

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 616-092

Шакова Ф.М.<sup>1</sup>, Калинина Т.И.<sup>2</sup>, Гуляев М.В.<sup>3</sup>, Черемных А.М.<sup>2</sup>, Юрин В.Л.<sup>2</sup>, Романова Г.А.<sup>1</sup>

## **Нейропротективный и антиамнестический эффекты мутантных молекул эритропоэтина на модели фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крысы**

<sup>1</sup> — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> — ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

<sup>3</sup> — Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31, к. 5

**Методика.** Методом генной инженерии созданы мутантные молекулы ЕРО, лишённые эритропоэтической активности, но обладающие цитопротекторным действием. Оценка терапевтической эффективности полученных мутантных белков проводилась по степени сохранения условного рефлекса пассивного избегания (ЛП УРПИ), выработанного до ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крыс, а также на основе МРТ-анализа объёма ишемического повреждения. Исследовано антиамнестическое и нейропротективное действие мутантных молекул — МЕРО-Fc и МЕРО-TR на модели фототромбоза префронтальной коры мозга крыс при однократном интраназальном введении через 1 ч после ишемического повреждения коры. **Результаты.** Показаны нейропротективный (МРТ) и антиамнестический (ЛП УРПИ) эффекты мутантных молекул производных эритропоэтина.

**Ключевые слова:** фототромбоз; префронтальная кора; мутантные молекулы эритропоэтина МЕРО-TR, МЕРО-Fc; интраназальное введение; МРТ; УРПИ; нейропротективный и антиамнестический эффект

**Для цитирования:** Шакова Ф.М., Калинина Т.И., Гуляев М.В., Черемных А.М., Юрин В.Л., Романова Г.А. Нейропротективный и антиамнестический эффекты мутантных молекул эритропоэтина на модели фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крысы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 34–38.

**Для корреспонденции:** Шакова Фатима Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru.

**Финансирование.** Работа поддержана субсидией Президиума РАН по программе «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2014—2016 гг.

**Конфликт интересов:** отсутствует.

**Поступила:** 07.09.2016

Shakova F.M.<sup>1</sup>, Kalinina T.I.<sup>2</sup>, Gulyaev M.V.<sup>3</sup>, Cheremnykh A.M.<sup>2</sup>, Yurin V.L.<sup>2</sup>, Romanova G.A.<sup>1</sup>

## **Neuroprotective and antiamnesic effects of mutant molecules of erythropoietin on model of photochemical thrombosis of rat brain prefrontal cortex**

<sup>1</sup> — FSBI Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

<sup>2</sup> — State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545, Moscow, 1-st Dorozhnyi pr., 1

<sup>3</sup> — MSU, Faculty of Fundamental Medicine, 117192, Moscow, 31-5, Lomonosovsky Prospekt

Mutant EPO molecules, deprived of erythropoietic activity, but possessing cytoprotective action, were created by the method of genetic engineering. The assessment of the therapeutic effectiveness of the received mutant proteins was carried out by the retention of the conditioned reflex of passive avoidance (PA), developed before the ischemic injury of rat brain prefrontal cortex, and by the MRI-analysis of ischemic damage volume. Antiamnesic and neuroprotective action of mutant molecules — MERO-Fc and MERO-TR is investigated on model of photothrombosis of rat brain prefrontal cortex at single intranasal introduction in 1 h after cortex ischemic damage. The neuroprotective (MRI) and antiamnesic (PA) effects of mutant molecules of erythropoietin derivatives are shown.

**Keywords:** photothrombosis; the prefrontal cortex; mutant erythropoietin molecules МЕРО-TR, МЕРО-Fc; intranasal administration; MRI; PA; neuroprotective and antiamnesic effect.

**For citation:** Shakova F.M., Kalinina T.I., Gulaev M.V., Cheremnykh A.M., Yurin V.L., Romanova G.A. Neuroprotective and anti-amnesic effects of mutant erythropoietin molecules on model photochemical thrombosis of prefrontal cortex in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 34–38. (in Russ.).

**For correspondence:** Shakova F.M., e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

**Funding:** The work was supported by Grant of the Presidium of RAS «Fundamental research for the development of biomedical technology» on 2014–2016 years.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding.**

**Received** 07.09.2016

## Введение

Приоритетным направлением в лечении ишемического инсульта признается нейропротективная терапия, направленная на поддержание метаболизма мозга. Использование препаратов нейрометаболического действия повышает устойчивость нейронов в условиях недостаточности кровоснабжения и кислородного голодания.

