

УДК 57.03;57.017.64

## НАКОПЛЕНИЕ ДЕЛЕЦИЙ В ДНК МИТОХОНДРИЙ ГИППОКАМПА ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИХ КРЫС OXYS И ВЛИЯНИЕ НА НЕГО АНТИОКСИДАНТА SkQ1

© 2015 П.С. Лощенова<sup>1</sup>, О.И. Сеницына<sup>1,2</sup>, Л.А. Федосеева<sup>1</sup>,  
Н.А. Стефанова<sup>1</sup>, Н.Г. Колосова<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН,  
630090 Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10;  
электронная почта: kolosova@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет,  
630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

<sup>3</sup> Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, НИИ Митоинженерии, 119991 Москва

Поступила в редакцию 16.12.14  
После доработки 09.01.15

Снижение эффективности окислительного фосфорилирования при старении и развитии ассоциированных с ним нейродегенеративных заболеваний, в т.ч. болезни Альцгеймера, связывают с накоплением протяженных делеций митохондриальной ДНК (ΔмтДНК), которые рассматривают как маркер окислительных повреждений. Недавно мы показали, что адресованный в митохондрии антиоксидант SkQ1 (10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний) способен замедлять развитие признаков болезни Альцгеймера у преждевременно стареющих крыс OXYS. Цель настоящей работы – исследование связи развития нейродегенеративных изменений в мозге крыс OXYS с изменением количества мтДНК и протяженной делеции мтДНК 4834 п.н. (ΔмтДНК<sub>4834</sub>) и влияния на них SkQ1. Исследовали относительное количество мтДНК и ΔмтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе крыс OXYS и Вистар (контроль) в возрасте 1, 2, 6, 10, 20 дней и 3, 6 и 24 мес. В период, критический для манифестации признаков преждевременного старения крыс OXYS (с 1,5 до 3 мес.), оценивали влияние приема SkQ1 (250 нмоль/кг) и витамина Е (670 ммоль/кг – препарат сравнения) на количество мтДНК и ΔмтДНК<sub>4834</sub>, а также на формирование у крыс OXYS поведенческого признака ускоренного старения – пассивного типа поведения в тесте «открытое поле». У крыс OXYS уровень ΔмтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе повышен, по сравнению с крысами Вистар, наиболее существенно – в период завершения формирования мозга в постнатальный период и остается повышенным как на стадиях, предшествующих манифестации проявлений ускоренного старения мозга и развития признаков болезни Альцгеймера, так и в период их прогрессии, но в возрасте 24 мес. различий не выявлено. Прием SkQ1 снизил уровень ΔмтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе крыс Вистар и OXYS и замедлил формирование пассивного поведения у крыс OXYS. Полученные результаты подтверждают перспективность использования SkQ1 для профилактики старения мозга.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** старение, гиппокамп, митохондрии, делеция 4834 пар оснований митохондриальной ДНК, адресованный в митохондрии антиоксидант SkQ1.

Старение человека и животных связано с постепенным снижением когнитивных функций (прежде всего способности к обучению и памяти), ростом риска развития нейродегенеративных заболеваний [1]. Важную роль в их развитии играют мутации митохондриальной ДНК

(мтДНК) и связанная с ними дисфункция митохондрий [2]. С возрастом доля мтДНК с протяженными делециями растёт. Их накопление наиболее существенно в тканях с высоким уровнем энергетического метаболизма – мышцах и мозге, где уровень делеций существенно зависит от региона [3]. Накопление делеций мтДНК рассматривается как одна из причин снижения эффективности окислительного фосфорилирования при старении и развитии связанных с ним нейродегенеративных заболеваний, в т.ч. болезнью Паркинсона [4] и Альцгеймера [5]. В свою очередь снижение эффективности работы дыха-

Принятые сокращения: SkQ1 – антиоксидант 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний, мтДНК – митохондриальная ДНК, п.н. – пары нуклеотидов, ΔмтДНК – делеция мтДНК, ΔмтДНК<sub>4834</sub> – делеция 4834 п.н. мтДНК, АФК – активные формы кислорода.

\* Адресат для корреспонденции.

тельной цепи приводит к усиленному накоплению окислительных повреждений мтДНК и делеций в результате окислительного стресса – нарушения баланса в системах генерации и детоксикации активных форм кислорода (АФК). Закономерно, что для профилактики возрастных изменений активно используются антиоксиданты. Однако убедительных доказательств того, что они способны обеспечить защиту от нейродегенеративных изменений, сопровождающих ассоциированные со старением когнитивные расстройства, и тем более профилактики нейродегенеративных заболеваний, на сегодня нет. Недавно было показано, что уникальным нейропротекторным потенциалом обладает адресованный в митохондрии антиоксидант SkQ1 [6–8]. В наномолярных концентрациях он не только предотвратил, но и снизил выраженность ряда признаков ускоренного старения у крыс OXYS – созданной в Институте цитологии и генетики СО РАН модели преждевременного старения и ассоциированных с ним заболеваний [6, 9–16]. Развитие нейродегенеративных изменений у крыс OXYS связано с изменениями метаболического пути болезни Альцгеймера: усиленным накоплением в коре головного мозга и гиппокампе белка-предшественника амилоида бета и растворимого амилоида  $\beta$  (1–42), образованием амилоидных бляшек и гиперфосфорилированием тау-белка – ключевых маркеров заболевания [7, 17]. Гиперфосфорилирование тау-белка у крыс OXYS регистрируется уже в возрасте 3 мес. К этому возрасту у них формируется пассивный тип поведения, повышается тревожность, нарушаются способность к обучению и память, формирование длительной посттетанической потенциации, методами МРТ выявляются нейродегенеративные изменения в мозге [7, 17]. Примечательно, что манифестация всех этих признаков опережает по времени повышенное накопление в гомогенатах мозга маркеров окислительного стресса – окисленных белков и липидов [18]. Недавно мы показали, что профилактический прием SkQ1 существенно замедляет ускоренное старение мозга крыс OXYS и снижает содержание в нем ключевых маркеров болезни Альцгеймера [7], однако механизм его нейропротекторного действия остается неясным.

