывать влияние на функционирование вегетативных ядер ствола мозга. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты исследования симпатовагального баланса у пациентов БАС [203]. В данной работе было показано, что при исследовании спектрального анализа вариабельности сердечного ритма в покое у пациентов БАС с бульбарной формой отмечается более выраженный вегетативный дисбаланс, в основном затрагивающий парасимпатическую функцию, в отличие от остальных пациентов с БАС или здорового контроля. При этом у всех участников исследования ортостатические тесты были в норме, что отражало интактность симпатического отдела вегетативной нервной системы.

Таким образом, в данном исследовании было установлено, что на досимптомной стадии изменение экспрессии синаптических белков НМС при разных мутациях (SOD1(G93A) и FUS¹⁻³⁵⁹) носят разнонаправленный характер. Это проявляется в виде снижения экспрессии белка SNAP-25 в mSOD1-модели и в виде повышения экспрессии данных белков в случае FUS-модели. При этом на симптомной стадии изменения носят общий характер в виде снижения экспрессии пресинаптических белков. Также, несмотря на достоверное изменение экспрессии АХЭ в НМС, активность АХЭ в плазме у трансгенных животных достоверно не изменяется. В исследовании на человеке также не удалось показать достоверного изменения активности АХЭ плазмы у пациентов с БАС. Однако было выявлено достоверное повышение активности АХЭ в слюне у пациентов с бульбарной формой БАС в сравнении с пациентами со спинальной формой БАС и здоровыми добровольцами, а также тенденция к повышению активности АХЭ в сравнении с неврологическим контролем, которая не достигла статистической значимости. Выявленное повышение активности АХЭ слюны, вероятно, обусловлено нейродегенеративным процессом на бульбарном уровне с поражением парасимпатической части вегетативной системы. Результаты данного исследования расширяют представления о гетерогенности различных клинических и генетических вариантов БАС, а также о широте вовлечения невральных структур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые с момента внедрения современных диагностических критериев заболевания было проведено измерение активности АХЭ плазмы крови у пациентов с БАС. Несмотря на наличие теоретических и экспериментальных данных, предрасполагающих к наличию изменений активности АХЭ плазмы, в данном исследовании у пациентов с БАС в сравнении с контрольными группами этого показано не было. Достоверной корреляции между значениями активности АХЭ и клиническими характеристиками заболевания также выявлено не было. При этом почти у всех пациентов с БАС, участвовавших в исследовании (см. Таблицы 7 и 8), отмечались явные клинические признаки поражения нижних мотонейронов и признаки текущего денервационно-реиннервационного процесса согласно иЭМГ. У двух пациентов также было выявлено расширение центрального канала спинного мозга, гидромиелия, изначально расцененное как сирингомиелия, однако в дальнейшем интерпретированное как проявление атрофии спинного мозга вследствие дегенерации мотонейронов передних рогов и пирамидных трактов с типичным для БАС прогрессированием и фатальным исходом [79]. Отсутствие изменений активности АХЭ в плазме крови у пациентов с БАС при наличии прогрессирующей денервации скелетных мышц может объясняться тем, что усиленное высвобождение АХЭ из НМС при денервации нивелируется абсолютным снижением экспрессии АХЭ в самой скелетной мышце [70, 138, 177, 327]. Такой же результат был показан при измерении активности АХЭ у трансгенных FUS-мышей на досимптомной и симптомной стадии, где не было выявлено достоверной разницы между трансгенными мышцами и мышцами дикого типа.

При отсутствии изменений в активности АХЭ плазмы, у трансгенных мышей с моделью БАС отмечалось нарушение экспрессии АХЭ в НМС. Экспериментальное исследование было проведено на двух трансгенных моделях, которые экспрессируют человеческие мутантные гены SOD1 и FUS, являющиеся одними из основных генов, мутации которых приводят к развитию семейной и

спорадической формы БАС [152]. Заболевание считается гетерогенным, и данные гены приводят к развитию разных первичных патогенетических механизмов болезни. В случае гена SOD1 – это развитие окислительного стресса [150], в случае гена FUS – нарушение метаболизма РНК [47]. В mSOD1-модели было отмечено снижение экспрессии АХЭ как на досимптомной, так и на симптомной стадии, в то время как в FUS-модели было отмечено повышение экспрессии АХЭ на симптомной стадии. Выявленные различия в нарушении экспрессии АХЭ, вероятно, могут быть обусловлены гетерогенным характером изменений параметров синаптической передачи у данных трансгенных животных [115, 117, 119, 224, 323]. Помимо этого, на экспрессию АХЭ могут влиять патогенетические механизмы, развивающиеся в трансгенных моделях, такие как окислительный стресс (mSOD1-модель) и нарушение метаболизма РНК (FUS-модель).

Выявленные различия в нарушении экспрессии АХЭ также могут быть обусловлены гетерогенным характером изменений экспрессии синаптических белков у данных трансгенных животных. В связи с чем в настоящей работе было проведено комплексное исследование экспрессии синаптических белков синаптофизина, синапсина I, SNAP-25, н-холинорецепторов и АХЭ, участвующих в механизмах секреции, рецепции и гидролиза ацетилхолина в НМС диафрагмы в mSOD1- и FUS-трансгенных моделях БАС на разных стадиях развития болезни.

В ходе исследования был установлен временной ход нарушения экспрессии синаптических белков. Было показано, что еще до развития первых клинических проявлений болезни у трансгенных мышей, экспрессирующих разные человеческие мутантные гены, изменение экспрессии пресинаптических белков синапсина I и SNAP-25 носит разнонаправленный характер, как и в случае экспрессии АХЭ. В частности, в mSOD1-модели было показано снижение экспрессии синапсина I и более грубое снижение экспрессии белка SNAP-25, вероятно обусловленное его избирательной чувствительностью к развитию окислительного стресса в пре- и постсинаптической мембране [290]. В свою очередь в FUS-модели были выявлены противоположные изменения в виде увеличения экспрессии пресинаптических белков SNAP-25 и синапсина I,

обусловленные, вероятнее всего, локальными изменениями экспрессии РНК в синапсе [169]. На стадии развернутой клинической картины в виде задней параплегии у трансгенных мышей двух моделей БАС экспрессия пресинаптических белков нарушается уже схожим образом в виде достоверного ее снижения. Полученные данные указывают на то, что в патогенезе БАС разные первичные механизмы болезни, определяющие развитие заболевания, конвергируют и приводят к запуску общих механизмов дегенерации мотонейронов спинного мозга и единому исходу – гибели мотонейронов и денервации скелетной мышцы, проявляющееся схожим нарушением экспрессии синаптических белков НМС в двух разных генетических моделях БАС на симптомной стадии. На стадии развитой клинической картины mSOD1- и FUS-трансгенные мыши воспроизводят поражение НМС у пациентов с БАС, так как выявленное у трансгенных мышей нарушение экспрессии синаптических белков НМС соотносится с данными, полученными при иммунофлуоресцентном исследовании НМС биоптата скелетной мышцы пациента с БАС (женщина 67 лет, спорадический БАС, бульбарная форма, стадия 3 по King's, см. 2.2.2, Рисунок 1).

Временной ход нарушения экспрессии синаптических белков воспроизводит временной ход нарушения синаптической передачи в обеих трансгенных моделях. Так, такие значения синаптической передачи, как квантовый состав, частота МПКП, динамика экзо-эндоцитоза и рециклирование синаптических везикул, выявленные ранее в ходе электрофизиологических исследований в mSOD1- и FUS-трансгенных моделях БАС соотносятся с данными экспрессии синаптических белков НМС, полученными в результате данной работы [115, 117, 119, 224, 323].

Судя по всему, пресинаптическая мембрана является более уязвимой частью НМС при развитии БАС. Подобный вывод позволяют сделать полученные данные в двух трансгенных моделях БАС на разных стадиях патологии. Данное явление может быть характерной чертой БАС, так как, например, в модели СМА пре- и постсинаптическая мембрана НМС поражаются в одинаковой степени на равных сроках [90]. В настоящем исследовании достоверное нарушение постсинаптической мембраны было выявлено только у FUS-трансгенных мышей на

симптомной стадии, что может обуславливать особенности нарушения синаптической передачи в данной модели БАС [117, 224].

Таким образом, нарушение экспрессии пресинаптических белков, развивающаяся дисфункция и денервация НМС, нарушение экспрессии АХЭ в НМС, показанные в двух моделях БАС, не отражаются на активности АХЭ в плазме крови у пациентов с данным заболеванием. Активность АХЭ плазмы не стоит рассматривать в качестве потенциального диагностического биомаркера БАС вследствие низкой чувствительности данного метода, хотя, как показывают исследования, изменение экспрессии АХЭ в НМС у пациентов с БАС вполне вероятно [138, 327]. Необходимо дальнейшее совершенствование методических подходов для определения активности АХЭ плазмы, возможно за счет забора крови из вен наиболее пораженных миотомов, или за счет более тонкого изучения изоформ АХЭ.

В то же время диагностическую значимость может иметь активность АХЭ слюны. В данной работе впервые было проведено исследование активности АХЭ слюны у пациентов с БАС. Было установлено, что у пациентов с БАС активность АХЭ слюны достоверно повышается в сравнении со здоровыми добровольцами. При разделении группы БАС на подгруппы с бульбарной и спинальной формой, было установлено, что выявленные изменения обусловлены пациентами с бульбарной формой БАС. У данной подгруппы отмечалось более высокое значение активности АХЭ в слюне, статистически значимо отличающееся от группы здорового контроля и подгруппы со спинальной формой БАС. Выявленный факт статистически значимого повышения активности АХЭ слюны у пациентов с бульбарной формой БАС может рассматриваться как отражение локального дегенеративного и денервационного процесса на бульбарном уровне, а также как маркер распространения дегенеративного процесса на автономные структуры ствола мозга у данных пациентов. Это подтверждается результатами других, ранее проведенных исследований, в которых было выявлено более грубое нарушение парасимпатического контроля сердечной деятельности у пациентов с бульбарной формой БАС в сравнении с пациентами со спинальной формой заболевания [203],

а также нарушение функционирования слюнных желез, вероятно связанное с нарушенным вегетативным контролем [171].

Таким образом, клинико-экспериментальный характер настоящего исследования позволил установить некоторые звенья патогенеза, согласующиеся с «восходящей» гипотезой патогенеза БАС (Рисунок 15).

В экспериментальном исследовании на трансгенных моделях БАС удалось установить нарушение экспрессии пресинаптических белков синапсина I и SNAP-25 на досимптомной стадии. Это нарушение в двух трансгенных моделях носит разный характер. Согласно теоретическим и экспериментальным данным, подобное нарушение приводит к дисфункции НМС и способствует его денервации [91, 172, 224]. В следствие начинающегося денервационного процесса еще на досимптомной стадии отмечается нарушение экспрессии АХЭ в НМС. Подобные нарушения являются показателем доклинической стадии заболевания и дебюта дегенеративного процесса в мотонейронах. Дальнейшее развитие заболевания приводит к массивной гибели мотонейронов, прогрессирующей денервации НМС, что отражается в едином для двух трансгенных моделей грубом снижении экспрессии пресинаптических белков синаптофизина, синапсина I и SNAP-25, а также нарушении экспрессии АХЭ и в некоторых случаях н-холинорецепторов на развитой симптомной стадии.

Эти экспериментальные данные позволяют предположить участие АХЭ в патогенезе БАС, а также роль АХЭ как потенциального маркера прогрессирующего денервационного процесса при БАС. И у пациентов с бульбарной формой БАС удается зарегистрировать достоверное изменение активности АХЭ в слюне. Однако, несмотря на экспериментальные и теоретические предпосылки, при рутинном исследовании активности АХЭ в плазме крови достоверные изменения не регистрируются. Возможные причины подобного наблюдения были изложены выше.

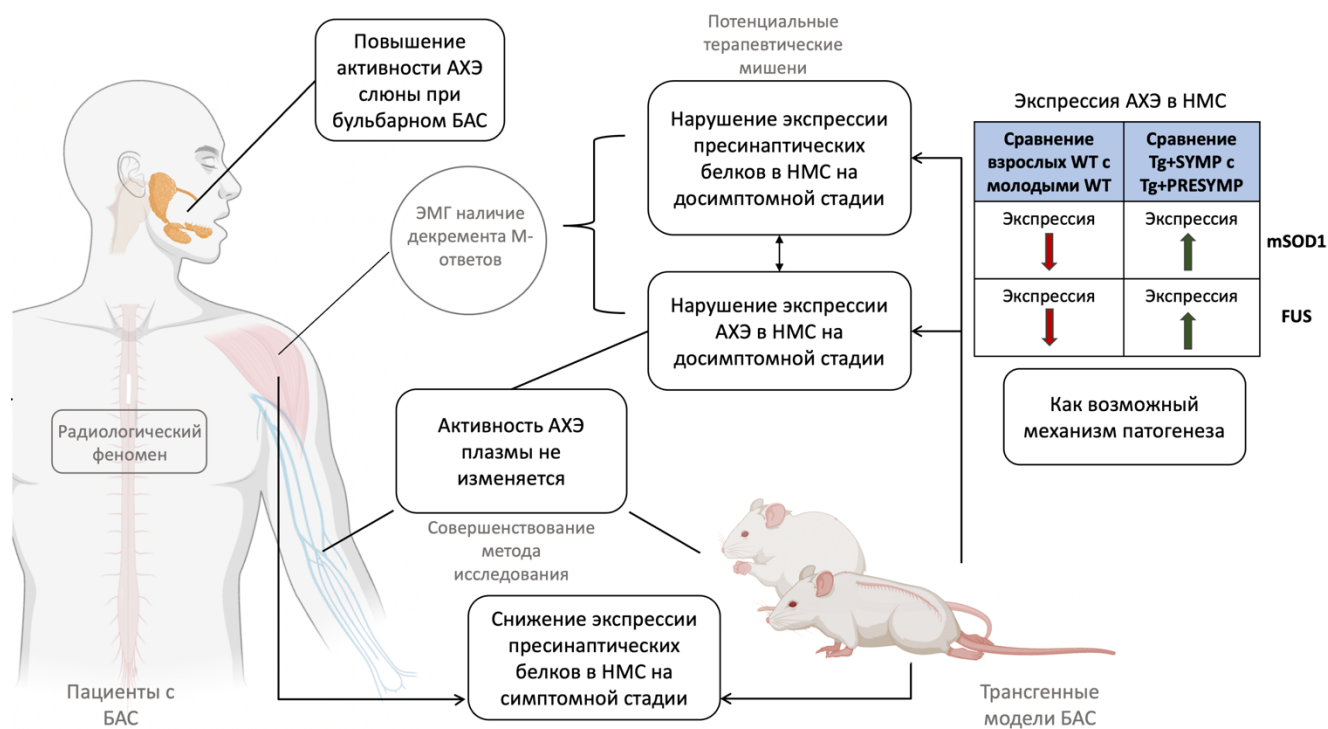


Рисунок 15 – Схематичное изображение установленных и предполагаемых на основании результатов настоящего исследования звеньев патогенеза и фенотипических характеристик БАС

Помимо этого, выявленное в экспериментальном исследовании нарушение экспрессии пресинаптических белков и АХЭ может объяснить наблюдаемый у пациентов с БАС клинический феномен мышечной утомляемости и инструментальный феномен в виде незначительного декремента М-ответов при стимуляционной ЭМГ [341]. Также в клиническом исследовании был установлен радиологический феномен атрофии спинного мозга вследствие дегенерации мотонейронов передних рогов в виде расширения центрального канала у пациентов с БАС [79].

Вышеописанные результаты настоящего исследования определяют научную новизну, а также теоретическую и практическую значимость работы.

ВЫВОДЫ

1. Активность АХЭ слюны статистически значимо выше у пациентов с бульбарной формой БАС по сравнению с пациентами со спинальной формой БАС ($p=0,022$) и здоровыми лицами ($p=0,035$), что позволяет рассматривать данный показатель в качестве диагностического маркера для подтверждения БАС у пациентов с бульбарными нарушениями.

2. Активность АХЭ плазмы крови у пациентов с БАС достоверно не изменяется ($p>0,05$), соответственно, рутинное определение данного показателя не может рассматриваться в качестве диагностического маркера заболевания.

3. В трансгенной модели БАС активность АХЭ плазмы крови не отличается в сравнении с мышами дикого типа ($p>0,05$), независимо от стадии заболевания.

4. На досимптомной стадии в mSOD1-трансгенной модели выявлено достоверное снижение экспрессии пресинаптических белков SNAP-25 ($p<0,001$) и синапсина I ($p<0,01$), в то время как в FUS-трансгенной модели – достоверное повышение экспрессии SNAP-25 ($p<0,01$) и синапсина I ($p<0,05$). На симптомной стадии в двух трансгенных mSOD1- и FUS-моделях выявлено достоверное снижение экспрессии SNAP-25, синапсина I и синаптофизина ($p<0,01$).

5. С развитием симптомной стадии в обеих трансгенных моделях отмечается повышение экспрессии АХЭ в НМС ($p<0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Измерение активности ацетилхолинэстеразы слюны при боковом амиотрофическом склерозе можно использовать в качестве диагностического маркера бульбарной формы данного заболевания, а также для дифференциальной диагностики бульбарных параличей различной этиологии. Измерение активности ацетилхолинэстеразы слюны может быть использовано в клинических и фундаментальных исследованиях бокового амиотрофического склероза для стратификации пациентов на подгруппы.

2. Для диагностики бокового амиотрофического склероза измерение активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови не следует рассматривать в качестве диагностического биомаркера вследствие отсутствия достоверных изменений.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективой дальнейших исследований может являться разработка терапевтических методов по коррекции поражения НМС при БАС в зависимости от характера нарушения экспрессии синаптических белков. Также исследование экспрессии синаптических белков может использоваться для оценки эффективности применения таких терапевтических подходов.

Также перспективными видятся исследования по более широкому изучению холинергической системы при БАС, которые могут включать исследование изоформ АХЭ в крови, слюне и СМЖ. Совместно с АХЭ возможно изучение других участников холинергической системы, таких как бутирилхолинэстеразы, ацетилхолинтрансферазы, везикулярного транспортера ацетилхолина. Подобные данные могут позволить вывести холинергические индексы и оценить их корреляцию с клиническими параметрами заболевания. Также следует провести исследование АХЭ в биологических жидкостях совместно с морфологическим и функциональным исследованием слюнных желез, инструментальным исследованием вегетативной нервной системы, а также изучением аутопсийного материала головного и спинного мозга, для выяснения более подробных механизмов изменения активности АХЭ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность и признательность Самигуллину Д.В., Нуруллину Л.Ф., Сибгатуллиной Г.В. (лаборатория биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики, обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) за оказанную помощь и содействие в проведении иммунофлуоресцентного исследования; Зуевой И.В. и Петрову К.А. (лаборатория «Нейрофизиология» Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) за оказанную помощь и содействие в проведении спектрофотометрического исследования.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-15-00329, гранта Президента РФ МД-6877.2018.4, гранта ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по договору № 1/22-3 о предоставлении гранта от 13.07.2022 г. в рамках Программы развития университета, гранта Российского научного фонда № 23-15-00438, с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

АХ – ацетилхолин

АХР – ацетилхолиновый рецептор

АХЭ – ацетилхолинэстераза

БАС – боковой амиотрофический склероз

БМН – болезнь мотонейрона

ВМН – верхний мотонейрон (первичная моторная зона)

ДЕ – двигательная единица

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

иЭМГ – игольчатая электромиография

ЛВД – лобно-височная дегенерация

ММН – мультифокальная моторная невропатия

МН - мотонейрон

МПКП – миниатюрный потенциал концевой пластинки

МРТ – магнитно-резонансная томография

НИВЛ – неинвазивная искусственная вентиляция легких

НМН – нижний мотонейрон (передние рога спинного мозга)

НМС – нервно-мышечный синапс

ПБС – первичный боковой склероз

ПКП – потенциал концевой пластинки

ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия

РКИ – рандомизированное клиническое исследование

РНК – рибонуклеиновая кислота

СВ – синаптическая везикула

СМА – спинальная мышечная атрофия

СМЖ – спинномозговая жидкость

ТМС – транскраниальная магнитная стимуляция

ХВДП – хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия

ЦНС – центральная нервная система

ALSFRS-R – Amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale revised, пересмотренная шкала нарушений функций при БАС

BDNF - brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга

C9ORF72 --chromosome 9 open reading frame 72 gene

CD1 – мышцы дикого типа для FUS-трансгенных мышей

ColQ – коллаген-подобный хвост, некаталитический домен АХЭ

EFNS - European Federation of Neurological Societies, Европейская федерация неврологических обществ

FF ДЕ – быстрые утомляемые двигательные единицы

FR ДЕ – быстрые неутомляемые двигательные единицы

FUS – fused in sarcoma protein

FUS-PRESYMP – трансгенные FUS-мышцы на досимптомной стадии

FUS-SYMP - трансгенные FUS-мышцы на симптомной стадии

GDNF - glial cell line-derived neurotrophic factor, глиальный нейротрофический фактор

IGF-1 – insulin-like growth factor-1, инсулиноподобный фактор роста 1

IGFBP-3 – insulin-like growth factor binding protein 3, белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста 3

King's – шкала стадирования БАС Королевского Колледжа Лондона

LRP4 - lipoprotein receptor-related protein 4, белок 4, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности

Me - медиана

Mean±SE – среднее значение±стандартная ошибка

MiToS – Милано-Туринская шкала стадирования БАС

mSOD1 – mutated superoxide dismutase 1, мутированный ген супероксиддисмутазы 1

mSOD1-PRESYMP – трансгенные mSOD1-мышцы на досимптомной стадии

mSOD1-SYMP - трансгенные mSOD1-мышцы на симптомной стадии

MuSK - muscle-specific kinase, мышечная специфическая тирозин-киназа

nAChR – н-холинорецептор

NFL – легкие цепи нейрофиламента

NT-3 - neurotrophin-3, нейротрофин 3

NT-4 - neurotrophin-4, нейротрофин 4

p75NTR – рецептор нейротрофина p75

PBS – фосфатный буфер

PBST – раствор тритона на фосфатном буфере

pNFH – фосфорилированные тяжелые цепи нейрофиламента

Q1 – 1-ый квартиль

Q3 – 3-ий квартиль

S ДЕ – медленные двигательные единицы

SNAP-25 – synaptosomal-associated protein 25-kD, один из главных компонентов белкового комплекса SNARE

SNARE – soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) – attachment protein receptor – рецепторы растворимого NSF присоединяющего белка

SOD1 – superoxide dismutase 1, супероксиддисмутаза 1

SYN-I – синапсин-1

SYP – синаптофизин

TDP-43 – TAR DNA binding protein-43

TMR-ABT – альфа-бунгаротоксин, конъюгированный с тетраметилпроламином

VEGF - vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

WT – мыши дикого типа

WT(3-4) – мыши дикого типа трансгенных mSOD1-мышей на досимптомной стадии

WT(6-7) – мыши дикого типа трансгенных mSOD1-мышей на симптомной стадии

WT(P100-150) – мыши дикого типа трансгенных FUS-мышей на симптомной стадии

WT(P40-60) – мыши дикого типа трансгенных FUS-мышей на досимптомной стадии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боковой амиотрофический склероз : клиническая гетерогенность и подходы к классификации / И. С. Бакулин, И. В. Закройщикова, Н. А. Супонева, М. Н. Захарова // Нервно-мышечные болезни. – 2017. – Т. 7, № 7. – С. 10-20.
2. Боковой амиотрофический склероз : современные представления о патогенезе и экспериментальные модели / М. А. Мухамедьяров, А. М. Петров, П. Н. Григорьев [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности. – 2018. – Т. 65, № 5. – С. 551-567.
3. Давыдова, Т. К. Спорадический боковой амиотрофический склероз в республике Саха (Якутия) / Т. К. Давыдова // Вестник Северо-Восточного Федерального университета им. М. М. Аммосова. – 2015. – Т. 12, № 2. – С. 119-123.
4. Зефирова, А. Л. Везикулярный цикл в пресинаптическом нервном окончании / А. Л. Зефирова // Российский Физиологический Журнал. – 2007. – Т. 93, № 5. – С. 554-563.
5. Зефирова, А. Л. Синаптическая везикула и механизмы освобождения медиатора (экзо-эндоцитозный везикулярный цикл) / А. Л. Зефирова, А. М. Петров. – Казань : Арт-кафе, 2010. – 324 с.
6. Исламов, Р. Р. Нейротрофический контроль пластичности скелетной мышцы млекопитающих / Р. Р. Исламов, В. В. Валиуллин // Неврологический вестник. – 2014. – Т. 46, № 3. – С. 56-64.
7. Исследование диагностической значимости тяжелых цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости при боковом амиотрофическом склерозе / А. В. Владыкина, В. Д. Назаров, В. С. Краснов [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2021. – Т. 15, № 1. – С. 43-50.
8. Клинические рекомендации по диагностике бокового амиотрофического склероза // Болезни мозга : от изучения механизмов к диагностике и лечению / М. Н. Захарова, Л. В. Брылев. – Москва : ООО «Буки-Веди», 2018. – С. 481-489.

9. Ковражкина, Е. А. Клинический полиморфизм бокового амиотрофического склероза / Е. А. Ковражкина, О. Д. Разинская, Л. В. Губский // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2017. – Т. 117, № 8. – С. 4-10.
10. Колос, Е. А. Маркер синаптических контактов – синаптофизин / Е. А. Колос, И. П. Григорьев, Д. Э. Коржевский // Морфология. – 2015. – Т. 147, № 1. – С. 78-82.
11. Коновалов, Н. В. Подострый передний полиомиелит / Н. В. Коновалов. – Москва : «Медицина», 1964. – 98 с.
12. Мухамедьяров, М. А. Ранние дисфункции при боковом амиотрофическом склерозе : патогенетические механизмы и роль в инициации заболевания / М. А. Мухамедьяров, А. Н. Хабибрахманов, А. Л. Зефилов // Биологические мембраны. – 2020. – Т. 37, № 47. – С. 264-270.
13. Неврология. Национальное руководство. Том 1 / В. А. Абабков, Г. Н. Авакян, И. А. Авдюнина [и др.]. – Москва : "ГЭОТАР-Медиа", 2018. – 880 с.
14. Периферическая дисфункция как один из механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний / М. А. Мухамедьяров, А. В. Мартынов, Е. О. Петухова [и др.] // Гены и клетки. – 2015. – Т. 15, № 4. – С. 8-14.
15. Петров, К. А. Холинэстеразы : взгляд нейрофизиолога / К. А. Петров, А. Д. Харламова, Е. Е. Никольский // Гены и Клетки. – 2014. – Т. 9, № 3-2. – С. 160-167.
16. Проскурина, С. Е. Глия в трехчастном нервно-мышечном синапсе / С. Е. Проскурина, К. А. Петров // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 10. – С. 1203-1214.
17. Самошкина, О. И. Клинико-эпидемиологические особенности бокового амиотрофического склероза в Санкт-Петербурге и Ленинградской области : специальность 14.00.13 «Нервные болезни» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Самошкина Ольга Игоревна ; Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. Академика И. П. Павлова. – Санкт-Петербург, 2007. – 25 с.

18. Современная концепция патогенеза нейродегенеративных заболеваний и стратегия терапии / И. В. Литвиненко, И. В. Красаков, Г. Н. Бисага [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 1-8.
19. Современные клеточные и молекулярные подходы в изучении болезней двигательного нейрона / Е. В. Лысогорская, Н. Ю. Абрамычева, А. С. Ветчинова [и др.] // Неврологический журнал. – 2018. – Т. 23, № 4. – С. 160-165.
20. Тяптин, А. А. Клинико-эпидемиологическая характеристика болезни двигательного нейрона в популяции Ярославской области : специальность 14.01.11 «Нервные болезни» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Тяптин Артем Анатольевич ; Ивановская государственная медицинская академия. – Иваново, 2010. – 22 с.
21. Хабибрахманов, А. Н. Биомаркеры бокового амиотрофического склероза / А. Н. Хабибрахманов, М. А. Мухамедьяров, Э. И. Богданов // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2022. – Т. 122, № 5. – С. 30-35.
22. Хондкариан, О. А. Боковой амиотрофический склероз / О. А. Хондкариан, Т. Л. Бунина, И. А. Завалишин. – Москва : Медицина, 1978. – 264 с.
23. Экзосомальный транспорт и прогрессирование нейродегенеративного процесса при боковом амиотрофическом склерозе / М. В. Иванова, Е. О. Чеканова, И. В. Закройщикова [и др.] // Нейрохимия. – 2019. – Т. 13, № 3. – С. 195-207.
24. A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis / J. Tang, A. Maximov, O. Schin [et al.] // Cell. – 2006. – Vol. 126. – Pp. 1175-1187.
25. A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing : implications for the genesis of synaptic active zones / Y. Wang, X. Liu, T. Biederer, T. C. Sudhof // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2002. – Vol. 99. – Pp. 14464-14469.
26. A HRP study of the relation between cell size and motor unit type in cat ankle extensor motoneurons / R. E. Burke, R. P. Dum, J. W. Fleshman [et al.] // J Comp Neurol. – 1982. – Vol. 209, No 1. – Pp. 17-28.

27. A Liquid Phase of Synapsin and Lipid Vesicles / D. Milovanovic, Y. Wu, X. Bian, P. De Camilli // *Science*. – 2018. – Vol. 361, No 6402. – Pp. 604-607.
28. A longitudinal study defined circulating microRNAs as reliable biomarkers for disease prognosis and progression in ALS human patients / G. Dobrowolny, J. Martone, E. Lepore [et al.] // *Cell Death Discov*. – 2021. – Vol. 7, No 1. – P. 4.
29. A method for measuring cholinesterase activity in human saliva and its application to farmers and consumers / S. Thiphom, T. Prapamontol, S. Chantara [et al.] // *Anal Methods*. – 2013. – Vol. 5, No 18. – Pp. 4687-4693.
30. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Feather-Stone // *Biochem Pharmacol*. – 1961. – Vol. 7. – Pp. 88-95.
31. A proposal for new diagnostic criteria for ALS / J. M. Shefner, A. Al-Chalabi, M. R. Baker [et al.] // *Clinical Neurophysiology*. – 2020. – Vol. 131, No 8. – Pp. 1975-1978.
32. A proposed staging system for amyotrophic lateral sclerosis / J. C. Roche, R. Rojas-Garcia, K. M. Scott [et al.] // *Brain*. – 2012. – Vol. 135, No 3. – Pp. 847-852.
33. A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions / Y. Furukawa, K. Kaneko, S. Watanabe [et al.] // *J Biol Chem*. – 2011. – Vol. 286, No 21. – Pp. 18664-18672.
34. A zebrafish model for C9orf72 ALS reveals RNA toxicity as a pathogenic mechanism / B. Swinnen, A. Bento-Abreu, T. F. Gendron [et al.] // *Acta Neuropathol*. – 2018. – Vol. 135, No 3. – Pp. 427-443.
35. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis / J. D. Rothstein, G. Tsai, R. W. Kuncl [et al.] // *Ann Neurol*. – 1990. – Vol. 28, No 1. – Pp. 18-25.
36. Accelerated structural maturation induced by synapsin I at developing neuromuscular synapses of *Xenopus laevis* / F. Valtorta, N. Iezzi, F. Benfenati [et al.] // *Eur J Neurosci*. – 1995. – Vol. 7, No 2. – Pp. 261-270.

37. Acetylcholine receptors from human muscle as pharmacological targets for ALS therapy / E. Palma, J. M. Reyes-Ruiz, D. Lopergolo [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2016. – Vol. 113, No 11. – Pp. 3060-3065.
38. Acetylcholinesterase and ATPases in motor neuron degenerative diseases / C. G. Rasool, D. Chad, W. G. Bradley [et al.] // Muscle Nerve. – 1983. – Vol. 6, No 6. – Pp. 430-435.
39. Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan / H. B. Peng, H. Xie, S. G. Rossi, R. L. Rotundo // J Cell Biol. – 1999. – Vol. 145, No 4. – Pp. 911-921.
40. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo / M. Behra, X. Cousin, C. Bertrand [et al.] // Nat Neurosci. – 2002. – Vol. 5, No 2. – Pp. 111-118.
41. Activity, molecular forms, and cytochemistry of cholinesterases in developing rat diaphragm / M. Brzin, J. Sketelj, V. M. Tennyson [et al.] // Muscle Nerve. – 1981. – Vol. 4, No 6. – Pp. 505-513.
42. Adaptive Remodeling of the Neuromuscular Junction with Aging / M. R. Deschenes, R. Flannery, A. Hawbaker [et al.] // Cells. – 2022. – Vol. 11, No 7. – Pp. 1150.
43. Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis / A. Y. Chiu, P. Zhai, M. C. Dal Canto [et al.] // Mol Cell Neurosci. – 1995. – Vol. 6, No 4. – Pp. 349-362.
44. Age-specific ALS incidence : a dose-response meta-analysis / B. Marin, A. Fontana, S. Arcuti [et al.] // Eur J Epidemiol. – 2018. – Vol. 33, No 7. – Pp. 621-634.
45. Aggregation-prone c9FTD/ALS poly(GA) RAN-translated proteins cause neurotoxicity by inducing ER stress / Y. J. Zhang, K. Jansen-West, Y. F. Xu [et al.] // Acta Neuropathol. – 2014. – Vol. 128, No 4. – Pp. 505-524.
46. Alhindi, A. Small junction, big problems : Neuromuscular junction pathology in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) / A. Alhindi, I. Boehm, H. Chaytow // J Anat. – 2021. – Vol. 241, No 5. – Pp. 1089-1107.

47. ALS Genetics : Gains, Losses, and Implications for Future Therapies / G. Kim, O. Gautier, E. Tassoni-Tsuchida [et al.] // *Neuron*. – 2020. – Vol. 108, No 5. – Pp. 822-842.
48. ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules / C. Vance, E. L. Scotter, A. L. Nishimura [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2013. – Vol. 22, No 13. – Pp. 2676-2688.
49. ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function / A. Sharma, A. K. Lyashchenko, L. Lu [et al.] // *Nat Commun*. – 2016. – Vol. 7. – P. 10465.
50. Amyotrophic lateral sclerosis – frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD) : Revised diagnostic criteria / M. J. Strong, S. Abrahams, L. H. Goldstein [et al.] // *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. – 2017. – Vol. 18, No 3-4. – Pp. 153-174.
51. Amyotrophic lateral sclerosis / M. C. Kiernan, S. Vucic, B. C. Cheah [et al.] // *Lancet*. – 2011. – Vol. 377, No 9769. – Pp. 942-955.
52. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy : evidence in mice and man / L. R. Fischer, D. G. Culver, P. Tennant [et al.] // *Exp Neurol*. – 2004. – Vol. 185, No 2. – Pp. 232-240.
53. Amyotrophic lateral sclerosis, occupational exposure to extremely low frequency magnetic fields and electric shocks : a systematic review and meta-analysis / H. Jalilian, K. Najafi, Y. Khosravi, M. Rööslü // *Rev Environ Health*. – 2021. – Vol. 36, No 1. – Pp. 129-142.
54. Amyotrophic lateral sclerosis : macro-EMG and twitch forces of single motor units // R. Dengler, A. Konstanzer, G. Küther [et al.] // *Muscle Nerve*. – 1990. – Vol. 13, No 6. – Pp. 545-550.
55. Amyotrophic lateral sclerosis : moving towards a new classification system / A. Al-Chalabi, O. Hardiman, M. C. Kiernan [et al.] // *The Lancet Neurology*. – 2016. – Vol. 15, No 11. – Pp. 1182-1194.

56. Analysis of neuromuscular junctions and effects of anabolic steroid administration in the SOD1G93A mouse model of ALS / V. Cappello, E. Vezzoli, M. Righi [et al.] // *Mol Cell Neurosci.* – 2012. – Vol. 51, No 1-2. – Pp. 12-21.
57. Association of a salivary acetylcholinesterase with Alzheimer's disease and response to cholinesterase inhibitors / R. Sayer, E. Law, P. J. Connelly, K. C. Breen // *Clinical Biochemistry.* – 2004. – Vol. 37, No 2. – Pp. 98-104.
58. Awaji criteria improves the diagnostic sensitivity in amyotrophic lateral sclerosis : A systematic review using individual patient data / N. Geevasinga, C. T. Loy, P. Menon [et al.] // *Clinical Neurophysiology.* – 2016. – Vol. 127, No 7. – Pp. 2684-2691.
59. Axonal degeneration, distal collateral branching and neuromuscular junction architecture alterations occur prior to symptom onset in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis / J. A. Clark, K. A. Southam, C. A. Blizzard [et al.] // *J Chem Neuroanat.* – 2016. – Vol. 76. – Pp. 35-47.
60. Baltadzhieva, R. Autonomic impairment in amyotrophic lateral sclerosis / R. Baltadzhieva, T. Gurevich, A.D. Korczyn // *Curr Opin Neurol.* – 2005. – Vol. 18, No 5. – Pp. 487-493.
61. Becherer, U. Vesicle pools, docking, priming and release / U. Becherer, J. Rettig // *Cell Tissue Res.* – 2006. – Vol. 326. – Pp. 393-407.
62. Bensimon, G. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group / G. Bensimon, L. Lacomblez, V. Meininger // *N Engl J Med.* – 1994. – Vol. 330, No 9. – Pp. 585-591.
63. Binding to the Ca²⁺ binding site of the synaptotagmin 1 C2B domain triggers fast exocytosis without stimulating SNARE interactions / O. H. Shin, J. S. Rhee, J. Tang [et al.] // *Neuron.* – 2003. – Vol. 37. – Pp. 99-108.
64. Bjornskov, E. K. Quantitative axon terminal and end-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis / E. K. Bjornskov, F. H. Norris, J. Mower-Kuby // *Arch Neurol.* – 1984. – Vol. 41, No 5. – Pp. 527-530.

65. Boillée, S. The wobblers mouse : a neurodegeneration jigsaw puzzle // S. Boillée, M. Peschanski, M. P. Junier // *Mol Neurobiol.* – 2003. – Vol. 28, No 1. – Pp. 65-106.
66. Burke, R. E. Mammalian motor units : physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius / R. E. Burke, D. N. Levine, F. E. Zajac // *Science.* – 1971. – Vol. 174, No 4010. – P. 709-712.
67. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking / M. A. Farg, V. Sundaramoorthy, J. M. Sultana [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2014. – Vol. 23, No 13. – Pp. 3579-3595.
68. Can Salivary Acetylcholinesterase be a Diagnostic Biomarker for Alzheimer? / S. Bakhtiari, N. B. Moghadam, M. Ehsani [et al.] // *J Clin Diagn Res.* – 2017. – Vol. 11, No 1. – Pp. 58-60.
69. Cardiotrophin-1, a Muscle-Derived Cytokine, Is Required for the Survival of Subpopulations of Developing Motoneurons / R. W. Oppenheim, S. Wiese, D. Prevette [et al.] // *J Neurosci.* – 2001. – Vol. 21, No 4. – Pp. 1283-1291.
70. Cater, J. L. Effects of acute and chronic denervation on release of acetylcholinesterase and its molecular forms in rat diaphragms / J. L. Cater, S. Brimijoin // *J Neurochem.* – 1981. – Vol. 36, No 3. – Pp. 1018-1025.
71. Causative Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Protein Degradation Pathways : a Link to Neurodegeneration / C. Maurel, A. Dangoumau, S. Marouillat [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2018. – Vol. 55, No 8. – Pp. 6480-6499.
72. Cedarbaum, J. M. Performance of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS) in multicenter clinical trials / J. M. Cedarbaum, N. Stambler // *Journal of the Neurological Sciences.* – 1997. – Vol. 152. – Pp. 1-9.
73. Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction / R. A. Jones, C. Harrison, S. L. Eaton [et al.] // *Cell Rep.* – 2017. – Vol 21, No 9. – Pp. 2348-2356.
74. Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS : part II, results and discussion / S. Vinsant, C. Mansfield, R. Jimenez-Moreno [et al.] // *Brain Behav.* – 2013. – Vol. 3, No 4. – Pp. 431-457.

75. Chen, K. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs / K. Chen, N. Rajewsky // *Nat Rev Genet.* – 2007. – Vol. 8, No 2. – Pp. 93-103.
76. Chen, Y. A. SNARE-mediated membrane fusion / Y. A. Chen, R. H. Sheller // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 2. – Pp. 98-106.
77. Cholinergic regulation of neurite outgrowth from isolated chick sympathetic neurons in culture / D. H. Small, G. Reed, B. Whitefield, V. Nurcombe // *J Neurosci.* – 1995. – Vol. 15. – Pp. 144-151.
78. Chronic blockade of glutamate receptors enhances presynaptic release and downregulates the interaction between synaptophysin-synaptobrevin / A. Bacci, S. Coco, E. Pravettoni [et al.] // *J. Neurosci.* – 2001. – Vol. 21. – Pp. 6588-6596.
79. Clinical cases of amyotrophic lateral sclerosis concurrent with hydromyelia / E. I. Bogdanov, E. G. Mendeleovich, A. N. Khabibrakhmanov [et al.] // *Clinical Case Reports.* – 2021. – Vol. 9, No 6. – Pp. 1571-1576.
80. Clinical features and differential diagnosis of flail arm syndrome / A. Hübers, V. Hildebrandt, S. Petri [et al.] // *J Neurol.* – 2016. – Vol. 263, No 2. – Pp. 390-395.
81. Clinical features and outcomes of the flail arm and flail leg and pure lower motor neuron MND variants : a multicentre Italian study / P. Schito, G. Ceccardi, A. Calvo [et al.] // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2020. – Vol. 91, No 9. – Pp. 1001-1003.
82. Clinical features that distinguish PLS, upper motor neuron-dominant ALS, and typical ALS / P. H. Gordon, B. Cheng, I. B. Katz [et al.] // *Neurology.* – 2009. – Vol. 72, No 22. – Pp. 1948-1952.
83. Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) / L. I. Grad, G. A. Rouleau, J. Ravits, N. R. Cashman // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2017. – Vol. 7, No 8. – a024117.
84. Coleman, B. M. Extracellular vesicles – Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases / B. M. Coleman, A. F. Hill // *Semin Cell Dev Biol.* – 2015. – Vol. 40. – Pp. 89-96.

85. ColQ controls postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction / S. M. Sigoillot, F. Bourgeois, M. Lambergeon [et al.] // *J Neurosci.* – 2010. – Vol. 30, No 1. – Pp. 13-23.
86. Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS / T. W. Gould, R. R Buss, S. Vinsant [et al.] // *J Neurosci.* – 2006. – Vol. 26, No 34. – Pp. 8774-8786.
87. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients / K. Abe, Y. Itoyama, G. Sobue [et al.] // *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* – 2014. – Vol. 15, No 7-8. – Pp. 610-617.
88. Costa, J. Awaji Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis : A Systematic Review / J. Costa, M. Swash, M. de Carvalho // *Archives of Neurology.* – 2012. – Vol. 69, No 11. – Pp. 1410-1416.
89. Cousin, M. A. Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent Dyes / M. A. Cousin, P. J. Robinson // *J. Neurochem.* – 1999. – Vol. 73. – Pp. 2227-2239.
90. Cross-disease comparison of amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy reveals conservation of selective vulnerability but differential neuromuscular junction pathology / L. H. Comley, J. Nijssen, J. Frost-Nylen, E. Hedlund // *J Comp Neurol.* – 2016. – Vol. 524, No 7. – Pp. 1424-1442.
91. Cross-talk between motor neurons and myotubes via endogenously secreted neural and muscular growth factors / J. Saini, A. Faroni, A. J. Reid [et al.] // *Physiol Rep.* – 2021. – Vol. 9, No 8. – e14791.
92. CSF neurofilament protein analysis in the differential diagnosis of ALS / T. S. Reijn, W. F. Abdo, H. J. Schelhaas, M. M. Verbeek // *J Neurol.* – 2009. – Vol. 256, No 4. – Pp. 615-619.
93. Cys-loop receptors : new twists and turns / H. A. Lester, M. I. Dibas, D. S. Dahan [et al.] // *Trends Neurosci.* – 2004. – Vol. 27, No 6. – Pp. 329-336.

94. Dadon-Nachum, M. The «dying-back» phenomenon of motor neurons in ALS / M. Dadon-Nachum, E. Melamed, D. Offen // *J Mol Neurosci.* – 2011. – Vol. 43, No 3. – Pp. 470-477.
95. Daniels, G. Functions of red cell surface proteins / G. Daniels // *Vox Sanguinis.* – 2007. – Vol. 93, No 4. – Pp. 331-340.
96. Davis, L. Cholinesterase. Its significance in anaesthetic practice / L. Davis, J. J. Britten, M. Morgan // *Anaesthesia.* – 1997. – Vol. 52, No 3. – Pp. 244-260.
97. De novo expression of connexin hemichannels in denervated fast skeletal muscles leads to atrophy / L. A. Cea, B. A. Cisterna, C. Puebla [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – Vol. 110, No 40. – Pp. 16229-16234.
98. Decker, M. M. Denervation-induced alterations of acetylcholinesterase in denervated and nondenervated muscle / M. M. Decker, H. A. Berman // *Exp Neurol.* – 1990. – Vol. 109, No 2. – Pp. 247-255.
99. Defective mitochondrial dynamics is an early event in skeletal muscle of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model / G. Luo, J. Yi, C. Ma [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, No 12. – e82112.
100. Defective neuromuscular transmission in the SOD1 G93A transgenic mouse improves after administration of human umbilical cord blood cells / N. Souayah, K. M. Coakley, R. Chen [et al.] // *Stem Cell Rev Rep.* – 2012. – Vol. 8, No 1. – Pp. 224-228.
101. Defects in Synapse Structure and Function Precede Motor Neuron Degeneration in Drosophila Models of FUS-Related ALS / M. Shahidullah, S. J. L. Marchand, H. Fei [et al.] // *J Neurosci.* – 2013. – Vol. 33, No 50. – Pp. 19590-19598.
102. Defects in synaptic transmission at the neuromuscular junction precede motor deficits in a TDP-43Q331K transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis / K. K. Chand, K. M. Lee, J. D. Lee [et al.] // *FASEB J.* – 2018. – Vol. 32, No 5. – Pp. 2676-2689.
103. Developing a simple laboratory test for Alzheimer's disease : measuring acetylcholinesterase in saliva – a pilot study / P. F. Boston, K. Gopalkaje, L.

- Manning [et al.] // *Int J Geriatr Psychiatry*. – 2008. – Vol. 23, No 4. – Pp. 439-440.
104. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF / R. W. Oppenheim, L. J. Houenou, J. E. Johnson [et al.] // *Nature*. – 1995. – Vol. 373, No 6512. – Pp. 344-346.
105. Development and evaluation of a clinical staging system for amyotrophic lateral sclerosis / A. Chiò, E. R. Hammond, G. Mora [et al.] // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 2015. – Vol. 86, No 1. – Pp. 38-44.
106. Diagnostic Utility of Gold Coast Criteria in Amyotrophic Lateral Sclerosis / A. Hannaford, N. Pavey, M. van den Bos [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2021. – Vol. 89, No 5. – Pp. 979-986.
107. Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses / D. Gitler, Y. Takagishi, J. Feng [et al.] // *J. Neurosci*. – 2004. – Vol. 24, No 50. – Pp. 11368-11380.
108. Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction / N. C. Day, S. J. Wood, P. G. Ince [et al.] // *J Neurosci*. – 1997. – Vol. 17, No 16. – Pp. 6226-6235.
109. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy : a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis / Y. Riku, N. Atsuta, M. Yoshida [et al.] // *BMJ Open*. – 2014. – Vol. 4, No 5. – e005213.
110. Differentiation between primary lateral sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis : examination of symptoms and signs at disease onset and during follow-up / M. C. Tartaglia, A. Rowe, K. Findlater [et al.] // *Arch Neurol*. – 2007. – Vol. 64, No 2. – Pp. 232-236.
111. Disruption of Trkb-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions / M. Gonzalez, F. P. Ruggiero, Q. Chang [et al.] // *Neuron*. – 1999. – Vol. 24, No 3. – Pp. 567-583.
112. Distinct Changes in Synaptic Protein Composition at Neuromuscular Junctions of Extraocular Muscles versus Limb Muscles of ALS Donors / J. X. Liu,

- T. Brännström, P. M. Andersen, F. Pedrosa-Domellöf // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, No 2. – e57473.
113. Dormann, D. TDP-43 and FUS : a nuclear affair / D. Dormann, C. Haass // Trends Neurosci. – 2011. – Vol. 34, No 7. – Pp. 339-348.
114. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II / L. Lacomblez, G. Bensimon, P. N. Leigh [et al.] // Lancet. – 1996. – Vol. 347, No 9013. – Pp. 1425-1431.
115. Dysfunction of Neuromuscular Synaptic Transmission and Synaptic Vesicle Recycling in Motor Nerve Terminals of mSOD1 Transgenic Mice with Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis / M. A. Mukhamedyarov, P. N. Grigoryev, G. A. Khisamieva [et al.] // BioNanoScience. – 2019. – Vol. 9. – Pp. 66-73.
116. Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations : a new mechanism for ALS / A. Emde, C. Eitan, L. Liou [et al.] // EMBO J. – 2015. – Vol. 34, No 21. – Pp. 2633-2651.
117. Early alterations in structural and functional properties in the neuromuscular junctions of mutant FUS mice / M. A. Mukhamedyarov, A. N. Khabibrakhmanov, V. F. Khuzakhmetova [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24, No 10. – Pp. 9022.
118. Early and Selective Loss of Neuromuscular Synapse Subtypes with Low Sprouting Competence in Motoneuron Diseases / D. Frey, C. Schneider, L. Xu [et al.] // J Neurosci. – 2000. – Vol. 20, No 7. – Pp. 2534-2542.
119. Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset / M. C. Rocha, P. A. Pousinha, A. M. Correia [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, No 9. – e73846.
120. Early detachment of neuromuscular junction proteins in ALS mice with SODG93A mutation / H. Narai, Y. Manabe, M. Nagai M [et al.] // Neurol Int. – 2009. – Vol. 1, No 1. – e16.

121. Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis / C. Casas, M. Herrando-Grabulosa, R. Manzano [et al.] // *Brain Behav.* – 2013. – Vol. 3, No 2. – Pp. 145-158.
122. Effect of genetic background on phenotype variability in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis : a window of opportunity in the search for genetic modifiers / T. D. Heiman-Patterson, R. B. Sher, E. A. Blankenhorn [et al.] // *Amyotroph Lateral Scler.* – 2011. – Vol 12, No 2. – Pp. 79-86.
123. Effects of ALS-related SOD1 mutants on dynein- and KIF5-mediated retrograde and anterograde axonal transport / P. Shi, A. L. Ström, J. Gal, H. Zhu // *Biochimica et biophysica acta.* – 2010. – Vol. 1802, No 9. – P. 707.
124. EFNS guidelines on the clinical management of amyotrophic lateral sclerosis (MALS) – revised report of an EFNS task force / P. M. Andersen, S. Abrahams, G. D. Borasio [et al.] // *Eur J Neurol.* – 2012. – Vol. 19, No 3. – Pp. 360-375.
125. Eisen, A. Corticomotorneuronal hyper-excitability in amyotrophic lateral sclerosis / A. Eisen, M. Nakajima, M. Weber // *J Neurol Sci.* – 1998. – Vol. 160, No 1. – Pp. 64-68.
126. El Escorial revisited : Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis / B. R. Brooks, R. G. Miller, M. Swash, T. L. Munsat // *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders.* – 2000. – Vol. 1, No 5. – Pp. 293-299.
127. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS / M. de Carvalho, R. Dengler, A. Eisen [et al.] // *Clinical Neurophysiology.* – 2008. – Vol. 119, No 3. – Pp. 497-503.
128. Endplate denervation correlates with Nogo-A muscle expression in amyotrophic lateral sclerosis patients / G. Bruneteau, S. Bauché, J. L. Gonzalez de Aguilar [et al.] // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2015. – Vol. 2, No 4. – Pp. 362-372.
129. Evaluation of salivary acetylcholinesterase and pseudoacetylcholinesterase in patients with Alzheimer's disease : A case-control study / F. Ahmadi-Motamayel,

- M. T. Goodarzi, S. Tarazi [et al.] // *Spec Care Dentist.* – 2019. – Vol. 39, No 1. – Pp. 39-44.
130. Evaluation of the Golgi trafficking protein VPS54 (wobbler) as a candidate for ALS / M. H. Meisler, C. Russ, K. T. Montgomery [et al.] // *Amyotroph Lateral Scler.* – 2008. – Vol. 9, No 3. – Pp. 141-148.
131. Evans, R. M. Presynaptic Ca²⁺ channels ñ integration centers for neuronal signaling pathway / R. M. Evans, G. W. Zamponi // *Trends Neurosci.* – 2006. – Vol. 29. – Pp.617-624.
132. Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons / M. Matteoli, K. Takei, M. S. Penn [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1992. – Vol. 117. – Pp. 849-861.
133. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis / M. DeJesus-Hernandez, I. R. Mackenzie, B. F. Boeve [et al.] // *Neuron.* – 2011. – Vol. 72, No 2. – Pp. 245-256.
134. Expression of synapsin I correlates with maturation of the neuromuscular synapse / B. Lu, A. J. Czernik, S. Popov [et al.] // *Neuroscience.* – 1996. – Vol. 74, No 4. – Pp. 1087-1097.
135. Extracellular vesicles from a muscle cell line (C2C12) enhance cell survival and neurite outgrowth of a motor neuron cell line (NSC-34) / R. D. Madison, C. McGee, R. Rawson, G. A. Robinson // *J Extracell Vesicles.* – 2014. – Vol. 3. – Pp. 22865.
136. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content / K. J. De Vos, A. L. Chapman, M. E. Tennant [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2007. – Vol. 16, No 22. – Pp. 2720-2728.
137. Feeding difficulties, a key feature of the Drosophila NDUFS4 mitochondrial disease model / S. Foriel, J. Beyrath, I. Eidhof [et al.] // *Dis Model Mech.* – 2018. – Vol. 11, No 3. – dmm032482.

138. Fernandez, H. L. Skeletal muscle acetylcholinesterase molecular forms in amyotrophic lateral sclerosis / H. L. Fernandez, J. R. Stiles, J. A. Donoso // *Muscle Nerve*. – 1986. – Vol. 9, No 5. – Pp. 399-406.
139. Festoff, B. W. Plasma and red blood cell acetylcholinesterase in amyotrophic lateral sclerosis / B. W. Festoff, H. L. Fernandez // *Muscle Nerve*. – 1981. – Vol. 4, No 1. – Pp. 41-47.
140. Fiji : an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // *Nat Methods*. – 2012. – Vol. 9, No 7. – Pp. 676-682.
141. Focus on the heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis / C. Bendotti, V. Bonetto, E. Pupillo [et al.] // *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. – 2020. – Vol. 21, No 7-8. – Pp. 485-495.
142. Freibaum, B. D. The Role of Dipeptide Repeats in C9ORF72-Related ALS-FTD / B. D. Freibaum, J. P. Taylor // *Front Mol Neurosci*. – 2017. – Vol. 10. – P. 35.
143. Frequentin/NCS-1 and the Ca²⁺-channel alpha1-subunit co-regulate synaptic transmission and nerve-terminal growth / J. S. Dason, J. Romero-Pozuelo, L. Marin [et al.] // *J Cell Sci*. – 2009. – Vol. 122. – Pp. 4109-4121.
144. Functional recovery in new mouse models of ALS/FTLD after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43 / A. K. Walker, K. J. Spiller, G. Ge [et al.] // *Acta Neuropathol*. – 2015. – Vol. 130, No 5. – Pp. 643-660.
145. Functional studies of the parotid and pancreas glands in amyotrophic lateral sclerosis / R. J. Charchafli, L. B. Fernandez, C. J. Percec [et al.] // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 1974. – Vol. 37. – Pp. 863-867.
146. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice / T. A. Shelkownikova, O. M. Peters, A. V. Deykin [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2013. – Vol. 288, No 35. – Pp. 25266-25274.
147. FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis / G.

- Picchiarelli, M. Demestre, A. Zuko [et al.] // *Nat Neurosci.* – 2019. – Vol. 22, No 11. – Pp. 1793-1805.
148. Gender-Specific Mechanism of Synaptic Impairment and Its Prevention by GCSF in a Mouse Model of ALS / N. Naumenko, E. Pollari, A. Kurronen [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2011. – Vol. 5. – Pp. 26.
149. Gene Therapy for ALS-A Perspective / M. Cappella, C. Ciotti, M. Cohen-Tannoudji, M. G. Biferi // *IJMS.* – 2019. – Vol. 20, No 18. – Pp. 4388.
150. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis : a systematic review and meta-analysis / Z. Y. Zou, Z. R. Zhou, C. H. Che [et al.] // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2017. – Vol. 88, No 7. – Pp. 540-549.
151. Genetic overlap between apparently sporadic motor neuron diseases / M. van Blitterswijk, L. Vlam, M. A. van Es [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, No 11. – e48983.
152. Ghasemi, M. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis // M. Ghasemi, R. H. Brown // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2018. – Vol. 8, No 5. – a024125.
153. Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction / C. R. Keller-Peck, G. Feng, J. R. Sanes [et al.] // *J Neurosci.* – 2001. – Vol. 21, No 16. – Pp. 6136-6146.
154. Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis : a Systematic Review of the Published Literature / A. Chiò, G. Logroscino, B. Traynor [et al.] // *Neuroepidemiology.* – 2013. – Vol. 41, No 2. – Pp. 118-130.
155. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 / V. L. Feigin, E. Nichols, T. Alam [et al.] // *The Lancet Neurology.* – 2019. – Vol. 18, No 5. – Pp. 459-480.
156. Gold Coast diagnostic criteria : Implications for ALS diagnosis and clinical trial enrollment / S. Vucic, T. A. Ferguson, C. Cummings [et al.] // *Muscle Nerve.* – 2021. – Vol. 64, No 5. – Pp. 532-537.

157. Gozutok, O. Mutations and Protein Interaction Landscape Reveal Key Cellular Events Perturbed in Upper Motor Neurons with HSP and PLS / O. Gozutok, B. R. Helmold, P. H. Ozdinler // *Brain Sciences*. – 2021. – Vol. 11, No 5. – Pp. 578.
158. Greenfield, S. A. A Non-Cholinergic Function for Acetylcholinesterase / S. A. Greenfield // In : *Enzymes of the Cholinesterase Family*. – Springer US, 1995. – Pp. 415-421.
159. Grosskreutz, J. Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis / J. Grosskreutz, L. Van Den Bosch, B. U. Keller // *Cell Calcium*. – 2010. – Vol. 47, No 2. – Pp. 165-174.
160. Grubič, Z. Developmental Expression of Acetylcholinesterase in Skeletal Muscle / Z. Grubič, A. F. Miranda // In : *Enzymes of the Cholinesterase Family*. – Springer US, 1995. – Pp. 37-43.
161. Heckman, C. J. Motor unit / C. J. Heckman, R. M. Enoka // *Compr Physiol*. – 2012. – Vol. 2, No 4. – Pp. 2629-2682.
162. Hegedus, J. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis / J. Hegedus, C. T. Putman, T. Gordon T // *Neurobiol Dis*. – 2007. – Vol. 28, No 2. – Pp. 154-164.
163. Hennig, R. Firing patterns of motor units in normal rats / R. Hennig, T. Lømo // *Nature*. – 1985. – Vol. 314, No 6007. – Pp. 164-166.
164. Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons / Y. Yamamoto, J. Livet, R. A. Pollock [et al.] // *Development*. – 1997. – Vol. 124, No 15. – Pp. 2903-2913.
165. Hepatocyte growth factor promotes motor neuron survival and synergizes with ciliary neurotrophic factor / V. Wong, D. J. Glass, R. Arriaga R [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272, No 8. – Pp. 5187-5191.
166. Hexanucleotide repeat expansions in C9ORF72 in the spectrum of motor neuron diseases / W. van Rheenen, M. van Blitterswijk, M. H. B. Huisman [et al.] // *Neurology*. – 2012. – Vol. 79, No 9. – Pp. 878-882.

167. Hodel, A. SNAP-25 / A. Hodel // *Int J Biochem Cell Biol.* – 1998. – Vol. 30, No 10. – Pp. 1069-1073.
168. Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme / K. Ohno, I. Brengman, A. Tsujino, A. G. Engel // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95, No 16. – Pp. 9654-9659.
169. Identification of a novel interaction of FUS and syntaphilin may explain synaptic and mitochondrial abnormalities caused by ALS mutations / S. Salam, S. Tacconelli, B. N. Smith [et al.] // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11, No 1. – P. 13613.
170. Immunohistochemical study on choline acetyltransferase in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis / Y. Oda, S. Imai, I. Nakanishi [et al.] // *Pathol Int.* – 1995. – Vol. 45, No 12. – Pp. 933-939.
171. Impaired salivary gland function reveals autonomic dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis / R. Giess, E. Werner, M. Beck [et al.] // *J Neurol.* – 2002. – Vol. 249. – Pp. 1246-1249.
172. Impaired signaling for neuromuscular synaptic maintenance is a feature of Motor Neuron Disease / Q. Ding, K. Kesavan, K. M. Lee [et al.] // *Acta Neuropathol Commun.* – 2022. – Vol. 10. – Pp. 61.
173. Implications of ALS focality : rostral-caudal distribution of lower motor neuron loss postmortem / J. Ravits, P. Laurie, Y. Fan, D. H. Moore // *Neurology.* – 2007. – Vol. 68. – Pp. 1576-1582.
174. Importance of lipids for upper motor neuron health and disease / A. Gunay, H. H. Shin, O. Gozutok [et al.] // *Seminars in Cell & Developmental Biology.* – 2021. – Vol. 112. – Pp. 92-104.
175. In vitro and in vivo models of amyotrophic lateral sclerosis : an updated overview / A. M. Gois, D. F. M. Mendonça, M. A. M. Freire, J. R. Santos // *Brain Research Bulletin.* – 2020. – Vol. 159. – Pp. 32-43.
176. Inducible expression of human C9ORF72 36x G4C2 hexanucleotide repeats is sufficient to cause RAN translation and rapid muscular atrophy in mice / F. W.

