

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ НИЗКОСИАЛИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА, ВКЛЮЧЕННОГО В НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ У КРЫС С ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ ГЕМАТОМОЙ

О. С. Елизарова¹, С. А. Литвинова¹, В. Ю. Балабаньян¹, И. В. Барсков², С. В. Новикова²,
Е. В. Стельмашук², Т. Л. Гарибова¹, Т. А. Воронина¹

В опытах на крысах выявлена нейропротекторная активность низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека (нсРЭЧ), сорбированного на PLGA [poly(lactic-co-glycolic) acid, полилактид-ко-гликолидные] наночастицах на модели геморрагического инсульта, вызванного интрацеребральной посттравматической гематомой (ИПГ). Установлено, что нсРЭЧ, сорбированный на PLGA наночастицах, при внутрибрюшинном введении оказывал защитный эффект у крыс с ИПГ. Ослаблял неврологические нарушения, уменьшал гибель животных, предупреждал развитие амнезии условного рефлекса пассивного избегания и уменьшал зону повреждения мозга, вызванную интрацеребральной посттравматической гематомой. Эти эффекты регистрировались в течение 7-дневного времени наблюдения. Нативный нсРЭЧ обладал значительно менее выраженным эффектом.

Ключевые слова: эритропоэтин; PLGA (полилактид-ко-гликолидные) наночастицы; интрацеребральная посттравматическая гематома; нейропротекция; морфообъем

ВВЕДЕНИЕ

Гемопоэтический ростовой фактор эритропоэтин обладает широким спектром защитных функций, основными проявлениями которых является стимуляция пролиферации и дифференцировки эритроцитов. Физиологические некроветворные функции эритропоэтина обусловлены его влиянием на центральную нервную систему. Показано, что при различных повреждениях ЦНС наблюдается синтез астроцитами эритропоэтина, который оказывает нейропротекторное действие [8], ингибируя апоптоз, стимулируя пролиферацию нейронов и ангиогенез [20]. В медицинской практике для лечения анемий различного генеза применяется рекомбинантный эритропоэтин человека (РЭЧ). По структуре РЭЧ является кислым гликопротеидом [13] и в составе углеводных цепей содержит от 4 до 17 остатков сиаловой кислоты [12], обеспечивающих биологическую активность и стабильность всей молекулы [18]. В отличие от РЭЧ, эритропоэтин, синтезируемый в мозге, имеет меньший размер (30,3 кДа), что связано с менее выраженной сиалированностью молекулы [7]. В экспериментальных исследованиях показано, что РЭЧ эффективен при ишемическом инсульте как при тотальной, так и фокальной ишемии [19], геморрагическом инсульте [21], травмах головного мозга. Вместе с тем эффект нативного РЭЧ, как нейропротектора, выявляется только в очень высоких до-

зах [10], вызывающих ряд побочных эффектов (кровообразование и антителообразование) [14]. С целью улучшения биодоступности эритропоэтина, как нейропротектора, снижения побочных эффектов, осуществлялись различные подходы. В частности, были сконструированы пептиды-миметики эритропоэтинового рецептора [6, 11], однако, они не нашли применения в медицинской практике в связи с высокой стоимостью производства. На экспериментальных моделях инсульта было показано нейропротекторное действие аналогов эритропоэтина с измененными фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами, таких как асиалированный РЭЧ, низкосиалированный РЭЧ (нсРЭЧ), карбамилированный РЭЧ, дарбепэтин (ДЭПО), карбамилированный ДЭПО (Caranesp) и мутантный ЕРО-S100E. Но, как и нативный эритропоэтин, эти негемопоэтические дериваты имели большую молекулярную массу и плохо проникали через ГЭБ [15].

В последнее время все большее внимание уделяется исследованиям, направленным на разработку транспортных систем для доставки белков и пептидов в различные органы и ткани. Одним из таких способов является включение веществ в нанотранспортные системы [3, 9, 16], в частности, наночастицы (НЧ) на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (poly(lactic-co-glycolic) acid, PLGA) [17].

Ранее было показано, что эритропоэтин, включенный в состав наночастиц на основе полибутилцианоакрилата проникает через гемато-энцефалический барьер и оказывает нейропротекторное действие [1].

Целью исследования явилось изучение нейропротекторных свойств нсРЭЧ, аналога эритропоэтина,

¹ Лаборатория психофармакологии (руководитель — проф. Т. А. Воронина) ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Зукосова РАМН”, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

² Отдел исследований мозга (руководитель — проф. С. Н. Иллариошкин) ФГБУ НЦН РАМН, Москва.

