

**ОТКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
"НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР  
МЕДИЦИНСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ"**

«Утверждаю»  
Генеральный директор  
Дудкин С.М.

**"Исследование влияния Эритропоэтинов и  
препарата Криомелт МН на экспрессию  
нейротрофических факторов BDNF и NGF" in vitro.**

**МОСКВА 2018г.**

## **Аннотация.**

Регуляция экспрессии нейротрофинов и их рецепторов в мозге в настоящее время рассматривается как один из самых перспективных путей воздействия на ряд патологических состояний ЦНС, связанных с дегенерацией и гибелью нейронов. В то же время, известные к настоящему времени соединения, способные регулировать экспрессию нейротрофинов в мозге, например, антидепрессанты, обладают негативными побочными эффектами, ограничивающими их использование.

В примере исследована активность препаратов, названных соответственно Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2, в регуляции экспрессии нейротрофических факторов BDNF и NGF *in vitro*.

*Эритропоэтин N1* – это модифицированная форма рекомбинантного эритропоэтина человека с добавлением (1:1) препарата **Криомелт МН** (5 мг/мл).

*Эритропоэтин N2* – это лекарственная форма рекомбинантного эритропоэтина человека с торговым названием - **Эритростим**.

Для культивируемых нейроглиальных клеток коры больших полушарий крысы показано, что в концентрации 3 нМ происходит статистически достоверная стимуляция экспрессии как BDNF, так и NGF в 2-5 раз по сравнению с контролем через 1 и 4 часа после введения препаратов. Наиболее высокая стимуляция экспрессии нейротрофического фактора BDNF через 4 часа после введения отмечена для препарата Эритропоэтин N1, которая составила 340 % от контроля. Поскольку BDNF обладает высокой нейропротекторной и нейротрофической активностью, то на основе препарата Эритропоэтин N1 возможно создание фармпрепарата, проявляющего активность при демиелинизирующих заболеваниях.

## **Введение**

Нейротрофины – семейство регуляторных белков нервной ткани, которые синтезируются нейронами и клетками нейроглии, и способствуют дифференцировке и поддержанию жизнеспособности и функционирования периферических и центральных нейронов. При этом используется аутокринный и паракринный механизмы регуляции. Нейротрофины регулируют нейрональную дифференцировку, индуцируют ветвление дендритов (арборизацию) и рост аксонов (спрутинг) в направлении клеток-мишеней. В зрелой нервной системе нейротрофины регулируют как краткосрочную синаптическую передачу, так и долговременное потенцирование, участвуя, таким образом, в обеспечении пластичности нервной системы, необходимой для ее нормального функционирования.

Зрелые активные формы BDNF представляют собой стабильные гомодимеры с молекулярной массой около 28кД. Он поддерживает рост спинальных сенсорных нейронов, а также выживание и рост мотонейронов, сенсорных, ганглионарных, дофаминергических, холинергических и ГАМК-ергических нейронов. BDNF продуцируется прежде всего клетками нейроглии головного и спинного мозга, а также шванновскими клетками, ассоциированными с периферическими мотонейронами.

## **Материалы и методы исследования**

### ***Использованные материалы и реагенты.***

В работе использовались следующие реагенты: L-глутамин, MEM, F12, DMEM, эмбриональная сыворотка коровы (ICN), сахароза, BSA, SDS, EDTA, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, PPO, POPOP, бензамидин, PMSF, BDNF, Трис, инсулин, трансферрин, прогестерон, путресцин, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, трифторуксусная кислота, гептафтормасляная кислота, трихлоруксусная кислота, ацетонитрил, полиэтиленмин, D-глюкоза, L-глутамин, апротинин, лейпептин (Sigma, Sigma-Aldrich), CuSO<sub>4</sub>, параформальдегид, Ca,Na-тарtrat, соляная кислота,

толуол (Реахим), CaCl<sub>2</sub>, реактив Фолина (Merck), тритон X-100 ("Ferak Berlin"). Использовалась пластиковая культуральная посуда фирм Nunc и Costar. Производители других использованных в работе материалов и реагентов указаны в соответствующих разделах.