- Riemslogh, E. C. van der Toorn, R. F. M. Verhagen [et al.] // *Dis Model Mech.* – 2021. – Vol. 14, No 2. – dmm.044842.
177. Inestrosa, N. C. Effects of denervation and of axoplasmic transport blockage on the in vitro release of muscle endplate acetylcholinesterase / N. C. Inestrosa, B. U. Ramírez, H. L. Fernández // *J Neurochem.* – 1977. – Vol. 28, No 5. – Pp. 941-945.
178. Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase activation and mutant SOD1(G93A)-induced motor neuron death / M. Dewil, V. F. dela Cruz, L. Van Den Bosch, W. Robberecht // *Neurobiol Dis.* – 2007. – Vol. 26, No 2. – Pp. 332-341.
179. Interaction between familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked SOD1 mutants and the dynein complex / F. Zhang, A. L. Ström, K. Fukada [et al.] // *J Biol Chem.* – 2007. – Vol. 282, No 22. – Pp. 16691-16699.
180. Interactions between intrinsic regulation and neural modulation of acetylcholinesterase in fast and slow skeletal muscles / J. Sketelj, N. Crne-Finderle, S. Ribaric, M. Brzin // *Cell Mol Neurobiol.* – 1991. – Vol. 11, No 1. – Pp. 35-54.
181. Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells / L. I. Grad, W. C. Guest, A. Yanai [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108, No 39. – Pp. 16398-16403.
182. Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis / T. Nomura, S. Watanabe, K. Kaneko [et al.] // *J Biol Chem.* – 2014. – Vol. 289, No 2. – Pp. 1192-1202.
183. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons / B. J. Wainger, E. Kiskinis, C. Mellin [et al.] // *Cell Rep.* – 2014. – Vol. 7, No 1. – Pp. 1-11.
184. Jahn, R. Membrane fusion / R. Jahn, T. Lang, T. C. Sudhof // *Cell.* – 2003. – Vol. 112. – Pp.519-533.
185. Jaiswal, M. K. Riluzole But Not Melatonin Ameliorates Acute Motor Neuron Degeneration and Moderately Inhibits SOD1-Mediated Excitotoxicity

- Induced Disrupted Mitochondrial Ca²⁺ Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis / M. K. Jaiswal // *Front Cell Neurosci.* – 2016. – Vol. 10. – P. 295.
186. Jang, Y. C. Age-associated alterations of the neuromuscular junction / Y. C. Jang, H. Van Remmen // *Exp Gerontol.* – 2011. – Vol 46, No 2-3. – Pp. 193-198.
187. Juliana, T. H. Release of acetylcholinesterase by cultured spinal cord cells / T. H. Juliana, J. Y. Chyu, S. R. Max // *J Neurobiol.* – 1977. – Vol. 8, No 5. – Pp. 469-476.
188. Kalckar, H. M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes ; determination of hydroxypurine compounds / H. M. Kalckar // *J Biol Chem.* – 1947. – Vol. 167. – Pp. 429-443.
189. Karlsson, E. Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* / E. Karlsson, P. M. Mbugua, D. Rodriguez-Ithurralde // *J Physiol (Paris).* – 1984. – Vol. 79, No 4. – Pp. 232-240.
190. Kernell, D. Input conductance axonal conduction velocity and cell size among hindlimb motoneurons of the cat / D. Kernell, B. Zwaagstra // *Brain Res.* – 1981. – Vol. 204, No 2. – Pp. 311-326.
191. Kiernan, J. A. Changes in sizes of cortical and lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis / J. A. Kiernan, A. J. Hudson // *Brain.* – 1991. – Vol. 114. – Pp. 843-853.
192. Liewluck, T. Progressive Muscular Atrophy / T. Liewluck, D. S. Saperstein // *Neurologic Clinics.* – 2015. – Vol. 33, No 4. – Pp. 761-773.
193. Lifetime Risk and Heritability of Amyotrophic Lateral Sclerosis / M. Ryan, M. Heverin, R. L. McLaughlin, O. Hardiman // *JAMA Neurol.* – 2019. – Vol. 76, No 11. – Pp. 1367-1374.
194. Local RNA Translation at the Synapse and in Disease / L. Liu-Yesucevitz, G. J. Bassell, A. D. Gitler [et al.] // *J Neurosci.* – 2011. – Vol. 31, No 45. – Pp. 16086-16093.

195. Loss of cholinergic synapses on the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis / M. Nagao, H. Misawa, S. Kato, S. Hirai // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 1998. – Vol. 57, No 4. – Pp. 329-333.
196. Manders, E. M. M. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images / E. M. M. Manders, F. J. Verbeek, J. A. Aten // *J Microsc.* – 1993. – Vol. 169, No 3. – Pp. 375-382.
197. Marinesco-Sjögren syndrome protein SIL1 regulates motor neuron subtype-selective ER stress in ALS / A. Filézac de L'Etang, N. Maharjan, M. Cordeiro Braña [et al.] // *Nat Neurosci.* – 2015. – Vol. 18, No 2. – Pp. 227-238.
198. Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis : a randomized clinical trial / J. S. Mora, A. Genge, A. Chio [et al.] // *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* – 2020. – Vol. 21, No 1-2. – Pp. 5-14.
199. Masrori, P. Amyotrophic lateral sclerosis : a clinical review / P. Masrori, P. Van Damme // *Eur J Neurol.* – 2020. – Vol. 27, No 10. – Pp. 1918-1929.
200. McAlary, L. The prion-like nature of amyotrophic lateral sclerosis / L. McAlary, J. J. Yerbury, N. R. Cashman // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2020. – Vol. 175. – Pp. 261-296.
201. Membrane area and dendritic structure in type-identified triceps surae alpha motoneurons / S. Cullheim, J. W. Fleshman, L. L. Glen, R. E. Burke // *J Comp Neurol.* – 1987. – Vol. 255, No 1. – Pp. 68-81.
202. Mendell, L. M. The size principle : a rule describing the recruitment of motoneurons / L. M. Mendell // *J Neurophysiol.* – 2005. – Vol. 93, No 6. – Pp. 3024-3026.
203. Merico, A. Autonomic dysfunction in the early stage of ALS with bulbar involvement / A. Merico, M. Cavinato // *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis.* – 2011. – Vol. 12. – Pp. 363-367.
204. Milovanovic, D. Synaptic vesicle clusters at synapses : a distinct liquid phase? / D. Milovanovic, P. De Camilli // *Neuron.* – 2017. – Vol. 93, No 5. – Pp. 995-1002.

205. MiR-206, a Key Modulator of Skeletal Muscle Development and Disease / G. Ma, Y. Wang, Y. Li [et al.] // *Int J Biol Sci.* – 2015. – Vol. 11, No 3. – Pp. 345-352.
206. Mitochondrial abnormalities and disruption of the neuromuscular junction precede the clinical phenotype and motor neuron loss in hFUSWT transgenic mice / E. So, J. C. Mitchell, C. Memmi [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2018. – Vol. 27, No 3. – Pp. 463-474.
207. Mitsumoto, H. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis : why so many negative trials and how can trials be improved? / H. Mitsumoto, B. R. Brooks, V. Silani // *The Lancet Neurology.* – 2014. – Vol. 13, No 11. – Pp. 1127-1138.
208. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid / J. R. Atack, E. K. Perry, J. R. Bonham, R. H. Perry // *J Neurochem.* – 1987. – Vol. 48, No 6. – Pp. 1845-1850.
209. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation / M. E. Gurney, H. Pu, A. Y. Chiu [et al.] // *Science.* – 1994. – Vol. 264, No 5166. – Pp. 1772-1775.
210. Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia / J. R. Burrell, M. C. Kiernan, S. Vucic, J. R. Hodges // *Brain.* – 2011. – Vol. 134, No 9. – Pp. 2582-2594.
211. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders / T. G. Beach, C. H. Adler, L. I. Sue [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2010. – Vol. 119, No 6. – Pp. 689-702.
212. Münch, C. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells / C. Münch, J. O'Brien, A. Bertolotti // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108, No 9. – Pp. 3548-3553.
213. Murthy, N. V. Cell biology of the presynaptic terminal / N. V. Murthy, P. DeCamilli // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2003. – Vol. 26. – Pp.701-728.
214. Muscle cells of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients secrete neurotoxic vesicles / L. Le Gall, W. J. Duddy, C. Martinat [et al.] // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* – 2022. – Vol. 13, No 2. – Pp. 1385-1402.

215. Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model / G. Dobrowolny, C. Giacinti, L. Pelosi, [et al.] // *J Cell Biol.* – 2005. – Vol. 168, No 2. – Pp. 193-199.
216. MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction / A. Cartaud, L. Strohlic, M. Guerra [et al.] // *J Cell Biol.* – 2004. – Vol. 165, No 4. – Pp. 505-515.
217. Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic) / C. Donger, E. Krejci, A. P. Serradell [et al.] // *Am J Hum Genet.* – 1998. – Vol. 63, No 4. – Pp. 967-975.
218. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis / D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson D [et al.] // *Nature.* – 1993. – Vol. 362, No 6415. – Pp. 59-62.
219. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis / T. J. Kwiatkowski, D. A. Bosco, A. L. Leclerc [et al.] // *Science.* – 2009. – Vol. 323, No 5918. – Pp. 1205-1208.
220. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants / L. C. Wijesekera, S. Mathers, P. Talman [et al.] // *Neurology.* – 2009. – Vol. 72, No 12. – Pp. 1087-1094.
221. Navazesh, M. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures / M. Navazesh, C. M. Christensen // *J Dent Res.* – 1982. – Vol. 61, No 10. – Pp. 1158-1162.
222. Nearly 30 Years of Animal Models to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis : A Historical Overview and Future Perspectives / T. Bonifacino, R. A. Zerbo, M. Balbi [et al] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, No 22. – P. 12236.
223. Neuromuscular junction disassembly and muscle fatigue in mice lacking neurotrophin-4 / N. Belluardo, H. Westerblad, G. Mudó [et al.] // *Mol Cell Neurosci.* – 2001. – Vol. 18, No 1. – Pp. 56-67.

224. Neuromuscular Junction Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis / S. Verma, S. Khurana, A. Vats [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2022. – Vol. 59, No 3. – Pp. 1502-1527.
225. Neuromuscular junction immaturity and muscle atrophy are hallmarks of the ColQ-deficient mouse, a model of congenital myasthenic syndrome with acetylcholinesterase deficiency / S. M. Sigoillot, F. Bourgeois, J. Karmouch [et al.] // *FASEB J.* – 2016. – Vol. 30, No 6. – Pp. 2382-2399.
226. Neuromuscular Junction Impairment in Amyotrophic Lateral Sclerosis : Reassessing the Role of Acetylcholinesterase / M. L. Campanari, M. S. García-Ayllón, S. Ciura [et al.] // *Front Mol Neurosci.* – 2016. – Vol. 9. – P. 160.
227. Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis / R. A. Maselli, R. L. Wollman, C. Leung [et al.] // *Muscle Nerve.* – 1993. – Vol. 16, No 11. – Pp. 1193-1203.
228. Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration / A. Kaplan, K. J. Spiller, C. Towne [et al.] // *Neuron.* – 2014. – Vol. 81, No. 2. – Pp. 333-348.
229. Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival / S. Saxena, F. Roselli, K. Singh [et al.] // *Neuron.* – 2013. – Vol. 80, No 1. – Pp. 80-96.
230. Neurturin is a PGC-1 α 1-controlled myokine that promotes motor neuron recruitment and neuromuscular junction formation / R. Mills, H. Taylor-Weiner, J. C. Correia [et al.] // *Mol Metab.* – 2017. – Vol. 7. – Pp. 12-22.
231. Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system / E. X. Albuquerque, E. F. Pereira, N. G. Castro [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 1995. – Vol. 757. – Pp. 48-72.
232. Niebrój-Dobosz, I. Cytotoxic activity of serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients against acetylcholinesterase / I. Niebrój-Dobosz, I. Domitrz, A. Mickielewicz // *Folia Neuropathol.* – 1999. – Vol. 37. – Pp. 107-112.

233. Niebroj-Dobosz, I. Serum cholinesterase activity in infantile and juvenile spinal muscular atrophy / I. Niebroj-Dobosz, I. Hausmanowa-Petrusewicz // *Acta Neurol Scand.* – 1989. – Vol. 80, No 3. – Pp. 208-214.
234. Nijssen, J. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis / J. Nijssen, L. H. Comley, E. Hedlund // *Acta Neuropathol.* – 2017. – Vol. 133, No 6. – Pp. 863-885.
235. Nishimune, H. Practical anatomy of the neuromuscular junction in health and disease / H. Nishimune, K. Shigemoto // *Neurol Clin.* – 2018. – Vol. 3, No 2. – Pp. 231-240.
236. Non-Motor Symptoms in Patients Suffering from Motor Neuron Diseases / R. Günther, N. Richter, A. Sauerbier [et al.] // *Front Neurol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 117.
237. Normal human serum contains two forms of acetylcholinesterase / K. Sorensen, U. Brodbeck, A. G. Rasmussen, B. Norgaard-Pedersen // *Clin Chim Acta.* – 1986. – Vol. 158, No 1. – Pp. 1-6.
238. Novel Genetic Signatures Associated With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis / R. Logan, J. Dubel-Haag, N. Scholnicov, S. J. Miller // *Front Genet.* – 2022. – Vol. 13. – Pp. 851496.
239. On functions of cholinesterases during embryonic development / L. E. Paroanu, G. Steinert, J. Klaczinski [et al.] // *J Mol Neurosci.* – 2006. – Vol. 30, No 1-2. – Pp. 201-204.
240. Onset and spreading patterns of upper and lower motor neuron symptoms in amyotrophic lateral sclerosis / S. Körner, K. Kollwe, M. Fahlbusch [et al.] // *Muscle Nerve.* – 2011. – Vol. 43, No 5. – Pp. 636-642.
241. Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin 1 during Ca²⁺ dependent glutamate release in isolated nerve terminals / J. N. Jovanovic, T. S. Sihra, A. C. Narin [et al.] // *J Neurosci.* – 2001. – Vol. 21. – Pp. 7944-7953.
242. Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis / B. Halter, J. L. Gonzalez de

- Aguilar, F. Rene F [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2010. – Vol. 48, No 7. – Pp. 915-923.
243. Pamphlett, R. Motor neuron disease : a primary disorder of corticomotoneurons? / R. Pamphlett, J. Kril, T. M. Hng // *Muscle Nerve.* – 1995. – Vol. 18, No 3. – Pp. 314-318.
244. Parkinson's disease with involvement of the parasympathetic ganglia / S. Takeda, K. Yamazaki, T. Miyakawa, H. Arai // *Acta Neuropathol (Berl).* – 1993. – Vol. 86. – Pp. 397-398.
245. Pathophysiology and Treatment of Non-motor Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis / C. J. Mahoney, R. M. Ahmed, W. Huynh [et al.] // *CNS Drugs.* – 2021. – Vol. 35, No 5. – Pp. 483-505.
246. Pérez-González, A. OH radical scavenging activity of Edaravone : mechanism and kinetics / A. Pérez-González, A. Galano // *J Phys Chem B.* – 2011. – Vol. 115, No 5. – Pp. 1306-1314.
247. Peters, O. M. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS / O. M. Peters, M. Ghasemi, R. H. Brown // *J Clin Invest.* – 2015. – Vol. 125, No 5. – Pp. 1767-1779.
248. Phenotypic and molecular analyses of primary lateral sclerosis / H. Mitsumoto, P. L. Nagy, C. Gennings [et al.] // *Neurol Genet.* – 2015. – Vol. 1, No 1. – e3.
249. Phosphorylated neurofilament heavy subunit (pNF-H) in peripheral blood and CSF as a potential prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis / K. B. Boylan, J. D. Glass, J. E. Crook [et al.] // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2013. – Vol. 84, No 4. – Pp. 467-472.
250. Phukan, J. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis / J. Phukan, N. P. Pender, O. Hardiman // *Lancet Neurol.* – 2007. – Vol. 6, No 11. – Pp. 994-1003.
251. pNfH is a promising biomarker for ALS / J. Ganesalingam, J. An, R. Bowser [et al.] // *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* – 2013. – Vol. 14, No 2. – Pp. 146-149.

252. Post-hoc analysis of MCI186-17, the extension study to MCI186-16, the confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of edaravone in amyotrophic lateral sclerosis / F. Takahashi, K. Takei, K. Tsuda, J. Palumbo // *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* – 2017. – Vol. 18. – Pp. 32-39.
253. Potentiation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) activity by an antibody : supportive evidence for enhancement of IGF-I bioavailability in vivo by IGF binding proteins / C. E. Stewart, P. C. Bates, T. A. Calder [et al.] // *Endocrinology.* – 1993. – Vol. 133, No 3. – Pp. 1462-1465.
254. Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis / J. Hegedus, C. T. Putman, N. Tyreman, T. Gordon // *J Physiol.* – 2008. – Vol. 586, No 14. – Pp. 3337-3351.
255. Primary Lateral Sclerosis / J. M. Statland, R. J. Barohn, M. M. Dimachkie [et al.] // *Neurologic Clinics.* – 2015. – Vol. 33, No 4. – Pp. 749-760.
256. Primary lateral sclerosis / M. A. Singer, J. M. Statland, G. I. Wolfe, R. J. Barohn // *Muscle Nerve.* – 2007. – Vol. 35, No 3. – Pp. 291-302.
257. Primary lateral sclerosis. Clinical features, neuropathology and diagnostic criteria / C. E. Pringle, A. J. Hudson, D. G. Munoz [et al.] // *Brain.* – 1992. – Vol. 115. – Pp. 495-520.
258. Prognosis and epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis : Analysis of a clinic population, 1997-2011 / K. Traxinger, C. Kelly, B. A. Johnson [et al.] // *Neurol Clin Pract.* – 2013. – Vol. 3, No 4. – Pp. 313-320.
259. Progression of cortical and spinal dysfunctions over time in amyotrophic lateral sclerosis // S. Attarian, J. P. Vedel, J. Pouget, A. Schmied // *Muscle Nerve.* – 2008. – Vol. 37, No 3. – Pp. 364-375.
260. Queralt, A. A. Linkers, packages and pathways : new concepys in axonal transport / A. A. Queralt, L. S. B. Goldstein // *Curr. Opin. in Neurobiol.* – 2001. – Vol. 11. – Pp. 550-557.
261. Real-world evidence of riluzole effectiveness in treating amyotrophic lateral sclerosis / J. A. Andrews, C. E. Jackson, T. D. Heiman-Patterson [et al.] //

- Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. – 2020. – Vol. 21, No 7-8. – Pp. 509-518.
262. Reduced calreticulin levels link endoplasmic reticulum stress and Fas-triggered cell death in motoneurons vulnerable to ALS / N. Bernard-Marissal, A. Moumen, C. Sunyach [et al.] // *J Neurosci.* – 2012. – Vol. 32, No 14. – Pp. 4901-4912.
263. Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin / C. Y. Wang, F. Yang, X. P. He [et al.] // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, No 12. – Pp. 10614-10625.
264. Remodeling of the neuromuscular junction in mice with deleted exons 5 and 6 of acetylcholinesterase / E. Girard, V. Bernard, S. Camp [et al.] // *J Mol Neurosci.* – 2006. – Vol. 30, No 1-2. – Pp. 99-100.
265. Retrograde signaling onto Ret during motor nerve terminal maturation / C. Baudet, E. Pozas, I. Adameyko [et al.] // *J Neurosci.* – 2008. – Vol. 28, No 4. – Pp. 963-975.
266. RIM1 forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release / S. Schoch, P. E. Castillo, T. Jo [et al.] // *Nature.* – 2002. – Vol. 415. – Pp.321-326.
267. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis / C. Ingre, P. M. Roos, F. Piehl [et al.] // *Clin Epidemiol.* – 2015. – Vol. 7. – Pp. 181-193.
268. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system / C. Ruiz de Almodovar, D. Lambrechts, M. Mazzone, P. Carmeliet // *Physiol Rev.* – 2009. – Vol. 89, No 2. – Pp. 607-648.
269. Rosenstein, J. M. VEGF in the nervous system / J. M. Rosenstein, J. M. Krum, C. Ruhrberg // *Organogenesis.* – 2010. – Vol. 6, No 2. – Pp. 107-114.
270. ROS-related Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle of an ALS Mouse Model during the Disease Progression / Y. Xiao, C. Karam, J. Yi [et al.] // *Pharmacol Res.* – 2018. – Vol. 138. – Pp. 25-36.
271. Rotundo, R. L. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction / R. L. Rotundo // *J Neurocytol.* – 2003. – Vol. 32, No 5-8. – Pp. 743-766.

272. Rowland, L. P. Progressive muscular atrophy and other lower motor neuron syndromes of adults / L. P. Rowland // *Muscle Nerve*. – 2010. – Vol. 41, No 2. – Pp. 161-165.
273. Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease : a pilot study / F. Bermejo-Pareja, D. Antequera, T. Vargas [et al.] // *BMC Neurol*. – 2010. – Vol. 10. – P. 108.
274. Salivary Acetylcholinesterase Activity Is Increased in Parkinson's Disease : A Potential Marker of Parasympathetic Dysfunction / T. Fedorova, C. S. Knudsen, K. Mouridsen [et al.] // *Parkinson's Disease*. – 2015. – Vol. 2015. – Pp. 156479.
275. Salivary acetylcholinesterase as a biomarker for organophosphate exposure / V. Ng, D. Koh, A. Wee, S. E. Chia // *Occup Med (Lond)*. – 2009. – Vol. 59, No 2. – Pp. 120-122.
276. Salivary gland dysfunction and salivary redox imbalance in patients with Alzheimer's disease / A. Zalewska, A. Klimiuk, S. Zięba [et al.] // *Sci Rep*. – 2021. – Vol. 11, No 1. – Pp. 23904.
277. Saxena, S. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice / S. Saxena, E. Cabuy, P. Caroni // *Nat Neurosci*. – 2009. – Vol. 12, No 5. – Pp. 627-636.
278. Schmitt-John, T. VPS54 and the wobbler mouse / T. Schmitt-John // *Front Neurosci*. – 2015. – Vol. 9. – Pp. 381.
279. Schoch, S. Molecular organization of the presynaptic active zone / S. Schoch, E. D. Gundelfinger // *Cell Tissue Res*. – 2006. – Vol. 326. – Pp.379-391.
280. Schoser, B. G. Matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle / B. G. Schoser, D. Blottner // *Neuroreport*. – 1999. – Vol. 10, No 13. – Pp. 2795-2797.
281. SDH and actomyosin ATPase activities of different fiber types in rat diaphragm muscle / G. C. Sieck, W. Z. Zhan, Y. S. Prakash [et al.] // *J Appl Physiol (1985)*. – 1995. – Vol. 79, No 5. – Pp. 1629-1639.

282. Selective degeneration of a physiological subtype of spinal motor neuron in mice with SOD1-linked ALS / M. Hadzipasic, B. Tahvildari, M. Nagy [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – Vol. 111, No. 47. – Pp. 16883-16888.
283. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF / S. Pun, A. F. Santos, S. Saxena S [et al.] // *Nat Neurosci.* – 2006. – Vol. 9, No 3. – Pp. 408-419.
284. Serum neurofilament heavy chains as early marker of motor neuron degeneration / M. D. Schaepdryver, J. Goossens, S. D. Meyer [et al.] // *Annals of Clinical and Translational Neurology.* – 2019. – Vol. 6, No 10. – Pp. 1971-1979.
285. Shared polygenic risk and causal inferences in amyotrophic lateral sclerosis / S. Bandres-Ciga, A. J. Noyce, G. Hemani [et al.] // *Annals of Neurology.* – 2019. – Vol. 85, No 4. – Pp. 470-481.
286. Singh, N. Clinical Mimickers of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Conditions We Cannot Afford to Miss / N. Singh, S. Ray, A. Srivastava // *Ann Indian Acad Neurol.* – 2018. – Vol. 21, No 3. – Pp. 173-178.
287. Sketelj, J. Neural Regulation of Acetylcholinesterase Expression in Slow and Fast Muscles of the Rat / J. Sketelj, B. Črešnar // In : *Enzymes of the Cholinesterase Family.* – Springer US, 1995. – Pp. 253-259.
288. Slater, C. R. The Structure of Human Neuromuscular Junctions : Some Unanswered Molecular Questions / C. R. Slater // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18, No 10. – P. 2183.
289. Smith, E. F. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis / E. F. Smith, P. J. Shaw, K. J. De Vos // *Neurosci Lett.* – 2019. – Vol. 710. – Pp. 132933.
290. SNAP25 is a pre-synaptic target for the depressant action of reactive oxygen species on transmitter release / A. R. Giniatullin, F. Darios, A. Shakirzyanova [et al.] // *Journal of Neurochemistry.* – 2006. – Vol. 98, No 6. – Pp. 1789-1797.
291. Sollner, T. A. Protein assembly – disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion /

- T. A. Sollner, M. K. Bennett, S. W. Whiteheart // *Cell*. – 1993. – Vol. 75. – Pp. 409-418.
292. Specific impulse patterns regulate acetylcholinesterase activity in skeletal muscles of rats and rabbits / J. Sketelj, E. Leisner, B. Gohlsch [et al.] // *J Neurosci Res*. – 1997. – Vol. 47, No 1. – Pp. 49-57.
293. Spinal cord motoneurons express p75NGFR and p145trkB mRNA in amyotrophic lateral sclerosis / J. L. Seeburger, S. Tarras, H. Natter, J. E. Springer // *Brain Res*. – 1993. – Vol. 621, No 1. – Pp. 111-115.
294. Spinal Muscular Atrophy / S. Nicolau, M. A. Waldrop, A. M. Connolly, J. R. Mendell // *Semin Pediatr Neurol*. – 2021. – Vol. 37. – Pp. 100878.
295. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology / D. Grisaru, M. Sternfeld, A. Eldor [et al.] // *Eur J Biochem*. – 1999. – Vol. 264, No 3. – Pp. 672-686.
296. Study of 962 patients indicates progressive muscular atrophy is a form of ALS / W. K. Kim, X. Liu, J. Sandner [et al.] // *Neurology*. – 2009. – Vol. 73, No 20. – Pp. 1686-1692.
297. Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease / C. H. Adler, B. N. Dugger, M. L. Hinni, [et al.] // *Neurology*. – 2014. – Vol. 82. – Pp. 858-864.
298. Swinnen, B. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis / B. Swinnen, W. Robberecht // *Nat Rev Neurol*. – 2014. – Vol. 10, No 11. – Pp. 661-670.
299. Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of human umbilical cord blood cells genetically modified with adeno-viral vectors expressing a neuro-protective factor and a neural cell adhesion molecule / R. R. Islamov, A. A. Rizvanov, M. A. Mukhamedyarov [et al.] // *Current Gene Therapy*. – 2015. – Vol. 15, No 3. – Pp. 266-276.

300. Synapsins Are Downstream Players of the BDNF-Mediated Axonal Growth / A. Marte, M. Messa, F. Benfenati, F. Onofri // *Mol Neurobiol.* – 2017. – Vol. 54, No 1. – Pp. 484-494.
301. Synaptic FUS accumulation triggers early misregulation of synaptic RNAs in a mouse model of ALS / S. Sahadevan, K. M. Hembach, E. Tantardini [et al.] // *Nat Commun.* – 2021. – Vol. 12, No 1. – P. 3027.
302. Synaptic FUS Localization During Motoneuron Development and Its Accumulation in Human ALS Synapses / D. Deshpande, J. Higelin, M. Schoen [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2019. – Vol. 13. – P. 256.
303. Synaptic vesicle recycling in synapsin I knock-out mice / T. A. Ryan, L. Li, L. S. Chin [et al.] // *J Cell Biol.* – 1996. – Vol. 134, No 5. – Pp. 1219-1227.
304. Tandem Delivery of Multiple Therapeutic Genes Using Umbilical Cord Blood Cells Improves Symptomatic Outcomes in ALS / R. R. Islamov, A. A. Rizvanov, V. Y. Fedotova [et al.] // *Molecular Neurobiology.* – 2017. – Vol. 54, No 6. – Pp. 4756-4763.
305. Taylor, J. P. Decoding ALS : from genes to mechanism / J. P. Taylor, R. H. Brown, D. W. Cleveland // *Nature.* – 2016. – Vol. 539, No 7628. – Pp. 197-206.
306. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis / J. Sreedharan, I. P. Blair, V. B. Tripathi [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 319, No 5870. – Pp. 1668-1672.
307. Tedeschi, V. Calcium Dyshomeostasis and Lysosomal Ca²⁺ Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis / V. Tedeschi, T. Petrozziello, A. Secondo // *Cells.* – 2019. – Vol. 8, No 10. – P. 1216.
308. The ALSFRS as an outcome measure in therapeutic trials and its relationship to symptom onset / M. Proudfoot, A. Jones, K. Talbot [et al.] // *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* – 2016. – Vol. 17, No 5-6. – Pp. 414-425.
309. The ALSFRS-R : a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function / J. M. Cedarbaum, N. Stambler, E. Malta [et al.] // *Journal of the Neurological Sciences.* – 1999. – Vol. 169, No 1-2. – Pp. 13-21.

310. The asymmetric molecular forms of AChE and the expression of collagen Q in mature and immature fast and slow rat muscles / S. Glisović, M. Trinkaus, P. Pregelj, J. Sketelj // *Chem Biol Interact.* – 2010. – Vol. 187, No 1-3. – Pp. 90-95.
311. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase : cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring / J. Massoulié, S. Bon, N. Perrier, C. Falasca // *Chem Biol Interact.* – 2005. – Vol. 157-158. – Pp. 3-14.
312. The Extracellular Domain of Neurotrophin Receptor p75 as a Candidate Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis / S. R. Sheppard, T. Chataway, D. W. Schultz [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, No 1. – e87398.
313. The motor end-plate fine structure and ultrastructural localization of acetylcholine receptors in amyotrophic lateral sclerosis / M. Tsujihata, R. Hazama, T. Yoshimura [et al.] // *Muscle Nerve.* – 1984. – Vol. 7, No 3. – Pp. 243-249.
314. The natural history of primary lateral sclerosis / P. H. Gordon, B. Cheng, I. B. Katz [et al.] // *Neurology.* – 2006. – Vol. 66, No 5. – Pp. 647-653.
315. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model / N. Jokic, J. L. Gonzalez de Aguilar, L. Dimou [et al.] // *EMBO Rep.* – 2006. – Vol. 7, No 11. – Pp. 1162-1167.
316. The Neurotoxicity of Vesicles Secreted by ALS Patient Myotubes Is Specific to Exosome-Like and Not Larger Subtypes / E. Anakor, V. Milla, O Connolly [et al.] // *Cells.* – 2022. – Vol. 11, No 5. – Pp. 845.
317. The pro and the active form of matrix metalloproteinase-9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis / M. Demestre, G. Parkin-Smith, A. Petzold, A. H. Pullen // *J Neuroimmunol.* – 2005. – Vol. 159, No 1-2. – Pp. 146-154.
318. The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis // M. E. Alexianu, B. K. Ho, A. H. Mohamed [et al.] // *Ann Neurol.* – 1994. – Vol. 36, No 6. – Pp. 846-858.
319. The Gold Coast criteria increases the diagnostic sensitivity for amyotrophic lateral sclerosis in a Chinese population / D. Shen, X. Yang, Y. Wang [et al.] // *Transl Neurodegener.* – 2021. – Vol. 10, No 1. – P. 28.

320. Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain : synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine / I. Fernandez, D. Arac, J. Ubach [et al.] // *Neuron*. – 2001. – Vol. 32. – Pp.1057-1069.
321. Trauma and amyotrophic lateral sclerosis : a systematic review and meta-analysis / D. Gu, S. Ou, M. Tang [et al.] // *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* – 2021. – Vol. 22, No 3-4. – Pp. 170-185.
322. Treatment with an antibody directed against Nogo-A delays disease progression in the SOD1G93A mouse model of Amyotrophic lateral sclerosis / V. Bros-Facer, D. Krull, A. Taylor [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2014. – Vol. 23, No 16. – Pp. 4187-4200.
323. Tremblay, E. Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model : When Motor Units Matter / E. Tremblay, É. Martineau, R. Robitaille // *J Neurosci.* – 2017. – Vol. 37, No 37. – Pp. 8901-8918.
324. Two sites of action for synapsin domain E in regulating neurotransmitter release / S. Hilfiker, F. E. Schwizer, H. T. Kao [et al.] // *Nat Neurosci.* – 1998. – Vol. 1, No 1. – Pp. 29-35.
325. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis / M. Neumann, D. M. Sampathu, L. K. Kwong [et al.] // *Science.* – 2006. – Vol. 314, No 5796. – Pp. 130-133.
326. Ueda, K. Cholinesterase activity of human saliva and types of the enzymes. Comparison of whole saliva with parotid saliva / K. Ueda, K. Yamaguchi K // *Bull Tokyo Dent Coll.* – 1976. – Vol. 17, No 4. – Pp. 231-241.
327. Ultrastructural and histochemical study of the motor end plates of the intrinsic laryngeal muscles in amyotrophic lateral sclerosis / T. Yoshihara, T. Ishii, M. Iwata, M. Nomoto // *Ultrastruct Pathol.* – 1998. – Vol. 22, No 2. – Pp. 121-126.
328. Urodynamic findings in amyotrophic lateral sclerosis patients with lower urinary tract symptoms : Results from a pilot study / S. Arlandis, J. F. Vázquez-Costa, E. Martínez-Cuenca [et al.] // *Neurourology and Urodynamics.* – 2017. – Vol. 36, No 3. – Pp. 626-631.

329. van Blitterswijk, M. RNA processing pathways in amyotrophic lateral sclerosis / M. van Blitterswijk, J. E. Landers // *Neurogenetics*. – 2010. – Vol. 11, No 3. – Pp. 275-290.
330. Variation in muscle and neuromuscular junction morphology between atrophy-resistant and atrophy-prone muscles supports failed re-innervation in aging muscle atrophy / S. K. Burke, A. I. Fenton, Y. Konokhova, R. T. Hepple // *Exp Gerontol*. – 2021. – Vol. 156. – Pp. 111613.
331. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis : a meta-analysis / B. Marin, F. Boumédiène, G. Logroscino [et al.] // *Int J Epidemiol*. – 2017. – Vol. 46, No 1. – Pp. 57-74.
332. Vesicle Clustering in a Living Synapse Depends on a Synapsin Region that Mediates Phase Separation / A. Pechstein, N. Tomilin, K. Fredrich [et al.] // *Cell Rep*. – 2020. – Vol. 30, No 8. – Pp. 2594-2602.e3.
333. Vesicle turnover in developing neurons : how to build a presynaptic terminal / M. Matteoli, S. Coco, U. Schenk, C. Verderio // *TRENDS in Cell Biol*. – 2004. – Vol. 14, No 13. – Pp.133-140.
334. Vu, L. T. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis / L. T. Ve, R. Bowser // *Neurotherapeutics*. – 2017. – Vol. 14, No 1. – Pp. 119-134.
335. Weinberg, C. B. Junctional form of acetylcholinesterase restored at nerve-free endplates / C. B. Weinberg, Z. W. Hall // *Dev Biol*. – 1979. – Vol. 68, No 2. – Pp. 631-635.
336. Where does parkinson disease pathology begin in the brain? / K. Del Tredici, U. Rüb, R. A. I. De Vos [et al.] // *J Neuropathol Exp Neurol*. – 2002. – Vol. 61. – Pp. 413-426.
337. Wijesekera, L. C. Amyotrophic lateral sclerosis / L. C. Wijesekera, P. N. Leigh // *Orphanet J Rare Dis*. – 2009. – Vol. 4. – P. 3.
338. Wu, H. Morphological analysis of neuromuscular junctions by immunofluorescent staining of whole-mount mouse diaphragms / H. Wu, L. Mei // *Methods Mol Biol*. – 2013. – Vol. 1018. – Pp. 277-285.

339. Wu, H. To build a synapse : signaling pathways in neuromuscular junction assembly / H. Wu, W. C. Xiong, L. Mei // *Development*. – 2010. – Vol. 137, No 7. – Pp. 1017-1033.
340. Yan, Q. An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats / Q. Yan, E. M. Johnson // *J Neurosci*. – 1988. – Vol. 8, No 9. – Pp. 3481-3498.
341. Zhang, D. CMAP decrement by low-frequency repetitive nerve stimulation in different hand muscles of ALS patients / D. Zhang, Y. Zhao, C. Yan // *Neurological Sciences*. – 2019. – Vol. 40. – Pp. 2609–2615.
342. Zhang, M. Synapsins and the synaptic vesicle reserve pool : floats or anchors? / M. Zhang, G. J. Augustine // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, No 2. – P. 658.
343. Zhang, X. H. Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon / X. H. Zhang, M. M. Poo // *Neuron*. – 2002. – Vol. 36, No 4. – Pp. 675-688.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

- Таблица 1 – Демографическая характеристика исследованных групп 40
- Таблица 2 – Спецификации использованных антител 52
- Рисунок 1 – Репрезентативные изображения нервно-мышечных синапсов локтевой мышцы пациента с установленным диагнозом БАС (женщина, 66 лет, БАС бульбарная форма, 3 стадия). nAChR – н-холинорецепторы, SYN-1 – синапсин I, SYP – синаптофизин, Merged – объединенное изображение. Стрелками указаны области экспрессии SNAP-25. Отмечается фрагментация нервно-мышечного синапса, слабый сигнал в канале синапсина-1 и почти полное отсутствие сигнала в канале SNAP-25. Шкала – 10 мкм. (Из личного архива автора) 54
- Таблица 3 – Клиническая характеристика пациентов с БАС. Примечания. ВМН – верхний мотонейрон, НМН – нижний мотонейрон, ПБС – первичный боковой склероз, ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия 56
- Рисунок 2 – Фенотипическая вариабельность пациентов с БАС. Отмечены возраст пациентов, стадия по King's, длительность болезни, тяжесть заболевания по ALSFRS-R. * - уровень дебюта заболевания. Верхний ряд – пациенты с бульбарной формой БАС, средний ряд – пациенты со спинальной формой БАС, нижний ряд – отдельно выделены пациенты с преимущественным поражением ВМН. ВМН – верхний мотонейрон, НМН – нижний мотонейрон, ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия, ПБС – первичный боковой склероз, ФТД – фронто-темпоральная дегенерация 59
- Рисунок 3 – Пациент с БАС и гидромиелией. А – МРТ, T2-взвешенные изображения, расширение центрального канала спинного мозга на уровне сегментов Th3 – Th9. Мальформации Киари или других экстремедуллярных факторов развития сирингомиелии выявлено не было. Б – Прогрессирующие амиотрофии мышц нижних конечностей в динамическом наблюдении (разница 4 года) 61
- Таблица 4 – Клинико-лабораторные данные пациентов с БАС. Примечания. БАС – классическая форма БАС, БАС-НМН – БАС с преимущественным

поражением нижнего мотонейрона, БАС-ВМН – БАС с преимущественным поражением верхнего мотонейрона, БФ – бульбарная форма, СФ – спинальная форма, ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия, ПБС – первичный боковой склероз, ССН – синдром свисающих ног 62

Таблица 5 – Активность АХЭ в плазме крови и слюне в группе БАС и контролях 65

Рисунок 4 – Активность АХЭ плазмы крови. Отмечается широкая вариабельной значений активности АХЭ. U – количество микромоль ацетилтиохолина, гидролизованного в течение 1 мин в 1 мл образца плазмы 65

Рисунок 5 – Активность АХЭ слюны. * - p-value <0,05 66

Таблица 6 – Данные активности АХЭ плазмы крови и слюны в зависимости от формы БАС. Примечание. * - Н-критерий Краскела-Уоллиса 67

Рисунок 6 – Активность АХЭ слюны в зависимости от формы БАС. * - p-value <0,05 68

Таблица 7 – Корреляция активности АХЭ с измеряемыми клиническими показателями 69

Таблица 8 – Активность АХЭ плазмы и слюны у пациентов с разной скоростью прогрессирования БАС 70

Рисунок 7 – Активность АХЭ плазмы крови трансгенных FUS-мышей и их контроля 71

Рисунок 8 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы трансгенных мышей на разной стадии патологии и мышей дикого типа соответствующих возрастов. А, Б – НМС мышей дикого типа. В – НМС mSOD1-трансгенных мышей на досимптомной стадии, Г – НМС mSOD1-трансгенных мышей на симптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), ацетилхолинэстеразу (AChE). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм. Отмечается снижение интенсивности флуоресценции областей AChE у трансгенных мышей 73

Рисунок 9 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы трансгенных мышей на разной стадии патологии и мышей дикого типа

соответствующих возрастов. А, Б – НМС мышей дикого типа. В – НМС FUS-трансгенных мышей на досимптомной стадии, Г – НМС FUS-трансгенных мышей на симптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), ацетилхолинэстеразу (AChE). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм 73

Рисунок 10 – Площадь и интенсивность флуоресценции АХЭ в НМС трансгенных моделей. А - mSOD1-модель. Б – FUS-модель. * - $p < 0,05$. ** - $p < 0,01$. *** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$ 75

Таблица 9 – Иммунофлуоресценция синаптических белков у трансгенных mSOD1-мышей на досимптомной стадии и их контроля. Примечание. * - U-критерий Манна-Уитни. n – количество исследованных терминалей 77

Рисунок 11 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы мышей. А, Б – НМС мышей дикого типа. В, Г – НМС mSOD1-трансгенных мышей на досимптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), синапсин I (SYN-1), SNAP-25, синаптофизин (SYP). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм. Отмечается снижение интенсивности флуоресценции SNAP-25 у трансгенных мышей 78

Таблица 10 – Таблица 10 – Иммунофлуоресценция синаптических белков у трансгенных mSOD1-мышей на симптомной стадии и их контроля. Примечание. * - U-критерий Манна-Уитни. n – количество исследованных терминалей 79

Рисунок 12 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы мышей. А, Б – НМС мышей дикого типа. В, Г – НМС mSOD1-трансгенных мышей на симптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), синапсин I (SYN-1), SNAP-25, синаптофизин (SYP). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм. Отмечается снижение интенсивности флуоресценции SNAP-25, синапсина I и синаптофизина у трансгенных мышей 80

Таблица 11 – Иммунофлуоресценция синаптических белков у трансгенных FUS-мышей на досимптомной стадии и их контроля. Примечание. * - U-критерий Манна-Уитни. n – количество исследованных терминалей 81

Рисунок 13 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы

мышей. А, Б – НМС мышей дикого типа. В, Г – НМС FUS-трансгенных мышей на досимптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), синапсин I (SYN-1), SNAP-25, синаптофизин (SYP). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм мкм 82

Таблица 12 – Иммунофлуоресценция синаптических белков у трансгенных FUS-мышей на симптомной стадии и их контроля. Примечание. * - U-критерий Манна-Уитни. n – количество исследованных терминалей 83

Рисунок 14 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия НМС диафрагмы мышей. А, Б – НМС мышей дикого типа. В, Г – НМС FUS-трансгенных мышей на симптомной стадии. Окраска на н-холинорецепторы (nAChR), синапсин I (SYN-1), SNAP-25, синаптофизин (SYP). Merged – объединенное изображение. Шкала – 20 мкм. Отмечается снижение интенсивности флуоресценции SNAP-25, синапсина I и синаптофизина у трансгенных мышей 84

Рисунок 15 – Схематичное изображение установленных и предполагаемых на основании результатов настоящего исследования звеньев патогенеза и фенотипических характеристик БАС 106

.
.

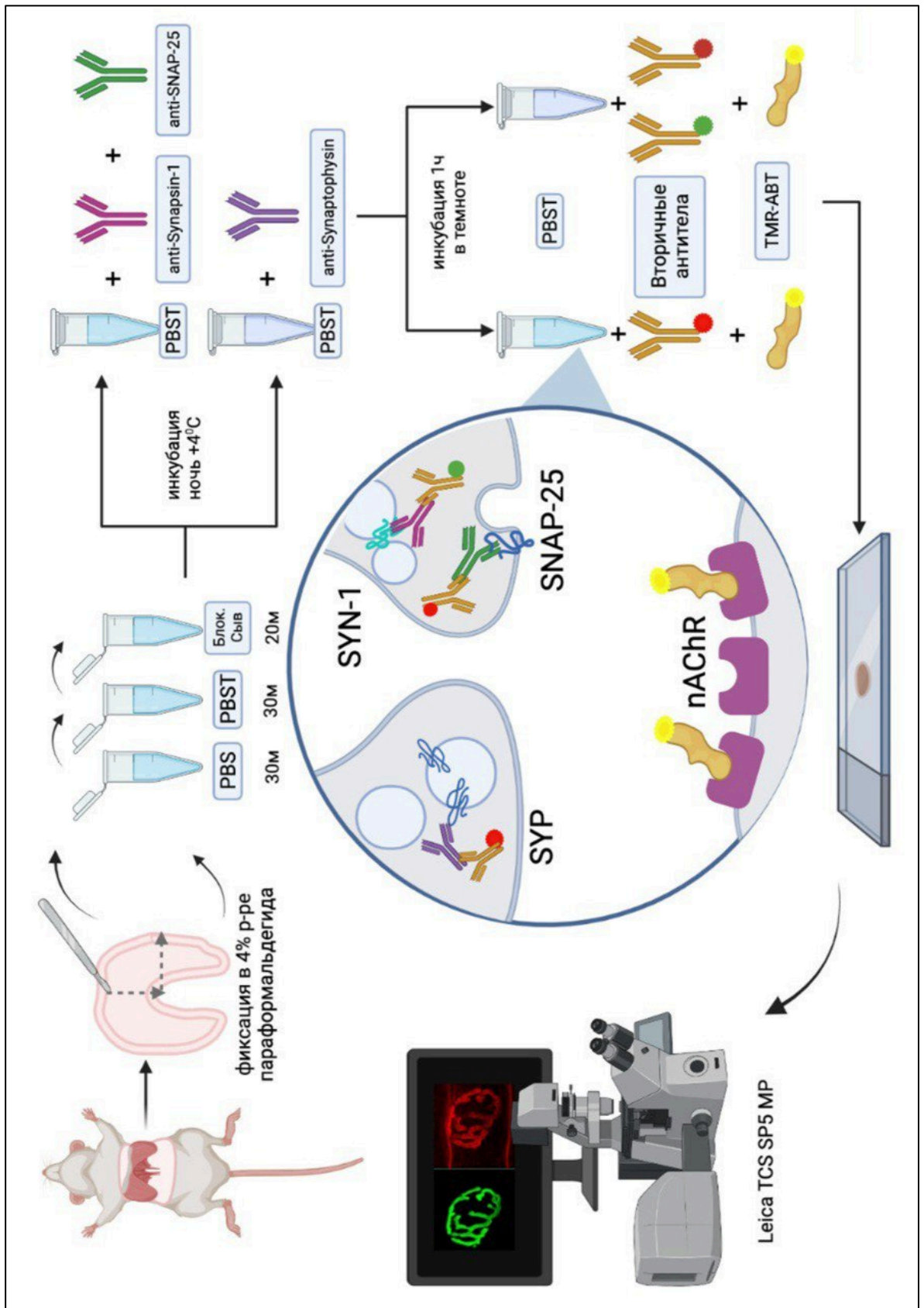
.