синтезируемого в мозге, включенного в состав PLGA наночастиц с человеческим сывороточным альбумином (Human Serum Albumin, HSA), покрытых плуроником F68 (далее нсРЭЧ на PLGA НЧ) на состояние, поведение и морфометрические показатели у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (ИПГ).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали нсРЭЧ (ООО “Протеиновый контур”, С.-Петербург), лиофильно высушенные НЧ (ООО “НПК “Наносистема”) на основе PLGA (Resomer 502H, Boehringer Ingelheim, Германия). Средний размер (Z-Aved) PLGA НЧ — $90,09 \pm 0,4567$ нм, степень сорбции нсРЭЧ на их поверхности составляет 81,5 %.

Изучение противоинсультных, нейропротекторных свойств соединений проводили на модели локального кровоизлияния в головном мозге — ИПГ модели геморрагического инсульта (ГИ) [2, 4]. В исследовании были использованы нелинейные крысы-самцы массой 200 – 220 г, содержащиеся в экспериментальной комнате при свободном доступе к пище и воде и обычном световом режиме. Крысам, наркотизированным хлоралгидратом (400 мг/кг внутривенно) при помощи специального устройства (мандрен — нож) в стереотаксисе осуществляли деструкцию мозговой ткани (координаты Н = 5,5 мм, L = 3,5 мм, А = 2 мм) в области внутренней капсулы (capsula interna) левого полушария, с последующим (через 2 – 3 мин) введением в место повреждения крови, взятой из-под языка животного (0,02 – 0,03 мл). Морфологические исследования показали, что таким способом достигается посттравматическая гематома в области внутренней капсулы (диаметр — 2 мм, глубина — 3 мм) без существенных повреждений расположенных выше образований мозга и неокортекса. Ложно оперированным (ЛО) животным проводили скальпирование и трепанацию черепа. НсРЭЧ и его наноформу вводили внутривенно в дозе 0,05 мг/кг. Первое введение веществ осуществляли через 3 – 3,5 ч после операции и пробуждения животного от наркоза. Повторное ежедневное применение веществ проводили на второй и третий дни после операции. ЛО животным и контрольным крысам с геморрагическим инсультом вводили по той же схеме физиологический раствор. Динамику развития ИПГ исследовали в течение 7 дней с регистрацией гибели крыс, показателей поведения и состояния животных в 1-е и 7-е сутки после операции, используя комплекс традиционных для экспериментальной психофармакологии методов [2]. Неврологический статус крыс определяли с использованием шкалы Stroke-index McGrow по балльной системе. Отмечали количество крыс с легкой (от 0,5 до 2,5 баллов) и с тяжелой (от 3 до 10 баллов) неврологической симптоматикой. Обучение и память изучали в условиях методики условного рефлекс

са пассивного избегания (УРПИ) на установке Passive avoidance фирмы Lafayette Instrument Co, США [5].

Для морфометрического измерения объема зоны повреждения мозга крыс с посттравматической гематомой были использованы две группы крыс: контрольная группа с ГИ и группа с ГИ, которой вводили нсРЭЧ на PLGA НЧ. На 7-е сутки после операции животных декапитировали, извлекали мозг и фиксировали его смесью формалин 40 % — ледяная уксусная кислота — спирт 96 % в пропорции 2:1:7. После фиксации материал переносили на сутки в 70 % спирт и резали в дистиллированной воде на вибротоме (vibratome series 1000 sectioning system Tecnical Product international inc., США) с шагом 100 мкм. Каждый второй серийный вибротомный срез последовательно монтировали на предметных стеклах, покрытых желатиной, окрашивали 0,2 % раствором метиленового синего. Далее препараты обрабатывали по стандартной гистологической методике: обезживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в балзам. Гистологические препараты и миллиметровую бумагу сканировали на слайд-приставке сканера Epson perfection V100 PHOTO. Этот метод позволяет получить файл с изображением среза мозга нежно-голубого цвета, на котором четко видна темно-синяя зона повреждения. Площадь повреждения на каждом срезе промеряли с помощью программы анализа компьютерного изображения “IMAGE J” в мм², масштабирование по миллиметровой бумаге. Объем зоны повреждения определяли по формуле цилиндра: $V = \Sigma S_n d$, где d — толщина пары срезов (200 мкм); S_n — измеренная площадь серийного среза в мм²; Σ — сумма объемов ишемического повреждения на срезах. Коэффициент эффективности защиты (КЭЗ), характеризующий эффективность действия препарата, рассчитывали по формуле: $KЭЗ = (V_0 - V_B)/V_0 \cdot 100 \%$, где V_0 — средний объем повреждения в контроле, V_B — с введением вещества.

Статистическую обработку результатов проводили по программе “Biostatistics III” с использованием параметрических и непараметрических методов Стьюдента, Крускала-Уоллиса, Манна-Уитни, Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что у ЛО животных на 7-е сутки после операции не наблюдались тяжелые неврологические нарушения — манежные движения, парезы, параличи. Такие нарушения отмечались в контрольной группе крыс с ИПГ у 50 % животных (таблица). Нативный нсРЭЧ не оказывал существенного влияния на неврологический дефицит у крыс с ИПГ, отмечалась лишь тенденция ослабления нарушений. В группе животных с ГИ, получавших нсРЭЧ на PLGA НЧ, регистрировалось статистически достоверное уменьшение количества животных с тяжелыми неврологическим дефицитом до 7,14 %.

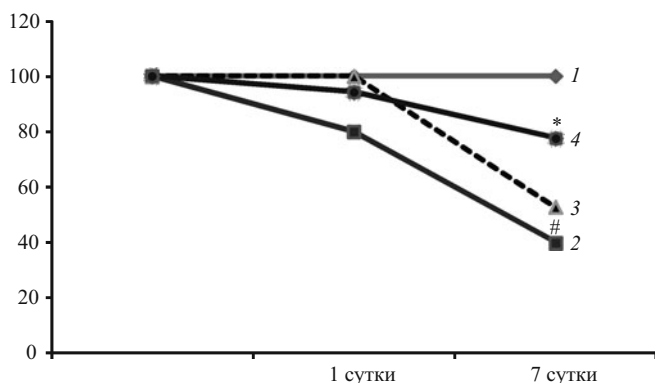


Рис. 1. Влияние веществ на выживаемость крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой, геморрагическим инсультом.

По вертикали: количество выживших животных, %; по горизонтали: время в сутках после операции. 1 — ЛО крысы, 2 — животные с ИПГ, 3 — ИПГ + нсРЭЧ (0,05 мг/кг/3 дня), 4 — ИПГ + нсРЭЧ + PLGA (0,05 мг/кг/3 дня).

— достоверность отличий от ЛО животных, * — достоверность отличий от группы крыс с ИПГ при $p < 0,05$ (критерий Фишера).

Изучение динамики выживания крыс показало, что к 7-му дню наблюдения все ЛО животные выжили (рис. 1). На фоне повторного 3-дневного введения нсРЭЧ, включенного в PLGA НЧ, к концу эксперимента выжило 77,8 % крыс, что на 37,8 % больше, чем в контрольной группе животных с ИПГ. Полученные данные свидетельствуют о защитном эффекте соединения. Менее выраженным действием обладал нативный нсРЭЧ, на его фоне к 7-м суткам выжило 52,6 % крыс.

Таким образом, более эффективным веществом, оказывающим защитный эффект при регистрации неврологических дефицитов у крыс после ГИ и предупреждающим гибель животных, был нсРЭЧ на PLGA НЧ.

Изучение влияния веществ на обучение УРПИ показало, что животные во всех четырех группах обучились условному рефлексу, т.к. при его воспроизведении на следующие сутки все 100% крыс помнили об ударе током в темной камере и не заходили туда в течение всего времени наблюдения (рис. 2). При воспроизведении УРПИ через 7 дней после обучения в группе ЛО животных 100 % крыс помнили о ситуации и не заходили в темную камеру, где получили обучающий удар током, а в контрольной группе крыс с ИПГ только 50 % животных осуществляли рефлекс пассивного избегания. Полученные результаты свидетельствуют о развитии у крыс с ИПГ нарушений памяти. НсРЭЧ на PLGA НЧ предупреждал развитие амнезии УРПИ у крыс с ИПГ, увеличивая количество животных, осуществлявших рефлекс до 100 %. У животных с ИПГ, получавших нсРЭЧ, отмечалась лишь тенденция к увеличению числа животных, осуществлявших рефлекс по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, нсРЭЧ, сорбированный на PLGA НЧ проявлял антиамнестические свойства, в значительной степени ослабляя нарушение воспроизведения УРПИ у крыс с ИПГ.

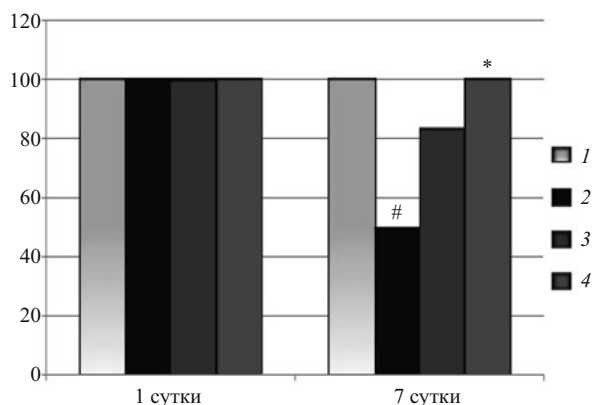


Рис. 2. Влияние веществ на обучение УРПИ у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой.

По вертикали: количество крыс, не зашедших в темную камеру при воспроизведении рефлекса, %; по горизонтали: время в сутках после обучения. 1 — ЛО, 2 — животные с ИПГ, 3 — ИПГ + нсРЭЧ (0,05 мг/кг/3 дня), 4 — ИПГ + нсРЭЧ + PLGA (0,05 мг/кг/3 дня).

— достоверность отличий от ЛО животных, * — достоверность отличий от группы крыс с ИПГ при $p < 0,05$ (критерий Фишера).

ЛО — ложнооперированные животные, ИПГ — крысы с интрацеребральной посттравматической гематомой.

Морфометрические исследования объема поврежденной зоны мозга показали, что у контрольной группы крыс с ИПГ наблюдалось значительное повреждение тканей мозга объемом в среднем $17,49 \pm 4,94 \text{ мм}^3$. В группе крыс, получавших нсРЭЧ на PLGA НЧ, площадь очага поражения была значительно меньше и составляла $5,01 \pm 1,9 \text{ мм}^3$ ($p = 0,045$). КЭЗ у крыс с ИПГ, которым вводили нсРЭЧ на PLGA НЧ, составил 71,36 %, что свидетельствует о высокой эффективности препарата. На рис. 3 представлены срезы головного мозга крыс с ИПГ в области наибольшего поражения. Видно, что у крыс с ИПГ, получавших нсРЭЧ на PLGA НЧ (справа) область поражения значительно меньше, чем у контрольных крыс с ИПГ (слева).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что нсРЭЧ, сорбированный на PLGA НЧ, оказывал защитный нейропротекторный эффект на модели геморрагического инсульта, уменьшая количество животных с тяжелыми неврологическими нарушениями.

Влияние веществ на неврологический статус крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (ИПГ)

Группа животных	Количество животных с тяжелыми неврологическими нарушениями			
	1-е сутки		7-е сутки	
	абс. пок.	отн. пок.	абс. пок.	отн. пок.
ЛО	0/10	0	0/10	0
ИПГ	4/16	25	4/8	50 [#]
ИПГ + нсРЭЧ	6/19	31,6	2/10	20
ИПГ + нсРЭЧ + PLGA НЧ	5/18	27,8	1/14	7,4*

Примечание. ЛО — ложнооперированные животные. # — достоверность отличий от ЛО, * — достоверность отличий от группы крыс с ИПГ при $p < 0,05$ (критерий Фишера).



Рис. 3. Сравнение максимальной зоны повреждения у крыс с ИПГ на срезах мозга, окрашенных метиленовым синим (7-е сутки).

Масштаб 3 мм. Слева на право: ИПГ + физ.р-р; ИПГ + нсРЭЧ + PLGA (0,05 мг/кг/3 дня).

скими нарушениями (манежные движения, парезы и параличи конечностей) сокращал число погибших крыс, предупреждал амнезию УРПИ, развивающуюся у животных с ИПГ. Менее выраженным действием обладал нативный нсРЭЧ, что, по-видимому, связано с низкой дозой препарата, которая не обеспечила достаточную концентрацию вещества в мозге для проявления существенного противоишемического эффекта. Морфометрические исследования показали, что нсРЭЧ на PLGA НЧ достоверно уменьшал у крыс с ИПГ площадь зоны очага поражения, что свидетельствует об эффективности препарата как нейропротектора.

ВЫВОДЫ

1. Низкосиалированный рекомбинантный эритропоэтин человека (РЭЧ), сорбированный на PLGA наночастицах (0,05 мг/кг/3 дня) уменьшает неврологические дефициты и количество погибших животных, восстанавливает нарушение памяти и уменьшает объем зоны поражения у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой. Нативный РЭЧ в той же дозе обладает слабым нейропротекторным эффектом.

