

## EPOR/CD131-ОПОСРЕДОВАННАЯ РЕТИНОПРОТЕКЦИЯ ПРИ РОТЕНОН-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ СВЯЗНА С УВЕЛИЧЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АУТОФАГИИ

В. О. Солдатов<sup>1✉</sup>, М. В. Покровский<sup>1</sup>, О. А. Пученкова<sup>1</sup>, Н. С. Жунусов<sup>1</sup>, А. М. Краюшкина<sup>1</sup>, А. В. Гречина<sup>2</sup>, М. О. Солдатова<sup>3</sup>, К. Н. Лапин<sup>4</sup>, О. Ю. Бушуева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

<sup>2</sup> Первый московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

<sup>4</sup> Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

Митохондриальная дисфункция является ключевым драйвером развития нейродегенерации. Целью исследования было оценить протективный потенциал стимуляции EPOR/CD131, гетеродимерного рецептора эритропоэтина (EPO), при нейродегенерации, вызванной нарушением функции митохондрий. В качестве агонистов EPOR/CD131 были использованы EPO или pHBSP, эффективность которых оценивали в условиях *in vivo* и *in vitro*. В модели ротенон-индуцированной ретинопатии однократная инъекция 10 мкг/кг EPO или 5 мкг/кг pHBSP привела к значительному снижению дегенерации ганглионарных клеток сетчатки ( $p < 0,05$ ). Кроме того, инкубация в 500 нМ растворах EPO и pHBSP резко увеличила выживаемость первичной мышиной нейроглиальной культуры, обработанной ротенонем ( $p < 0,005$ ). Примечательно, что применение агонистов EPOR/CD131 привело к увеличению экспрессии мРНК LC3A, ATG7, Beclin-1, Паркина и BNIP3, что свидетельствует об активации аутофагии и митофагии как потенциальном механизме митопротективного действия.

**Ключевые слова:** митохондриальная дисфункция, ротенон-индуцированная ретинопатия, рецептор EPOR/CD131, эритропоэтин, pHBSP

**Финансирование:** государственное задание «Лаборатория геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии FZWG-2021-0016».

**Вклад авторов:** В. О. Солдатов — идея и дизайн эксперимента, написание статьи; М. В. Покровский, А. В. Дейкин — консультация по идее и дизайну исследования; О. А. Пученкова — моделирование ротенон-индуцированной ретинопатии, забор материала для гистологического исследования и анализа экспрессии целевых генов; Н. С. Жунусов — моделирование ротенон-индуцированной ретинопатии, исследование цитопротективной активности ротенона *in vitro*; А. М. Краюшкина — исследование цитопротективной активности ротенона *in vitro*; А. В. Гречина — проведение морфологических исследований; О. Ю. Бушуева — выделение РНК, проведение количественной ПЦР; М. О. Солдатова — выделение РНК, проведение количественной ПЦР.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 06-07/21 от 15 июля 2021 г.). Все процедуры выполняли согласно Положению о лабораторной практике в РФ 2003 г. с соблюдением требований Директивы Европейского сообщества (86/609 EC) и рекомендаций руководства ARRIVE.

✉ **Для корреспонденции:** Владислав Олегович Солдатов  
ул. Победы, д. 85, г. Белгород, 308015, Россия; pharmsoldatov@gmail.com

**Статья получена:** 11.07.2022 **Статья принята к печати:** 01.08.2022 **Опубликована онлайн:** 12.08.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.040

## EPOR/CD131-MEDIATED ATTENUATION OF ROTENONE-INDUCED RETINAL DEGENERATION IS ASSOCIATED WITH UPREGULATION OF AUTOPHAGY GENES

Soldatov VO<sup>1✉</sup>, Pokrovsky MV<sup>1</sup>, Puchenkova OA<sup>1</sup>, Zhunusov NS<sup>1</sup>, Krayushkina AM<sup>1</sup>, Grechina AV<sup>2</sup>, Soldatova MO<sup>3</sup>, Lapin KN<sup>4</sup>, Bushueva OYu<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

<sup>2</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Kursk State Medical University, Kursk, Russia

<sup>4</sup> Federal Research and Clinical Center for Resuscitation and Rehabilitology, Moscow, Russia

Mitochondrial dysfunction is a key driver of neurodegeneration. This study aimed to evaluate the protective potential of EPOR/CD131 (heterodimeric erythropoietin receptor) stimulation in the neurodegeneration caused by rotenone-induced mitochondrial dysfunction. The effects of erythropoietin (EPO) and an EPO mimetic peptide pHBSP were assessed using *in vivo* and *in vitro* models. Single injections of 10 µg/kg EPO or 5 µg/kg pHBSP significantly alleviated the degeneration of ganglion cells of the retina in a rotenone-induced retinopathy in rats ( $p < 0.05$ ). Consistently, *in vitro* exposure of rotenone-treated murine primary neuroglial cultures to 500 nM EPO or pHBSP significantly rescued the survival of the cells ( $p < 0.005$ ). The observed enhancement of LC3A, ATG7, Beclin-1, Parkin and BNIP3 mRNA expression by EPOR/CD131 agonists implicates the autophagy and mitophagy activation as a plausible mitoprotective mechanism.