.

.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А - Схема иммунофлуоресцентного исследования



**Приложение Б – Значения измерений активности АХЭ плазмы крови во
всех исследованных группах**

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, U/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, U/мл	Оптическая плотность A280	Оптическая плотность A260	Концентрация белка, мг/мл	
БАС								
1	0,1929 0,1909 0,1767	0,1919 0,1899 0,1757	0,18583 3333	69,6875	0,7476	0,436	76,138	0,91527883 6
2	0,1493 0,1467 0,1457	0,1483 0,1457 0,1447	0,14623 3333	54,8375	0,7404	0,41	77,018	0,71200888 1
3	0,2482 0,1932 0,17	0,2472 0,1922 0,169	0,2028	76,05	0,78	0,439	80,614	0,94338452 4
4	0,1945 0,193 0,1733	0,1935 0,192 0,1723	0,18593 3333	69,725	0,8076	0,461	82,988	0,84018171 3
5	0,1096 0,1036 0,076	0,1086 0,1026 0,075	0,0954	35,775	0,8748	0,497	90,068	0,39719989 3
6	0,0657 0,0678 0,0581	0,0647 0,0668 0,0571	0,06286 6667	23,575	0,792	0,439	82,354	0,28626417 7
7	0,0298 0,0242 0,0221	0,0288 0,0232 0,0211	0,02436 6667	9,1375	0,7524	0,407	78,98	0,11569384 7
8	0,0325 0,0178 0,0172	0,0315 0,0168 0,0162	0,0215	8,0625	0,8004	0,421	84,904	0,09496019
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,165 0,1614 0,1429	0,164 0,1604 0,1419	0,15543 3333	58,2875	0,8208	0,432	87,048	0,66960182 9

Продолжение Приложения Б.1

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, У/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, У/мл	Оптическая плотность A280	Оптическая плотность A260	Концентрация белка, мг/мл	
11	0,1996 0,175 0,174	0,1986 0,174 0,173	0,18186 6667	68,2	0,7836	0,437	81,284	0,8390335 12
12	0,0336 0,0305 0,0246	0,0326 0,0295 0,0236	0,02856 6667	10,7125	0,687	0,425	68,165	0,1571554 32
13	0,0793 0,0758 0,0795	0,0783 0,0748 0,0785	0,0772	28,95	0,37	0,17	41,07	0,7048940 83
14	0,0605 0,0564 0,0533	0,0595 0,0554 0,0523	0,05573 3333	20,9	0,749	0,469	73,899	0,2828184 41
15	0,0451 0,097 0,0946	0,0441 0,096 0,0936	0,0779	29,2125	0,621	0,408	59,853	0,4880707 73
16	0,0978 0,1031 0,1021	0,0968 0,1021 0,1011	0,11986 6667	44,95	0,709	0,433	70,763	0,6352189 7
17	0,1423 0,1423 0,1299	0,1413 0,149 0,1289	0,13973 3333	52,4	0,9168	0,49	96,676	0,5420166 33
Медиана [Q1; Q3]								0,589[0,284; 0,807]
Здоровый контроль								
1	0,1595 0,1293 0,1074	0,1585 0,1283 0,1064	0,13106 6667	49,15	0,6912	0,43	68,404	0,7185252 32
2	0,2965 0,2405 0,2233	0,2955 0,2395 0,2223	0,25243 3333	94,6625	0,7476	0,431	76,508	1,2372889 11
3	0,2686 0,1843 0,1774	0,2676 0,1833 0,1764	0,2091	78,4125	0,7812	0,425	81,824	0,9583068 54

Продолжение Приложения Б.1

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, U/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, U/мл	Оптическая плотность A280	Оптическая плотность A260	Концентрация белка, мг/мл	
4	0,1033 0,093 0,0873	0,1023 0,092 0,0863	0,09353 3333	35,075	0,6816	0,378	70,86	0,494990121
5	0,191 0,1873 0,1608	0,19 0,1863 0,1598	0,1787	67,0125	0,6396	0,366	65,658	1,020629626
6	0,0534 0,0476 0,047	0,0524 0,0466 0,046	0,04833 3333	18,125	0,6576	0,359	68,786	0,263498386
7	0,1692 0,169 0,1429	0,1682 0,168 0,1419	0,15936 6667	59,7625	0,7836	0,44	81,062	0,737244331
8	0,1512 0,117 0,0887 0,1068	0,1502 0,116 0,0877 0,1058	0,11492 5	43,0968 75	0,684	0,381	70,986	0,607117953
9	0,0617 0,0612 0,0553	0,0607 0,0602 0,0543	0,0584	21,9	0,544	0,323	54,978	0,398341155
10	0,1804 0,1851 0,1851	0,1794 0,1841 0,1841	0,18253 3333	68,45	0,497	0,313	48,903	1,399709629
11	0,1554 0,1542 0,1516	0,1544 0,1532 0,1506	0,15273 3333	57,275	0,681	0,391	69,811	0,820429445
12	0,0283 0,0248 0,0214	0,0273 0,0238 0,0204	0,02383 3333	8,9375	0,621	0,404	60,149	0,148589336
13	0,0462 0,0429 0,0341	0,0452 0,0419 0,0331	0,04576 6667	17,1625	0,562	0,349	55,664	0,308323153
14	0,0425 0,0604 0,0422	0,0415 0,0594 0,0412	0,04736 6667	17,7625	0,732	0,407	76,022	0,23364947

Продолжение Приложения Б.1

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, У/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, У/мл	Оптическая плотность А280	Оптическая плотность А260	Концентрация белка, мг/мл	
15	0,0583 0,0464 0,0479	0,0573 0,0454 0,0469	0,04986 6667	18,7	0,7008	0,391	72,682	0,2572851 6
Медиана [Q1; Q3]								0,607 [0,264; 0,96]
Неврологический контроль								
1	0,2009 0,1763 0,1674	0,1999 0,1753 0,1664	0,18053 3333	67,7	0,81	0,44	84,89	0,7975026 5
2	0,1066 0,096 0,938	0,1056 0,095 0,937	0,3792	142,2	0,798	0,434	83,594	1,7010790 25
3	0,1068 0,0812 0,0921	0,1058 0,0802 0,0911	0,09236 6667	34,6375	0,9636	0,497	102,944	0,3364693 43
4	0,1657 0,1519 0,1384	0,1647 0,1509 0,1374	0,151	56,625	0,7584	0,428	78,296	0,7232170 23
5	0,1177 0,0966 0,1468	0,1167 0,0956 0,1458	0,11936 6667	44,7625	0,5832	0,321	60,81	0,7361042 59
6	0,1056 0,1045 0,105	0,1046 0,1035 0,104	0,10403 3333	39,0125	0,559	0,349	55,229	0,7063770 85
7	0,0302 0,0283 0,0285	0,0292 0,0273 0,0275	0,028	10,5	0,504	0,295	51,25	0,2048780 49
8	0,0758 0,0793	0,0748 0,0783	0,07655	28,7062 5	0,563	0,353	55,513	0,5171086 05
9	0,0259 0,0346 0,031	0,0249 0,0336 0,03	0,0295	11,0625	0,492	0,293	49,658	0,2227737 73

Продолжение Приложения Б.1

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, U/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, U/мл	Оптическая плотность A280	Оптическая плотность A260	Концентрация белка, мг/мл	
Медиана [Q1; Q3]								0,706[0,028; 0,767]

**Приложение В – Значения измерений активности АХЭ слюны во всех
исследованных группах**

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, U/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза АХ, субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, U/мл	Оптическая плотность A280	Оптическая плотность A260	Концентрация белка, мг/мл	
БАС								
1	0,0022 0,003 0,002	0,0012 0,002 0,001	0,0014	0,525	0,1332	0,122	10,286	0,051040249
2	0 0,002 0,0019	0 0,001 0,0009	0,00063 3333	0,2375	0,1956	0,128	18,89	0,01257279
3	0,0009 0,003 0,0017	0 0,002 0,0007	0,0009	0,3357	0,1812	0,131	16,58	0,01960193
4	0,0066 0,0056 0,0047	0,0056 0,0046 0,0037	0,00463 3333	1,7375	0,138	0,139	9,724	0,178681613
5	0,0018 0,003 0,003	0,0008 0,002 0,002	0,0016	0,6	0,102	0,097	7,612	0,078822911
6	0,0021 0,0013 0,0021	0,0011 0,0003 0,0011	0,00083 3333	0,3125	0,1272	0,103	10,822	0,028876363
7	0,002 0,002 0,0021	0,001 0,001 0,0011	0,00103 3333	0,3875	0,1068	0,132	5,718	0,067768451
8	0,0013 0,0016 0,0009	0,0003 0,0006 0	0,0003	0,1125	0,144	0,107	12,962	0,008679216
9	0,0017 0,0012 0,0008	0,0007 0,0002 0	0,0003	0,1125	0,1476	0,139	11,116	0,010120547

Продолжение Приложения В.1

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, U/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, U/мл	Оптическая плотность A280	Оптическая плотность A260	Концентрация белка, мг/мл	
10	0,0011 0,0023 0,0013	0,0001 0,0013 0,0003	0,00056 6667	0,2125	0,1932	0,164	15,878	0,0133832 98
11	0,0014 0,0014 0,008	0,0004 0,0004 0,007	0,0026	0,975	0,018	0,004	2,314	0,4213483 15
12	0,0017 0,0012 0,0003	0,0007 0,0002 0	0,0003	0,1125	0,094	0,05	9,93	0,0113293 05
13	0,0086 0,002 0,0093	0,0076 0,001 0,0083	0,00563 3333	2,1125	0,109	0,069	10,699	0,1974483 6
14	0,0018 0,0012 0,0018	0,0008 0,0002 0,0008	0,0006	0,225	0,063	0,024	7,359	0,0305748 06
15	0,0019 0,0047 0,0004	0,0009 0,0037 0	0,00153 3333	0,575	0,1092	0,111	7,62	0,0754593 18
16	0,0019 0,001 0,0005	0,0009 0 0	0,0003	0,1125	0,054	0,017	6,572	0,0171180 77
17	0,0027 0,0018 0,0017	0,0017 0,0008 0,0007	0,00106 6667	0,4	0,1452	0,134	11,138	0,0359130 9
Медиана [Q1; Q3]								0,03057 [0,013; 0,077]
Здоровый контроль								
1	0,0032 0,0022 0,0008	0,0022 0,0012 0	0,00113 333	0,017	0,1248	0,142	7,588	0,0022403 8

Продолжение Приложения В.1

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, U/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, U/мл	Оптическая плотность A280	Оптическая плотность A260	Концентрация белка, мг/мл	
2	0,0016 0,0022 0,0023	0,0006 0,0012 0,0013	0,00103 3333	0,0155	0,1428	0,131	11,012	0,00140755 5
3	0,0027 0,001 0,0015	0,0017 0 0,0005	0,00073 3333	0,011	0,1596	0,143	12,56	0,00087579 6
4	0,0016 0,0009 0,0012	0,0006 0 0,0002	0,00026 6667	0,004	0,1068	0,114	7,05	0,00056737 6
5	0,001 0,0011 0,0014	0 0,0001 0,0004	0,00016 6667	0,0025	0,1128	0,103	8,734	0,00028623 8
6	0,006 0,0024 0,0004	0,005 0,0014 0	0,00213 333	0,032	0,18	0,154	14,704	0,00217627 9
7	0 0,0012 0,002	0 0,0002 0,001	0,004	0,006	0,1344	0,113	11,126	0,00053927 7
8	0,0013 0,0044 0,0046	0,0003 0,0034 0,0036	0,00243 3333	0,0365	0,4332	0,426	31,29	0,00116650 7
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,0028 0,0024 0,0014	0,0018 0,0014 0,0004	0,0012	0,45	0,067	0,053	5,793	0,07767995 9
11	0,0003 0,0034 0,0021	0 0,0024 0,0011	0,00116 6667	0,35	0,061	0,033	6,403	0,05466187 7

Продолжение Приложения В.1

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, У/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, У/мл	Оптическая плотность А280	Оптическая плотность А260	Концентрация белка, мг/мл	
12	0,0021 0,0018 0,0022	0,0011 0,0008 0,0012	0,00103 3333	0,3875	0,061	0,033	6,403	0,0605185 07
13	0,0027 0,0022 0,0013	0,0017 0,0012 0,0003	0,0013	0,4875	0,048	0,016	5,776	0,0844009 7
14	0,001 0,0011 0,0013	0 0,0001 0,0003	0,00013 3333	0,05	0,1092	0,115	7,324	0,0068268 71
15	0,0014 0,008 0,0017	0,0004 0,007 0,0007	0,0027	1,0125	0,096	0,095	6,89	0,1469521 04
Медиана [Q1; Q3]								0,0022 [0,0008; 0,071]
Неврологический контроль								
1	0,0024 0,0023 0,0041	0,0014 0,0013 0,0031	0,00193 3333	0,725	0,1344	0,135	9,498	0,0763318 59
2	0,0022 0,0023 0,0023	0,0012 0,0013 0,0013	0,00126 6667	0,475	0,0948	0,107	5,828	0,0815030 89
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0,0023 0,001 0	0,0013 0 0	0,00043 333	0,1625	0,0984	0,101	6,794	0,0239181 63
5	0 0,0027 0,0014	0 0,0017 0,0004	0,0007	0,2625	0,144	0,107	12,962	0,0202515 04
6	0,0016 0,0019 0,0019	0,0006 0,0009 0,0009	0,0008	0,3	0,062	0,038	6,178	0,0485594 04

Продолжение Приложения В.1

Пациент	Определение активности АХЭ				Определение концентрации белка по формуле Калькара			Нормированная на концентрацию белка активность АХЭ, U/мг белка
	Средняя скорость гидролиза АХ, dA412/мин	Без спонтанного гидролиза субстрата АХ, dA412/мин	Среднее по пациенту, dA412/мин	Активность АХЭ, U/мл	Оптическая плотность A280	Оптическая плотность A260	Концентрация белка, мг/мл	
7	0,0011 0,0012 0,002	0,0001 0,0002 0,001	0,00043 3333	0,1625	0,047	0,028	4,743	0,0342610 16
8	0,0022 0,001 0,0025	0,0012 0 0,0015	0,0009	0,3375	0,067	0,032	7,347	0,0459371 17
9	0,0016 0,0016 0,0016	0,0006 0,0006 0,0006	0,0006	0,225	0,047	0,029	4,669	0,0481901 91
Медиана [Q1; Q3]								0,047 [0,0265; 0,0694]