Одной из экспериментальных моделей, наиболее полно воспроизводящей клиническую картину фокального ишемического инфаркта мозга, является фотохимический тромбоз кровеносных сосудов коры. Использование данной модели дает возможность количественной оценки нейропротективного и антиамнестического действия препаратов, используемых для фармакологической коррекции ишемической патологии мозга [1–3].

Важной задачей современной медицины является разработка лекарственных средств, снижающих степень нейродегенерации, улучшающих функции ЦНС, и характеризующихся при этом быстрым способом доставки действующего вещества до органа-мишени и высокой биодоступностью. В связи с этим представляется перспективным изучение интраназального пути введения препаратов, теоретические и практические основы которого разрабатываются уже более 30 лет. Установлено, что при интраназальном применении лекарств большая их часть всасывается в кровь, меньшая — при помощи перинеурального транспорта по чувствительным нервам попадает непосредственно в мозг через нейроны обонятельного тракта и далее распространяется по структурам головного мозга при помощи механизмов, не связанных с кровотоком. Возможность прямого поступления лекарств в мозг и непосредственно в зону поражения, минуя гематоэнцефалический барьер, открывает новые перспективы для эффективного лечения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний ЦНС. Разработка и внедрение новых лекарственных препаратов с нейропротекторной активностью позволит оптимизировать подходы к лечению последствий ишемического инсульта.

На модели очагового ишемического инсульта ранее были проведены доклинические испытания карбамиллированных форм новых гибридных белков на основе ЕРО [4–7]. Было показано, что данная химическая модификация как ЕРО, так и его производных (ЕРО-TR и ЕРО-Fc) ведёт к потере эритропоэтической активности, при сохранении нейропротекторного действия [5]. Для активации цитопротекции, в отличие от эритропоэза, требуются значительно более высокие дозы ЕРО. Применение высоких доз вызывает повышение уровней гематокрита и тромбоцитов, что может быть связано с серьёзными побочными эффектами.

Представляется интересной и практически важной задачей создание новых мутантных форм ЕРО, не стимулирующих эритропоэз, но способных инициировать цитопротекцию. Известно, что молекула ЕРО имеет два сайта при последовательном взаимодействии с гоморецептором, участвующим в эритропоэзе. Ранее было показано, что замена аргинина в 103 положении в молекуле эритропоэтина приводит к потере способности инициировать пролиферацию эритроцитов, но позволяет сохранить цитопротекторные свойства [8]. Важно было исследовать влияние этой замены в производных, разработанных нами ранее (ЕРО-TR и ЕРО-Fc). Методом геной инженерии созданы мутантные молекулы ЕРО, несущие замену (R103A), как в виде мономера ЕРО-TR, так и димера в форме рекомбинантного белка с Fc-фрагментом иммуноглобулина, сформированного за счёт димеризации двух Fc-фрагментов. С использованием полученных плазмид, несущих гены мутантных ЕРО, и техники Flp/FRT сайт-специфической интеграции трансгенов в геном Flp-In/CHO клеток-реципиентов были созданы CHO линии-продуценты соответствующих мутантных белков. После селекции с помощью гигромицина были получены стабильно-трансфецированные линии клеток CHO, способные секретировать мутантные белки. Для наработки белковых соединений проводилось культивирование линий-продуцентов, с последующим получением очищенных образцов рекомбинантных белков из культуральных жидкостей методами

афинной хроматографии. Эритропоэтическая активность полученных мутантных гибридных белков оценена в тестах *in vitro*, где производилась оценка способности очищенных мутантных белков инициировать пролиферацию УТ-7еро клеток, чувствительных к ЕРО в сравнении со стандартным препаратом ЕРО. Анализ полученных данных показал, что способность взаимодействовать с рецептором и соответственно вызывать пролиферацию УТ-7еро клеток, редуцирована в 1000 и более раз у мутанта, содержащего замену R103E в контексте мономера ЕРО. В случае димерных молекул с молекулой Fc, способность вызывать пролиферацию была снижена в 100 раз. Таким образом, созданы мутантные молекулы эритропоэтина в контексте ЕРО-TR и ЕРО-Fc с сильно редуцированной эритропоэтической активностью. Получение препаратов таких белков не требует дополнительной химической модификации, что делает процесс более воспроизводимым и менее трудоёмким с точки зрения биотехнологического производства.

*Цель исследования* — изучение на модели фототромбоза сосудов префронтальной коры мозга крыс и определение дозозависимости нейропротективного и антиамнестического эффектов мутантных белков эритропоэтина — МЕРО-Fc и МЕРО-TR при однократном интраназальном введении.