**Keywords:** mitochondrial dysfunction, rotenone-induced retinopathy, EPOR/CD131 receptors, erythropoietin, pHBSP

**Funding:** State Assignment "Laboratory for Genome Editing in Biomedicine and Veterinary FZWG-2021-0016".

**Author contribution:** Soldatov VO — concept and design of the study, writing of the manuscript; Pokrovsky MV, Lapin KN — consulting on the concept and design of the study; Puchenkova OA — collection of samples for histological examination and target gene expression analysis; Puchenkova OA, Zhunusov NS — modeling of the rotenone-induced retinal degeneration; Zhunusov NS, Krayushkina AM — *in vitro* assay of rotenone cytoprotective activity; Grechina AV — morphological study; Bushueva OYu, Soldatova MO — RNA extraction, quantitative PCR assay.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the ethical committee of the Belgorod State National Research University (Protocol № 06-07/21 of 15 July 2021); all procedures were performed in accordance with the Regulations on Laboratory Practice in the Russian Federation of 2003, in compliance with the 86/609 EEC Directive and ARRIVE guidelines.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladislav O. Soldatov  
Pobedy, 85, Belgorod, 308015, Russia; pharmsoldatov@gmail.com

**Received:** 11.07.2022 **Accepted:** 01.08.2022 **Published online:** 12.08.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.040

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области изучения физиологии и патологии мозга, прогресс в лечении нейродегенеративных заболеваний (НЗ), одной из главных групп патологий нервной системы, остается относительно скромным. В то же время ввиду увеличения средней продолжительности жизни населения, бремя НЗ приобретает все большую медико-социальную значимость [1]. При этом на сегодняшний день отсутствуют средства этиотропной терапии нейродегенерации, а существующие подходы патогенетической и симптоматической направленности очень ограниченно влияют на исходы заболеваний. Все это обуславливает актуальность поиска новых эффективных стратегий нейропротекции. Отдельный интерес фармакотерапия НЗ представляет для офтальмологии, поскольку многие заболевания сетчатки тоже имеют нейродегенеративную природу [2].

Аномалии митохондриальной функции рассматривают как ключевое звено нейронной дегенерации [3]. Показано, что нарушение митохондриальной функции является не следствием, а драйвером развития НЗ [4]. В связи с исключительной важностью энергетического обмена одной из основных задач клетки является поддержание пула здоровых митохондрий. При этом ключевым механизмом, предотвращающим накопление дефектных митохондрий, служит митофагия [5]. Термин «митофагия», впервые предложенный Лемастерсом [6], относится к процессу избирательной деградации митохондрий посредством макроаутофагии [7]. Два основных пути митофагии включают PINK1/паркин-опосредованную и рецептор-опосредованную митофагию [8].

В итоге элиминация поврежденных митохондрий приводит к снижению окислительного стресса и увеличению эффективности энергетического обмена клетки [9]. Таким образом, стимуляцию митофагии

можно рассматривать как эффективный подход к нейропротекции. Более того, активация аутофагии в целом приводит к снижению перегрузки нейронов неправильно свернутыми белками и белковыми агрегатами, которые являются основным патоморфологическим субстратом при нейродегенеративном процессе [10].

В качестве потенциальной стратегии нейропротекции, которая может быть связана с активацией аутофагии и улучшением функции митохондрий, может быть рассмотрена фармакологическая активация гетеродимерного рецептора эритропоэтина (EPO) EPOR/CD131 [11]. Ранее для агонистов EPOR/CD131 была показана нейропротективная активность [12–14] и способность активировать аутофагию [15]. Цель работы — оценить нейропротективную активность эритропоэтина (EPO) и его пептидного агониста pHSP, избирательно стимулирующего гетеродимерный рецептор EPOR/CD131.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки митотропных эффектов в качестве модели была выбрана ротеноновая токсичность в условиях *in vivo* и *in vitro*. Пестицид ротенон прерывает митохондриальную дыхательную цепь, блокируя комплекс I. Воздействие ротенона способно индуцировать клеточные изменения, характерные для митохондриальных заболеваний и нейродегенерации [16].

## Животные

Исследование проводили на 24 самцах крыс (питомник «Столовая»; Московская область, Россия), трех самках мышей линии CD-1 (питомник Пушино; Московская область, Россия) и 24 новорожденных мышатах. До и во

Таблица. Праймеры для оценки экспрессии целевых генов

Ген (кодируемый белок)	Последовательность праймера	Длина продукта (п.н.)
Маркер ретикулярной дегенерации		
<i>Nefl</i> (NEFL)	F: 5'-GGAGTACCAGGACCTCCTCA-3'	102
	R: 5'-CTGGTGAAACTGAGCCTGGT-3'	
Гены, регулирующие аутофагию/митофагию		
<i>Becn1</i> (Beclin 1)	F: 5'-CAGCTGGACACTCAGCTCAA-3'	99
	R: 5'-CTGTTCACTGTCCGCTCAT-3'	
<i>Map1lc3a</i> (LC3A)	F: 5'-TTGGTCAAGATCATCCGGCG-3'	104
	R: 5'-TCAGCGATGGGTGTGGATAC-3'	
<i>Atg7</i> (ATG7)	F: 5'-TCCTGGCCAAGGTGTTAACT	104
	R: 5'-ACTCATGTCCCAGATCTCAGC-3'	
<i>Prkn</i> (Паркин)	F: 5'-TGCCCATTTGAAAAGAATGGAGG-3'	95
	R: 5'-GTTCCACTCACAGCCACAGT-3'	
<i>Bnip3</i> (BNIP3)	F: 5'-AACAGCACTCTGTCTGAGGA-3'	100
	R: 5'-GCCGACTTGACCAATCCCA-3'	
Гены воспалительного ответа		
<i>Il1b</i> (IL1b)	F: 5'-GGCTGACAGACCCCAAAAGA-3'	101
	R: 5'-TGTCGAGATGCTGCTGTGAG-3'	
<i>Il6</i> (IL6)	F: 5'-CTCATTCTGTCTCGAGCCAC-3'	105
	R: 5'-AGAAGGCAACTGGCTGGAAG-3'	
Гены домашнего хозяйства		
<i>Actb</i> (B-actin)	F: 5'-CCACCCGCGAGTACAACC-3'	95
	R: 5'-GACGACGAGCGCAGCGATA-3'	

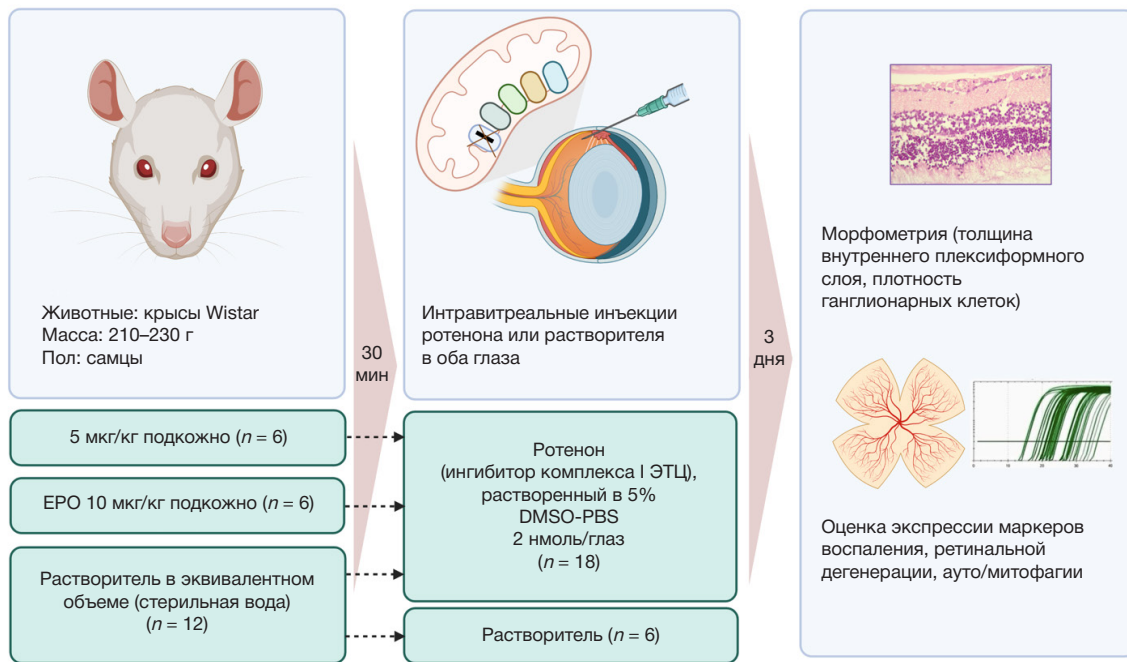


Рис. 1. Схема исследования ретинопротективной активности агонистов EPOR/CD131 при ротенон-индуцированной ретинопатии

время выполнения исследования животных содержали в помещениях с искусственным освещением (режим 12/12 ч) при температуре 21–23 °С, влажности 38–50%, со свободным доступом к корму и воде.

### Ротенон-индуцированная ретикулярная дегенерация

Для индукции ретикулярной дегенерации 18 самцам крыс (возраст 20 недель, масса 250–275 г) под местной новокаиновой анестезией интравитреально инъецировали 5 мкл 0,4 мМ раствора ротенона, разбавленного 5%-м раствором ДМСО в PBS Дюльбекко (D-PBS) (2 нмоль/глаз) [17].

Затем животных делили на три равные группы:

- 1) контроль (стерильная вода подкожно + ротенон интраорбитально);
- 2) рНБСП (рНБСП 5 мкг/кг подкожно + ротенон интраорбитально);
- 3) EPO (EPO 10 мкг/кг подкожно + ротенон интраорбитально).

Дополнительно была введена группа интактных животных ( $n = 6$ ; соответствующие по возрасту и массе) с введением носителя вместо ротенона.

Исследуемые препараты EPO и рНБСП вводили подкожно за 30 мин до инъекции ротенона. Животным контрольной и интактной групп вводили стерильную воду. На 3-й день глаза энуклеировали для гистологического исследования и анализа экспрессии целевых генов (рис. 1).

### Морфологическое исследование

Глазные яблоки заливали в парафин с предварительной фиксацией в забуференном формалине (рН около 7,0) с 0,002%-м раствором пикриновой кислоты и с последующей осторожной аспирацией стекловидного тела и заменой расплавленным воском, как описано ранее [18]. Все срезы были стандартизированы по одной и той же области (1 мм выше слепого пятна) и толщине (7 мкм) для корректного сравнения полученных данных. Слайды окрашивали по стандартным протоколам [19] для

дальнейшего структурного анализа. Проводили оценку толщины слоя внутреннего плексиформного слоя (ВПС) и числа ядер на 100 мкм слоя ганглионарных клеток.

### Количественная полимеразно-цепная реакция

Выделение суммарной РНК и обратную транскрипцию проводили по методике, описанной ранее [20]. Для оценки экспрессии целевых генов в амплификаторе CFX96 (BioRad; США) проводили ПЦР образцов с использованием коммерческого набора SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad Laboratories, Inc.; США) и олигонуклеотидных праймеров (Евроген; Россия).

Праймеры подбирали с использованием ресурса Primer-BLAST (NCBI) и с соблюдением ряда условий: 1) температура плавления 59–61 °С; 2) каждый праймер должен отжигаться на область межэкзонного соединения или оба праймера должны отжигаться на разные экзоны; 3) прямой и обратный праймеры не должны образовывать ауто- и кросс-димеры в одной смеси; 4) размер ПЦР-продукта должен составлять 95–107 п.н. (см. таблицу).

Преобразование полученных при количественной ПЦР данных проводили с использованием метода двух дельта. После проведения амплификации с помощью программы Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad; США) для каждого образца рассчитывали  $\Delta Ct$  (разницу между пороговым значением цикла для гена домашнего хозяйства и пороговым значением цикла для гена интереса).

Полученные данные преобразовывали по формуле (1) [21]:

$$2E \Delta \Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{контр}} \quad (1),$$

где  $\Delta Ct$  — цикл, в котором логарифмическая кривая интенсивности флуоресценции красителя SYBR Green достигает порогового уровня (cycle threshold) при проведении реакции с геном домашнего хозяйства, взятым как контроль;  $\Delta Ct_{\text{контр}}$  — разница циклов между пороговым уровнем флуоресценции для гена интереса и контрольным геном.

## Исследование цитопротективной активности рНБСП при ротеноновой токсичности *in vitro*

Для приготовления культуры клеток использовали мышей линии CD1 в возрасте одни сутки после рождения. Проводили декапитацию животного, помещали голову на чашку Петри, помещенную на лед. Препарирование черепной коробки от кожи и фасций проводили в условиях охлаждения. Извлекали головной мозг и помещали в чашку Петри с охлажденным PBS. Гиппокамп, кору или средний отдел мозга выделяли под бинокляром Leica (ув.  $\times 10$ ) на охлажденном предметном стекле, помещенном в чашку Петри.

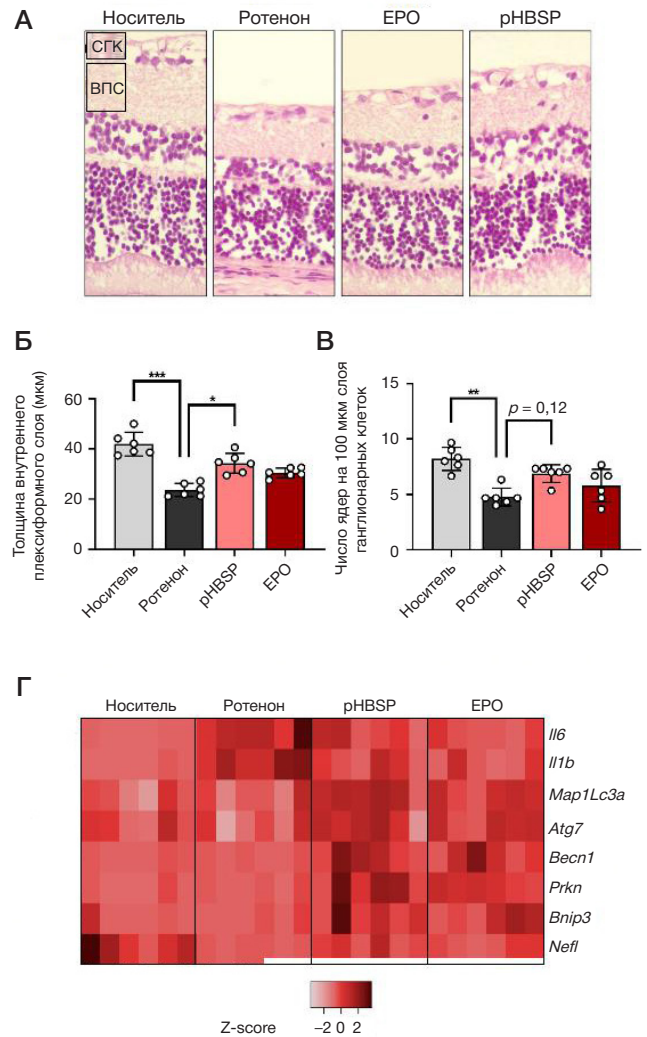
Ткани собирали в пробирку, промывали D-PBS, трипсинизировали, и засевали по 20 000 клеток в планшеты, обработанные поли-D-лизином, для дальнейшего культивирования в среде Neurobasal (Панэко; Россия). Через 16–18 ч половину среды заменяла на среду Neurobasal Plus. Через каждые 2 дня проводили контроль культуры под микроскопом и меняли половину среды на новую. Культивирование клеток осуществляли в течение 10 дней. За 24 ч до подсчета числа живых клеток в лунки добавляли ротенон для получения конечной концентрации 2,5 мМ. После 20 ч инкубации с ротеноном в суспензию добавляли изучаемые препараты (рНБСП и EPO) в концентрациях 50 или 500 нМ. Подсчет выживших клеток проводили с помощью окраски красителем МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид] в автоматическом счетчике клеток с функцией анализатора жизнеспособности Cell Counter (Corning; США) с использованием программы CytoSmart (Axion; Нидерланды).

