

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА
И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО**

Стефан Мирчев Кръстев

**ИЗСЛЕДВАНЕ ЕФЕКТА НА ТЕЧНИТЕ СЛОЕВЕ В
МИЕЛИНОВАТА ОБВИВКА ВЪРХУ МЕМБРАННИТЕ
СВОЙСТВА НА СИМУЛИРАНИ СЛУЧАИ НА
ДЕМИЕЛИНИЗИРАЩИ НЕВРОПАТИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „ДОКТОР“**

**Професионално направление Биологични науки, шифър 4.3
(стар шифър 01.06.08 „Биофизика“)**

София

2011

Дисертационният труд е написан на 106 страници, съдържа 27 фигури и 3 таблици. Цитирани са 164 източника. Цитираната в автореферата литература съответства на тази в дисертацията.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на 18. 10. 2011г. от разширен семинар на секция “Възбудими структури” към Институт по Биофизика и Биомедицинско Инженерство, Българска Академия на Науките.

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в канцеларията на ИБФБМИ, БАН, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 105, София.

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА
И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО**

Стефан Мирчев Кръстев

**ИЗСЛЕДВАНЕ ЕФЕКТА НА ТЕЧНИТЕ СЛОЕВЕ В
МИЕЛИНОВАТА ОБВИВКА ВЪРХУ МЕМБРАННИТЕ
СВОЙСТВА НА СИМУЛИРАНИ СЛУЧАИ НА
ДЕМИЕЛИНИЗИРАЩИ НЕВРОПАТИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „ДОКТОР“**

**Професионално направление Биологични науки, шифър 4.3
(стар шифър 01.06.08 „Биофизика“)**

Научни ръководители: проф. Диана Стефанова, д.б.н.

доц. д-р Негрин Негрев, д.м.

Официални рецензенти: чл.-кор. проф. Андон Косев, д.б.н.

проф. Божидар Димитров, д.м.н.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

ISD	Интернодална Системна Демиелинизация	Internodal System Demyelination
PSD	Паранодална Системна Демиелинизация	Paranodal System Demyelination
PISD	Паранодална Интернодална Системна Демиелинизация	Paranodal Internodal SystemDemyelination
CMT1A	Болест на Шарко-Мари-Туут тип 1А	Charcot-Marie-Tooth disease Type 1A
CIDP	Хронична Възпалителна Демиелинизираща Полиневропатия	Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy
DSS	Dejerine-Sottas синдром	Dejerine-Sottas syndrome
ПНС	Периферна нервна система	
ЦНС	Централна нервна система	

I. УВОД

Миелинизирането на аксоните е поредната прогресираща стъпка в еволюцията на нервната система. Основната функция на миелина като многослойна плазматична мембрана се свежда до осигуряване бързото и надеждно провеждане на нервния импулс при ниски енергетични разходи. Рентгено-дифракционните изследвания показват, че миелиновите ламели не са навити плътно около аксона, а са разделени от течни слоеве с дебелина около 4–5 nm, заемащи почти половината (40%) от обемното пространство на миелина (Kirschner et al. 1984). За наличните йони е установено, че могат лесно да преминават както през течните слоеве (Vlaugock 1971), така и да се движат в тези слоеве под действието на надлъжни и напречни потенциални градиенти, което предполага разглеждането на миелиновата обвивка като проводник с надлъжна и напречна проводимост.

Когато нормално формираната миелинова обвивка на нервните влакна се разрушава под действието на различни патогенни фактори като автоимунни реакции, генетични нарушения и инфекции се получават състояния, обуславящи демиелинизиращите заболявания. Сред тези заболявания могат да се посочат множествената склероза (MS), болестта на Шарко-Мари-Туут (СМТ), хроничната възпалителна демиелинизираща полиневропатия (CIPD), синдромът на Гилен-Барé (GBS), мултифокалната моторна невропатия (MMN) и др. Въпреки напредъка в технологиите, многогодишните експериментални изследвания в различни области на невробиологията не успяват да дадат пълна представа за процесите, протичащи във възбудимите структури, което намалява ефективността на лечението на множество нервно-мускулни заболявания. Това прави

математичното моделиране на тези процеси, прилагано и от нас, много ценен подход в модерната област на биофизиката на сложните системи.

Двойнокабелният модел на човешко моторно нервно влакно (Stephanova and Bostock 1995, 1996) е приложен успешно за изследване мембранните свойства на влакното в норма и при симулирани случаи на прогресивно нарастващи интернодални-, паранодални-, паранодални интернодални фокални (IFD, PFD, PIFD) и интернодални-, паранодални-, паранодални интернодални системни (ISD, PSD, PISD) демиелинизации (Stephanova and Alexandrov 2006; Stephanova and Daskalova 2005a,b; Stephanova et al. 2005, 2006a,b, 2007a,b). В цитираните статии е показано, че симулираните системни демиелинизации могат да се разглеждат като специфични индикатори на заболяванията като СМТ1А, СІDР и подтипове СІDР.

Като следваща стъпка в развитието на моделите на миелинизираните аксони се явява мултиламеларният модел на Stephanova (2001), който се различава от предишните двойнокабелни модели (Blight 1985; Halter and Clark 1991; Stephanova and Bostock 1995, 1996) с представянето на миелиновата обвивка като многослойна анизотропна структура. Моделът ревизира класическата теория за миелиновата обвивка като електрически изолатор. До момента той не е използван за изследване на потенциалите и индикаторите на аксоналната възбудимост на човешки моторни нервни влакна в патология. Интересно е да се разбере дали течните слоеве в миелина, като наноструктури, оказват някакво допълнително влияние и колко голямо е то, ако има такова, върху параметрите на аксоналната възбудимост при симулирани прогресивно нарастващи слаби и силни системни демиелинизации (като ISDs, PSDs, PISDs), които са специфични индикатори на заболяванията като СМТ1А, СІDР и подтипове СІDР.

Мултиламеларният модел на миелиновата обвивка на човешки моторни аксони е подробно разгледан в Методите на изследване в дисертацията (и е накратко представен в Автореферата), тъй като той се използва за изпълнението на поставената цел и задачи на настоящата дисертация.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Измененията в съотношенията на пасивните параметри на миелиновата структура (т.е. демиелинизациите), водещи до редица болестни състояния характерни за периферната нервна системи, несъмнено поставят условия за по-детайлното изучаване на съответните състояния на влакната при дадени (надпрагови и подпрагови бързо и бавно действащи) токови стимулации. В този смисъл, все по-ясна става необходимостта от разширяване на познанието за електрогенезата на миелиновата обвивка и за тестването на идеята, че течните слоеве на миелиновата обвивка оказват значителен допълнителен ефект върху мембранните свойства при вродени и хронични демиелинизиращи невропатии.

ЦЕЛ на настоящата дисертация е изследването на ефекта на течните слоеве в миелиновата обвивка върху мембранните свойства на симулирани случаи на демиелинизиращи невропатии.

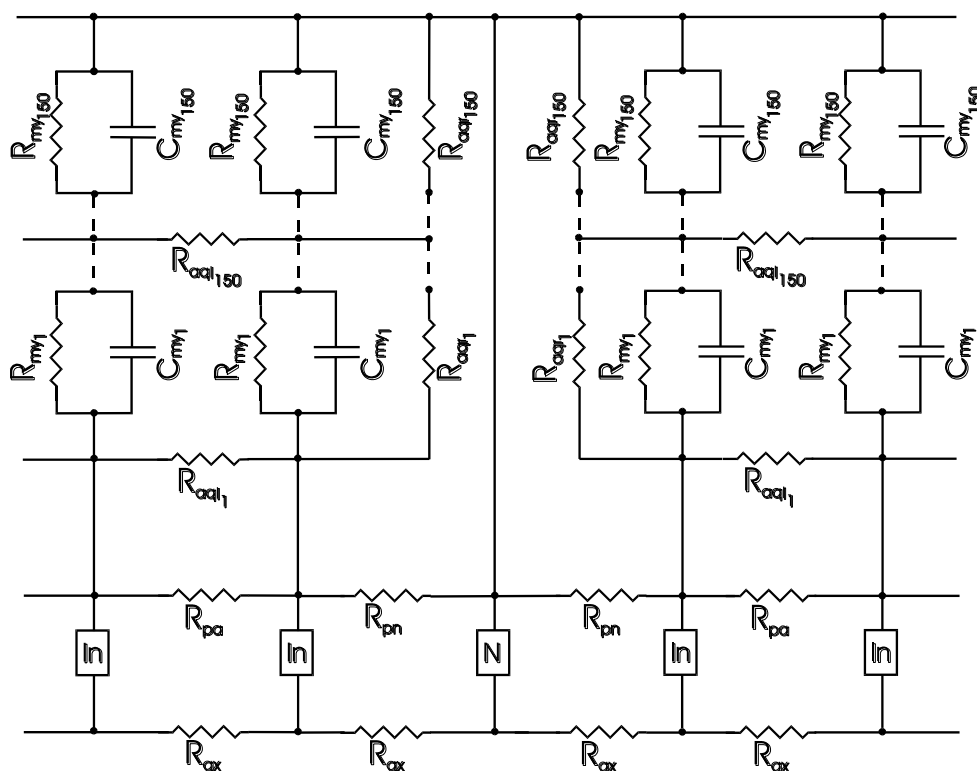
За изпълнение на тази цел бяха набелязани следните **ЗАДАЧИ**:

1. Симулиране на три типа (ISDs, PSDs, PISDs) слаби и силни системни демиелинизации на човешки моторни нервни влакна на базата на мултиламеларния модел на миелиновата обвивка на влакната.
2. Изследване промените на потенциалите (интрацелуларни акционни, електротонични) и индексите на аксоналната възбудимост (кривите сила-продължителност, заряд-продължителност, времевите константи, реобазите и циклите на възстановяване) за симулираните случаи на демиелинизации без и с отчитане наличието на течните слоеве в миелиновата обвивка.
3. Отчитане ефекта на течните слоеве върху изследваните мембранни свойства на демиелинизираните човешки моторни нервни влакна.
4. Даване на нова допълнителна информация за механизмите на заболяването Шарко-Мари-Туут тип 1А (СМТ1А) и на хронично възпалителната демиелинизираща полиневропатия (СІDР).

III. МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

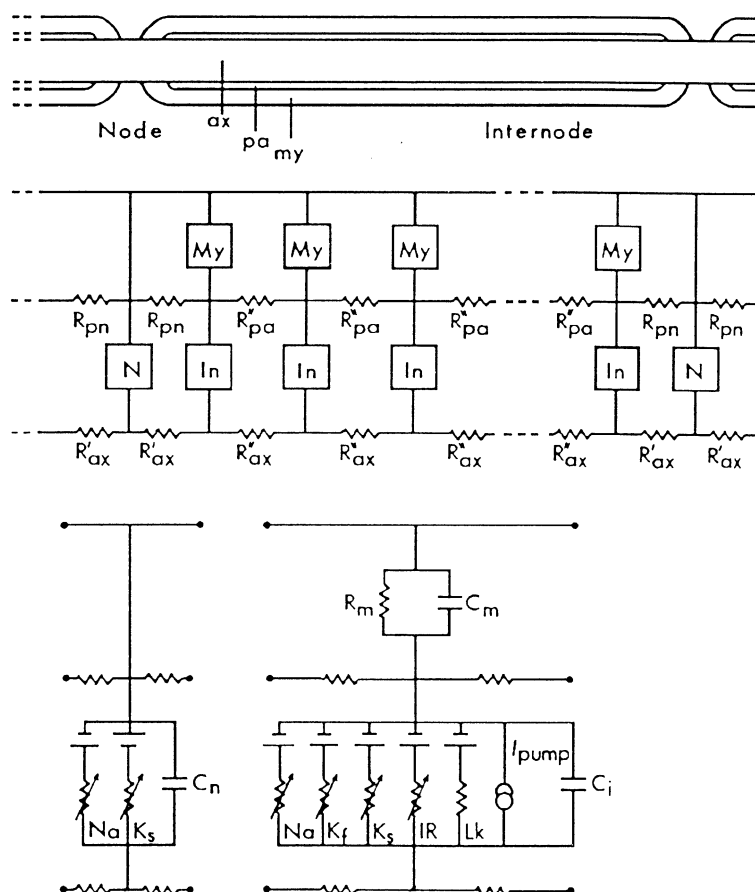
3.1. Мултиламеларен и двойнокабелен модели

Методът на математичното моделиране и представените компютърни симулации на човешко моторно нервно влакно в норма и патология се използват в дисертационния труд за изследване ефекта на течните слоеве на миелиновата обвивка на влакната върху възбудимите свойства на симулирани демиелинизиращи невропатии. Структурата на миелиновата обвивка на влакната е описана и симулирана по-рано в модела на Stephanova (2001), накратко изложен отново по-долу, тъй като той се използва при проведените изследвания. Съгласно този модел, миелиновата обвивка се разглежда като мултиламеларна структура, съставена от $N=150$ успоредно взаимно свързани ламели, а тяхната двойна структура се моделира чрез редуващи се $N=150$ течни и $N=150$ липидни слоеве както е показано на Фиг. 3.1



Фиг. 3.1. Еквивалентна електрична схема на многослойно миелинизирано човешко моторно нервно влакно. (Фигурата е взета от Stephanova 2001.)

В схемата са представени един нод (**N квадрат**) и интернодални сегменти, всеки от които включва интернодална аксолема (**In квадрати**) и многослойна миелинова обвивка. Илюстрирани са също и надлъжните аксоплазматични (R_{ax}), периаksonални (R_{pa}) и паранодални (R_{pn}) съпротивления. Дължината на всеки интернодален сегмент е една пета от цялата дължина ($998.5\mu m$) на интернода. Еквивалентната електрична схема за многослойната миелинова обвивка, съдържа, съответно: капацитет и съпротивление (C_{myN} , R_{myN} за $N=1, 150$) на миелиновите слоеве, и надлъжно и радиално съпротивления (R_{aqIN} , R_{aqrN} за $N=1, 150$) на течните слоеве. Еквивалентните електрични схеми за всеки N и In квадрат са същите, както са описани в предишния двойнокабелен модел представен на Фиг.3.2



Фиг.3.2. Схематична диаграма на миелинизирано човешко моторно нервно влакно. (Фигурата е взета от Stephanova and Bostock 1995.)

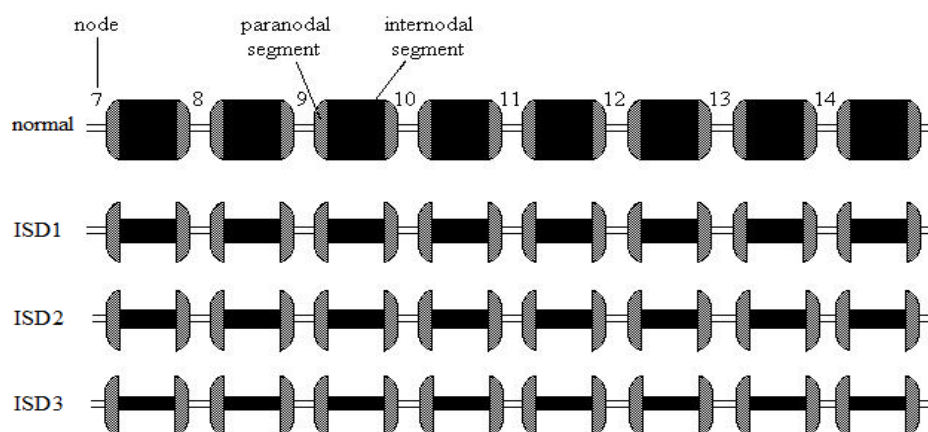
В тази еквивалентна електрична схема са представени два последователни нода (N *квадрати*), съседните паранодални и интернодалните сегменти между тях, всеки от които включва миелинова обвивка (Mu *квадрати*) и интернодална аксолема (In *квадрати*). Паранодалното съпротивление (R_{pn}) свързва всеки интернод с нодовете на Ранвие. В съответствие с нееднаквите пространствени стъпки, различните надлъжни аксоплазматични (R_{ax}) и периаksonални (R_{pa}) съпротивления са представени чрез техните маркирани елементи, съответно R'_{ax} за нодалните; R''_{ax} , R''_{pa} за паранодалните; и R'''_{ax} , R'''_{pa} за интернодалните сегменти. Всеки интернодален сегмент е една пета от цялата дължина на интернода. На долния ред, еквивалентните електрични схеми за всеки *квадрат* съдържат, съответно: канали (Na , K_s) и капацитет (C_n) за N *квадратите*; канали (Na , K_f , K_s , IR , Lk), електрогенна помпа (I_{pump}) и капацитет (C_i) за In *квадратите*; и съпротивление и капацитет (R_m , C_m) за Mu *квадратите*. Канали: Na (натриеви), K_f (бързи калиеви), K_s (бавни калиеви), IR (на обърната ректификация), Lk (на утечка).

В статията на Stephanova (2001), законът на Кирхоф за тока се използва, за да се получи система от частни диференциални уравнения за решаване на електрическата еквивалентна схема (Фиг.3.1.). Видовете канали и максималните им проницаемости са взети от Stephanova and Bostock (1995). Представените максимални проницаемости за каналните видове P_{Na} 9; P_{Kf} 0.07, 27*; P_{Ks} 0.26; P_{IR} 0.008* са обновените взети от статията на Stephanova and Mileva (2000). Звездичката * обозначава интернодално количество. Моделното влакно съдържа 30 нода и 29 интернода. Всеки интернод е разделен на 2 паранодални и 5 интернодални сегмента. Всички изчисления се провеждат за влакно с аксонален диаметър от 12.5 μm . Температурата е 37°C.

IV – V. РЕЗУЛТАТИ И ОБОБЩАВАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

4.1. Изследване ефекта на течните слоеве в миелиновата обвивка върху мембранните свойства на симулирани случаи на интернодални системни демиелинизации (ISDs)

За разширяване на познанието ни върху възможните механизми, обуславящи клиничното нарушаване на свойствата на нервната възбудимост при пациенти с наследствени демиелинизиращи невропатии е изследван ефекта на течните слоеве в миелиновата обвивка върху комплексните мембранни свойства на симулирани демиелинизации. Три прогресивно нарастващи степени на интернодални системни демиелинизации без/с течни слоеве в миелиновата обвивка са симулирани, използвайки мултиламеларния модел на човешки моторни нервни влакна. Демиелинизациите се свързват със съответната загуба на миелиновите ламели без и с отчитане на течните слоеве в тях (Фиг. 4.1.1).



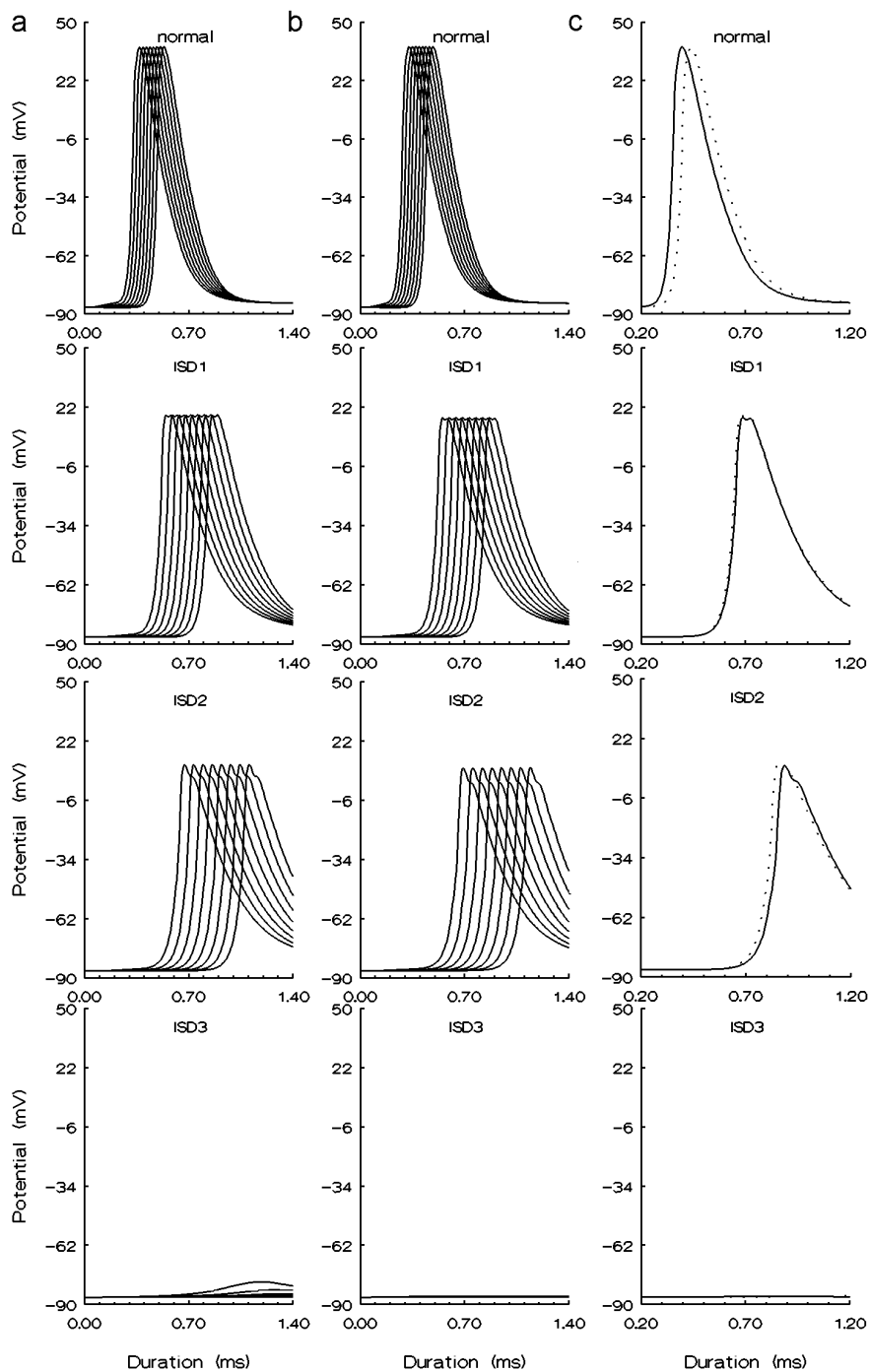
Фиг. 4.1.1. Схематична диаграма на човешки моторни влакна от 7-мия до 14-тия нодове в нормален случай, слаби (70%, 80%) и силни (93%) интернодални системни демиелинизирани случаи. 70%-то, 80%-то и 93%-то намаляване на миелиновите ламели без/с техните течни слоеве съответно за ISD1, ISD2 и ISD3 е еднакво по цялата дължина на влакното.

70%-те (ISD1) и 80%-те (ISD2) стойности за миелиновите ламели без/с течни слоеве, които са намалени еднакво по дължината на влакното са недостатъчни за предизвикване на блок на разпространение на акционния потенциал и демиелинизациите се разглеждат като слаби. 93%-та (ISD3) редуцирана стойност е първата степен за постигане на блок на разпространение на потенциала и демиелинизацията се разглежда като силна. Параметрите, дефиниращи човешкото нервно влакно в норма и при изследваните слаби и силни интернодални системни демиелинизации са дадени в Таблица 4.1.1.

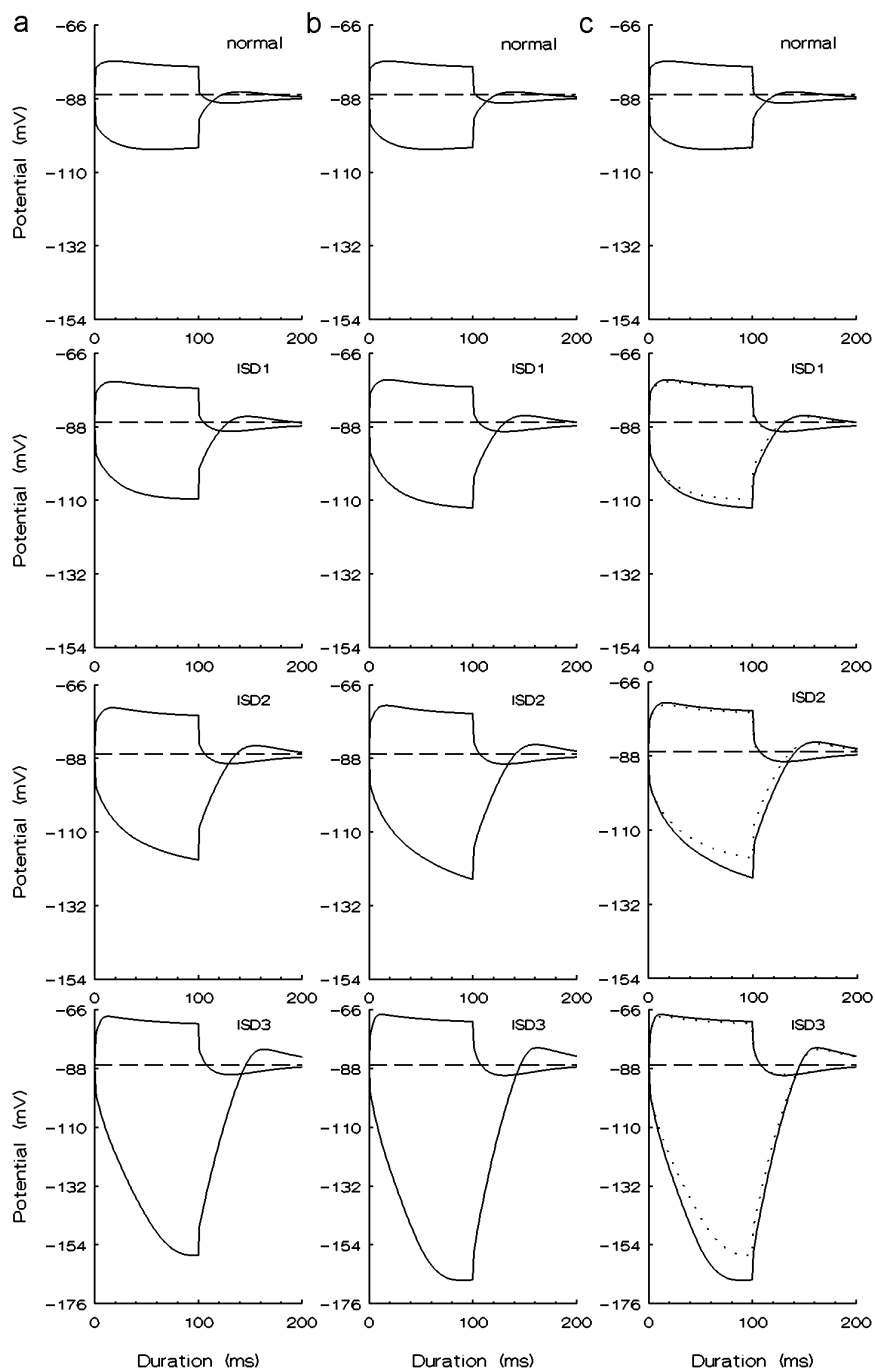
	Without aqueous layers	With aqueous layers
Normal		
N [lamellae]	150	150
R_{my} [$M\Omega$]	250.0	250.0
C_{my} [pF]	1.5	1.5
R_{aq1} [$M\Omega$]	∞	21.3
R_{aqr} [$M\Omega$]	∞	436.8
R_{pa} [$M\Omega$]	300.0	1250.0
R_{pn} [$M\Omega$]	125.0	140.0
ISD1 [70%]		
N [lamellae]	47	47
ISD2 [80%]		
N [lamellae]	30	30
ISD3 [93%]		
N [lamellae]	11	11

Таблица 4.1.1 Стойности на мембранните параметри за човешки моторни нервни влакна без и с отчитане наличието на течните слоеве в нормалния и демиелинизираните случаи, когато демиелинизациите са слаби (ISD1- 70%; ISD2 - 80%) и силни (ISD3 - 93%). N (брой на миелиновите ламели); R_{my} (миелиново съпротивление); C_{my} (миелинов капацитет); R_{aq1} (аксиално съпротивление на течния слой), R_{aqr} (радиално съпротивление на течния слой), R_{pa} (периаксонално съпротивление), R_{pn} (паранодално съпротивление).

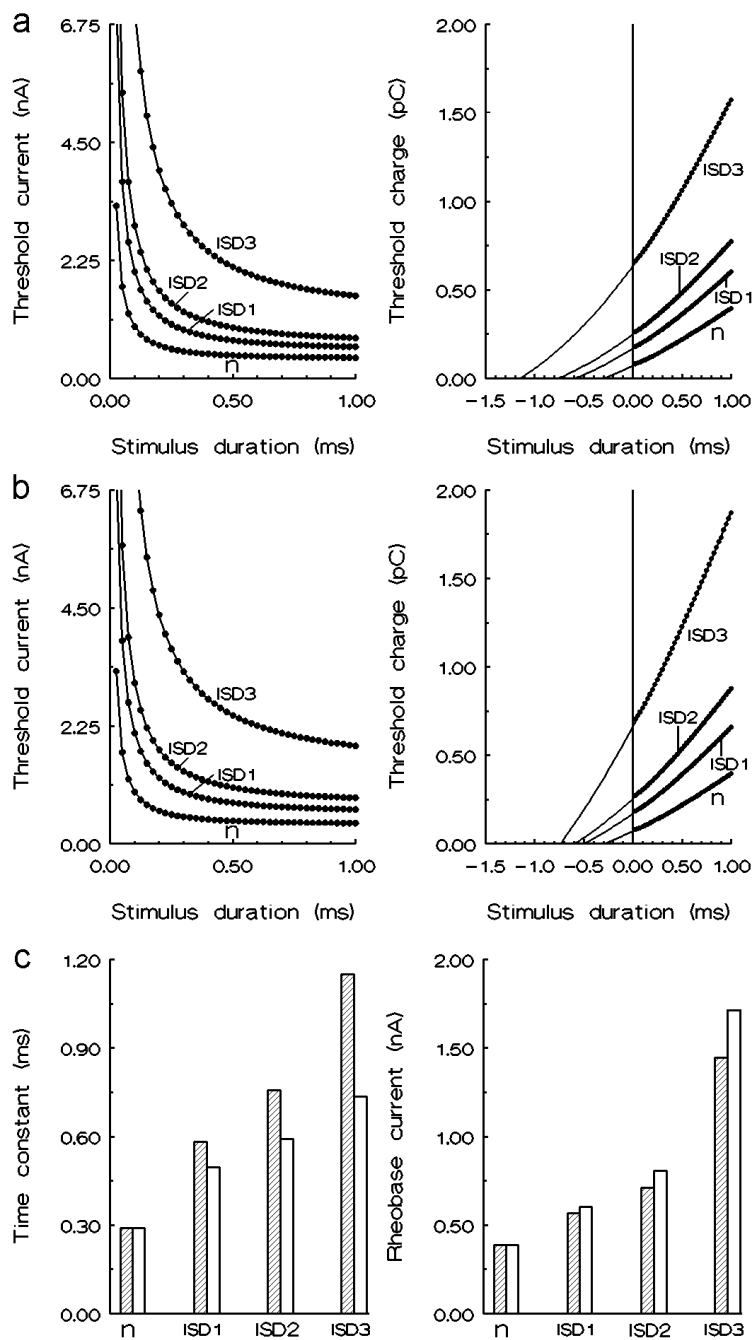
За тези симулирани демиелинизации са изследвани комплексно промените в потенциалите (акционни, електротонични), кривите сила-продължителност, кривите заряд-продължителност, времевите константи, реобазите и циклите на възстановяване, представени графично по-долу.



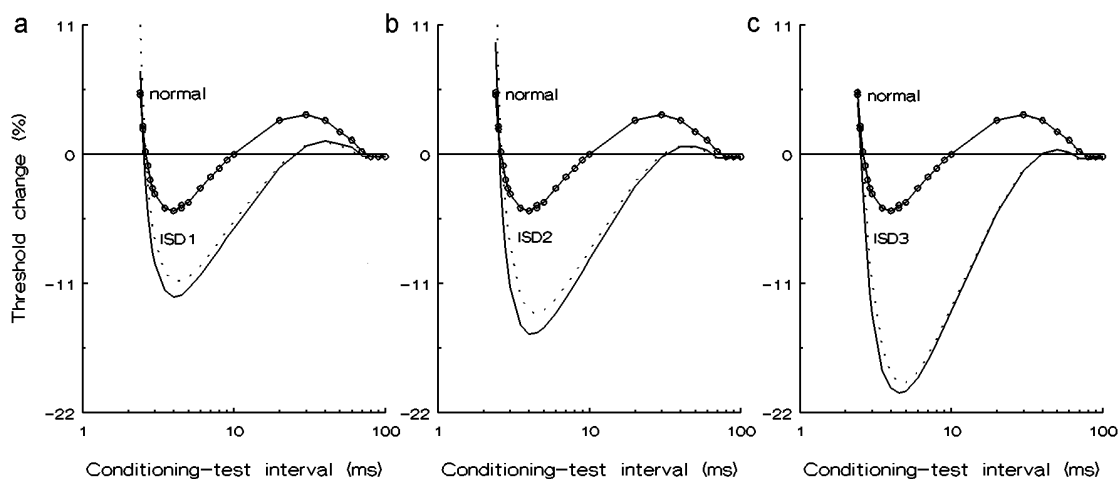
Фиг. 4.1.2. Интрацелуларни акционни потенциали на човешки моторни влакна в нормален, ISD1, ISD2, ISD3 случаи без (a), с (b) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка и при сравняване на двата случая (c). Потенциалите в отговор на 0.1 ms прагови токови импулси са представени за всеки нод от 7-мия до 14-тия (a, b) и двата случая са сравнени само в 10-тия нод (c). При сравняването, потенциалите без отчитане на течните слоеве са представени с *точкови линии*, а тези с течните слоеве с *непрекъснати линии*.



Фиг. 4.1.3. Електротонични потенциали на човешки моторни влакна в нормален, ISD1, ISD2, ISD3 случаи без (a), с (b) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка и при сравняване на двата случая (c). Потенциалите в отговор на 100 ms деполаризиращи и хиперполаризиращи токови импулси ($\pm 40\%$ от прага) са представени за всеки нод от 7-мия до 14-тия. При сравняването (c), потенциалите без отчитане на течните слоеве са представени с *точкови линии*, а тези с течните слоеве с *непрекъснати линии*.



Фиг. 4.1.4. Сила-продължителност кривите (лява колона) и заряд-продължителност кривите (дясна колона) на човешки моторни влакна в нормален, ISD1, ISD2, ISD3 случаи без (a) и с (b) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка. Сравняване на времевите константи (лява колона) и реобазните токове (дясна колона) (c) без (защриховани колони) и с (незащриховани колони) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка.



Фиг. 4.1.5. Цикли на възстановяване в нормален, ISD1, ISD2, ISD3 случаи (a-c) на човешки моторни влакна без (*точкови линии*) и с (*непрекъснати линии*) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка. За всички изследвани случаи, у-остта се дефинира като $100 \times (I_{\text{test}} - I_{\text{cond}})/I_{\text{cond}}$ (%), където I_{test} и I_{cond} са съответно праговите токове на тестиращия и обуславящия импулси. В нормалния случай, кривите без и с наличие на течните слоеве напълно съвпадат. За по-добра илюстрация на ефекта на течните слоеве върху аксоналната супервъзбудимост, *положителните ординати* са прекъснати. Максималните стойности на рефрактерността са 14% /16% (не са дадени в (a,b)) за случаите съответно ISD1/ ISD2 без течни слоеве (*точкови линии*).

