

# НЕЙРОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРБАМИЛИРОВАННОГО ДАРБЭПОЭТИНА НА МОДЕЛИ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ГИППОКАМПА

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.10  
УДК 576:577.3:611.813.14:616.831  
Поступила 28.03.2019 г.

© **О.М. Широкова**, младший научный сотрудник отдела электронной микроскопии Института фундаментальной медицины<sup>1</sup>;  
**Р.А. Соколов**, младший научный сотрудник Центра трансляционных исследований<sup>2</sup>;  
**С.А. Коротченко**, научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины<sup>1</sup>;  
**В.И. Першин**, аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>2</sup>; лаборант отдела молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины<sup>1</sup>;  
**К.В. Ермин**, младший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины<sup>1</sup>;  
**М.М. Глявина**, аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>2</sup>; лаборант отдела морфологии Института фундаментальной медицины<sup>1</sup>;  
**М.А. Жученко**, к.б.н., начальник сектора<sup>3</sup>;  
**Н.Н. Андреева**, д.б.н., профессор кафедры нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова<sup>1</sup>;  
**Н.А. Щелчкова**, к.б.н., доцент кафедры нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова<sup>1</sup>; доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>2</sup>;  
зав. отделом молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины<sup>1</sup>;  
**И.В. Мухина**, д.б.н., профессор, директор Института фундаментальной медицины<sup>1</sup>;  
зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова<sup>1</sup>; профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

<sup>3</sup>ООО «ФАРМАПАРК», Научный проезд, 8, стр. 1, Москва, 117246

Активация церебральной эритропоэтиновой системы может служить перспективной стратегией для лечения различных нейродегенеративных и психоневрологических заболеваний благодаря запуску нейропротекторных механизмов и улучшению когнитивных функций. Отсутствие сведений о возможном нейротропном действии эритропоэтина снижает возможность использования мозгового рецептора к эритропоэтину в качестве терапевтической мишени при нейродегенеративных заболеваниях, связанных с гипоксией и воспалением.

**Цель исследования** — изучение влияния агониста эритропоэтинового рецептора карбамилированного дарбэпоэтина (CdEpo) на морфофункциональные характеристики нейрон-глиальных сетей первичной культуры гиппокампа мышей в условиях нормоксии.

**Материалы и методы.** Для изучения влияния стимуляции эритропоэтинового рецептора на функциональную активность нейрон-глиальных сетей гиппокампа использовали первичные культуры из диссоциированных клеток гиппокампа, полученных из эмбрионов (E18) мышей линии C57BL/6. Эксперименты проводились на 18–23-й дни развития культуры *in vitro*. Длительность воздействия CdEpo (100 нг/мл) составила 24 ч. Функциональные изменения оценивали по электрической и метаболической активности клеток культуры с использованием методов локальной фиксации потенциала (patch clamp), мультиэлектродной регистрации биоэлектрической активности нейронных сетей и кальциевого имиджинга соответственно. Морфологические характеристики клеток первичной культуры гиппокампа исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

**Результаты.** Воздействие CdEpo в течение суток на клетки первичной культуры гиппокампа не влияло на частоту спонтанных одиночных потенциалов действия, спонтанную пачечную активность клеток, на характеристики потенциалов действия нейронов (амплитуду фазы деполяризации, пороговый потенциал, амплитуду фазы гиперполяризации), емкость мембраны; не оказывало воздействия на биоэлектрические параметры сетевой активности нейронов (число спайков в составе сетевой пачки, длительность сетевой пачки и межпачечный интервал), кальциевую активность нейронов и глиальных клеток, определяемую по параметрам длительности и частоты спонтанных кальциевых осцилляций. На ультраструктурном уровне под влиянием CdEpo не изменялось количество зрелых асимметричных синаптических контактов, но происходил морфогенез внутренней структуры дендритных шипиков:

**Для контактов:** Широкова Олеся Михайловна, e-mail: shirokovaom@gmail.com

повышалось число шипиков с эндоплазматическим ретикуломом и/или шипиковым аппаратом внутри, что является уникальным явлением для модели первичной культуры гиппокампа.

**Заключение.** На модели первичной культуры гиппокампа выявлено отсутствие нейротропного действия CdEpo — по параметрам биоэлектрической активности одиночных нейронов, нейронных сетей, а также активности астроцитарных сетей — по параметрам изменения концентрации внутриклеточного кальция (кальциевых осцилляций) в условиях нормоксии. В то же время CdEpo вызывает в некоторых нейронах изменение внутренней организации дендритных шипиков с появлением в них шипикового аппарата. Отсутствие влияния CdEpo на работу интактных нейронов и глии свидетельствует об относительной безопасности использования данной молекулы в терапевтических целях в качестве цитопротектора для тканей мозга.

**Ключевые слова:** эритропоэтиновый рецептор; гиппокамп; первичные культуры гиппокампа; нейрон-глиальные сети; ультраструктура нейронов; шипиковый аппарат; метод локальной фиксации потенциала; кальциевый имиджинг.