### ***Первичные культуры клеток нейроглии.***

Первичную культуру клеток нейроглии получали согласно стандартной методике (Cole, 1989). Крыс линии Sprague-Dowly возраста 1-3 дня забивали с помощью углекислотной асфиксии (15 минут) и помещали на 1 минуту в 80% водный раствор этанола. Далее все операции проводили в асептических условиях при температуре 4-7<sup>0</sup>С. Выделенный мозг помещали в раствор Хэнкса и далее выделяли кору больших полушарий, освобождая ткань от оболочек. Выделенную ткань один раз промывали раствором Хэнкса и переносили в среду MEM/F12 (1:1), содержащую 20% эмбриональной сыворотки коровы и 2 мМ L-глутамин. Ткань диссоциировали на отдельные клетки механически. Полученную клеточную суспензию один раз промывали средой того же состава с помощью центрифугирования при 200 g. Клетки засеивали плотностью 200 тыс. клеток/см<sup>2</sup> на обработанные поли-L-лизинем культуральные флаконы площадью 75 см<sup>2</sup>. Культивирование клеток проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37<sup>0</sup>С в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха в среде MEM/F12 содержащей 15% эмбриональной сыворотки коровы, 6 г/л D-глюкозы, 2 мМ L-глутамин, 25 мг/л инсулина, 100 мкг/мл трансферрина, 20 нМ прогестерон, 100 нМ путресцин и 30 нМ селенит натрия, 100 мкг/мл гентамицина. Культуральную среду меняли каждые 3-4 дня. Пересев клеток проводили после достижения монослоя в соотношении 1:3 (время достижения монослоя 1.5-2 недели).

## **Исследование влияния препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 на уровень экспрессии BDNF мРНК и NGF мРНК в культуре нейроглии.**

### ***Выделение тотальной РНК.***

Для экспериментов использовали полученные после третьего пересева клетки: плотностью 100 тыс./см<sup>2</sup> высевали на обработанные поли-L-лизинном 6-луночные культуральные планшеты в указанной культуральной среде. После достижения клетками монослоя культуральную среду заменяли на бессывороточную (указанная среда без эмбриональной сыворотки коровы). После 48 ч инкубации в среду вводили стерильные растворы (40 мкл) тестируемых соединений до конечной концентрации 3 нМ (3 параллели на точку). В качестве контроля вводили равный объем 0.9 % раствора NaCl в воде. Через указанные промежутки времени отбирали культуральную среду, клетки промывали холодным фосфатно-солевым буфером и выделяли тотальную РНК фенол-хлороформным методом с использованием набора YellowSolve (Клоноген, Россия) с использованием методики производителя. Чистоту и концентрацию РНК в полученных образцах проводили спектрофотометрически, и в дальнейших экспериментах использовали образцы с соотношением  $A_{260}/A_{280} \geq 1.6$ .

### ***Обратная транскрипция и ПЦР.***

Для проведения обратной транскрипции отбирали 1 мкг тотальной РНК и проводили реакцию 1 час при 37<sup>0</sup>С в среде, содержащей 8 ед/мл Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV)-обратную транскриптазу, 10 мМ дитиотрейтол, 800 мкМ dNTPs, случайные гексапраймеры (20 мкг/мл) и first-strand buffer (50 мМ Трис-НСl, 75 мМ КСl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>) в объеме 25 мкл. После последующей инкубации 10 минут при 70<sup>0</sup>С, образцы полученной кДНК хранили при -20<sup>0</sup>С.

Оценку уровня экспрессии BDNF мРНК проводили с использованием количественной ПЦР в реальном времени (real-time quantitative PCR, система Mx3000P, Stratagene). Применяли высокоспецифичный dsДНК-связывающий

краситель SYBR green I. Реакцию проводили в смеси объемом 25 мкл, содержащей 2 мкл к ДНК образца или стандарта, или 2 мкл воды (негативная проба), 250 мкМ смеси дНТФ (дезокси-нуклеозидтрифосфаты), 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 15 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 50 мМ КCl, 0,5% глицерола, 0.1% Tween 20, интеркалирующий краситель SYBR Green I, 1 ед Taq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами ("Синтол", Россия) и по 10 пмоль смысловых и антисмысловых праймеров ("Синтол", Россия; Табл. 1) при следующих условиях: старт - 5 минут 95<sup>0</sup>С, затем 40 циклов, включающих плавление - 30 секунд при 95<sup>0</sup>С, отжиг – 30 сек при 68<sup>0</sup>С, элонгация – 30 секунд при 72<sup>0</sup>С с детекцией флуоресценции в конце каждого шага элонгации.

Таблица 1

Ген	Последовательности праймеров (прямой; обратный)
<b>□-Актин</b>	5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3' 5'-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'
<b>BDNF</b>	5'-AGCCTCCTCTGCTCTTTCTGCTGGA-3' 5'-CTTTTGTCTATGCCCCTGCAGCCTT-3'
<b>NGF</b>	5'-TCAGTGTGTGGGTTGGAGAT-3' 5'-AGCCTGTTTGTCTGTTG-3'

Для подтверждения специфичности продуктов амплификации после окончания амплификации образцы охлаждали до 60<sup>0</sup>С и через 20 минут получали кривые плавления нагреванием до 95<sup>0</sup>С со скоростью 0.03<sup>0</sup>С/сек. с непрерывной детекцией флуоресценции. Для получения калибровочных кривых, смесь кДНК образцов последовательно разбавляли водой, свободной от ДНКаз, получали стандартные растворы с известной относительной концентрацией соответствующего продукта. С использованием программного обеспечения производителя определяли номер цикла, соответствующий максимальному ускорению процесса амплификации, получали калибровочную кривую числа данных циклов от относительной концентрации продукта, и определяли относительную концентрацию в неизвестном образце с последующей

нормализацией по  $\beta$ -актину.

