

УДК 576.08

АПРОБАЦИЯ НОВОЙ МОДЕЛИ ВТОРИЧНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ НА ОСНОВЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КРЫСЫ

© 2023 г. Е. Б. Рыкунова¹, М. А. Микеладзе¹, И. А. Утепова^{2,3}, академик РАН О. Н. Чупахин^{2,3},
И. В. Гужова¹, В. Ф. Лазарев¹

Поступило 15.04.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принято к публикации 11.05.2023 г.

В работе представлена новая модель вторичных повреждений после черепно-мозговой травмы. Модель основана на культивировании эмбриональных фибробластов крысы, перепрограммированных в нейрональный фенотип, в присутствии спинномозговой жидкости травмированных крыс. На представленной модели было осуществлено тестирование терапевтического действия индукторов синтеза шаперонов из классов пирролил- и индолилазинов, обладающих нейропротекторными свойствами.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, спинномозговая жидкость, вторичные повреждения, шапероны, Hsp70, производные пирролил- и индолилазинов

DOI: 10.31857/S2686738923700312, **EDN:** JLLFST

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) может являться причиной длительной, отложенной во времени на месяцы, гибели нейронов. Это явление называется вторичными повреждениями и традиционно связывается с изменением кровоснабжения, ишемией, гипоксией, воспалением, отеком мозга и повышенным внутричерепным давлением и т.д. [1, 2]. На молекулярном уровне вторичные повреждения после ЧМТ могут быть обусловлены появлением активных форм кислорода, эксайтотоксичностью, дисфункцией митохондрий, что в конечном итоге приводит к гибели глиальных и нейронных клеток, чаще всего через механизмы апоптоза [3] или некроза [4]. Потенциально токсичные продукты клеточной гибели

могут накапливаться в спинномозговой жидкости (СМЖ), так как они транспортируются из межклеточной жидкости через лимфатическую систему [5].

Моделированием вторичных повреждений *in vitro* после ЧМТ занимаются многие научные группы. Это связано с необходимостью иметь возможность, не прибегая к модели на животных, проверить новые терапевтические подходы или потенциальные терапевтические препараты. Почти всегда моделирование сводится к имитации действия какого-то одного фактора, вызывающего вторичные повреждения, например, окислительного стресса [6] или воспалительной реакции [7], что не отражает весь спектр патологических процессов.

В наших предыдущих работах мы разработали и апробировали новую модель для анализа вторичных повреждений после черепно-мозговой травмы на основе культуры клеток, культивируемых в присутствии СМЖ травмированных животных [8]. Преимущества нашей модели заключались в том, что она учитывала сразу множество факторов, обеспечивавших вторичное повреждение, а также позволяла апробировать потенциальные терапевтические препараты, добавляя их в ростовую среду клеток, содержащую спинномозговую жидкость травмированных животных. Основным недостатком использованных нами ра-

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина”, Екатеринбург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

*e-mail: lazarev@incras.ru

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в исследовании

GAPDH	прямой	5'-ATGATTCTACCCACGGCAAG-3'
	обратный	5'-CTGGAAGATGGTGTATGGGTT-3'
NeuN	прямой	5'-GGCTGCTGATCCCTACCATC-3'
	обратный	5'-GAAGCGGCTGTACCCTCC-3'
MAP2	прямой	5'-CAACACAAGGATCAGCCTGC-3'
	обратный	5'-TGTTTGTCTGATGCTGGCG-3'
NF-M	прямой	5'-TCCTCAGTCCTTGGGGGAAT-3'
	обратный	5'-TGCCCTCTTTCAACAGCTT-3'
NF-H	прямой	5'-CCAGGATGCAATTCAGCAGC-3'
	обратный	5'-TCTTGACGTTGAGCAGGTCC-3'
Syn	прямой	5'-TCGTGTTCAAGGAGACAGGC-3'
	обратный	5'-CAGGTGCTGGTTGCTTTTCC-3'
PSD95	прямой	5'-AAGATGAAGACACGCCCCC-3'
	обратный	5'-ATCACAGGGGGAGAATTGGC-3'

нее моделей заключался в том, что в качестве клеток-акцепторов мы использовали опухолевые клетки — глиобластомы крысы С6. Поэтому основная цель, которая стояла перед нами в рамках настоящей работы, это разработка релевантной модели вторичных повреждений после черепно-мозговой травмы, основанной на культуре клеток крысы, имеющих нейрональный фенотип.

Эмбриональные фибробласты крысы DFK-3 были получены из центра коллективного пользования “Коллекция культур клеток позвоночных”, поддержанного грантом Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683). Клетки культивировали в среде DMEM (БиолоТ, Россия), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США), антибиотики пенициллин 100 ед./мл и стрептомицин 0.1 мг/мл (БиолоТ, Россия) при 37°C и 5% CO₂.

Перепрограммирование этих клеток в нейрональный фенотип (DFK3-Neu) производили в течение 5 дней в среде Neurobasal (BioinnLabs, Россия), содержащей добавку Нейромакс (ПанЭко, Россия), 3% бычьей эмбриональной сыворотки, 100 единиц/мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина. Проверка нейронального фенотипа проводилась на основе анализа экспрессии панели маркеров зрелых нейронов [9, 10] — NeuN, MAP2, 160 kDa neurofilament medium (NF-M), 200kDa neurofilament heavy (NF-H), Synaptophysin (Syn), PSD95 с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). С этой целью лизаты клеток, собранных с 27 см², растворяли в 600 мкл реактива ExtractRNA (Евроген, Россия). Выделение матричной РНК осуществляли по описанному ранее протоколу [11]. Далее для получения комплементарной ДНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора MMLV RT (Евроген, Россия)

согласно протоколу производителя. Для анализа использовали 2 мкг РНК на пробу.

Все реакции ПЦР-РВ проводили на системе детекции полимеразной цепной реакции в реальном времени CFX96 (BioRad, США) с использованием qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Данные были проанализированы на кратность изменения количества матричной РНК с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX (версия 3.1). Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в табл. 1. GAPDH использовали в качестве контроля для нормализации. Все праймеры были заказаны в компании Евроген (Россия). Параметры ПЦР-РВ: 5 мин предварительной денатурации при 95°C; затем 40 циклов: 30 с при 95°C, 30 с при 62°C и 30 с при 72°C.

Мы установили, что уровень экспрессии генов основных нейрональных маркеров в клетках DFK3-Neu (эмбриональные фибробласты после нейрональной дифференцировки) в среднем в 2–4 раза превышает их уровень экспрессии в клетках DFK3 (рис. 1). Повышение экспрессии мар-

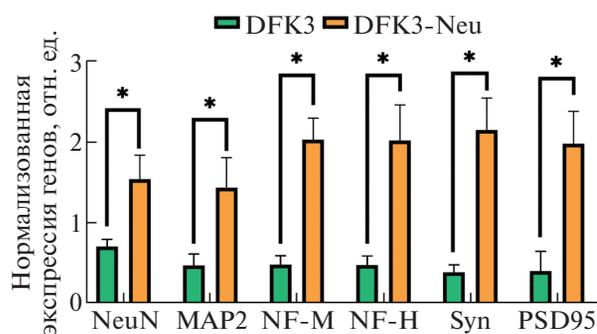


Рис. 1. Анализ нейрональных маркеров в клетках DFK3 и DFK3-Neu. Различия с контролем достоверны (*) при $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни).

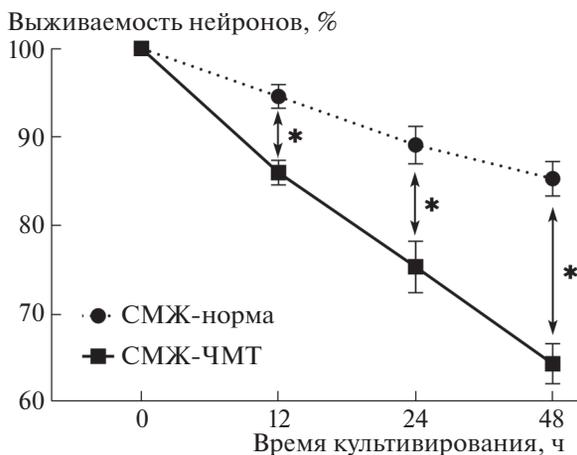


Рис. 2. Сравнение жизнеспособности клеток DFK3-Neu при культивировании в присутствии СМЖ травмированных (СМЖ-ЧМТ) и нетравмированных (СМЖ-норма) крыс. Различия с контролем достоверны (*) при $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни).

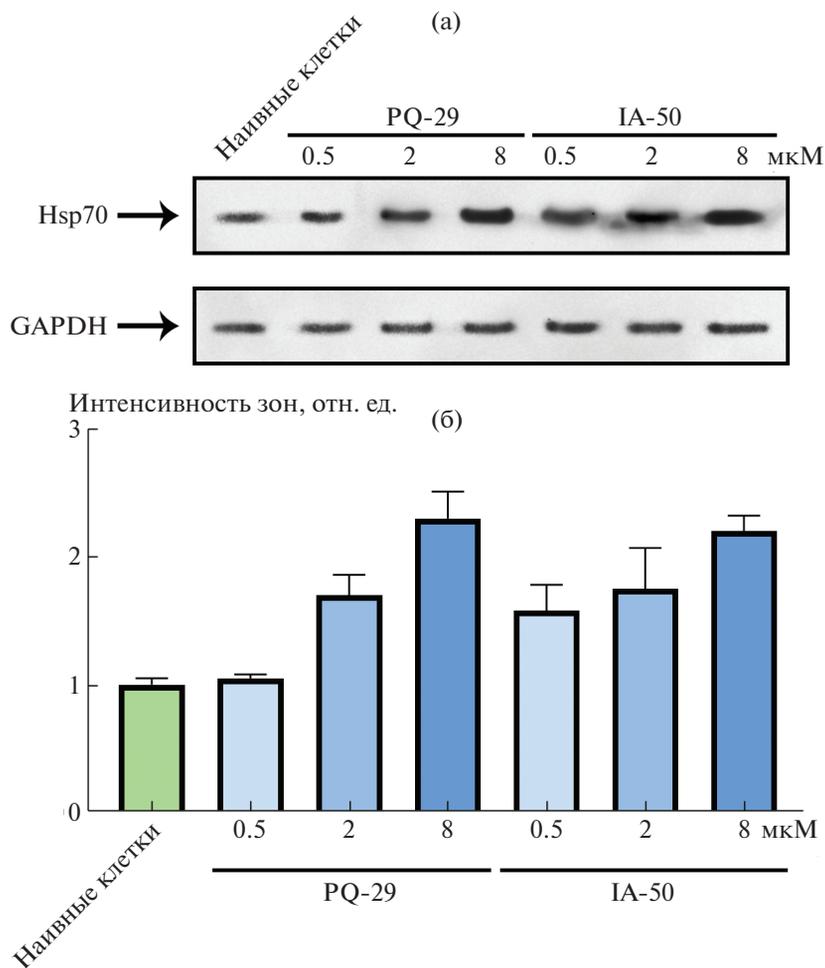


Рис. 3. Влияние соединений PQ-29 и IA-50 на количество белка Hsp70 в клетках DFK3-Neu. (а) Представлены репрезентативные данные вестерн-блот анализа. В качестве контроля нагрузки использованы антитела против GAPDH. (б) Результат оцифровки интенсивности зон блета, представленный как отношение интенсивности зон Hsp70 к интенсивности референтного белка GAPDH, нормированное на значение, полученное для необработанных клеток.

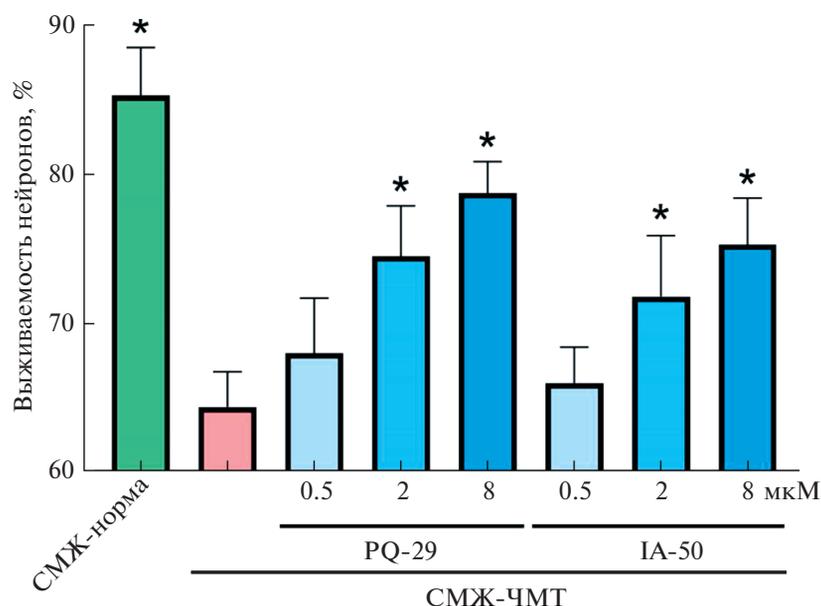


Рис. 4. Применение соединений PQ-29 и IA-50 предотвращает гибель клеток DFK3-Neu, вызванную культивированием в присутствии СМЖ травмированных крыс. СМЖ-норма – клетки, культивированные в течение 48 ч в присутствии СМЖ здоровых животных; СМЖ-ЧМТ – клетки, культивированные в течение 48 ч в присутствии СМЖ травмированных крыс. Различия с контролем (СМЖ-ЧМТ) достоверны (*) при $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни).

керов зрелых нейронов свидетельствует о приобретении клетками нейронального фенотипа [9].

Следующим этапом работы стало изучение влияния на выживаемость нейрональных клеток СМЖ травмированных животных. С этой целью мы делали ЧМТ крысам по описанному ранее протоколу [8], через 9 сут после ЧМТ производили забор СМЖ через большое затылочное отверстие у наркотизированных животных. Далее мы культивировали клетки DFK3-Neu в присутствии СМЖ травмированных (СМЖ-ЧМТ) либо здоровых (СМЖ-норма) животных. Соотношение СМЖ и среды для дифференцировки было 1 : 1. По прошествии 12, 24 либо 48 ч культивирования жизнеспособность нейронов оценивали с помощью метода МТТ – оценка активности дегидрогеназа по Мосману [12]. Мы установили, что культивирование нейронов с СМЖ травмированных животных приводило к снижению жизнеспособности клеток по сравнению с культивированием в присутствии контрольной СМЖ (рис. 2). При этом спустя 12 ч культивирования разница составила 11%, спустя 24 ч – 14.6%, а спустя 48 ч – 20.9%.

В рамках разработки подобной модели нам необходимо было провести ее апробацию – удостовериться, что клетки DFK3-Neu способны реагировать на лекарственную обработку. С этой целью мы использовали синтезированные нами производные пирролил- и индолилазинов [13, 14], способных вызывать накопление шаперонов в клетках и ранее продемонстрировавших нейро-

протекторное действие в моделях вторичных повреждений после ЧМТ [8] и при болезни Альцгеймера [14]. Клетки DFK3-Neu в течение суток культивировали в присутствии соединений PQ-29 (производное пирролилазина) и IA-50 (производное индолилазина) в концентрациях 0.5, 2 и 8 мкМ. Спустя сутки клетки лизировали, а полученные лизаты подвергли вестерн-блот анализу по описанному ранее протоколу [14]. Блот последовательно инкубировали с мышиными антителами против Hsp70 клон 3C5 [11], GAPDH (клон 6C5, Abscam, Великобритания) и затем с антителами против антител мыши, меченными пероксидазой хрена (Abscam, Великобритания). Окраску блота антителами против GAPDH использовали в качестве контроля общей белковой нагрузки проб. Результат гибридизации блота с антителами приведен на рис. 3а. На основе 3 независимых экспериментов с помощью программного обеспечения TotaLab Quant была произведена оцифровка интенсивности зон белков. Результат оцифровки представлен на рис. 3б как нормированное отношение интенсивности зон Hsp70 к интенсивности референтного белка GAPDH. Мы продемонстрировали, что PQ-29 и IA-50 в концентрации 8 мкМ вызывают увеличение количества белка Hsp70 в нейронах крысы в 2.3 и 2.2 раза соответственно.

Ключевым этапом работы стала верификация новой модели. Для этого с помощью метода МТТ мы оценили выживаемость крысиных нейронов в присутствии СМЖ травмированных животных, а

также нейропротекторных соединений из классов пирролил- и индолилазаинов. Мы установили, что препараты PQ-29 и IA-50 эффективно препятствовали гибели нейронов в присутствии СМЖ крыс после ЧМТ. При этом в наиболее высоких из проверенных концентраций — 8 мкМ — удалось предотвратить гибель 14.36 и 10.9% клеточной популяции (для PQ-29 и IA-50 соответственно).