Обсъждане на резултатите

Настоящото изследване показва, че течните слоеве в миелиновата обвивка изменят мембранните свойства на човешките моторни нервни влакна когато системните демиелинизации са интернодални. Загубата на миелиновите ламели и техните течни слоеве в ISD1 и ISD2 случаите допълнително забавят скоростта на разпространение на интрацелуларните акционни потенциали в сравнение със случаите, когато не се отчитат течните слоеве. Скоростите на разпространение, получени от нас, са в диапазона от 31/30.6 – 23/22.2 m/s за случаите съответно без/с течните слоеве в миелиновата обвивка. Средните скорости на разпространение в медиалния нерв, измерени в пациенти със CMT1A са 21 ± 5.7 m/s (Hattory et al. 2003) и 16.5 m/s в диапазона 5–35 m/s (Carvalho et al. 2005; Marques et al.

2005). Относително слабият ефект на течните слоеве върху процесите на разпространение в изследваните демиелинизирани случаи може да обясни еднаквите редуциращи стойности (93% / 93%) за миелиновите ламели без/с течните слоеве, получени за реализирането на блока на разпространение.

В изследваните демиелинизирани случаи, значително по-голям ефект на течните слоеве се наблюдава върху акомодативните и адаптивните процеси отколкото върху процесите на разпространение, като резултат на почти цялостната дисфункция на интернодалната аксолема по дължината на влакното в изследваните демиелинизирани случаи. При отчитане наличието на течните слоеве се констатира допълнително нарастване на хиперполяризиращите електротонични потенциали, реобазните токове и супервъзбудимостта на аксоните, а също така се наблюдава и значително намаляване на рефрактерностите и времевите константи сила-продължителност. Промените в акционните потенциали в норма и при различните степени на демиелинизация се определят от кинетиката на нодалните йонни токове. Промените в електротоничните потенциали в норма и при различните степени на демиелинизация се обуславят от нодалните и интернодалните йонни токове. Механизмите на изменение на свойствата на възбудимостта, както и кинетиката на йонните токове, протичащи през интернодално системно демиелинизираните случаи без течни слоеве в миелиновата обвивка са подробно описани и дискутирани в редица публикации (Stephanova and Alexandrov 2006; Stephanova and Daskalova 2008; Stephanova et al. 2005, 2007) и са същите като в случаите в които течните слоеве се взимат под внимание. Следователно тяхното детайлно описване и дискутиране няма да бъде излагано отново.

Накратко, по време на деполяризиращите токови импулси, приносът на изходящия нодален бавен калиев ток, както към общия нодален йонен ток, така и към генерацията на електротоничния потенциал е голям и е почти еднакъв за нормалния, и за демиелинизираните случаи без/с течни слоеве. По-голямата част от входящия нодален ток не тече през нодалната

аксолема, но преминава надлъжно през паранодалното съпротивление към периаksonалното пространство. По време на хиперполяризиращите токови импулси, приносът на общия йонен ток в нода за нормалния и демиелизираните случаи е незначителен, докато за паранодалните и интернодалните сегменти, входящите токове на обърната ректификация и на утечка доминират в общия йонен ток. С нарастване на загубата на миелиновите ламели и техните съответни течни слоеве, токът по време на бързата фаза на електротоничния потенциал (0 – 10 ms) нараства бързо, което допринася за допълнителното нарастване на тока на обърната ректификация и на тока на утечка. Тези механизми обясняват значителните разлики наблюдавани между деполяризиращите и хиперполяризиращите електротонични потенциали в случаите без/с течни слоеве. Редица изследвания (Stephanova and Alexandrov, 2006; Stephanova and Daskalova, 2008; Stephanova et al. 2005; 2007) потвърждават връзката между интернодалните системни демиелинизации и наследствени невропатии като CMT1A (Nodera et al. 2004; Nodera and Kaji 2006).

Както е известно, наследствените невропатии на периферната нервна система са клинично хетерогенна група от заболявания (Dyck et al. 1993). Главните типове са заболяването Шарко-Мари-Туут тип 1 (CMT1) или наследствена моторна и сензорна невропатия тип I (HMSN I), демиелинизираща невропатия; заболяването Шарко-Мари-Туут тип 2 (CMT2) или наследствена моторна и сензорна невропатия тип II (HMSN II), аксонална невропатия; и Dejerine-Sottas синдром (DSS) или наследствена моторна и сензорна невропатия тип III (HMSN III), силна демиелинизираща невропатия. CMT тип 1 е заболяване със сегментална демиелинизация, която води до забавянето на провеждането в моторните и сензорните нерви (Dyck et al. 1993; Fabrizi et al. 2007; Hattori et al. 2003; Verhamme et al. 2009; Yiu et al. 2008). CMT тип 2 се характеризира с аксонална загуба, но скоростите на разпространение на акционните потенциали в CMT2 са близки до нормалните (Coleman and Freeman 2010; Guertin et al. 2005;

Moldovan et al. 2009). СМТ тип 3 се характеризира със силна демиелинизация (Benstead et al. 1990; Gabreëls-Festen 2002; Yim et al. 1995) и по принцип е много по-силна от СМТ тип 1. Заболяването СМТ1А е генетично демиелинизираща полиневропатия обикновено свързана с DNA дупликация на хромозом 17. Следователно резултатите представени тук са съвместими с интерпретацията, че генетичните фактори, причиняващи промените в интернодалните сегменти на миелиновата обвивка биха могли да отговарят за клиничните нарушения при СМТ1А, регистрирани с техниката за проследяване на прага.

Настоящото изследване потвърждава също, че преходът от забавяне на провеждането (ISD1–70%; ISD2–80%) до блокиране на провеждането (ISD3–93%) води до нарастване на степента на промените в мембранните свойства, като посоката на промените се запазва. Това е валидно и за двата случая без и с отчитането на течните слоеве в миелиновата обвивка.

В заключение може да се каже, че настоящото изследване показва различни нарушения в свойствата на мембранната възбудимост на човешките моторни нервни влакна без/с течни слоеве в миелиновата обвивка. Обаче, течните слоеве, когато се взимат под внимание, имат допълнителен ефект върху тези свойства. Те са допълнително влошавани с изключение на рефрактерността и времевите константи сила-продължителност, които са подобрени, но все пак, времевите константи са по-дълги от тези в норма. Рефрактерността в демиелинизираните случаи с течните слоеве е малко по-висока или близка до нормалната. Такава рефрактерност и стойности на времевите константи сила-продължителност са по-характерни за пациентите с СМТ1А (Nodera et al. 2004). Промените в мембранните свойства са по-големи за акомодативните и адаптивните процеси отколкото за процесите на разпространение във влакната. Слабите интернодални системни демиелинизации изследвани тук са характерни за СМТ тип 1, като СМТ1А, докато изследваните тук силни демиелинизации са по-характерни за СМТ тип 3, като DSS.

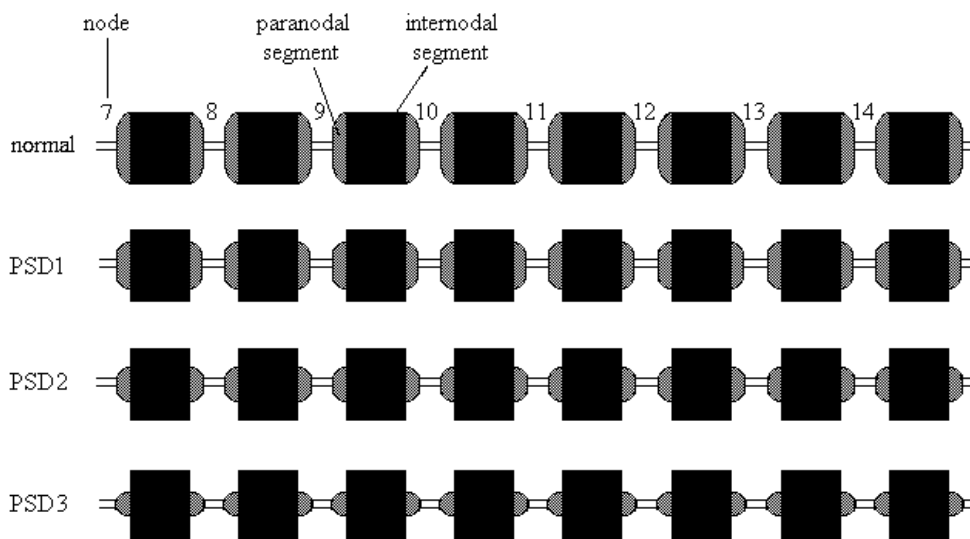
Направените **ИЗВОДИ** от изследваните симулирани интернодални системни демиелинизации (**ISDs**) могат да се формулират така:

- Ефектът на течните слоеве в миелиновата обвивка върху индексите на аксонална възбудимост е силно изразен за влакната с ISDs.
- Промените в мембранните свойства са по-големи за акомодативните и адаптивните процеси отколкото за процесите на разпространение на акционния потенциал във влакна с ISDs, отчитащи наличието на течните слоеве в миелиновата обвивка.
- Загубата на миелиновите ламели и техните течни слоеве води до допълнително влошаване на свойствата на възбудимостта на влакната с ISDs и респективно до влошаване на мембранните свойства на симулираното заболяване СМТ1А .
- Резултатите представени тук са съвместими с интерпретацията, че генетичните фактори, причиняващи промените в интернодалните сегменти на миелиновата обвивка биха могли да отговарят за клиничните нарушения при СМТ1А, регистрирани с техниката за проследяване на прага.
- Би могло да се допусне, че лекарствени средства, които водят до ремиелинизирването и респективно до възстановяването на течния баланс във вече ремиелинизираната обвивка биха били ефикасни при лечението на заболяването Шарко–Мари–Туут тип 1А.

Провеждането на изследвания за проследяване на ефекта на такива лекарствени средства върху промените на нервната възбудимост на пациенти със заболяването СМТ1А, и базиращи се на техниката за проследяване на прага (Bostock et al. 1998; Kiernan et al. 2000), биха могли да потвърдят това наше допускане.

4.2. Изследване ефекта на течните слоеве в миелиновата обвивка върху мембранните свойства на симуирани случаи на паранодални системни демиелинизации (PSDs)

Напоследък, пациенти с хронични демиелинизиращи невропатии демонстрират значителни нарушения в техните комплексно изследвани свойства на нервната възбудимост, чрез прилагането на неинвазивната техника за проследяване на прага. Наново, за да разширим нашето познание върху възможните механизми, описващи тези нарушения, които все още не са добре разбрани, бяха симуирани както нормалния (контролен) случай, така и прогресивно нарастващи степени на системни демиелинизации, всяка от които паранодална. Демиелинизациите (PSD1, PSD2, PSD3) се свързват със съответната загуба на краищата на миелиновите обвивки без/с отчитане на течни слоеве в тях (Фиг. 4.2.1).



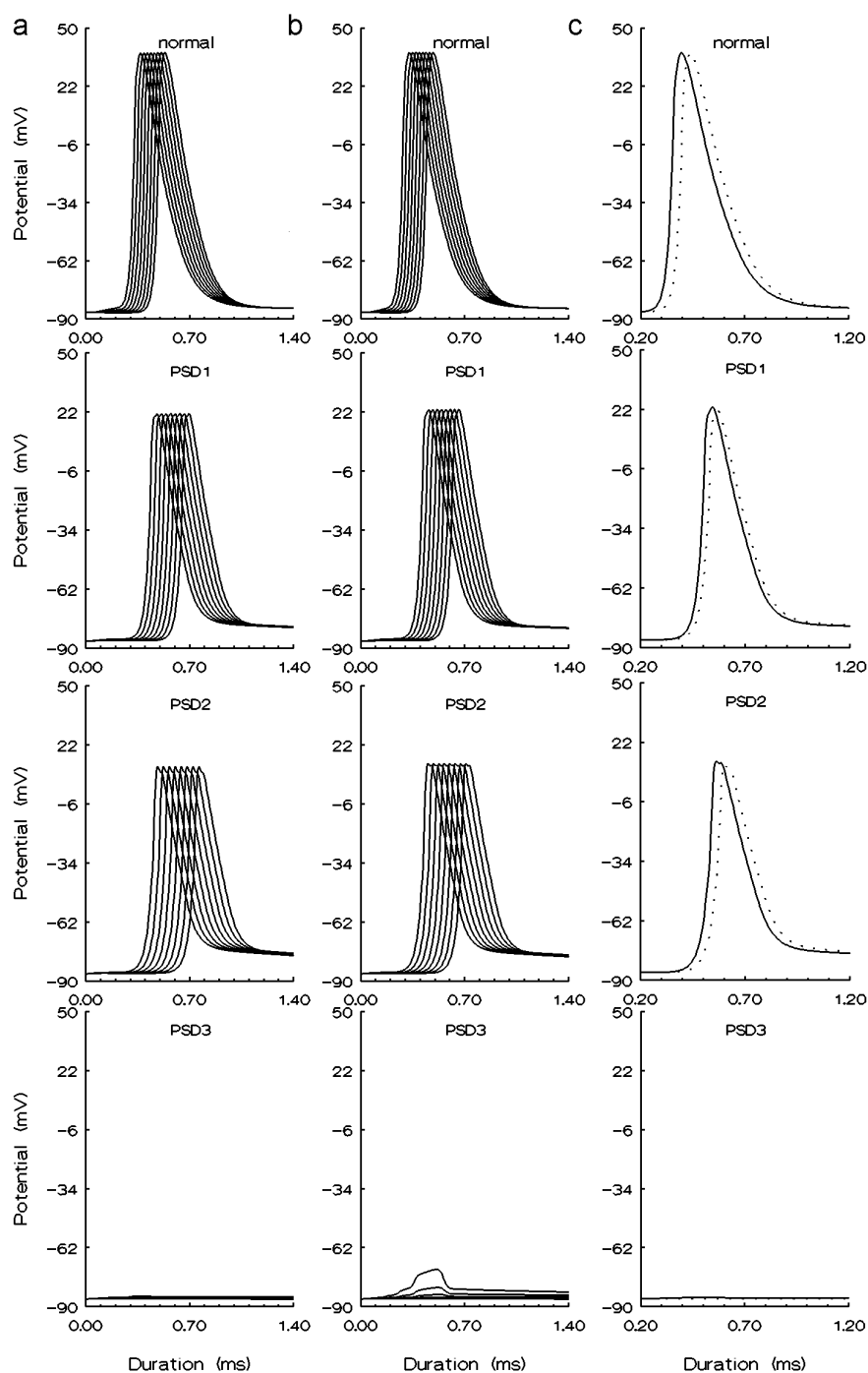
Фиг.4.2.1. Схематична диаграма на човешки моторни влакна от 7-мия до 14-тия нодове в нормален, слаби (70%, 80%) и силни (90%) паранодални системни демиелинизирани случаи. 70%-то, 80%-то и 90%-то намаляване на паранодалните области съответно за PSD1, PSD2 и PSD3 случаите е еднакво по цялата дължина на влакното.

Параметрите, характеризиращи симулираните и изследваните от нас случаи са дадени в Таблица 4.2.1.

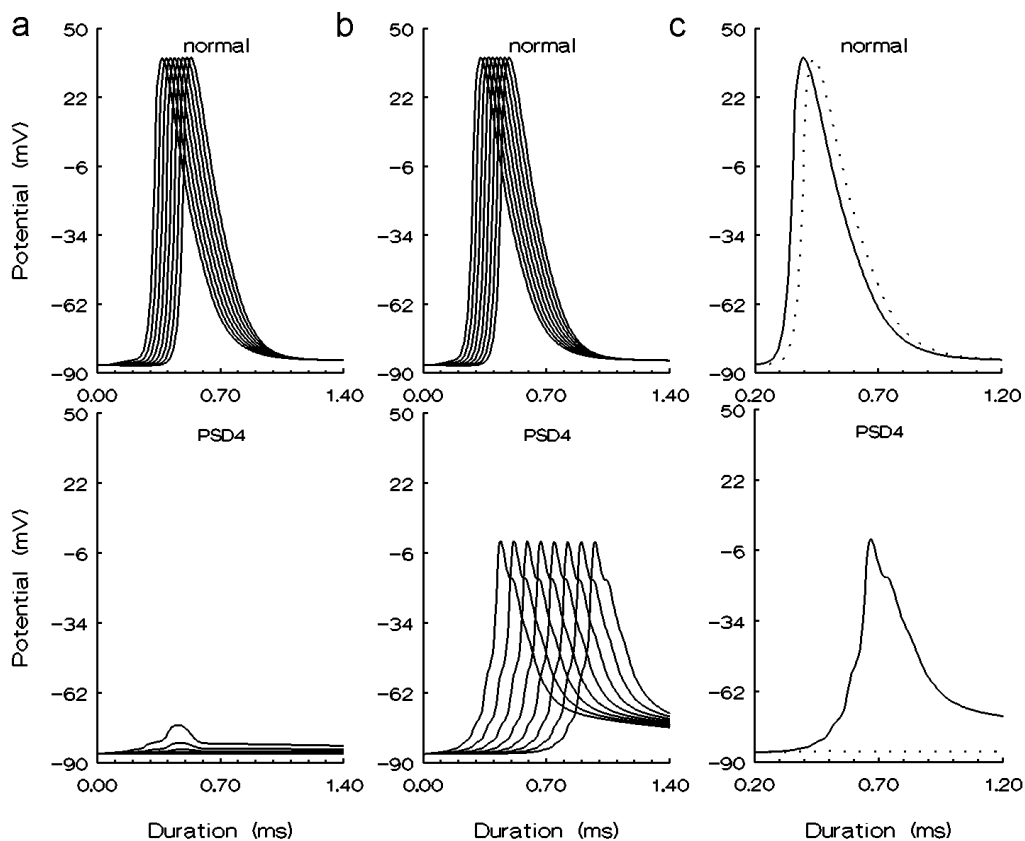
	Without aqueous layers	With aqueous layers
Normal		
N [lamellae]	150	150
R_{my} [$M\Omega$]	250.0	250.0
C_{my} [pF]	1.5	1.5
R_{aq1} [$M\Omega$]	∞	21.3
R_{aqr} [$M\Omega$]	∞	436.8
R_{pa} [$M\Omega$]	300.0	1250.0
R_{pn} [$M\Omega$]	125.0	140.0
v [m/s]	58.0	62.0
PSD1 [70%]		
R_{pn} [$M\Omega$]	39.0	43.9
v [m/s]	41.0	44.0
PSD2 [80%]		
R_{pn} [$M\Omega$]	25.0	28.0
v [m/s]	35.0	38.0
PSD3 [90%]		
R_{pn} [$M\Omega$]	12.5	14.0
v [m/s]	block	block
PSD4 [89%]		
R_{pn} [$M\Omega$]	13.75	15.4
v [m/s]	block	19.0

Таблица 4.2.1 Стойности на мембранните параметри характерни за човешки моторни нервни влакна без и с течните слоеве в нормалните и демиелинизираните случаи, когато демиелинизациите са слаби (PSD1- 70%; PSD2- 80%) и силни (PSD3- 90%, PSD4- 89% съответно). N (брой на миелиновите ламели); R_{my} (миелиново съпротивление); C_{my} (миелинов капацитет); R_{aq1} (аксиално съпротивление на течния слой), R_{aqr} (радиално съпротивление на течния слой), R_{pa} (периаксонално съпротивление), R_{pn} (паранодално съпротивление), v (скорост на разпространение).

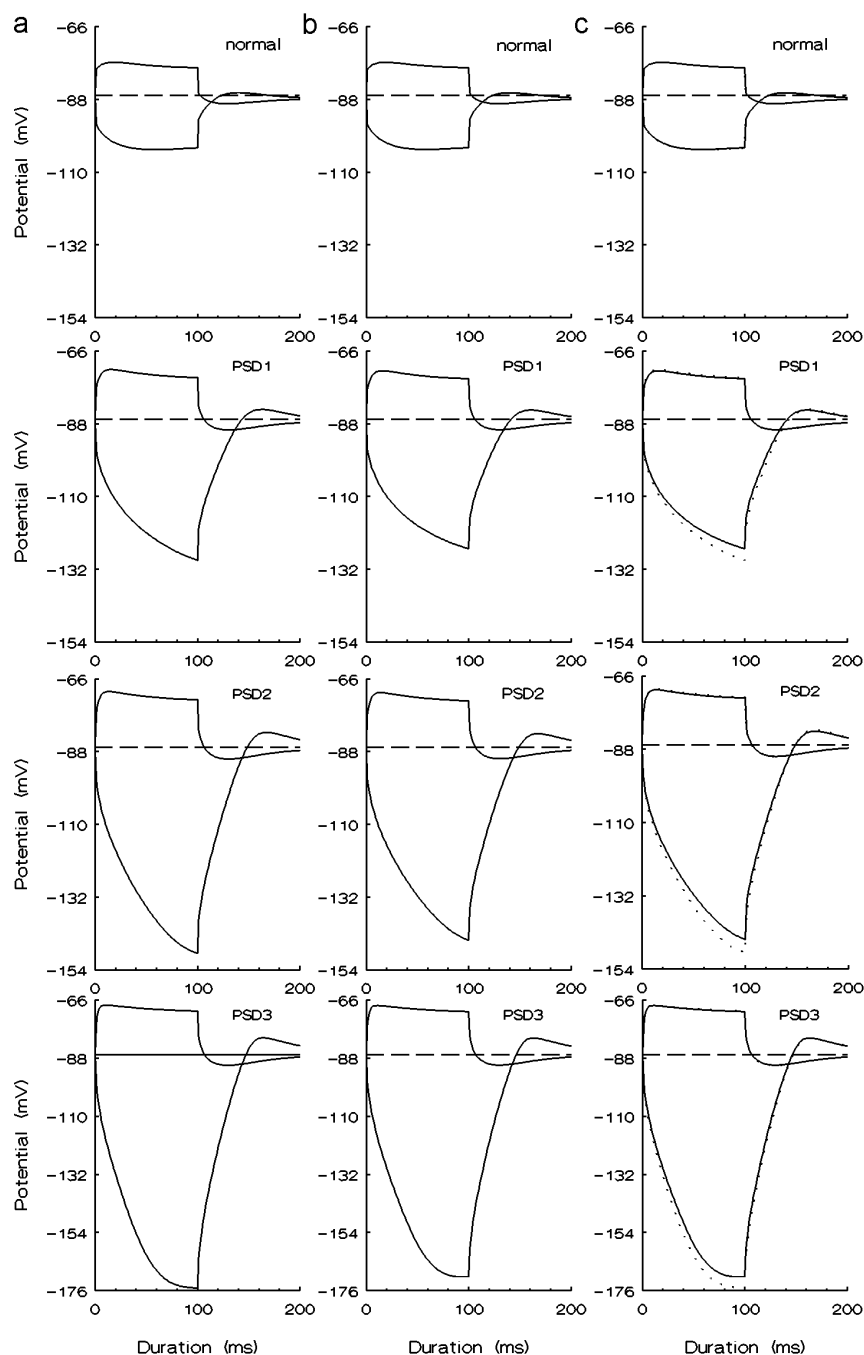
За тези симулирани демиелинизации са също изследвани комплексно промените в потенциалите (акционни, електротонични), кривите сила-продължителност, кривите заряд-продължителност, времевите константи, реобазите и циклите на възстановяване, представени графично по-долу.



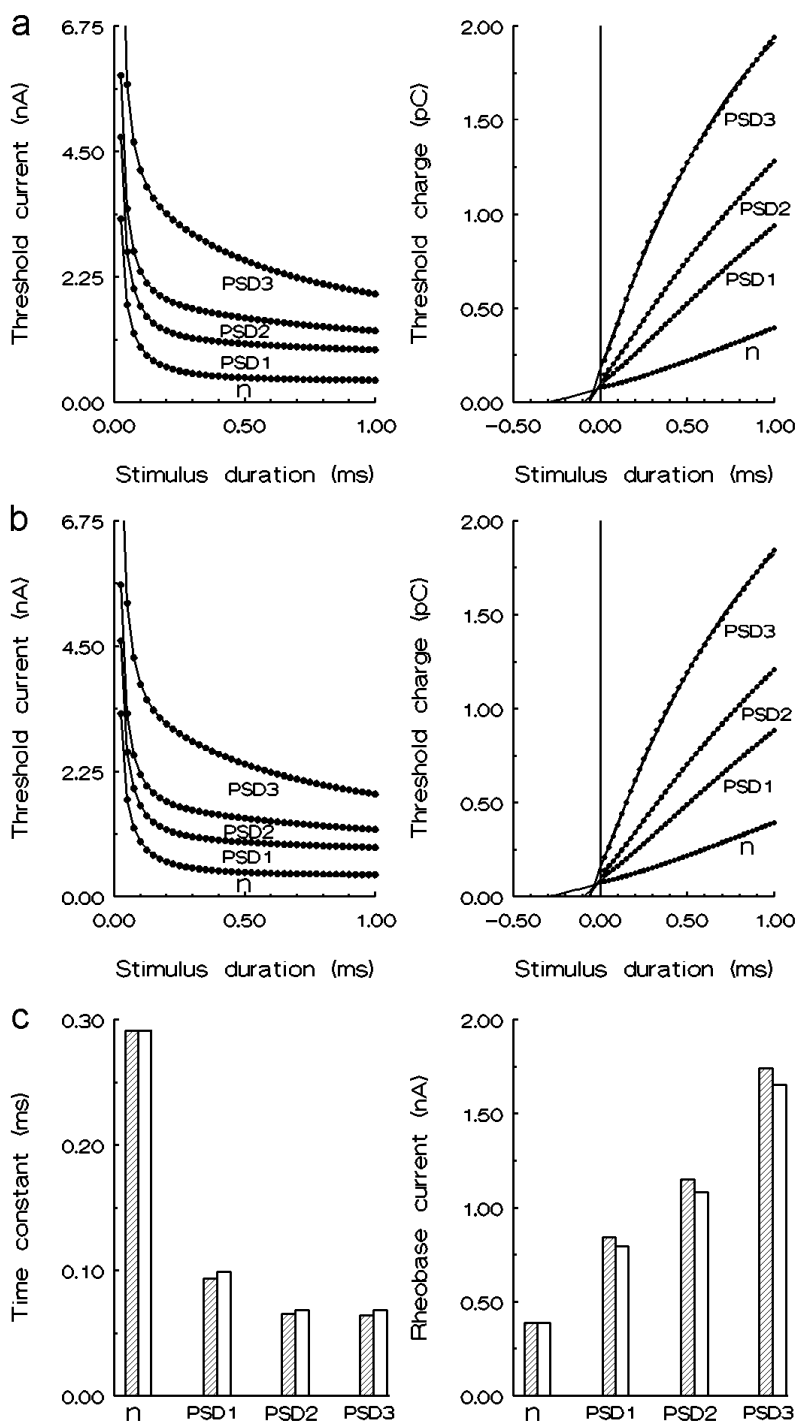
Фиг. 4.2.2. Интрацелуларни акционни потенциали на човешки моторни влакна в нормален и PSD1, PSD2, PSD3 случаи без (а), с (б) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка и при сравняване на двата случая (в). Потенциалите в отговор на 0.1 ms прагови токови импулси са представени за всеки нод от 7-мия до 14-тия (а, б) и двата случая са сравнени само в 10-тия нод (в). При сравняването, потенциалите без отчитане на течните слоеве са представени с *точкови линии*, а тези с течните слоеве с *непрекъснати линии*.



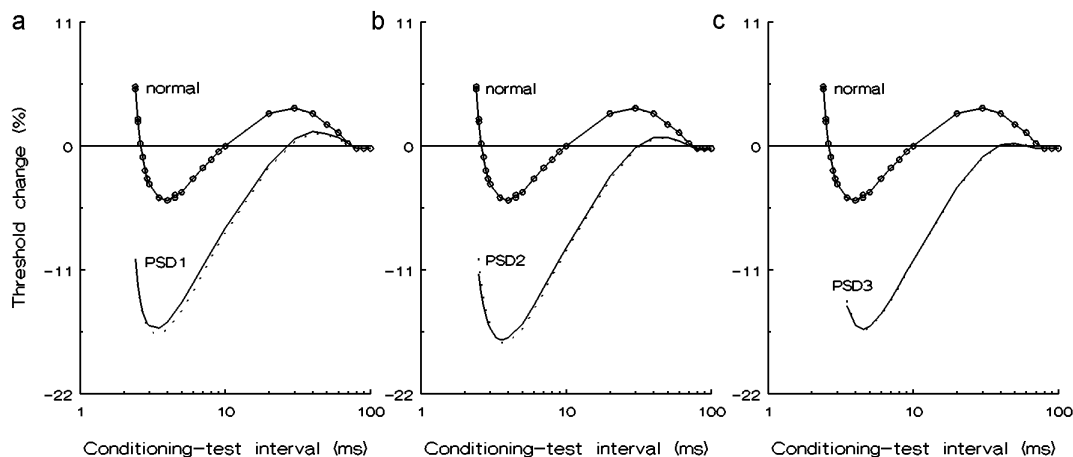
Фиг. 4.2.3. Интрацелуларни акционни потенциали на човешки моторни влакна в нормален и силен PSD4 (89%) случаи без (a), с (b) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка и при сравняване на двата случая (c). Потенциалите в отговор на 0.1 ms прагови токови импулси са представени за всеки нод от 7-мия до 14-тия (a, b) и двата случая са сравнени в 10-тия нод (c). При сравняването, потенциалите без отчитане на течните слоеве са представени с *точкови линии*, а тези с течните слоеве с *непрекъснати линии*.



Фиг. 4.2.4. Електротонични потенциали на човешки моторни влакна в нормален, PSD1, PSD2, PSD3 случаи без (a), с (b) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка и при сравняване на двата случая (c). Потенциалите в отговор на 100 ms деполаризиращи и хиперполаризиращи токови импулси ($\pm 40\%$ от прага) са представени за всеки нод от 7-мия до 14-тия. При сравняването (c), потенциалите без отчитане на течните слоеве са представени с *точкови линии*, а тези с течните слоеве с *непрекъснати линии*.



Фиг. 4.2.5. Сила-продължителност кривите (лява колона) и заряд-продължителност кривите (дясна колона) на човешки моторни влакна в нормален, PSD1, PSD2, PSD3 случаи без (a) и с (b) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка. Сравняване на времевите константи сила-продължителност (лява колона) и реобазните токове (дясна колона) (c) без (защриховани колони) и с (незащриховани колони) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка.



Фиг. 4.2.6. Цикли на възстановяване в нормален, PSD1, PSD2, PSD3 случаи (a-c) на човешки моторни влакна без (точкови линии) и с (непрекъснати линии) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка. За всички изследвани случаи, у-остта се дефинира като $100 \times (I_{\text{test}} - I_{\text{cond}}) / I_{\text{cond}}$ (%), където I_{test} и I_{cond} са съответно праговите токове на тестиращия и обуславящия импулси. В нормалния случай, кривите без и с наличие на течните слоеве напълно съвпадат.

Обсъждане на резултатите

Резултатите получени в представеното изследване показват, че течните слоеве в паранодално системно демиелинизираните миелинови обвивки изменят специфично функционалните свойства на човешките моторни нервни влакна. Еднаквото намаляване на паранодалното съпротивление по дължината на влакната в PSD1 и PSD2 случаите, допълнително повишава скоростите на разпространение на интрацелуларните акционни потенциали при сравняването им със случаите, когато течните слоеве не се вземат под внимание. Изчислените скорости на разпространение са в диапазона 41/44 – 35/38 m/s съответно за случаите без/с течни слоеве. За един от силно демиелинизираните случаи, за който разпространението без течни слоеве е блокирано, течните слоеве възстановяват разпространението на акционния потенциал. Скоростта на разпространение на акционния потенциал точно преди блокажа (PSD4,

89%) е 19 m/s. Скоростите на разпространение при пациенти с CIDP измервани в медиални моторни аксони в сегменти на китката на ръката са в диапазона 54–20 m/s (Cappelen-Smith et al. 2001; Sung et al. 2004).

Значително по-голям ефект на течните слоеве се наблюдава върху процесите на разпространение отколкото върху процесите на адаптация и акомодация, като резултат от дисфункцията на всеки паранодален сегмент до нодалните сегменти по дължината на влакната в изследваните демиелинизирани случаи. Промените в акционните потенциали в нормалния и в изследваните демиелинизирани случаи без течни слоеве се определят главно от кинетиката на нодалните йонни токове, които са описани и дискутирани в предишни изследвания (Stephanova and Alexandrov 2006; Stephanova and Chobanova 1997; Stephanova et al. 2007). Тази кинетика е същата, както в случаите в които течните слоеве също се вземат под внимание. Накратко, генерирането на акционните потенциали в нодалните сегменти се определя главно от входящия натриев ток, тъй като приносът на бързите и бавните калиеви канали към общия нодален йонен ток е незначителен. Външно регистрираният нодален входящ ток (мембранен ток) е по-малък отколкото тока през нодалната аксолема, поради протичането на ток през паранодалното съпротивление. Отрицателната низходяща фаза на входящия мембранен ток се следва от позитивна фаза на изходящия мембранен ток, която нараства с нарастването на протичането на тока през паранодалната аксолема към периаksonалното пространство. Разцепването на пика на акционните потенциали наблюдавано в демиелинизираните случаи отразява наклона на отрицателната спадаща фаза и на момента на появяването на позитивната фаза на нодалния мембранен ток. Независимо, че паранодалните съпротивления в изследваните демиелинизирани случаи с течни слоеве (R_{pn} , 43.9, 28.0, 15.4 M Ω) са по-големи от тези (R_{pn} , 39.0, 25.0, 13.75 M Ω , съответно) без течни слоеве, и периаksonалното съпротивление (R_{pa} , 1250 M Ω) е значително високо в случая с течни слоеве, то еквивалентното

периаксонално съпротивление (R_{pa}^* , 20.9 M Ω , Stephanova, 2001) е по-ниско от надлъжното съпротивление на течните слоеве (R_{aql} , 21.3 M Ω), виж Таблица 4.2.1. Първият, провеждащ надлъжно течен слой (R_{aql}), паралелно с периаксоналния слой (R_{pa}) дефинира еквивалентния периаксонален слой (R_{pa}^* , Stephanova 2001), който подпомага разпространението на акционния потенциал. Периаксоналното съпротивление в случая без течни слоеве (R_{pa} , 300 M Ω), виж Таблица 4.2.1., е по-високо от еквивалентното периаксонално съпротивление. Следователно, намаляването на паранодалното съпротивление в случаите с течни слоеве води до допълнително повишаване на надлъжния ток, преминаващ през паранодалната аксолема към периаксоналното пространство. В резултат на това скоростта на разпространение на потенциала допълнително нараства.

Промените в електротоничния потенциал в нормалния и в демиелинизираните случаи без течни слоеве се определят от кинетиката на нодалните и интернодални токове, които са също дискутирани и описани в предишни работи (Stephanova and Alexandrov 2006; Stephanova et al. 2007). Обаче, в изследваните демиелинизирани случаи всички интернодални сегменти и техните течни слоеве не са променени и това може да обясни незначителния и относително слаб ефект на течните слоеве върху деполяризиращите и хиперполяризиращите електротонични потенциали. Накратко, по време на деполяризиращите токови импулси, приносят на изходящия нодален бавен калиев ток, както към общия нодален йонен ток, така и към генерацията на електротоничния потенциал е голям, и е почти еднакъв за нормалния, и за демиелинизираните случаи без/с течни слоеве. По време на хиперполяризиращите токови импулси, приносят на общия йонен ток в нода за нормалните и демиелизираните случаи е незначителен, докато за паранодалните и интернодалните сегменти, входящите токове на обърната ректификация и на утечка доминират в общия йонен ток. С намаляването на паранодалното съпротивление протичането на тока през бързата електротонична фаза (0 – 10 ms) нараства

бързо, което обуславя нарастването на токовете на обърната ректификация и на утечка, в случаите без течни слоеве. Обаче, паранодалните съпротивления в демиелинизираните случаи с течни слоеве са по-големи от тези без течни слоеве, както това е дискутирано по-горе. В резултат на това, по нататъшно намаляване се наблюдава в бързата фаза на електротоничните потенциали, обуславяща съответно намалените токове на обърната ректификация и на утечка.

В заключение, настоящото изследване показва, че течните слоеве имат подобряващ ефект върху мембранните свойства на възбудимостта на човешки моторни нервни влакна. Изследванията (Stephanova and Alexandrov 2006; Stephanova and Daskalova 2005, 2008) потвърждават връзката между паранодалните системни демиелинизации и хроничните демиелинизираци невропатии, такива като хроничната възпалителна демиелинизираща полиневропатия (CIDP). Както е известно CIDP е заболяване със сегментална демиелинизация, която води до намаляване или блокиране на разпространението на акционния потенциал в моторни и сензорни нерви (Köller et al. 2005). Това заболяване се характеризира с пълна симетрия, като са засегнати проксималните и дисталните мускули (Köller et al. 2005; Saperstein 2001). Изследванията върху пациенти с CIDP показват, че аномално по-големите негативни електротонични отговори, по-късите времеви константи, по-високите реобазни токове и по-високите аксонални супервъзбудимости са характерни за тях. Представеното тук изследване също потвърждава, че слабите и силните паранодални системни демиелинизации без/с течни слоеве могат да дадат важна информация за патофизиологичните механизми, описващи CIDP.

Направените **ИЗВОДИ** от изследваните симулирани паранодални системни демиелинизации (**PSDs**) могат да се формулират така:

- Ефектът на течните слоеве в миелиновата обвивка върху мембранните свойства на влакната в случаите с PSDs е обратен на този при ISDs

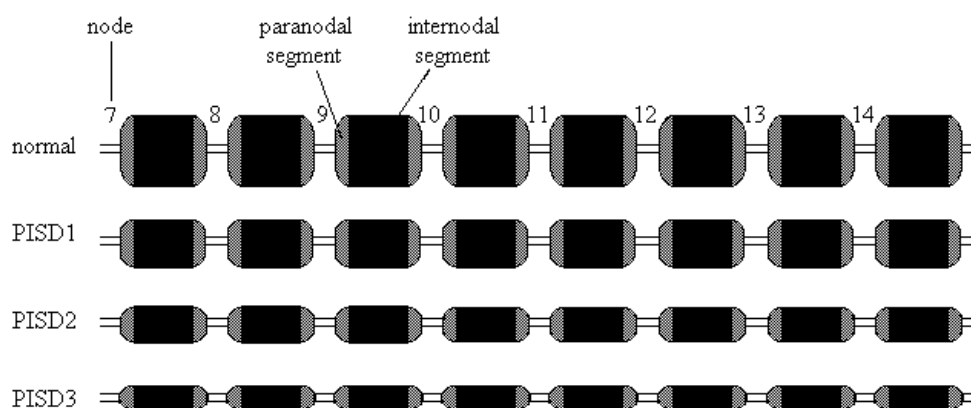
т.е. свойствата се подобряват и респективно това води до подобряване на мембранните свойства на симулираната хронична възпалителна демиелинизираща полиневропатия (CIDP).

- Промените в мембранните свойства на влакната са по-големи за процеса на разпространение на акционния потенциал отколкото за процесите на акомодация и адаптация на влакната с PSDs, отчитащи наличието на течните слоеве в миелиновата обвивка.
- С прогресивното нарастване на демиелинизацията до блокирането на акционните потенциали в PSDs с отчитане на течните слоеве, потенциалите прогресивно увеличават скоростта си на разпространение и възстановяват вече блокираното разпространение на потенциала в същия демиелинизиран случай, но без отчитане на течните слоеве в миелиновата обвивка.
- Резултатите представени тук са съвместими с интерпретацията, че имунологичните фактори, причиняващи промените в паранодалните сегменти на миелиновата обвивка биха могли да отговарят за клинично наблюдаваните нарушения при CIDP, регистрирани с техниката за проследяване на прага.
- Би могло да се допусне, че лекарствени средства, които водят до подобряването на потенциалите и индексите на аксоналната възбудимост по същия начин както при разгледаните PSDs случаи, с отчитане на течните слоеве в миелиновата обвивка, биха били полезни за лечението на пациенти с CIDP.

Най-новите изследвания на ефекта на интравенозен имуноглобулин (IVIg) върху промените на нервната възбудимост на пациенти с CIDP (Voërio et al. 2010), базиращи се на техниката за проследяване на прага, потвърждават това наше допускане. Известен е фактът, че въпреки високите разходи, терапията с IVIg е широко застъпена като ефикасно лечение за хронично възпалителната демиелинизираща полиневропатия (Eftimov et al. 2009).

4.3 Изследване ефекта на течните слоеве в миелиновата обвивка върху мембранните свойства на симуирани случаи на паранодални интернодални системни демиелинизации (PISDs)

Третият тип симуирани от нас прогресивно нарастващи системни демиелинизации са смесените интернодални паранодални (две слаби – PISD1, PISD2 и една силна – PISD3). Тези демиелинизации се свързват с едновременното разхлабване или отстраняване на миелиновите крайни окончания и загубата на миелиновите ламели без/с течни слоеве по цялата дължина на влакната (Фиг. 4.3.1).



Фиг.4.3.1. Схематична диаграма на човешки моторни влакна от 7-мия до 14-тия нодове в нормален, слаби (70%, 80%) и силни (82%) паранодални интернодални системни демиелинизирани случаи. 70%-то, 80%-то и 82%-то едновременно намаляване на паранодалните области и миелиновата обвивка съответно за PISD1, PISD2 и PISD3 е еднакво по цялата дължина на влакното за системно демиелинизирани случаи.

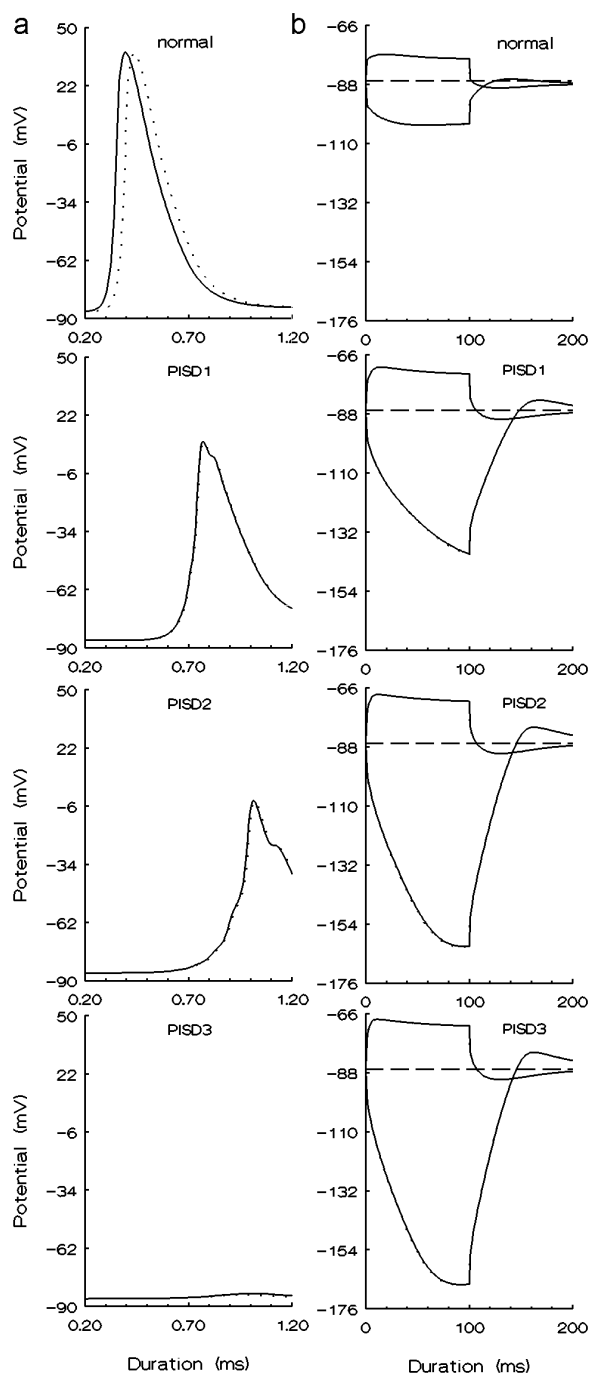
Двете слаби демиелинизации се реализират отново чрез 70%-то и 80%-то едновременно редуциране на миелиновото съпротивление и на миелиновите ламели без и с отчитане на техните течни слоеве. За смесения тип демиелинизации, блок на разпространение на акционния потенциал настъпва при редуциращата стойност за миелиновите сегменти от 82%.

В Таблица 4.3.1. са представени параметрите, характеризиращи човешкото моторно нервно влакно без и с отчитане на течните слоеве в миелиновата обвивка, както в норма, така и при изследваните паранодални интернодални системни демиелинизации.

	Without aqueous layers	With aqueous layers
Normal		
N [lamellae]	150	150
R_{my} [$M\Omega$]	250.0	250.0
C_{my} [pF]	1.5	1.5
R_{aq1} [$M\Omega$]	∞	21.3
R_{aqr} [$M\Omega$]	∞	436.8
R_{pa} [$M\Omega$]	300.0	1250.0
R_{pn} [$M\Omega$]	125.0	140.0
PISD1 [70%]		
N [lamellae]	47	47
R_{pn} [$M\Omega$]	39.0	43.9
PISD2 [80%]		
N [lamellae]	30	30
R_{pn} [$M\Omega$]	25.0	28.0
PISD3 [82%]		
N [lamellae]	27	27
R_{pn} [$M\Omega$]	22.5	25.2

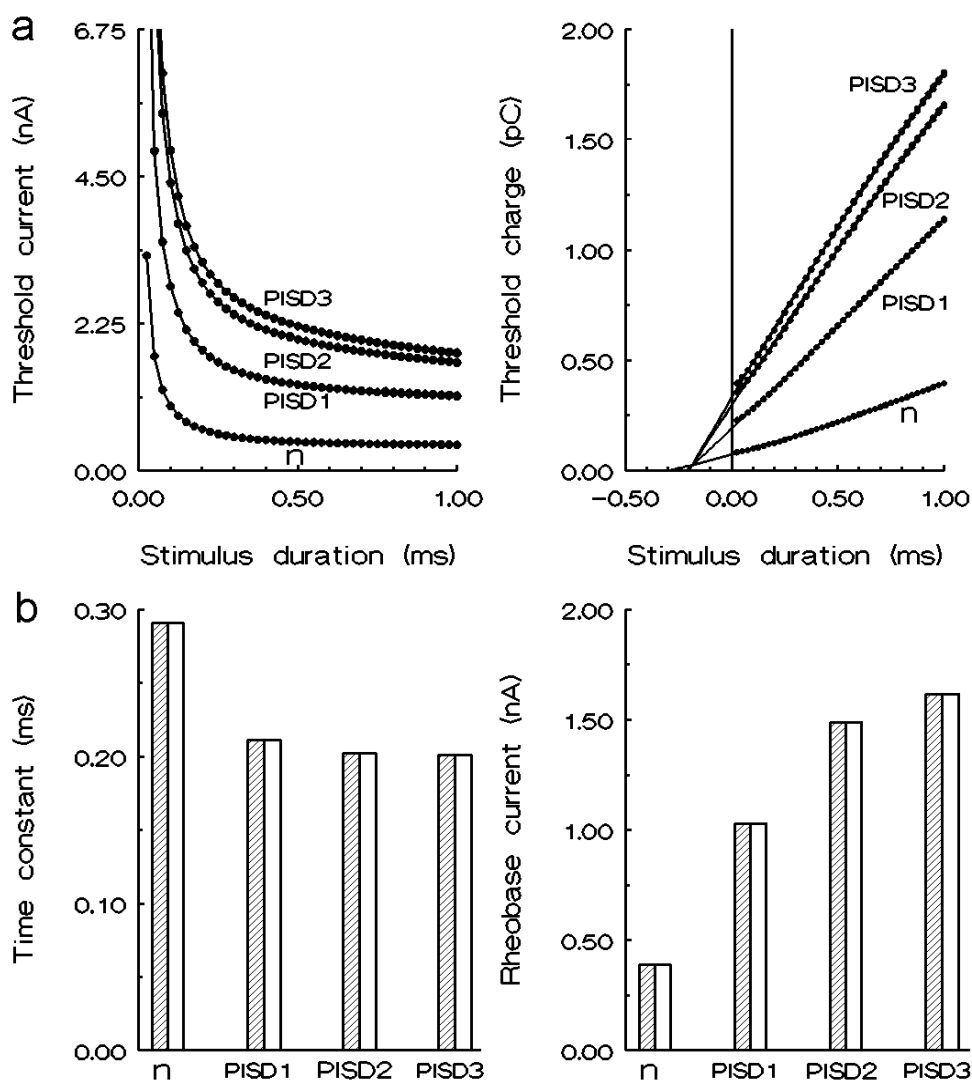
Таблица 4.3.1. Стойности на мембранните параметри за човешки моторни нервни влакна без (*първа колона*) и с (*втора колона*) отчитане наличието на течните слоеве в нормалния и демиелинизираните случаи, когато демиелинизациите са слаби (PISD1- 70%; PISD2- 80%) и силни (PISD3- 82%). Обозначенията са както следват: N (брой на миелиновите ламели); R_{my} (миелиново съпротивление); C_{my} (миелинов капацитет); R_{aq1} (аксиално съпротивление на течния слой), R_{aqr} (радиално съпротивление на течния слой), R_{pa} (периаksonално съпротивление), R_{pn} (паранодално съпротивление).

