

УДК 612.82;615.2

МИТОХОНДРИАЛЬНО-АДРЕСОВАННОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ПЛАСТОХИНОНА АНТИОКСИДАНТ SkQR1 ОКАЗЫВАЕТ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ПАМЯТЬ КРЫС

© 2015 Е.В. Стельмашук^{1,3}, А.В. Ставровская¹, Н.Г. Ямщикова¹,
А.С. Ольшанский¹, Н.А. Капай^{1,3}, О.В. Попова^{1,3}, Л.Г. Хаспеков¹,
В.Г. Скребицкий¹, Н.К. Исаев^{1,2,3*}

¹ Научный центр неврологии РАМН, 125367 Москва,
Волоколамское шоссе, 80; электронная почта: estelmash@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва;
факс: +7(495)939-3181, электронная почта: isaev@genebee.msu.ru

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ Митохондженирии, 119991 Москва;
электронная почта: info@skq&project.ru

Поступила в редакцию 25.11.14

Однократное внутривнутрибрюшинное введение крысам митохондриально-адресованного производного пластохинона антиоксиданта SkQR1 в дозе 1 мкмоль/кг веса достоверно улучшало воспроизведение ими условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). В экспериментах *in vitro*, выполненных на срезах гиппокампа, обнаружено, что внутривнутрибрюшинное введение SkQR1 за 24 ч до приготовления срезов вызывает достоверное повышение эффективности синаптической передачи пирамидных нейронов поля CA1. Полученные результаты указывают на то, что SkQR1 положительно влияет на процессы памяти.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: память, длительная потенция, гиппокамп, митохондриально-адресованные антиоксиданты, SkQ.

Память — это главная составляющая личности, она соединяет прошлое человека с его настоящим и будущим и является сложным физиологическим процессом, включающим в себя сохранение, воспроизведение и накопление информации. От состояния памяти, несомненно, зависят и способности к обучению. Ослабление памяти может возникнуть с возрастом, а также вследствие сосудистых заболеваний головного мозга, его травматических повреждений и развития такого фатального возрастного нейродегенеративного заболевания, как болезнь Альцгеймера (БА). Это заболевание характеризуется прогрессирующим нарушением памяти, переходящим в разрушение личности, что в конечном итоге заканчивается смертью. Нарушения памяти

при БА в значительной степени связывают с бета-амилоидным пептидом (Абета) и гиперфосфорилированным тау-белком, вовлеченными в процессы синаптической дегенерации и дисфункции митохондрий [1]. Этим нарушениям могут препятствовать митохондриально-адресованные антиоксиданты [2–5]. Однако проблема фармакологической стимуляции процессов памяти в значительной степени остается открытой, что и явилось предметом исследования в настоящей работе. Мы показали, что митохондриально-адресованный антиоксидант SkQR1 усиливает длительную потенцию популяционного спайка пирамидных нейронов поля CA1, т.е. вызывает повышение эффективности синаптической передачи в срезах гиппокампа, лежащей, как полагают, в основе процессов обучения и памяти [6], а также улучшает способность животных запоминать негативное раздражение в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Полученные данные демонстрируют, что SkQR1 обладает выраженными мнемотропными свойствами.

Принятые сокращения: УРПИ — условный рефлекс пассивного избегания, Абета — бета-амилоидный пептид 1–42, АФК — активные формы кислорода, ПС — популяционный спайк, БА — болезнь Альцгеймера, ВЧС — высокочастотная стимуляция, SkQR1 — 10-(6'-пластохинонил)децилпроламины 19.

* Адресат для корреспонденции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар. Животных содержали в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественном чередовании суточной освещенности. Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и одобрены Этическим Комитетом ФГБУ «НЦН» РАМН.

В экспериментах крысам в возрасте 1 мес. и массой 80–110 г вводили внутрибрюшинно SkQR1 в дозе 1 мкмоль/кг. Срезы гиппокампа, приготовленные через 24 или 48 ч после введения SkQR1, помещали в камеру для регистрации биоэлектрической активности и перфузировали при 29–30° модифицированным раствором Рингера, непрерывно насыщаемым карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂), следующего состава (мМ): NaCl – 124; KCl – 3; CaCl₂ – 2,5; MgSO₄ – 2,5; Na₂HPO₄ – 1,25; NaHCO₃ – 26; D-глюкоза – 10. Регистрацию начинали через 1,5–2 ч после приготовления срезов. С помощью стеклянного микроэлектрода, заполненного 1,5 М NaCl (сопротивление 2–5 МОм), в пирамидном слое поля CA1 регистрировали популяционный ответ, вызываемый стимуляцией радиального слоя одиночными прямоугольными импульсами (0,1 мс, 1/15 с). Силу стимула подбирали так, чтобы амплитуда пикового компонента ответа, отражающего суммарный спайковый ответ популяции пирамидных нейронов (ПС), составляла примерно половину его максимальной величины. Потенциацию ПС вызывали высокочастотной стимуляцией (ВЧС, 100 Гц, 1 с) входа через те же электроды и при той же силе стимула. На каждом срезе проводили только одну ВЧС. Степень реактивности пирамидных нейронов оценивали по изменениям амплитуды ПС относительно ее средней величины, определяемой по 15-минутному периоду регистрации фоновой активности до ВЧС.

