

УДК 616.74-009.115

СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ МИАСТЕНИИ У ГРЫЗУНОВ ПОСРЕДСТВОМ ИНДУКЦИИ АУТОИММУННОГО ПОРАЖЕНИЯ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ

© 2021 г. С. В. Чепур¹, М. А. Юдин¹, А. С. Никифоров¹, И. М. Иванов¹,
А. Н. Алексеев¹, Т. М. Устинова¹, *

¹Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Поступила в редакцию 30.09.2020 г.

После доработки 30.09.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

Показана возможность моделирования миастении у крыс посредством внутривенного введения рекомбинантных плазмидных ДНК, кодирующих химерный Н-холинорецептор с помощью гидропояции. Формирование нарушений нервно-мышечной проводимости оценивали при электронейромиографии в виде снижения амплитуды М-ответа и его декремента, уменьшения площади ответа, а также снижение работоспособности по тестам “Плавание с грузом” и “Сила хвата”. В ходе гематологического исследования в динамике прослежено увеличение численности популяций лимфоцитов и моноцитов крови, увеличение содержания в ней антител к холинорецептору и провоспалительного цитокина IL-1 α . Разработанная модель может быть использована при отборе лекарственных средств для терапии миастении.

Ключевые слова: миастения, Н-холинорецептор, экспериментальная модель

DOI: 10.31857/S0042132421020034

ВВЕДЕНИЕ

Поиск средств и методов терапии миастении (myasthenia gravis – далее MG) определяет необходимость совершенствования ее экспериментальных моделей. MG относят к аутоиммунным заболеваниям с образованием афинных к α -цепи Н-холинорецептора (Н-ХР) антител (Behin, Le Panse, 2018). Повреждение ХР может протекать через усиление скорости их деградации и облегчение фагоцитоза макрофагами, через активацию системы комплемента и через блокаду связывания с ацетилхолином (Mantegazza et al., 2016).

Проявления MG у животных сопряжены с мышечной слабостью, обратимой после применения ингибиторов ацетилхолинэстеразы, декрементом М-ответа и нарушением функций аксонов периферических нервов. Для животных с MG характерна поза с опущенной вниз головой, подгибающимися передними конечностями и сильно выгнутой спиной, наблюдают рывки головой и передними конечностями, прослеживают недержание мочи и отсутствие глотательных движений (Gilhus et al., 2016). Тяжелые формы MG сопровождаются заболеваниями дыхательных путей, часто с гиперсекрецией и слезоточивостью. Шумное дыхание, обусловленное параличом гортани, пропа-

дает после восстановления мышечной силы (Rasca et al., 2020).

Экспериментальную MG на животных моделируют аутоантителами и лимфокинами, выделенными из крови и тимуса больных миастенией; сенсбилизацией ХР, выделенными из электрического органа *Torpedo californica* в полном адьюванте Фрейнда; введением пенициллина (Fuchs et al., 2014). При введении крысам антител к ХР в больших дозах выделяют два периода мышечной слабости, сопровождающихся потерей массы тела. Первый острый период протекает с 7 по 12 сут, а восстановление мышечной силы обычно наступает уже на 15 сут. Второй период с прогрессирующей мышечной слабостью возникает между 26 и 35 сут, причем ему предшествует появление заболеваний дыхательных путей (Baggi et al., 2012).

Существуют также неиммунные модели миастенических синдромов, которые связаны с мутациями генов, кодирующих различные эпитопы субъединиц ХР, а также модельные состояния, связанные с десенсбилизацией Н-ХР при промежуточном синдроме и при отдаленных демиелинизирующих нейропатиях после отравления фосфорорганическими соединениями (Тюнин и

др., 2017). МГ у животных моделируют также нокаутом генов белков, ответственных за формирование иммунного ответа (Cao et al., 2017).

Н-ХР выявлены и в иммунокомпетентных клетках, что также необходимо учитывать в патогенезе МГ. TCR/CD3-зависимый путь индуцирует экспрессию $\alpha 4$ - и $\alpha 7$ -субъединиц Н-ХР в CD4-позитивных Т-лимфоцитах мышей (Qian et al., 2011). В Т-клеточной линии CCRF-CEM лейкемии человека никотин ингибировал экспрессию мРНК всего спектра субъединиц Н-ХР и в присутствии внеклеточного Ca^{2+} запускал краткосрочное увеличение проницаемости мембраны для ионов Ca^{2+} . Этот эффект отменяли агонисты $\alpha 7$ -субъединицы Н-ХР (к примеру, α -бунгаротоксин), что подтверждает роль Н-ХР в Ca^{2+} -сигналинге Т-клеток (Wang et al., 2004).

В макрофагах, $\alpha 7$ -субъединицы Н-ХР играют роль негативных регуляторов синтеза и секреции TNF- α (Wang et al., 2003). Предполагают, что функция иммунных клеток частично регулируется холинергической системой посредством паракринных влияний по типу дистантного синапса через $\alpha 7$ -субъединицу Н-ХР (Fujii et al., 2007). $\alpha 7$ -Субъединица Н-ХР вовлечена в регуляцию продукции провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, модулируют продукцию антител.

Цель исследования состояла в испытании химерной конструкции типа экстраклеточного домена $\alpha 1$ -субъединицы Н-ХР быка *Bovis taurus*, слитого с N-конца с субъединицей A_1 энтеротоксина *Vibrio cholerae* O1 для моделирования МГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 180–220 г, полученных из питомника РАН “Рапполово”. Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде в соответствии с правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) и работе с животными, утвержденными ГОСТ Р 53434-2009.

Синтезировали рекомбинантную плазмидную ДНК (РПД ХР), кодирующую химерный ХР выбранной структуры (ООО “АТГ Сервис Ген”, г. Санкт-Петербург). Препарат представлял собой прозрачный раствор, который вводили в организм посредством метода гидропорации. Гидродинамическое воздействие представляло собой внутривенное (в/в) введение РПД в физиологическом растворе в течение 25–35 с из расчета 1 мг/кг в объеме, соответствующем 10% от массы тела. Экспериментальные животные получали РПД однократно и трехкратно (1 раз в день). Животным контрольной группы вводили РПД, ко-

дирующую целевой белок, без последовательно-сти, аналогичным способом. Всем животным подкожно вводили полный адъювант Фрейнда в дозе 0.2 мг/кг для стимуляции выработки антител.

Появление в крови IgG к ХР и IL-1 α , отражающего воспалительную реакцию, оценивали количественно с применением соответствующих иммуноферментных тест-систем с помощью анализатора ChemWell Elisa 2910 (Awareness Technology, США). Формирование МГ у животных подтверждали в ходе электронейромиографии (ЭНМГ) и тестов “Плавание с грузом” (10% до отказа) и “Сила хвата”, определяли клеточный состав крови (динамика лейкоцитов и их популяций, IL-1 α и антитела к ХР). Мышечную утомляемость оценивали по времени плавания с отягощением (10% от массы тела) до отказа и в тесте, определяющем максимальную силу хватки лап (Grip Strength Meter, Columbus). Критерием мышечной утомляемости являлось статистически значимое снижение “длительности однократного плавания” и снижение силы хватки или невыполнение этого рефлекса.

Средние величины регистрируемых показателей рассчитывали общепринятыми статистическими методами с применением программы SigmaPlot 11.0. Полученные данные представлены в виде средних значений со стандартным отклонением ($M \pm SD$). Для сравнения средних величин показателей и установления статистически значимых различий с группой сравнения проводили статистическую обработку по непараметрическому тесту Манна–Уитни. Для сравнения средних величин и установления достоверности различий с фоном использовали непараметрический критерий для парных сравнений Уилкоксона. Для оценки значимости межгрупповых различий альтернативных показателей применяли χ^2 -критерий Пирсона и точный метод Фишера. Различия по сравнению с контролем считали статистически значимыми при $p < 0.05$ и менее.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс, которым в/в однократно и трехкратно вводили РПД ХР гидродинамическим способом, при проведении ЭНМГ выявлены неврологические нарушения, характеристики которых приведены в табл. 1.