Как полагают Майсснер с соавт., идеальным критерием оценки темпов старения человека и, соответственно, эффективности воздействия на них может служить накопление делеции мтДНК 4977 п.н. [19], прежде всего – в клетках постмитотических тканей, характеризующихся высоким энергетическим потреблением – мышечной и нервной [20, 21]. При моделировании бо-

лезни Альцгеймера введением амилоида бета в гиппокампе крыс было зарегистрировано увеличение количества  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> [22] – делеции, которая соответствует делеции 4977 п.н. мтДНК у человека и возникает в результате рекомбинации между двумя 16-нуклеотидными повторами (позиции 8,103–8,118 и 12,937–12,952), приводя к элиминации ряда генов: *mt-nd5*, *mt-Tl*, *mt-Ts*, *mt-Th*, *mt-nd4*, *mt-nd4l*, *mt-Tr*, *mt-nd3*, *mt-Tg*, *mt-co3*, *mt-Atp6* [20, 23]. Целью настоящей работы явилось исследование связи развития нейродегенеративных изменений в мозге крыс OXYS с изменением количества мтДНК и  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub>, а также влияния SkQ1 на эти показатели. Для этого определяли относительное количество  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> и мтДНК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар (контроль) разного возраста, а также исследовали влияние на эти показатели приема SkQ1 в период, критический для манифестации признаков преждевременного старения крыс OXYS – в возрасте с 1,5 до 3 мес. В качестве препарата сравнения использовали витамин Е. Влияние антиоксидантов на накопление  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> сопоставляли с их способностью предупреждать формирование у крыс OXYS поведенческого признака ускоренного старения их мозга – пассивного типа поведения в тесте «открытое поле».

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные и воздействие на них.** Работа выполнена на самцах крыс OXYS и Вистар на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием лабораторных животных». Крыс содержали группами по пять особей в клетках размером 57 × 36 × 20 см при температуре 22 ± 2° в условиях фиксированного режима освещения (12 ч свет/12 ч темнота) при свободном доступе к воде и пище – стандартному гранулированному корму для лабораторных животных («Чара», ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия).

Для исследования изменения содержания  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> и мтДНК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар с возрастом использовали животных в возрасте 1, 2, 6, 10, 20 дней и 3, 6 и 24 мес. (по 5 животных в группе). При оценке влияния на эти показатели антиоксидантов животные опытных групп получали с 1,5 до 3 мес. с кормом SkQ1 (синтезирован в НИИ митоинженерии МГУ) или витамин Е (токоферола ацетат производства «Уралбиофарм», Россия) в дозе 250 нмоль и 670 ммоль на кг массы тела соответственно.

Крысы контрольной группы получали только корм. Количество животных в группах – 15.

**Исследование влияния препаратов на поведение животных** в тесте «открытое поле» проводили в возрасте 3 мес., используя квадратную камеру (100 × 100 см) с пластмассовыми стенками высотой 40 см. Освещение обеспечивалось бесшумной лампой мощностью 100 Вт, расположенной на высоте 100 см над центром поля. Животное помещали в угол камеры, после чего регистрировали его двигательную активность в течение 5 мин. Подсчитывали количество пересеченных квадратов, вертикальных стоек.

**Выделение тотальной ДНК из гиппокампа.** Тотальную (митохондриальную и ядерную) ДНК из гиппокампа выделяли, используя набор WizardR Plus SV Genomic DNA Purification System («Promega», США) в соответствии с протоколом производителя.

**ПЦР в режиме реального времени.** Относительное количество мтДНК и относительное количество  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan. Для определения мтДНК непосредственно в тотальной ДНК был использован метод, описанный Никлас с соавт. [24]. Количество мтДНК (при помощи амплификации района D-петли) измеряли относительно количества ядерной ДНК, определяемого по уровню содержания ДНК гена 18S рРНК. Количество  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> (амплификация участка, образующегося в результате смыкания последовательностей, фланкирующих делетируемый участок мтДНК) измеряли относительно количества мтДНК. Последовательности праймеров и зондов, подобранные с использованием онлайн-олигоанализатора Integrated DNA Technologies (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/>), приведены

в таблице. Олигонуклеотиды синтезированы ЗАО «Биосан» (Россия).

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1× буфер для Taq-полимеразы, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 нМ dNTP (25 мМ каждого), 400 нМ зонда на D-петлю и соответствующих праймеров (прямого и обратного), 0,2 U Taq Pol и ~1 нг тотальной ДНК. Аналогичная смесь для реакции на ген 18S рРНК содержала 400 нМ, а смесь для реакции на  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> – 500 нМ соответствующих праймеров и зонда. Реакцию проводили в следующих условиях: предварительный прогрев 95° – 30 с, затем 40 основных циклов: денатурация 94° – 10 с, отжиг 64° – 15 с, элонгация 72° – 20 с. В каждом эксперименте на один планшет помещали образцы исследуемых ДНК с праймерами и зондами на D-петлю (по 4 повтора на каждый образец ДНК) и ген 18S рРНК (также по 4 повтора); аналогично – на  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> и D-петлю; на каждый планшет для построения калибровочной кривой помещали также стандартную матрицу ДНК в разведениях: 1 : 1, 1 : 4, 1 : 16 и 1 : 64 с теми же праймерами и зондами (по 2 повтора на разведение). Для каждого образца ДНК ПЦР проводили не менее двух раз.

В качестве стандартной матрицы ДНК для построения калибровочных кривых применяли образец ДНК, один и тот же для каждой серии реакций. Относительное количество ДНК определяли, используя калибровочные кривые, полученные из разведений стандартной ДНК. По получаемым стандартным калибровочным кривым определяли исходный уровень исследуемых ДНК (относительно «стандартной» ДНК), и эту величину для мтДНК относили к количеству ядерной ДНК, а уровень делетированной мтДНК – к уровню мтДНК.

Праймеры и зонды, использованные в ПЦР

Праймер/зонд	Последовательность
	Митохондриальная D-петля
Прямой праймер	5'-GGTTCCTACTTCAGGGCCATCA-3'
Обратный праймер	5'-GATTAGACCCGTTACCATCGAGAT-3'
Зонд	5'-FAM-TTGTTTCATCGTCCATACGTTCCSCTTA-BQH1-3'
	Митохондриальная делеция
Прямой праймер	5'-AAGGACGAACCTGAGCCСТААТА-3'
Обратный праймер	5'-CGAAGTAGATGATCCGTATGCTGTA-3'
Зонд	5'-R6G-TCACTTTAATCGCCACATCCATAACTGCTGT-FQ-3'
	18S рРНК
Прямой праймер	5'-CTACCACATCCAAGGAAGGCA-3'
Обратный праймер	5'-GCCTCGAAAGAGTCCTGTATTGT-3'
Зонд	5'-HEX-CAAAATTACCCACTCCCGACCCG-BHQ1-3'

**Статистическую обработку** результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA (версия 6.0). Использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) с post-hoc сравнением групповых средних (Newman-Keul test). В качестве независимых факторов рассматривали: при анализе изменений количества мтДНК и  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> с возрастом – возраст и генотип животных; при оценке эффектов антиоксидантов – генотип и препарат. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Данные представлены как  $M \pm S.E.M.$

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

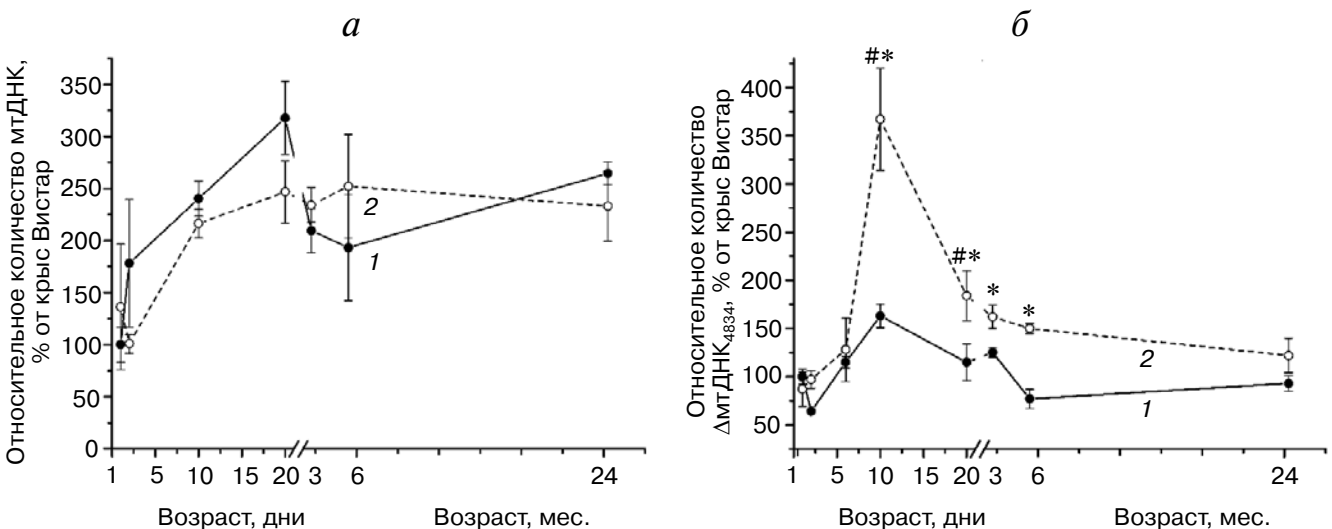
**Количество мтДНК и  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе крыс разного возраста.** Содержание мтДНК в гиппокампе (рис. 1, а) не зависело от генотипа животных ( $F_{1,36} = 0,23, p = 0,63$ ) и изменялось с возрастом ( $F_{7,36} = 9,41, p < 0,00001$ ), при этом наиболее существенно – в первые дни жизни. На 20-й день после рождения этот показатель был выше, чем в первый день, у крыс Вистар в 3 раза ( $p < 0,004$ ), у крыс OXYS – в 2 раза ( $p < 0,025$ ). К возрасту 3 мес. показатель несколько снижался и оставался на том же уровне в возрасте 6 и 24 мес. Значимых межлинейных различий в содержании мтДНК ни в одной из возрастных групп выявлено не было.

Количество  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> (рис. 1, б) зависело от возраста ( $F_{7,36} = 6,84, p < 0,00003$ ) и генотипа животных ( $F_{1,36} = 12,75, p < 0,001$ ) и было существенно

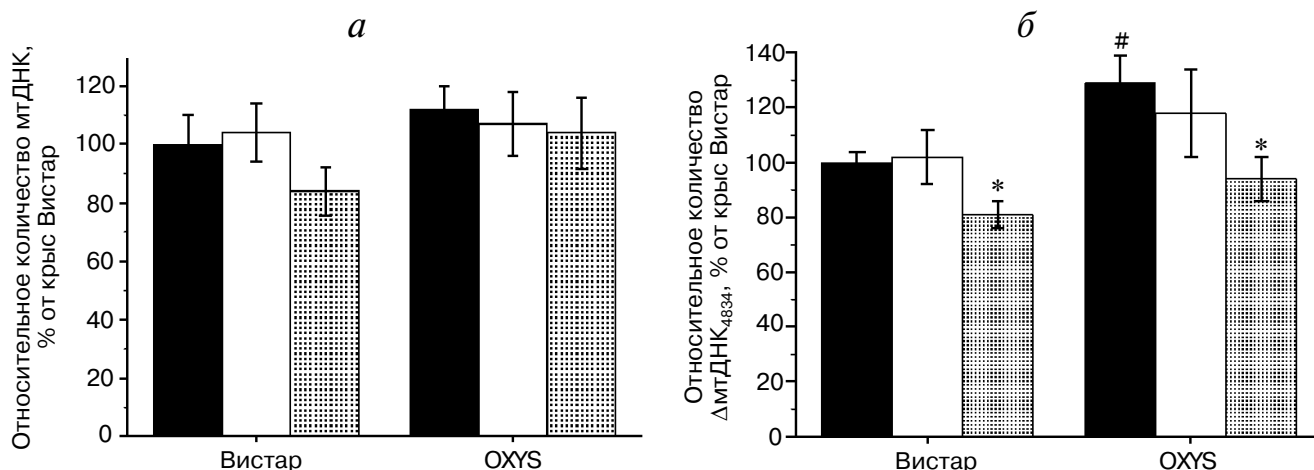
выше у крыс OXYS. Максимальное количество делетированной мтДНК было выявлено у крыс обеих линий в возрасте 10 дней, при этом у крыс OXYS показатель был в 3,5 раза выше, чем в первый день после рождения ( $p < 0,0001$ ), и вдвое – по сравнению с одновозрастными крысами Вистар ( $p < 0,0002$ ). К возрасту 20 дней количество  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе крыс OXYS снижалось ( $p < 0,0001$ ) и в дальнейшем значимо не изменялось, оставаясь выше, чем у крыс Вистар ( $p < 0,05$  для всех), вплоть до возраста 24 мес., когда межлинейные различия нивелировались (рис. 1, б).

**Влияние SkQ1 и витамина Е на количество  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> и мтДНК в гиппокампе крыс Вистар и OXYS.** Как показал дисперсионный анализ, содержание мтДНК (рис. 2, а) не зависело от генотипа животных ( $F_{1,30} = 1,58, p = 0,219$ ), и на него не повлиял прием антиоксидантов ( $F_{2,30} = 1,15, p = 0,341$ ). Относительное количество  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> (рис. 2, б) было больше у крыс OXYS ( $F_{1,30} = 5,77, p < 0,023$ ), и на него влиял фактор «препарат» ( $F_{2,30} = 4,43, p < 0,021$ ). Однако сравнение групповых средних показало, что только эффект SkQ1 был достоверным: на фоне его приема уровень  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> у крыс Вистар и OXYS был ниже, чем у контрольных животных соответствующей линии ( $p < 0,05$ ).

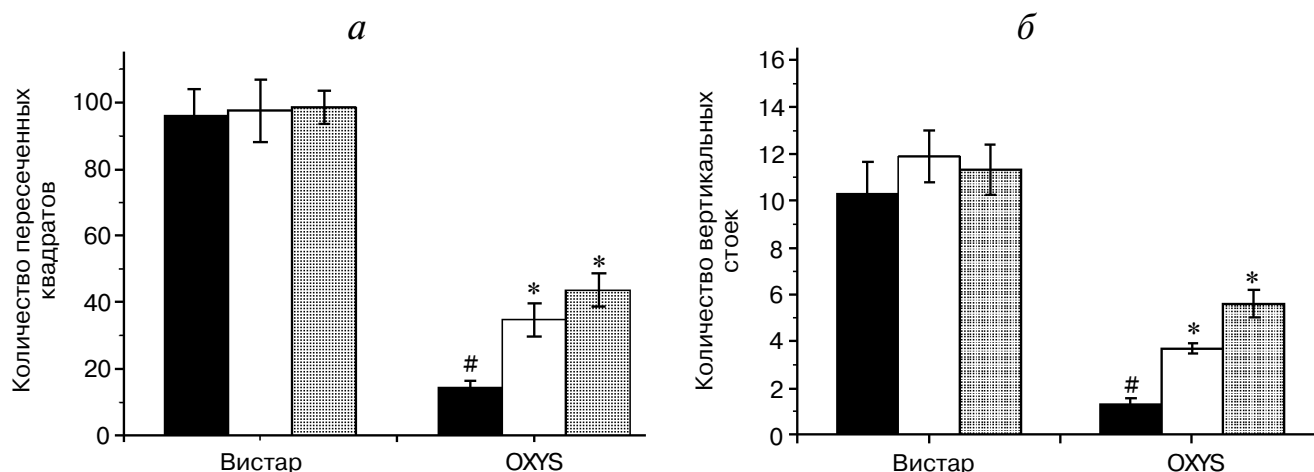
**Влияние SkQ1 и витамина Е на поведение крыс OXYS и Вистар в тесте «открытое поле».** Количество пересеченных квадратов (рис. 3, а) – показатель двигательной активности животных – в возрасте 3 мес. у крыс OXYS было существенно



**Рис. 1.** Изменение с возрастом относительного количества мтДНК (а) и  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> (б) в гиппокампе крыс Вистар (1) и OXYS (2). За 100% принимали соответствующий показатель крыс Вистар в возрасте 1 день. \* – Достоверные межлинейные различия, # – достоверные отличия от крыс той же линии предыдущего возраста



**Рис. 2.** Относительное количество мтДНК (а) и ΔмтДНК<sub>4834</sub> (б) в гиппокампе контрольных (черные столбцы), получавших витамин Е (белые столбцы) и SkQ1 (серые столбцы) крыс Вистар и OXYS. Витамин Е и SkQ1 животные получали ежедневно с 1,5 до 3 мес. в дозе 670 ммоль/кг и 250 нмоль/кг соответственно. \* – Достоверный эффект препарата, # – достоверные межлинейные различия



**Рис. 3.** Моторная (а) и исследовательская (б) активности контрольных (черные столбцы), получавших витамин Е (белые столбцы) и SkQ1 (серые столбцы) крыс Вистар и OXYS. Витамин Е и SkQ1 животные получали ежедневно с 1,5 до 3 мес. в дозе 670 ммоль/кг и 250 нмоль/кг соответственно. \* – Достоверный эффект препарата, # – достоверные межлинейные различия

меньше, чем у крыс Вистар ( $F_{1,63} = 187,6, p = 0,0001$ ). Препараты повлияли на двигательную активность животных ( $F_{2,63} = 6,6, p = 0,003$ ), однако сравнение групповых средних показало, что этот параметр значимо изменился только у крыс OXYS: количество пересеченных квадратов у принимавших SkQ1 и витамин Е крыс было в 3 и 2,4 раза больше, чем у крыс контрольной группы ( $p < 0,001$  для всех).

Количество вертикальных стоек (рис. 3, б) отражает как двигательную, так и исследова-

тельную активность животных. Этот показатель у крыс OXYS был меньше, чем у Вистар ( $F_{1,62} = 71,2, p = 0,0001$ ), и фактор «препарат» влиял на него ( $F_{2,63} = 4,9, p = 0,01$ ). Однако *post-hoc* сравнения групповых средних показали, что антиоксиданты значимо повлияли только на поведение крыс OXYS: на фоне приема SkQ1 и витамина Е количество вертикальных стоек у получавших их крыс OXYS было, соответственно, в 4,2 и 2,8 раз больше, чем у контрольных ( $p < 0,001$  для всех).

Таким образом, анализ результатов поведения крыс OXYS и Вистар в тесте «открытое поле» выявил способность SkQ1 и витамина E предупредить снижение с возрастом двигательной и исследовательской активностей у крыс OXYS и не влиять на эти параметры у молодых крыс Вистар.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Делеции мтДНК рассматриваются как маркер окислительных повреждений, количество которых с возрастом растет [2]. Однако согласно последним исследованиям [25, 26] только у долгоживущих видов (в т.ч. у человека), но не у мышей и крыс, накопление мутаций в мтДНК может влиять на продолжительность жизни. Сведения о динамике их накопления в мозге в постнатальный период отсутствуют. Известно только, что делеции мтДНК были выявлены во всех исследованных постмортальных образцах мозга новорожденных и могли быть, по мнению авторов, следствием перинатальной гипоксии и интенсивной терапии [27]. Мы оценили уровень делетированной мтДНК в гиппокампе в постнатальный период, период активной манифестации (3 мес.) и прогрессии (6 мес.) признаков ускоренного старения мозга у крыс OXYS, а также в возрасте 24 мес., когда все признаки болезни Альцгеймера у них ярко выражены [7, 17]. Примечательно, что уровень  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> был максимальным в возрасте 10 дней как у преждевременно стареющих крыс OXYS, так и у крыс Вистар. В этом возрасте он становился существенно выше, чем в первый день жизни, а к 20-му дню снижался на фоне повышения копийности мтДНК. Существенное увеличение  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> пришлось на период, в который происходит адаптация к условиям внеутробной жизни. У человека он длится 28 дней после рождения, у крыс — 14 дней. В этот период в головном мозге млекопитающих происходит ряд процессов (пролиферация, дифференцировка, миграция и др.), определяющих окончательное созревание нервной системы. После рождения во многих регионах мозга, включая гиппокамп, продолжают развиваться и гистогенез, связанный с формированием межнейронных контактов и устранением «переходных» клеточных популяций путем апоптоза [28]. Высокая активность апоптоза, а по последним данным и нейрогенеза, предполагает усиление генерации АФК [29]. Именно в этом возрасте уровень  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе крыс OXYS был наиболее существенно (в 3,5 раза) выше, чем у крыс Вистар. К возрасту 3 мес. у крыс OXYS формируется характерный для них

пассивный тип поведения, нарушается способность к обучению и память, выявляются первые гистоморфологические признаки нейродегенерации, которые с возрастом прогрессируют. Настоящее исследование показало, что эти события происходят на фоне повышенного уровня  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе. Однако в возрасте 24 мес., когда у крыс OXYS ярко выражены все признаки болезни Альцгеймера [17], отличий от крыс Вистар по этому показателю выявлено не было. Такой результат, как и тот факт, что в этом возрасте и у крыс Вистар, и у крыс OXYS уровень  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе не отличался от такового у 3- и 6-месячных животных, на первый взгляд представляется неожиданным. Тем не менее он согласуется с данными о том, что накопление  $\Delta$ мтДНК при болезни Альцгеймера повышено, но не коррелирует с прогрессией заболевания [30].

