

**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".**

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.

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**».

Исследована активность препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 в регуляции экспрессии нейротрофических факторов BDNF и NGF *in vivo* и *in vitro*. Показано влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 на экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF в гиппокампе и коре головного мозга крысы *in vivo* через 1 час после внутрибрюшинного и интраназального введения 10000 ед ЭПО на кг веса крысы. Для препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 показано, что в дозе 10000 ед/кг веса происходит статистически достоверная стимуляция экспрессии как BDNF, так и NGF в 2-3 раз как гиппокампе, так и в коре головного мозга крысы при интраназальном введении. Для гиппокампа, имеющего особое значение при нейродегенеративных заболеваниях, отмечено значительное увеличение экспрессии как BDNF, так и NGF только при интраназальном введении препаратов. Для препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 показано, что через 1 час после внутрибрюшинного введения 10000 ед/кг веса в гиппокампе не наблюдается изменения экспрессии как BDNF, так и NGF. Таким образом, делается вывод о перспективности создания фармакологического препарата, обладающего

способностью стимулировать экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF при интраназальном введении.

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, Na₂CO₃, Na₂HPO₄, NaCl, PPO, POPOP, бензамидин, PMSF, BDNF, Трис, инсулин, трансферрин, прогестерон, путресцин, Na₂SeO₃, трифторуксусная кислота, гептафтормасляная кислота, трихлоруксусная кислота, ацетонитрил,

полиэтиленмин, D-глюкоза, L-глутамин, аprotинин, лейпептин (Sigma, Sigma-Aldrich), CuSO₄, параформальдегид, Ca,Na-таратрат, соляная кислота, толуол (Реахим), CaCl₂, реактив Фолина (Merck), тритон X-100 ("Ferak Berlin"). Использовалась пластиковая культуральная посуда фирм Nunc и Costar.

Эритропоэтин N1 – это химически модифицированная форма рекомбинантного эритропоэтина человека, не содержащая альбумин человека. Инъекционная форма изготовлена на основе патента на стабилизированный раствор эритропоэтина на основе 10% раствора реополиглюкина. Форма выпуска – 1 доза (1мл) содержит 200 мкг, эквивалент 20 000 МЕ в дозе. Концентрация использованного в исследованиях ЭПО (№1) составляла 0,2 мг/мл в 10% растворе реополиглюкина.

Эритропоэтин N2 – это лекарственная форма с торговым названием - Эритростим. Он содержит высокоочищенный (99.5%) рекомбинантный эритропоэтин человека, сывороточный альбумин человека, изотонический цитратный буферный раствор. Форма выпуска - по 1 мл 2000МЕ, в ампулах.

Исходная концентрация ЭПО (№2) была в 10 раз ниже, чем у ЭПО (№1). Для увеличения концентрации ЭПО (№2) его лекарственная форма в количестве 15 мл была лиофильно высушена, растворена в 1,5 мл дистиллированной воды и подвергнута диализу против физиологического раствора. В результате чего был получен раствор ЭПО (№2) с концентрацией 0,2 мг/мл в физиологическом растворе, содержащем около 10% сывороточного альбумина человека.

Подготовка образцов исследуемых отделов мозга *in vivo*.

Использовали самцов крыс линии Вистар, массой 200 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище и 12-ти часовым циклом освещения (включение света в 9:00, выключение – в 21:00). Были созданы все условия для минимизации стрессирования животных. Животных содержали в клетках по 4 штуки таким образом, что каждая клетка содержала представителей и контрольных, и экспериментальных животных. Изучаемые препараты однократно вводили в дозе 10000 ед/кг массы тела крысы

внутрибрюшинно и интраназально в объеме 100 мкл. Контрольным животным вводили внутрибрюшинно или интраназально эквивалентный объем физиологического раствора. В каждой группе было по 4 животных. Через 1 час после введения препарата крыс забивали с помощью углекислотной асфиксии, и сразу после этого выделяли исследуемые отделы мозга (гиппокамп и фронтальная кора мозга). Ткань замораживали на сухом льду и хранили при -80°C .

Выделение тотальной РНК.

Тотальную РНК из образцов выделяли с помощью фенол-хлороформной экстракции с использованием набора RneqGold TriFast (RneqLab, Германия), следуя методике и рекомендациям производителя. Полученную РНК трижды промывали 80% этанолом (4°C), растворяли в 100 мкл воды, свободной от РНКаз и хранили при -80°C . Содержание РНК измеряли спектрофотометрически, и далее использовали образцы, для которых соотношение оптических плотностей при 260 и 280 нм превышало 1.6.

Обратная транскрипция и ПЦР.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора фирмы "Силекс" (Россия) по протоколу и рекомендациям производителя. Отбирали по 0.25 мкг тотальной РНК и проводили реакцию 1 час при 37°C в 50 мкл смеси, содержащей 0.1 мкг случайных гексапраймеров, 200 ед Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV)-обратную транскриптазу, 150 мкМ смеси dNTP, 70 mM Трис-НСl, pH 8.3 / 25 C, 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,5 mM MgCl_2 . После последующей инкубации 10 минут при 95°C , образцы кДНК хранили при -20°C .

Оценка уровня экспрессии BDNF и NGF мРНК.

Оценку уровня экспрессии BDNF и NGF 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 3 мкл кДНК образца или стандарта, или 2 мкл воды (негативная проба), 250 мкМ смеси дНТФ (дезокси-нуклеозидтрифосфаты), 2.5 мМ MgCl₂, 15 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 50 мМ КСl, 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 ("Евроген", Россия; Табл. 1) при следующих условиях: старт - 15 минут 95⁰С, затем 40 циклов, включающих плавление - 30 секунд при 95⁰С, отжиг – 45 секунд (см. Табл. 1), элонгация – 45 секунд при 72⁰С с детекцией флуоресценции в конце каждого шага элонгации.

Таблица 1

Ген	Последовательности праймеров (прямой; обратный)	Температура отжига
□-актин	5'- CTACAATGAGCTGCGTGTGGC -3' 5'- CAGGTCCAGACGCAGGATGGC -3'	68 ⁰ С
BDNF	5'-AGGCACTGGAАСТCGCAATG -3' 5'-AAGGGCCCGAACATACGATT-3'	62 ⁰ С
NGF	5'-TCAGTGTGTGGGTTGGAGAT-3' 5'-AGCCTGTTTGTСGTCTGTTG-3'	62 ⁰ С

Для подтверждения специфичности продуктов амплификации после окончания амплификации образцы охлаждали до 60⁰С и получали кривые плавления нагреванием до 95⁰С со скоростью 0.03⁰С/сек. с непрерывной детекцией флуоресценции. Для получения калибровочных кривых, смесь к ДНК 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 β -актин.

Статистическая оценка результатов.

Результаты обрабатывались с помощью программ Jandel Scientific SigmaPlot. Достоверности различий групповых средних оценивались с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA). На графике представлены средние значения групп с учетом стандартной ошибки среднего ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$).

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 отделах мозга крысы *in vivo*. 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 гиппокампе и коре больших полушарий головного мозга крысы. Показано влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 на экспрессию нейротрофических факторов BDNF (Рисунки 1, 3) и NGF (Рисунки 2, 4) в гиппокампе (Рисунки 1, 2) и коре головного мозга (Рисунки 3, 4) крысы *in vivo* через 1 час после внутрибрюшинного и интраназального введения 10000 ед ЭПО на кг веса крысы.

Концентрация использованных в исследованиях ЭПО (№1 и №2) составляла 0,2 мг/мл в присутствии в несколько десятков раз больших количеств полимерных стабилизаторов реополиглобулина (№1) и сывороточного альбумина человека (№2). Необходимо отметить, что если для внутрибрюшинного введения объем дозы в 100 мкл является приемлемым, то для интраназального введения он превышает оптимальный объем в 20 мкл в несколько раз. Большой объем вводимых интраназально проб приводил к тому, значительная часть препаратов выделялась из носовых отверстий крысы или проглатывалась в желудок. Таким образом, эффективная доза ЭПО при интраназальном введении была значительно ниже, чем при внутрибрюшинном. На рисунках 3 и 4, описывающих экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF в коре *in vivo* через 1 час после препаратов, можно видеть соизмеримые по величине эффекты для внутрибрюшинного и интраназального введения. Можно предположить то, что произойдет значительное увеличение экспрессии нейротрофических факторов BDNF и NGF при уменьшении объема вводимой пробы при интраназальном введении. Так же можно предположить значительное увеличение проникновения ЭПО в мозг крысы при снижении концентрации полимерных стабилизаторов (реополиглобулина или сывороточного альбумина человека) в препаратах.

Представляется целесообразным сравнение наблюдаемой активности препаратов в коре мозга крысы *in vivo* (Рисунки 3, 4) с полученными ранее данными о влиянии препаратов Эритропозтин N1 и Эритропозтин N2 на экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF в культивируемых клетках астроцитов коры больших полушарий мозга крысы *in vitro*. Можно видеть, что препарат Эритропозтин N1 в эксперименте *in vitro* при инкубации в течение 1 часа проявил несколько меньшую активность (Отчет № 07-02, Рисунок 1), в то время как в эксперименте *in vivo* наблюдаемая активность препарата Эритропозтин N1 в коре мозга крысы при внутрибрюшинном введении значительно выше. При интраназальном введении препаратов наблюдаемая активность препарата Эритропозтин N1 в коре мозга крысы значительна, но она несколько снижается относительно препарата Эритропозтин N1, что может быть связано с худшими условиями преодоления им ГЭБ.

Значительный интерес для анализа молекулярных механизмов действия ЭПО и при демиелинизирующих заболеваниях представляют результаты, полученные для гиппокампа крысы *in vivo* (Рисунки 1, 2). Для препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 показано, что в дозе 10000 ед/кг веса происходит статистически достоверная стимуляция экспрессии как BDNF, так и NGF в 2-3 раз как в гиппокампе, так и в коре головного мозга крысы при интраназальном введении. Для гиппокампа, имеющего особое значение при нейродегенеративных заболеваниях, отмечено значительное увеличение экспрессии как BDNF, так и NGF только при интраназальном введении препаратов (Рисунки 1, 2). Для препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 показано, что через 1 час после внутрибрюшинного введения 10000 ед/кг веса в гиппокампе не наблюдается изменения экспрессии как BDNF, так и NGF. Представляется целесообразным проведение исследования влияния препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 на экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF в культивируемых клетках астроцитов гиппокампа мозга крысы *in vitro*. Это позволит вычленивать из суммарного эффекта действия препарата *in vivo* стимулирующую активность при взаимодействии с ЭПО с клетками гиппокампа.

В качестве возможной причины обнаруженных различий в эффектах *in vivo* на гиппокампе и фронтальной коре можно предположить как различия в скорости проникновения препарата в различные отделы при внутрибрюшинном и интраназальном способах введения, так и тканеспецифичность этого органа. В соответствии с этим эффект в гиппокампе при внутрибрюшинном введении может наблюдаться в другое время (позже) или при использовании при внутрибрюшинном введении других (больших) доз ЭПО. Представляется целесообразным анализ дозовой и временной активности препарата Эритропоэтин N1 в гиппокампе *in vivo*.

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 и обладающего способностью стимулировать экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF при интраназальном введении препарата.

Таким образом, делается вывод о перспективности создания фармакологического препарата на основе Эритропоэтина N1, обладающего способностью стимулировать экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF при интраназальном введении. Кроме того, у этого препарата можно предположить наличие антидепрессантной активности, так как известно, что прямая инъекция BDNF в гиппокамп лабораторных животных вызывает антидепрессантный эффект.

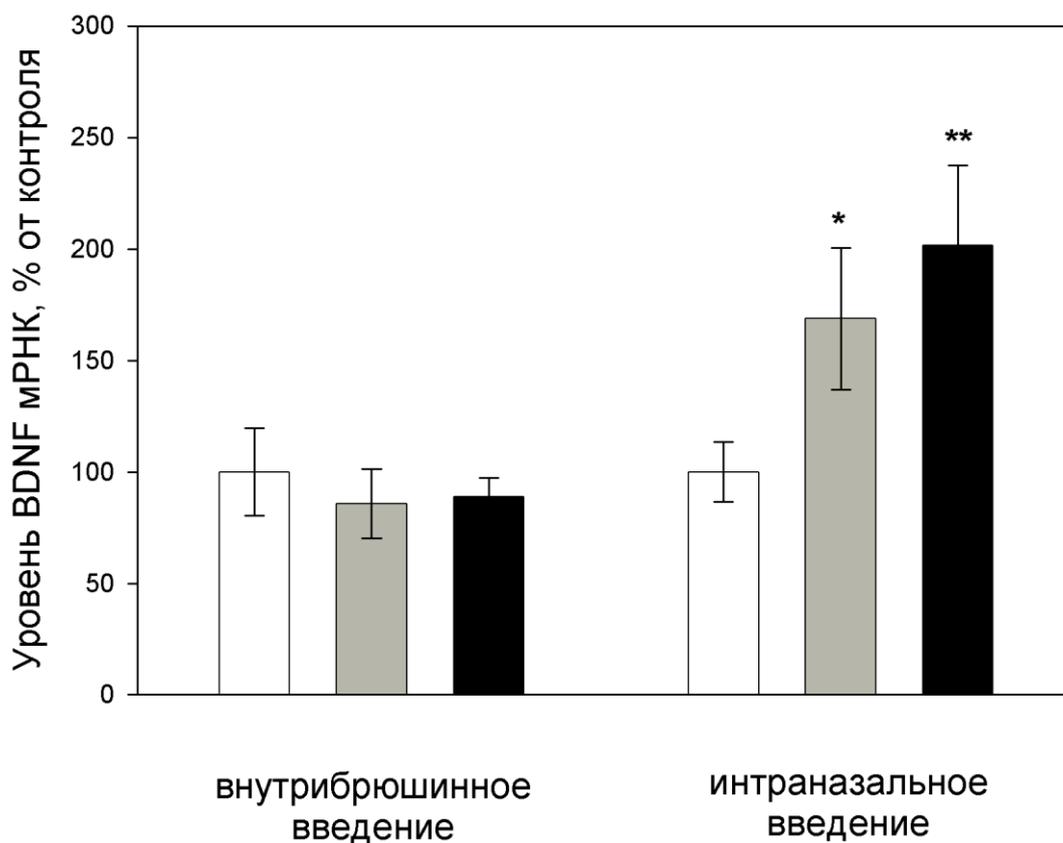


Рисунок 1. Влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 на экспрессию нейротрофического фактора BDNF *in vivo* через 1 час после внутрибрюшинного и интраназального введения 10000 ед/кг веса в гиппокампе крысы. (белый – контроль, серый - Эритропоэтин N1, черный – Эритропоэтин N2; * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$)

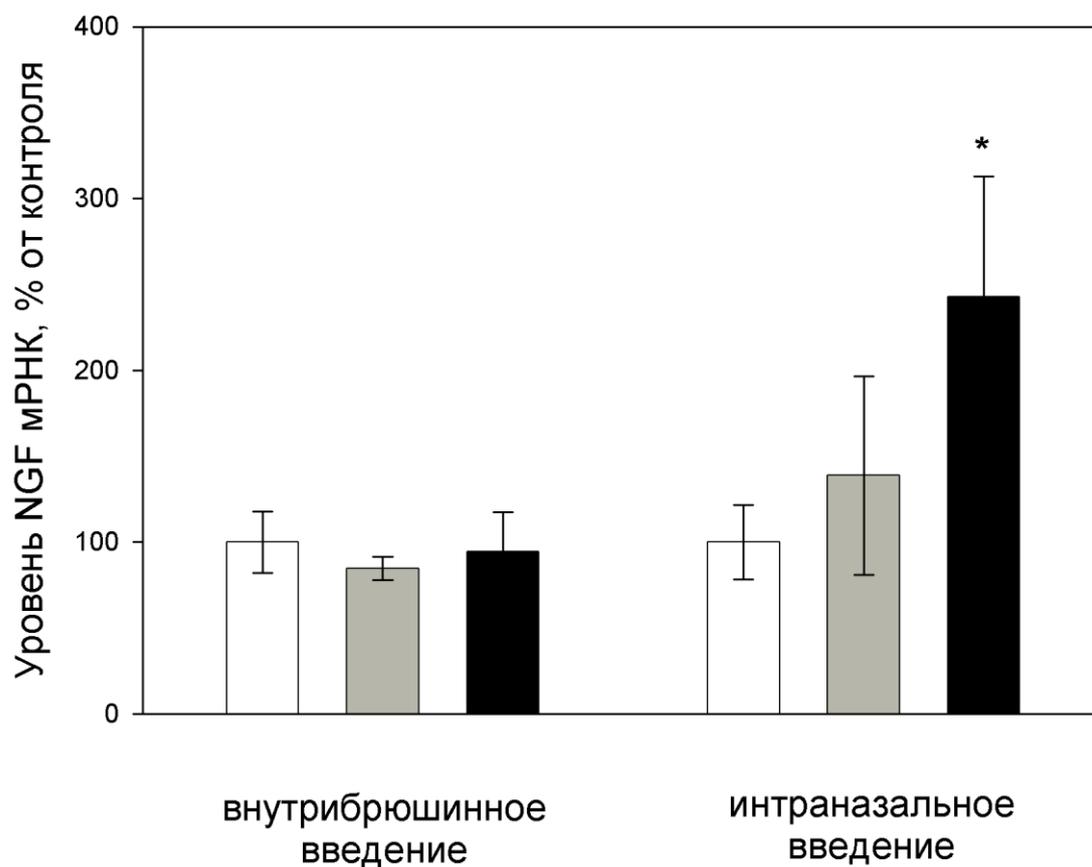


Рисунок 2. Влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 на экспрессию нейротрофического фактора NGF *in vivo* через 1 час после внутрибрюшинного и интраназального введения 10000 ед/кг веса в гиппокампе крысы. (белый – контроль, серый - Эритропоэтин N1, черный –, Эритропоэтин N2; * - $p < 0.05$)

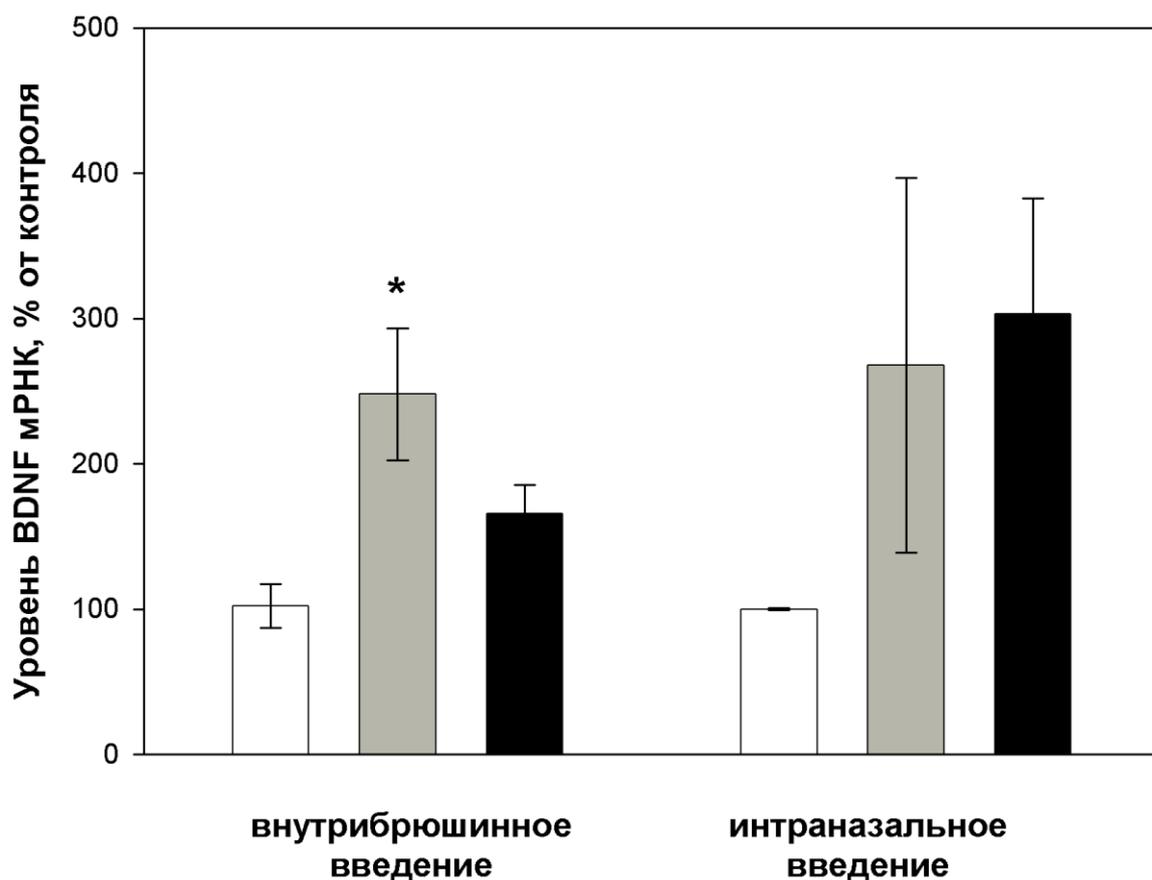


Рисунок 3. Влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 на экспрессию нейротрофического фактора BDNF *in vivo* через 1 час после внутрибрюшинного и интраназального введения 10000 ед/кг веса в коре мозга крысы. (белый – контроль, серый - Эритропоэтин N1, черный –, Эритропоэтин N2; * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$)

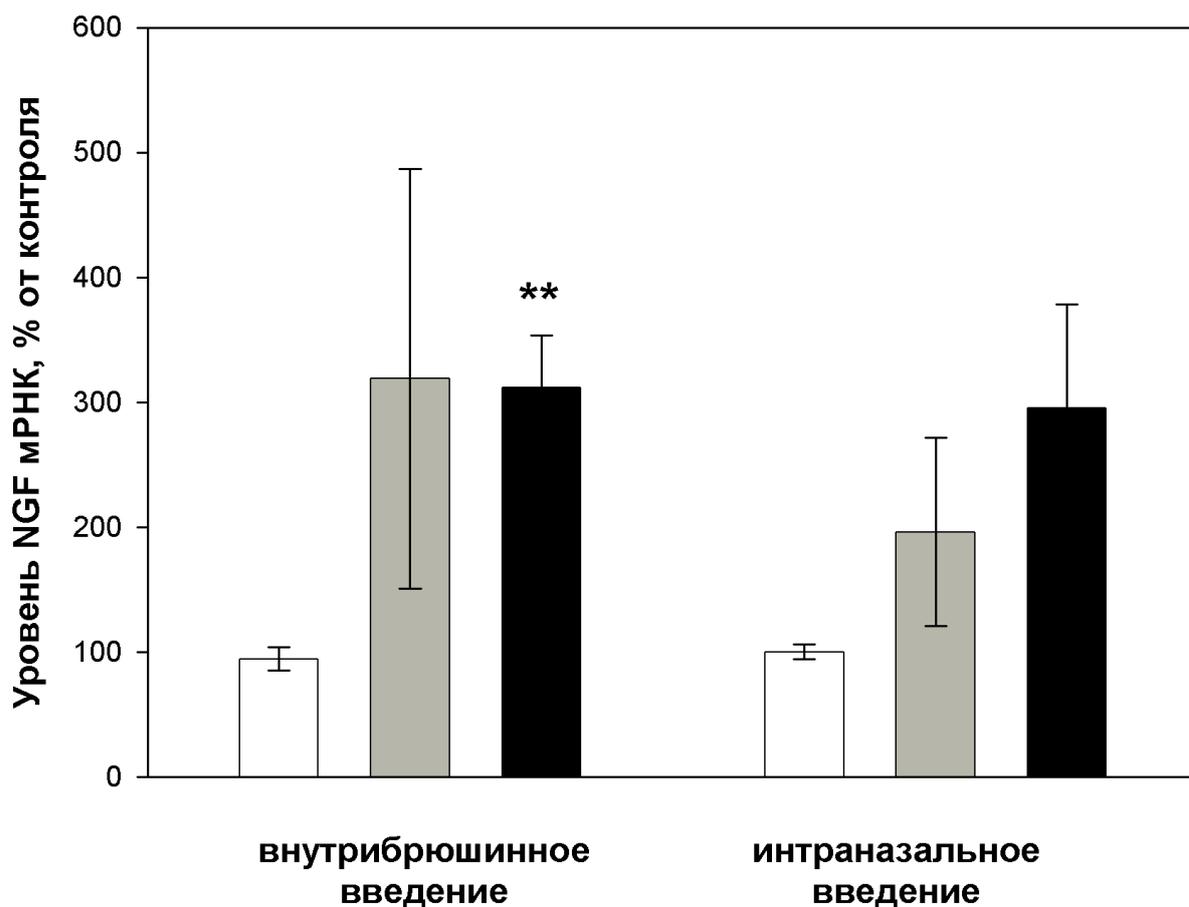


Рисунок 4. Влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 на экспрессию нейротрофического фактора NGF *in vivo* через 1 час после внутрибрюшинного и интраназального введения 10000 ед/кг веса в коре мозга крысы. (белый – контроль, серый - Эритропоэтин N1, черный –, Эритропоэтин N2; * - $p < 0.05$)

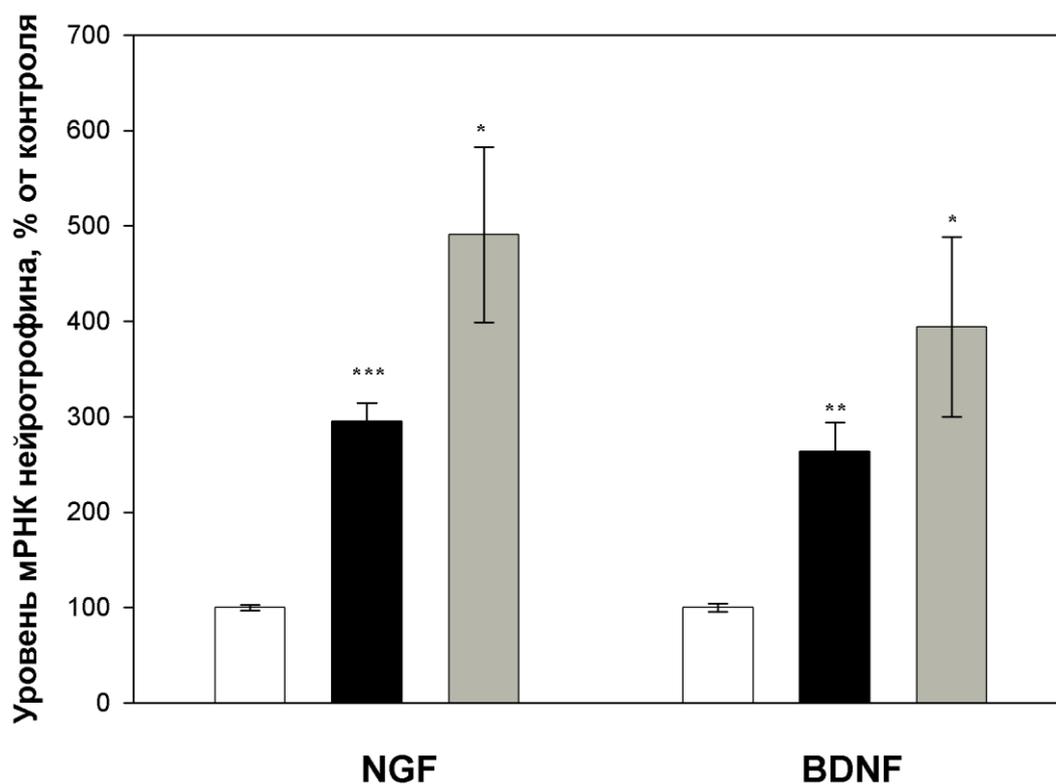


Рисунок 5. Влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 в концентрации 3 нМ на экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF в культивируемых клетках астроцитов коры больших полушарий мозга крысы при инкубации в течение 1 часа. (белый – контроль, черный - Эритропоэтин N1, серый – Эритропоэтин N2; * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$)

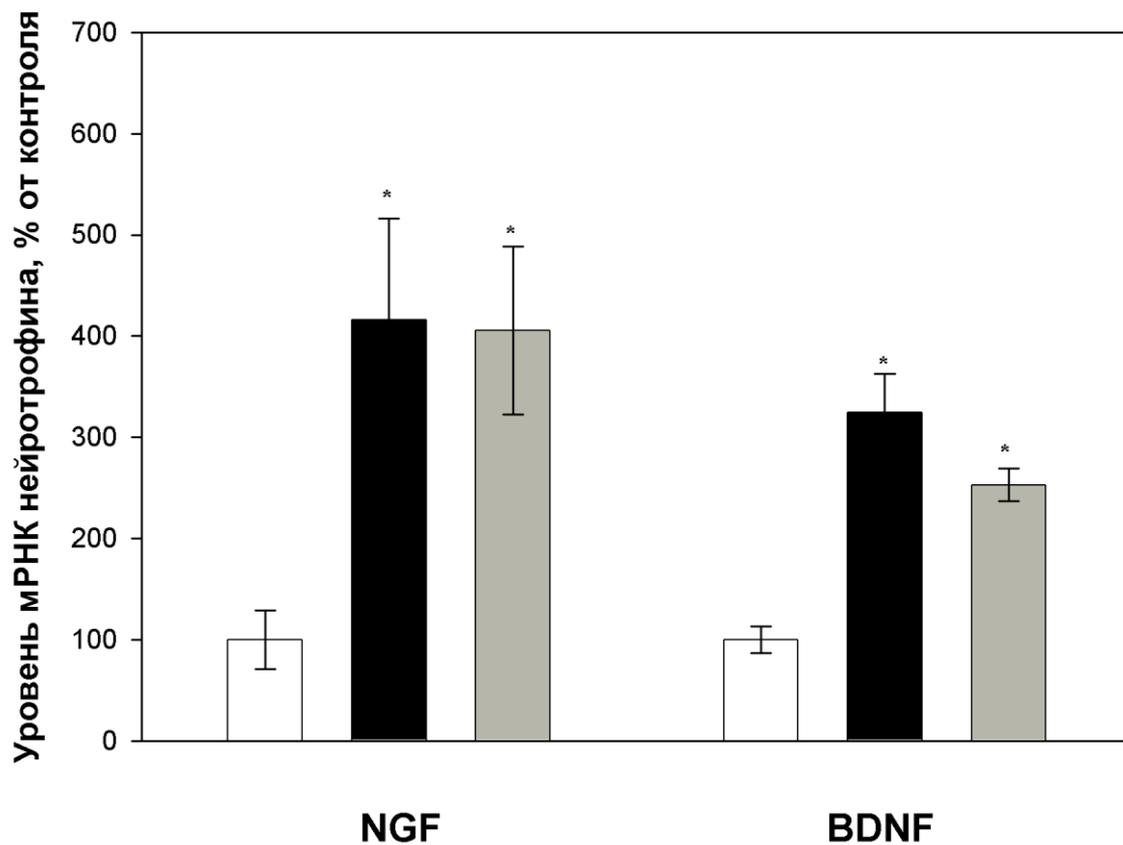


Рисунок 6. Влияние препаратов Эритропоэтин N1 и Эритропоэтин N2 в концентрации 3 нМ на экспрессию нейротрофических факторов BDNF и NGF в культивируемых клетках астроцитов коры больших полушарий мозга крысы при инкубации в течение 4 часов. (белый – контроль, черный - Эритропоэтин N1, серый –, Эритропоэтин N2; * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$)

Генеральный
директор



Дудкин С. М.