

ИЗУЧЕНИЕ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ К С3 КОМПОНЕНТУ КОМПЛЕМЕНТА НА МОДЕЛИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У КРЫС

© 2018 г. Н. П. Горбунов*, А. М. Ищенко, А. В. Жахов, А. В. Трофимов,
Е. С. Денисенко, Г. В. Александров, М. С. Захаров

*E-mail: n.p.gorbynov@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Получены высокоаффинные моноклональные антитела, блокирующие активацию компонента крысы по альтернативному пути за счет специфической нейтрализации С3 компонента, их эффективность изучена на модели закрытой черепно-мозговой травмы (ЗЧМТ) путем оценки сохранности условного рефлекса пассивного избегания и исследования гистологических препаратов мозга. Полученные результаты свидетельствовали о сохранении когнитивных функций, а также улучшении гистологической картины мозговой ткани у животных с ЗЧМТ, которым вводили нейтрализующие комплемент антитела.

Ключевые слова: С3 компонент комплемента крысы, моноклональные антитела, черепно-мозговая травма, когнитивные функции, гистологический анализ

DOI: 10.31857/S102872210002623-0

Авторы:

Горбунов Н. П., м.н.с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Ищенко А. М., к.б.н., начальник лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Жахов А. В., в.н.с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Трофимов А. В., руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Денисенко Е. С., инженер 1 категории лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Александров Г. В., к.б.н., зам.начальника лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Захаров М. С., начальник лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Введение. Накоплен большой массив данных, которые указывают на то, что комплемент является потенциальной терапевтической мишенью при остром инсульте и других повреждениях мозга [1–2]. Эти данные были получены в экспериментах *in vitro* на культивируемых линиях клеток, а также на различных экспериментальных моделях ишемического и геморрагического инсульта у грызунов. Имеются положительные данные по блокированию комплемента после инсульта у людей [3]. При этом блокирование

компонента С3 — центрального в цепи активации всех трех путей является перспективным стратегическим направлением [4].

Целью настоящей работы являлось получение высокоаффинных моноклональных антител, блокирующих активацию комплемента крысы по альтернативному пути за счет специфической нейтрализации С3 компонента, и их последующее использование в качестве протективного средства на модели закрытой черепно-мозговой травмы (ЗЧМТ).

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели из плазмы крови экспериментальных животных был выделен и очищен С3 компонент комплемента крысы для получения антител и скрининга гибридом. Процесс выделения и очистки включал осаждение ПЭГ 6000 и последовательную хроматографию низкого давления с применением сорбентов monoQ, Capto G и Superdex G200. Для получения моноклональных антител использовали методы гибридомной технологии. Иммунизацию животных осуществляли измельченными гранулами Сефадекса G-50 с иммобилизованным на них С3 компонентом комплемента крысы. Для скрининга и характеристики антител использовали варианты иммуноферментного анализа, иммуноблоттинг и тест гемолиза эритроцитов кролика в условиях АПК.

Для моделирования закрытой черепно-мозговой травмы у экспериментальных животных была применена модель свободно падающего груза. Для нанесения повреждения животному над теменной областью черепа слева была установлена металлическая трубка. Трубка направляла падение груза, представляющего собой свинцовый шар. В результате падения груза, крыса получала повреждение головного мозга, сравнимое с ЗЧМТ у человека.

Состояние экспериментальных животных до и после нанесения повреждения оценивали в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) с использованием аппаратно-программного комплекса «Шелтер» (ООО «Нейроботикс», Россия). Метод осуществляли в 3 этапа: предварительный отбор животных, проводящих в светлой камере не более 40 из 120 сек наблюдения, процедура выработки УРПИ, оценка сохранности приобретенного УРПИ на фоне введения тестируемого препарата в сроки, установленные условиями эксперимента. Для оценки сохранности УРПИ животное помещали в светлый отсек камеры и в течение 180 сек регистрировали его поведение. Животное, зашедшее в темный отсек, считалось необученным или забывшим факт электроболевого раздражения, животное, не зашедшее в темный отсек, считалось обученным. Для каждой экспериментальной группы фиксировали количество обученных и необученных животных.

Для проведения гистологического и патоморфологического исследования через сутки после нанесения ЗЧМТ крыс подвергали эвтаназии, головной мозг извлекали из полости черепа, рассчитывали его массовый коэффициент относительно массы тела животного и готовили препараты различных участков мозга и гиппокампа путем фиксации в 10% растворе формалина. Готовые препараты после соответствующей обработки изучали, используя световой микроскоп DMLB (Leica Microsystems AG, Германия). Микрофотографии срезов получали с помощью цифровой камеры DC300 (Leica Microsystems A.G, Германия). На гистологических препаратах мозга исследовали степень травматического повреждения путем анализа выраженности кровоизлияний, отека и других признаков ЗЧМТ, оценивали соотношения живых и погибших нейронов в областях гиппокампа CA1 и CA3.