При ЭНМГ не выявлено отклонений порога раздражения, что свидетельствует о сохранности элементов чувствительной иннервации. Как при однократном, так и при трехкратном в/в введении РПД ХР с применением гидродинамического введения у крыс прослеживали стойкое снижение амплитуды М-ответа, изменения показателя при трехкратном введении регистрировали в более

Таблица 1. Параметры ЭНМГ крыс в различные сроки после внутривенного введения РПД ХР с применением гидродинамического воздействия ($M \pm SD$, $n = 8$)

Показатель ЭНМГ	Срок регистрации, нед.	Группа/препарат		
		контроль гидропороции РПД	РПД ХР, 1 мг/кг, однократно	РПД ХР, 1 мг/кг, трехкратно
Амплитуда, мВ	1	25.11 ± 0.28	24.84 ± 0.44	21.54 ± 0.39*
	2	25.01 ± 0.24	24.52 ± 0.53	22.29 ± 0.53*
	3	24.94 ± 0.16	23.00 ± 0.80*	22.73 ± 0.26*
	4	24.69 ± 0.29	22.60 ± 0.91*	21.20 ± 0.60*
Длительность М-ответа, мс	1	2.16 ± 0.03	2.32 ± 0.06*	2.30 ± 0.08*
	2	2.13 ± 0.04	1.99 ± 0.04	2.06 ± 0.13
	3	2.13 ± 0.04	2.10 ± 0.04	2.02 ± 0.09
	4	2.05 ± 0.05	2.13 ± 0.04	1.96 ± 0.05
Площадь М-ответа, мВ × мс	1	32.08 ± 0.91	33.47 ± 1.16	25.90 ± 0.97*
	2	32.17 ± 0.76	25.98 ± 1.30*	23.46 ± 1.48*
	3	31.08 ± 0.90	24.84 ± 1.99*	25.93 ± 1.65*
	4	31.23 ± 0.88	26.56 ± 1.52*	22.03 ± 0.75*

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при $p < 0.05$. Здесь и в табл. 2 и 3.

ранние сроки. Увеличение длительности М-ответа фиксировали в течение 1 нед. после однократного и трехкратного введения РПД ХР. Соответственно сокращалась и площадь ответа: этот интегральный показатель в группе однократного в/в введения снижался через 2 нед. от начала эксперимента, тогда как при трехкратном введении его достоверные отклонения от контроля прослеживали, начиная с 1-й нед. эксперимента. Таким образом, выявлены электрофизиологические признаки нарушений функции нервно-мышечной передачи, проявления которых зависели от кратности в/в введения РПД ХР.

Изменения количества лейкоцитов в крови исследованных групп зависели от кратности применения РПД ХР и не были вызваны использованием метода гидродинамического введения (табл. 2). При однократном в/в введении РПД ХР этот показатель статистически значимо увеличивался только к окончанию периода наблюдения, тогда как при трехкратном введении образца количество лейкоцитов увеличивалось, начиная со 2-й нед. эксперимента, а к окончанию эксперимента наблюдали выраженную лейкопению. Из числа субпопуляций лейкоцитов через 2 нед. после однократного введения РПД ХР статистически значимо возрастало количество лимфоцитов и моноцитов, тогда как количество гранулоцитов снижалось с тенденцией к восстановлению к концу 4-й нед. При трехкратном введении РПД ХР прирост моноцитов отмечали до окончания периода наблюдения. В этот срок фиксировали резкое снижение при восстановлении популяции гранулоцитов к 3-й нед. наблюдения.

В пользу протекания воспалительного процесса у животных, получавших РПД ХР, указывали данные биохимических маркеров (табл. 3). При однократном гидродинамическом введении РПД ХР повышение количества антител к ХР прослеживали на 1–2 нед. эксперимента, и к его окончанию показатель соответствовал контрольным значениям. При трехкратном введении образца нарастание количества антител выявляли как на первой неделе эксперимента, так и через 3–4 нед. после его начала, что предполагало развитие аутоиммунного воспалительного процесса. Уровень $IL-1\alpha$ резко увеличивался через 1 нед. после введения РПД ХР, а в последующем отмечалась плавная динамика его снижения. Полученные данные позволяли сделать предположение о формировании аутоиммунного воспаления, при этом модель трехкратного введения РПД ХР обеспечивает более длительный и выраженный ответ.

Биологическое действие РПД ХР прослежено в тесте 10%-ным грузом до отказа и силы хвата. По результатам фонового заплыва средняя продолжительность плавания животных во всех группах составляла 143–154 с. После однократного в/в гидродинамического введения РПД (контроль) на 7-е сут фиксировали снижение продолжительности плавания на 11.7% относительно фоновых значений. В последующие сроки тестирования продолжительность плавания животных данной группы повышалась, и к 3-й нед. составила 195 ± 12.5 с. После однократного в/в гидродинамического введения РПД ХР к 3-й нед. продолжительность плавания была на 10% ниже значений контрольной группы. Установлено, что трех-

