

УДК 615.9 :616-009

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД НА МОДЕЛИ НЕЙРОПАТИИ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ МАЛАТИОНОМ

В.В. Шилов¹, М.А. Юдин², Т.В. Щербаков¹,
О.А. Беличенко¹

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки
«Северо-Западный научный центр гигиены и
общественного здоровья» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека, 191036,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

² Научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины Военно-медицинской академии
имени С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург,
Российская Федерация

На модели периферической нейропатии, вызванной трехкратным введением крысам малатиона в дозе 0,5 ЛД₅₀, показана эффективность применения средств генной терапии: рекомбинантных плазмидных ДНК (РПД), кодирующих в организме наработку факторов роста (фактор роста нервов (NGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и соматолиберина-1). Наибольшим защитным действием в отношении нервной ткани обладала РПД NGF и РПД VEGF. По данным электрофизиологических исследований препараты на основе этих плазмидных конструкций оказывали положительный эффект уже через неделю после повреждения, а к 21-м сут полностью устраняли проявления нейропатии.

Ключевые слова: малатион, периферические нейропатии, рекомбинантные плазмидные ДНК, факторы роста.

Введение. Сегодня вопрос терапии периферических нейропатий, вызванных воздействием химического фактора, остается открытым. Известно, что на фоне воздействия фосфорорганическими соединениями, и в первую очередь малатионом, риск развития нейропатий достигает 25-60 %. Данный яд обладает множеством механизмов действия на центральную и периферическую нервную системы [1]. В ходе экспериментов на крысах было установлено, что при отравлении малатионом морфологическим изменениям подвергаются эритроциты. Изменение их цитоскелета приводит к закупорке сосудов, что ведет к нарушениям микроциркуляции, а VEGF способствует процессу ревазуляризации. Отравление малатионом ведет к гибели нейронов, повреждению определенных участков нервного волокна, активации свободно-радикальных процессов [2], демиелинизации нерв-

ных волокон и дегенерации аксонов [3], что в конечном итоге ведет к нарушению нервно-мышечной передачи и развитию нейропатии. В виду этого терапия фармакопейными препаратами (реактиваторы холинэстеразы, производные адамантана, витамины, препараты, улучшающие микроциркуляцию, пластический и энергетический обмена) не дает должного результата [7].

Низкая эффективность нейротропных средств делает жизненно-необходимым решение вопроса поиска принципиально новых препаратов для лечения и реабилитации больных с поражением периферической нервной системы [4]. К числу таких препаратов относятся плазмидные конструкции или факторы роста, отвечающие в организме за наработку определенных белков [5]. Так, в частности, применение фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) способствует ангиогенезу и обра-

Шилов Виктор Васильевич (ShilovViktorVasil'evich), доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья» Роспотребнадзора, 191036, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, vshilov@inbox.ru

Юдин Михаил Анатольевич (Judin Mikhail Anatol'evich), доцент кандидат медицинских наук заместитель начальника отдела Научно-исследовательского испытательного института военной медицины Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, mikhail.judin@gmail.com

ЩербаковТарас Владимирович (Shherbakov Taras Vladimirovich), аспирант ФБУН «Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья» Роспотребнадзора, 191036, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, taraskbr@yandex.ru

Беличенко Ольга Александровна (Belichenko Olga Alexandrovna), лаборант-исследователь лаборатории токсикологии ФБУН «Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья» Роспотребнадзора, 191036, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, sznc.viv@gmail.com

зованию Шванновских клеток, что приводит к улучшению микроциркуляции и регенерации поврежденных нейронов [10].