### Методика

Опыты выполнены на 60 нелинейных белых крысах-самцах массой 200—220 г, выращенных в питомнике ФГБНУ НИИОПП и содержавшихся в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима. Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными МЗ РФ № 708 от 23.08.2010 г.

Введение исследуемых мутантных форм производных эритропоэтина осуществлялось однократно, интраназально в дозах 50 мкг/кг и 10 мкг/кг через 1 ч после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

Все экспериментальные животные были разделены на 5 групп:

Интраназальное введение исследуемых веществ:

1. Фототромбоз + МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг ( $n = 12$ );
2. Фототромбоз + МЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг ( $n = 12$ );
3. Фототромбоз + МЕРО-TR в дозе 10 мкг/кг ( $n = 12$ );
4. Фототромбоз + МЕРО-Fc в дозе 10 мкг/кг ( $n = 12$ );

5. Фототромбоз + 0,9% раствор NaCl в объеме 50 мкл ( $n = 12$ ).

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) вырабатывали по ранее описанной схеме [9]. Определяли латентный период (ЛП) — время, которое проходило от начала теста до момента пересечения крысой отверстия, разделяющего освещенный и темный отсеки камеры. При повторном заходе крысы в темный отсек камеры дверь в него закрывали и через металлические прутья пола пропускали электрический ток (1,3 мА, 50 Гц, 5 с). УРПИ считали выработанным, если ЛП составлял не менее 300 с. Животных с меньшим ЛП исключали из эксперимента. Оценку антиамнестического действия исследуемых мутантных белков проводили на 4-е сут. после индукции инфаркта коры.

Двустороннее фокальное ишемическое повреждение префронтальной коры головного мозга крыс (циртоархитектонические поля Frl и Fr2) создавали методом фотохимического тромбоза [10, 11]. Операцию проводили под наркозом (внутрибрюшинное введение хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг). После введения фотосенсибилизирующего красителя бенгальского розового (внутривенно 40 мг/кг, «Sigma», USA) голову крысы фиксировали в стереотаксисе. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света — галогеновой лампы мощностью 250 Вт и световода с диаметром внутреннего сечения 3,0 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1,0 мм от поверхности черепа, на 2,0 мм роstralнее брегмы и на 2,0 мм латеральнее сагиттального шва и облучали через кость черепа каждое из полушарий мозга холодным светом длиной волны 560 нм в течение 15 мин.

Головной мозг всех экспериментальных животных, предварительно наркотизированных хлоралгидратом в дозе 300 мг/кг в/б, исследовали с помощью МРТ на 4-е сут. после фототромбоза. Сканирование головного мозга производили на магнитно-резонансном томографе (МРТ) BioSpec 70/30 USR фирмы Bruker (Germany) с постоянным магнитным полем 7 Тл и с градиентной системой 105 мТл/м. Морфометрический анализ МРТ изображений проводили в программе ImageJ 1.38x (National Institutes of Health, USA) [12].

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Для сравнения показателей латентного периода в тесте УРПИ использовали U-критерий Манна—Уитни для независимых выборок и критерий Вилкоксона для связанных выборок. Статистическую значимость различий объемов инфаркта оценивали по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

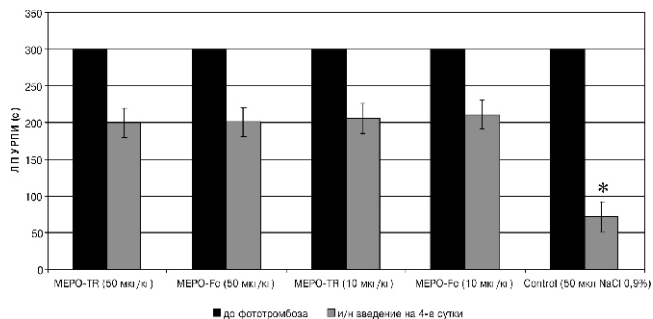
Ранее было показано, что фотохимически индуцируемый двусторонний тромбоз кровеносных сосудов в префронтальной области коры головного мозга крыс приводит к формированию ишемического очага, который захватывает всю толщину коры и отделен от окружающей неповрежденной ткани четко выраженной границей, такое повреждение коры сопровождается потерей выработанного до ишемии условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [4, 13].

Оценку функционального состояния ЦНС проводили по показателям ЛП УРПИ до и после ишемического повреждения коры головного мозга крыс. До фототромбоза у всех обученных экспериментальных животных этот показатель составлял 300 с. Проверку сохранения выработанных до ишемии УРПИ проводили на 4-е сут. после операции.