### Статистическая обработка

Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Нормально распределенные данные представляли в виде  $M \pm SD$ , ненормально распределенные данные — в виде  $Me [Q_1; Q_3]$ . Статистическую обработку и визуализацию данных проводили в программе GraphPad Prism 9.2.0 (Graphpad Software Inc; США). Значимость различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса и анализа *post hoc* по методу Данна с процедурой Бенджамини–Хохберга. Данные, использованные для построения тепловых карт, не подвергали статистической обработке.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование продемонстрировало, что интравитреальные инъекции ротенона привели к специфическим изменениям морфологии ВПС: ее истончению, уменьшению толщины ВПС и уменьшению количества ганглионарных клеток. Толщина ВПС уменьшилась с 41,92 мкм [38,74; 43,70] в группе носителя до 23,59 мкм [21,37; 25,62] в группе с введением ротенона, тогда как количество ядер в 100 мкм слоя ганглионарных клеток (СГК) уменьшилось с 8,22 [7,75; 8,83] до 4,78 [4,42; 4,67]. Изменения указывают на дегенерацию ганглионарных клеток, что свидетельствует о нейродегенеративном процессе, индуцированном ротеноном. Кроме того, анализ экспрессии генов выявил повышенную экспрессию цитокинов *Il6* и *Il1b* и снижение экспрессии *Nefl*, маркера количества ганглионарных клеток сетчатки (ГКС), что также подтверждает повреждение сетчатки.



**Рис. 2.** Терапевтический эффект рНБСП и EPO на ротеноно-индуцированную ретинопатию у крыс. **А.** Репрезентативные снимки гистологических срезов сетчатки. **Б.** Результаты оценки толщины внутреннего плексиформного слоя. **В.** Результаты подсчета числа ядер в ганглионарном слое сетчатки. **Г.** Нормализованная тепловая карта, отражающая экспрессию маркеров воспаления (*Il6*, *Il1b*), аутофагии (*Map1Lc3a*, *Atg7*), митофагии (*Becn1*, *Prkn*, *Bnip3*) и ретиальной дегенерации (*Nefl*). СГК — слой ганглионарных клеток; ВПС — внутренний плексиформный слой; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,005$ ; \*\*\* —  $p < 0,0005$  при сравнении результатов анализа по Краскелу–Уоллису и *post-hoc* анализа по Данну

рНБСП и EPO значительно уменьшили изменения, вызванные ротеноном, как по гистологической картине (рис. 2А–В), так и по данным анализа экспрессии генов (рис. 2Г). Примечательно, что рНБСП продемонстрировал более значительное снижение дегенерации сетчатки. Толщина ВПС и число ядер в 100 мкм СГК у крыс, получавших рНБСП, составляли 34,34 [31,52; 36,02] и 6,89 [7,00; 7,33] соответственно.

Обнаружено также, что крысы, получавшие рНБСП или EPO, имели повышенную экспрессию маркеров митофагии и аутофагии *Map1Lc3a*, *Atg7*, *Becn1*, *Prkn*, *Bnip3* в сетчатке (рис. 2Г). Оба препарата продемонстрировали сравнимую активность в отношении повышения экспрессии *Nefl* и генов, которые кодируют белки, связанные с аутофагией, а также сравнимую супрессорную активность в отношении экспрессии провоспалительных цитокинов.

Таким образом, однократное системное введение рНБСП и EPO в дозах 5 и 10 мкг соответственно привело к снижению ретиальной дегенерации, вызванной интравитреальной инъекцией ротенона. В основе



ретинопротективных эффектов, опосредованных стимуляцией EPOR/CD131, может лежать снижение воспалительной активации и усиление митофагии, что подтверждено снижением экспрессии маркеров воспаления и увеличением экспрессии маркеров ауто/ митофагии.

### Цитопротективная активность *in vitro*

Инкубация в течение 24 ч первичной нейроглиальной культуры гиппокампа в 2,5 мкМ растворе ротенона привела к гибели более 50% культуры, что снизило количество живых клеток с  $69,80 \pm 6,62\%$  в группе необработанных клеток до  $27,06 \pm 8,98\%$  в группе с применением ротенона без лечения (рис. 3). Применение исследуемых препаратов в концентрации 500 нМ статистически значительно увеличило жизнеспособность культуры до  $61,73 \pm 11,56\%$  ( $p < 0,005$ ) и  $71,20 \pm 6,97\%$  ( $p < 0,005$ ) при применении рНБСП и ЕРО соответственно. В концентрации 50 нМ оба препарата так же выражено снизили количество мертвых клеток, но эффект не был статистически значим.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Функциональное состояние митохондрий рассматривают как один из основных факторов, определяющих клеточный гомеостаз. Ткани с особенно большими энергетическими потребностями, такие как мозг и сетчатка, характеризуются наиболее высокой чувствительностью к митохондриальным аномалиям [2].

В данном исследовании мы продемонстрировали, что стимуляция EPOR/CD131 способна улучшать морфофункциональное состояние нейрональных клеток сетчатки и выживаемость первичной нейроглиальной культуры *in vitro* при химически индуцированной митохондриальной дисфункции. Поскольку нейротоксичный эффект ротенона связан с разобщением дыхательной цепи митохондрий, митопротективное действие можно рассматривать как наиболее вероятный механизм наблюдаемых положительных эффектов стимуляции EPOR/CD131. В целом это согласуется с полученными ранее данными, касающимися влияния ЕРО на митохондриальную функцию [22]. Анализ генной экспрессии продемонстрировал, что одним из потенциальных механизмов митопротективной активности агонистов EPOR/CD131 является стимуляция ауто- и митофагии. Так, применение препаратов привело к увеличению экспрессии мРНК LC3A, ATG7, Beclin-1, Паркина и BNIP3. Эти результаты согласуются также с полученными нами ранее данными по эффекту рНБСП на экспрессию генов аутофагии при этанол-индуцированной нейродегенерации

### Литература

- Logroscino G, Urso D, Savica R. Descriptive epidemiology of neurodegenerative diseases: What are the critical questions? *Neuroepidemiology*. 2022 Jun 21. Online ahead of print. PMID: 35728570.
- Soldatov VO, Kukharsky MS, Belykh AE, Sobolev AM, Deykin AV. Retinal Damage in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Underlying Mechanisms. *Eye Brain*. 2021; 13: 131–146. PMID: 34012311.
- Angelova PR, Esteras N, Abramov AY. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Med Res Rev*. 2021; 41 (2): 770–784. PMID:

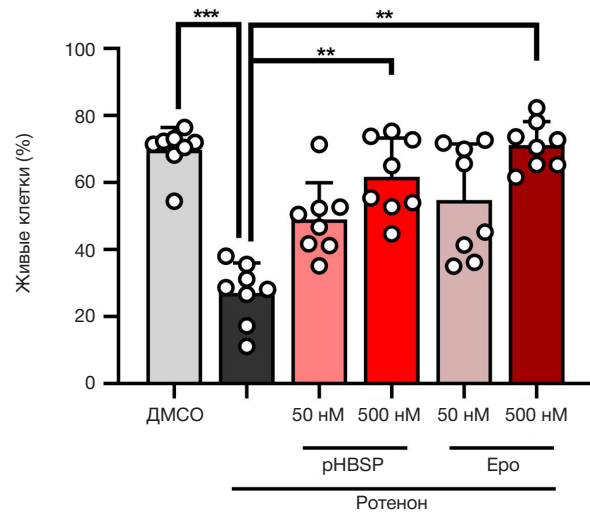


Рис. 3. Цитопротективное действие рНБСП и ЕРО на первичной нейроглиальной культуре, обработанной ротеноном в концентрации 2,5 мкМ. \*\* —  $p < 0,005$ ; \*\*\* —  $p < 0,0005$  при сравнении по Данну

у крыс [23]. Несмотря на то что в этой работе мы не проводили количественную или полуквантитативную оценку уровня степени фосфорилирования белков аутофагии, некоторые из данных факторов уже были идентифицированы как медиаторы нейропротекции при митохондриальной дисфункции [16, 24, 25]. Кроме того, прежде было показано, что некоторые положительные эффекты рНБСП связаны со стимуляцией аутофагии. Например, продемонстрировано, что гепатопротективная активность рНБСП связана с увеличением экспрессии белков LC3II, LC3I, and Beclin 1 и может быть отменена ингибиторами аутофагии [15]. Аналогично, аутофагия была идентифицирована как одно из основных звеньев, опосредующих нейропротективные эффекты ЕРО [26].

### Выводы

Таким образом, ЕРО и рНБСП, селективный агонист EPOR/CD131, проявляют выраженную нейропротективную активность при ротенон-индуцированном поражении. Исследование показало, что стимуляция аутофагии и митофагии является одним из вероятных механизмов наблюдаемых фармакологических эффектов. Применение агонистов EPOR/CD131 является перспективным направлением в лечении нейродегенеративных процессов центральной нервной системы и сетчатки. Дальнейшие исследования на конкретных моделях НЗ, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или боковой амиотрофический склероз, могут помочь в определении перспективности клинического применения рНБСП.

- 32656815.
- Ludtmann MHR, Abramov AY. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2018; 663: 86–90. PMID: 28838811.
- Lou G, Palikaras K, Lautrup S, Scheibye-Knudsen M, Tavernarakis N, Fang EF. Mitophagy and Neuroprotection. *Trends Mol Med*. 2020; 26 (1): 8–20. PMID: 31375365.
- Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*. 2005; 8 (1): 3–5. doi:

- 10.1089/rej.2005.8.3.
7. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 2018; 20 (9): 1013–1022. doi: 10.1038/s41556-018-0176-2.
  8. Zuo Z, Jing K, Wu H, Wang S, Ye L, Li Z, Yang C, Pan Q, Liu WJ, Liu HF. Mechanisms and Functions of Mitophagy and Potential Roles in Renal Disease. *Front Physiol.* 2020; 11: 935. PMID: 32903665.
  9. Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22 (2): 206–211. PMID: 20045304.
  10. Cai Q, Ganesan D. Regulation of neuronal autophagy and the implications in neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis.* 2022; 162: 105582. PMID: 34890791.
  11. Senousy MA, Hanafy ME, Shehata N, Rizk SM. Erythropoietin and Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Mitigate 3-Nitropropionic Acid-Induced Huntington-like Disease in Rats by Modulating the PI3K/Akt/mTOR/P70S6K Pathway and Enhancing the Autophagy. *ACS Chem Neurosci.* 2022; 13(6): 721–732. PMID: 35226456.
  12. Nichol A, French C, Little L, Haddad S, Presneill J, Arabi Y, Bailey M, Cooper DJ, Duranteau J, Huet O, Mak A, McArthur C, Pettilä V, Skrifvars M, Vallance S, Varma D, Wills J, Bellomo R. EPO-TBI Investigators; ANZICS Clinical Trials Group. Erythropoietin in traumatic brain injury (EPO-TBI): a double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2015; 386 (10012): 2499–2506. PMID: 26452709.
  13. Hemani S, Lane O, Agarwal S, Yu SP, Woodbury A. Systematic Review of Erythropoietin (EPO) for Neuroprotection in Human Studies. *Neurochem Res.* 2021; 46(4): 732–739. PMID: 33521906.
  14. Robertson CS, Garcia R, Gaddam SS, Grill RJ, Cerami Hand C, Tian TS, Hannay HJ. Treatment of mild traumatic brain injury with an erythropoietin-mimetic peptide. *J Neurotrauma.* 2013; 30 (9): 765–74. PMID: 22827443.
  15. Tan R, Tian H, Yang B, Zhang Bo, Dai C, Han Z, Wang M, Li Y, Wei L, Chen D, Wang G, Yang H, He F, Chen Z. Autophagy and Akt in the protective effect of erythropoietin helix B surface peptide against hepatic ischaemia/reperfusion injury in mice. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 14703.
  16. Filomeni G, Graziani I, De Zio D, Dini L, Centonze D, Rotilio G, Ciriolo MR. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2012; 33 (4): 767–85. PMID: 20594614.
  17. Sasaoka M, Ota T, Kageyama M. Rotenone-induced inner retinal degeneration via presynaptic activation of voltage-dependent sodium and L-type calcium channels in rats. *Sci Rep.* 2020; 10: 969. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57638-y>.
  18. Benjamin AB, Ahenkorah J, Bismarck AH, Esther D, Addai FK. Improved method of producing satisfactory sections of whole eyeball by routine histology. *Microscopy Research and Technique.* 2014; 77 (2): 138–142. PMID: 24249388.
  19. Goldberg MF, McLeod S, Tso M, Packo K, Edwards M, Bhutto IA, Baldeosingh, Eberhart C, Weber BHF, Luty GA. Ocular Histopathology and Immunohistochemical Analysis in the Oldest Known Individual with Autosomal Dominant Vitreoretinopathy. *Ophthalmology Retina.* 2018; 2 (4): 360–378. PMID: 29774302.
  20. Kubekina MV, Silaeva Y Yu, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, Soldatova MO, Seryogina E, Kolesnik IM, Ukolova PA, Korokin MV, Deykin AV. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology.* 2021; 7 (3): 33–39.
  21. Livak KJ. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25 (4): 402–408. PMID: 11846609.
  22. Plenge U, Belhage B, Guadalupe-Grau A, Andersen PR, Lundby C, Dela F, Stride N, Pott FC, Helge JW, Boushel R. Erythropoietin treatment enhances muscle mitochondrial capacity in humans. *Front Physiol.* 2012; 13 (3): 50. PMID: 22419911.
  23. Покровский М. В., Солдатов В. О., Затолокина М. А. и др. Связь EPOR/CD131-опосредованной нейропротекции при хронической экспозиции этанола у крыс с модуляцией экспрессии генов аутофагии, апоптоза, нейровоспаления и нейрональной регенерации. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2021; 84 (2): 91–98.
  24. Su Y, Zhang Z, Li H, Ma J, Sun L, Shao S, Zhang Z, Hölscher C. A GLP-2 Analogue Protects SH-SY5Y and Neuro-2a Cells Against Mitochondrial Damage, Autophagy Impairments and Apoptosis in a Parkinson Model. *Drug Res (Stuttg).* 2021; 71 (1): 43–50. PMID: 33022720.
  25. Li Q, Zhang T, Wang J, Zhang Z, Zhai Y, Yang GY, Sun X. Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 444 (2): 182–188. PMID: 24440703.
  26. Jang W, Kim HJ, Li H, Jo KD, Lee MK, Yang HO. The Neuroprotective Effect of Erythropoietin on Rotenone-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells Through the Induction of Autophagy. *Mol Neurobiol.* 2016; 53 (6): 3812–3821. PMID: 26156288.