Результаты. Методом гибридной технологии получены моноклональные антитела к С3 компоненту комплемента крысы, обладающие

высокой аффинностью и способностью нейтрализовать активацию комплемента, показанную в гемолитическом тесте.

Анализ состояния когнитивных функций экспериментальных животных в методике оценки сохранности УРПИ выявил, что введение крысам антител к С3 компоненту комплемента вызывает четкую тенденцию к сохранению памятного следа у животных, перенесших ЗЧМТ.

Результаты гистологического и патоморфологического исследования показали, что у животных, не получавших ЗЧМТ, не выявляются признаки отека оболочек и вещества головного мозга, кровоизлияния, полнокровия сосудов и лейкоцитарной инфильтрации. У животных контрольной группы, получивших ЗЧМТ, но не получивших лечение, наблюдали типичные признаки ЗЧМТ: периваскулярные кровоизлияния и инфильтрацию лейкоцитами, вазоспазм, отек, полнокровие сосудов. У животных опытных групп, получавших препарат в дозах 125 и 250 мг/кг, было выявлено лишь небольшое полнокровие сосудов и очаги отека ткани. Помимо этого в ряде случаев у животных контрольной группы наблюдали очаговые кровоизлияния в толще мозговых оболочек; в опытных группах состояние мозговых оболочек было нормальным.

Исследование гистологических препаратов также показало, что у контрольных животных с ЗЧМТ в специфических областях мозга наблюдаются полиморфные изменения ядер (гипохромия и гиперхромия) нейронов, увеличение количества клеток-«теней». То есть наблюдаются все стадии апоптоза нервных клеток. У животных опытных групп, получавших препарат в экспериментальных дозах, патологические изменения значительно менее выражены.

Обсуждение/выводы. На основании результатов, полученных в ходе исследования, можно утверждать, что введение антител к С3 компоненту комплемента экспериментальным животным с ЗЧМТ приводило к выраженному положительному эффекту, проявлявшемуся в сохранении когнитивных функций животных, а также в улучшении гистологической картины мозговой ткани животных.

Исследование выполнено в рамках государственного контракта № 14.N08.11.0121 от 30.09.2016 г. с Минобрнауки РФ по теме: «Доклинические исследования лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизованного антитела к С3 компоненту компле-

мента человека для лечения травматического повреждения головного мозга».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Brennan F. H., Lee J. D., Ruitenber M. J., Woodruff T. M. Therapeutic targeting of complement to modify disease course and improve outcomes in neurological conditions // *Semin Immunol.* 2016. 28(3). P. 292–308.
2. Alawieh A., Tomlinson S. Injury site-specific targeting of complement inhibitors for treating stroke // *Immunol. Rev.* 2016. Vol. 274 (1). P. 270–280.
3. Alawieh A., Elvington A., Zhu H., Yu J., Kindy M. S., Atkinson C., Tomlinson S. Modulation of post-stroke degenerative and regenerative processes and subacute protection by site-targeted inhibition of the alternative pathway of complement // *J Neuroinflammation.* 2015. Vol.12. P. 247–259.
4. Mastellos D. C., Reis E. S., Yancopoulou D., Hajishengallis G., Ricklin D., Lambris J. D. From orphan drugs to adopted therapies: Advancing C3-targeted intervention to the clinical stage // *Immunobiology.* 2016. Oct. Vol.221(10).P.1046–57.

STUDY OF THE INHIBITORY EFFECT OF ANTIBODIES AGAINST C3 COMPLEMENT COMPONENT IN A RAT MODEL OF TRAUMATIC BRAIN INJURY

© 2018 N. P. Gorbunov*, A. M. Ischenko, A. V. Zhakhov, A. V. Trofimov, E. S. Denisenko, G. V. Alexandrov, M. S. Zakharov

*E-mail: n.p.gorbynov@hpb.spb.ru

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia

High affinity monoclonal antibodies against the complement component C3 that can inhibit rat complement alternative activation were generated. The antibody effectiveness was assessed in animal model of traumatic brain injury (TBI) by evaluating conditioned passive avoidance reflex and by histologic studying brain tissue specimens. It was demonstrated that application of complement-neutralizing antibodies in rats subjected to TBI resulted in preservation of animal cognitive functions and an improvement of brain tissue histology.

Key words: C3 component of rat's complement, monoclonal antibodies, traumatic brain injury, cognitive functions, histological study

Authors:

Gorbunov N. P., ☒ Senior Researcher, Laboratory of Protein Biochemistry State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia, E-mail: n.p.gorbynov@hpb.spb.ru;

Ischenko A. M., Ph.D., Head of Laboratory of Protein Biochemistry State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Zhakhov A. V., Leading Researcher, Laboratory of Protein Biochemistry State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Trofimov A. V., Group Leader, Laboratory of Protein Biochemistry State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Denisenko E. S., Engineer, Laboratory of Protein Biochemistry State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Aleksandrov G. V., Ph.D., Deputy Head of Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Zakharov M. S., Head of Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia.