

На правах рукописи

САМХАЕВА НЮДЛЯ ДОРДЖИЕВНА

**ДИАГНОСТИКА И ПАТОГЕНЕЗ АЛКОГОЛЬ-
ИНДУЦИРОВАННОГО ПОРАЖЕНИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ**

14.01.11 – Нервные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2019

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы и степень разработанности темы исследования

Несмотря на тенденцию к снижению, уровень потребления спиртных напитков в России остается высоким, снижая качество и продолжительность жизни лиц трудоспособного возраста. Одним из наиболее частых осложнений алкогольной болезни является хроническая алкогольная миопатия (ХрАМ), характеризующаяся прогрессирующей слабостью и гипотрофией проксимальных групп мышц конечностей, нормальным уровнем креатинфосфокиназы (КФК) в плазме крови и отсутствием типичного миопатического паттерна по данным игольчатой электромиографии (ЭМГ) (Зиновьева О. Е. и соавт., 2007, Chaudhuri et. al., 1999, Fernández-Solà et. al., 1996).

Ведущим механизмом развития мышечной атрофии при хронической алкогольной миопатии является снижение белкового синтеза (Wassif W.S. et. al., 1993). Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о снижении синтеза сократительных и цитоскелетных белков скелетных мышц при ХрАМ (Slavin G. et. al., 1983). В то же отсутствуют данные о состоянии структуры и функции скелетных мышц при хронической алкогольной миопатии у человека.

В диагностике ХрАМ «золотым стандартом» признана биопсия проксимальной мышцы конечности (дельтовидная мышца, четырехглавая мышца бедра) с последующим морфологическим и морфометрическим исследованием (Ангеличева О. И. и соавт., 2009). Однако, инвазивность метода, вероятность получения ложноотрицательных результатов в связи с неоптимальным выбором мышцы, делают обоснованным поиск дополнительных методов диагностики поражения скелетных мышц при хронической алкогольной интоксикации.

Цель исследования: оптимизировать диагностику хронической алкогольной миопатии с помощью нейровизуализационного, морфологического и морфометрического обследования.

Задачи исследования:

- 1) Изучить частоту встречаемости ХрАМ по результатам клинического, нейровизуализационного и морфологического обследования.
- 2) Оценить роль гендерного фактора в развитии ХрАМ

- 3) Изучить состояние ростовых гуморальных факторов (инсулиноподобного фактора роста – IGF-I) у пациентов с ХрАМ.
- 4) Оценить информативность метода МРТ мышц бедер для диагностики алкоголь-индуцированного поражения скелетных мышц.
- 5) Изучить морфометрические проявления хронической алкогольной миопатии.
- 6) Исследовать состояние структурных белков саркомера (титина и небулина) и их роль в развитии миопатии при хронической алкогольной интоксикации.

Научная новизна

В работе впервые проведена комплексная диагностика ХрАМ, включающая клиническое, лабораторное, нейровизуализационное, морфологическое и иммуногистохимическое обследование пациентов с длительной этаноловой интоксикацией.

Представлена оценка роли гендерного фактора в развитии ХрАМ. Выявлена большая чувствительность лиц женского пола к негативному влиянию алкоголя при сопоставимой с пациентами мужского пола длительностью и дозой потребляемого алкоголя.

Впервые в диагностике ХрАМ использован метод МРТ скелетных мышц, который показал информативность в диагностике ранней доклинической стадии заболевания, выявлении наиболее пораженной группы мышц и оценке развития мышечной атрофии.

Уставлено участие титина и небулина, структурных белков саркомера, в патогенезе атрофического процесса скелетных мышц при хронической алкогольной интоксикации у человека.

Теоретическая и практическая значимость

Данные, полученные в результате проведенного комплексного обследования пациентов, длительно злоупотребляющих алкоголем, свидетельствуют о высокой частоте встречаемости ХрАМ, которая зачастую остается нераспознанной.

Показана информативность шкалы жировой дегенерации E. Mercuri при МР-диагностике поражения мышц у пациентов с хронической алкогольной интоксикацией.

Результаты клинического, нейрофизиологического и МР-исследования пациентов с запойным характером потребления алкоголя свидетельствуют о развитии у них остро/подострой полиневропатии смешанного генеза в сочетании с ХрАМ.

Полученные в ходе проведенного исследования результаты указывают на целесообразность разделения пациентов по гендерному признаку при оценке атрофического процесса скелетных мышц при ХрАМ.

Методология и методы исследования

Объект исследования - 27 пациентов, злоупотребляющие алкоголем более 3 лет. Обследование проводилось на базе Клиники нервных болезней им.А.Я. Кожевникова Университетской клинической больницы №3 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Проводилась клиническая оценка неврологического статуса. Лабораторное обследование включало исследование уровня печеночных ферментов, КФК и IGF-I. Электрофизиологическое обследование – стимуляционная и игольчатая ЭМГ, включало оценку СРВ по двигательным и чувствительным волокнам нервов конечностей, амплитуды моторных и сенсорных ответов, параметров ПДДЕ и спонтанной активности мышечных волокон и двигательных единиц. Проведено визуализационное исследование - МРТ мышц бедер. Выполнена открытая биопсия латеральной головки четырехглавой мышцы бедра с последующим морфологическим, иммуногистохимическим исследованием биоптата, а также электрофорез структурных белков скелетных мышц.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) В развитии ХрАМ имеются гендерные различия: женщины более чувствительны к токсическому действию этанола и продуктов его метаболизма.
- 2) Метод МРТ мышц бедер является информативным для ранней доклинической диагностики поражения скелетных мышц при ХрАМ.
- 3) Структурные белки цитоскелета: титин и небулин, принимают участие в развитии мышечной слабости и атрофии скелетных мышц при ХрАМ.

Степень достоверности и апробация работы

Основные положения и результаты исследования были доложены и обсуждены на Российской научно-практической конференции с международным участием «Нередкие редкие болезни: болезни периферических нервов» г. Москва, 23 декабря 2017 года; а также на научной сессии молодых ученых 14-ой междисциплинарной

конференции с международным участием «Вейновские чтения» г. Москва, 10 февраля 2018 года.

Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством наблюдений, основанной на адекватной выборе пациентов с учетом разработанных критериев включения, четкой постановкой цели и задач, использованием в работе современных электрофизиологических, визуализационных, патоморфологических методов исследования, а также высокоточной статистической обработке результатов с использованием пакета профессиональных программ статистического анализа.

Диссертационная работа была апробирована и рекомендована к защите на заседании кафедры нервных болезней и нейрохирургии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 17.09.2019г протокол №2.

Личный вклад автора

Автору принадлежит определяющая роль в разработке и выполнении протокола исследования, постановке цели и задач исследования, формулировании выводов и практических рекомендаций. Автором самостоятельно проведен сбор анамнеза, клинический неврологический осмотр, проанализированы результаты электрофизиологического и МРТ обследования. Самостоятельно проведена статистическая обработка и анализ полученных данных. Подготовлены статьи и устные доклады с последующей публикацией в научных журналах и участием в научных конференциях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Представленная диссертация соответствует шифру научной специальности 14.01.11 – «нервные болезни», а также области исследования, согласно пунктам 5 (Заболевания периферической нервной системы), 17 (Неврология токсических и ятрогенных повреждений нервной системы) и 19 (Нейровизуализационные и инструментальные методы исследования в неврологии) паспорта научной специальности «нервные болезни».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ. В журналах базы цитирования Scopus опубликованы 2 статьи, 9 статей опубликованы в журналах рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 125 листах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, клиническая характеристика пациентов, результаты исследования, клинические примеры, обсуждение, выводы и практические рекомендации, список литературы. Работа содержит 27 таблиц и иллюстрирована 13 рисунками. Библиографический указатель содержит 127 источников литературы: 26 отечественных и 101 зарубежный.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) в Университетской клинической больнице №3 с 2014 по 2017 год. Клиническая и лабораторная часть работы проводилась в 3-ем неврологическом отделении, нейрофизиологическое обследование – в отделении функциональной диагностики по нейрофизиологии врачом функциональной диагностики Н.С. Щегловой, забор биопсийного материала – в отделении нейрохирургии УКБ №3. МРТ мышц бедер проводилось в отделении лучевой диагностики Обособленного структурного подразделения «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева» ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова врачом-радиологом Д.О. Казаковым. Патоморфологическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов скелетных мышц проводились в лаборатории миологии ГНЦ РФ Института медико-биологических проблем РАН - заведующий лабораторией д.б.н., профессор, Б.С.Шенкман. Определение содержания титина и небулина и уровень фосфорилирования этих белков проводился на базе лаборатории структуры и функции мышечных белков Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН в г. Пущино группой под руководством д.б.н., И.М. Вихлянцева. Исследование одобрено Локальным комитетом по этике ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (протокол № 08-15 от 16.09.2015г).

Общая характеристика пациентов

Основную группу составили 27 пациентов (14 мужчин и 13 женщин) в возрасте от 20 до 60 лет. Средний возраст составил $43,8 \pm 2,21$ лет. Длительность употребления алкоголем во всех случаях, согласно критериям включения, была более

3 лет и варьировала от 4 до 37 лет. Средняя длительность употребления алкоголем составила $10,0 \pm 1,5$ лет. Среднее количество потребляемого алкоголя в неделю составило $56,9 \pm 5,2$ ед.алк./нед (минимальное – 25, максимальное - 153 ед.алк/нед). Одна единица алкоголя соответствует 10мл чистого (96%) этанола.

Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту. Все испытуемые контрольной группы отрицали факт злоупотребления спиртными напитками, не имели на момент обследования острых и/или хронических заболеваний, признаков поражения периферических нервов и скелетных мышц. В соответствии с поставленными задачами всем добровольцам проводилось обследование, включавшее клинический осмотр, общий клинический анализ крови, биохимический анализ крови (глюкоза, АСТ, АЛТ, ГГТ, КФК), определение IGF-I в плазме крови, маркеров вирусных гепатитов В и С, реакции Вассермана (RW), антител к ВИЧ-инфекции, электромиографическое исследование, МРТ мышц бедер, пункционная биопсия m.quadriceps femoris (vastus lateralis) с последующим морфологическим, морфометрическим и иммуногистохимическим исследованием, исследование содержания изоформ титина, небулина, а также уровень их фосфорилирования в m.quadriceps femoris (vastus lateralis).

Методы исследования

Клинический неврологический осмотр включал исследование чувствительной, двигательной, координаторной сфер и глубоких рефлексов. При исследовании двигательной сферы оценивались мышечный тонус, мышечная сила в проксимальных и дистальных отделах конечностей по 6-балльной шкале при изометрическом напряжении мышцы. В ногах сила оценивалась отдельно в передней и задней группах мышц. Для выявления субклинического снижения мышечной силы в конечностях проводились функциональные пробы, включавшие ходьбу на носках, пятках и проба с глубоким приседанием.

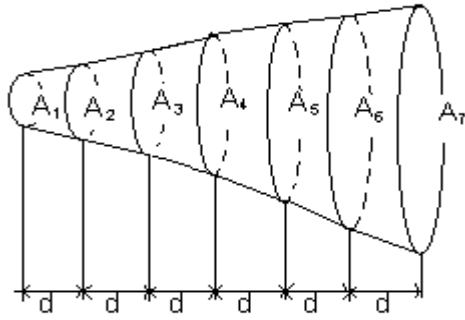
Лабораторные исследования включали: общий клинический анализ крови, общий клинический анализ мочи, биохимический анализ крови (с оценкой уровня общего белка, общей фракции билирубина, печеночных трансаминаз (АЛТ, АСТ), Г-ГТ, КФК, глюкозы). Также исследовалось содержание в плазме крови инсулиноподобного фактора роста I (IGF-I, соматомедин С) методом иммуноферментного анализа.

Электромиографическое исследование включало стимуляционную и игольчатую электромиографию. Методом стимуляционной ЭМГ исследовались двигательные и чувствительные волокна: двигательная порция бедренного (n. femoralis), малоберцового (n. peroneus), большеберцового (n. tibialis) нервов, чувствительная порция малоберцового нерва (n. peroneus superficialis) и икроножный нерв (n. suralis). Полученные результаты анализировались в сравнении с показателями контрольной группы. Методом игольчатой ЭМГ исследовались латеральная головка четырехглавой мышцы бедра (m. quadriceps femoris (vastus lateralis), двуглавая мышца (m. biceps femoris). Оценивались параметры ПДДЕ (средняя длительность, средняя и максимальная амплитуда), количество полифазных и псевдополифазных ПДДЕ (% от общего количества зарегистрированных ПДДЕ), наличие и выраженность денервационной спонтанной активности мышечных волокон (ПФ, ПОВ) и спонтанной активности всей двигательной единицы (ПФц). Оценивалось не менее 20 ПДЕ в каждой мышце. Нормы средней длительности ПДЕ определялись по таблицам Н.Р.Лудин (1980 г.) с уточнениями параметров ПДЕ по таблицам Б.М.Гехта и соавторов (1997 г.).

МРТ мышц бедер проводилось на МР-томографе компании Toshiba excelart vantagec напряженностью магнитного поля в 1.5 Тесла. Протокол исследования включал сканирование в режимах обычного T1SE и в вариации режима T2 с подавлением жировой ткани — STIR (инверсия-восстановление короткими тау-волнами). Для интерпретации полученных данных и оценки степени поражения мышечной ткани использовалась шкала, E. Mercuri, позволяющая дать качественную оценку степени жирового замещения в каждой мышце исследуемой области. Выявленные дегенеративные изменения оценивались с учетом нормальной возрастной жировой дегенерации мышц. Также проводилась количественная оценка объема передней (латеральная головка четырехглавой мышцы бедра) и задней (двуглавая мышца бедра) групп мышц бедра у больных и группы контроля. Расчет объема скелетной мышцы проводился по формуле Симпсона (стереометрическая формула срединного сечения) (Автандилов Г.Г, 1990):

$V = (d/3) * [(A1+A7) + 4(A2+A4+ A 6)+2(A3+A5)]$, где V – объем исследуемой мышцы; A_n – площадь поперечного сечения среза мышцы; d – ширина интервала для неправильного тела, ограниченного двумя параллельными плоскостями (Рисунок №1).

Рисунок №1. Расчет объема скелетной мышцы с помощью формулы Симпсона.



Морфологическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов скелетных мышц. Образцы мышечной ткани были получены путем открытой биопсии из латеральной головки четырехглавой мышцы бедра под местной анестезией 1% раствором новокаина. Пробы немедленно замораживались в жидком азоте и до момента обработки хранились при температуре -80°C . Морфологический анализ с исследованием признаков деструкции (некроза) мышечных волокон, разрастания соединительной (признаков фиброза) и жировой ткани, лейкоцитарной инфильтрации (признаки воспаления) проводился посредством окраски гематоксилином и эозином. Иммуногистохимический анализ мышечных срезов, окрашенных моноклональными антителами против МНС I и МНС II включал измерение площади поперечного сечения (ППС) мышечных волокон (МВ).

Для расчета средней площади поперечного сечения (ППС) анализировалось не менее 100 мышечных волокон каждого типа. Оценка выраженности атрофического процесса в скелетной мышце, проводилась на основании сравнения площади поперечного сечения (ППС) мышечного волокна (МВ) пациентов с аналогичными показателями контрольной группы. Средняя ППС мышечных волокон I типа в контрольной группе составила $4927,6 \pm 136,7 \text{ мкм}^2$, мышечных волокон II типа – $4653,3 \pm 137,9 \text{ мкм}^2$.

Определение содержания титина и небулина и уровень фосфорилирования. Для электрофоретического разделения небулина, высокомолекулярных изоформ интактного титина-1 и протеолитических фрагментов титина в присутствии ДСН использовали крупнопористый 2,2%-ный полиакриламидный гель с содержанием агарозы 0,5–0,6% с модификациями. Гели, окрашенные Coomassie Brilliant Blue, оцифровывали, а затем проводили денситометрическую обработку с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11.

Содержание изоформ титина и небулина оценивали по отношению к содержанию тяжелых цепей миозина (ТЦМ). Определение уровня фосфорилирования титина и небулина проводилось с целью выявления возможного влияния этой посттрансляционной модификации на изменение чувствительности вышеуказанных белков к протеолизу. Нативный уровень фосфорилирования белков в геле оценивали с помощью флуоресцентного красителя Pro-Q Diamond (Invitrogen) для фосфопротеинов. В таблицах, отражающих изменение содержания и уровня фосфорилирования T1, T2 и небулина контрольные значения принимали за 100%. При этом в каждом отдельно взятом эксперименте принималось среднее значение от не менее 3 контрольных образцов, присутствующих в геле. Для содержания T1 среднее контрольное значение составило $100\% \pm 17,6$, T2 – $100\% \pm 21,7$, небулина – $100\% \pm 23,4$. Для фосфорилирования среднее контрольное значение T1 составило $100\% \pm 20,4$, T2 – $100\% \pm 33,7$, небулина – $100\% \pm 29,8$.

Статистический анализ данных

Для анализа данных использовался однофакторный дисперсионный анализ, основная математическая идея которого состоит в применении критерия Фишера для оценки различия средней межгрупповой и средней внутригрупповой дисперсий. Статистическая обработка данных электрофореза мышечных белков и его изоформ проводилась с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Для получения данных описательной статистики использовался научный профессиональный статистический пакет Statistica 10.0 фирмы StatSoft.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом критериев включения в исследуемую группу вошли 27 пациентов, употребляющие алкоголь в течение 3 и более лет в дозах, представляющих высокий риск для здоровья. (WHO. International Guide for Monitoring alcohol consumption and related harm, 2000). Основные сведения о пациентах приведены в таблице №1.

Таблица №1. Общая характеристика пациентов, включенных в исследование.

Средний возраст (лет) $M \pm m$	$43,8 \pm 2,21$ (20-60)
Распределение по полу: мужчины/женщины (%)	52/48
Длительность приема алкоголя (лет), $M \pm m$	$10,0 \pm 1,5$ (4-37)
Количество единиц алкоголя в неделю, $M \pm m$	$56,9 \pm 5,2$ (25-153)

На основании полученных ранее данных о различиях в течении алкогольной миопатии у мужчин и женщин исследуемая группа была разделена по гендерному признаку. В первую группу вошли 14 мужчин, во вторую - 13 женщин. Общая характеристика групп представлена в таблице №2.

Таблица №2. Общая характеристика групп пациентов, разделенных по гендерному признаку.

Характеристики	Мужчины (n=14)	Женщины (n=13)
Средний возраст, лет	43,2±14,9 (20-60)	44,4±6,7 (33-57)
Длительность употребления, лет	12,0±9,6 (4-37)	7,9±3,8 (4-15)
Количество алкоголя в нед, ед.алк/нед.	51,9±22,8 (25-100)	63±32,3 (32-153)
* p ≤0,05		

Пациенты обеих групп статистически не различались по возрасту, длительности и количеству потребляемого алкоголя. Однако обнаружена тенденция, что женщины по длительности пили меньше, но по количеству больше.

Анализ жалоб

При поступлении в клинику жалобы на слабость в ногах и, связанные с ней, затруднения при ходьбе предъявляли 12 пациентов (44,5%): 3 мужчин и 9 женщин. Четверо больных отмечали преимущественную слабость в стопах; 6 пациентов предъявляли жалобы на наличие слабости, как в стопах, так и в мышцах бедер, различной степени выраженности. 8 больных (29,6%) жаловались на похудание мышц конечностей. Никто из пациентов при активном опросе не предъявлял жалобы на боли в мышцах. Разнообразные жалобы сенсорного характера в ногах как негативные (от легкого ощущения онемения в стопах и голенях до практически полной анестезии), так и позитивные (болезненные ощущения в стопах различной интенсивности, ощущение жжения, простреливающие боли, покалывание) отмечались у 21 пациента (77,8%). 11 больных (40,7%) также предъявляли жалобы на расстройство чувствительности (онемение, покалывание, жжение) в кистях. Пятеро пациентов (18,5%) обращали внимание на ощущение ходьбы по неровному полу, усиливающееся в темноте и при закрывании глаз.

Клиническое неврологическое обследование

Двигательные нарушения в виде периферических парезов выявлены у 11 (40,8%) больных. Клинические признаки симметричного нижнего проксимального парапареза, как изолированного, так и в сочетании с дистальным парезом, отмечались в 8 случаях (29,6%): у 2 мужчин и 6 женщин. Степень пареза варьировала от 3 баллов (у 3 пациентов) до 4 баллов (у 5 пациентов) как в передней, так и в задней группах мышц бедер, и во всех случаях сопровождалась мышечной гипотонией и гипотрофией. **Глубокие рефлексy** с рук были симметрично снижены у 2 пациентов (7,4%) и оставались живыми у 25 пациентов (92,6%). Коленные рефлексy отсутствовали у 5 обследованных (18,5%), были снижены – у 7 (25,9%) и оставались живыми у 15 (55,6%). Ахилловы рефлексy не вызывались у 14 пациентов (51,9%). В 3 случаях (11,1%) ахилловы рефлексy были снижены. Патологические кистевые и стопные рефлексy отсутствовали у всех обследованных больных. При клиническом исследовании поверхностной чувствительности (болевой и температурной) отмечалась гипалгезия у 10 (37,0%), гипералгезия - у 5 (18,5%), сочетание гиперестезии и аллодинии – у 3 пациентов в дистальных отделах нижних конечностей. Тактильная чувствительность в голених и стопах была снижена у 12 (44,5%) пациентов. Снижение мышечно-суставного чувства в стопах разной степени выраженности выявлялось у 8 (29,6%) пациентов. У 13 (48,1%) больных отмечалось снижение вибрационной чувствительности в стопах. У 11 (40,8%) обследованных пациентов отмечались клинические симптомы сенситивной атаксии, проявляющейся нарастанием неустойчивости при закрывании глаз.

Результаты лабораторных методов исследования

Выявлено достоверное повышение уровня АСТ и Г-ГТ у пациентов по сравнению с контролем. У всех обследованных пациентов уровень КФК оставался в пределах референсных значений и достоверно не отличался от группы контроля. При исследовании уровня IGF-1 в группе обследованных средний показатель составил $159,7 \pm 17,0$ нг/мл, что достоверно ниже, чем в группе контроля ($212,1 \pm 12,1$ нг/мл).

Анализ результатов биохимического анализа крови по группам, разделенным по гендерному признаку. В группе мужчин отмечалось достоверное повышение уровня АСТ, Г-ГТ. Также выявлено достоверное повышение уровня КФК по сравнению с контрольной группой, однако, результаты анализа КФК у всех пациентов данной группы были в пределах референсных значений, что обусловлено гендерными особенностями. В группе женщин выявлено достоверное повышение

уровня всех печеночных ферментов (АСТ, АЛТ и Г-ГТ). При исследовании уровня IGF-I по группам, разделенным по гендерному признаку, выявлено его достоверное снижение у женщин и тенденцию к снижению у мужчин.

Результаты электромиографического исследования

Анализ данных стимуляционной ЭМГ выявил достоверное снижение скорости распространения возбуждения по двигательным волокнам всех исследованных нервов нижних конечностей, а также достоверное снижение амплитуды моторного ответа при стимуляции малоберцового нерва и амплитуды сенсорного ответа при стимуляции поверхностного малоберцового и икроножного нервов в группе пациентов по сравнению контролем. Полученные данные свидетельствуют о наличии сопутствующей периферической невропатии. При анализе данных стимуляционной ЭМГ у пациентов мужского и женского пола получены результаты аналогичные в группе в целом.

Таблица №3. Результаты стимуляционной ЭМГ по двигательным и чувствительным волокнам нервов нижних конечностей.

Исследуемые нервы	Параметры стимуляционной ЭМГ	Результаты стимуляционной ЭМГ	
		Пациенты (n=27)	Контроль (n=10)
Двигательные волокна нервов нижних конечностей			
Бедренный нерв	Амплитуда, мВ	5,8±0,7	6,4±0,7
	Дистальная латенция, мс	4,0±0,2 *	3,0±0,1
Малоберцовый нерв	Амплитуда, мВ	3,6±0,5 *	7,4±0,7
	Скорость распространения возбуждения, м/с	40,2±1,8 *	48,1±0,7
Большеберцовый нерв	Амплитуда, мВ	8,4±1,1	9,4±0,9
	Скорость распространения возбуждения, м/с	42,0±1,0 *	48,4±1,4
Чувствительные волокна нервов нижних конечностей			
Поверхностный малоберцовый нерв	Амплитуда S-ответа, мкВ	3,7±0,9*	10,9±0,9
	Скорость распространения возбуждения, м/с	47,4±2,2	53,0±1,0
Икроножный нерв	Амплитуда S-ответа, мкВ	5,6±1,2*	14,2±1,9
	Скорость распространения возбуждения, м/с	48,3±1,6	54,5±1,5
* p≤0,01 (пациенты - контроль)			

При анализе данных **игольчатой ЭМГ** мышц бедра у 24 пациентов (88,9%) выявлялось уменьшение средней длительности в сочетании с увеличением средней и максимальной амплитуды ПДЕ, что может указывать как на мышечный, так и невральный уровень поражения. Полученные данные указывают на отсутствие типичного миопатического паттерна и могут быть проявлением как неврального, преимущественно аксонального, так и мышечного поражения. Спонтанная денервационная активность в мышцах бедра в виде единичных ПФ, ПОВ регистрировалась в 3 случаях. При анализе результатов **игольчатой ЭМГ** у мужчин и женщин выявлено достоверное уменьшение средней длительности в сочетании с увеличением средней и максимальной амплитуды ПДЕ.

Таблица №4. Результаты игольчатой ЭМГ в группе пациентов.

Параметры игольчатой электромиографии	Результаты игольчатой электромиографии	
	Пациенты	Норма для данной возрастной группы
	Латеральная головка четырехглавой мышцы бедра (<i>m. Quadriceps femoris vastus lateralis</i>) (n=27)	
Средняя длительность, мс	10,2±0,2 *	11-12
Средняя амплитуда, мкВ	1373,6±106,9 *	600-700
Максимальная амплитуда, мкВ	2657,5±209,8 *	До 1500
% полифазных ПДЕ, %	14,8±2,1	До 10%
Спонтанная денервационная активность (ПФ, ПОВ)	У 3х пациентов (единичные ПФ и ПОВ)	нет
Потенциалы фасцикуляций	У 2 пациентов (единичные ПФц)	нет
	Двуглавая мышца бедра (<i>m. biceps femoris caput longum</i>) (n=8)	
Средняя длительность, мс	9,5±0,2*	10,6-12,2
Средняя амплитуда, мкВ	1237,3±215,0*	600-700
Максимальная амплитуда, мкВ	2312,2±435,4*	До 1500
% полифазных ПДЕ, %	16,5±3,1*	До 10 %
Спонтанная денервационная активность (ПФ, ПОВ)	У 2 пациентов (единичные ПФ и ПОВ)	Нет
Потенциалы фасцикуляций	У 1 пациента (единичные ПФц)	нет
* $p \leq 0,05$ (пациенты - норма для данной возрастной нормы)		

Результаты МРТ-исследования мышц бедер

При анализе степени жировой дегенерации мышечной ткани (шкала E. Mercuri, 2002) изменения в мышцах бедра отмечались у 13 (48,1%) пациентов: 5 мужчин и 8 женщин. Изменения в передней группе мышц бедра выявлялись у 6 пациентов (2 мужчин и 4 женщин), а в задней группе - у всех пациентов (5 мужчин и 8 женщин).

При анализе объема мышц бедер выявлено достоверное симметричное снижение объема мышц передней группы (латеральная головка четырехглавой мышцы бедра) у пациентов по сравнению с контролем. Средний объем латеральной головки четырехглавой мышцы бедра справа у пациентов составил $339,5 \pm 15,0$ см³, в контрольной группе справа - $491,8 \pm 34,1$ см³, средний объем латеральной головки четырехглавой мышцы бедра слева составил $329,7 \pm 15,4$ см³, в контрольной группе - $485,1 \pm 33,1$ см³. При оценке задней группы мышц бедер выявлена тенденция к снижению объема двуглавой мышц бедра. Средний объем двуглавой мышцы бедра у пациентов справа составил $196,0 \pm 17,9$ см³, в контрольной группе - $261,1 \pm 32,6$ см³. Средний объем двуглавой мышцы бедра у пациентов слева - $187,9 \pm 17,9$ см³, в контрольной группе - $255,4 \pm 32,2$ см³.

При оценке объема мышц бедра по данным МРТ в группах, разделенных по гендерному признаку, объем мышц пациентов-мужчин сравнивался с объемом мышц у мужчин контрольной группы и, соответственно, в группе женщин-пациентов и женщин контрольной группы. Полученные результаты выявили достоверное симметричное снижение объема мышц передней и задней групп, как в группе мужчин, так и в группе женщин, в сравнении с контролем.

Результаты морфологического и иммуногистохимического методов исследования

По результатам **морфологического исследования** у всех пациентов установлено, что большинство мышечных волокон имели правильную полигональную форму. Во всех пробах отсутствовали признаки воспалительной инфильтрации, а также зоны некроза, не выявлено признаков группировки мышечных волокон, характерных для процесса денервации. При **иммуногистохимическом исследовании** мышечных волокон выявлено достоверное уменьшение размеров волокон, как I-го типа, так и II-го типа.

При расчетах ППС мышечных волокон по группам сравнивались данные ППС пациентов-мужчин/женщин с данными ППС контрольных мужчин/женщин. По

результатам статистической обработки выявлено достоверное уменьшение размеров волокон, как I-го типа, так и II-го типа у мужчин и женщин.

Таблица №5. Данные ППС мышечных волокон I и II типов у мужчин и женщин в сравнении с контролем.

Параметры иммуногистохимического исследования	Результаты иммуногистохимического исследования	
	Пациенты (n=27)	Контроль (n=10)
Мужчины (n=14)		
ППС мышечных волокон I типа, мкм ²	3509,1±256,6*	5053,1±243,3
ППС мышечных волокон II типа, мкм ²	3000,2±264,8*	4808,8±239,1
Женщины (n=13)		
ППС мышечных волокон I типа, мкм ²	3325,2±234,5*	4802,1±128,3
ППС мышечных волокон II типа, мкм ²	2371,2±279,4*	4497,9±131,9
* p≤0,01 (группа – контроль)		

Результаты электрофоретического исследования содержания и уровня фосфорилирования титина и небулина

Исследование содержания изоформ титина и небулина, а также уровень их фосфорилирования было проведено 13 пациентам: 4 мужчинам и 9 женщинам. Содержание интактного титина (T1) в латеральной головке четырехглавой мышцы бедра по сравнению с аналогичным показателем в группе контроля имело четкую тенденцию к снижению и, согласно уставленным параметрам, было снижено у 6 пациентов (46,2%). Уровень содержания продуктов деградации титина (T2) в большинстве случаев был более 100% и превышал установленное значение 123% в 5 случаях (38,5%), у 4 пациентов (30,8%) отмечалось его снижение. Содержание небулина имело общую тенденцию к снижению, а у 4 пациентов (30,8%) было снижено.

Уровень фосфорилирования продуктов деградации титина T2 в латеральной головке четырехглавой мышцы бедра был повышен у 2х обследованных пациентов (15,4%), фосфорилирование небулина было повышенным в 1 случае (7,7%), при этом у

3 пациентов отмечалось его снижение. Уровень фосфорилирования интактного титина T1 у всех обследованных пациентов оставался неизменным в сравнении с контролем.

Обсуждение.

Цель настоящего исследования - оптимизация диагностики хронической алкогольной миопатии с помощью нейровизуализационного, морфологического и морфометрического обследования.

При сборе данных анамнеза установлено, что все пациенты в течение длительного времени потребляли опасные для здоровья дозы алкоголя и, соответственно, имели высокие риски развития осложнений. При клиническом неврологическом обследовании проявления ХрАМ в виде проксимальной мышечной слабости в нижних конечностях обнаружены у 29,6% пациентов, чаще у женщин. Установлено, что во всех случаях симптомы алкогольной миопатии отмечались в сочетании с признаками алкогольной полиневропатии.

Результаты лабораторного обследования пациентов выявили повышение уровня печеночных ферментов, что указывает на нарушение функции печени вследствие длительного воздействия алкоголя и продуктов его метаболизма. При исследовании уровня IGF-I установлено его снижение у пациентов, длительно потребляющих алкоголь. Полученные данные могут свидетельствовать о поражении печеночной ткани и снижении ее белковосинтетической функции на фоне длительного потребления алкоголя. Во всех случаях показатели КФК не превышали верхней границы нормальных значений, что указывало на отсутствие признаков деструкции скелетных мышц на фоне длительного потребления алкоголя.

С целью объективизации уровня и характера поражения периферического нейромоторного аппарата всем пациентам проведена стимуляционная электромиография с оценкой возбудимости и проводимости по двигательным и чувствительным волокнам нервов нижних конечностей, а также игольчатая электромиография проксимальных мышц ног. Результаты стимуляционной электромиографии выявили аксонально-демиелинизирующее поражение дистальных отделов двигательных волокон, а также аксональное поражение дистальных отделов чувствительных волокон, что подтверждает наличие сопутствующей полиневропатии и объясняет наличие слабости в дистальных отделах ног. Данные игольчатой электромиографии латеральной головки четырехглавой и двуглавой мышцы бедра пациентов выявляют уменьшение средней длительности ПДЕ в сочетании с увеличением амплитуды ПДЕ, что может быть проявлением как мышечного, так и

неврального уровня поражения. Таким образом, электрофизиологическое обследование пациентов с хронической алкогольной интоксикацией выявляет наличие сопутствующей полиневропатии, однако не позволяет достоверно установить причину проксимальной слабости нижних конечностей и определить уровень поражения нейромоторного аппарата. Полученные результаты согласуются с данными других авторов (Зиновьева О.Е. и соавт., 2015, Щеглова Н.С., 2015) и требуют поиска дополнительных методов диагностики поражения мышц.

В соответствии с поставленными задачами проведено МРТ мышц бедер с целью оценки состояния скелетных мышц у пациентов, злоупотребляющих алкоголем. По результатам МР-исследования дегенеративные изменения мышц бедер обнаружены у 48,1% пациентов, что значительно чаще, чем признаки миопатического синдрома, выявляемого по результатам клинического неврологического обследования у 29,6% пациентов. Качественный анализ данных МРТ показал, что в большей степени дегенеративным изменениям подвергаются задние антигравитационные мышцы бедра, испытывающие максимальную нагрузку в вертикальном положении. Количественная обработка данных МРТ выявила преобладание атрофических изменений в передней группе мышц бедра. Симметричность выявленных атрофических и дегенеративных изменений косвенно может свидетельствовать о мышечном характере поражения (Lamminen A.E., 1990). Наличие алкогольного анамнеза, клинических проявлений в виде симметричной слабости проксимальных групп мышц ног и результатов лабораторных исследований, указывающих на нарушение функции печени, снижение уровня IGF-I - внеклеточного регулятора белкового синтеза, указывают на наиболее вероятный токсический генез миопатии. Количественная обработка данных МРТ мышц позволяет объективизировать наличие атрофического процесса в передней и задней группах мышц бедер. В целом у 5 пациентов выявлялись изменения по данным МРТ мышц бедер при отсутствии клинических проявлений ХрАМ. Следовательно, метод МРТ является информативным для диагностики поражения мышечной ткани при хронической алкогольной интоксикации на доклинической стадии.

Результаты ранее проведенных исследований свидетельствуют, что морфологической основой ранних проявлений ХрАМ является атрофия мышечных волокон II типа. В ходе прогрессирования заболевания атрофии подвергаются и мышечные волокна I типа. В ходе настоящего исследования по результатам морфологического исследования не выявлено признаков некроза, воспалительной инфильтрации, а также «феномена группировки» мышечных волокон, характерного

для процесса денервации. Морфометрическое исследование выявило атрофию мышечных волокон обоих типов у всех обследованных пациентов, что можно объяснить тяжелым стационарным контингентом пациентов, высокими дозами и большой продолжительностью потребления спиртных напитков.

В литературе приводятся данные о половом диморфизме в развитии ХрАМ, что послужило основанием для разделения пациентов на группы по гендерному признаку: 14 мужчин и 13 женщин. Статистически значимых различий между группами по длительности злоупотребления и дозе потребляемого алкоголя получено не было. Пациенты женского пола чаще предъявляли жалобы на слабость в ногах. При клиническом неврологическом обследовании выявлялся нижний симметричный проксимальный парапарез, который, в ряде случаев, сочетался с нижним дистальным парапарезом. По результатам лабораторного исследования у пациентов женского пола отмечалось более значительное токсическое поражение печени, в том числе снижение ее белоксинтезирующей функции. Результаты стимуляционной и игольчатой ЭМГ не отличались у пациентов мужского и женского пола. При оценке данных МР-исследования установлено, что признаки жировой дегенерации передней и задней группы мышц бедер чаще выявлялись в группе женщин. Учитывая наличие морфометрических различий (рост, вес и объем мышечной массы) мужчин и женщин при количественной обработке результатов визуализации проведено разделение по гендерному признаку не только группы пациентов, но и контрольной группы. Количественный анализ показателей объема латеральной головки четырехглавой мышцы бедра и двуглавой мышцы бедра у мужчин и женщин выявил уменьшение объема мышц, как передней, так и задней группы. Таким образом, результаты клинического, лабораторного и МР-исследования мышц бедер показали, что при сопоставимой длительности и дозе потребляемого алкоголя проявления ХрАМ чаще выявлялись у женщин, что свидетельствует о большей чувствительности к этанолу и продуктам его метаболизма лиц женского пола. При морфометрическом исследовании биоптатов мышечной ткани с анализом площади поперечного сечения мышечных волокон у пациентов как мужского, так и женского пола отмечается атрофия мышечных волокон I и II типов.

Наличие экспериментальных данных, свидетельствующих об изменении содержания и фосфорилирования структурных матричных белков, таких как титин и небулин на фоне хронической алкогольной интоксикации, могут указывать на участие этих белков в патогенезе ХрАМ. Снижение содержания титина и небулина вследствие

их повышенного протеолиза, наблюдаемое при развитии мышечной атрофии (Вихлянцев И.М. и соавт., 2008), может приводить к нарушению высокоупорядоченной саркомерной структуры, ухудшению эластических свойств и сократительной способности мышц. Анализ результатов электрофоретического исследования содержания титина и небулина у обследованных пациентов с хронической алкогольной интоксикацией выявляет тенденцию к снижению содержания интактного титина (Т1) и небулина и повышение содержания продуктов деградации титина (Т2), что может быть признаком активации процессов протеолиза. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов и подтверждают участие этих белков в развитии атрофического процесса скелетных мышц (Грицына Ю.В. и соавт., 2013). Повышенная протеолитическая деградация титина и небулина может быть следствием изменения уровня фосфорилирования этих белков и увеличения их чувствительности к протеолизу. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии титина и небулина в патогенезе развития атрофического процесса скелетных мышц при хронической алкогольной интоксикации и могут приводить к нарушению сократительной функции скелетной мускулатуры.

ВЫВОДЫ

1) По результатам клинического обследования частота ХрАМ в группе пациентов с хронической алкогольной интоксикацией составила 29,6%, по результатам МРТ мышц бедер – 48,1%, а по данным морфологического исследования биоптата мышечной ткани достигала 100%. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости комплексного клинико-инструментального подхода к диагностике ХрАМ.

2) При сопоставимой длительности и дозе потребляемого алкоголя проявления ХрАМ выявлялись чаще и были более выражены у женщин по сравнению с мужчинами, что свидетельствует о большей чувствительности к этанолу и продуктам его метаболизма лиц женского пола.

3) У пациентов с хронической алкогольной интоксикацией выявлено снижение уровня IGF-I, относящегося к системным регуляторам белкового синтеза, в том числе, синтеза белков цитоскелета мышечной ткани, что подтверждает участие данного белка в патогенезе развития ХрАМ.