Таблица 2. Воспалительные изменения популяции лейкоцитов крови крыс в различные сроки после в/в гидродинамического воздействия РПД ХР ($M \pm SD$, $n = 8$)

Показатель, $\times 10^3/\text{мкл}$	Срок регистрации показателя после введения образца, нед.				
	фоновые значения	1	2	3	4
Однократное введение РПД ХР с применением гидропорации					
Лейкоциты	11.4 ± 0.87	12.6 ± 1.29	16.3 ± 2.19	16.1 ± 2.69	$15.8 \pm 1.64^*$
Лимфоциты	6.4 ± 0.64	$9.5 \pm 0.99^*$	$11.1 \pm 1.30^*$	12.9 ± 3.19	$11.4 \pm 1.37^*$
Моноциты	0.6 ± 0.08	$1.71 \pm 0.26^*$	$2.60 \pm 0.43^*$	$1.78 \pm 0.35^*$	$0.88 \pm 0.08^*$
Гранулоциты	4.3 ± 0.58	$1.2 \pm 0.13^*$	$2.5 \pm 0.53^*$	$1.4 \pm 0.21^*$	3.5 ± 0.13
Трехкратное введение РПД ХР с применением гидропорации					
Лейкоциты	11.4 ± 0.87	14.4 ± 1.63	$16.1 \pm 0.91^*$	$17.7 \pm 1.76^*$	$7.3 \pm 0.54^*$
Лимфоциты	6.4 ± 0.64	$11.1 \pm 1.47^*$	$12.2 \pm 0.63^*$	$12.5 \pm 1.41^*$	$3.6 \pm 0.28^*$
Моноциты	0.6 ± 0.08	$1.70 \pm 0.27^*$	$2.03 \pm 0.18^*$	$0.86 \pm 0.08^*$	$1.21 \pm 0.20^*$
Гранулоциты	4.3 ± 0.58	$1.6 \pm 0.19^*$	$1.9 \pm 0.27^*$	4.2 ± 0.75	3.2 ± 0.26

Таблица 3. Накопление антител к ХР и содержание IL-1 α в плазме крови крыс в различные сроки после внутривенного введения РПД ХР с применением гидродинамического воздействия ($M \pm SD$, $n = 8$)

Показатель	Фоновые значения	Кратность введения РПД	Продолжительность наблюдения, сут			
			7	14	21	28
IgG к ХР, мкг/л	0.1 ± 0.04	Однократно	$0.3 \pm 0.04^*$	$0.3 \pm 0.08^*$	0.2 ± 0.05	0.1 ± 0.03
		Трехкратно	$0.5 \pm 0.04^*$	0.2 ± 0.03	$0.3 \pm 0.08^*$	$0.3 \pm 0.04^*$
IL-1 α , мкг/л	0.1 ± 0.07	Однократно	$2.1 \pm 0.74^*$	$2.1 \pm 0.9^*$	1.9 ± 0.97	$1.3 \pm 0.1^*$
		Трехкратно	5.3 ± 2.79	$3.9 \pm 1.62^*$	3.2 ± 2.23	$2.6 \pm 0.53^*$

кратное гидродинамическое в/в введение РПД ХР способствовало снижению длительности плавания крыс на 24% к 3-й нед. эксперимента по сравнению с однократным введением РПД ХР.

На фоне однократного в/в гидродинамического введения РПД ХР показано снижение силы

хвата лап крыс на 2-й нед. на 0.4 ± 0.83 Н по сравнению с фоновыми значениями и к 3-й нед. сила хвата была сопоставима с исходными значениями. Установлено, что трехкратное в/в гидродинамическое введение РПД ХР оказывало влияние на мышечный тонус крыс по сравнению с его однократным введением (рис. 1).

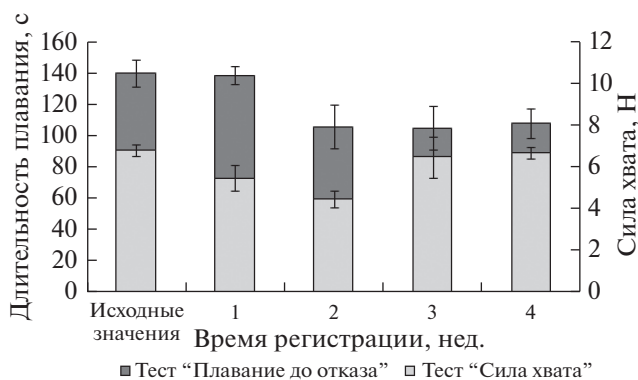


Рис. 1. Мышечная утомляемость у крыс после трехкратного внутривенного гидродинамического введения РПД ХР в тестах “Плавание до отказа” и “Сила хвата”, ($M \pm SD$, $n = 8$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Посредством индукции экспрессии химерного холинорецептора разработана сохраняющая патогенетическое единство с экспериментальной моделью МG, предполагающая трехкратное внутривенное введение РПД ХР с применением гидродинамического введения. Предложенная схема введения образца обеспечивает выраженный аутоиммунный ответ, сохранение длительности воспалительной реакции на протяжении 4-х недель и снижение физической работоспособности и показателей электронной ромиографии животных. Разработанная модель потенциально может быть использована при отборе лекарственных средств для терапии аутоиммунных заболеваний холинергической природы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Тюнин М.А., Чепур С.В., Гоголевский А.С. и др. Проблема промежуточного синдрома при отравлениях антихолинэстеразными соединениями // Токсикол. вестн. 2017. Т. 145. № 4. С. 40–49.
- Baggi F., Antozzi C., Toscani C., Cordiglieri C. Acetylcholine receptor-induced experimental myasthenia gravis: what have we learned from animal models after three decades? // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 2012. V. 60. № 1. P. 19–30.
- Behin A., Le Panse R. New pathways and therapeutic targets in autoimmune myasthenia gravis // J. Neuromuscul. Dis. 2018. V. 5. (3). P. 265–277.
- Cao Y., Lu X., Wang J. et al. Construction of an miRNA-regulated drug repurposing candidates for myasthenia gravis // Int. J. Mol. Med. 2017. V. 39. № 2. P. 268–278.
- Fuchs S., Aricha R., Reuveni D., Souroujon M.C. Experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG): from immunochemical characterization to therapeutic approaches // J. Autoimmun. 2014. V. 54. P. 51–59.
- Fujii Y.X., Fujigaya H., Moriwaki Y. et al. Enhanced serum antigen-specific IgG1 and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice // J. Neuroimmunol. 2007. V. 189. (1–2). P. 69–74.
- Gilhus N.E., Kerty E., Løseth S. et al. Myasthenia gravis – optimal treatment and acute diagnosis // Tidss. Nor. Laegeforen. 2016. V. 136. № 12–13. P. 1089–1094.
- Mantegazza R., Cordiglieri C., Consonni A., Baggi F. Animal models of myasthenia gravis: utility and limitations // Int. J. Gen. Med. 2016. №. 9. P. 53–64.
- Qian J., Galitovskiy V., Chernyavsky A.I. et al. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in *in vitro* differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th17 lineages // Gen. Immun. 2011. V. 12. P. 222–230.
- Racca F., Vianello A., Mongini T. et al. Practical approach to respiratory emergencies in neurological diseases // Neurol. Sci. 2020. V. 41. № 3. P. 497–508.
- Wang H., Liao H., Ochani M. et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis // Nat. Med. 2004. V. 10. P. 1216–1221.
- Wang H., Yu M., Ochani M. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation // Nature. 2003. V. 421. (6921). P. 384–388.

Method for Modeling Myasthenia Gravis in Rodents by Inducing Autoimmune Cholinoreceptor Damage

S. V. Chepur^a, M. A. Yudin^a, A. S. Nikiforov^a,
I. M. Ivanov^a, A. N. Alekseev^a, and T. M. Ustinova^a. *

^aState Scientific-Research Test Institute of the Military Medicine, Russian Federation Defense Ministry, Saint-Petersburg, Russia

*e-mail: gniiivm_15@mil.ru

The possibility of modeling myasthenia gravis in rats by intravenous administration of recombinant plasmid DNA encoding a chimeric nACh-receptor, followed by hydroporation or electroporation, is shown. The formation of neuromuscular conduction disorders was evaluated by electroneuromyography in the form of a decrease in the amplitude of the M-response and its decrement, and a decrease in the response area. In a hematological study, an increase in the number of blood lymphocyte and monocyte populations, an increase in the content of antibodies to the cholinoreceptor and the proinflammatory cytokine IL-1 α was observed in dynamics. The developed model is suitable for the selection of medicines for the treatment of myasthenia gravis.

Keywords: myasthenia gravis, nACh-receptor, experimental model