Результаты настоящего исследования косвенно указывают на то, что развитие мозга крыс OXYS в ранний постнатальный период протекает на фоне усиленного окислительного стресса. Возможно, он связан с гипоксией, признаки адаптации к которой мы ранее выявили в мозге 2–3-недельных крыс OXYS при исследовании энергетического метаболизма [31]. Как отмечалось выше, при оценке маркеров окислительного стресса — уровня окислительных поврежденных белков и липидов в гомогенатах мозга молодых крыс OXYS — мы не выявили отличий от контрольных крыс Вистар [17, 18]. В то же время дифференциальная оценка активности свободнорадикальных процессов в различных структурах мозга по уровню продуктов перекисного окисления липидов показала, что именно в гиппокампе 2- и 18-месячных крыс OXYS она выше, чем у крыс Вистар [32], что согласуется с результатами настоящего исследования.

Нарастающие с возрастом дисфункции митохондрий впервые были выявлены в печени крыс OXYS и рассматриваются в качестве одной из возможных причин их преждевременного старения [33, 34]. В дальнейшем структурно-функциональные нарушения митохондрий были обнаружены в мышцах [13] и гиппокампе [17]: деструкция крист, лизис матрикса, снижение объемной и поверхностной плотности митохондрий выявляются уже у 3-месячных крыс OXYS и с возрастом нарастают. Прием SkQ1 не только замедлял развитие деструктивных изменений митохондрий в мышцах [13] и гиппокампе (неопубликованные данные), но и существенно улучшил их состояние у крыс Вистар и OXYS с уже выраженными признаками преждевременного старения. При этом длительный прием SkQ1 предупредил накопление с возраст-

том амилоида-бета, повышение уровня белка-предшественника амилоида, тау-белка и его фосфорилированной формы у крыс OXYS до уровня одновозрастных крыс Вистар [7].

В настоящем исследовании мы показали, что профилактический прием SkQ1 в период активной манифестации признаков ускоренного старения крыс OXYS замедлил развитие его поведенческих проявлений — повысил двигательную и исследовательскую активности, а также снизил уровень  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе. Также SkQ1 снизил уровень  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> и в гиппокампе крыс Вистар, но на их поведение не повлиял. Снижение накопления  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> на фоне приема SkQ1 могло быть обусловлено как его прямым антиоксидантным действием [35], так и способностью подавлять генерацию АФК в митохондриях, потенцируя вызываемое жирными кислотами мягкое разобщение окисления и фосфорилирования [36]. Следует отметить, что препарат сравнения витамин Е в меньшей степени, но также достоверно повысил локомоторную и исследовательскую активности крыс OXYS, но не оказал значимого влияния на уровень  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub>. Также не выявлено достоверного влияния антиоксидантов на количество мтДНК в гиппокампе животных.

Таким образом, наиболее существенное повышение уровня  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе крыс OXYS, по сравнению с крысами Вистар, наблюдается в период завершения формирования моз-

га в постнатальный период и остается повышенным как на стадиях, предшествующих манифестации фенотипических проявлений ускоренного старения мозга и развития признаков болезни Альцгеймера, так и в период их прогрессии. Мы показали, что адресованный в митохондрии антиоксидант SkQ1 замедляет ускоренное старение мозга крыс OXYS, снижая при этом уровень  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> в гиппокампе. Однако связать механизм его действия только с этим эффектом не представляется возможным, поскольку не повлиявший на уровень  $\Delta$ мтДНК<sub>4834</sub> витамин Е также несколько снизил выраженность поведенческих проявлений ускоренного старения мозга крыс OXYS. В целом полученные результаты укладываются в представления о том, что окислительный стресс и дисфункция митохондрий вносят существенный вклад в патогенез болезни Альцгеймера и подтверждают перспективность использования SkQ1 для профилактики старения мозга.

Авторы выражают глубокую благодарность В.П. Скулачеву за критическое обсуждение и многолетнюю поддержку своих исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 12-04-01495 и 15-04-06066) и Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morley, J.E., Armbrecht, H.J., Farr, S.A., and Kumar, V.B. (2012) The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 650–656.
- Li, H., Liu, D., Lu, J., and Bai, Y. (2012) Physiology and pathophysiology of mitochondrial DNA, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **942**, 39–51.
- Kazachkova, N., Ramos, A., Santos, C., and Lima, M. (2013) Mitochondrial DNA damage patterns and aging: revising the evidences for humans and mice, *Aging Dis.*, **4**, 337–350.
- Zhang, J., Montine, T.J., Smith, M.A., Siedlak, S.L., Gu, G., Robertson, D., and Perry, G. (2002) The mitochondrial common deletion in Parkinson's disease and related movement disorders, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **8**, 165–170.
- Krishnan, K., Ratnaik, T., De Gruyter, H., Jaros, E., and Turnbull, D. (2012) Mitochondrial DNA deletions cause the biochemical defect observed in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **33**, 2210–2214.
- 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.
- 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.
- Kapay, N.A., Popova, O.V., Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Kondratenko, R.V., Zorov, D.B., Skrebitsky, V.G., and Skulachev, V.P. (2013) Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQ1 prevents amyloid- $\beta$ -induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices, *J. Alzheimers Dis.*, **36**, 377–383.
- Колосова Н.Г., Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Фурсова А.Ж., Кожевникова О.С. (2014) Крысы OXYS — генетическая модель преждевременного старения и связанных с ним заболеваний, *Успехи геронтологии*, **27**, 336–340.
- Amstislavskaya, T.G., Maslova, L.N., Gladkikh, D.V., Belousova, I.I., Stefanova, N.A., and Kolosova, N.G. (2010) Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on sexually motivated behavior in male rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **96**, 211–216.
- Neroev, V.V., Archipova, M.M., Bakeeva, L.E., Fursova, A.Zh., Grigorian, E.N., Grishanova, A.Yu., Iomdina, E.N., Ivashchenko, Zh.N., Katargina, L.A., Khoroshilova-Maslova, I.P., Kilina, O.V., Kolosova, N.G., Kopenkin, E.P., Korshunov, S.S., Kovaleva, N.A., Novikova, Yu.P., Philippov, P.P., Pilipenko, D.I., Robustova, O.V., Saprunova, V.B., Senin, I.I., Skulachev, M.V., Sotnikova, L.F.,