Достоверности различий групповых средних оценивались с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA). На графике представлены средние значения групп с учетом стандартной ошибки среднего ( $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ). Обозначения уровней достоверности: \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$

## **Результаты и их обсуждение**

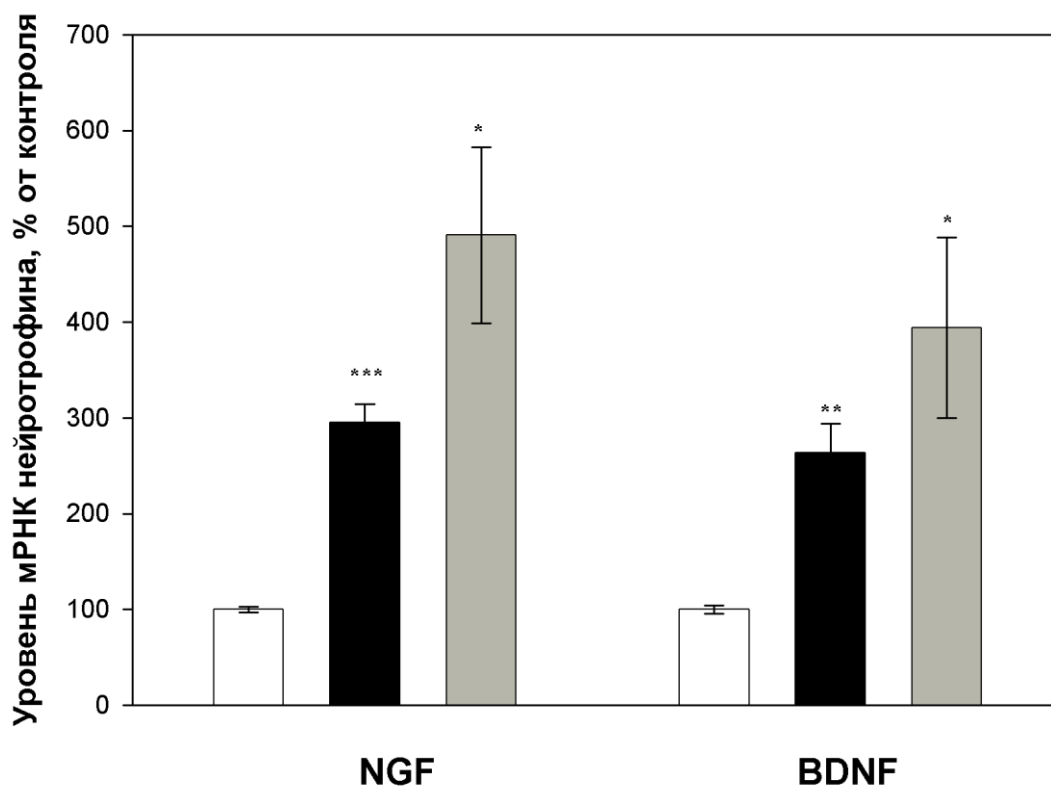
В результате проведенных экспериментов проведено тестирование способности препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 регулировать экспрессию наиболее изученных нейротрофинов BDNF (brain-derived neurotrophic factor) и NGF (nerve growth factor) в культивируемых астроцитах коры больших полушарий крысы. Для этого с использованием метода количественной ОТ-ПЦР в реальном времени (полимеразная цепная реакция продуктов обратной транскрипции) протестирована способность препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 влиять на экспрессию на уровне мРНК генов BDNF и NGF в культивируемых астроцитах коры больших полушарий мозга крысы.

В результате проведенных исследований было показано, что при введении культуральную среду Эритропоэтина N1 и Эритропоэтина N2 в концентрации 3 нМ обнаружено сильное изменение экспрессии как BDNF, так и NGF, составляющее 2-5 раз по сравнению с контролем. Такое увеличение экспрессии является длительным и наблюдается через как 1, так и через 4 ч после введения (Рисунки 1 и 2). Наиболее значительным и длительным эффектом на увеличение экспрессии BDNF обладает препарат Эритропоэтин N1. По сравнению с контролем экспрессии BDNF составила 340 % (Рисунок 2).