Сравнението между интрацелуларните акционни и електротоничните потенциали в норма и при PISD1, PISD2, PISD3 случаите без/с отчитане на течните слоеве е представено на Фиг. 4.3.2.

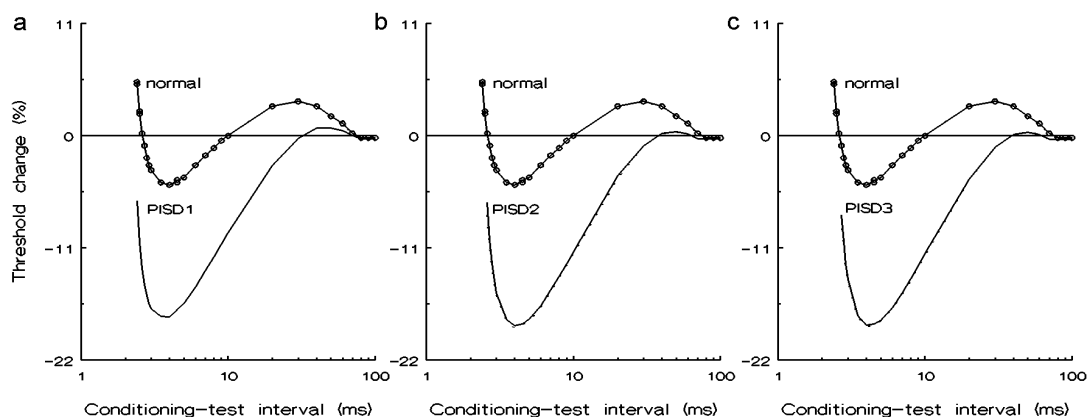


Фиг. 4.3.2. Интрацелуларни акционни (a) и електротонични (b) потенциали на човешки моторни нервни влакна в нормален и PISD1, PISD2, PISD3 случаи без (точкови линии) и с наличие на течните слоеве (непрекъснати линии) в миелиновата обвивка. Акционните потенциали (a) в отговор на 0.1-ms прагови токови импулси са представени само в 10-тия нод. Електротоничните потенциали (b) в отговор на 100 ms деполаризиращи и хиперполаризиращи токови импулси ($\pm 40\%$ от прага) са представени за всеки нод от 7-мия до 14-тия. С изключение на акционните потенциали в норма, за всички останали случаи, потенциалите съвпадат.

Кривите сила-продължителност и кривите заряд-продължителност за нормалния и демиелинизираните случаи без и с отчитане на течните слоеве в миелиновата обвивка са представени на Фиг. 4.3.3.(a). За по-доброто илюстриране на времевите константи сила-продължителност и реобазните токове се използват отново хистограми (Фиг. 4.3.3.(b)).



Фиг. 4.3.3. (a) Сила-продължителност кривите (*горе ляво*) и заряд-продължителност кривите (*горе дясно*) на човешки моторни влакна в нормален и PISD1, PISD2, PISD3 случаи без и с наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка. (b) Сравняване на времевите константи (*долу ляво*) и реобазните токове (*долу дясно*) без (*защриховани колони*) и с (*незащриховани колони*) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка. За всички случаи, изследваните параметри без и с наличието на течните слоеве напълно съвпадат.



Фиг. 4.3.4. Цикли на възстановяване в нормален и PISD1, PISD2, PISD3 случаи (a-c) на човешки моторни влакна без (*точкови линии*) и с (*непрекъснати линии*) наличие на течните слоеве в миелиновата обвивка. За всички изследвани случаи, у-остта се дефинира като $100 \times (I_{\text{test}} - I_{\text{cond}}) / I_{\text{cond}}$ (%), където I_{test} и I_{cond} са съответно праговите токове на тестиращия и обуславящия импулси. За всички изследвани случаи, кривите без и с наличието на течните слоеве напълно съвпадат.

Обсъждане на резултатите

Анализът на получените резултати показва един интересен факт – течните слоеве в миелиновата обвивка не изменят мембранните свойства на човешките моторни нервни влакна когато демиелинизациите са смесени, т.е. когато са паранодални интернодални системни. Резултатът е интересен, защото значителен ефект на течните слоеве бе илюстриран върху мембранните свойства на демиелинизираните влакна, когато демиелинизациите са интернодални системни или паранодални системни. Това ни дава основание да изкажем твърдението, че взаимно противоположните ефекти на двата типа демиелинизации, когато се реализират едновременно, се компенсират взаимно. При това, настоящото изследване показва значителни промени в мембранните свойства на симулираните демиелинизирани случаи.

Направените **ИЗВОДИ** от изследваните паранодални интернодални системни демиелинизации (**PISDs**) могат да се формулират така:

- Течните слоеве не въздействат върху мембранните свойства на влакната със смесени демиелинизации, тъй като при двата типа демиелинизации, когато се реализират заедно, ефектите на течните им слоеве върху мембранните свойства на влакната се компенсират взаимно.
- При смесените системни демиелинизираци невропатии не би могло да се наблюдава допълнителен ефект на течните слоеве на миелиновата обвивка върху мембранните им свойства.
- От хода на изменението на изследваните параметри в условията на адаптация и акомодация на влакната се разбира, че тези параметри следват хода на изменение характерен за паранодалните системни демиелинизации.
- Резултатите представени тук са съвместими с интерпретацията, че генетичните фактори, причиняващи промените в интернодалните сегменти на миелиновата обвивка и имунологичните фактори, причиняващи промените в паранодалните сегменти на миелиновата обвивка биха могли да отговарят за клиничните нарушения при подтиповете CIDP, регистрирани с техниката за проследяване на прага.
- Би могло да се допусне, че паранодалните системни демиелинизации ще са доминиращите при смесените паранодални интернодални системни невропатии и може би лекарствените средства, подходящи за пациенти с CIDP биха били доминиращи при лечението на подтиповете CIDP.

Сравняването на всичките изследвани случаи дава възможност да се покаже, че ефектът на течните слоеве в миелиновата обвивка е съществено различен и специфично характерен за даден тип демиелинизация. В хода на изследването, бе установено, че независимо дали течните слоеве

допринасят за подобряването или влошаването на изследваните мембранни параметри, то изчислените параметри са по-близки до тези измервани при пациенти с разгледаните тук демиелинизиращи невропатии. Подчертано бе също че, ако цялостен блок на разпространение на акционния потенциал се реализира, то практически става невъзможно използването на техниката за проследяването на прага. Следователно, получените резултати при силните демиелинизации за ISD, PSD и PISD имат и предсказваща стойност.

Направените **ИЗВОДИ** от сравняването на изследваните три типа демиелинизации (**ISDs, PSDs, PISDs**) могат да се формулират така:

- Общо за трите типа разгледани демиелинизации може да се каже, че промените на параметрите в условията на разпространението на акционния потенциал, акомодацията и адаптацията, с прогресивното нарастване на демиелинизациите, води до мултиплицирането на тези промени, като посоката на промените се запазва. Това е валидно и за двата случая без и с отчитането на течните слоеве в миелиновите обвивки.
- Ефектът на течните слоеве върху мембранните свойства т.е. върху потенциалите (акционни и електротонични) и индексите на аксонална възбудимост (криви сила-продължителност, заряд-продължителност, времеви константи, реобазис и цикли на възстановяване) на демиелинизираните влакна е различен и зависи от типа на демиелинизацията.

В заключение може да се каже, че представените в дисертацията резултати са уникални. Те са от голяма социална значимост, тъй като доизясняват възможните механизми, обуславящи клиничните нарушения при наследствените и хроничните възпалителни демиелинизиращи невропатии.

VI. ПРИНОСИ

1. За първи път в литературата е изследван ефекта на течните слоеве на миелиновата обвивка върху нервната възбудимост на симулирани системни демиелинизиращи невропатии.
2. Установено е, че ефектът на течните слоеве в миелиновата обвивка е най-голям при симулираните интернодални системни невропатии като заболяването Шарко-Мари-Туут тип 1А. Загубата на миелиновите ламели и техните течни слоеве води до допълнително влошаване на мембранните свойства на заболяването, като изключение правят времевите константи и рефрактерностите, които се подобряват.
3. Установено е, че ефектът от наличието на течните слоеве в миелиновата обвивка, върху комплексните свойства на нервната възбудимост на симулираните паранодални системни невропатии като хроничната възпалителна демиелинизираща полиневропатия, води до подобряване на мембранните свойства на заболяването.
4. Установено е, че наличието на течните слоеве в миелиновата обвивка не оказва влияние върху мембранните свойства на симулираните смесени паранодални интернодални системни невропатии. При тези случаи, взаимно противоположните ефекти на течните слоеве от двата типа демиелинизации се компенсират.

VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

7.1. ПУБЛИКАЦИИ

1. **Krustev S**, Daskalova M, Stephanova D: Myelin sheath aqueous layers do not modulate membrane fibre properties of simulated cases of paranodal internodal systematic demyelinations, *Compt. rend. Acad bulg. Sci*, 63(12): 1845-1852, 2010, **IF=0.219**; ISSN (1310-1331)
2. Stephanova DI, **Krustev SM**, Daskalova M: The aqueous layers within the myelin sheath modulate the membrane properties of simulated hereditary demyelinating neuropathies, *Journal of Integrative Neuroscience*, 10(1):89-103, 2011, **IF=1.294**; ISSN (0219-6352)
3. Stephanova DI, **Krustev SM**, Negrev N, Daskalova M: The myelin sheath aqueous layers improve the membrane properties of simulated chronic demyelinating neuropathies, *Journal of Integrative Neuroscience*, 10(1): 105-120, 2011, **IF=1.294**; ISSN (0219-6352)
4. **Krustev SM**, Negrev N, Stephanova DI: The strength-duration properties in simulated demyelinating neuropathies depend on the myelin sheath aqueous layers, *Scripta Scientifica Medica*, 2011 (in press); ISSN (0582-3250)
5. Stephanova DI, **Krustev SM**, Negrev N, Daskalova M: Effect of the myelin sheath aqueous layers on the membrane properties of simulated demyelinating neuropathies, *Clinical Neurophysiology*, 122(S1-S214): P.7.4, S90, 2011, **IF= 3.122**; ISSN (1388-2457)

7.2. НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Stephanova DI, **Krustev SM**, Negrev N, Daskalova M: Effect of the myelin sheath aqueous layers on the membrane properties of simulated demyelinating neuropathies, *14th European Congress on Clinical Neurophysiology, 20-25 June 2011, Rome, Italy*
2. **Krustev SM**, Negrev N, Stephanova DI: The strength-duration properties in simulated demyelinating neuropathies depend on the myelin sheath aqueous layers, *10th National Congress of Bulgarian Society for Physiological Sciences, 6-9 October 2011, Varna, Bulgaria*