- Stefanova, N.A., Tikhomirova, N.K., Tsapenko, I.V., Shchipanova, A.I., Zinovkin, R.A., and Skulachev, V.P. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 4. Age-related eye disease. SkQ1 returns vision to blind animals, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1317–1328.
12. Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., 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.
  13. Vays, V.B., Eldarov, C.M., Vangely, I.M., Kolosova, N.G., Bakeeva, L.E., and Skulachev, V.P. (2014) Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure, *Aging (Albany, N.Y.)*, **6**, 140–148.
  14. Saprunova, V.B., Lelekova, M.A., Kolosova, N.G., and Bakeeva, L.E. (2012) SkQ1 slows development of age-dependent destructive processes in retina and vascular layer of eyes of Wistar and OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 648–658.
  15. Markovets, A.M., Fursova, A.Z., and Kolosova, N.G. (2011) Therapeutic action of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on retinopathy in OXYS rats linked with improvement of VEGF and PEDF gene expression, *PLoS One*, **6**, e21682.
  16. Kolosova, N.G., Stefanova, N.A., Muraleva, N.A., and Skulachev, V.P. (2012) The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 but not N-acetylcysteine reverses aging-related biomarkers in rats, *Aging (Albany, N.Y.)*, **4**, 686–694.
  17. Stefanova, N.A., Kozhevnikova, O.S., Vitovtov, A.O., Maksimova, K.Y., Logvinov, S.V., Rudnitskaya, E.A., Korbolina, E.E., Muraleva, N.A., and Kolosova, N.G. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease, *Cell Cycle*, **13**, 898–909.
  18. Kolosova, N.G., Shcheglova, T.V., Sergeeva, S.V., and Loskutova, L.V. (2006) Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats, *Neurobiol. Aging*, **27**, 1289–1297.
  19. Meissner, C., Bruse, P., Mohamed, S.A., Schulz, A., Warnk, H., Storm, T., and Oehmichen, M. (2008) The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: a useful biomarker or more, *Exp. Gerontol.*, **43**, 645–652.
  20. Gadaleta, M.N., Rainaldi, G., Lezza, A.M., Milella, F., Fracasso, F., and Cantatore, P. (1992) Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats, *Mutat. Res.*, **275**, 181–193.
  21. DiMauro, S., Tanji, K., Bonilla, E., Pallotti, F., and Schon, E. (2002) Mitochondrial abnormalities in muscle and other aging cells: classification, causes, and effects, *Muscle Nerve*, **26**, 597–607.
  22. Chen, T.F., Chiu, M.J., Huang, C.T., Tang, M.C., Wang, S.J., Wang, C.C., and Huang, R.F. (2011) Changes in dietary folate intake differentially affect oxidised lipid and mitochondrial DNA damage in various brain regions of rats in the absence/presence of intracerebroventricularly injected amyloid  $\beta$ -peptide challenge, *Br. J. Nutr.*, **105**, 1294–1302.
  23. Edris, W., Burgett, B., Colin, O., and Filburn, C. (1994) Detection and quantitation by competitive PCR of an age-associated increase in a 4.8-kb deletion in rat mitochondrial DNA, *Mutat. Res.*, **316**, 69–78.
  24. Nicklas, J., Brooks, E., Hunter, T., Single, R., and Branda, R. (2004) Development of a quantitative PCR (TaqMan) assay for relative mitochondrial DNA copy number and the common mitochondrial DNA deletion in the rat, *Environ. Mol. Mutagen.*, **44**, 313–320.
  25. Kowald, A., and Kirkwood, T.B. (2013) Mitochondrial mutations and aging: random drift is insufficient to explain the accumulation of mitochondrial deletion mutants in short-lived animals, *Aging Cell*, **12**, 728–731.
  26. Kowald, A., Dawson, M., and Kirkwood, T.B. (2014) Mitochondrial mutations and ageing: can mitochondrial deletion mutants accumulate via a size based replication advantage, *J. Theor. Biol.*, **340**, 111–118.
  27. Nadasi, E., Meleg, B., Seress, L., and Kosztolanyi, G. (2004) Mitochondrial DNA deletions in newborn brain samples, *Orv. Hetil.*, **145**, 1321–1325.
  28. Kim, W.R., and Sun, W. (2011) Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system, *Dev. Growth Differ.*, **53**, 225–235.
  29. Walton, N.M., Shin, R., Tajinda, K., Heusner, C.L., Kogan, J.H., Miyake, S., Chen, Q., Tamura, K., and Matsumoto, M. (2012) Adult neurogenesis transiently generates oxidative stress, *PLoS One*, **7**, e35264.
  30. Gerschutz, A., Heinsen, H., Grunblatt, E., Wagner, A.K., Bartl, J., Meissner, C., Fallgatter, A.J., Al-Sarraj, S., Troakes, C., Ferrer, I., Arzberger, T., Deckert, J., Riederer, P., Fischer, M., Tatschner, T., and Monoranu, C.M. (2013) Neuron-specific mitochondrial DANN deletion levels in sporadic Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.*, **10**, 1041–1046.
  31. Sergeeva, S., Bagryanskaya, E., Korbolina, E., and Kolosova, N. (2006) Development of behavioural dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats is associated with early postnatal alterations in brain phosphate metabolism, *Exp. Gerontol.*, **41**, 141–150.
  32. Kolosova, N.G., Shcheglova, T.V., Amstislavskaya, T.G., and Loskutova, L.V. (2003) Comparative analysis of LPO products in brain structures of Wistar and OXYS rats of different age, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **135**, 593–596.
  33. Шабалина И.Г., Колосова Н.Г., Гришанова А.Ю., Соловьева Н.А., Соловьев В.Н., Салганик Р.И. (1995) Активность окислительного фосфорилирования,  $F_0F_1$ -АТФазы и содержание цитохромов митохондрий печени крыс с врожденным повышением способности радикалообразования, *Биохимия*, **60**, 2045–2052.
  34. Колосова Н.Г., Айдагулова С.В., Непомнящих Г.И., Шабалина И.Г., Шалбуева Н.И. (2001) Динамика структурно-функциональных изменений митохондрий гепатоцитов преждевременно стареющих крыс линии OXYS, *Бюлл. экп. биол.*, **132**, 235–240.
  35. Skulachev, V.P., Antonenko, Y.N., Cherepanov, D.A., Chernyak, B.V., Izyumov, D.S., Khailova, L.S., Klishin, S.S., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Pletjushkina, O.Y., Roginsky, V.A., Rokitskaya, T.I., Severin, F.F., Severina, I.I., Simonyan, R.A., Skulachev, M.V., Sumbatyan, N.V., Sukhanova, E.I., Tashlitsky, V.N., Trendeleva, T.A., Vyssokikh, M.Y., and Zvyagilskaya, R.A. (2010) Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs), *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 878–889.
  36. Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Jankauskas, S.S., Rokitskaya, T.I., Chupyrkina, A.A., Pevzner, I.B., Zorova, L.D., Isaev, N.K., Antonenko, Y.N., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (2012) Mild uncoupling of respiration and phosphorylation as a mechanism providing nephro- and neuroprotective effects of penetrating cations of the SkQ family, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1029–1037.



**INFLUENCE OF SkQ1 ANTIOXIDANT  
ON ACCUMULATION OF MITOCHONDRIAL  
DNA DELETIONS IN THE HIPPOCAMPUS  
OF SENESCENCE-ACCELERATED  
OXYS RATS**

**P. S. Loschenova<sup>1</sup>, O. I. Sinitsyna<sup>1,2</sup>, L. A. Fedoseeva<sup>1</sup>,  
N. A. Stefanova<sup>1</sup>, N. G. Kolosova<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the Russian Academy  
of Sciences, pr. Lavrent'eva 10, Novosibirsk 630090, Russia;  
E-mail: kolosova@bionet.nsc.ru*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk 630090, Russia*

<sup>3</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, Institute of Mitoengineering,  
Moscow 119991, Russia*

Received December 16, 2014  
Revision received January 9, 2015

A reduction in the efficiency of oxidative phosphorylation during aging and during development of aging-related neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, is thought to be linked to the accumulation of long deletions in mitochondrial DNA (mtDNA). This mutation is considered a marker of oxidative damage. Recently, we showed that the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 (10-[6'-plastoquinonyl] decyltriphenylphosphonium) can slow the development of signs of Alzheimer's disease in senescence-accelerated OXYS rats. The aim of the present work was to explore the relationship of the neurodegenerative changes in the brain of OXYS rats with changes in the amount of mtDNA and an extended deletion in mtDNA (4834 bp;  $\Delta$ mtDNA<sub>4834</sub>) as well as the influence of SkQ1. We assessed the relative amount of mtDNA and  $\Delta$ mtDNA<sub>4834</sub> in the hippocampus of OXYS and Wistar (control) rats at ages 1, 2, 6, 10, and 20 days and 3, 6, and 24 months. During the period crucial for manifestation of the signs of premature aging of OXYS rats – from 1.5 to 3 months of age – we evaluated the effects of administration of SkQ1 (250 nmol/kg) and of vitamin E (670 mmol/kg, comparison treatment) on the amount of mtDNA and  $\Delta$ mtDNA<sub>4834</sub> and on formation of the behavioral feature of accelerated senescence in OXYS rats: passive type of behavior in the open field test. In OXYS rats, the level of  $\Delta$ mtDNA<sub>4834</sub> in the hippocampus is elevated compared to the Wistar strain, especially at the stage of completion of brain development in the postnatal period. This level stays elevated not only at the stages preceding the manifestation of the signs of accelerated senescence of the brain and the development of pathological changes linked to Alzheimer's disease, but also during their progression. Nonetheless, at age 24 months there were no detectable differences between the two strains. The SkQ1 treatment reduced the level of  $\Delta$ mtDNA<sub>4834</sub> in the hippocampus of Wistar and OXYS rats and slowed the formation of the passive behavior. These findings support the possible use of SkQ1 for prophylaxis of brain aging.

*Key words:* aging, hippocampus, mitochondria, 4834-bp mitochondrial DNA deletion, mitochondria-targeted antioxidant SkQ1