**Как цитировать:** Shirokova O.M., Sokolov R.A., Korotchenko S.A., Pershin V.I., Ermin K.V., Glyavina M.M., Zhuchenko M.A., Andreeva N.N., Shchelchkova N.A., Mukhina I.V. Neurotropic effect of carbamylated darbepoietin on the model of primary hippocampal culture. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 87–94, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.10>

English

## Neurotropic Effect of Carbamylated Darbepoietin on the Model of Primary Hippocampal Culture

**O.M. Shirokova**, Junior Researcher, Electron Microscopy Department, Institute of Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**R.A. Sokolov**, Junior Researcher, Center for Translational Research<sup>2</sup>;

**S.A. Korotchenko**, Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**V.I. Pershin**, PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>2</sup>;

Laboratory Assistant, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**K.V. Ermin**, Junior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**M.M. Glyavina**, PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>2</sup>;

Laboratory Assistant, Morphology Department, Institute of Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**M.A. Zhuchenko**, PhD, Chief of Section<sup>3</sup>;

**N.N. Andreeva**, DSc, Professor, Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov<sup>1</sup>;

**N.A. Shchelchkova**, PhD, Associate Professor, Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov<sup>1</sup>;

Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>2</sup>;

Head of Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**I.V. Mukhina**, DSc, Professor, Director of the Institute of Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov<sup>1</sup>; Professor,

Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

<sup>2</sup>National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

<sup>3</sup>LLC "FARMAPARK", 8/1 Nauchny proyezd, Moscow, 117246, Russia

Activation of the cerebral erythropoietin system can be a promising strategy for the management of various neurodegenerative and neuropsychiatric diseases as it triggers neuroprotective mechanisms and improves cognitive functions. Lack of information about the possible neurotrophic effect of erythropoietin reduces the possibility of using the brain receptor for erythropoietin as a therapeutic target in neurodegenerative diseases associated with hypoxia and inflammation.

**The investigation aims** to study the influence of the erythropoietin receptor agonist — carbamylated darbepoietin (CdEpo) — on the morphofunctional features of neuron-glia networks of primary hippocampal cultures in mice under normoxia.

**Materials and Methods.** Primary hippocampal cell cultures dissociated from embryos (E18) of C57BL/6 mice were used to study the influence of erythropoietin receptor stimulation on the functional activity of hippocampal neuron-glia networks. The experiments were carried out on days 18–23 of culture development *in vitro*. CdEpo (100 ng/ml) action duration was 24 h. Functional changes were assessed based on the electrical and metabolic activity of cultured cells using patch-clamp techniques, multielectrode registration of bioelectric activity in neural networks and calcium imaging, respectively. The morphological features of primary hippocampal cell cultures were studied using transmission electron microscopy.

**Results.** Treatment of primary hippocampal cell cultures with CdEpo during 24 h did not affect the frequency of spontaneous single action potentials, spontaneous burst activity of cells, the patterns of neuron action potentials (the amplitude of depolarization phase, threshold potential, the amplitude of hyperpolarization phase), membrane capacity. It did not affect the bioelectric parameters of neural network activity (the number of spikes in a network burst, network burst duration, and inter-burst interval), calcium activity of neurons and

glial cells determined by the duration and frequency parameters of spontaneous calcium oscillations. At the ultrastructural level, the number of mature asymmetric synaptic contacts remained unchanged under the influence of CdEpo, but there was a morphogenesis of the internal structure of dendritic spines: the number of spines with endoplasmic reticulum and/or the spine apparatus inside increased, which was a unique phenomenon for a model of primary hippocampal culture.

**Conclusion.** There was revealed no neurotropic effect of CdEpo on the model of primary hippocampal culture as reflected by bioelectric activity parameters of single neurons, neuronal networks, and astrocytic network activity evident in the parameters of intracellular calcium concentration changes (calcium oscillations) under normoxia conditions. However, CdEpo causes changes in the internal structure of dendritic spines in some neurons with the spine apparatus appearing in them. The absence of CdEpo effect on the functions of intact neurons and glia indicates the relative safety of using this molecule for therapeutic purposes as cytoprotection for the brain tissue.

**Key words:** erythropoietin receptor; hippocampus; primary hippocampal cultures; neuron-glia networks; neuronal ultrastructure; spine apparatus; patch-clamp technique; calcium imaging.

## Введение

Активация эритропоэтиновой системы головного мозга может служить перспективной стратегией для лечения различных нейродегенеративных и психоневрологических заболеваний благодаря запуску нейропротекторных механизмов и улучшению когнитивных функций [1, 2]. Оказалось, что выделяемый астроцитами эритропоэтин не только участвует в активации эритропоэза, но и стимулирует миграцию нейробластов в область ишемического повреждения мозга, т.е. регенерацию нервной ткани [3]. Выяснено, что транскрипционным фактором, запускающим экспрессию гена эритропоэтина в астроцитах при гипоксии, является *hypoxia-inducible factor 2 (HIF-2)* [4].

Нейропротекторное действие эритропоэтина (EPO) осуществляется предположительно через гетеромерный гетеродимерный тканевой протекторный рецептор, включающий субъединицу общего бета-рецептора ( $\beta cR$ , или CD131) [5] и по структуре отличающийся от классического гомодимерного эритропоэтинового рецептора (EpoR), участвующего в эритропоэзе [6]. Кроме того, для запуска механизма нейропротекции достаточно кратковременного доступа лиганда к гетеродимерному рецептору, тогда как для стимуляции эритропоэза с помощью гомодимерного EpoR требуется длительное воздействие лиганда [7]. Белок  $\beta cR$  относится к подсемейству рецепторов цитокинов 1-го типа и может образовывать гетеромерные рецепторы с субъединицами рецепторов к IL-3, IL-5 и GM-CSF. Установлено, что в ответ на клеточный стресс встраивание  $\beta cR$  в клеточную мембрану может изменяться [8]. Трудность в исследовании рецепторов к эритропоэтину в мозге заключается в отсутствии надежных коммерческих антител к комплексному гетеродимерному рецептору [9, 10]. На данный момент молекулярные механизмы действия эритропоэтина и его дериватов в головном мозге остаются неясными. В частности, нет данных об их возможном нейротропном действии, что снижает возможность использования мозгового рецептора к эритропоэтину в качестве терапевтической мишени при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе связанных с гипоксией и воспалением.

В нашем исследовании в качестве агониста к гетеродимерному рецептору предлагается карбами-

лированная форма дарбэпоэтина (CdEpo). CdEpo получают путем карбамилирования всех аминокислотных остатков лизина, входящего в молекулу дарбэпоэтина, а также аминокислотного остатка аланина в N-концевой области белка. Карбамилирование эритропоэтина приводит к модификации сайтов связывания молекулы с рецептором EpoR, в частности высокоаффинного сайта Pro42-Trp51, содержащего остаток лизина Lys45. Предполагается, что потеря кроветворной активности является результатом карбамилирования именно этого остатка [11].

Поскольку применение агониста гетеродимерного эритропоэтинового рецептора в качестве нейропротектора предполагает взаимодействие с клетками нервной системы, необходимо оценить возможности CdEpo оказывать нейротропное действие. В связи с этим **целью исследования** явилось изучение влияния карбамилированного дарбэпоэтина на морфофункциональные характеристики клеток нейрон-глиальных сетей в модели первичной культуры гиппокампа мышей.

## Материалы и методы

**Первичные культуры гиппокампа.** В качестве объекта исследования использованы первичные культуры гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6 (E18) и культивируемые в течение 23 сут. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, указанным в приказе Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», Национальном стандарте Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»), санитарно-эпидемиологических правилах 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 №51 и согласованы с Этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета.

Диссоциация клеток достигалась путем обработки ткани гиппокампа 0,25% трипсином (25200-056; Invitrogen, США). Смену культуральной среды осуществляли через день. Жизнеспособность культур поддерживали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре

35,5°C в газовой смеси, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Для изучения были взяты клеточные культуры на 18–23-е сутки развития *in vitro*. Предварительные электронно-микроскопические исследования показали [12], что на данном этапе развития первичной культуры нейроны взаимодействуют в сети в основном с помощью зрелых синаптических контактов. Регистрацию функциональной активности нейрон-глиальных сетей осуществляли через 24 ч после добавления в культуральную среду карбамилированного дарбэпоэтина (100 нг/мл).

**Кальциевый имиджинг.** С использованием флуоресцентной микроскопии, реализованной на базе конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss, Германия), осуществляли мониторинг функциональной активности нейронов и глии по параметру кратковременного изменения внутриклеточной концентрации кальция (кальциевые осцилляции). В качестве кальциевого зонда использовали Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (Thermo Fisher Scientific, США). Записи кальциевых осцилляций (событий) длились 10 мин с частотой смены кадров 4 с<sup>-1</sup>. Полученные серии изображений обрабатывали с помощью оригинального программного обеспечения [13]. Данная программа позволяет построить график зависимости интенсивности флуоресценции от времени для каждой клетки и отметить на них осцилляторные события, а также дает возможность определить такие параметры, как частоту и длительность кальциевых событий.

**Электрическая активность.** Электрофизиологические показатели единичных нейронов в составе сетей первичных культур гиппокампа мышей определяли методом локальной фиксации потенциала (patch clamp) в конфигурации «целая клетка». Для его реализации использовали установку SliceScope Pro 2000 (Scientifica, Великобритания), усилитель Double patch clamp EPC-10 USB (HEKA Elektronik, Германия), устройство для изготовления микропипеток Flaming Brown Micropipette Puller, model P-97 (Sutter Instrument CO, США), перистальтический насос Masterflex L/S (Cole-Parmer Instrument, Малайзия), фотовидеокамеру AxioCam ICm 1 (Carl Zeiss, Германия), капилляры из боросиликатного стекла GC120F-7.5 (Harvard Apparatus, Великобритания), а также программное обеспечение для записи и обработки электрофизиологических данных PatchMaster (HEKA Elektronik, Германия), MiniAnalysis (Synaptosoft Inc., США).