2. Низкосиалированный рекомбинантный эритропоэтин человека, иммобилизованный на PLGA наночастицах (0,05 мг/кг/3 дня), на 7-е сутки уменьшает площадь очага и объем ишемического поражения у

крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Ю. Балабаньян, И. Н. Солев, О. С. Елизарова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **74**(10), 12 – 15 (2011).
2. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005), сс. 253 – 263.
3. Т. А. Воронина, С. С. Трофимов, Р. Н. Аляутдин и др., *Мол. мед.*, № 5, 19 – 24 (2008).
4. А. Н. Макаренко, Н. С. Косицин, С. В. Карпенко, В. А. Мишина, А. с. № 1767518 от 03.11.1990.
5. R. Ader, W. Weijnen, P. Moleman, *Physchom. Sci.*, **26**, 125 – 128 (1971).
6. M. Brines, N. S. Patel, P. Villa, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10925 – 10930 (2008).
7. M. Buemi, E. Cavallaro, F. Floccari, et al., *Clinical science*, **103**, 275 – 282 (2002).
8. M. Celik, N. Gokmen, S. Erbayraktar, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(4), 2258 – 2263 (2002).
9. D. Das, J. Lin, *Pharm. Sci.*, **94**(6), 1343 – 1353 (2005).
10. H. Ehrenreich, K. Weissenborn, H. Prange, et al., *Stroke*, **40**(12), 647 – 656 (2009).
11. O. Fan, K. K. Leuther, C. P. Holmes, et al., *Exp. Hematol.*, **34**, 1303 – 1311 (2006).
12. J. M. Ficher, *Exp. Biol. Med.*, **228**, 1 – 14 (2003).
13. F. Locatelli, P. Alijama, P. Barany, *Nephrol. Dial. Transp.*, **19**(2), 288 – 293 (2004).
14. C. Pollock, D. W. Johnson, W. H. Horl, et al., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **3**, 193 – 199 (2008).
15. A. L. Siren, T. Fabhauer, C. Bartels, H. Ehrenreich, *Neurotherapeutics*, **6**, 108 – 127 (2009).
16. G. Tosi, L. Constantino, B. Ruozi, et al., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **5**(2), 155 – 174 (2008).
17. G. Tosi, A. V. Vergoni, B. Ruosi, et al., *Journal of controlled release*, **145**, 49 – 57 (2010).
18. E. Uchida, K. Morimito, N. Kawasaki, et al., *Free Radic Res.*, **27**, 311 – 323 (1997).
19. P. Villa, J. Van Beek, A. K. Larsen, et al., *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, **27**, 552 – 563 (2007).
20. Y. Xiong, A. Mahmood, Y. Zhang, et al., *J. Neurosurg.*, **114**(2), 549 – 559 (2010).
21. J. Zhang, Y. Zhu, D. Zhou, et al., *Cytokine*, **52**(3), 252 – 257 (2010).

Поступила 01.06.12

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN-LOADED POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC) ACID NANOPARTICLES IN RATS WITH INTRACEREBRAL POSTTRAUMATIC HEMATOMA

O. S. Elizarova¹, S. A. Litvinova¹, V. Yu. Balabanyan¹, I. V. Barskov², S. V. Novikova², E. V. Stel'mashuk², T. L. Garibova², and T. A. Voronina¹

¹ Department of Psychopharmacology, Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

² Department of Brain Research, Neurology Research Center, Volokolamskoe shosse 80, Moscow, 125367, Russia

The neuroprotective activity of recombinant human erythropoietin (rhEPO) loaded poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles has been observed in rats with model intracerebral post-traumatic hematoma (hemorrhagic stroke). It is established that rhEPO-loaded PLGA nanoparticles produce a neuroprotective effect in rats with hemorrhagic stroke, which is manifested by reduced number of lethal outcomes and animals with neurological disorders. Treatment with rhEPO-loaded PLGA prevented amnesia of passive avoidance reflex (PAR), which was produced by the hemorrhagic stroke, and reduced the area of brain damage caused by the intracerebral hematoma. These effects were recorded during one-week observation period. Native rhEPO exhibited a similar, but much less pronounced effect on the major disorders caused by the model hemorrhagic stroke in rats.

Key words: Erythropoietin; poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA); nanoparticles; model of intracerebral post-traumatic hematoma; neuroprotection