4) МРТ мышц бедер - информативный неинвазивный метод диагностики ХрАМ на доклинической стадии. МРТ позволяет выявить наиболее пораженные группы мышц и объективизировать развитие мышечной атрофии. Выявленные при МРТ признаки жировой дегенерации чаще отмечались в задней группе мышц бедер, что свидетельствует о более раннем поражении антигравитационных групп мышц при ХрАМ.

5) Морфологической основой ХрАМ у мужчин и женщин является атрофия мышечных волокон I и II типов. Не выявлено зависимости выраженности атрофического процесса в мышцах от дозы и длительности потребления спиртных напитков.

6) В биоптате мышечной ткани обнаружено снижение содержания интактного титина и тенденция к повышению уровня продуктов его деградации, а также снижение содержания небулина, что может приводить к нарушению сократительной функции скелетных мышц при ХрАМ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для диагностики ХрАМ при проведении клинического неврологического осмотра пациентов рекомендуется оценка силы в проксимальных отделах конечностей с обязательным исследованием силы в задней группе мышц бедер.

2. Определение уровня IGF-I в сыворотке крови может быть рекомендовано в качестве скринингового лабораторного метода верификации атрофии скелетных мышц при ХрАМ

3. С целью ранней диагностики ХрАМ целесообразно проведение МРТ мышц бедер с оценкой степени жировой дегенерации.

4. При проведении морфометрического исследования биоптата скелетной мышцы у пациентов с ХрАМ необходимо учитывать гендерный фактор.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зиновьева О.Е., Емельянова А.Ю., Самхаева Н.Д., Щеглова Н.С. Нервно-мышечные нарушения при хронической алкогольной интоксикации у женщин // **Неврология, нейропсихиатрия и психосоматика.** – 2015. - №7(2). – С.80-85.

2. Зиновьева О.Е., Щеглова Н.С., **Самхаева Н.Д.**, Емельянова А.Ю., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л., Яхно Н.Н. Роль гендерного фактора в развитии хронической алкогольной миопатии // **Неврологический журнал**. - 2015. - №20(3). – С.22-28.
3. Немировская Т.Л., Шенкман Б.С., Зиновьева О.Е., Казанцева Ю.Н., **Самхаева Н.Д.** Развитие клинических и морфологических проявлений хронической алкогольной миопатии у мужчин на фоне длительной алкогольной интоксикации // **Физиология человека**. – 2015. - №41(6). – С.625-628.
4. Зиновьева О.Е., Емельянова А.Ю., **Самхаева Н.Д.**, Щеглова Н.С., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Физиологические основы патогенеза алкоголь-индуцированного поражения скелетных мышц // **Физиология человека**. – 2016. - № 42(3). – С.130-136.
5. **Самхаева Н.Д.**, Зиновьева О.Е., Емельянова А.Ю., Щеглова Н.С., Казаков Д.О. Случай подострого развития нервно-мышечных нарушений у пациентки с хронической алкогольной интоксикацией // **Медицинский совет**. – 2016. - №11. – С.86-91.
6. Зиновьева О.Е., **Самхаева Н.Д.**, Щеглова Н.С., Казаков Д.О., Носовский А.М., Шенкман Б.С., Емельянова А.Ю., Яхно Н.Н. Характеристики магнитно-резонансной томографии мышц ног у пациентов с хронической алкогольной интоксикацией // **Неврологический журнал**. – 2016. - №21(5). - С.273-279.
7. **Самхаева Н.Д.** Диагностика хронической алкогольной миопатии: результаты МРТ, морфологического и морфометрического исследования скелетных мышц // **Медицинский алфавит**. – 2018. - № 1(338). – С. 71-72.
8. Shencman B.S., Belova S.P., Mirzoev T.M., Vilchinskaya N.A., Altaeva E.G., Turtikova O.V., Nemirovskaya T.L., Zinovyeva O.E., **Samkhaeva N.D.**, Kostrominova T.Y. Effect of chronic alcohol abuse on anabolic and catabolic signaling pathways in human skeletal muscle // *Alcoholism: clinical and experimental research*. – 2018. - №42(1). – P.:41-52.
9. Зиновьева О.Е., **Самхаева Н.Д.**, Казаков Д.О., Туртикова О.В., Носовский А.М., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Раннее проявление атрофических процессов мышц у женщин при хронической алкогольной миопатии // **Физиология человека**. – 2018. - №44(3). - С.138-142.
10. Зиновьева О.Е., **Самхаева Н.Д.**, Вихлянцев И.М., Уланова А.Д., Михайлова Г.З., Щеглова Н.С., Казаков Д.О., Емельянова А.Ю., Носовский А.М.

Изменение содержания и уровня фосфорилирования титина и небулина в четырехглавой мышце бедра при хронической алкогольной миопатии // **Неврология, нейропсихиатрия и психосоматика**. – 2019. - №11(1). – С.21-27.

11. Shenkman B.S., Belova S.P., Mirzoev T.M., Vilchinskaya N.A., Turtikova O.V., Nemirovskaya T.L., Zinovyeva O.E., **Samkhaeva N.D.**, Parfenov V.A., Barinov A.N., Vikhlyantsev I.M., Ulanova A.D. Cellular and molecular signatures of alcohol-induced myopathy in women // *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*. – 2019. - №316(5). – P.: 967-976.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АСТ - аспартатаминотрансфераза

Г-ГТ - гамма-глутамилтрансфераза

ДСН - додецилсульфат

КФК – креатинфосфокиназа

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПДДЕ – потенциал действия двигательной единицы

ПОВ – потенциалы острых волн

ППС - площадь поперечного сечения

ПФ – потенциалы фибрилляций

ПФЦ – потенциалы фасцикуляций

СРВ – скорость распространения возбуждения

Т1ВИ – Т1-взвешенное изображение

Т2ВИ – Т2-взвешенное изображение

ТЦМ – тяжелые цепи миозина

ХрАМ - хроническая алкогольная миопатия

ЭМГ – электромиография

IGF-I - инсулиноподобный фактор роста I