В экспериментах *in vivo* использовали крыс в возрасте 3–4 мес. Животным опытной группы вводили однократно внутрибрюшинно SkQR1 в дозе 1 мкмоль/кг веса в физиологическом растворе и через сутки проводили исследование в тесте УРПИ. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Экспериментальная установка для изучения пассивного оборонительного поведения («Panlab», Испания) представляла собой прямоугольную камеру с металлическим полом, разделенную вертикальной перегородкой на два отсека (темный и ярко освещенный) с отверстием между отсеками возле пола. С целью приучения к установке животных помещали в освещенный отсек и оп-

ределяли длительность латентных периодов переходов в темный отсек, не применяя болевую стимуляцию. После повторного помещения крыс в освещенный отсек переходы в темный отсек сопровождались болевым воздействием путем нанесения удара постоянного электрического тока (2 мА, 3 с). В это время доступ в светлый отсек был закрыт, а сразу после выключения тока крыс удаляли из установки и возвращали в домашнюю клетку. Чем лучше помнит животное о нанесенном в затемненном отделении болевом раздражении, тем меньше времени оно находится в темноте, тем больше временной интервал до захода в «опасное» отделение.

Регистрацию поведенческих реакций и анализ экспериментов проводили с применением системы видеонаблюдения (ANY-maze Video Tracking System, «Stoelting», США).

Для статистического анализа использовали *t*-критерий Стьюдента или тест ANOVA с поправкой Bonferroni. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты представляли в виде средней величины \pm SEM.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние SkQR1 на воспроизведение УРПИ. У животных, которым однократно вводили 1 мкмоль/кг SkQR1 за 24 ч до нанесения негативного стимула, латентные периоды перехода в темный отсек камеры были достоверно более продолжительными по сравнению с контрольными животными на первые сутки после нанесения болевого стимула. В дальнейшем, к 3 и 7-м суткам, различие между контрольной и опытной группами было менее выраженным (рис. 1).

Влияние SkQR1 на амплитуду ПС в срезах гиппокампа. Стандартная ВЧС (100 Гц, 1 с) коллатералей Шаффера вызывала длительную посттетаническую потенциацию в поле CA1 срезов гиппокампа, так что через 30 мин после ВЧС амплитуда ПС повышалась в контроле до $147,7 \pm 9,7\%$ ($n = 6$; рис. 2, а, з). В срезах, приготовленных через 24 ч после введения крысам 1 мкмоль/кг SkQR1, амплитуда ПС была достоверно выше, чем в контроле и составляла $218,6 \pm 27,6\%$ ($n = 7$; рис. 2, б, з), а через 48 ч – $176,4 \pm 19,7\%$ ($n = 5$; рис. 2, в, з).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время установлено, что гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) играет важную роль в патогенезе сердечных арит-

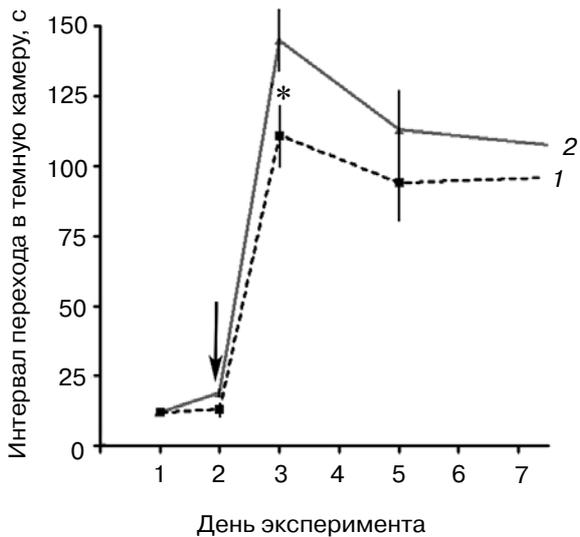


Рис. 1. Влияние однократного (за 24 ч до болевой стимуляции) введения SkQR1 на воспроизведение УРПИ. 1 – Контрольные животные, 2 – животные, получившие 1 мкмоль/кг SkQR1. По оси ординат – длительность временного интервала перехода животного в темный отсек камеры. Стрелка указывает время нанесения болевой стимуляции. * $p < 0,05$, $n = 26$ (число животных в каждой группе)

