

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

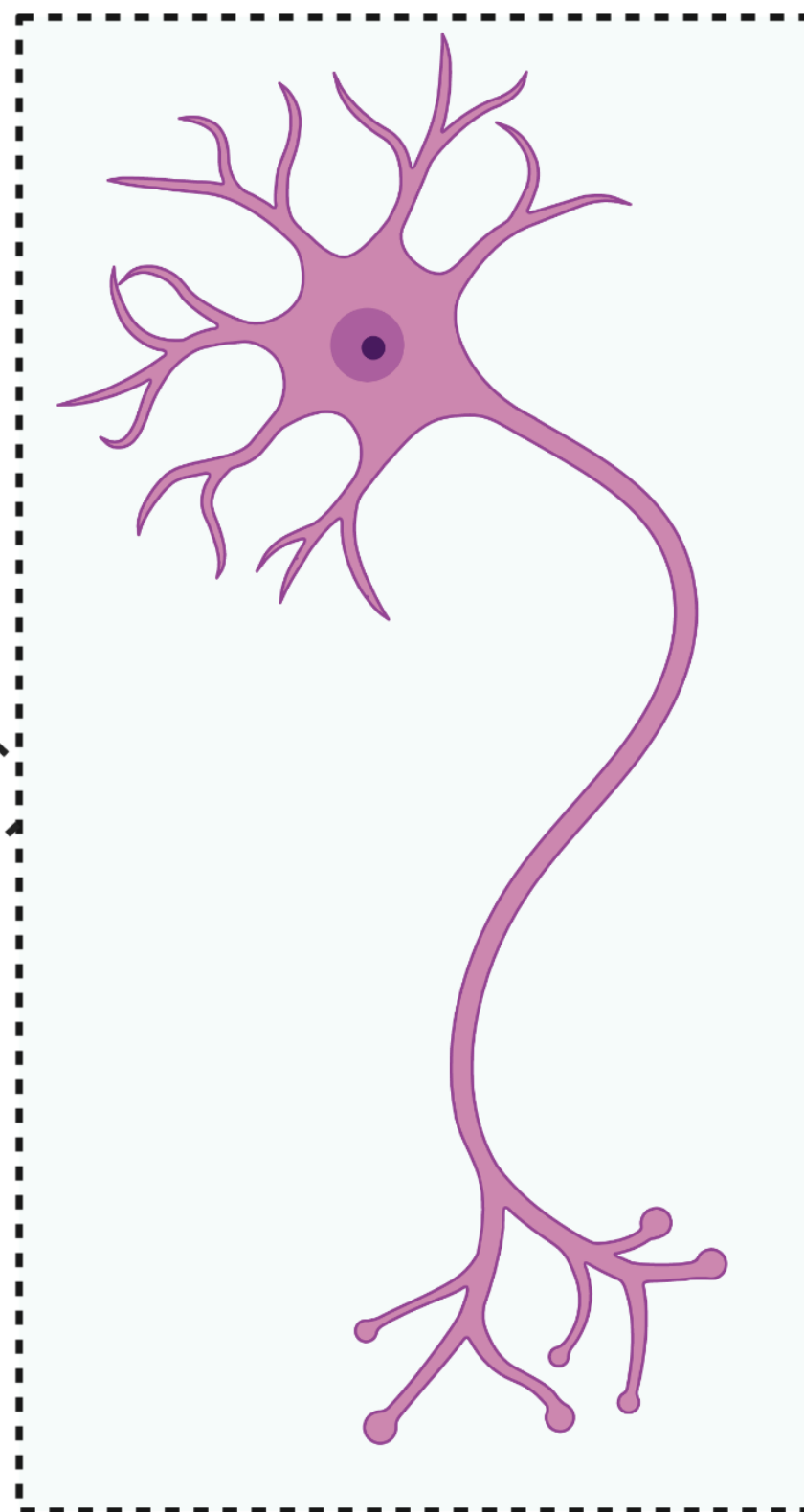
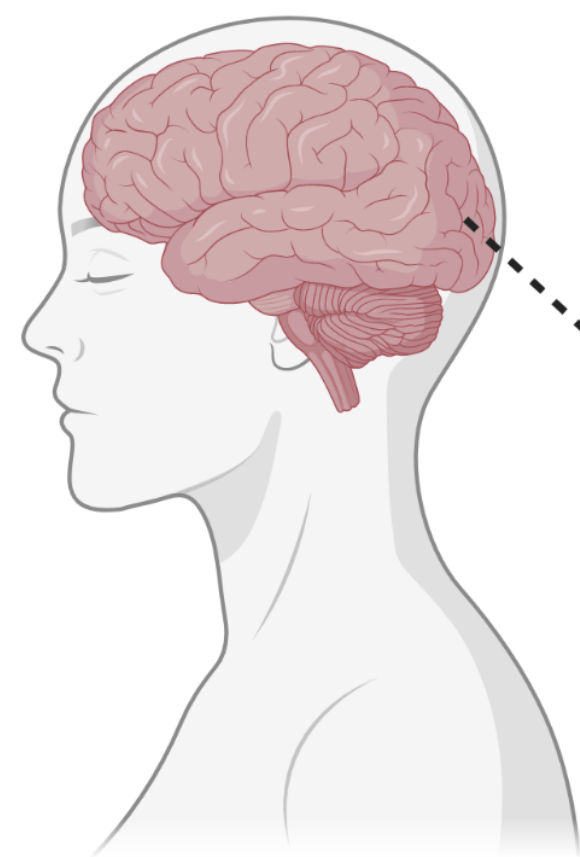
**ОЦЕНКА НЕЙРО- И РЕТИНОПРОТЕКТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ  
ПЕПТИДНОГО АГОНИСТА ГЕТЕРОДИМЕРНОГО  
РЕЦЕПТОРА ЭРИТРОПОЭТИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ  
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ**

*Солдатов В.О.*

**- Санкт-Петербург – 2023 -**

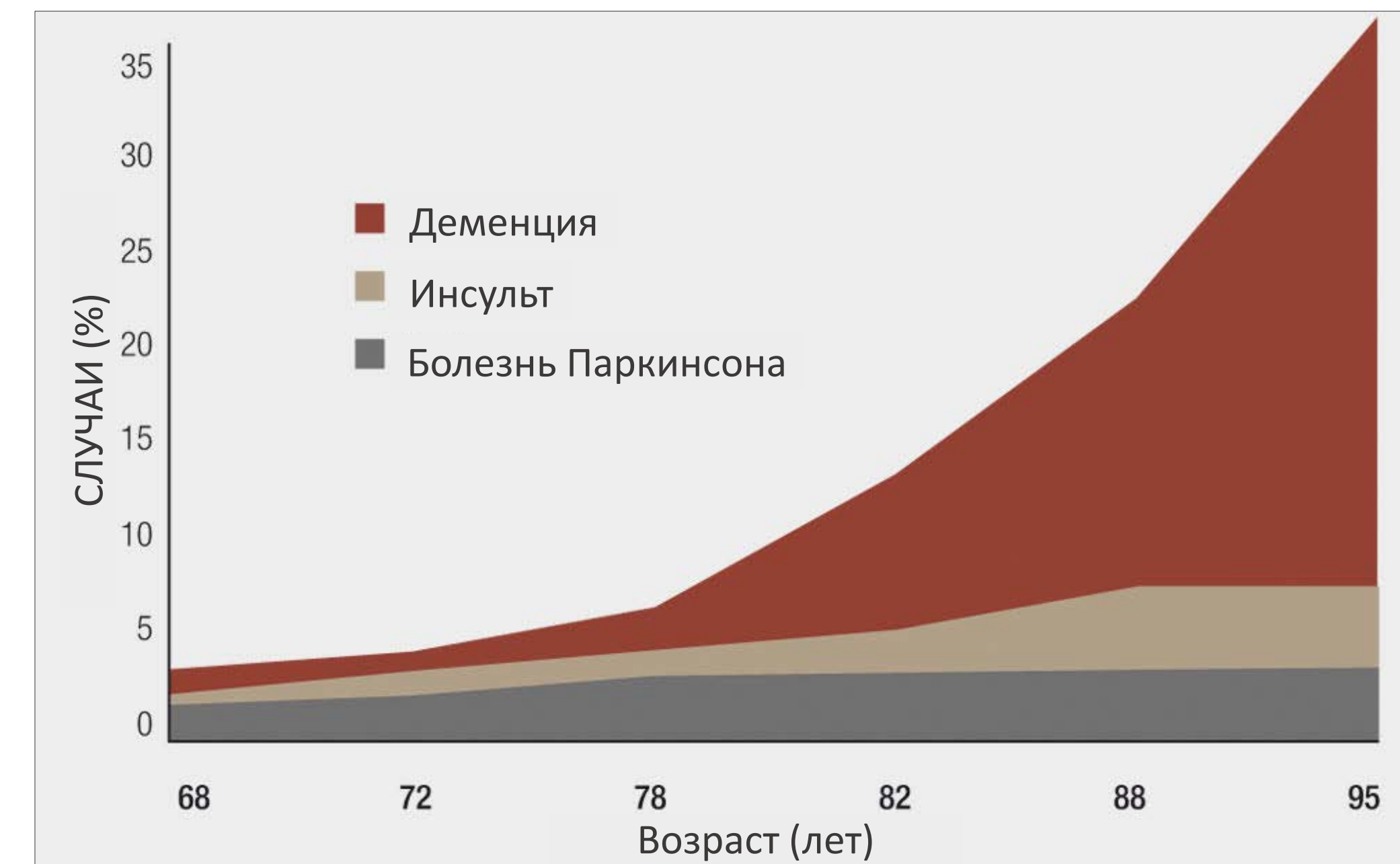
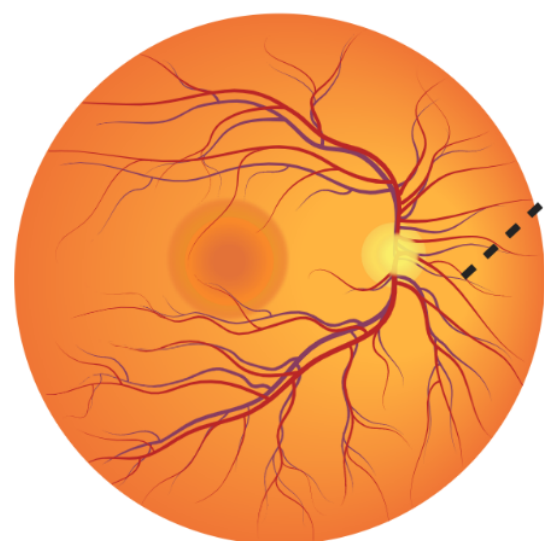
# Введение

- Болезнь Паркинсона
- Болезнь Альцгеймера
- Болезнь Хантингтона
- БАС
- и др.



- Воспалительная активация
- Оксидативный стресс
- **Белковые агрегаты**
- Дисфункция митохондрий
- Нейромедиаторный сдвиг

Глаукома

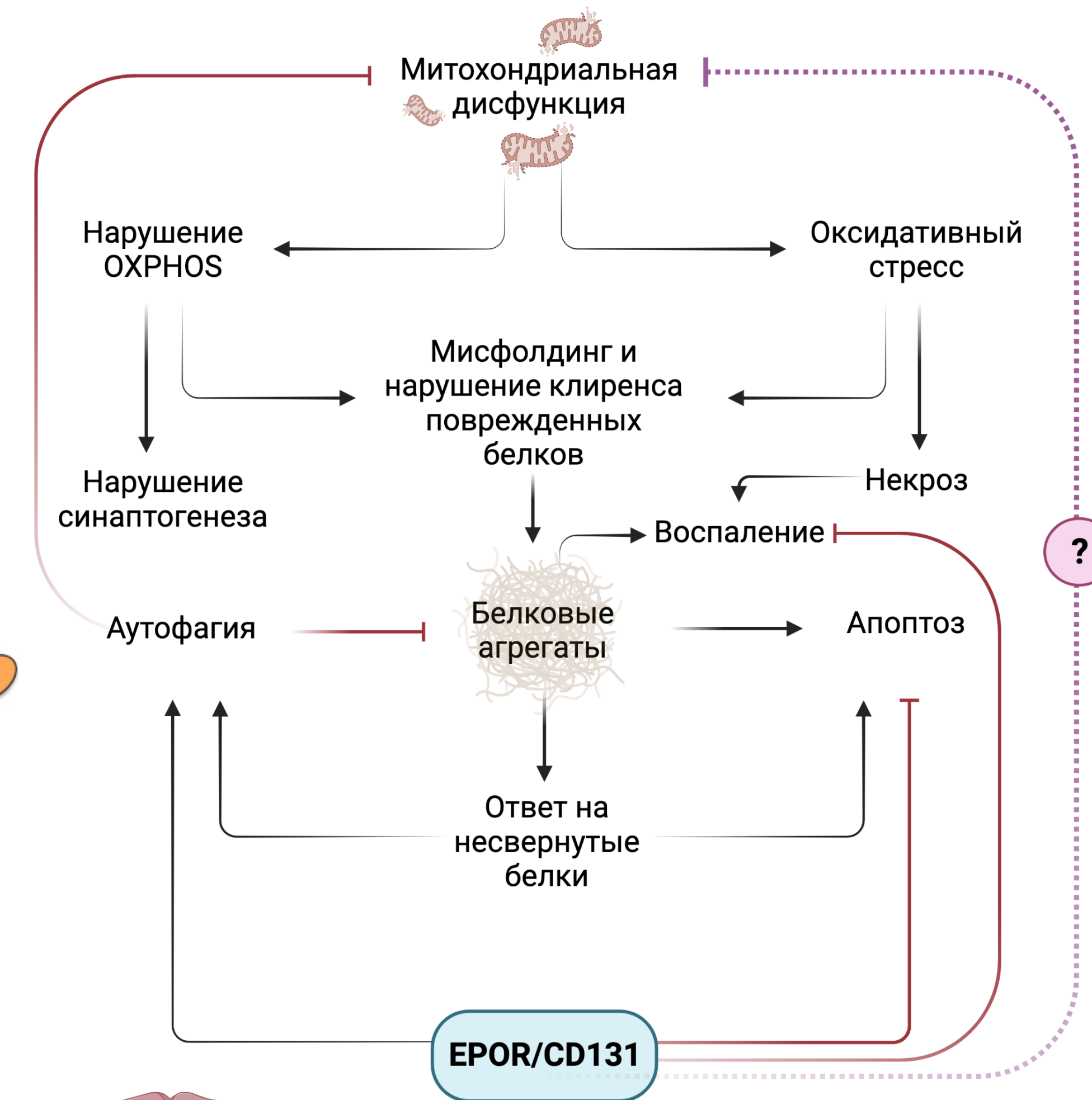
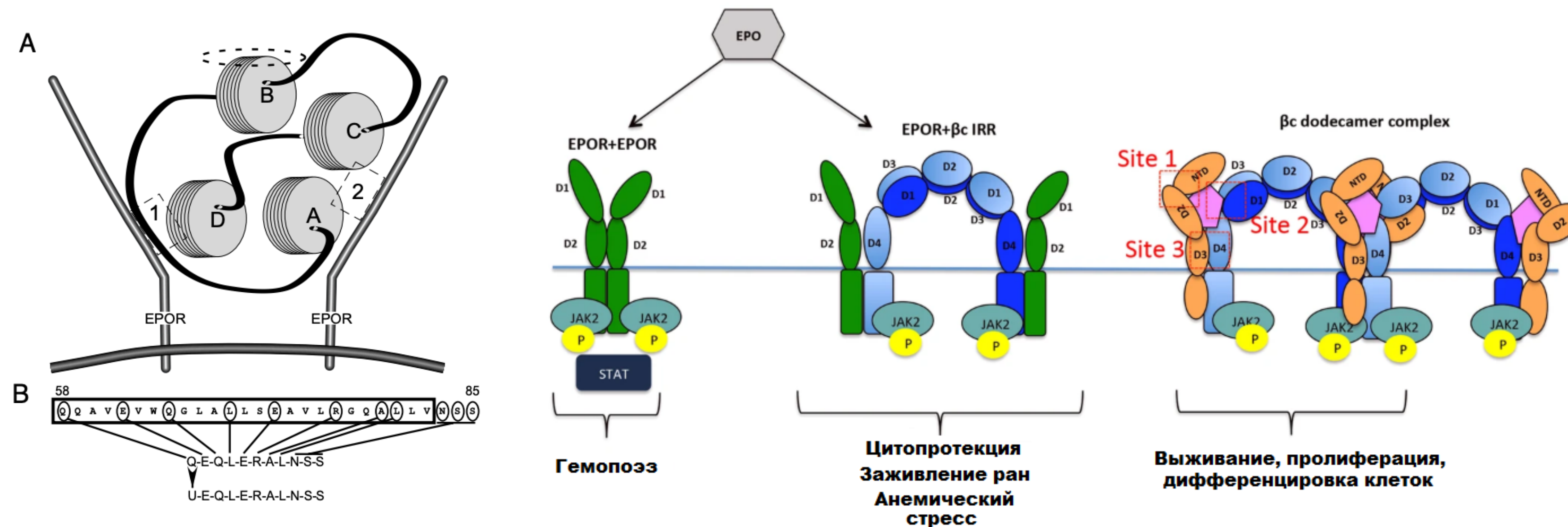


# Мотивация исследования

## Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common $\beta$ -subunit heteroreceptor

Michael Brines<sup>\*\*\*</sup>, Giovanni Grasso<sup>5†</sup>, Fabio Fiordaliso<sup>†</sup>, Alessandra Sfacteria<sup>5</sup>, Pietro Ghezzi<sup>\*†</sup>, Maddalena Fratelli<sup>†</sup>, Roberto Latini<sup>†</sup>, Qiao-wen Xie<sup>\*†</sup>, John Smart<sup>\*\*</sup>, Chiao-ju Su-Rick<sup>\*†</sup>, Eileen Pobre<sup>\*†</sup>, Deborah Diaz<sup>\*†</sup>, Daniel Gomez<sup>\*†</sup>, Carla Hand<sup>\*†</sup>, Thomas Coleman<sup>\*†</sup>, and Anthony Cerami<sup>\*†</sup>

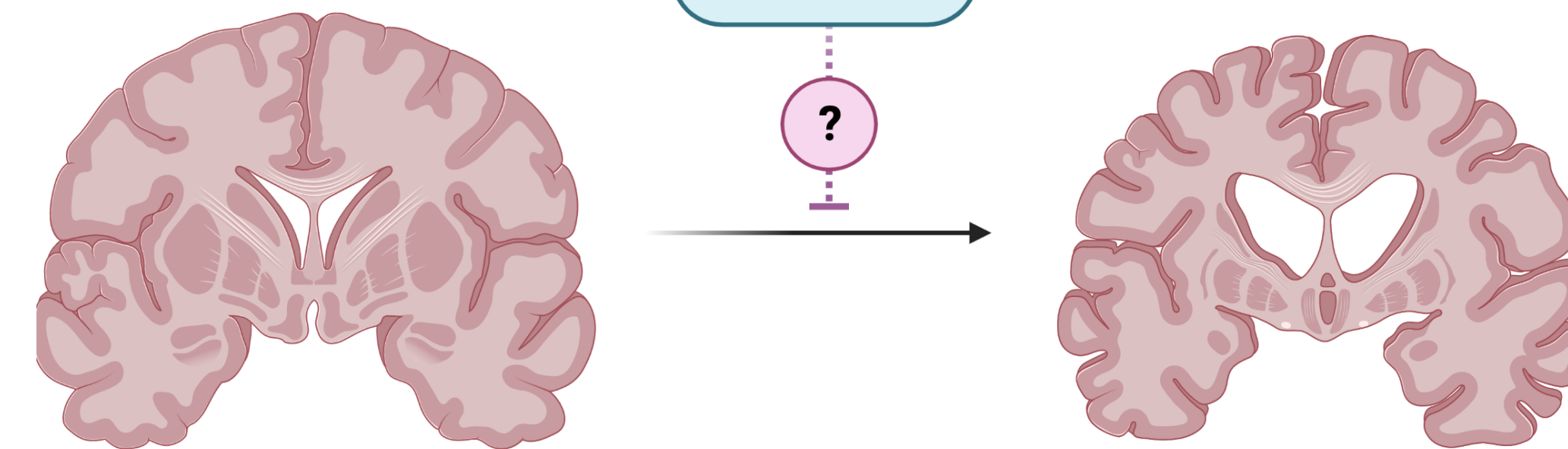
<sup>\*</sup>Kenneth S. Warren Institute and <sup>\*\*</sup>Warren Pharmaceuticals, Ossining, NY 10563; <sup>†</sup>Mario Negri Pharmacological Research Institute, 20157 Milan, Italy; and <sup>5</sup>University of Messina, 98122 Messina, Italy



## Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin

Michael Brines<sup>\*\*\*</sup>, Nimesh S. A. Patel<sup>5</sup>, Pia Villa<sup>†</sup>, Courtenay Brines<sup>\*</sup>, Tiziana Mennini<sup>†</sup>, Massimiliano De Paola<sup>†</sup>, Zubeyde Erbayraktar<sup>\*\*</sup>, Serhat Erbayraktar<sup>\*\*</sup>, Bruno Sepodes<sup>††</sup>, Christoph Thiemermann<sup>5</sup>, Pietro Ghezzi<sup>\*†</sup>, Michael Yamin<sup>\*</sup>, Carla C. Hand<sup>†</sup>, Qiao-wen Xie<sup>\*†</sup>, Thomas Coleman<sup>\*\*\*</sup>, and Anthony Cerami<sup>\*†</sup>

<sup>\*</sup>Warren Pharmaceuticals, Ossining, NY 10562; <sup>†</sup>The Kenneth S. Warren Institute, Ossining, NY 10562; <sup>5</sup>Centre for Translational Medicine and Therapeutics, William Harvey Research Institute, Barts and London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary, University of London, London EC1M 6BQ, England; <sup>†</sup>Mario Negri Institute for Pharmacological Research, 20-20156 Milan, Italy; <sup>\*\*</sup>Dokuz Eylül University, Izmir 35340, Turkey; <sup>††</sup>Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, 1600 Lisbon, Portugal; and <sup>†</sup>National Research Council, Institute of Neuroscience, 20129 Milan, Italy



# Цель исследования:

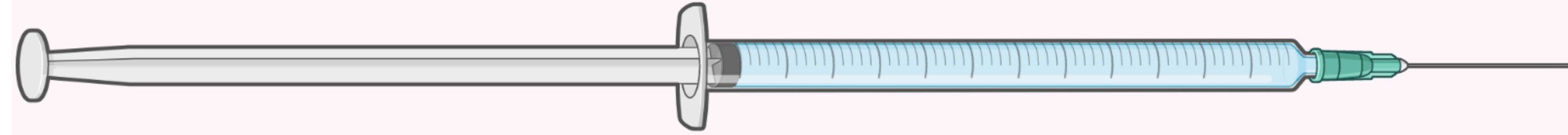
**Оценить нейро- и ретинопротективные эффекты пептидного агониста гетеродимерного рецептора эритропоэтина при моделировании нейродегенеративных процессов.**



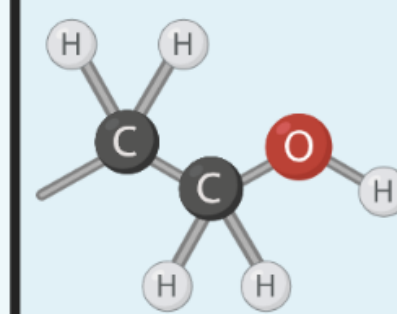
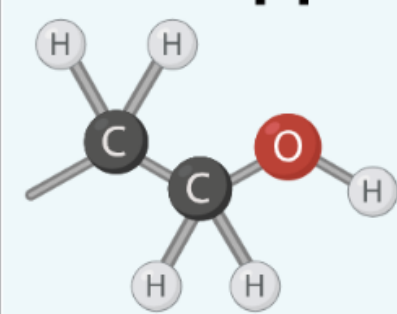
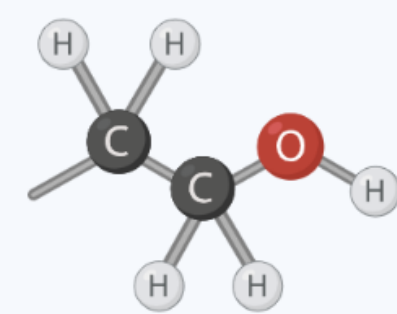
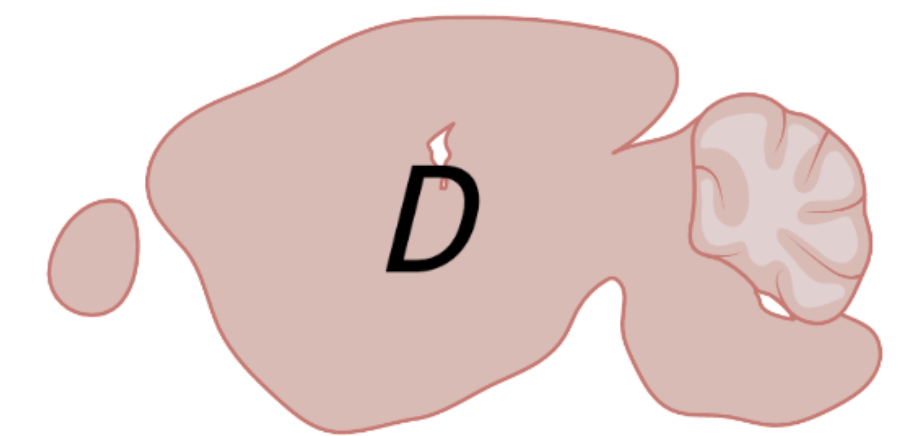
# Материалы и методы

**Животные:** крысы Wistar  
**Пол:** самцы  
**Возраст:** 20 недель  
**Масса:** 270-310 грамм  
**n=36**

pHBSF 5 мкг/кг (n=12), EPO 10 мкг/кг (n=12) или растворитель (стерильная вода) в эквивалентном объеме (n=12) подкожно 2 раза в неделю



Оценка экспрессии маркеров аутофагии, апоптоза, воспаления, регенерации



День 0

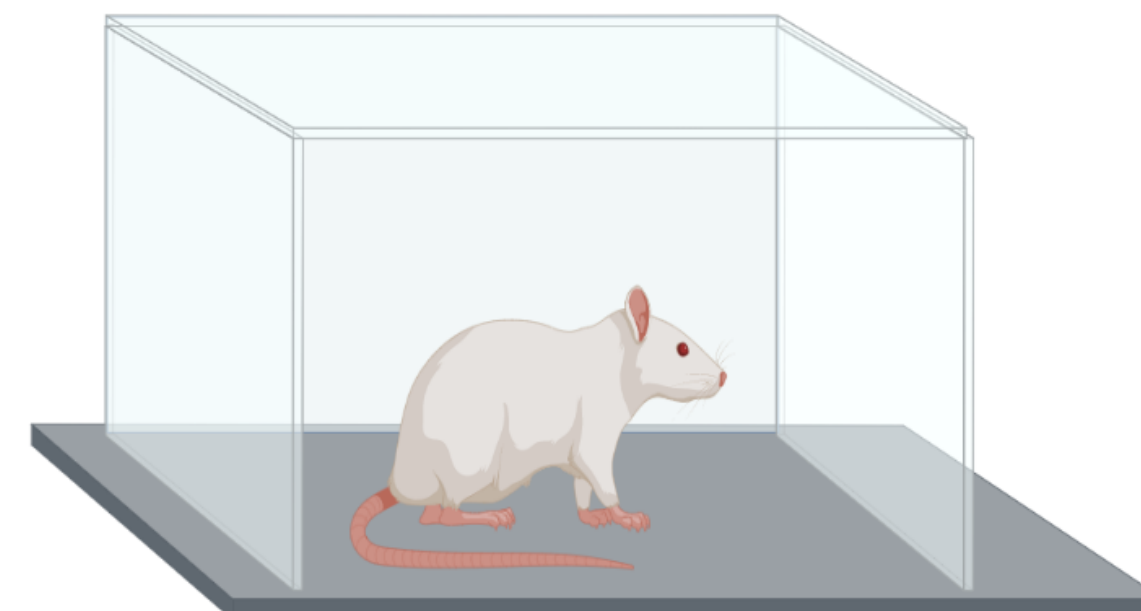
День 30

День 60

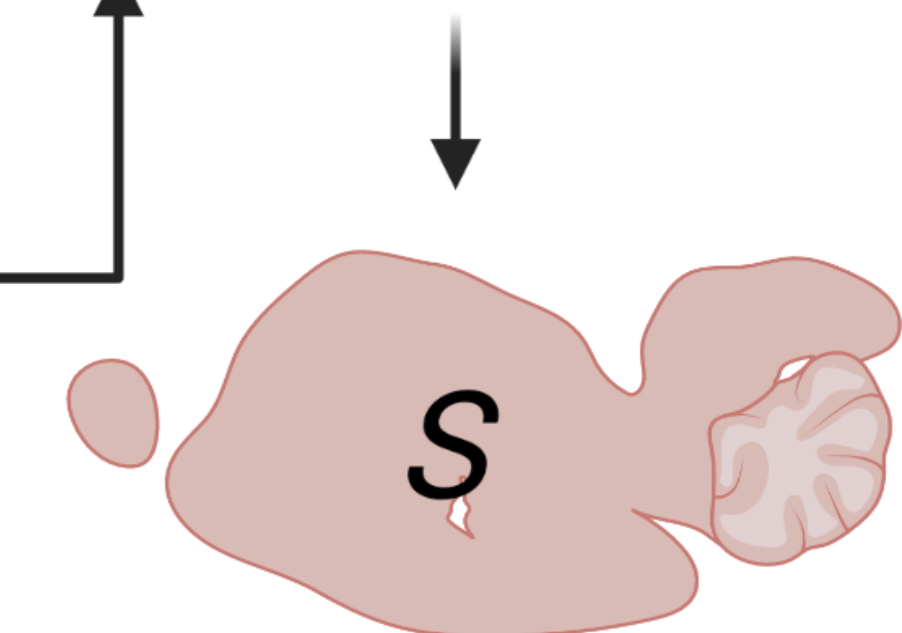
День 90

Эвтаназия

Тесты "Открытое поле"  
"Распознавание образов"

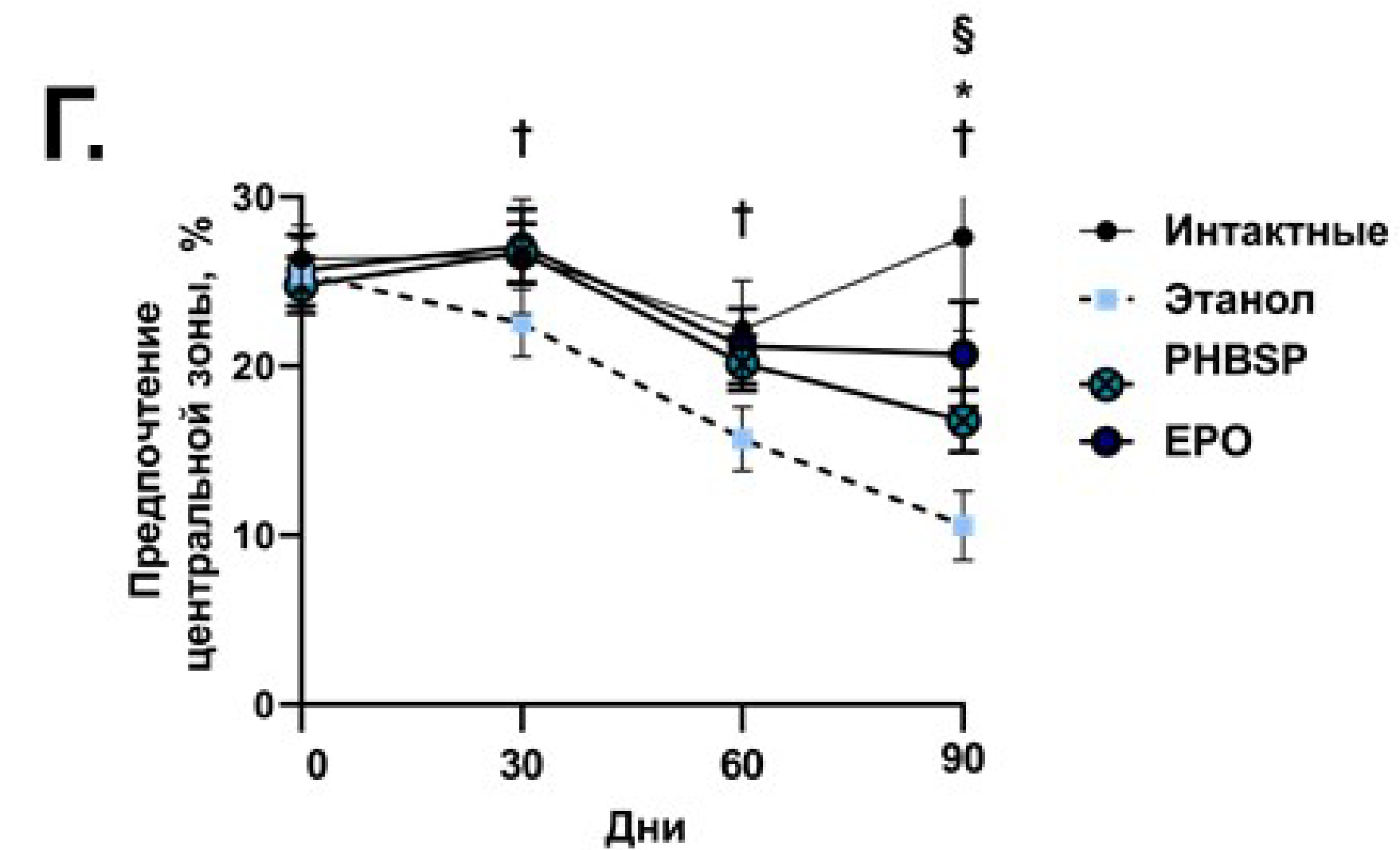
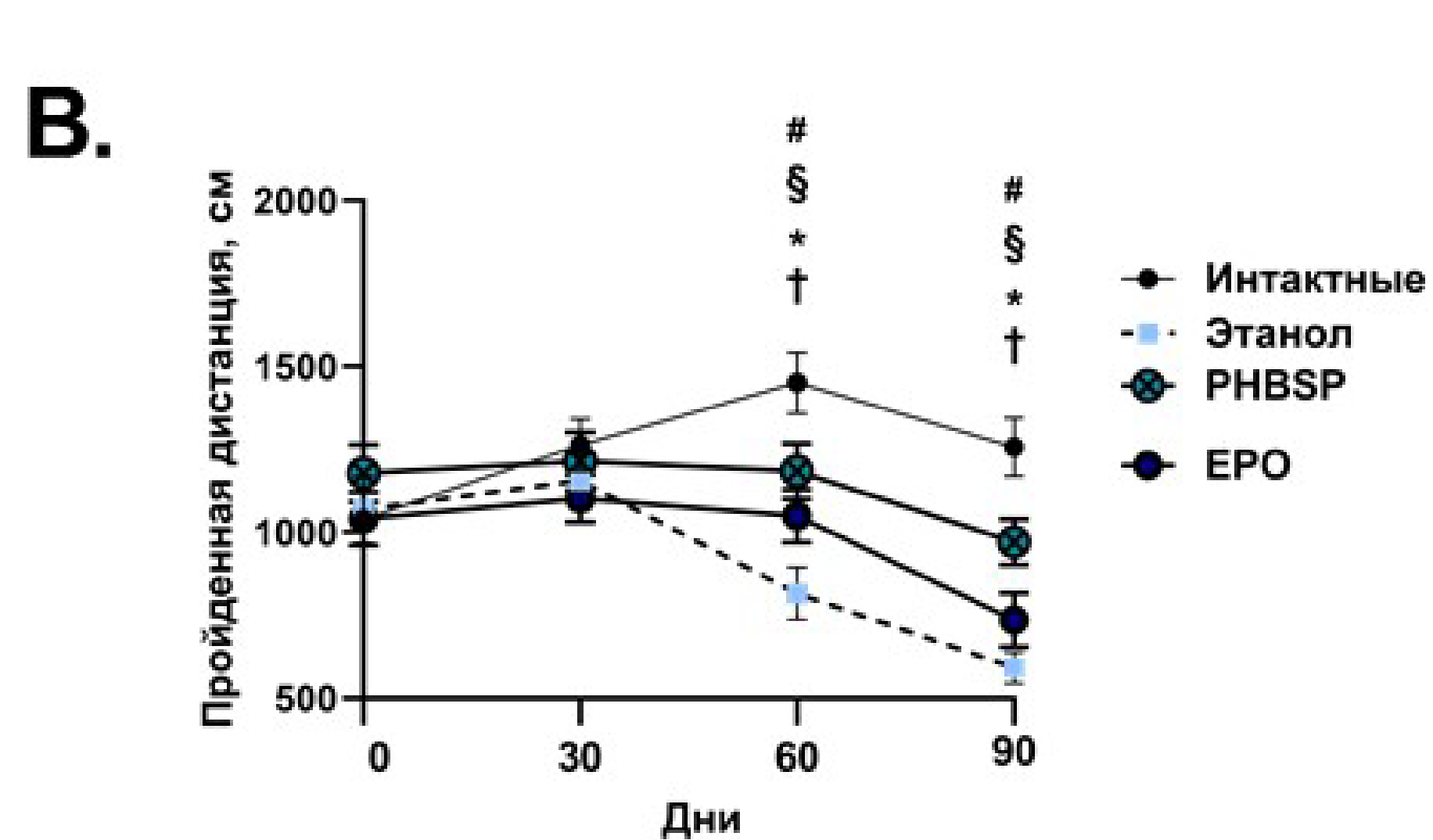
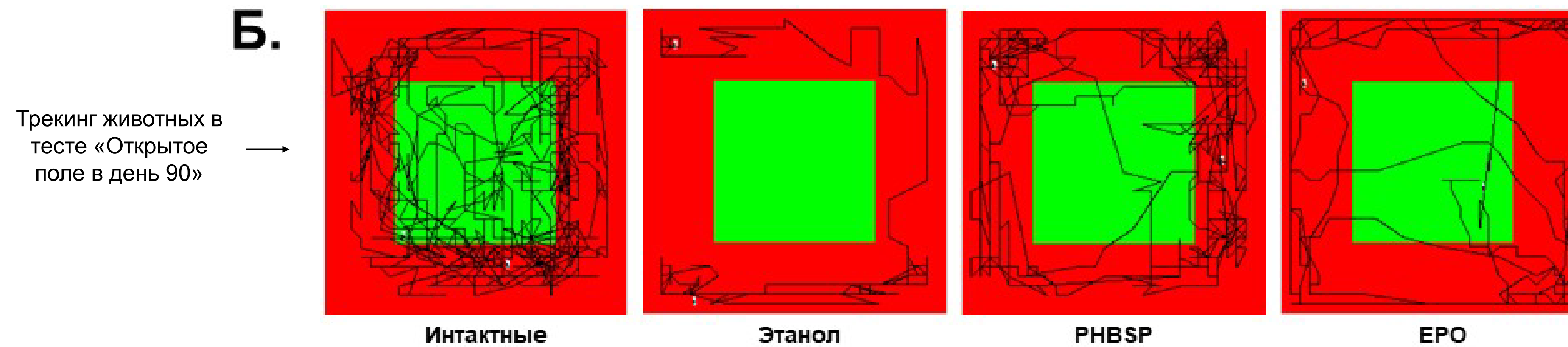
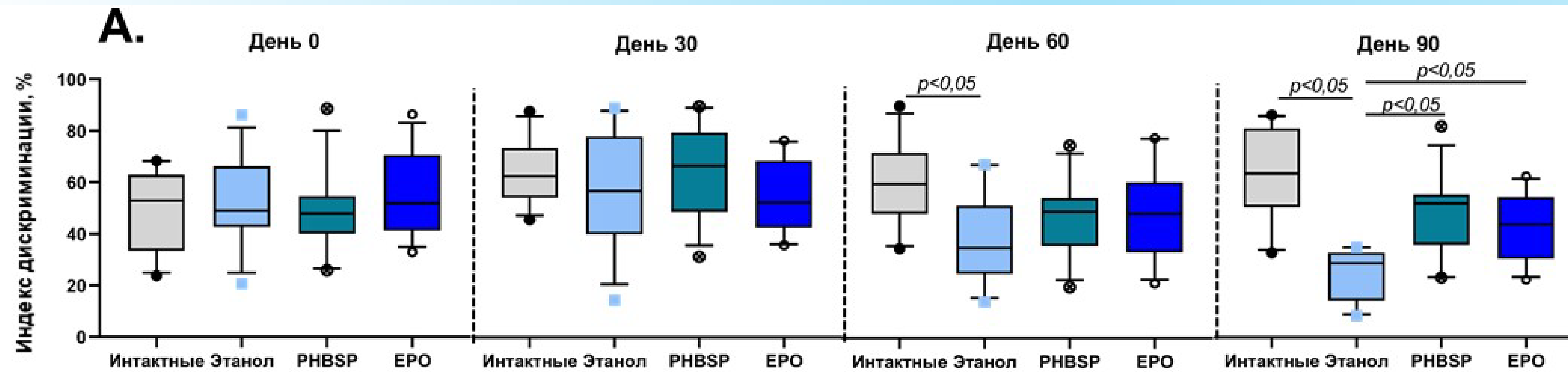


+ эквивалентная группа интактных животных, получавших растворитель в том же режиме (n=12)



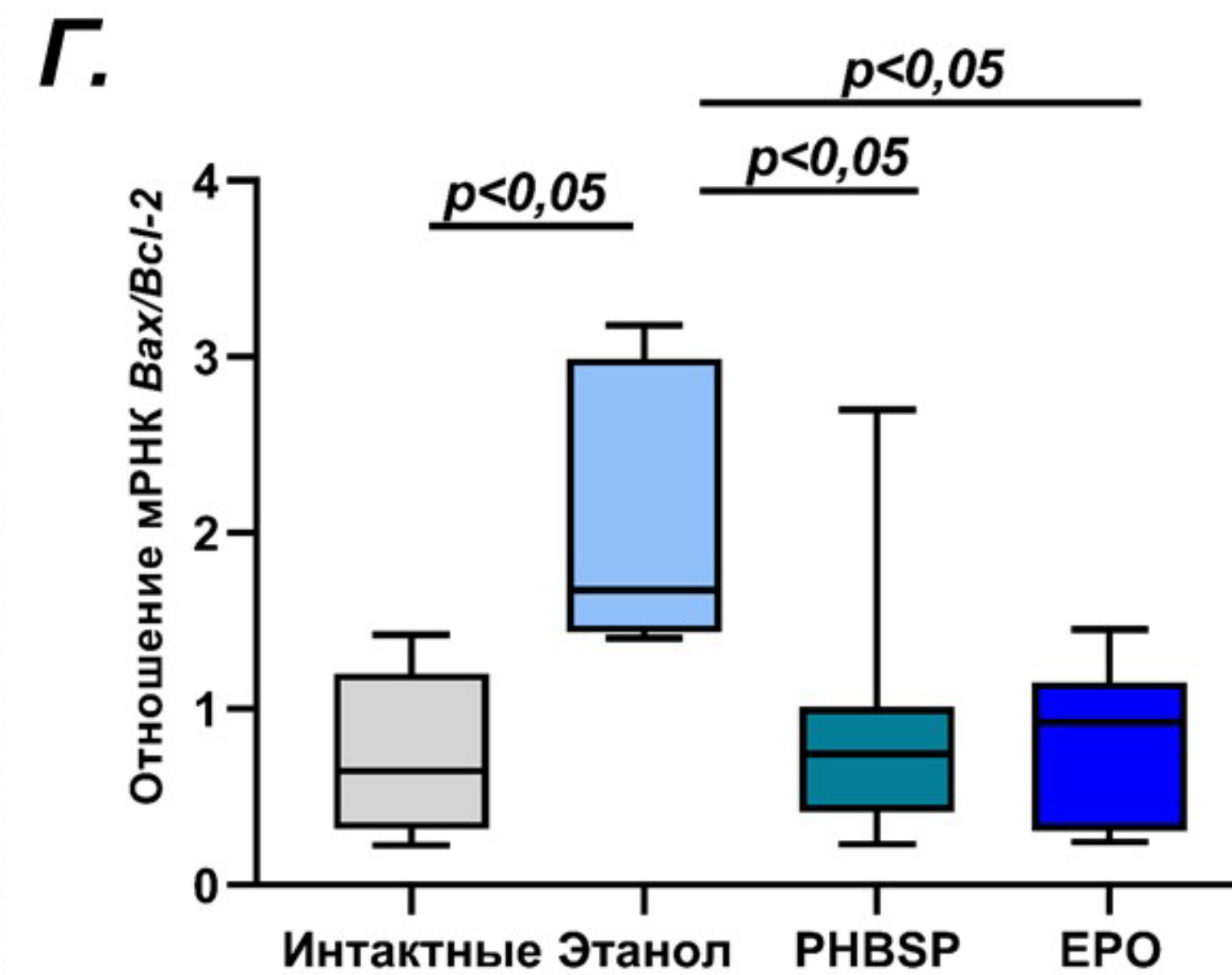
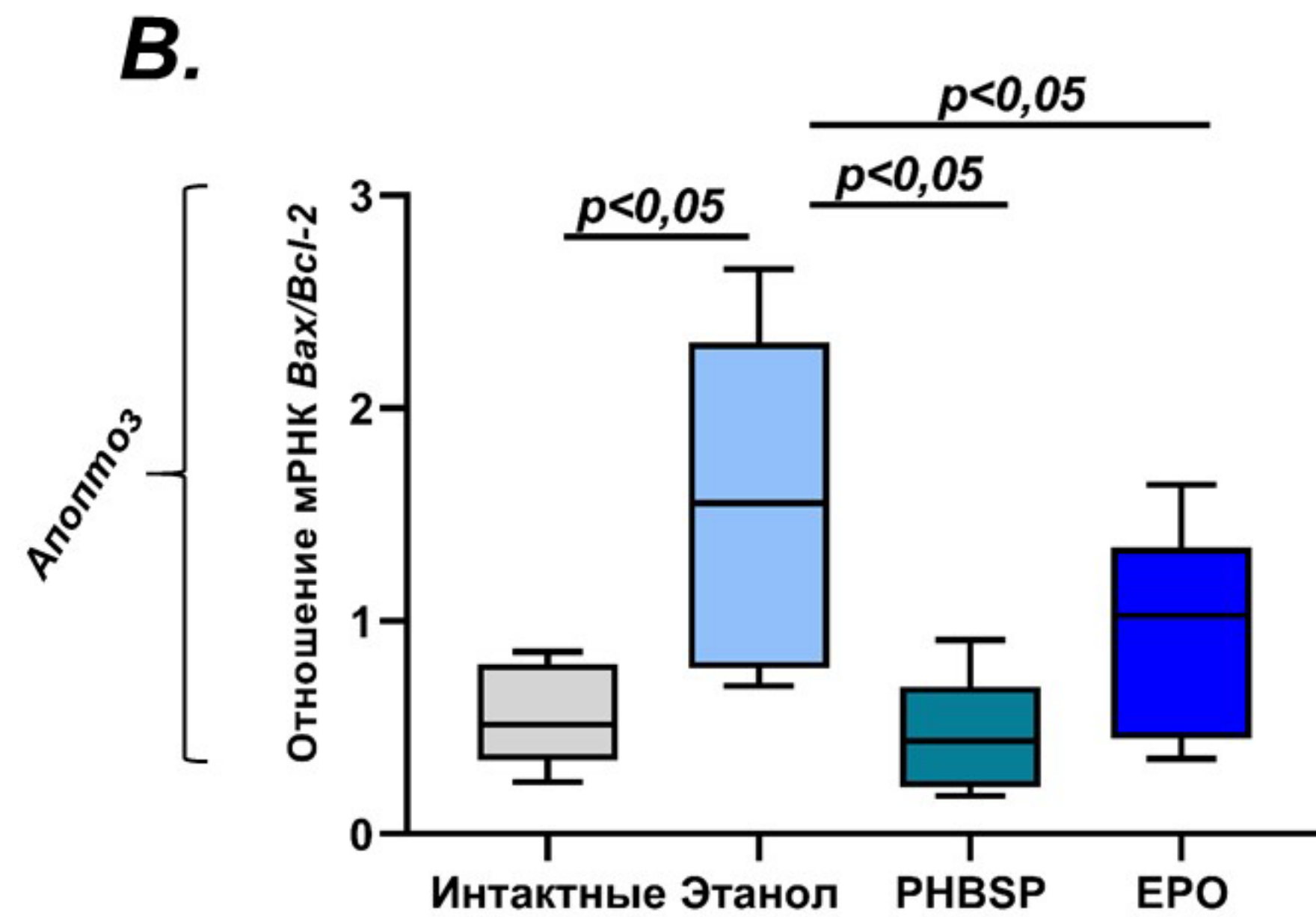
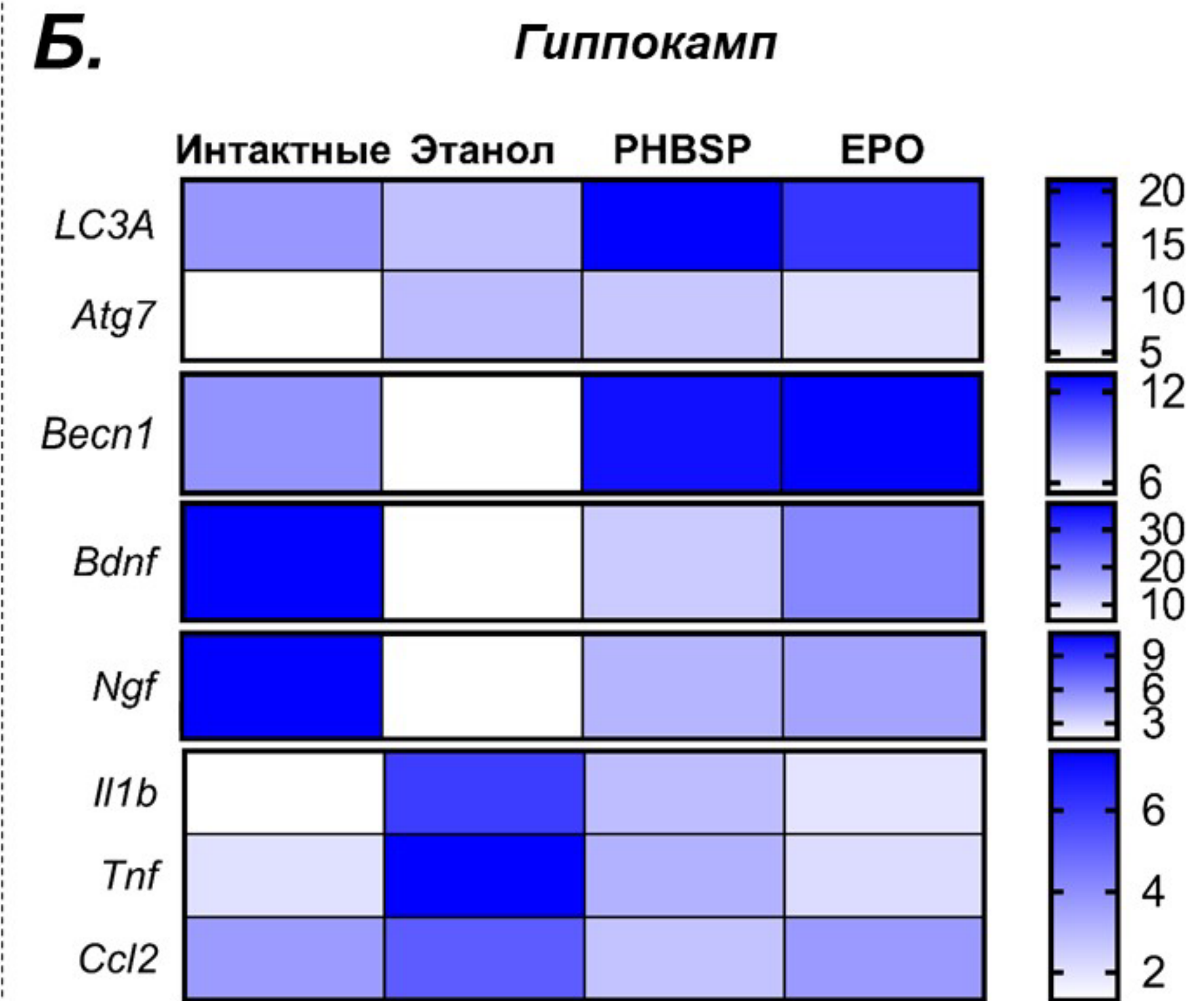
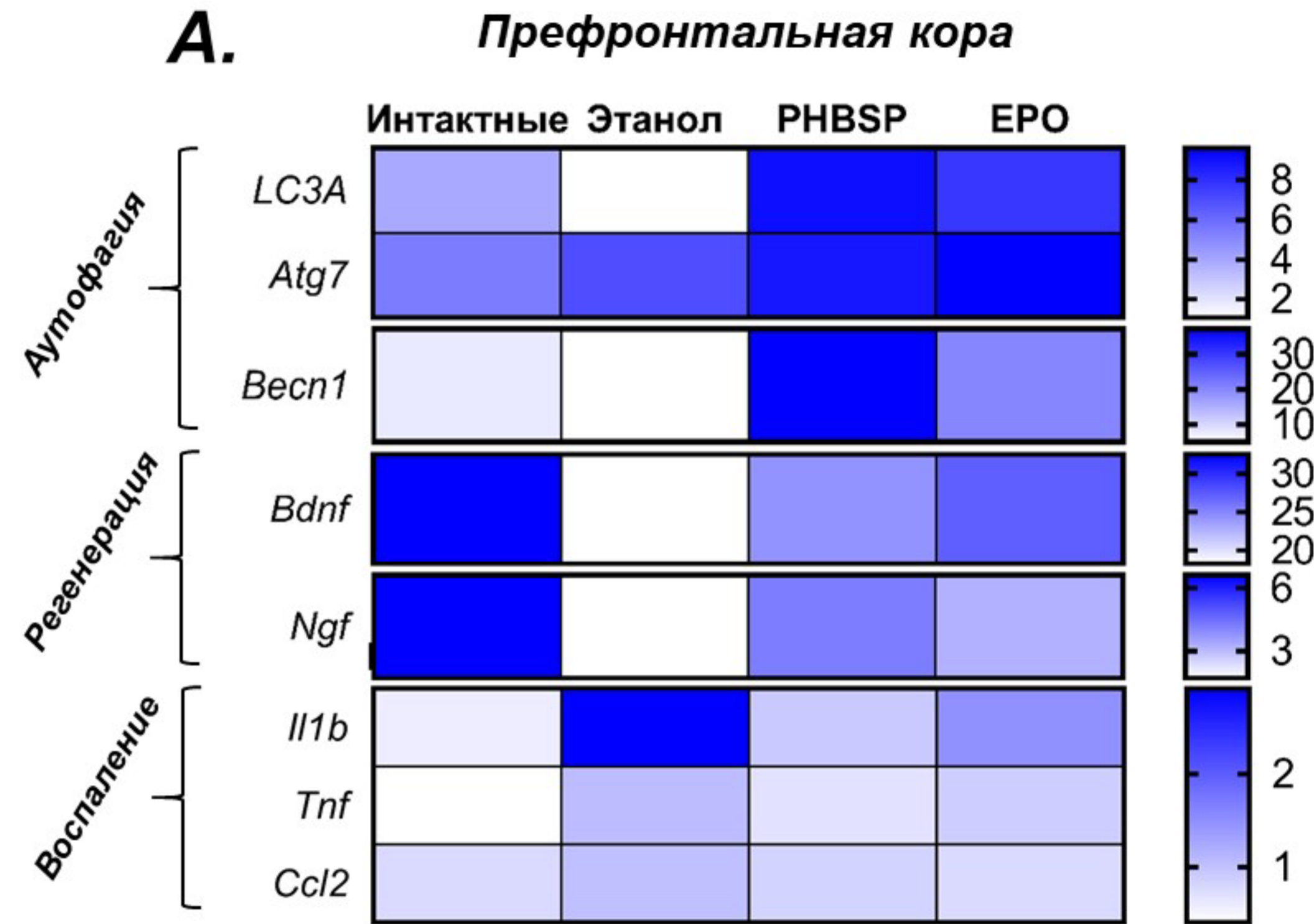
Морфологическое изучение

# Результаты



Статистические сравнения по Данну.  
 † –  $p < 0,05$  при сравнении групп «Этанол» и «Интактные»; \* –  $p < 0,05$  при сравнении групп «Этанол» и «PHBSP»; § –  $p < 0,05$  при сравнении групп «Этанол» и «EPO»; † –  $p < 0,05$  при сравнении групп «Этанол» и «EPO»; # – при сравнении групп «PHBSP» и «EPO».

# Результаты



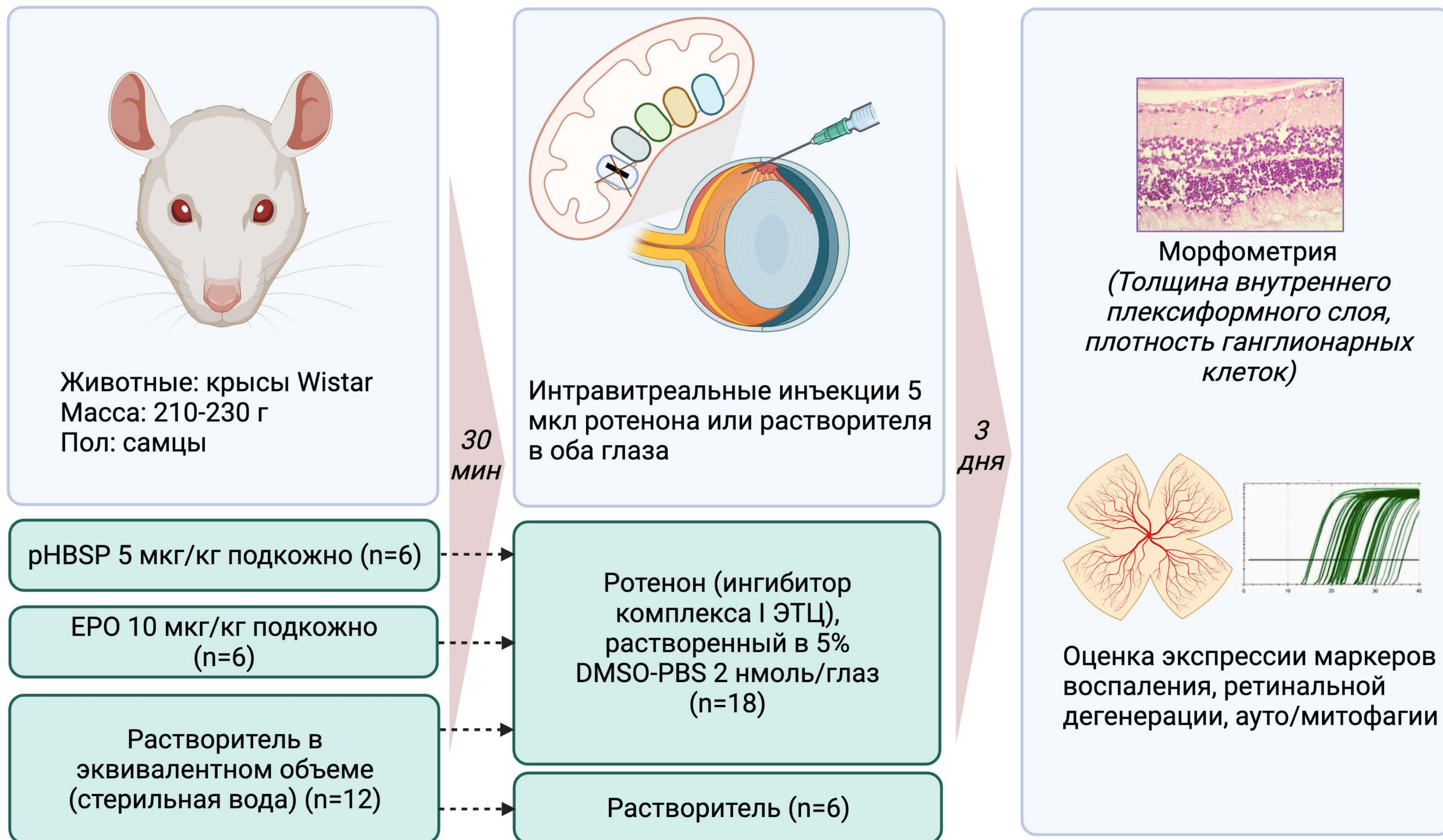
Статистические сравнения по Данну.

## **2-е положение, выносимое на защиту:**

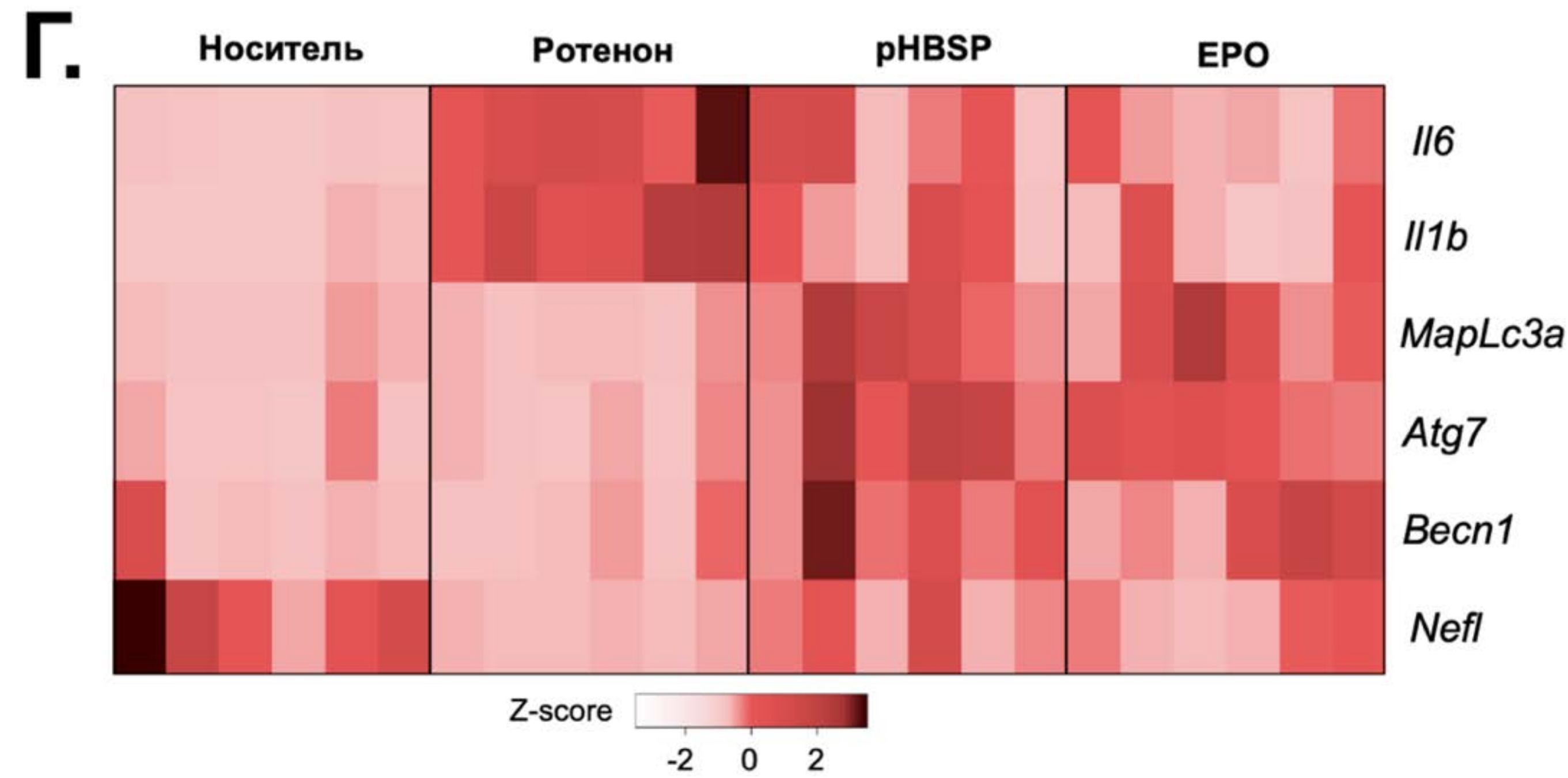
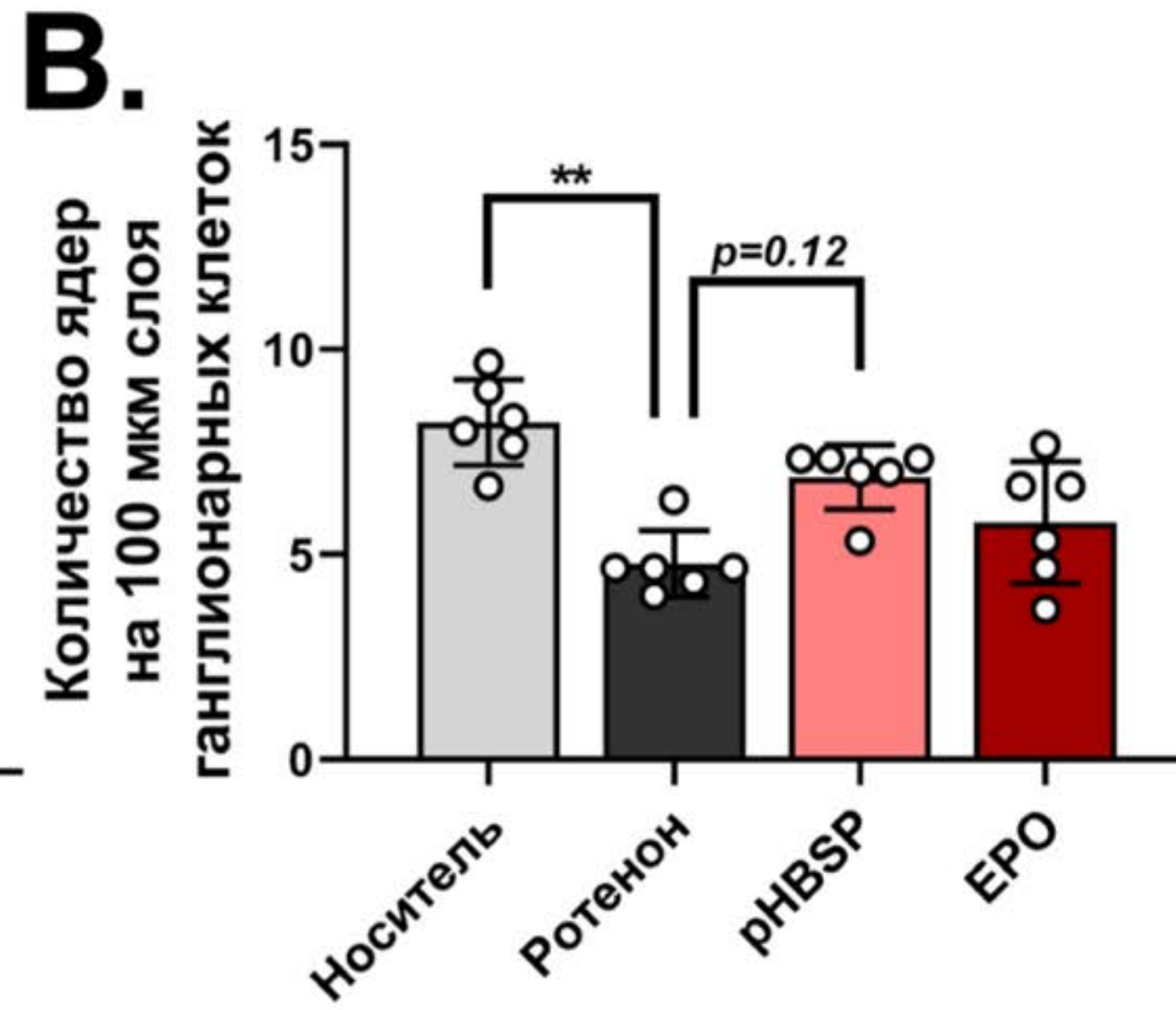
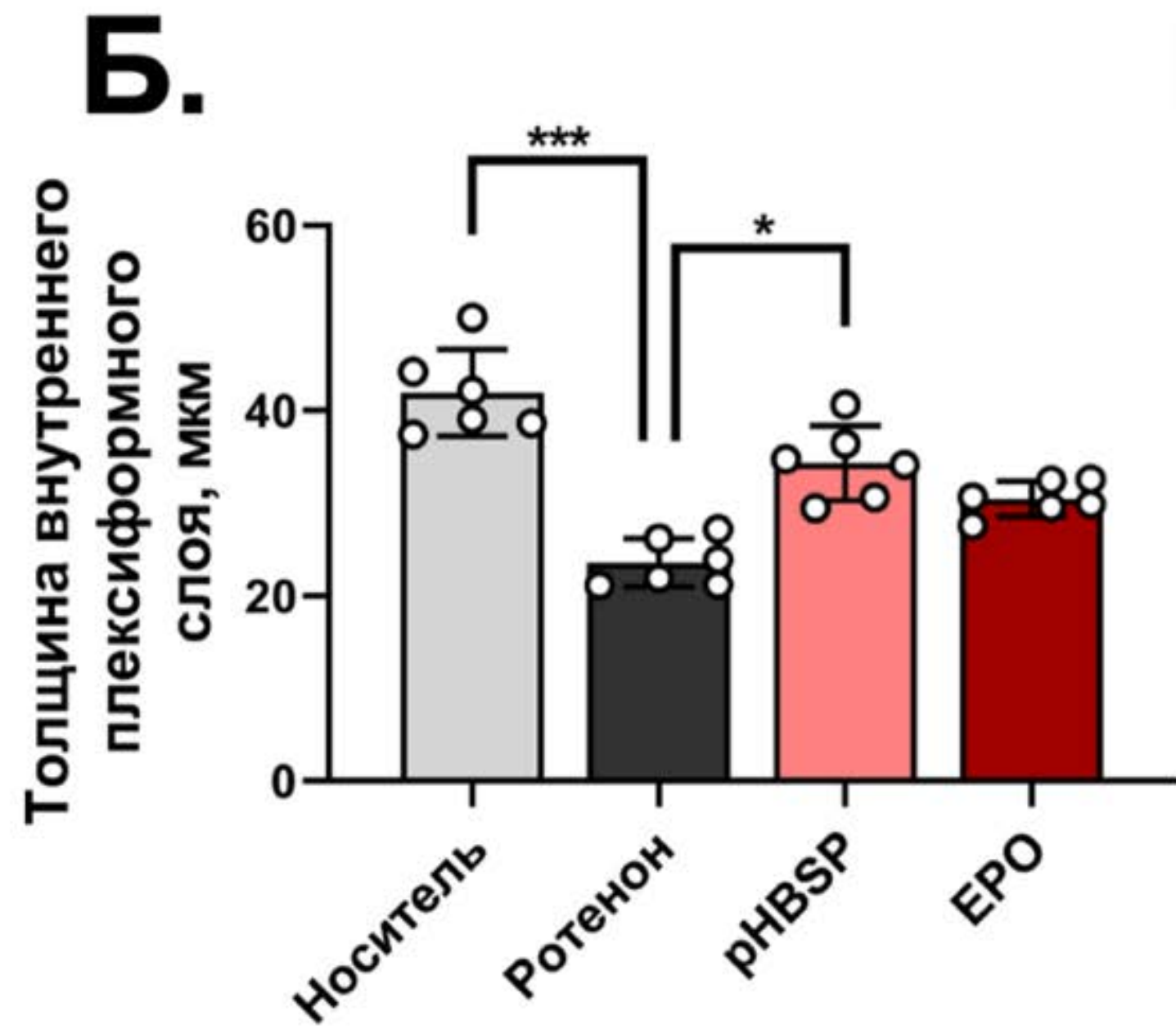
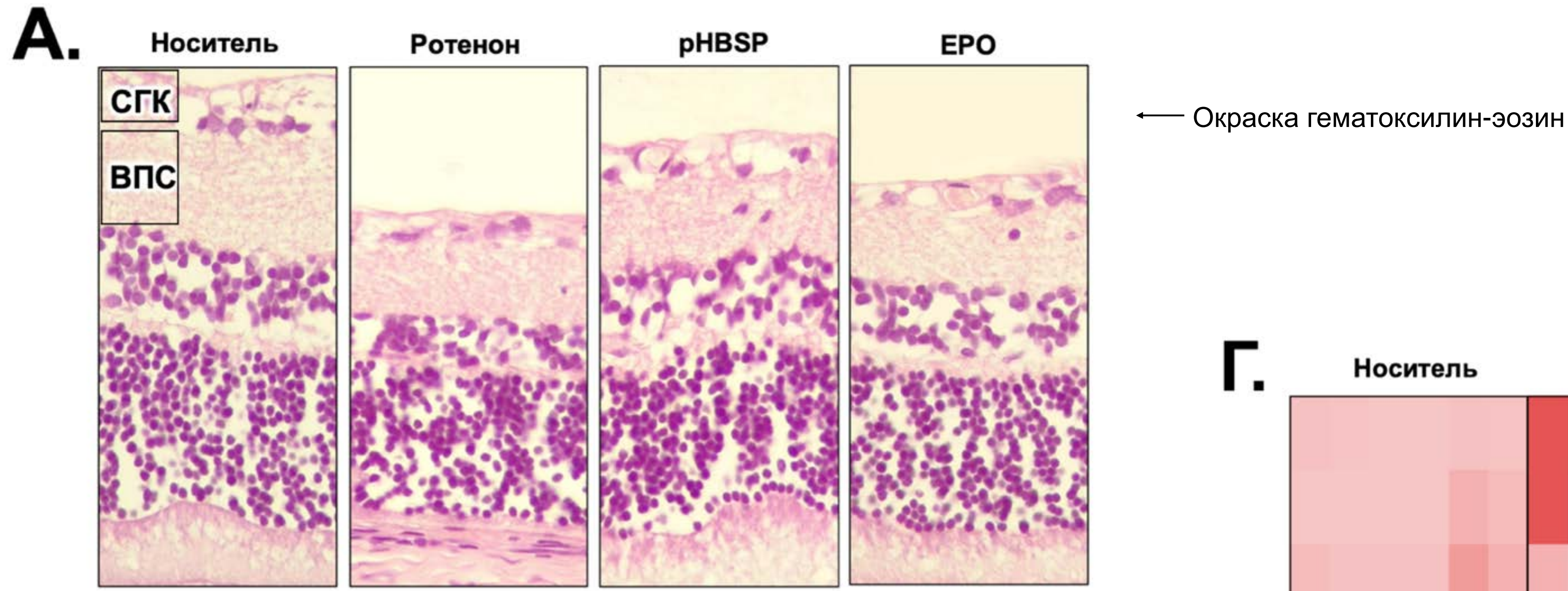
**рНВSP демонстрирует ретинопротективную активность при ротенон-индуцированной ретинопатии за счет снижения нейровоспаления, а также стимуляции ауто- и митофагии.**



