

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-5-10-13

## ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ КАРБАМИЛИРОВАННОГО ДАРБЭПОЭТИНА НА ЧЕТЫРЕХСОСУДИСТОЙ МОДЕЛИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

А. В. Тверской<sup>1</sup>, О. В. Щеплыкина<sup>1</sup>, П. Д. Колесниченко<sup>1</sup>, Д. В. Щеплыкин<sup>1</sup>,  
А. В. Нестеров<sup>1</sup>, Н. И. Нестерова<sup>1</sup>, К. М. Резников<sup>2</sup>, М. В. Покровский<sup>1</sup>

Исследовано церебропротекторное действие карбамилированного дарбэпоэтина и дарбэпоэтина альфа. Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар с использованием модели четырехсосудистой ишемии-реперфузии головного мозга. Установлено, что предварительное трехкратное внутрибрюшинное введение карбамилированного дарбэпоэтина (100 мкг/кг) с интервалом в 3 дня оказывает выраженный прекодиционирующий церебропротекторный эффект, что проявляется меньшим неврологическим дефицитом и большей активностью животных, получающих препарат перед моделированием четырехсосудистой ишемии, а также сохранностью нейрональных слоев гиппокампа и коры большого мозга при морфологическом исследовании.

**Ключевые слова:** церебральная ишемия; карбамилированный дарбэпоэтин; дарбэпоэтин альфа; модель глобальной четырехсосудистой ишемии-реперфузии.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что гипоксия является одной из наиболее распространенных причин гибели и повреждения клеток. С этим связано наличие в организме консервативных механизмов регуляции кислородного гомеостаза и гомеокинеза. Одна из этих систем, связанная с каскадом гипоксией-индуцируемого фактора, приводит к синтезу эритропоэтина (ЭПО) [13]. Данная молекула наиболее известна как положительный регулятор эритропоэза, который вырабатывается преимущественно в почках в ответ на снижение парциального давления кислорода. Однако спектр физиологических эффектов ЭПО широк и позволяет рассматривать его как вещество с универсальной цитопротекторной направленностью. Запускаемые ими каскады приводят к повышению устойчивости клеток к повреждению [10]. При ишемических поражениях разных органов ЭПО обуславливает ангиогенное, антиоксидантное, противовоспалительное и антиапоптотическое действие [15], что приводит к снижению площади повреждения. Реализация клеточных эффектов ЭПО происходит при связывании его с 2 рецепторами, в результате чего из них образуется гомодимер. Последнее влечёт активацию многих внутриклеточных факторов, среди которых главную роль в цитопротекции отводят Akt, который инактивирует каспазы, приводящие к повреждению митохондрий, нарушению клеточного гомеостаза и инициации апоптоза [11]. В то же время, ввиду активации большого количества вторичных посредников,

ЭПО способен инициировать развитие таких негативных эффектов, как увеличение продукции эндотелина, повышение концентрации тканевого ренина, изменение баланса простагландинов сосудистой ткани, стимуляция ангиогенеза и пролиферация клеток гладких мышц сосудов [6]. Карбамилированный дарбэпоэтин отличается от препаратов на основе эритропоэтина, сочетая в себе лучшие свойства препаратов предыдущих поколений [4].