мий, инфаркта миокарда и почки, инсульта, травмы головного мозга, болезни Альцгеймера. Применение соединений семейства митохондриально-адресованных антиоксидантов SkQ позволяет целенаправленно и эффективно препятствовать негативному действию АФК при моделировании этих патологических состояний [2, 7–12]. Одним из наиболее перспективных митохондриально-адресованных антиоксидантов группы SkQ является SkQ1, который в настоящее время уже используется в медицинской практике [13]. Кроме того, показано положительное действие SkQ1 при экспериментальном моделировании нормального и патологического старения. Так, при исследовании поведения в крестообразном лабиринте и открытом поле крыс линий Wistar и OXYS с ускоренным старением обнаружено, что введение SkQ1 значительно повышает их двигательную и исследовательскую активности, препятствуя возрастным нарушениям памяти, а также замедляет накопление в головном мозге гиперфосфорилированного тау-белка, Аβета и его белка-предшественника APP [14], вовлеченных в развитие нейродегенеративных процессов при БА. Кроме того,

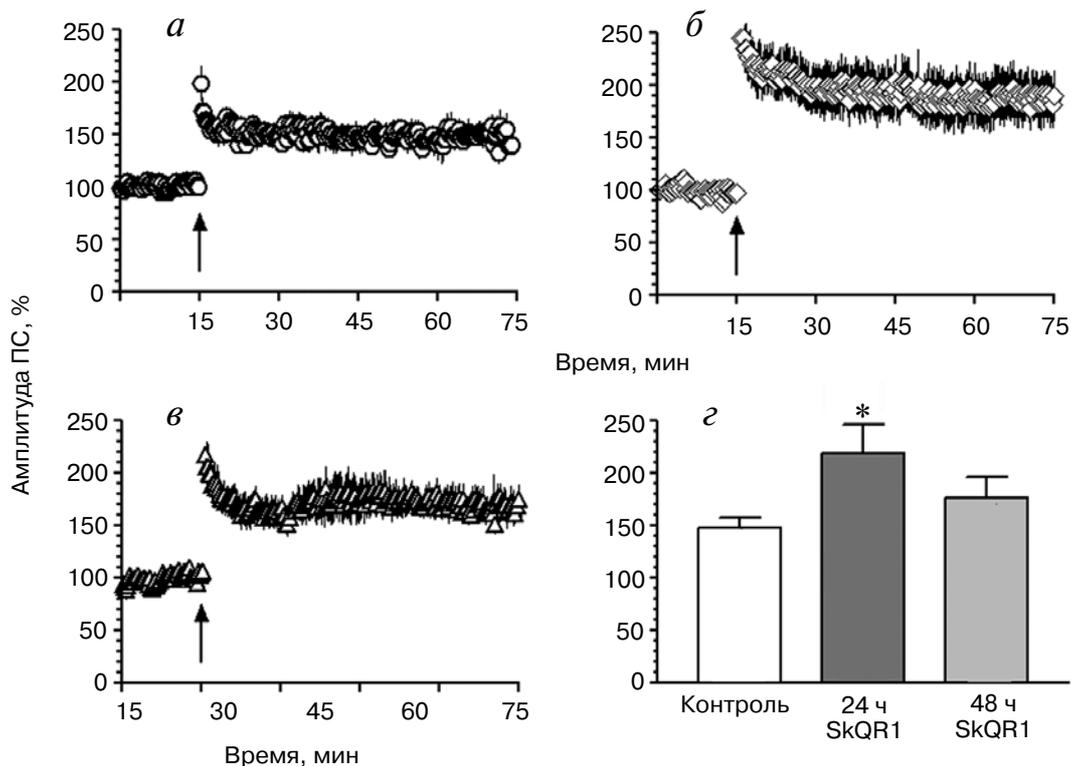


Рис. 2. SkQR1 стимулирует длительную посттетаническую потенцию в срезах гиппокампа. *a–в* – Временной ход изменений амплитуды суммарных ПС срезов гиппокампа: *a* – контроль ($n = 6$); *б* – срезы, приготовленные через 24 ч; *в* – через 48 ч после введения животным 1 мкмоль/кг SkQR1 ($n = 5$), n – число срезов от разных животных. Стрелка указывает момент нанесения ВЧС; *г* – средние значения амплитуд ПС, зарегистрированного через 30 мин после ВЧС. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем

SkQ1 препятствует таким возрастным изменениям у крыс, как снижение зрения и проявление ретинопатии и катаракты [15]. Результаты, полученные ранее нами и другими авторами, свидетельствуют о том, что митохондриально-адресованные антиоксиданты способны корректировать вызванные Аβета нарушения процессов, лежащих в основе памяти и других когнитивных функций [2, 3, 5]. В настоящей работе мы использовали высокоэффективный митохондриально-адресованный родамин-содержащий аналог SkQ1 – SkQR1 [16]. Это вещество является не только очень эффективным антиоксидантом, но и при внутрибрюшинном введении крысам ингибирует в головном мозге киназу гликогенсинтазы 3-бета (GSK3β) [17], снижение активности которой увеличивает длительную посттетаническую потенциацию популяционного спайка в гиппокампе *in vivo* и *in vitro* [18]. Длительная посттетаническая потенциация представляет собой повышение эффективности синаптической передачи между нейронами, сохраняющееся на протяжении длительного времени после высокочастотного воздействия на синаптический проводящий путь. В настоящее время большинство нейрофизиологов полагают, что механизмы долговременной потенциации лежат в основе клеточных механизмов памяти и обуче-

ния. Обнаруженное нами в данной работе усиление длительной посттетанической потенциации в срезах гиппокампа крыс, так же как и повышение способности этих животных к обучению в тесте УРПИ, наблюдавшееся через 24 ч после инъекции SkQR1, может быть обусловлено как антиоксидантным действием, так и ингибированием GSK3β. Следует отметить, что кратковременность эффектов (снижение этих показателей через 48 ч после инъекции) связана, по видимому, с постепенным метаболизмом и выведением SkQR1 из организма.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что митохондриально-адресованный антиоксидант SkQR1 обладает выраженными мнемотропными свойствами. Можно предположить, что механизмы коррекции памяти SkQR1 связаны не только с ингибированием избыточной продукции митохондриальных АФК, но и с его способностью снижать в головном мозге активность белка GSK3β [17], участвующего в ингибировании длительной посттетанической потенциации [19].

Мы очень благодарны В.П. Скулачеву за постоянное внимание и поддержку нашей работы. Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ 14-24-00107.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmitt, K., Grimm, A., Kazmierczak, A., Strosznajder, J.B., Gutz, J., and Eckert, A. (2012) Insights into mitochondrial dysfunction: aging, amyloid-β, and tau-A deleterious trio, *Antioxid. Redox Signal.*, **16**, 1456–1466.
- Капай Н.А., Исаев Н.К., Стельмашук Е.В., Попова О.В., Зоров Д.Б., Скребицкий В.Г., Скулачев В.П. (2011) Митохондриально-адресованное производное пластохинона, антиоксидант SkQR1, введенный *in vivo*, предотвращает нарушение длительной потенциации, вызванное β-амилоидом в срезах гиппокампа, *Биохимия*, **76**, 1695–1699.
- Ma, T., Hoeffler, C.A., Wong, H., Massaad, C.A., Zhou, P., Iadecola, C., Murphy, M.P., Pautler, R.G., and Klann, E. (2011) Amyloid β-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity are rescued by decreasing mitochondrial superoxide, *J. Neurosci.*, **31**, 5589–5595.
- Skulachev, V.P. (2012) Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases, *J. Alzheimers Dis.*, **28**, 283–289.
- Капай, Н.А., Попова, О.В., Исаев, Н.К., Стельмашук, Е.В., Кондратенко, Р.В., Зоров, Д.Б., Скребицкий, В.Г., и Скулачев, В.П. (2013) Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQ1 prevents amyloid-β-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices, *J. Alzheimers Dis.*, **36**, 377–383.
- Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1999) Long-term potentiation – a decade of progress, *Science*, **285**, 1870–1874.
- Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Elichev, V.P., Filenko, O.F., Kalinina, N.I., Kapelko, V.I., Kolosova, N.G., Kopnin, B.P., Korshunova, G.A., Lichinitser, M.R., Obukhova, L.A., Pasyukova, E.G., Pisarenko, O.I., Roginsky, V.A., Ruuge, E.K., Senin, I.I., Severina, I.I., Skulachev, M.V., Spivak, I.M., Tashlitsky, V.N., Tkachuk, V.A., Vyssokikh, M.Y., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437–461.
- Бакеева Л.Е., Барсков И.В., Егоров М.В., Исаев Н.К., Капелько В.И., Казаченко А.В., Кирпатовский М.И., Козловский С.В., Лакомкин В.Л., Левина С.В., Писаренко О.И., Плотников Е.Ю., Сапрунова В.Б., Серебрякова Л.И., Скулачев М.В., Стельмашук Е.В., Студнева И.М., Цкитишвили О.В., Васильева А.К., Викторов И.В., Зоров Д.Б., Скулачев В.П. (2008) Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения 2. Терапия некоторых старческих патологий, опосредованных АФК (сердечной аритмии, инфарктов сердца и почки и инсульта головного мозга), *Биохимия*, **73**, 1607–1621.
- Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Чупыркина А.А., Данышина М.И., Янкаускас С.С., Моросанова М.А., Стельмашук Е.В., Васильева А.К., Горячева Е.С., Пирогов Ю.А., Исаев Н.К., Зоров Д.Б. (2010) Новое поколение Скулачев-ионов, обладающих выраженным нефро- и нейропротекторным действием, *Биохимия*, **75**, 177–184.
- Исаев Н.К., Новикова С.В., Стельмашук Е.В., Барсков И.В., Силачев Д.Н., Хаспексов Л.Г., Скулачев В.П., Зоров Д.Б. (2012) Митохондриально-адресованное