# Материалы и методы

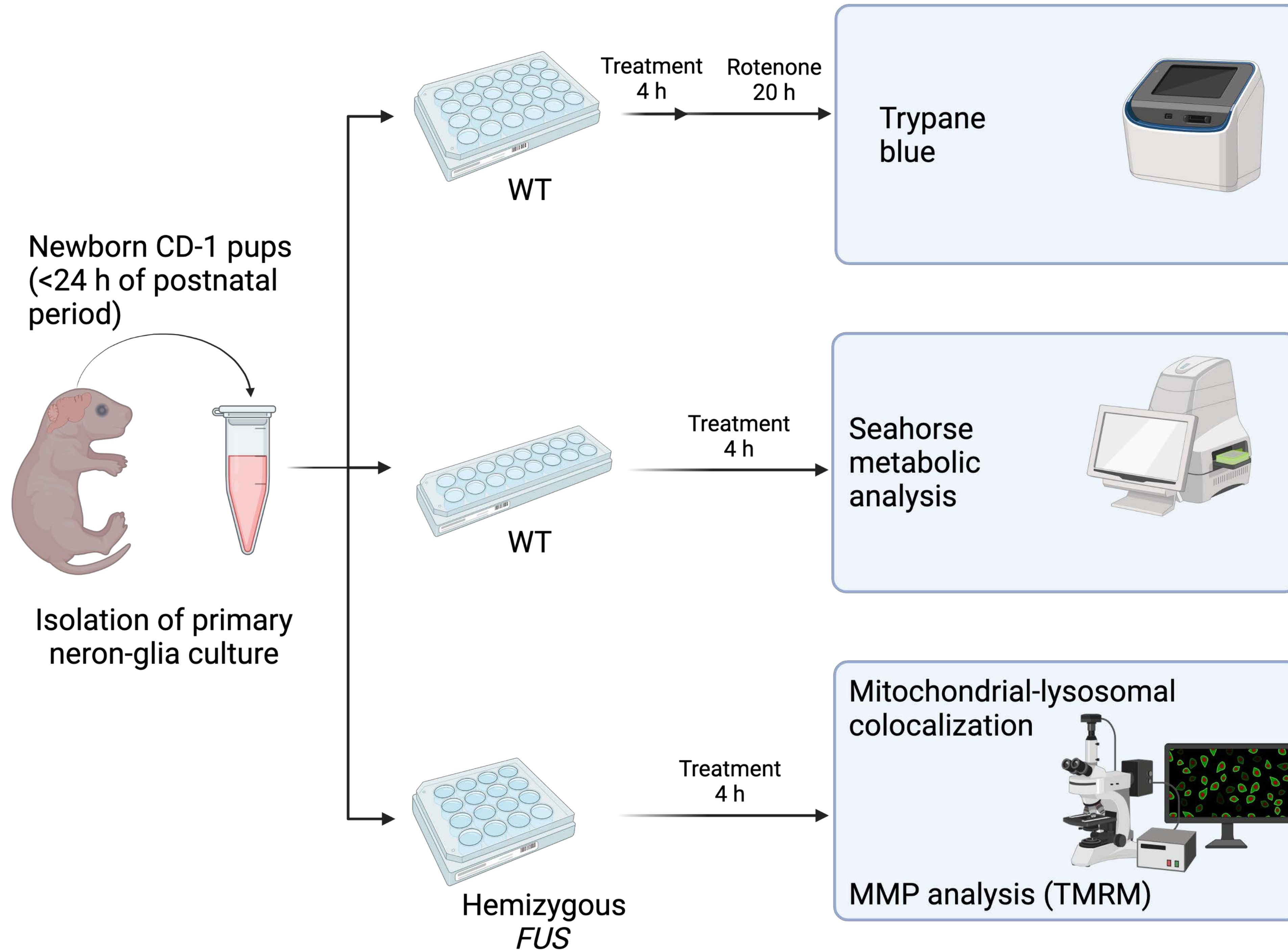


# Результаты



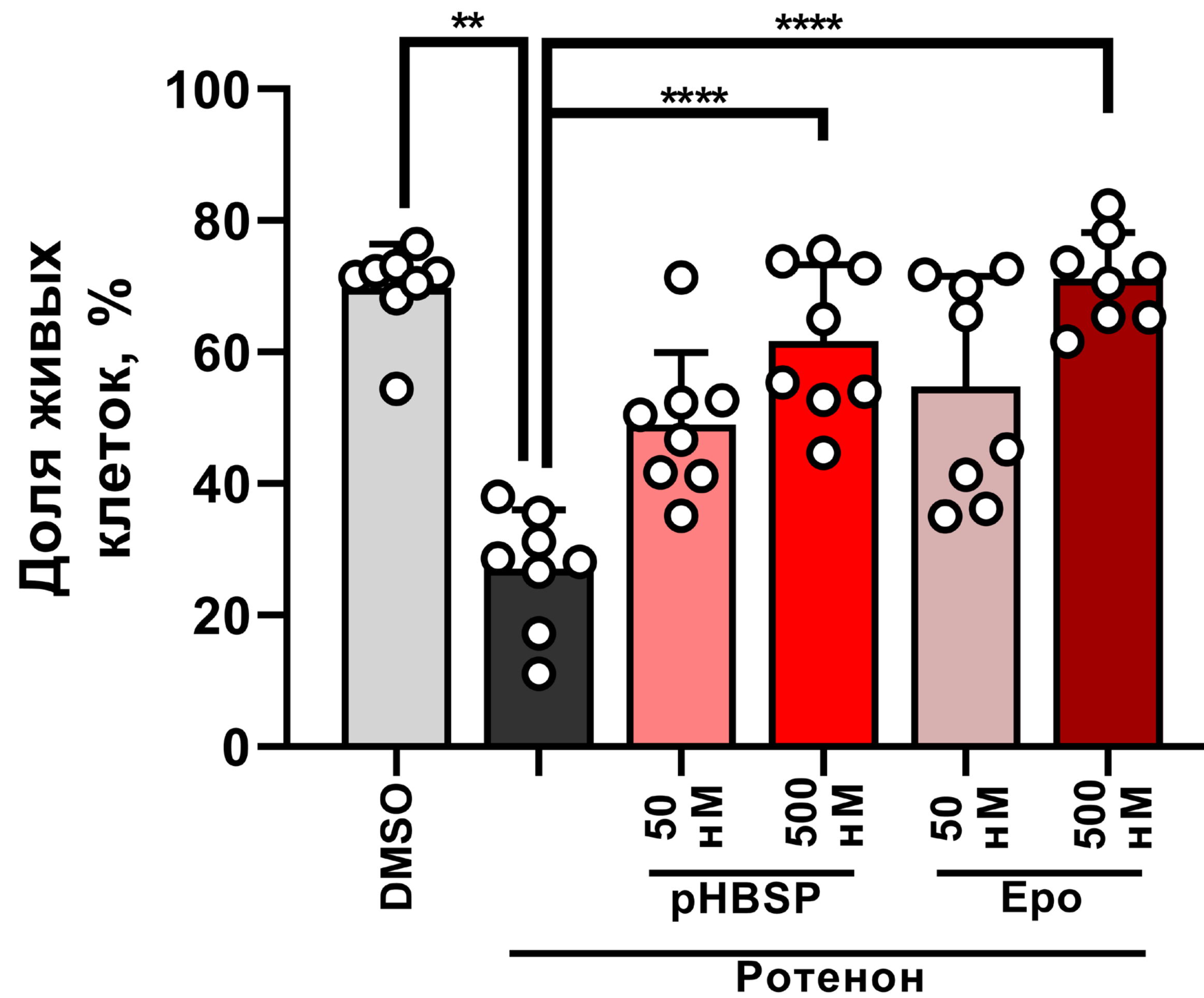
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  (пост-хок по Тьюки)

# Материалы и методы



# Результаты

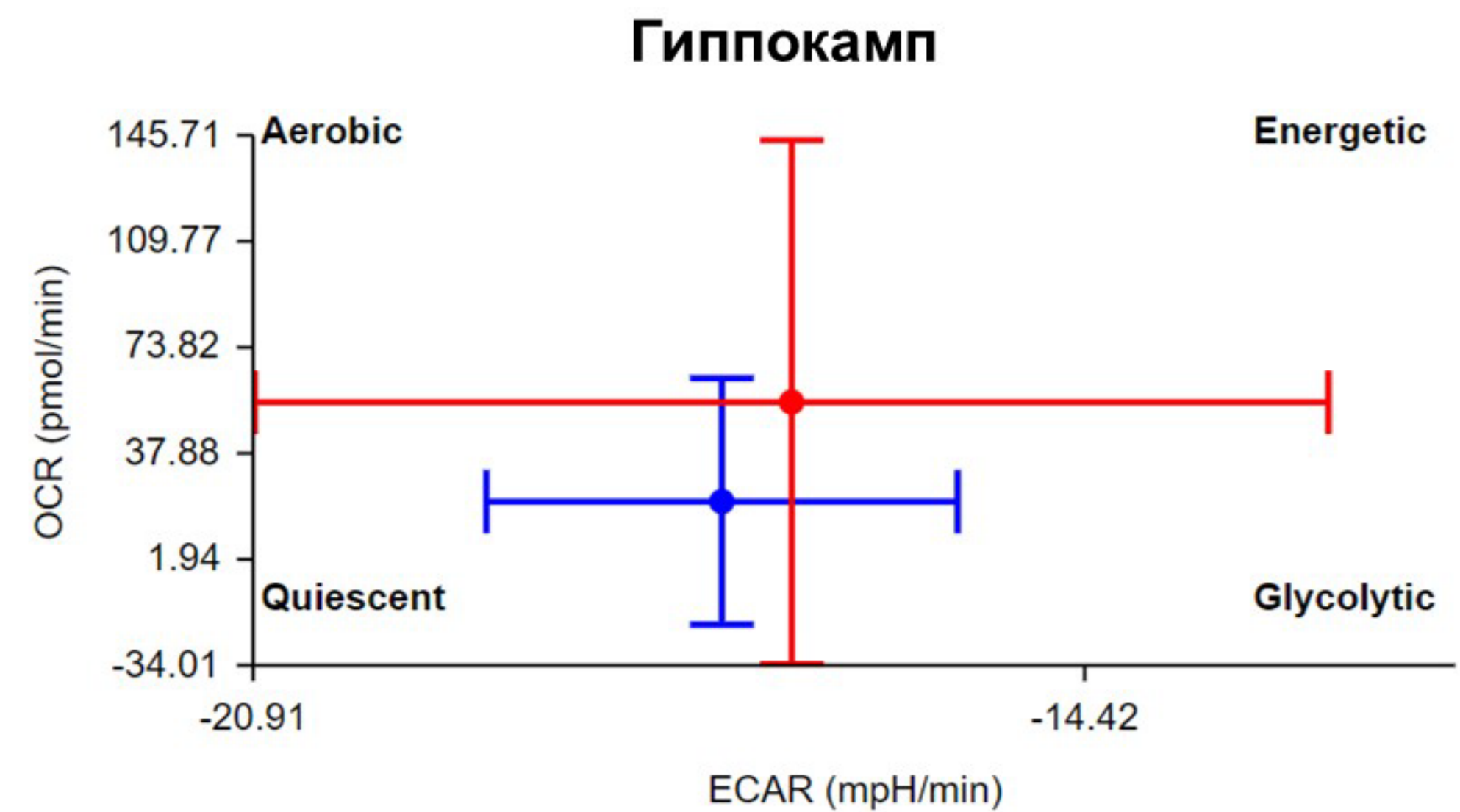
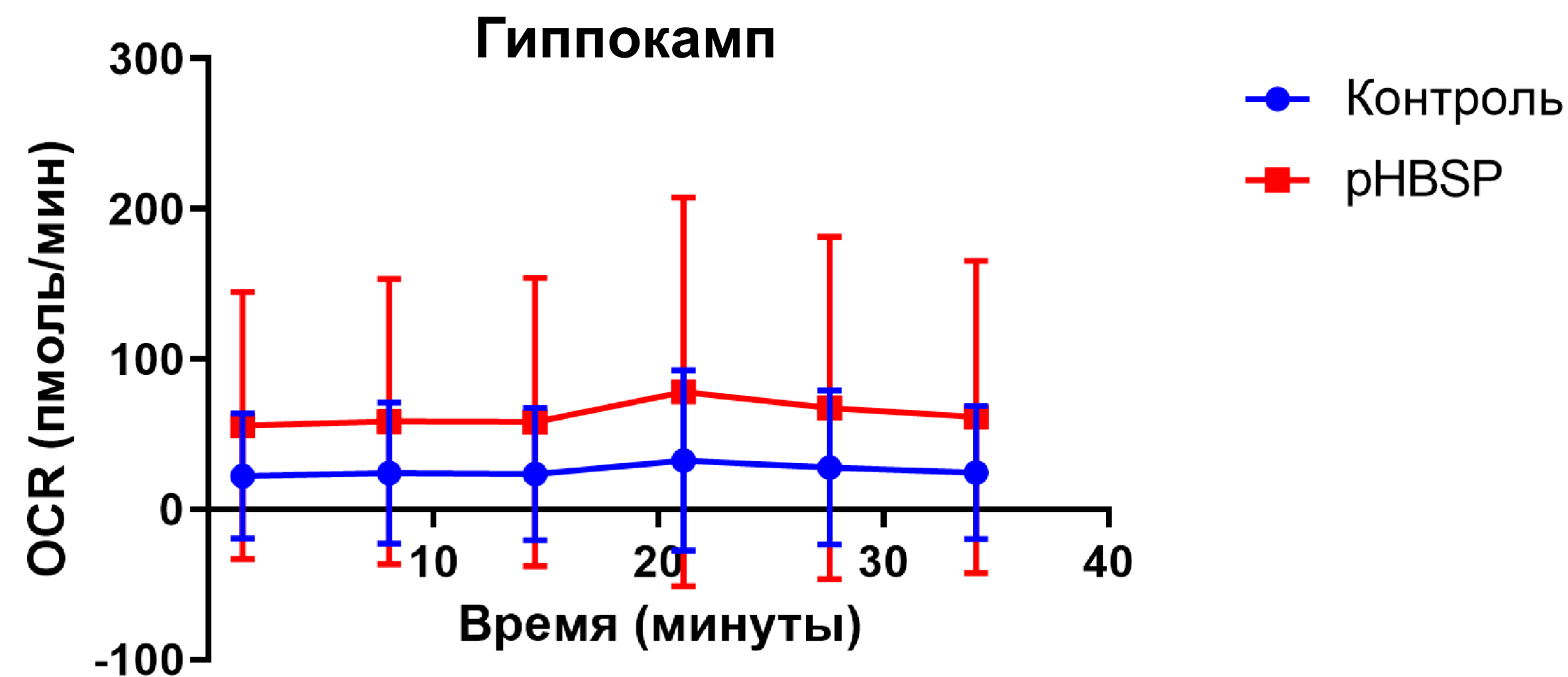
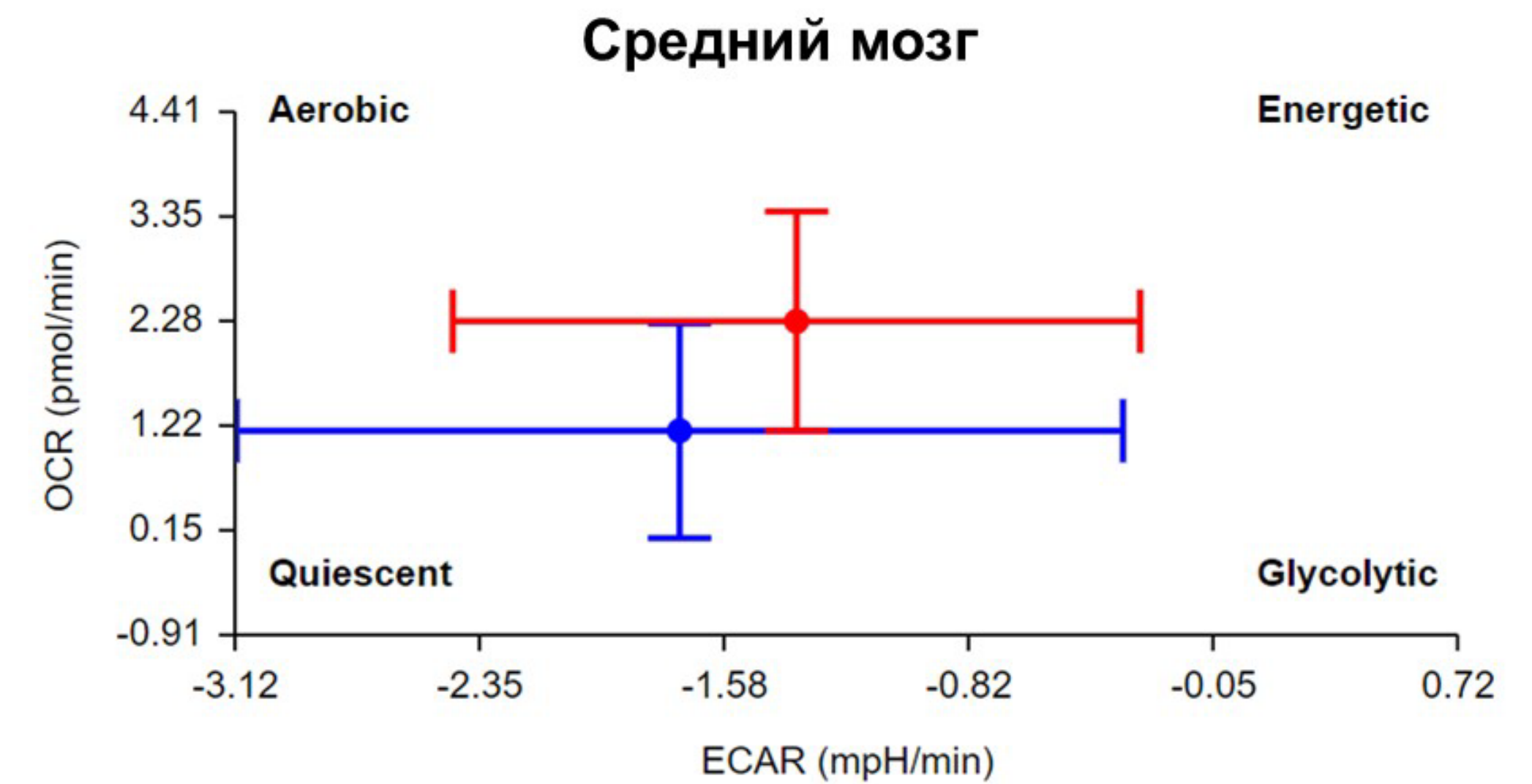
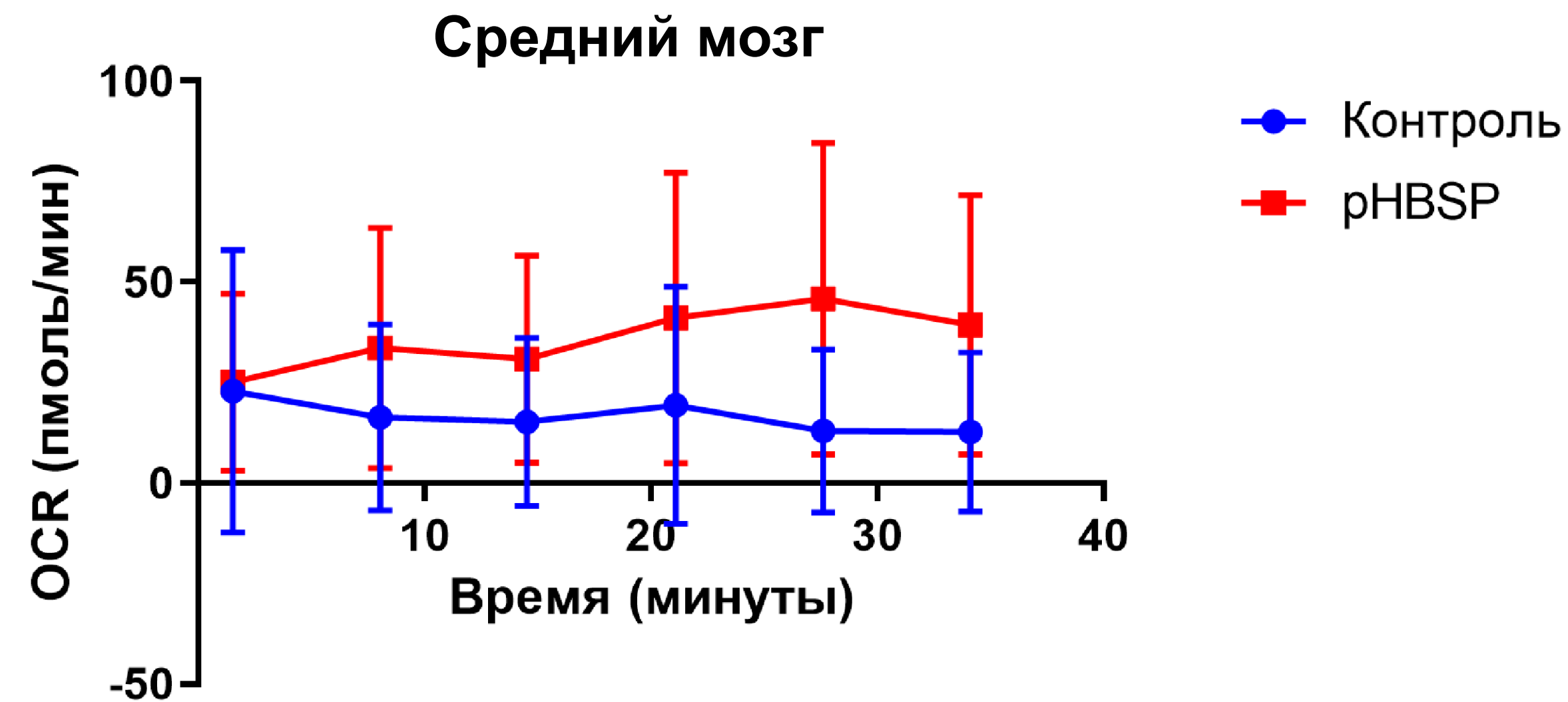
## Выживаемость первичной мышечной нейроглиальной культуры