Для измерения активности нейронов использовали внеклеточный раствор, содержащий (ммоль): NaCl — 130; KCl — 2,5; MgCl<sub>2</sub> — 1,5; CaCl<sub>2</sub> — 1,5; глюкозу — 10; HEPES — 10 при 24°C, осмолярности 300±5 мосм, pH — 7,3–7,4; а также внутриклеточный раствор (ммоль): K-gluconate — 130; HEPES — 10; EGTA — 2; L-аскорбиновая кислота — 3; MgCl<sub>2</sub> — 2; Na<sub>2</sub>-GTP — 1 и Na<sub>2</sub>-ATP — 2 (pH=7,2; осмолярность — 295±3 мосм). Для блокирования натриевых токов при записи спонтанных возбуждающих постсинаптических токов ис-

пользовали аналогичный внутриклеточный раствор с бромидом QX-314 в концентрации 2 мМ.

В работе задействованы клетки с сопротивлением доступа ниже 20 МОм и током утечки –100 ... 100 пА. Потенциал покоя для нейронов поддерживался на уровне –70 мВ. Были исследованы такие параметры потенциала действия, как его амплитуда — высчитывалась по точкам от подпорогового потенциала до точки овершута; амплитуда гиперполяризации — по разнице между нижней точкой периода гиперполяризации после потенциала действия и базовой линией стимуляционной ступеньки, на которой этот потенциал возник; амплитуда порогового потенциала — по скорости нарастания потенциала каждой из клеток. Перечисленные выше параметры определяли по первому потенциалу действия на пороговом стимуле. Спонтанную активность нейронов в составе клеточной культуры регистрировали на протяжении 5 мин. Емкость мембраны тестировали подачей импульса в 5 мВ и высчитывали по изменению тока.

Для построения графиков и статистического анализа использовали программу GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., США).

**Мультиэлектродная регистрация нейросетевой активности.** Известно, что нейронная сеть мозга рассматривается как структурно-функциональная единица, отвечающая за процессы обработки, хранения и воспроизведения информации. При мультиэлектродной регистрации сетевой активности *in vitro* первичные культуры клеток мозга, в частности гиппокампа, выращивали непосредственно на мультиэлектродных матрицах. Регистрацию спонтанной биоэлектрической активности проводили с использованием матрицы мультиэлектродной системы MEA60 (Multichannel Systems, Германия) при стандартных условиях окружающей среды: температуре, содержании углекислого газа и кислорода, влажности [14].

Для получения данных использовали набор программного обеспечения MC Rack (Multichannel Systems, Германия). Исследовали основные характеристики спонтанной биоэлектрической активности нейронной сети: частоту и длительность малых сетевых пачек, количество спайков в пачке, длительность межпачечного интервала, процент свободных спайков.

**Электронная микроскопия.** Для электронно-микроскопических исследований обработку ткани проводили по стандартной методике. В качестве фиксаторов использовали последовательно 2,5% раствор глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH=7,4) и 1% раствор четырехокси осмия с феррицианидом калия. Материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (до 100% спирта), далее — в 100% ацетоне. После обезвоживания обрабатывали смесью (1:1) 100% ацетона и смеси смол Epon-Araldit в течение 1 ч. После этого ткань заключали в смесь Epon-Araldit еще на 1 ч с последующей полимеризацией смолы. Ультратонкие срезы выполняли на ультратоме

Leica EMT UC7 (Leica Microsystems, Германия). Их контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по методу Reynolds, затем просматривали в электронном микроскопе Morgagni 268D (FIE, США). Подсчет синаптических контактов осуществляли в пяти полях зрения площадью 1600 мкм<sup>2</sup>.

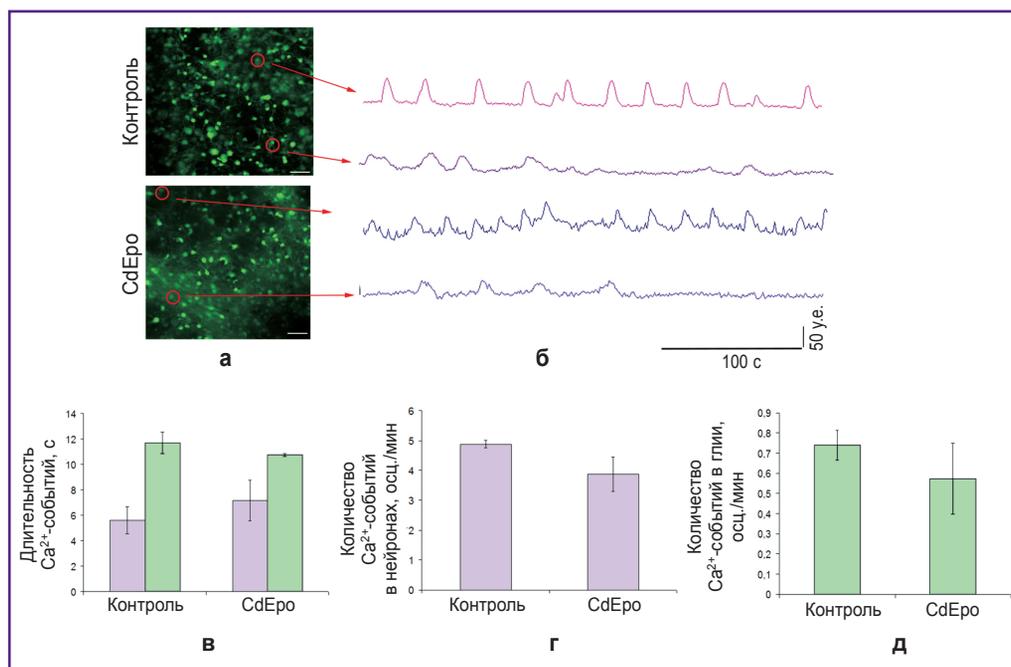
**Статистика.** Полученные данные изменения флюоресценции красителя Oregon Green 488 BAPTA-1 AM, отражающие динамику внутриклеточного кальция (частота и длительность кальциевых событий), морфометрические и электрофизиологические данные представлены в работе в виде среднего ± стандартная ошибка среднего (M±SEM). Достоверность статистических различий выборок проверяли с помощью непараметрического теста Манна–Уитни. Для выявления статистически значимых различий в характеристиках биоэлектрической активности использовали метод анализа ANOVA по одному параметру с применением теста Стьюдента–Ньюмана–Кельса, статистически значимыми считали различия выборок при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Исследование метаболической активности по параметру кратковременного изменения концентрации внутриклеточного кальция позволило оценить такие характеристики функционирования нейрон-глиальной

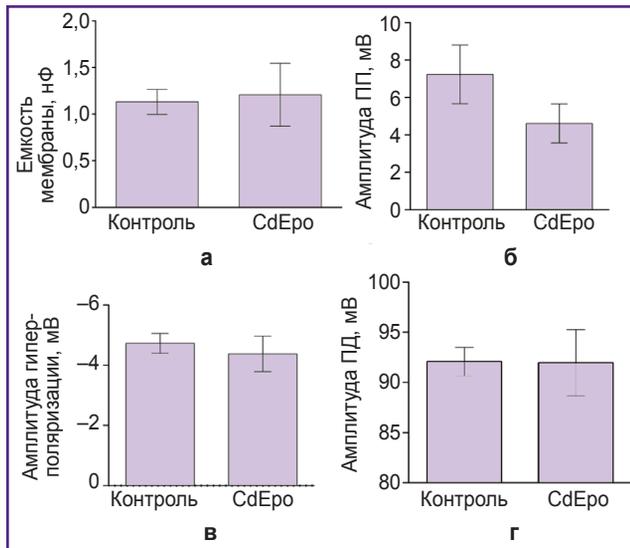
сети, как длительность и частота кальциевых событий (рис. 1). Карбамилированный дарбэпоэтин статистически значимо не влиял на частоту кальциевых осцилляций в нейронах ( $4,88 \pm 0,12$  с — в контроле и  $3,87 \pm 0,57$  с — в экспериментальной группе) и глие ( $0,74 \pm 0,07$  и  $0,57 \pm 0,17$  с соответственно) и на среднюю длительность кальциевых событий в нейронах ( $5,6 \pm 1,05$  с — в контроле и  $7,17 \pm 1,59$  с — в экспериментальной группе) и глиальных клетках ( $11,7 \pm 0,85$  и  $10,75 \pm 0,11$  с соответственно).

Проводимые электрофизиологические исследования показали отсутствие под действием CdEpo статистически значимых изменений следующих параметров потенциалов действия: размер ( $92,10 \pm 1,42$  мВ — в контроле и  $91,98 \pm 3,30$  мВ — в экспериментальной группе) (рис. 2, а); величина гиперполяризации ( $-4,75 \pm 0,33$  мВ — в контроле и  $-4,38 \pm 0,59$  мВ — в экспериментальной группе) (рис. 2, в); величина порогового потенциала, необходимого для возникновения потенциала действия ( $7,24 \pm 1,57$  мВ — в контроле и  $4,62 \pm 1,04$  мВ — при инкубации с CdEpo) (рис. 2, б). Емкость мембраны ( $1,132 \pm 0,1330$  нФ — в контроле и  $1,209 \pm 0,3371$  нФ — в экспериментальной группе) (рис. 2, а) также не подверглась изменениям после обработки культур CdEpo. Отсутствовали статистически значимые изменения в частоте спонтанного возникновения потенциалов действия ( $p = 0,2398$ ).

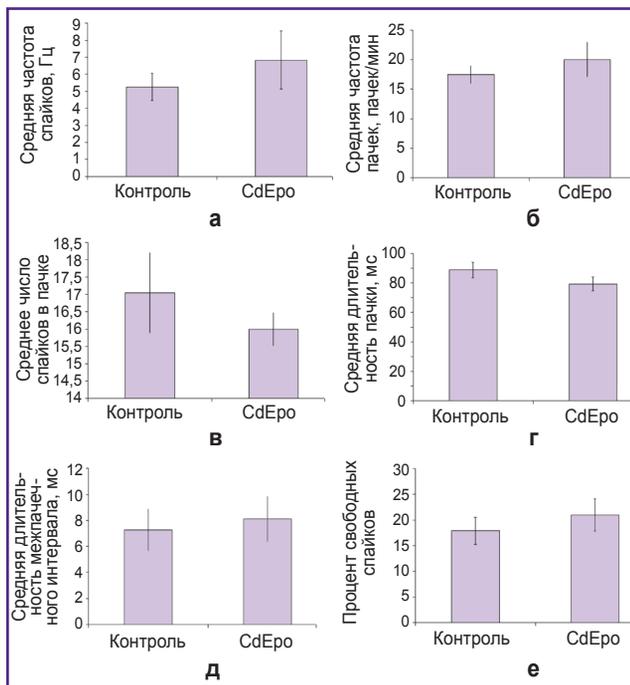


**Рис. 1. Влияние CdEpo на характеристики кальциевой активности:**

а — флюоресцентные изображения диссоциированных клеток, окрашенных Oregon Green 488 BAPTA-1 AM; б — примеры кривых изменения абсолютной интенсивности флюоресценции Oregon Green 488 BAPTA-1 AM во времени в контрольной и экспериментальной группах, масштаб по горизонтали — 100 с, по вертикали — 50 усл. ед.; в — средняя длительность одиночных кальциевых осцилляций; г — средняя частота одиночных кальциевых осцилляций в нейронах; д — средняя частота одиночных кальциевых осцилляций в глие

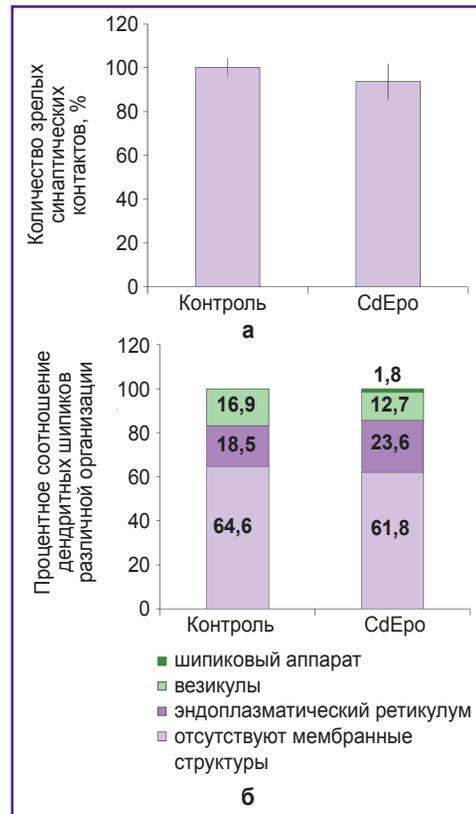


**Рис. 2. Электрофизиологические параметры нейронов после 24 ч инкубации клеток с CdEpo (100 нг/мл):** а — емкость мембраны; б — амплитуда порогового потенциала (ПП); в — амплитуда гиперполяризации; г — амплитуда потенциала действия (ПД)



**Рис. 3. Влияние CdEpo (50 нг/мл) на биоэлектрические показатели нейросетевой активности культур диссоциированных клеток гиппокампа:** а — частота спайков; б — частота пачек; в — число спайков в пачке; г — длительность пачек; д — длительность межпачечного интервала; е — свободные (не входящие в состав пачек) спайки в межпачечном интервале

Исследование нейросетевой активности не выявило статистически значимых различий в первичных культурах гиппокампа при добавлении карбамилоро-



**Рис. 4. Характеристики синаптических контактов в нейросетях первичных культур гиппокампа и соотношение дендритных шипиков с различной внутриклеточной организацией через 24 ч инкубации клеток с CdEpo (100 нг/мл):**

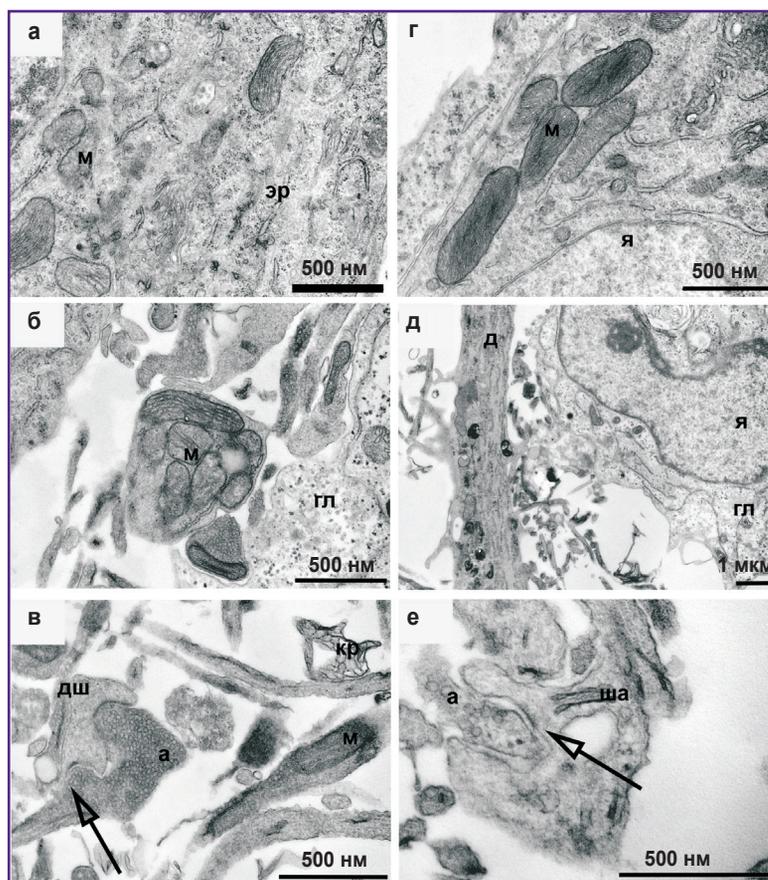
а — количество зрелых асимметричных химических синапсов; б — процентное соотношение дендритных шипиков с различной внутренней организацией в контрольной и экспериментальной группах

ванного дарбэпоэтина (рис. 3). Неизменными оставались как параметры спайков в пачке (рис. 3, а, в), так и характеристики самих пачек импульсов (рис. 3, б, г, д), а также процент свободных спайков нейронов, не вовлеченных в нейросетевую активность (рис. 3, е).

Ультраструктурный анализ синаптического пула нейронных сетей первичной культуры гиппокампа не обнаружил статистически значимых различий по количеству зрелых химических асимметричных контактов между группами (рис. 4, а). В то же время выявлено увеличение количества дендритных шипиков с эндоплазматическим ретикулумом и шипиковым аппаратом (рис. 4, б, рис. 5, е), редко встречаемых в первичных культурах клеток гиппокампа мышей. При качественном анализе ультраструктуры внутриклеточных органелл (митохондрий, ядра) значимых изменений в ультраструктурной организации не отмечено. Кристы в митохондриях были хорошо визуализированы в клетках как контрольной (рис. 5, а), так и исследуемой группы (рис. 5, в). В глиальных клетках наблюдались осмиофильные гранулы гликогена,

**Рис. 5.** Репрезентативные электронно-микроскопические изображения клеток нейрон-глиальных сетей после 24 ч инкубации их с CdЕро (100 нг/мл):

*контроль:* а — тело нейрона; б — скопление митохондрий в отростке; в — перфорированный асимметричный синапс; *CdЕро:* г — тело нейрона; д — дендрит нейрона и тело астроцита; е — шипиковый аппарат в дендритном шипике; стрелкой указан синаптический контакт. Здесь: эр — эндоплазматический ретикулум, а — аксон, гл — глиальная клетка, д — дендрит, дш — дендритный шипик, кр — конус роста, м — митохондрия, ша — шипиковый аппарат, я — ядро



различные органеллы интактной структуры (рис. 5, б и 5, д).

Таким образом, исследование воздействия CdЕро на интактные нейрон-глиальные сети *in vitro* через 24 ч продемонстрировало отсутствие нейротропного действия у карбамиллированного деривата эритропозтина. Следовательно, активация церебральных эритропозтиновых рецепторов не вызывает изменения характеристик возбудимости нейронов, в частности потенциалзависимых ионных каналов, участвующих в генерации потенциалов действия. Кроме того, при нормоксии после аппликации CdЕро не выявлено изменения активности астроцитов по параметрам регистрации внутриклеточного кальция как характеристики спонтанной активности невозбудимых клеток глии.

Отсутствие нейротропного действия у CdЕро на модели первичной культуры гиппокампа подтверждает гипотезу о том, что эритропозтин прежде всего является цитопротектором, запускающим каскад внутриклеточного сигналинга [15], способствующего адаптации клетки к гипоксии, чем и обусловлено улучшение функции нейронов и глии, наблюдаемое в эксперименте при моделировании ишемии/гипоксии.

Действительно, в наших исследованиях обнаружено адаптогенное действие CdЕро на морфогенез шипикового аппарата даже в условиях нормоксии, что позволяет модулировать поступающий к клетке сигнал через синапс. Ранее [16] была показана возможность

влияния шипикового аппарата на быструю и медленную компоненты затухания кальциевой осцилляции, которая обеспечивается как наличием кальциевых помп в органелле, так и физическим присутствием шипикового аппарата в шипиковой ножке (эффект изолирования).

### Заключение

Отсутствие статистически значимых различий по параметрам потенциалов действия и по длительности кальциевых событий в одиночных клетках, отсутствие изменений в биоэлектрической сетевой активности, а также нарушений ультраструктуры диссоциированных клеток гиппокампа после суточного воздействия карбамиллированной формы дарбэпозтина CdЕро демонстрирует относительную безопасность использования данной молекулы в терапевтических целях в качестве цитопротектора, поскольку она не оказывает значимых воздействий на работу интактных нейронов и глии.

**Финансирование исследования.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта №18-34-00877.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

Литература/References

1. Hernández C.C., Burgos C.F., Gajardo A.H., Silva-Grecchi T., Gavilan J., Toledo J.R., Fuentealba J. Neuroprotective effects of erythropoietin on neurodegenerative and ischemic brain diseases: the role of erythropoietin receptor. *Neural Regen Res* 2017; 12(9): 1381–1389, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.215240>.

2. Ponce L.L., Navarro J.C., Ahmed O., Robertson C.S. Erythropoietin neuroprotection with traumatic brain injury. *Pathophysiology* 2013; 20(1): 31–38, <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2012.02.005>.

3. Alnaeeli M., Wang L., Pikhova B., Rogers H., Li X., Noguchi C.T. Erythropoietin in brain development and beyond. *Anat Res Int* 2012; 2012: 953264, <https://doi.org/10.1155/2012/953264>.

4. Chavez J.C., Baranova O., Lin J., Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci* 2006; 26(37): 9471–9481, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2838-06.2006>.

5. Khan A.I., Coldewey S.M., Patel N.S., Rogazzo M., Collino M., Yaqoob M.M., Radermacher P., Kapoor A., Thiernemann C. Erythropoietin attenuates cardiac dysfunction in experimental sepsis in mice via activation of the  $\beta$ -common receptor. *Dis Model Mech* 2013; 6(4): 1021–1030, <https://doi.org/10.1242/dmm.011908>.

6. Leist M., Ghezzi P., Grasso G., Bianchi R., Villa P., Fratelli M., Savino C., Bianchi M., Nielsen J., Gerwien J., Kallunki P., Larsen A.K., Helboe L., Christensen S., Pedersen L.O., Nielsen M., Torup L., Sager T., Sfacteria A., Erbayraktar S., Erbayraktar Z., Gokmen N., Yilmaz O., Cerami-Hand C., Xie Q.W., Coleman T., Cerami A., Brines M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004; 305(5681): 239–242, <https://doi.org/10.1126/science.1098313>.

7. Brines M., Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(6): 484–494, <https://doi.org/10.1038/nrn1687>.

8. Bohr S., Patel S.J., Vasko R., Shen K., Iracheta-Vellve A., Lee J., Bale S.S., Chakraborty N., Brines M., Cerami A., Berthiaume F., Yarmush M.L. Modulation of cellular stress response via the erythropoietin/CD131 heteroreceptor complex in mouse mesenchymal-derived cells. *J Mol Med* 2015; 93(2): 199–210, <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1218-2>.

9. Elliott S., Busse L., Bass M.B., Lu H., Sarosi I., Sinclair A.M., Spahr C., Um M., Van G., Begley C.G. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* 2006; 107(5): 1892–1895, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4066>.

10. Kirkeby A., van Beek J., Nielsen J., Leist M., Helboe L. Functional and immunochemical characterisation of different antibodies against the erythropoietin receptor. *J Neurosci Methods* 2007; 164(1): 50–58, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.03.026>.

11. Жученко М.А., Серебрякова М.В., Серегин Ю.А., Черепушкин С.А., Лобанова Н.В., Клишин А.А., Вологжанникова А.А., Казаков А.С., Пермьяков С.Е. Карбамилированный дарбэпоэтин альфа: структура и свойства. *Биотехнология* 2017; 33(4): 28–43. Zhuchenko M.A., Serebryakova M.V., Seregin Yu.A., Cherepushkin S.A., Lobanova N.V., Klishin A.A., Vologzhannikova A.A., Kazakov A.S., Permyakov S.E. Carbamylated darbepoetin alfa: structure and properties. *Biotechnologiya* 2017; 33(4): 28–43, <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-4-28-43>.

12. Shirokova O.M., Frumkina L.E., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Zakharov Y.N., Khaspekov L.G., Mukhina I.V. Morphofunctional patterns of neuronal network developing in dissociated hippocampal cell cultures. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2013; 5(2): 6–13.

13. Zakharov Y.N., Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Korotchenko S.A., Kalintseva Y.I., Mukhina I.V., Potanina A.V. Fluorescence analysis of the metabolic activity patterns of a neuronal–glial network. *Journal of Optical Technology* 2012; 79(6): 348, <https://doi.org/10.1364/jot.79.000348>.

14. Pimashkin A., Gladkov A., Mukhina I., Kazantsev V. Adaptive enhancement of learning protocol in hippocampal cultured networks grown on multielectrode arrays. *Front Neural Circuits* 2013; 7, <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00087>.

15. Ding J., Wang J., Li Q.Y., Yu J.Z., Ma C.G., Wang X., Lu C.Z., Xiao B.G., Neuroprotection and CD131/GDNF/AKT pathway of carbamylated erythropoietin in hypoxic neurons. *Mol Neurobiol* 2017; 54(7): 5051–5060, <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0022-0>.

16. Majewska A., Brown E., Ross J., Yuste R. Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumps and calcium diffusion through the spine neck in biochemical compartmentalization. *J Neurosci* 2000; 20(5): 1722–1734, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-05-01722.2000>.