Применение генно-терапевтических средств на основе плазмидной ДНК, вызывающих в организме наработку факторов роста, очень удобно и эффективно, что выражается минимальной частотой введения препарата (1-3 инъекции) и контролируемым сроком синтеза целевого белка в организме человека [8]. Использование плазмидных конструкций уменьшает проявление, а в ряде случаев полностью предотвращает развитие нейропатии.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния ДНК плазмид, вызывающих в организме наработку факторов роста, на течение малатион-индуцированной нейропатии.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г. №708н «Об утверждении правил лабораторной практики» на крысах-самцах

Вистар, массой 180-220 г, которых содержали в стандартных условиях вивария. Все животные пребывали на обычном пищевом рационе и свободном доступе к воде, и до начала эксперимента проходили 2-недельный карантин.

Периферическую нейропатию моделировали ежедневным внутрижелудочным (в/ж) введением малатиона в дозе 0,5 ЛД₅₀. Крысы были разделены на 6 групп, по 10 в каждой (3 группы контроля, 3 группы с введением факторов роста). Малатион вводили крысам в течение 3-х дней. Для уменьшения риска гибели животных в группах им внутримышечно вводили холинолитик – атропин в дозе 1 мг/кг.

В ходе эксперимента у животных прослеживали динамику развития нейропатий на фоне применения средств генной терапии (рекомбинантная плазмидная ДНК NGF, VEGF и соматолиберина-1 (НПО «АТГ «СервисГен»)). ДНК плазмиды вводили животным через неделю после первой интоксикации малатионом. Препараты вводили внутримышечно в течение

Таблица 1

Показатели ЭНМГ седалищного нерва крыс после отравления малатионом в дозе 0,5 ЛД₅₀ трехкратно и лечения РПД NGF (M± m, n=10)

Сутки	Показатели электронейромиографии				
	Порог раздражения, мА	Максимальный М-ответ, мА	Амплитуда М-ответа, мВ	Площадь М-ответа, мВ·мс	Длительность М-ответа, мс
После отравления малатионом					
Фон	0,6±0,01	1,8±0,02	25±0,12	26,8±0,14	1,9±0,02
7-е	0,7±0,02***	1,7±0,02**	23,7±0,14***	27,9±0,14***	2,1±0,03***
14-е	0,7±0,01**	1,6±0,02***	22,9±0,12***	29,5±0,11***	2,2±0,02***
21-е	0,7±0,02***	1,6±0,01***	22,2±0,15***	31,8±0,12	2,3±0,01
После лечения РПД NGF					
Фон	0,6±0,01	1,8±0,01	25,3±0,09	27±0,18	1,9±0,01
7-е	0,6±0,02	1,6±0,03***	23,8±0,12***	28,4±0,14***	2±0,02***
14-е	0,7±0,03**	1,7±0,02***	24,5±0,15**	27,9±0,16**	2±0,03*
21-е	0,6±0,02	1,8±0,01	25,2±0,13*	26,9±0,13	1,9±0,02

Примечание:

* - отличия по отношению к фоновым значениям достоверны при $p \leq 0,05$;

** - отличия по отношению к фоновым значениям достоверны при $p \leq 0,01$;

*** - отличия по отношению к фоновым значениям достоверны при $p \leq 0,001$

ние 3-х дней в суммарной дозировке 0,5 мг/кг. Плазмиды вводили равными частями в 3 инъекции по окружности бедра. Группа контроля получала воду для инъекций.

Развитие нервно-мышечных поражений отслеживали на большеберцовом нерве методом непрямой электронейромиографии (ЭНМГ). Основными показателями, по которым судили о развитии нейропатии, являлись амплитуда М-ответа, его площадь и длительность [6]. Оценку данных параметров проводили в динамике на 7, 14, 21-е сутки после воздействия малатионом.

Статистическую обработку данных проводили с использованием статистического пакета программы Statistica 8.0.

Результаты и обсуждение. Трехдневные аппликации малатиона в дозе 0,5 ЛД₅₀ позволили смоделировать развитие нейродегенеративных процессов уже через неделю от момента первого введения яда. В этот срок во всех опытных группах развивались признаки

нарушения нервно-мышечной передачи, что проявлялось снижением амплитуды М-ответа, увеличением его площади и длительности.

Через 7 сут после введения малатиона значимых отличий показателей ЭНМГ между контрольной и опытными группами выявлено не было.

Через 14 сут после воздействия малатионом у животных, получавших РПД NGF (табл. 1) и РПД VEGF (табл. 2), отмечали положительную динамику нервно-мышечной проводимости. На это указывали рост амплитуды М-ответа, частичное снижение его площади и длительности.

Наиболее выраженное влияние оказывала РПД NGF. Через 14 сут показатели ЭНМГ в группе животных, получавших плазмиду NGF, превосходили по абсолютным значениям группу контроля, а по площади М-ответа достигали фоновых величин. Через 21 сут после отравления показатели ЭНМГ в этой опытной группе соответствовали фоновым

Таблица 2

Показатели ЭНМГ седалищного нерва крыс после отравления малатионом в дозе 0,5 ЛД₅₀ трехкратно и лечением РПД VEGF (M± m, n=10)

Показатели электронейромиографии					
Сутки	Порог раздражения, мА	Максимальный М-ответ, мА	Амплитуда М-ответа, мВ	Площадь М-ответа, мВ*мс	Длительность М-ответа, Мс
После отравления малатионом					
Фон	0,6±0,01	1,8±0,02	25,3±0,12	26,6±0,13	1,9±0,02
7-е	0,7±0,02***	1,7±0,02**	23,5±0,14***	27,8±0,14***	2,1±0,01***
14-е	0,6±0,02	1,7±0,02**	22,7±0,12***	29,3±0,12***	2,2±0,02***
21-е	0,7±0,02***	1,6±0,01***	22,5±0,15***	31,9±0,13	2,2±0,02***
После лечения РПД NGF					
Фон	0,6±0,01	1,8±0,01	25,5±0,17	27,4±0,17	2±0,02
7-е	0,7±0,03**	1,7±0,02***	24,3±0,15	28,9±0,13***	2,1±0,03*
14-е	0,7±0,02***	1,7±0,03**	24,7±0,18**	28,5±0,15**	2,1±0,01***
21-е	0,6±0,02	1,8±0,01	23±0,13***	29,8±0,17***	2±0,03

Примечание:

- * - отличия по отношению к фоновым значениям достоверны при $p \leq 0,05$;
- ** - отличия по отношению к фоновым значениям достоверны при $p \leq 0,01$;
- *** - отличия по отношению к фоновым значениям достоверны при $p \leq 0,001$

значениям, в то время как в группе контроля отмечали снижение амплитуды М-ответа в 1,2 раза, увеличение его площади и длительности в 1,2 раза. Восстановление параметров ЭНМГ по сравнению с контрольной группой иллюстрирует эффект NGF и доказывает его важную роль в процессе образования и восстановления нейронов после воздействия малатионом [11].

Схожие данные прослеживали в отношении опытной группы, получавшей плазмиду VEGF (табл. 2).

Однако в отличие от РПД NGF эффект после применения VEGF наступал раньше, в течение 1 нед после воздействия малатионом. Результаты о быстродействии РПД VEGF подтверждали данные литературы о достижении ожидаемого эффекта в кратчайшие сроки [9].

Через 21 сут у животных, получавших РПД VEGF, показатели ЭНМГ практически соот-

ветствовали фоновым значениям и превосходили показатели группы контроля. Однако динамика значений максимального М-ответа и его длительности позволяла предположить об ухудшении нейромышечной проводимости в этот срок.

РПД соматолиберина-1 не обладала лечебным действием, что подтверждалось отсутствием различий между значениями ЭНМГ у данной группы животных с контрольной группой (табл. 3).

Показатели ЭНМГ в данной группе животных позволяли говорить о сохранении дегенеративно-дистрофических процессов к 21 сут после воздействия малатионом.

Проведенные исследования показали эффективность применения различных факторов роста на модели периферической нейропатии, вызванной малатионом. Наибольшим лечебным действием обладает плазида NGF, а быстродействием плазида VEGF. Умень-

Таблица 3

Показатели ЭНМГ седалищного нерва крыс после отравления малатионом в дозе 0,5 ЛД₅₀ трехкратно и лечением РПД соматолиберина-1 (M ± m, n=10)

Показатели электронейромиографии					
Сутки	Порог раздражения, мА	Максимальный М-ответ, мА	Амплитуда М-ответа, мВ	Площадь М-ответа, мВ*мс	Длительность М-ответа, Мс
После отравления малатионом					
Фон	0,6±0,01	1,8±0,02	25,5±0,14	26,7±0,13	1,9±0,02
7-е	0,7±0,03***	1,7±0,02**	23,9±0,14	27,8±0,13***	2,2±0,03***
14-е	0,6±0,02**	1,7±0,02**	22,5±0,12***	29,3±0,12***	2,2±0,02***
21-е	0,7±0,02***	1,6±0,01***	22,1±0,15***	31,5±0,12***	2,3±0,01
После лечения РПД соматолиберина-1					
Фон	0,6±0,01	1,8±0,01	24,8±0,14	26,3±0,17	1,9±0,01
7-е	0,7±0,02***	1,7±0,03*	24±0,14**	27,9±0,11	2±0,02***
14-е	0,7±0,01	1,6±0,02***	23,1±0,13	29,1±0,13***	2,1±0,02
21-е	0,7±0,02***	1,6±0,02***	22,6±0,18	31±0,12***	2,2±0,03***

Примечание:

* - отличия по отношению к фоновым значениям достоверны при $p \leq 0,05$;

** - отличия по отношению к фоновым значениям достоверны при $p \leq 0,01$;

*** - отличия по отношению к фоновым значениям достоверны при $p \leq 0,001$

шение эффективности РПД VEGF в отличие от NGF через 21 сут после воздействия малатионом позволяют предположить об уменьшении роли нарушений микроциркуляции в развитии периферической нейропатии.

Заключение. На представленной модели малатион-индуцированной нейропатии показано, что фактор роста нервов (NGF) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) замед-

ляют или способствуют обратному течению нарушений нервно-мышечной проводимости. Эффективность применения РПД NGF прослеживается через 14 сут после его курсового введения крысам, тогда как эффективность VEGF – через 7 сут. Результаты, полученные в эксперименте, позволяют рекомендовать генно-терапевтические препараты в качестве средств терапии полинейропатий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куценко С. А. Основы токсикологии. 2002; 327-328.
2. Куценко С. А. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита. 2004
3. Rinsho S. Polyneuropathy: diagnosis and treatment. 2007; Vol.47, №11, 769-773.
4. Grogan P.M., Katz J.S. Toxic neuropathies /NeuroClin. 2005; Vol. 23, № 2, P. 377-396.
5. Мжаванадзе Н.Д., Бозо И.Я., Калинин Р.Е., Деев Р.В. Реалии и пер-

спективы применения генной терапии в сердечно-сосудистой хирургии. Клеточная трансплантология и клеточная инженерия. 2013; Том VII, №2.

6. Николаев С. Г. Практикум по клинической электромиографии. 2003
7. Прозоровский В. Б., Скопичев В. Г., Ардабьева Т. В. и др. Морфологические изменения эритроцитов как возможная причина низкой эффективности специфической терапии при отравлении карбофосом. Морфология, 1997.- Т. 112.-№6.-С-60-64

8. Миронов А. Н., Бунятян Н. Д., Утешев Д. Б., Радаев С. М. и др. Состояние и перспективы развития генотерапии в России. Вестник Росздравнадзора. 2011, №4.
9. Деев Р. В., Калинин Р. Е., Червяков Ю. В., Грязнов С. В., Мжаванадзе Н. Д. и др. Результаты применения генотерапевтического препарата «Неоваскулген» у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей: 1 год наблюдений. Вестник Национального медико-хирургического

Центра им.Н.И.Пирогова. 2011, Т.6, №4

10. Sondell M., Lundborg G., Kanje M. Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts // Brain Res. – 1999 Nov 6. – Vol. 846, № 2. – P. 219-28.
11. Масгутов Р. Ф., Ризванов А. А., Богов А. А. (мл.), Галлямов А. Р. и др. Современные тенденции лечения периферических нервов. Неврология, практическая медицина 1-1 (13). Актуальные проблемы медицины. 2013. Т.2,

REFERENCES:

1. Kucenko S.A. Osnovy toksikologii. 2002; 327-328 (in Russian).
2. Kucenko S.A. Voennaja toksikologija, radiobiologija i medicinskaja zashhita. 2004 (in Russian).
3. Rinsho S. Polyneuropathy: diagnosis and treatment. 2007; Vol.47, №11, 769-773.
4. Grogan P.M., Katz J.S. Toxic neuropathies /NeuroClin. 2005; Vol. 23, № 2, P. 377-396.
5. Mzhavanadze N.D., Bozo I.Ja., Kalinin R.E., Deev R.V. Realii i perspektivy primeneniya gennoj terapii v serdechno-

sosudistoj hirurgii. Kletocchnaja transplantologija i kletocchnaja inzhenerija. 2013; Tom VII, №2 (in Russian).

6. Nikolaev S.G. Praktikum po klinicheskoj jelektromiografii. 2003 (in Russian).
7. Prozorovskij V.B., Skopichev V.G., Ardab'eva T.V. i dr. Morfologicheskie izmeneniya jericitocitov kak vozmoznaja pricina nizkoj jeffektivnosti specificheskoj terapii pri otravlenii karbofosom. Morfologija, 1997.-T. 112.-№6.-S-60-64 (in Russian).
8. Mironov A.N., Bunjatjan N.D., Uteshev D.B., Radaev S.M. i dr. Sostojanie

i perspektivy razvitija genoterapii v Rossii. Vestnik Roszdravnadzora. 2011, №4 (in Russian).

9. Deev R.V., Kalinin R.E., Chervjakov Ju.V., Grjaznov S.V., Mzhavanadze N.D. i dr. Rezul'taty primeneniya genterapevticheskogo preparata «Neovaskulgen» u pacientov s hronicheskoj ishemiej nizhnih konechnostej: 1 god nabljudenij. Vestnik Nacional'nogo mediko-hirurgicheskogo Centra im.N.I.Pirogova. 2011, Т.6, №4 (in Russian).
10. Sondell M., Lundborg G.,

Kanje M. Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts // Brain Res. – 1999 Nov 6. – Vol. 846, № 2. – P. 219-28.

11. Masgutov R.F., Rizvanov A.A., Bogov A.A. (ml.), Galljamov A.R. i dr. Sovremennye tendencii lechenija perifericheskikh nervov. Nevrologija, prakticheskaja medicina 1-1 (13). Aktual'nye problemy mediciny. 2013. T.2 (in Russian).

V.V. Shilov¹, M.A. Judin², T.V. Shherbakov¹, O.A. Belichenko¹

STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF RECOMBINANT PLASMIDS IN A NEUROPATHY MODEL AT POISONING WITH MALATHION

¹Northwest Scientific Center of Hygiene and Public Health, 191036, Saint-Petersburg, Russian Federation

²Scientific Research Test Institute of Military Medicine, S.M. Kirov Medical Military Academy, 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation

The effectiveness of gene therapy agents application, i.e.: recombinant plasmid DNA (RPD) coding body growth factor production (nerve growth factor (NGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and somatoliberin-1) was shown using a model of peripheral neuropathy caused by a thrice-repeated 0.5 LD₅₀ malathion injection to rats. RPD NGF and RPD VEGF were found to have the strongest nerve tissue protective effect. According to electrophysiological studies findings, the preparations based on these plasmid constructions exerted a positive effect as early as a week after the damage and completely removed neuropathy manifestations by the 21 day.

Keywords: malathion, peripheral neuropathies, recombinant plasmid DNA, growth factors.

Материал поступил в редакцию 21.07.2015 г.