## References

1. Logroscino G, Urso D, Savica R. Descriptive epidemiology of neurodegenerative diseases: What are the critical questions? *Neuroepidemiology.* 2022 Jun 21. Online ahead of print. PMID: 35728570.
2. Soldatov VO, Kukharsky MS, Belykh AE, Sobolev AM, Deykin AV. Retinal Damage in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Underlying Mechanisms. *Eye Brain.* 2021; 13: 131–146. PMID: 34012311.
3. Angelova PR, Esteras N, Abramov AY. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Med Res Rev.* 2021; 41 (2): 770–784. PMID: 32656815.
4. Ludtmann MHR, Abramov AY. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2018; 663: 86–90. PMID: 28838811.
5. Lou G, Palikaras K, Lautrup S, Scheibye-Knudsen M, Tavernarakis N, Fang EF. Mitophagy and Neuroprotection. *Trends Mol Med.* 2020; 26 (1): 8–20. PMID: 31375365.
6. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* 2005; 8 (1): 3–5. doi: 10.1089/rej.2005.8.3.
7. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 2018; 20 (9): 1013–1022. doi: 10.1038/s41556-018-0176-2.
8. Zuo Z, Jing K, Wu H, Wang S, Ye L, Li Z, Yang C, Pan Q, Liu WJ, Liu HF. Mechanisms and Functions of Mitophagy and Potential Roles in Renal Disease. *Front Physiol.* 2020; 11: 935. PMID: 32903665.
9. Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22 (2): 206–211. PMID: 20045304.
10. Cai Q, Ganesan D. Regulation of neuronal autophagy and the implications in neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis.* 2022; 162: 105582. PMID: 34890791.
11. Senousy MA, Hanafy ME, Shehata N, Rizk SM. Erythropoietin and Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Mitigate 3-Nitropropionic Acid-Induced Huntington-like Disease in Rats by Modulating the PI3K/Akt/mTOR/P70S6K Pathway and Enhancing the Autophagy. *ACS Chem Neurosci.* 2022; 13(6): 721–732. PMID: 35226456.
12. Nichol A, French C, Little L, Haddad S, Presneill J, Arabi Y, Bailey M, Cooper DJ, Duranteau J, Huet O, Mak A, McArthur C, Pettilä V, Skrifvars M, Vallance S, Varma D, Wills J, Bellomo R. EPO-TBI Investigators; ANZICS Clinical Trials Group. Erythropoietin in traumatic brain injury (EPO-TBI): a double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2015; 386 (10012): 2499–2506. PMID: 26452709.
13. Hemani S, Lane O, Agarwal S, Yu SP, Woodbury A. Systematic

- Review of Erythropoietin (EPO) for Neuroprotection in Human Studies. *Neurochem Res.* 2021; 46 (4): 732–739. PMID: 33521906.
14. Robertson CS, Garcia R, Gaddam SS, Grill RJ, Cerami Hand C, Tian TS, Hannay HJ. Treatment of mild traumatic brain injury with an erythropoietin-mimetic peptide. *J Neurotrauma.* 2013; 30 (9): 765–74. PMID: 22827443.
  15. Tan R, Tian H, Yang B, Zhang Bo, Dai C, Han Z, Wang M, Li Y, Wei L, Chen D, Wang G, Yang H, He F, Chen Z. Autophagy and Akt in the protective effect of erythropoietin helix B surface peptide against hepatic ischaemia/reperfusion injury in mice. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 14703.
  16. Filomeni G, Graziani I, De Zio D, Dini L, Centonze D, Rotilio G, Ciriolo MR. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2012; 33 (4): 767–85. PMID: 20594614.
  17. Sasaoka M, Ota T, Kageyama M. Rotenone-induced inner retinal degeneration via presynaptic activation of voltage-dependent sodium and L-type calcium channels in rats. *Sci Rep.* 2020; 10: 969. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57638-y>.
  18. Benjamin AB, Ahenkorah J, Bismarck AH, Esther D, Addai FK. Improved method of producing satisfactory sections of whole eyeball by routine histology. *Microscopy Research and Technique.* 2014; 77 (2): 138–142. PMID: 24249388.
  19. Goldberg MF, McLeod S, Tso M, Packo K, Edwards M, Bhutto IA, Baldeosingh, Eberhart C, Weber BHF, Luttly GA. Ocular Histopathology and Immunohistochemical Analysis in the Oldest Known Individual with Autosomal Dominant Vitreoretinopathy. *Ophthalmology Retina.* 2018; 2 (4): 360–378. PMID: 29774302.
  20. Kubekina MV, Silaeva YYu, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, Soldatova MO, Seryogina E, Kolesnik IM, Ukolova PA, Korokin MV, Deykin AV. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology.* 2021; 7 (3): 33–39.
  21. Livak KJ. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25 (4): 402–408. PMID: 11846609.
  22. Plenge U, Belhage B, Guadalupe-Grau A, Andersen PR, Lundby C, Dela F, Stride N, Pott FC, Helge JW, Boushel R. Erythropoietin treatment enhances muscle mitochondrial capacity in humans. *Front Physiol.* 2012; 13 (3): 50. PMID: 22419911.
  23. Pokrovskij MV, Soldatov VO, Zatulokina MA et al. Svjaz' EPOR/CD131-oposredovannoj nejroprotekcii pri hronicheskoj jekspozicii jetanola u krysa s moduljaciej jekspressii genov autofagii, apoptoza, nejrovospaleniya i nejronal'noj regeneracii. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija.* 2021; 84 (2): 91–98. Russian].
  24. Su Y, Zhang Z, Li H, Ma J, Sun L, Shao S, Zhang Z, Hölscher C. A GLP-2 Analogue Protects SH-SY5Y and Neuro-2a Cells Against Mitochondrial Damage, Autophagy Impairments and Apoptosis in a Parkinson Model. *Drug Res (Stuttg).* 2021; 71 (1): 43–50. PMID: 33022720.
  25. Li Q, Zhang T, Wang J, Zhang Z, Zhai Y, Yang GY, Sun X. Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 444 (2) :182–188. PMID: 24440703.
  26. Jang W, Kim HJ, Li H, Jo KD, Lee MK, Yang HO. The Neuroprotective Effect of Erythropoietin on Rotenone-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells Through the Induction of Autophagy. *Mol Neurobiol.* 2016; 53 (6): 3812–3821. PMID: 26156288.