Таким образом, нами была разработана новая удобная модель для оценки вторичных повреждений после ЧМТ. Ключевой особенностью представленной модели является то, что она позволяет оценить цитотоксическое действие СМЖ травмированных крыс на культуру клеток крысы, обладающих нейрональным фенотипом. Для верификации релевантности новой модели мы проверили цитопротекторную активность соединений из классов пирролил- и индолилазаинов, которые ранее уже были представлены нами как нейропротекторы. Оба соединения продемонстрировали защитную активность в разработанной нами модели вторичных повреждений *in vitro*. Соединение IA-50 было впервые проверено нами на модели вторичных повреждений после ЧМТ, при этом мы зафиксировали терапевтический эффект. Некоторым ограничением возможного применения данной модели является отсутствие данных о возможности ее использования для тестирования препаратов, не оказывающих влияния на шаперонную систему.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 18-74-10087.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beez T., Steiger H.J., Etminan N.*, Pharmacological targeting of secondary brain damage following ischemic or hemorrhagic stroke, traumatic brain injury, and bacterial meningitis — a systematic review and meta-analysis // *BMC Neurol.* 2017. V. 17. P. 209. <https://doi.org/10.1186/s12883-017-0994-z>
2. *Smrcka M., Vidláč M., Máca K., Smrcka V., Gál R.*, The influence of mild hypothermia on ICP, CPP and outcome in patients with primary and secondary brain injury // *Acta Neurochir. Suppl.* 2005. V. 95. P. 273–275.
3. *Quillinan N., Herson P.S., Traystman R.J.*, Neurophysiology of Brain Injury, // *Anesthesiol. Clin.* 2016. V. 34. P. 453–464.
4. *Curvello V., Hekierski H., Pastor P., Vavilala M.S., Armstead W.M.*, Dopamine protects cerebral autoregulation and prevents hippocampal necrosis after traumatic brain injury via block of ERK MAPK in juvenile pigs // *Brain Res.* 2017. V. 1670. P. 118–124.
5. *Rasmussen M.K., Mestre H., Nedergaard M.*, The glymphatic pathway in neurological disorders, // *Lancet Neurol.* (2018).
6. *Yang X.J., Ling S., Zhou M.L., Deng H.J., Qi M., Liu X.L., Zhen C., Chen Y.X., Fan X.R., Wu Z.Y., Ma F.C., Rong J., Di G.F., Jiang X.C.*, Inhibition of TRPA1 Attenuates Oxidative Stress-induced Damage After Traumatic Brain Injury via the ERK/AKT Signaling Pathway // *Neuroscience.* 2022. V. 494. P. 51–68.
7. *Liu N., Li Y., Jiang Y., Shi S., Niamnud A., Vodovoz S.J., Katakam P.V.G., Vidoudez C., Dumont A.S., Wang X.*, Establishment and Application of a Novel In Vitro Model of Microglial Activation in Traumatic Brain Injury // *J. Neurosci.* 2023. V. 43. P. 319–332.
8. *Dutyshcheva E.A., Mikhaylova E.R., Trestsova M.A., Andreev A.I., Apushkin D.Y., Utepova I.A., Serebrennikova P.O., Akhremenko E.A., Aksenov N.D., Bon' E.I., Zimatkin S.M., Chupakhin O.N., Margulis B.A., Guzhovalva I.V., Lazarev V.F.*, Combination of a Chaperone Synthesis Inducer and an Inhibitor of GAPDH Aggregation for Rehabilitation after Traumatic Brain Injury: A Pilot Study // *Pharm.* 2023. V. 15. Page 7. 15 (2022) 7.
9. *Bessières B., Jia M., Travaglia A., Alberini C.M.*, Developmental changes in plasticity, synaptic, glia, and connectivity protein levels in rat basolateral amygdala // *Learn. Mem.* 2019. V. 26. P. 436–448.
10. *Gingras M., Champigny M.F., Berthod F.*, Differentiation of human adult skin-derived neuronal precursors into mature neurons // *J. Cell. Physiol.* 2007. V. 210. P. 498–506.
11. *Mikeladze M.A., Dutyshcheva E.A., Kartsev V.G., Margulis B.A., Guzhovalva I.V., Lazarev V.F.*, Disruption of the complex between GAPDH and Hsp70 sensitizes C6 glioblastoma cells to hypoxic stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22.
12. *Mosmann T.*, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63.
13. *Utepova I.A., Trestsova M.A., Chupakhin O.N., Charushin V.N., Rempel A.A.*, Aerobic oxidative C-H/C-H coupling of azaaromatics with indoles and pyrroles in the presence of TiO₂ as a photocatalyst // *Green Chem.* 2015. V. 17. P. 4401–4410.
14. *Lazarev V.F., Dutyshcheva E.A., Mikhaylova E.R., Trestsova M.A., Utepova I.A., Chupakhin O.N., Margulis B.A., Guzhovalva I.V.*, Indolyazine Derivative Induces Chaperone Expression in Aged Neural Cells and Prevents the Progression of Alzheimer's Disease // *Molecules.* 2022. V. 27. P. 8950.

**APPROBATION OF A NEW MODEL
OF SECONDARY DAMAGE AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY BASED
ON REPROGRAMMED RAT EMBRYO FIBROBLASTS**

**E. B. Rykunova^a, M. A. Mikeladze^a, I. A. Uteпова^{b,c}, Academician of the RAS O. N. Chupakhin^{b,c},
I. V. Guzhova^a, and V. F. Lazarev^{a,#}**

^a*Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation*

^b*Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation*

^c*Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg Russian Federation*

[#]*e-mail: lazarev@incras.ru*

The paper presents a new model of secondary injuries after traumatic brain injury. The model is based on the cultivation of rat embryonic fibroblasts reprogrammed to a neuronal phenotype in the presence of cerebrospinal fluid from injured rats. The presented model was used to test the therapeutic effect of inducers of the synthesis of chaperones from the classes of pyrrolyl- and indolylazines, which have neuroprotective properties.

Keywords: traumatic brain injury, cerebrospinal fluid, secondary injuries, chaperones, Hsp70, pyrrolyl- and indolylazine derivatives