Миелин ЦНС формируется в результате спирального обвития аксонов отростками глиальных клеток. Образующиеся при этом миелиновые оболочки в некоторых случаях могут разрушаться под воздействием вирусов и аутоиммунных реакций. Вследствие этого может нарушаться проводимость по нервным волокнам, что приводит, например, к двигательным нарушениям. Поддержание

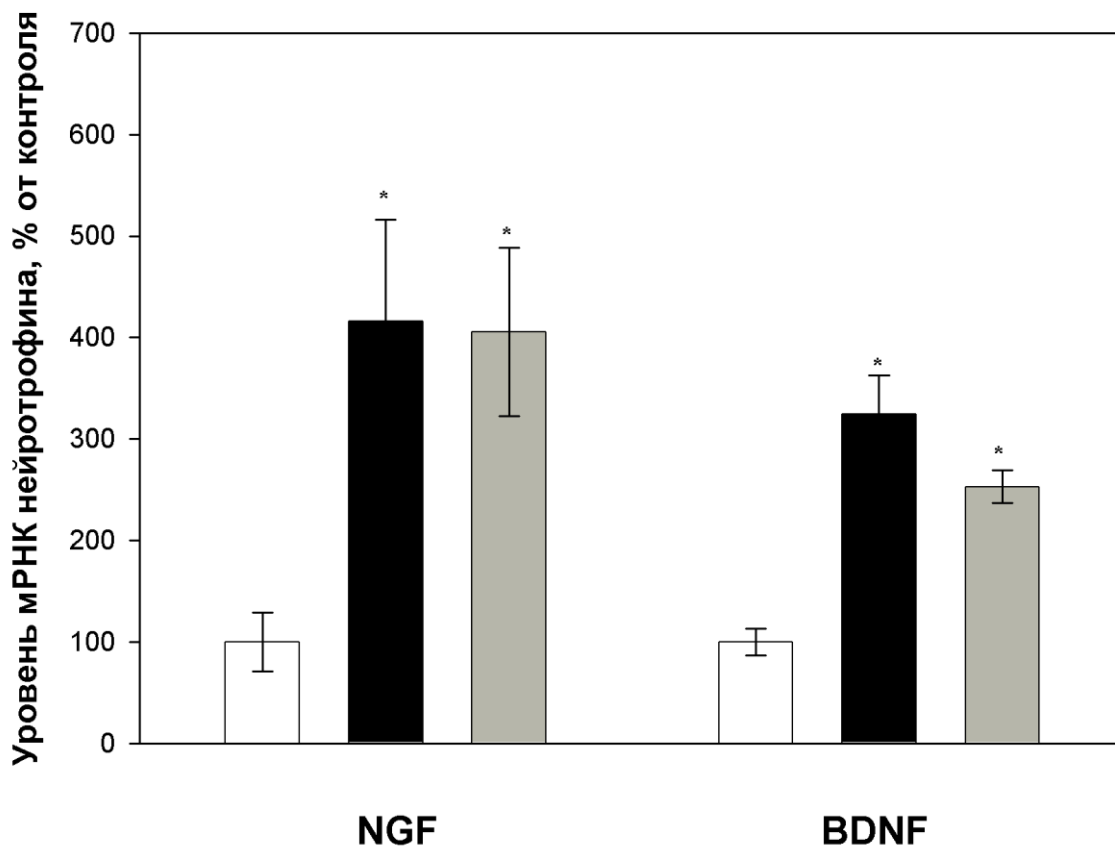
жизнеспособности нейронов является BDNF-зависимым процессом, осуществляемым нейроглиальными клетками. Можно предположить, что увеличение экспрессии BDNF и NGF под действием Эритропоэтина N1 является одним из основных молекулярных механизмов его терапевтического действия. Поскольку BDNF обладает высокой нейропротекторной и нейротрофической активностью, то на основе препарата Эритропоэтин N1 возможно создание фармпрепарата, проявляющего активность при демиелинизирующих заболеваниях.

Кроме того, найденная биологическая активность позволяет предполагать обнаружение у Эритропоэтина N1 и антидепрессантной активности, так как известно, что прямая инъекция BDNF в гиппокамп лабораторных животных вызывает антидепрессантный эффект.



**Рисунок 1.** Влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 в концентрации 3 нМ на экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF в культивируемых клетках астроцитов коры больших полушарий мозга крысы при инкубации в течение 1 часа. (белый – контроль, черный - Эритропоэтин N1, серый –, Эритропоэтин N2; \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ )





**Рисунок 2.** Влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 в концентрации 3 нМ на экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF в культивируемых клетках астроцитов коры больших полушарий мозга крысы при инкубации в течение 4 часов. (белый – контроль, черный - Эритропоэтин N1, серый – Эритропоэтин N2; \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ )

Генеральный  
директор



Дудкин С. М.