Важной особенностью интраназального введения лекарственных препаратов является возможность их проникновения непосредственно в ЦНС. Предполагается, что транспорт лекарственных средств из полости носа в ЦНС осуществляется без участия слизистой, экстрацеллюлярным путем по ходу тройничного и обонятельного нервов. Уже через 10—15 мин химические агенты, введенные интраназально, обнаруживаются в мозге. Данный факт привлекает всеобщее внимание, поскольку обеспечивает новые возможности в лечении заболеваний ЦНС. Теоретически лекарственные препараты проникают в головной мозг только из обонятельной области, где существует возможность экстра- и интрацеллюлярного проникновения препаратов через эпителиальный барьер и попадания их не в кровотоки, а непосредственно к оболочкам мозга [14].

При однократном интраназальном введении мутантных производных эритропоэтина, ЛП УРПИ на 4-е сут. после ишемии при введении МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг составил 200 с, МЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг — 201 с, МЕРО-TR в дозе 10 мкг/кг — 206 с, МЕРО-Fc в дозе 10 мкг/кг — 211 с, контрольная группа, получавшая 50 мкл NaCl 0,9% — 72 с.

Полученные данные показали достоверное сохранение выработанного до ишемии УРПИ при введении как МЕРО-TR, так и МЕРО-Fc. Антиамнестический эффект сохранялся при пятикратном снижении дозы



Влияние интраназального введения мутантных форм белков — МЕРО-TR и МЕРО-Fc на сохранение УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры.

По оси абсцисс: группы экспериментальных животных: МЕРО-TR (50 мкг/кг), МЕРО-Fc (50 мкг/кг), МЕРО-TR (10 мкг/кг), МЕРО-Fc (10 мкг/кг), Control (50 мкл NaCl 0,9%). Темные столбики — показатели группы до фототромбоза, серые столбики — показатели группы после однократного интраназального введения вещества на 4-е сут. после фототромбоза.

По оси ординат: латентный период условного рефлекса пассивного избегания соответствующих экспериментальных групп в секундах.

\* $p < 0,01$  по сравнению с соответствующим значением ЛП до фототромбоза (Критерий Вилкоксона).

препаратов, что доказывает эффективность интраназального способа введения, позволяющего существенно снизить дозу вводимого препарата (рисунок).

Объем повреждения мозговой ткани оценивали методом МРТ на 4-е сут. после фототромбоза (таблица).

При интраназальном способе введения, наиболее выраженный защитный эффект выявлен у МЕРО-Fc в дозировке 50 мкг/кг ( $p < 0,05$ ), несколько ниже, но также статистически значимым, он оказался у МЕРО-Fc в дозировке 10 мкг/кг и МЕРО-TR в дозировке 50 мкг/кг. Объем повреждения мозга при применении МЕРО-TR в дозе 10 мкг/кг существенно не отличался от соответствующего показателя в контрольной группе.

Таким образом, при интраназальном введении МЕРО-Fc и МЕРО-TR после двустороннего фотохимического повреждения префронтальной коры крыс получены данные, свидетельствующие об антиамнестическом действии данных мутантных производных ЕРО, а МРТ анализ показал нейропротективный эффект МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг и ( $p < 0,05$ ) и МЕРО-Fc как в стандартной, так и пятикратно уменьшенной дозе ( $p < 0,05$ ).

Таблица

МРТ исследование суммарного объема очага ишемического повреждения по экспериментальным группам

Группы животных	0,9% раствор NaCl, 0,5 мл	МЕРО-TR, 50 мкг/кг	МЕРО-Fc, 50 мкг/кг	МЕРО-TR, 10 мкг/кг	МЕРО-Fc, 10 мкг/кг
Суммарный объем (мм <sup>3</sup> ) повреждения мозга на крысу при интраназальном введении	29,4	21,3*	19,5*	23,4	20,7*

Примечание. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой с введением раствора NaCl 0,9% (Критерий Манна—Уитни)

### Заключение

Оценка терапевтической эффективности мутантных белков (МЕРО-TR, МЕРО-Fc) проводилась по степени сохранения когнитивных функций, нарушенных при фотохимическом повреждении сосудов префронтальной коры головного мозга крыс и объема повреждения по данным МРТ исследования очага ишемического повреждения. Полученные данные показали статистически значимое сохранение выработанного до ишемии навыка и снижение объема повреждения, что указывает на ноотропную и нейропротективную активность мутантных белков. Результаты согласуются с данными других авторов, которые продемонстрировали, что при интраназальном введении, производные эритропоэтина эффективно преодолевают гематоэнцефалический барьер и обладают нейропротекторными свойствами даже при уменьшении дозы введения, что было показано на модели фокальной церебральной ишемии [15]. Наши результаты продемонстрировали, что мутантные формы эритропоэтина как в контексте мономера, так и в контексте димера (МЕРО-TR, МЕРО-Fc), являются перспективными кандидатами для коррекции ишемических повреждений головного мозга.