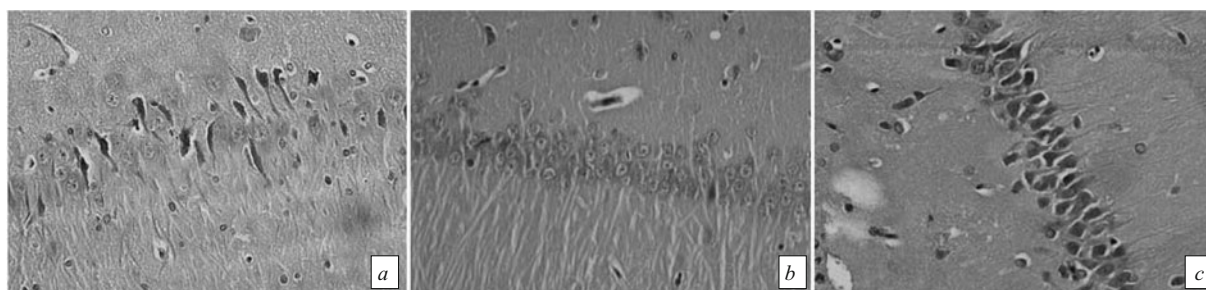
Целью исследования было изучение церебропротекторного действия карбамилированного дарбэпоэтина и дарбэпоэтина альфа на четырехсосудистой модели ишемии-реперфузии головного мозга крыс.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

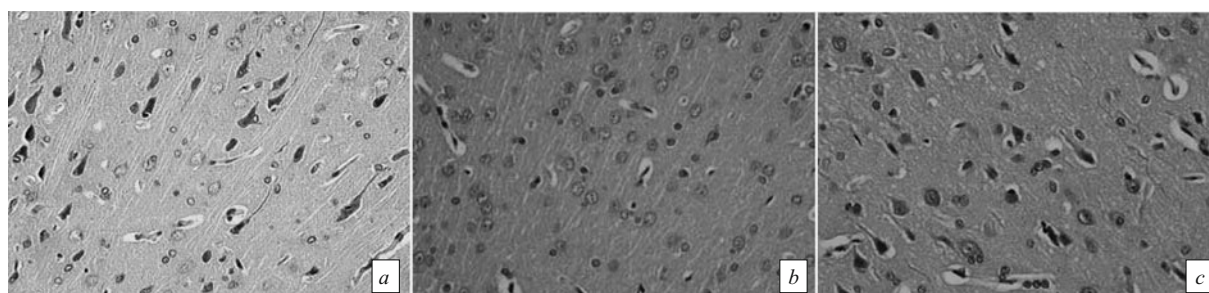
Эксперименты выполнены на 50 крысах линии Вистар, которые были разделены на 5 групп: первая — интактные животные; вторая — ложнооперированные; третья — крысы с четырехминутной четырехсосудистой моделью ишемии головного мозга без предварительного введения дарбэпоэтина; четвертая — крысы с предварительным трехкратным внутрибрюшинным введением карбамилированного дарбэпоэтина (ООО “Фармстандарт”, Россия) в дозе 100 мкг/кг с интервалом в 3 дня; пятая — крысы с предварительным трехкратным внутрибрюшинным введением дарбэпоэтина альфа (ООО “Фармстандарт”, Россия) в дозе 100 мкг/кг с интервалом в 3 дня. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. “Об утверждении правил лабораторной практики” (GLP) с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.). Крыс нарколо-

<sup>1</sup> ФГАОУ ВПО “Белгородский государственный национальный исследовательский университет”, Россия, 308015, Белгород, ул. Победы, 85, sheolvi31@gmail.com

<sup>2</sup> ФГБУ ВО “Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко”, Россия, 394036, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.



**Рис. 1.** Нейрональная дегенерация области CA1 гиппокампа без введения препаратов (a), после введения карбамилированного дарбэпозтина (b), дарбэпозтина альфа (c). Гематоксилин и эозин. a, b, c  $\times 400$ .



**Рис. 2.** Нейрональная дегенерация коры большого мозга без предварительного введения дарбэпозтина (a), после введения карбамилированного дарбэпозтина (b), после введения дарбэпозтина альфа (c). Гематоксилин и эозин. a, b, c  $\times 400$ .

тизировали золилитом в дозе 60 мг/кг и хлоралгидратом внутривенно в дозе 150 мг/кг. Для создания патологии была использована модель экспериментальной четырехсосудистой ишемии-реперфузии головного мозга крыс Mitsuo Yamaguchi et al. [14] под контролем ЭЭГ [2]. Электроэнцефалографию выполняли при помощи электроэнцефалографа MP150 EEG100C.

На 1 и 3 сут после эксперимента оценивали неврологический статус животных [1] по балльной шкале инсульта McGraw в модификации И. В. Ганнушкиной, а также посредством инфракрасного монитора активности. Для оценки ориентировочно-исследовательского поведения использовали установку фирмы Panlab Harvard Apparatus LE 8825.

Животных выводили из эксперимента через 24 и 72 ч после начала исследования. Для морфологического изучения забирали головной мозг, фиксировали его в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 24 – 48 ч. После этого препарат подвергали стандартной проводке на аппарате Leica TP 1020, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 – 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином, а также толуидиновым синим в модификации Ниссля с использованием стандартных протоколов и методик на аппаратах Leica EG 1150 H, Leica RM 2245, Leica autostainer XL.

Иммуногистохимические реакции проводили с антителами GFAP (клон EP672Y, CellMarque), NSE (клон MRQ55, CellMarque), p53 (клон DO7, CellMarque), Ki

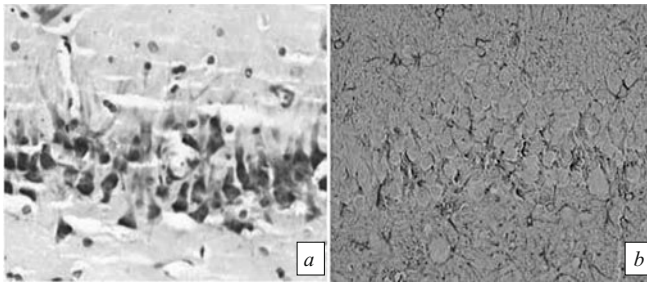
**Влияние карбамилированного дарбэпозтина и дарбэпозтина альфа на поведенческую активность крыс в тесте открытого поля (IRAC-TTRACK, Panlab, Испания) при моделировании тотальной 4-минутной четырёхсосудистой ишемии-реперфузии головного мозга (n = 10)**

Экспериментальная группа	Критерий						
	общая активность	стереотипы движений	локомоторная активность	максимальная скорость	минимальная скорость	средняя скорость	дистанция
Интактные*	1453 $\pm$ 149	105 $\pm$ 5	1110 $\pm$ 40	103 $\pm$ 4	6 $\pm$ 0,2	6 $\pm$ 1,2	1853 $\pm$ 83
Ложнооперированные <sup>#</sup>	965 $\pm$ 47*	43 $\pm$ 5*	816 $\pm$ 30*	98 $\pm$ 3	5 $\pm$ 0,7	4 $\pm$ 2	1781 $\pm$ 67*
Без лечения <sup>^</sup>	591 $\pm$ 65* <sup>#</sup>	32 $\pm$ 8,5*	501 $\pm$ 37* <sup>#</sup>	32 $\pm$ 6* <sup>#</sup>	1 $\pm$ 0,3* <sup>#</sup>	1 $\pm$ 0,2* <sup>#</sup>	812 $\pm$ 32* <sup>#</sup>
Карбамилированный дарбэпозтин	850 $\pm$ 13* <sup>^</sup>	39 $\pm$ 7,3*	759 $\pm$ 61* <sup>^</sup>	66 $\pm$ 3* <sup>#^</sup>	1 $\pm$ 0,3* <sup>#</sup>	3 $\pm$ 0,2* <sup>^</sup>	1623 $\pm$ 94 <sup>^</sup>
Дарбэпозтин альфа	700 $\pm$ 42* <sup>^</sup>	35 $\pm$ 6,1*	634 $\pm$ 72* <sup>^</sup>	58 $\pm$ 2* <sup>#^</sup>	1 $\pm$ 0,1* <sup>#</sup>	2 $\pm$ 0,8* <sup>^</sup>	1231 $\pm$ 88 <sup>^</sup>

\*  $p < 0,05$  при сравнении с группой интактных животных;

<sup>#</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с группой ложнооперированных животных;

<sup>^</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с группой без лечения.



**Рис. 3.** Нейрональная дегенерация области CA1 гиппокампа без предварительного введения дарбэпоэтина (реакция Nissle) (а) и GFAP-положительная реакция в 3 группе (b); а, b  $\times 400$ .

67 (клон NE14, Biogenex). Использован стрептавидин-биотиновый метод (LSAB Kit), в качестве хромогена — диаминобензидин. Демаскировку антигенов производили нагреванием в цитратном буфере (pH = 6,0) в течение 40 мин при температуре 93 – 95 °С. Фотопротоколирование выполняли на сканере Mirax Desk (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия), микроскопе Nikon Eclipse Ni при программном обеспечении Nis-Elements BR 4.60.00. Статистические вычисления проводили при помощи Statistica 10.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В группах интактных и ложнопериоперированных животных неврологическая симптоматика отсутствовала (0 баллов по шкале оценки инсульта McGraw). При гистологическом исследовании головного мозга особенностей в строении нейронов областей CA1–CA3 гиппокампа, зубчатой извилины, коры лобной и теменной долей не выявлено.

У крыс без предварительного введения дарбэпоэтина после 4-минутной тотальной ишемии наблюдали выраженные неврологические нарушения (5 – 7 баллов), которые практически полностью исчезали к концу первых суток (1,5 – 3 балла). Они проявлялись парезами, параличами, вялостью, замедлением движений. К концу 3 сут симптомы поражения нервной системы отсутствовали (0 – 0,5 балла).

При микроскопическом исследовании головного мозга крыс этой группы обнаружен выраженный периваскулярный и перичеселлюлярный отек, полнокровие мелких сосудов и капилляров вещества мозга, а также сосудистых сплетений. У нейронов зубчатой извилины, в областях CA1 – CA3 гиппокампа выявлены резко выраженные дегенеративные изменения большинства нейронов, характеризующиеся субтотальной дезорганизацией их слоев, частичным клеточным опустошением (рис. 1, а, 2, а).

Изменения ядер нейронов фиксировали в виде набухания, нечеткости контуров, кариопикноза и кариорексиса. Выявлялись также полиморфные изменения хроматофильного вещества в виде очагового хроматолиза, глыбчатой конденсации, нечеткости структуры апикальных дендритов пирамидных нейронов коры большого мозга (рис. 3, а). Эти изменения были хорошо заметны как при окраске гематоксилином и эози-

ном, так и при использовании толуидинового синего по методике Ниссля [3]. В одном случае зафиксирован паравентрикулярный очаг глиоза.

При иммуногистохимическом исследовании у группы животных без предварительного введения дарбэпоэтина в областях мозга с наибольшей чувствительностью к гипоксии и ярко выраженными изменениями при обзорной окраске выявлено отсутствие экспрессии с антителами к NSE и р53. При этом реакция с антителами к GFAP положительная, с незначительным уменьшением количества глиальных клеток и их отростков (рис. 3, в).

В группе крыс с предварительным введением карбамиллированного дарбэпоэтина проявилось нейропротекторное действие препарата, что выражалось наличием меньшего неврологического дефицита к концу первых суток (0,5 – 2 балла), а при морфологическом исследовании — сохранностью нейрональных слоев гиппокампа и коры большого мозга, единичных нейронов с явными признаками ишемического повреждения и дегенерации. Однако эти изменения наблюдались на фоне периваскулярного и перичеселлюлярного отека, полнокровия мелких сосудов и капилляров вещества мозга и его сосудистых сплетений (рис. 1, б, 2, б).

В группе крыс с предварительным введением дарбэпоэтина альфа выявлено нейропротекторное действие препарата, однако менее выраженное по сравнению с введением карбамиллированного дарбэпоэтина. Неврологический дефицит у крыс этой группы был менее выраженным по сравнению с группой без лечения (1,5 – 3 балла). При морфологическом исследовании на фоне сохранности нейрональных слоев гиппокампа и коры отмечались множественные нейроны с признаками кариопикноза и кариорексиса, были ярко выражены периваскулярный и перичеселлюлярный отеки, полнокровие сосудов (рис. 1, с, 2, с).

При оценке двигательной активности животных в тесте актиметрии IR Actimetr установлено, что крысы получавшие карбамиллированный дарбэпоэтин, обладали большей активностью ( $p < 0,05$ ). Более детально нарушения поведенческой активности представлены в таблице.

Лекарственная терапия при ишемическом инсульте проводится по 2 направлениям: реперфузия и нейропротекция.

Гибель клеток в области “ишемической полутени” происходит по механизмам некроза и апоптоза (часть клеток гибнет в результате программируемой клеточной смерти в условиях гипоксии — апоптоза, другие — вследствие некроза — смерти клеток из-за их повреждения), что приводит к увеличению размеров очага инфаркта. Однако эти клетки в течение определенного времени могут сохранять жизнеспособность и выполнять свои функции, их гибель можно предотвратить [7].

Гликопротеидный гормон — эритропоэтин, продуцируемый первично клетками капилляров почечных клубочков, получил известность как гормон гемопо-



эза, однако его биологическая роль этим не ограничивается. Физиологические некроветворные функции ЭПО обусловлены его влиянием на центральную нервную систему. Рецепторы ЭПО экспрессируются на поверхности нейронов [12]. При различных повреждениях ЦНС наблюдается синтез астроцитами ЭПО, который оказывает нейропротекторное действие [5], ингибируя апоптоз, стимулируя пролиферацию нейронов и ангиогенез.

Механизм действия ЭПО хорошо изучен [9]. При связывании молекулы ЭПО с рецептором EpoR запускается каскад реакций фосфорилирования ключевых белков, таких как Ras-митогенактивирующая протеинкиназа, янусовая тирозинкиназа-2 и др. (набор протеинкиназ может изменяться в зависимости от типа ткани), которые, в свою очередь, активируют экспрессию генов семейства bcl-xL и синтез антиапоптотических белков, подавляющих апоптотическую гибель клеток.

Природным стимулом, активирующим продукцию ЭПО как в кроветворных, так и некроветворных тканях, является кислородная недостаточность. Таким образом, ЭПО способствует сохранению жизнеспособности клеток в условиях недостатка кислорода. Именно недостаток кислорода является причиной гибели нейронов при ишемических инсультах.

Кроветворная активность ЭПО вызывает побочный эффект — повышение артериального давления и риск образования тромбов, что в случае ишемического инсульта категорически противопоказано, даже если ЭПО применялся в течение короткого периода.

Карбамилированный дарбэпоэтин, гипергликозилированный вариант рекомбинантного эритропоэтина человека, являясь столь же эффективным цитопротектором, обладает втрое большим периодом полураспада. Благодаря карбамилированию первичных аминов белка и аминокислотных остатков лизина белка в N-концевой области, не затрагивая профиль гликозилирования целой молекулы, карбамилированный дарбэпоэтин не взаимодействует с “классическим” ЭПО рецептором (не стимулирует пролиферацию клеток линии TF1), но сохраняет цитопротекторные свойства [8].

Таким образом, карбамилированный дарбэпоэтин может быть перспективен при применении *in vivo* в качестве цитопротекторного лекарственного средства

при заболеваниях ЦНС, приводящих к гибели клеток, вызванной гипоксией.

## ВЫВОДЫ

1. Карбамилированный дарбэпоэтин обладает выраженным нейропротекторным свойством, не стимулируя при этом пролиферацию клеток линии TF1.

2. Карбамилированный дарбэпоэтин не оказывает прекодиционирующего действия на микроциркуляторное русло.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. В. Ганнушкина, *Вестник Рос. акад. мед. наук*, **9**, 22 – 27 (2000).
2. О. В. Мясничева, М. В. Покровский, В. В. Гуреев и др., *Науч. вестн. НИУ “БелГУ”, сер. Медицина. Фармация*, № 11 (26/1), 123 – 126 (2014).
3. А. В. Тверской, А. А. Должиков, И. И. Бобынцев и др., *Курский научно-практ. вестник “Человек и его здоровье”*, № 3, 37 – 41 (2014).
4. D. H. Catlin, A. Breidbach, S. Elliott, and J. Glaspy, *Clin. Chem.*, **48**, 2057 – 2059 (2002).
5. M. Celik, N. Gokmen, S. Erbayraktar, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(4), 2258 – 2263 (2002).
6. J. W. Fisher, *Experim. Biol. Med. (Maywood)*, **228**(1), 1 – 14 (2003).
7. P. A. Lapchak, *Expert Opin Investig Drugs*, **19**, 1179 – 1186 (2010).
8. M. Leist, P. Ghezzi, G. Grasso, et al., *Science*, **305**, 239 – 242 (2004).
9. S. A. Middleton, F. P. Barbone, D. L. Johnson, et al., *J. Biol. Chem.*, **274**, 14163 – 14169 (1999); DOI: 10.1074/jbc.274.20.14163.
10. K. M. Reznikov, N. S. Gorbunova, P. D. Kolesnichenko, et al., *Res. Result: Pharmacol. Clin. Pharmacol.*, **3**(1), 125 – 136 (2017).
11. K. Rusai, A. Prokai, B. Szebeni, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1173 – 1181 (2010).
12. F. Sanchis-Gomar, C. Perez-Quilis, and G. Lippi, *Mol. Med.*, **19**, 62 – 64 (2013).
13. C. Stockmann and J. Fandrey, *Clin. Experim. Pharmacol. Physiol.*, **33**, 968 – 979 (2006).
14. M. Yamaguchi, J. W. Calvert, G. Kusaka, and J. H. Zhang, *Stroke*, № 36, 2212 – 2214 (2005).
15. L. Zhu, X. Bai, S. Wang, et al., *Neonatology*, **106**, 143 – 148 (2014); DOI: 10.1159/000362262.

Поступила 29.03.19

## CEREBROPROTECTIVE EFFECTS OF CARBAMYLATED DARBEPOETIN IN FOUR-VESSEL ISCHEMIA-REPERFUSION MODEL OF THE RAT BRAIN

A. V. Tverskoi<sup>1</sup>, O. V. Shcheblykina<sup>1</sup>, P. D. Kolesnichenko<sup>1</sup>, D. V. Shcheblykin<sup>1</sup>,  
A. V. Nesterov<sup>1</sup>, N. I. Nesterova<sup>1</sup>, K. M. Reznikov<sup>2</sup>, and M. V. Pokrovskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Belgorod State National Research University, ul. Pobedy 85, Belgorod, 308015 Russia

<sup>2</sup> N. N. Burdenko Voronezh State Medical University, ul. Studencheskaya 10, Voronezh, 394036 Russia

\* e-mail: sheolvi31@gmail.com

The cerebroprotective effects of carbamylated darbepoetin and darbepoetin alfa were investigated. The experiments were performed on male Wistar rats using a model of four-vessel ischemia-reperfusion of the brain. It is established that preliminary triple intraperitoneal administration of carbamylated darbepoetin at a dose of 100 mg/kg every 3 days has a pronounced preconditional cerebroprotective effect, which is manifested by lower neurological deficit and higher activity of animals receiving the drugs before modeling ischemia, as well as by better preservation of the neuronal layers of hippocampus and cerebral cortex as revealed by morphological examination.

**Keywords:** cerebral ischemia; carbamylated darbepoetin; darbepoetin alfa; global four-vessel ischemia-reperfusion model