- производное пластохинона, антиоксидант SkQR1, снижает вызванный травмой головного мозга неврологический дефицит у крыс, *Биохимия*, **77**, 1201–1206.
11. Исаев Н.К., Стельмашук Е.В., Шаронова И.Н., Скребицкий В.Г. (2013) Старение головного мозга и митохондриально-адресованные антиоксиданты класса SkQ, *Биохимия*, **78**, 391–397.
 12. Severina, I.I., Severin, F.F., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Ilyasova, T.M., Simonyan, R.A., Rogov, A.G., Trendeleva, T.A., Zvyagilskaya, R.A., Dugina, V.B., Domnina, L.V., Fetisova, E.K., Lyamzaev, K.G., Vyssokikh, M.Y., Chernyak, B.V., Skulachev, M.V., Skulachev, V.P., and Sadovnichii, V.A. (2013) In search of novel highly active mitochondria-targeted antioxidants: thymoquinone and its cationic derivatives, *FEBS Lett.*, **587**, 2018–2024.
 13. Скулачев В.П. (2012) Что такое «феноптоз» и как с ним бороться, *Биохимия*, **77**, 827–846.
 14. Stefanova, N.A., Fursova, A.Zh., and Kolosova, N.G. (2010) Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats, *J. Alzheimers Dis.*, **21**, 479–491.
 15. Stefanova, N.A., Muraleva, N.A., Skulachev, V.P., and Kolosova, N.G. (2014) Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1, *J. Alzheimers Dis.*, **38**, 681–694.
 16. Skulachev, V.P. (2013) Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **441**, 275–279.
 17. Silachev, D.N., Isaev, N.K., Pevzner, I.B., Zorova, L.D., Stelmashook, E.V., Novikova, S.V., Plotnikov, E.Y., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (2012) The mitochondria-targeted antioxidants and remote kidney preconditioning ameliorate brain damage through kidney-to-brain cross-talk, *PLoS One*, **7**, e51553.18.
 18. King, M.K., Pardo, M., Cheng, Y., Downey, K., Jope, R.S., and Beurel, E. (2014) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: rescuers of cognitive impairments, *Pharmacol. Ther.*, **141**, 1–12.
 19. Takashima, A. (2012) GSK-3 β and memory formation, *Front. Mol. Neurosci.*, **23**, 5–47.

MITOCHONDRIA-TARGETED PLASTOQUINONE ANTIOXIDANT SkQR1 HAS POSITIVE EFFECT ON MEMORY OF RATS

**E. V. Stelmashook^{1,3}, A. V. Stavrovskaya¹, N. G. Yamshchikova¹,
A. S. Ol'shanskii¹, N. A. Капар^{1,3}, O. V. Popova^{1,3}, L. G. Khaspekov¹,
V. G. Skrebitsky¹, N. K. Isaev^{1,2,3*}**

¹ *Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences,
Volokolamskoe sh. 80, Moscow 125367, Russia*

² *M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia*

³ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Institute
of Mitoengineering, Moscow 119991, Russia*

Received November 25, 2014

Intraperitoneal injection of the mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQR1 in rats (1 $\mu\text{mol/kg}$ of weight given 24 hours before slices were made) significantly increased long-term potentiation amplitude of the population spike in the pyramidal layer of the CA1 field of the hippocampus, and animals treated with SkQR1 performed better in behavioral tests of passive avoidance. The data indicate that SkQR1 has a positive effect on memory processes.

Key words: memory, long-term potentiation, hippocampus, mitochondria-targeted antioxidants, SkQR1