\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  (пост-хок по Тьюки)

# Результаты

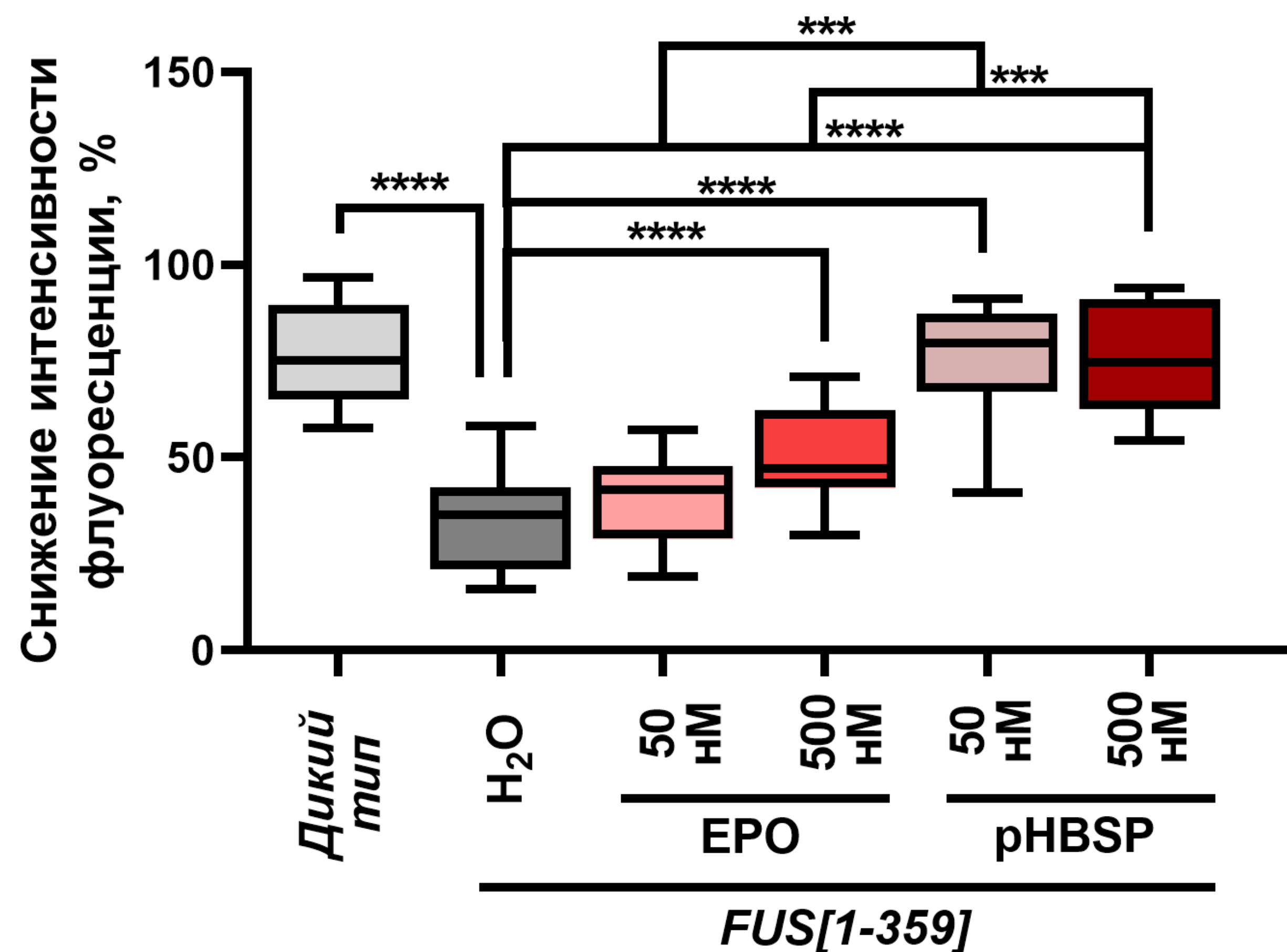
Влияние рНВСП на интенсивность потребления кислорода (OCR) первичной нейроглиальной культуры, полученной от мышей дикого типа



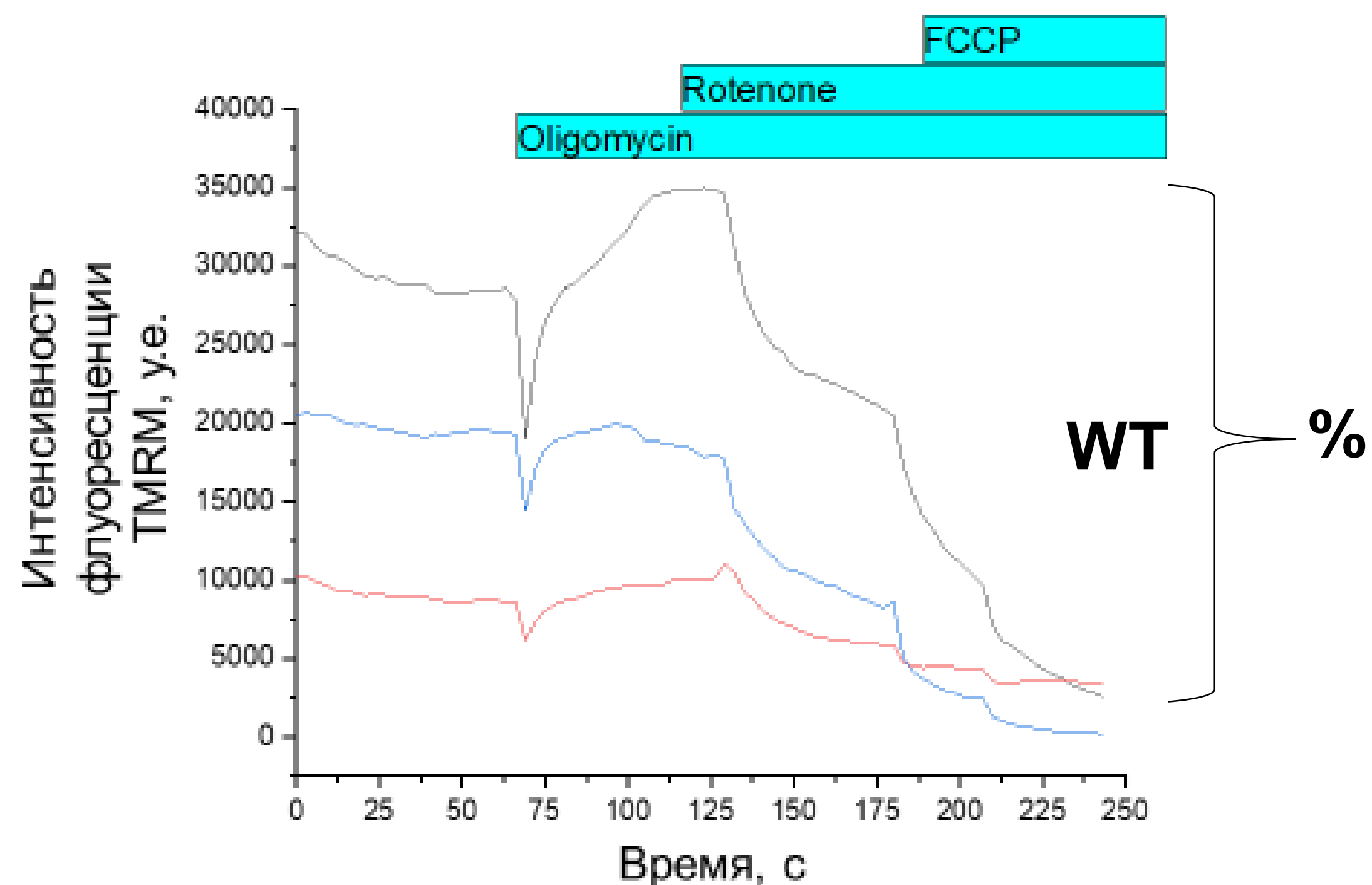
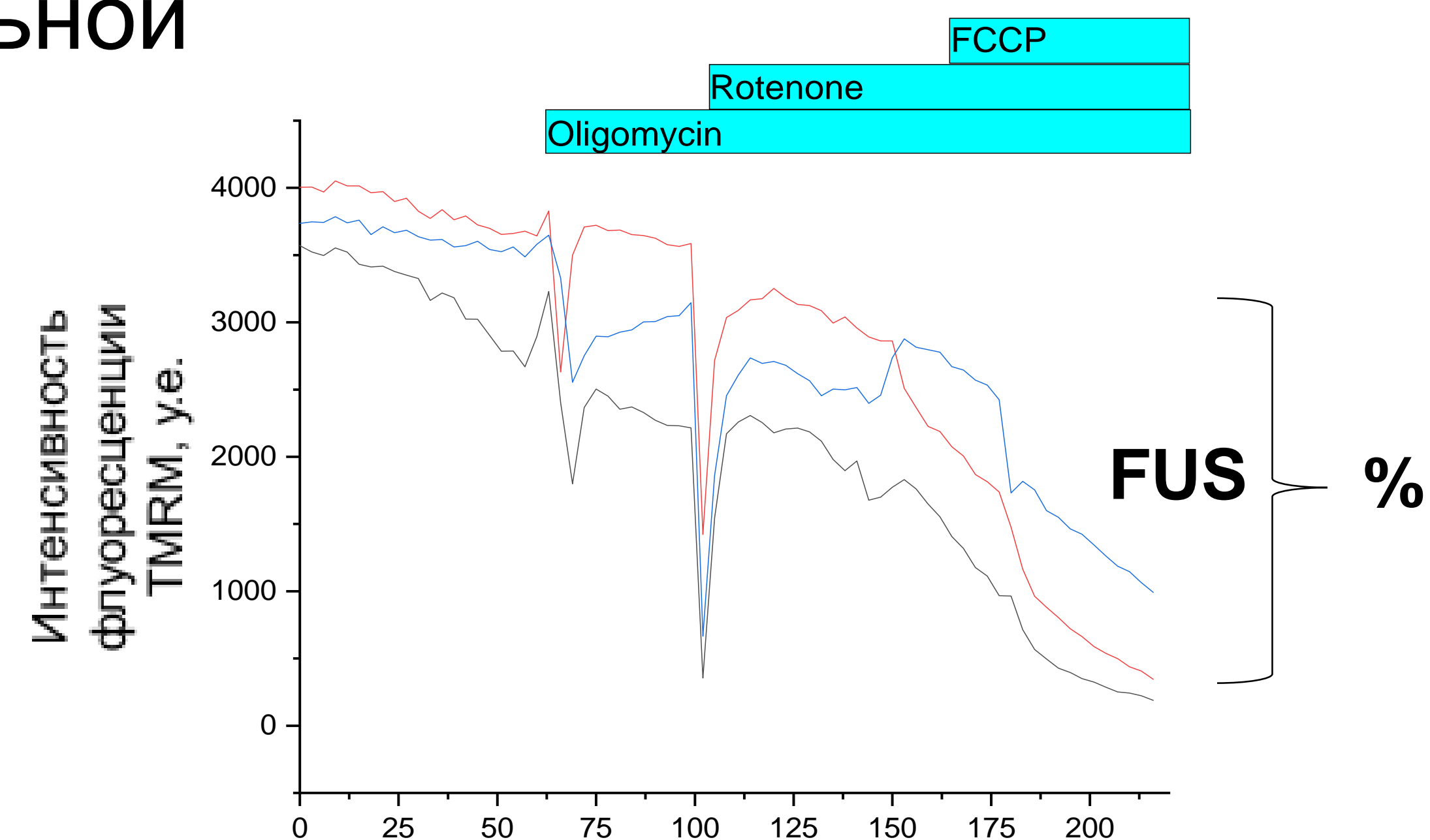
■ Контроль ■ рНВСП

# Результаты

Сохранение активности комплекса 1 при острой экспозиции ротеноном первичной нейроглиальной культуры мышей *FUS[1-359]*

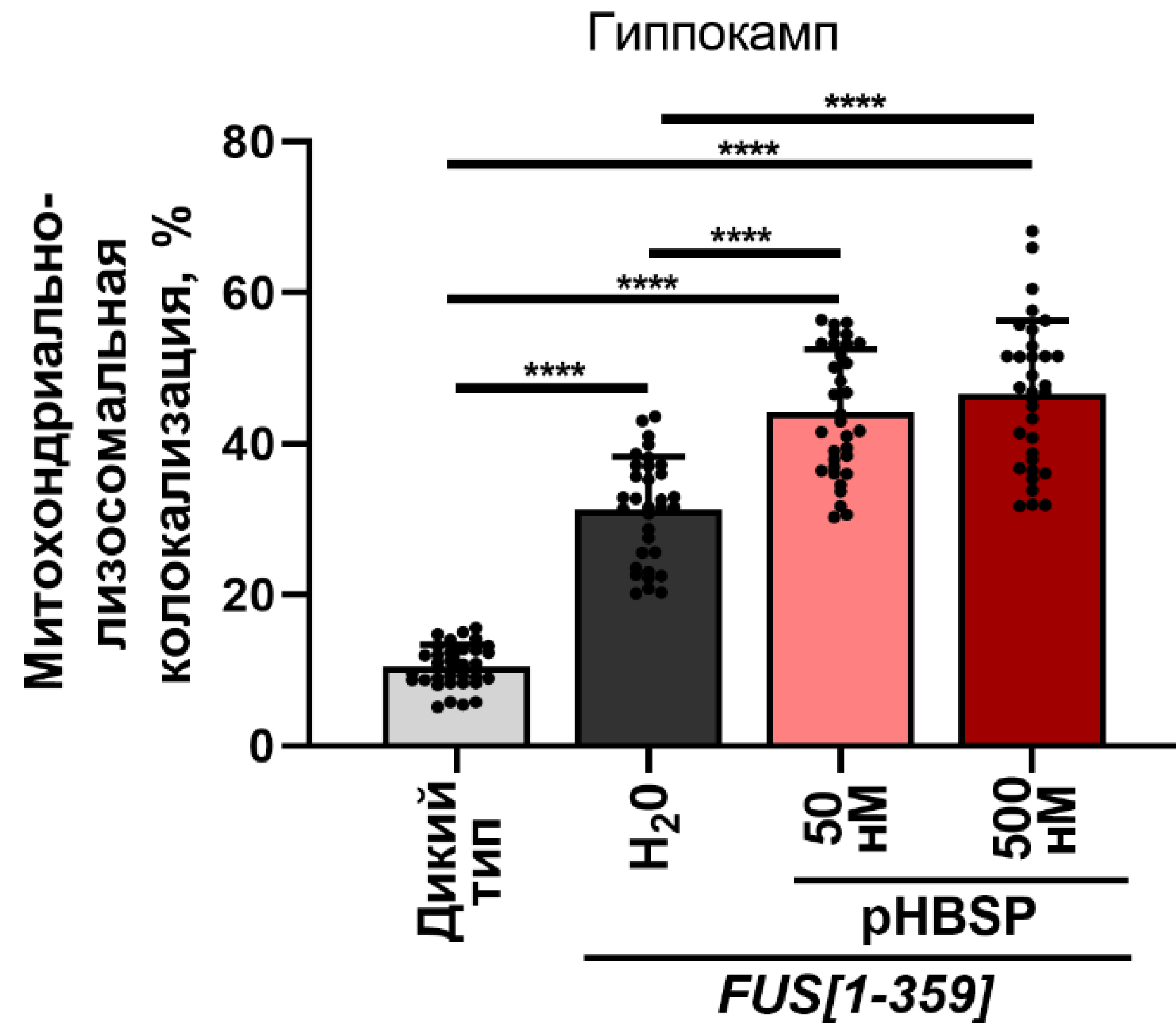


\*\*\* $p < 0,005$ ; \*\*\*\* $p < 0,0005$  (пост-хок по Тьюки)



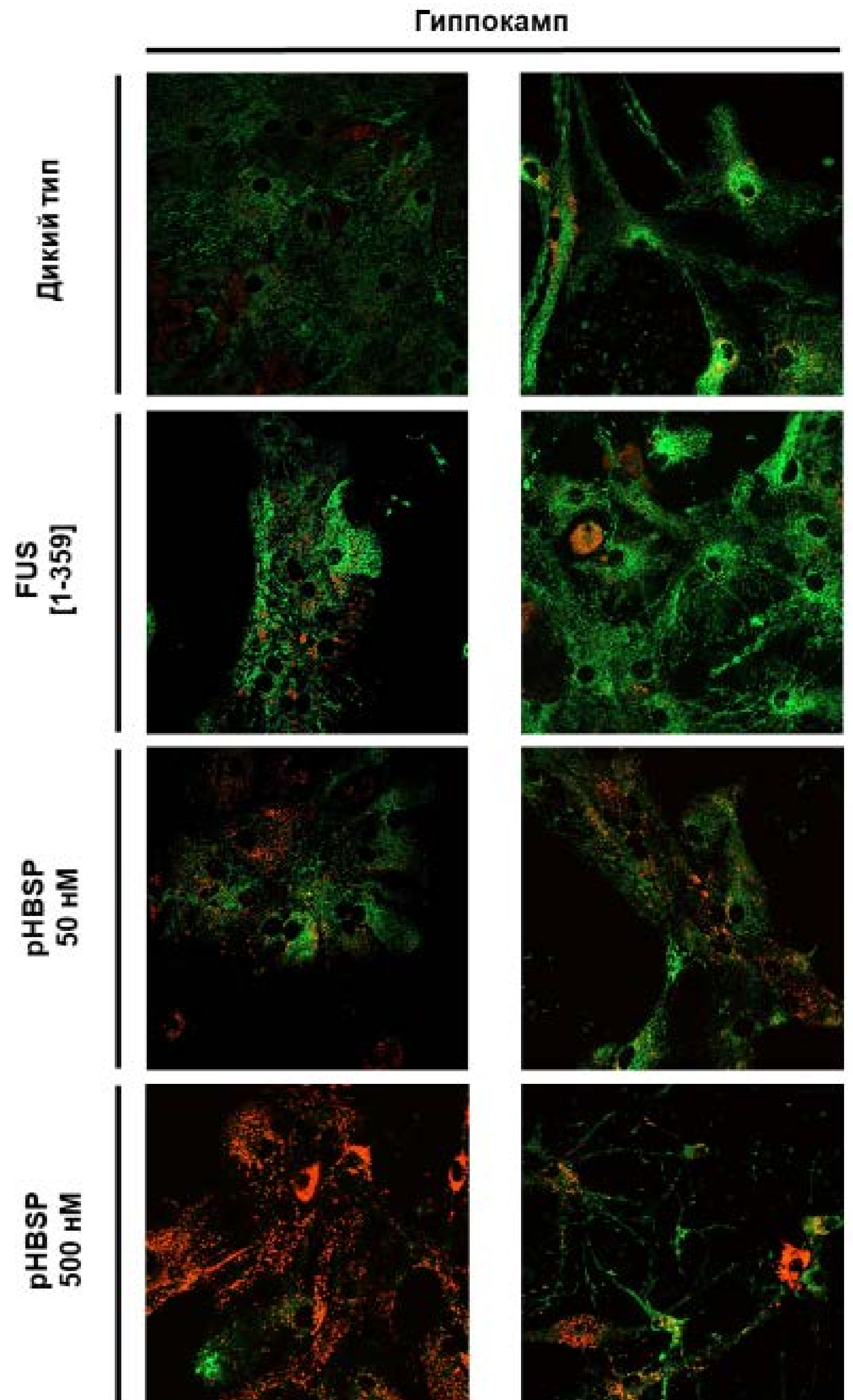
# Результаты

pHBSP увеличивает митофагию в первичной нейроглиальной культуре гиппокампа мышей FUS[1-359]



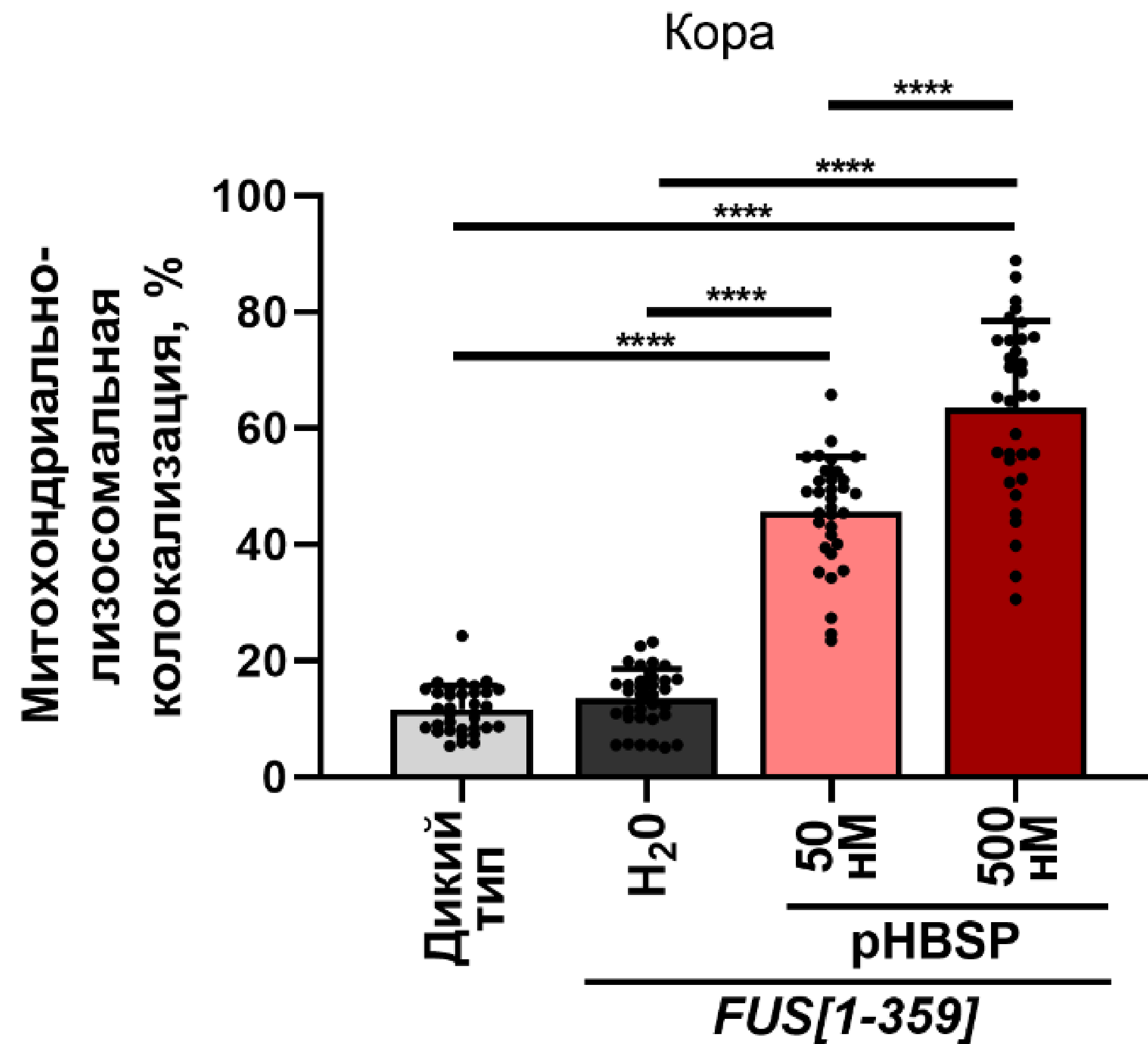
\*\*\*\*p<0,0005 (пост-хок по Тьюки)

Зеленый – MitoTracker  
Красный - LysoTracker



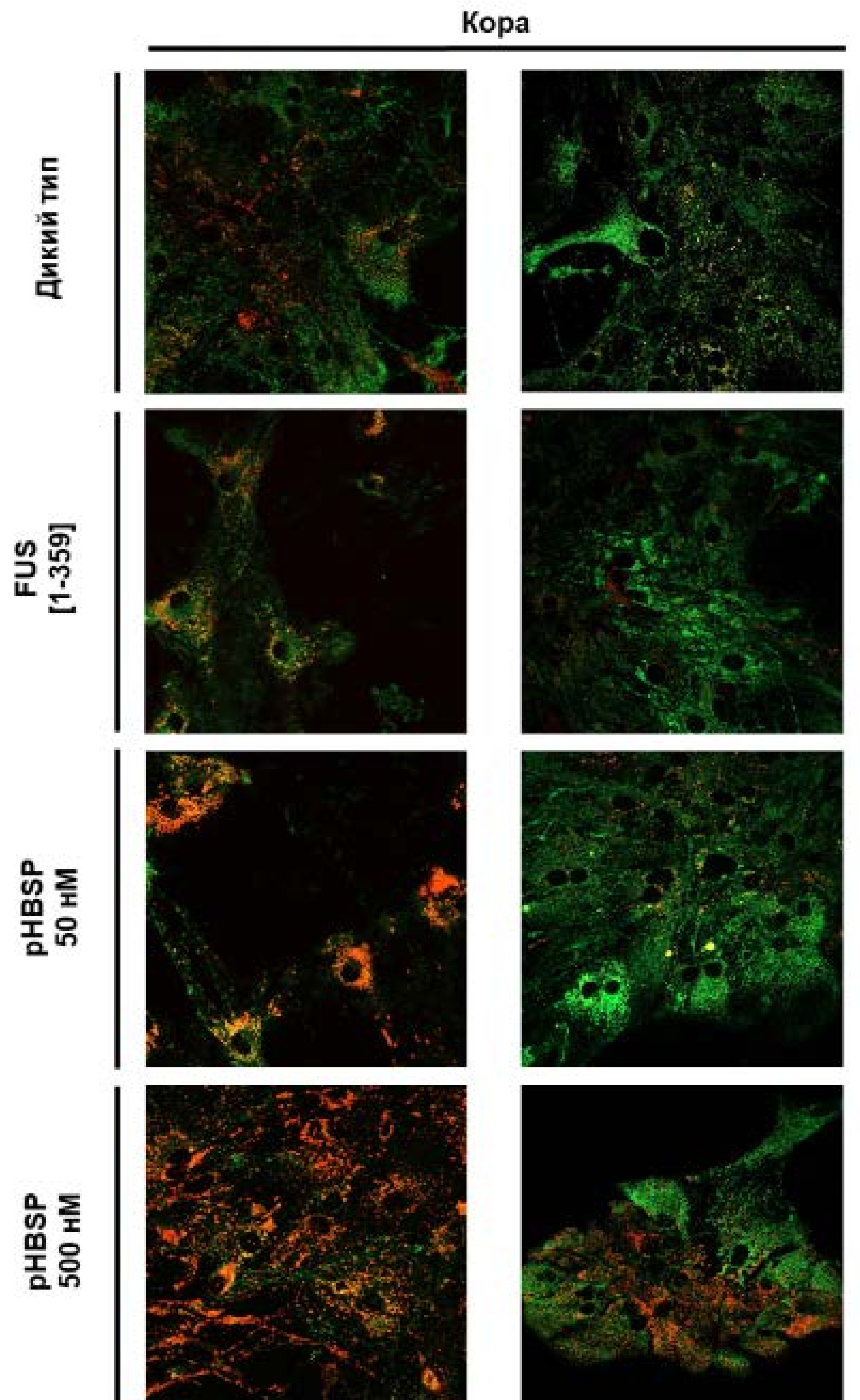
# Результаты

pHBSP увеличивает митофагию в первичной нейроглиальной культуре коры мышей FUS[1-359]



\*\*\*\*p<0,0005 (пост-хок по Тьюки)

Зеленый – MitoTracker  
Красный - LysoTracker





# Материалы и методы

В исследование было включено 24 трансгенных мыши, несущих один аллель человеческого гена *FUS*[1-359], экспрессирующегося под мышинным промотором *Thy1* (модель бокового амиотрофического склероза). Животные были разделены на 2 равные группы:

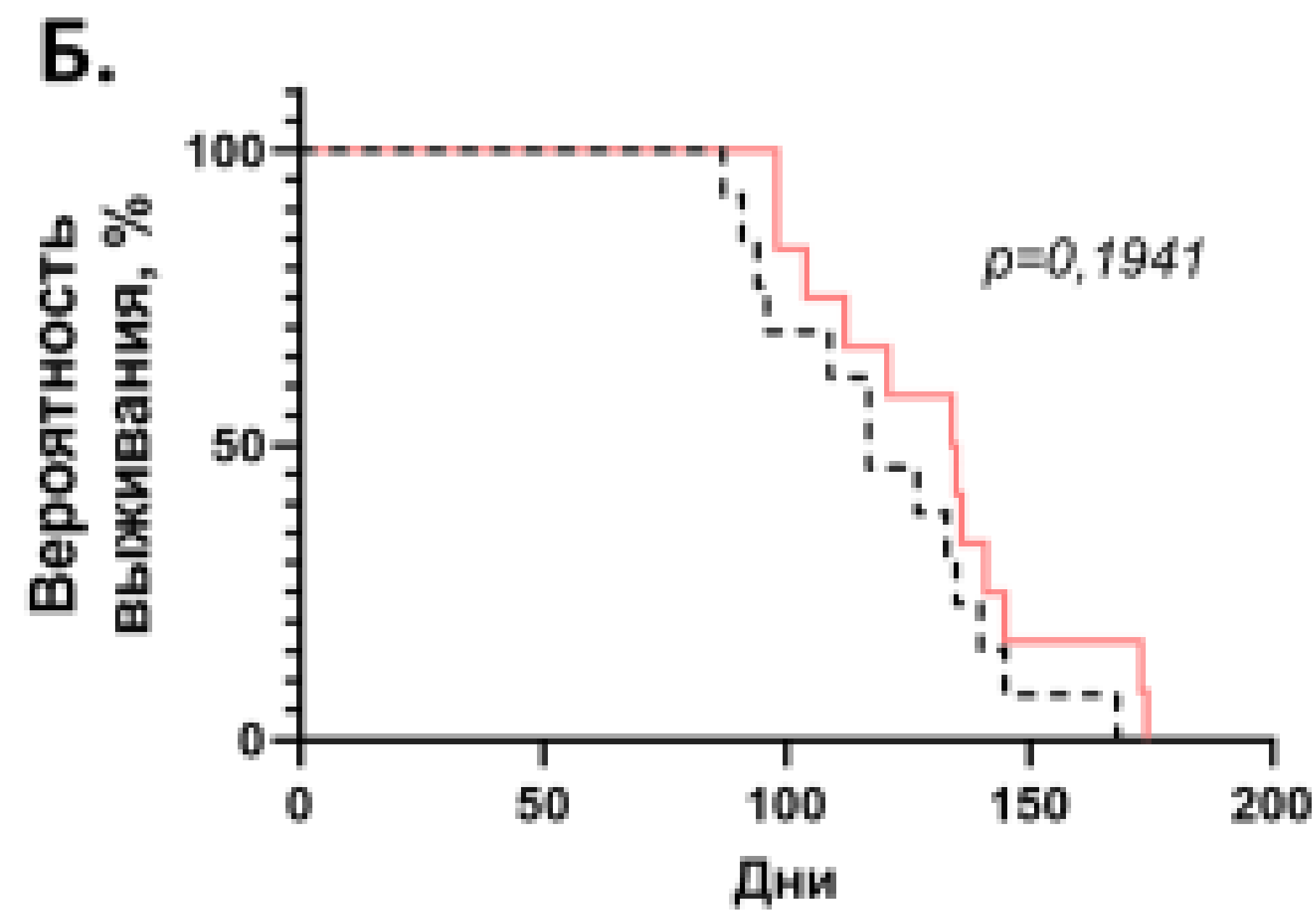
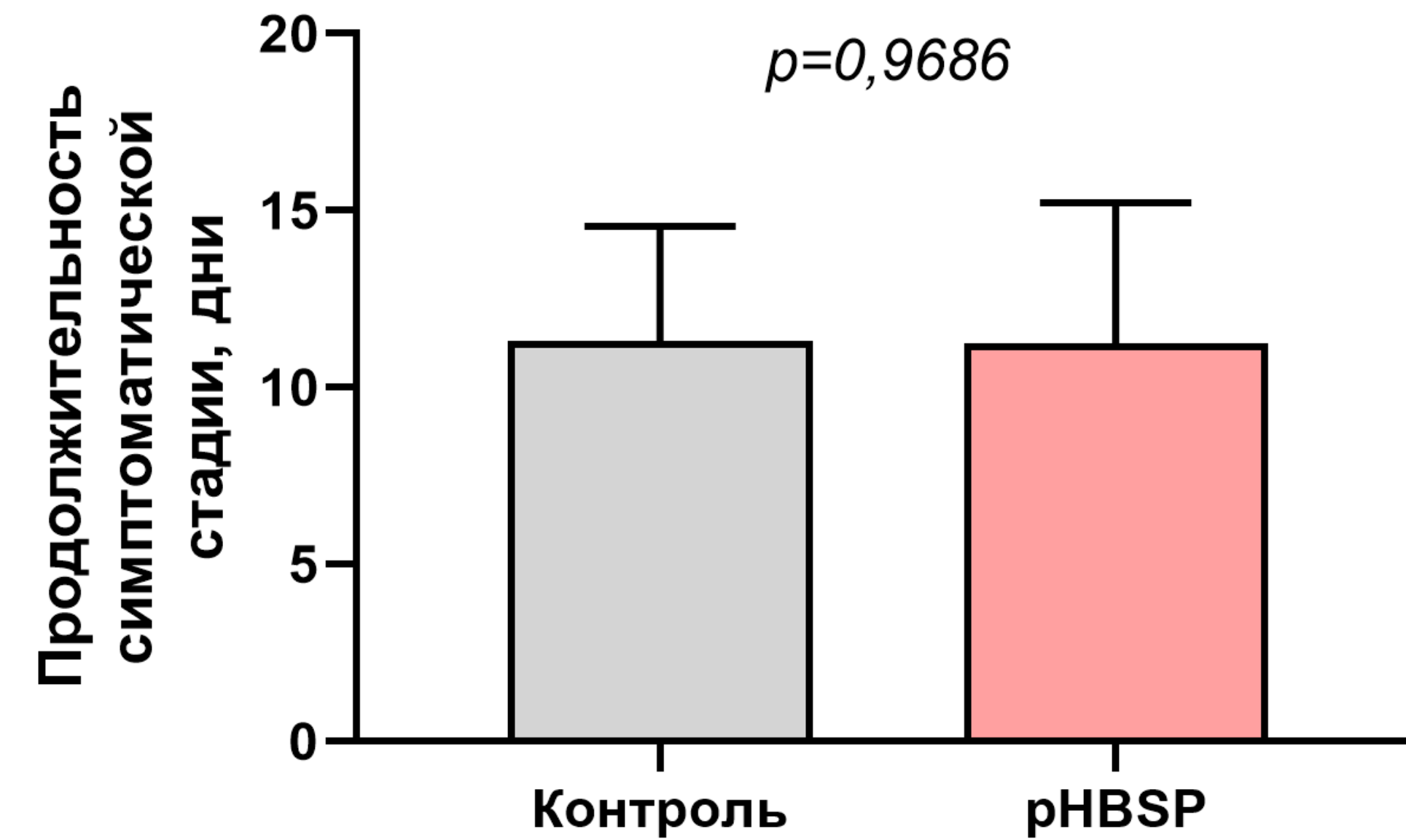
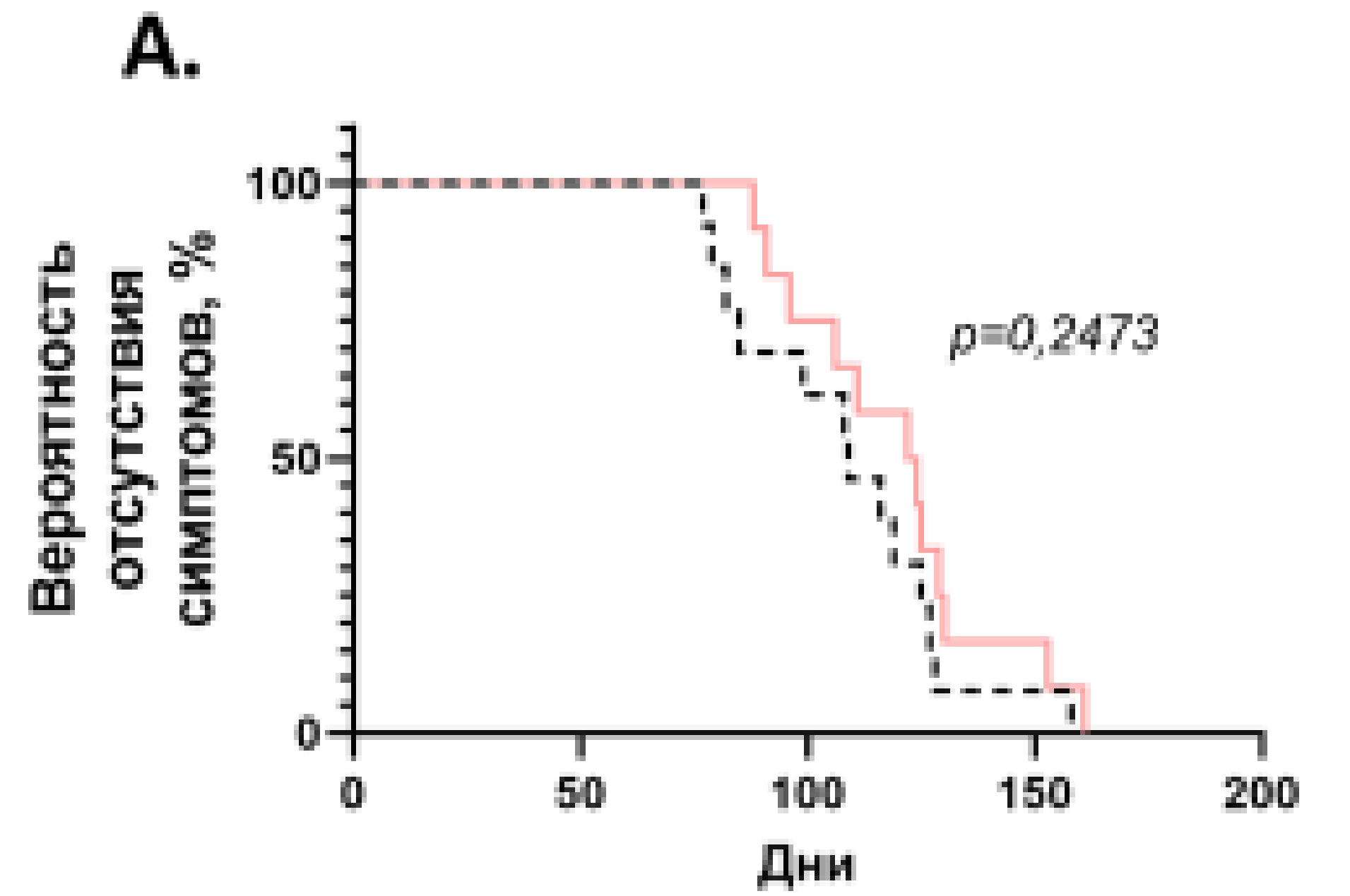
1) рНВSP – 50 мкл водного раствора рНВSP (5 мкг/мл) 2 раза в неделю подкожно, начиная с 60го дня жизни;

2) Контроль – 50 мкл воды для инъекций 2 раза в неделю подкожно, начиная с 60го дня жизни.



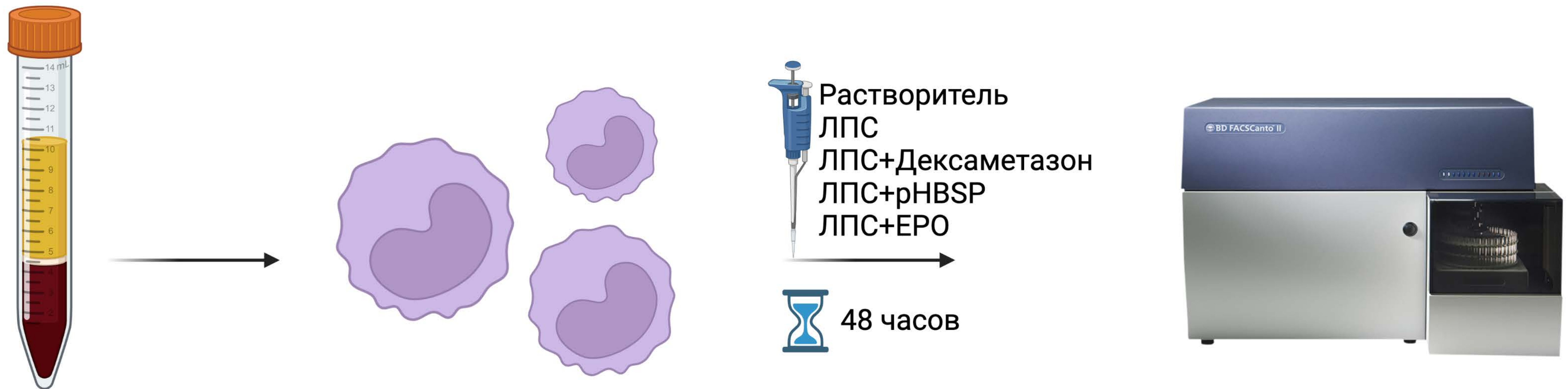
# Результаты

Влияние рНВСП на возраст манифестации и выживаемость мышей FUS[1-359]



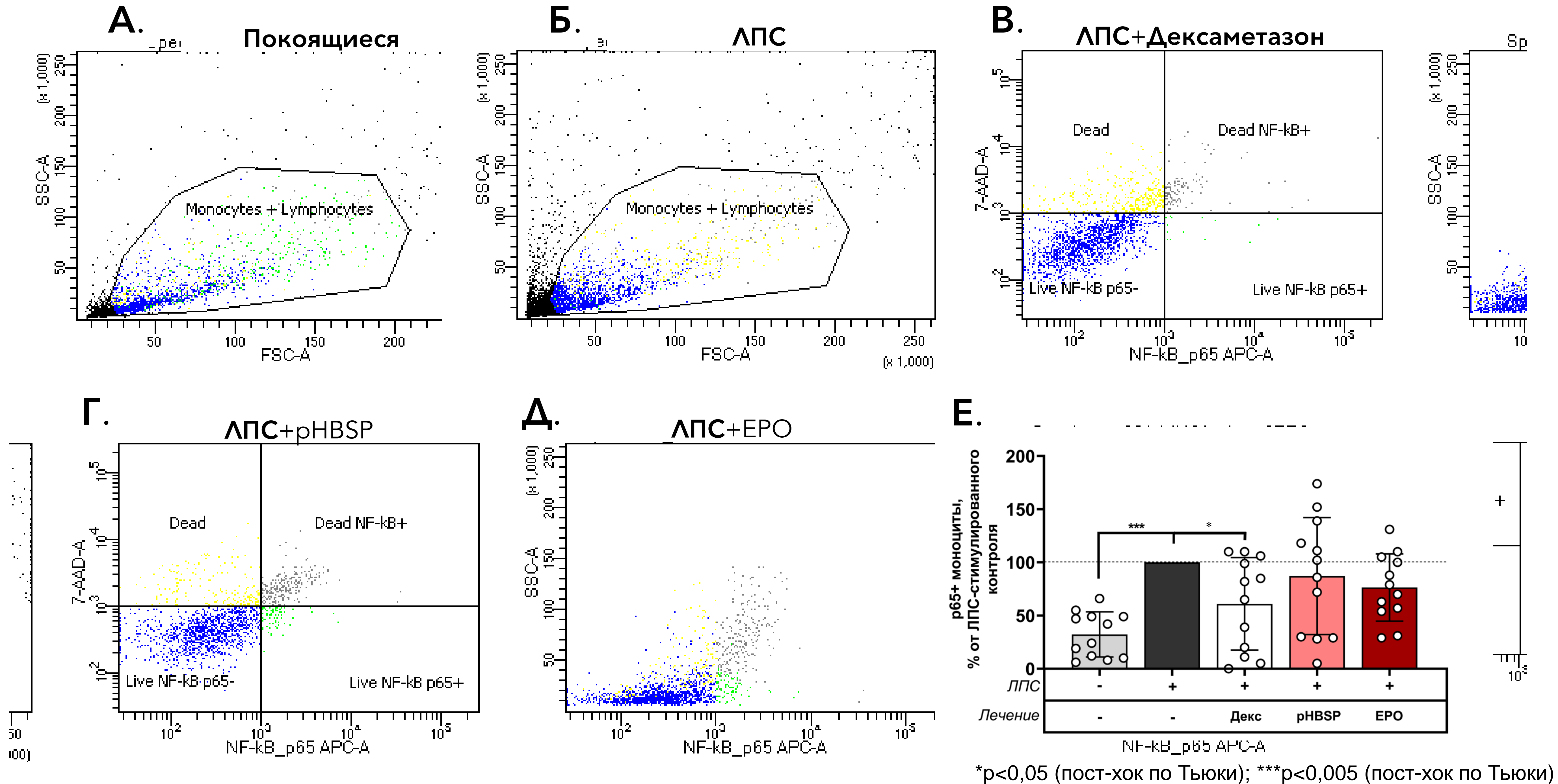
# Материалы и методы

Для определения противовоспалительной активности *in vitro* методом проточной цитометрии определяли экспрессию phospho-NF-кВ p65 в мононуклеарных клетках. Для этого выделенные на градиенте плотности фиколла мононуклеары человека стимулировали липополисахаридом (ЛПС) на фоне добавления EPO и рНВSP в конечных концентрациях 100 нМ. В качестве положительного контроля подавления фосфорилирования NF-кВ использовали дексаметазон.

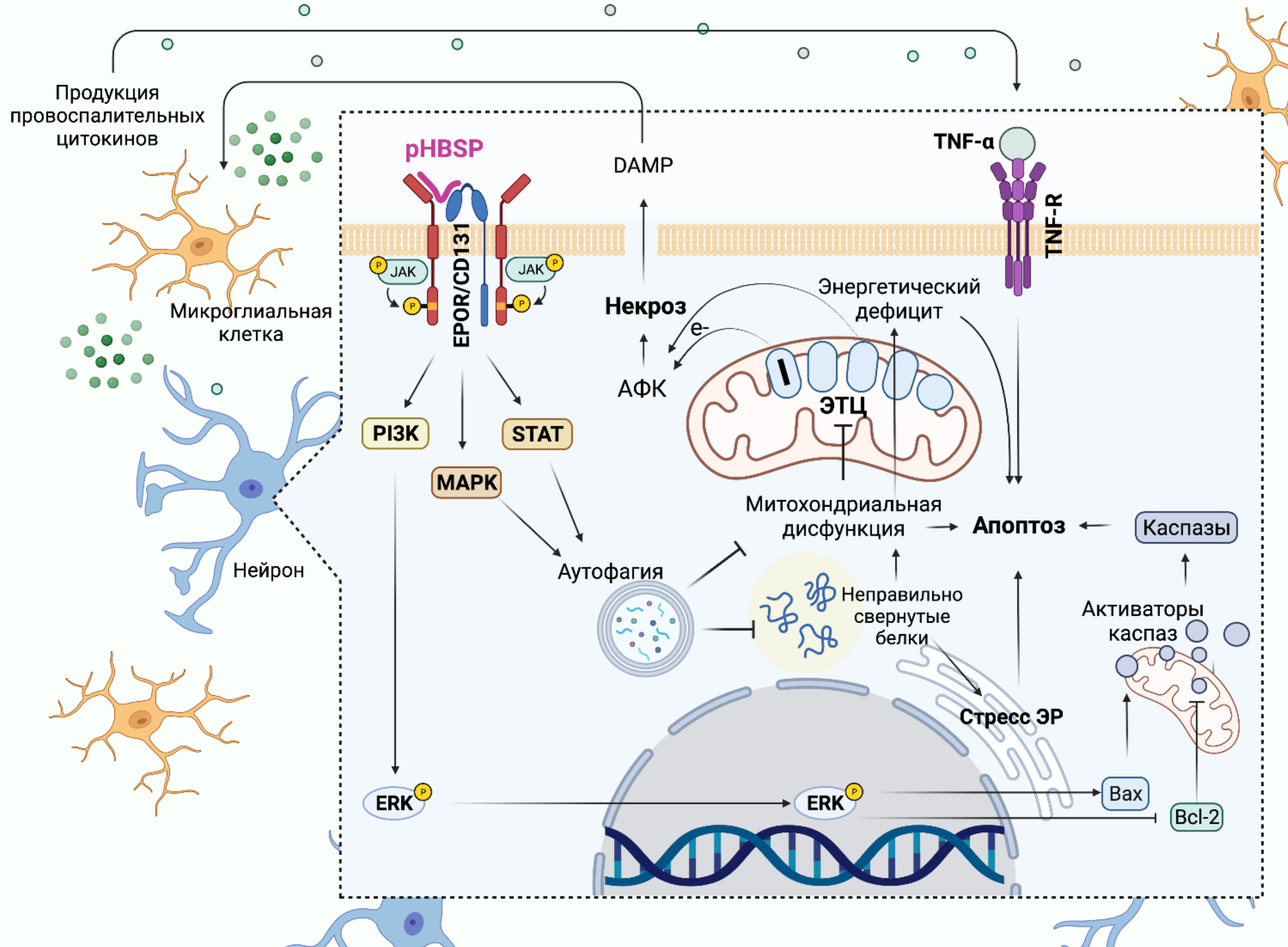


# Результаты

## Влияние рНВSP на активацию NF-κB в моноцитах человека



# Обсуждение



# Выводы:

1. 60-ти дневное применение рНВСП в дозе 5 мкг/кг 1 раз в 2 дня привело к сравнимому с ЕРО (10 мкг/кг) снижению токсического повреждения головного мозга, что проявилось в статистически значимом увеличении пройденной дистанции и времени, проведенном в центральной зоне. в тесте «Открытое поле», статистически значимому увеличению индекса дискриминации в тесте «Распознавание образов», улучшению гистологической картины префронтальной коры и гиппокампа, а также к восстановлению экспрессии генов, кодирующих нейротрофины, снижению экспрессии генов, связанных с апоптозом и воспалительным ответом, а также стимуляцией экспрессии генов, связанных с аутофагией.
2. Однократное введение рНВСП в дозе 5 мкг/кг привело к сравнимому с ЕРО (10 мкг/кг) ретинопротективному эффекту при ротенон-индуцированной ретинопатии, что проявилось в предотвращении истончения ВПС и потери ГКС, снижению экспрессии маркеров воспаления, восстановлению экспрессии *Nefl* и увеличением экспрессии генов, кодирующих белки, связанные с ауто/митофагией.
3. 4-часовая инкубация в 500 нМ растворе рНВСП улучшила показатели митохондриального дыхания и статистически значимо увеличила выживаемость после 24-часового воздействия 2 мМ раствора ротенона на первичной нейроглиальной культуре, полученной от мышей дикого типа, а также статистически значимо увеличила активность комплекса I ЭТЦ и митохондриально-лизосомальную колокализацию в первичной нейроглиальной культуре, полученной от мышей с суперэкспрессией аберрантного человеческого гена *FUS*[1-359].
4. рНВСП не оказал драматического влияния на возраст манифестации и динамику заболевания у мышей с суперэкспрессией аберрантного человеческого гена *FUS*[1-359], однако статистически незначимо увеличил общую продолжительность жизни со  $119,92 \pm 24,31$  дней в группе без лечения до  $130,92 \pm 25,81$  дней в группе с применением рНВСП ( $p=0,247$ ) и отодвинул манифестацию заболевания со  $108,62 \pm 23,84$  дня в контрольной группе до  $119,67 \pm 22,79$  дня в группе с лечением ( $p=0,194$ ).
5. рНВСП не привел к статистически значимому снижению активности NF-κB в мононуклеарных клетках человека, стимулированных ЛПС, статистически недостоверно снизив активность NF-κB до  $87,2 \pm 55,2\%$  от контроля.

# Финансирование

**Исследование было выполнено при финансовой поддержке:**

- Российского фонда фундаментальных исследований (Соглашение № 19-315-90114)
- Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1346)
- Государственного задания Лаборатории геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии (Соглашение № FZWG-2021-0016).



**Спасибо за внимание!**