### References

1. Romanova G.A., Silachev D.N., Shakova F.M., Viktorov I.V., Shram S.I., Myasoedov N.F. Neuroprotective and anti-amnesic effects of the peptide Semax with experimental brain ischemic infarct. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2006; 142 (12): 618-21. (In Russian)
2. Silachev D.N., Shram S.I., Shakova F.M., Romanova G.A., Myasoedov N.F. Long-term effects of synthetic analogue of ACTH (4-10) on the formation spatial memory in rats with ischemic damage prefrontal cortex. *Zhurnal Vyshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova*. 2008; 45 (4): 458-66. (In Russian)
3. Gudasheva T.A., Romanova G.A., Shakova F.M., Barskov I.V., Stel'maschuk E.V. Neuroprotective and anti-amnesic effects of dipeptide mimetic growth factor of nerves — GK-2H with experimental ischemic brain infarction in rats. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2012; 10: 50-4. (In Russian)

4. Shakova F.M., Kalinina T.I., Barskov I.V., Romanova G.A. Comparison of the neuroprotective effects of erythropoietin derivatives with different modes of administration on the model bilateral focal lesions of the prefrontal cortex in rats. *Patologicheskaya Fiziology i Eksperimental'naya Terapiya*. 2015; 3: 26-33. (In Russian)
5. Kalinina T.I., Cheremnykh A.M., Jurin V.L., Romanova G.A., Shakova F.M. Neuroprotective effect of carbamylated erythropoietin and its derivatives. *Proceedings of the VIII Moscow International Congress «Biotechnology: state and development prospects»*. Moscow; 2015: Abstracts: 114-6. (In Russian)
6. Romanova G.A., Shakova F.M., Kalinina T.I., Jurin V.L. Correction of functional disorders with erythropoietin derivatives on the model of focal ischemia rat cerebral cortex. *Proceedings of the XI International interdisciplinary congress «Neuroscience for Medicine and Psychology»*. Sudak; 2015: Abstracts: 329. (In Russian)
7. Shakova F.M., Romanova G.A., Kalinina T.I. The neuroprotective effect of carbamylated erythropoietin derivatives on model bilateral photochemical thrombosis of prefrontal cortex in rats. *Proceedings of the European Behavioural Pharmacology Society Meeting*. Verona; 2015: Book of abstracts: 31.
8. Leist M., Ghezzi P., Grasso G., et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*. 2004; 305: 239-41.
9. Buresh Y., Bureshova O.J., Houston A.P. *Methods and basic experiments on the brain and behavior*. Moscow: Higher School; 1999. (In Russian)
10. Paxinos G., Watson S. *Atlas of anatomy of rat brain. The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 1986.
11. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17 (5): 497-504.
12. Silachev D.N., Uchevatkin A.A., Pirogov Y.A., Zorov D.B., Isaev N.K. Comparison of MRI detection of brain damage as the research methods of experimental focal ischemia. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2009; 147 (2): 223-6. (In Russian)
13. Romanova G.A., Barskov I.V., Viktorov I.V. Behavioral and morphological disorders caused by bilateral photochemical induced thrombosis of the frontal cortex in rats. *Patologicheskaya Fiziology i Eksperimental'naya Terapiya*. 1998; 2: 8-10. (In Russian)
14. Privalova A.M., Gulyaeva N.V., Bukreeva T.V. Intranasal administration — a perspective way of delivery drugs in a brain. *Neyrokimiya*. 2012; 29 (2): 93-105. (In Russian)
15. Teste I.S., Tamos Y., Rodriguez Cruz Y. Dose effect evaluation and therapeutic window of the neuro-EPO nasal application for the treatment of the focal Ischemia model in the mongolian gerbil. *The Scientific World Journal*. 2012; Article ID 607.

### Сведения об авторах:

Шакова Фатимат Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории общей патологии нервной системы, shakova.fatima@yandex.ru

Романова Галина Александровна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаборатории общей патологии нервной системы, e-mail: romanovaga@mail.ru

Калинина Татьяна Игоревна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунологии

Гуляев Михаил Викторович, научный сотр, канд. физ-мат. наук, факультета фундаментальной медицины МГУ;

Черемных Антон Михайлович, научный сотрудник лаборатории иммунологии

Юрин Виталий Львович, канд. мед. наук, заведующий лабораторией иммунологии