

УДК 612.82+615.2

МИТОХОНДРИАЛЬНО-АДРЕСОВАННОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ПЛАСТОХИНОНА, АНТИОКСИДАНТ SkQR1, ВВЕДЕННЫЙ *in vivo*, ПРЕДОТВРАЩАЕТ НАРУШЕНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ПОТЕНЦИАЦИИ, ВЫЗВАННОЕ β -АМИЛОИДОМ В СРЕЗАХ ГИППОКАМПА

© 2011 г. Н.А. Капай^{1*}, Н.К. Исаев^{1,2,3*}, Е.В. Стельмашук^{1,3},
О.В. Попова¹, Д.Б. Зоров^{2,3}, В.Г. Скребицкий¹, В.П. Скулачев^{2,3}

¹ *НЦ неврологии РАМН, Отдел исследования мозга, пер. Обуха 5, 105064 Москва; электронная почта: karayn@gmail.com*

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

³ *Институт митоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова 119991 Москва*

Поступила в редакцию 13.09.11
После доработки 17.10.11

Бета-амилоидный пептид 1–42 (Абета), добавленный в концентрации 200 нМ нарушает индукцию длительной посттетанической потенциации (ДП) популяционного спайка (ПС) пирамидных нейронов поля CA1 срезов гиппокампа крысы. Внутривентрикулярное введение животным митохондриально-направленного производного пластохинона антиоксиданта SkQR1 (1 мкмоль/кг веса за 24 ч до приготовления срезов) устраняет ингибирующий эффект Абета на ДП в гиппокампе. Полученные результаты указывают на то, что SkQR1 способен корректировать нарушения синаптической пластичности в гиппокампе, вызванные Абета, лежащие в основе нарушения памяти и других когнитивных функций при болезни Альцгеймера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, долгосрочная память, длительная потенция, нейроны, гиппокамп, митохондриально-адресованные антиоксиданты, SkQR1.

Болезнь Альцгеймера является распространенным нейродегенеративным заболеванием и характеризуется сильным нарушением памяти и других когнитивных функций с развитием на поздних стадиях обширных дегенеративных повреждений головного мозга [1]. Одним из основных факторов патогенеза болезни Альцгеймера является бета-амилоидный пептид (Абета). Известно, что этот пептид в субмикромольных концентрациях нарушает синаптическую передачу в глутаматных синапсах [2], в то время как в микромолярных концентрациях вызывает нейродегенерацию по апоптотическому типу [3]. Механизмы токсических эффектов Абета до конца не изучены. Однако существуют данные,

указывающие на митохондриальную токсичность Абета, происходящую, в частности, путем стимуляции генерации активных форм кислорода (АФК), которая происходит преимущественно в митохондриях [4–9]. Показано, что Абета через систему транспорта белков митохондрий попадает в митохондриальный матрикс [10], где взаимодействует с ключевыми митохондриальными ферментами, в частности, с компонентами, контролирующими неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий [11]. Избыточная продукция митохондриальных АФК под действием Абета с возможным лавинообразным ее усилением [12] могла бы быть ключевым моментом в инициации этим пептидом синаптической дисфункции и нарушения памяти при болезни Альцгеймера. Выказано предположение о возможности предотвращения этих нарушений митохондриально-направленными антиоксидантами [13], что подтверждено в настоящей работе на модели синаптических изменений, лежащих в основе

Принятые сокращения: Абета – бета-амилоидный пептид 1–42; АФК – активные формы кислорода; ДП – длительная посттетаническая потенция гиппокампа; ПС – популяционный спайк; ВЧС – высокочастотная стимуляция; SkQR1 – (10-(6'-пластохинонил)децилпроламин 19.

* Адресаты для корреспонденции.

формирования обучения и памяти (длительная потенциация синаптической передачи в гиппокампе).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на срезах гиппокампа взрослых крыс – самцов Вистар массой 80–110 г. Сразу после приготовления срезы помещали в камеру для регистрации и перфузировали модифицированным раствором Рингера следующего состава (мМ): NaCl – 124; KCl – 3; CaCl₂ – 2.5; MgSO₄ – 2.5; Na₂HPO₄ – 1.25; NaHCO₃ – 26; D-глюкоза – 10, непрерывно насыщаемого карбогеном (95%-ный O₂ + 5%-ный CO₂) при 29–30°. Регистрацию электрической активности 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 СА1 регистрировали фокальный 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 (поп-спайк, ПС), составляла примерно половину его максимальной величины. Потенциацию ПС вызывали высокочастотной стимуляцией (ВЧС, 100 Гц, 1с) входа через те же электроды и при той же силе стимула. На каждом срезе проводили только одну ВЧС. За 15 мин до ВЧС систему протока переключали на второй резервуар с раствором, содержащим Абета. Обратное переключение производили через 5 мин после ВЧС. Изменения реактивности пирамидных нейронов оценивали по изменениям амплитуды ПС относительно ее средней величины, определяемой по 15-минутному периоду фоновой регистрации (период до переключения протока).

Концентрированные водные растворы β-амилоида (1–42) («Sigma-Aldrich», USA) хранили в виде замороженных микродоз и довели до нужной концентрации перфузирующей средой непосредственно перед использованием. SkQR1 вводили крысам внутрибрюшинно за 24 ч до приготовления срезов в дозе 1 мкмоль/кг.

Полученные результаты представлены в виде средней величины и ошибки средней ($M \pm m$). Статистическую оценку данных проводили с использованием теста непараметрического критерия Манна–Уитни и *t* критерия Стьюдента.

Обращение с животными и экспериментальные процедуры с ними были выполнены в соответствии с директивами совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании жи-

вотных для экспериментальных исследований и одобрены Этической комиссией МГУ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В наших экспериментах стандартная ВЧС (100 Гц, 1 с) коллатералей Шаффера вызывала длительную посттетаническую потенциацию популяционных спайков в гиппокампе, так что через 30 мин после тетанизации амплитуда популяционных спайков, в среднем, повышалась до $145,9 \pm 7,8\%$ ($n = 6$) у контрольных крыс (рисунков, а). На срезах гиппокампа крыс, которым за 24 ч до приготовления срезов вводили 1 мкМ SkQR1, амплитуда ДП, в среднем, составляла $175,4 \pm 17,1\%$ ($n = 6$) (рисунков, б, в), причем этот параметр был выше, чем в контроле.

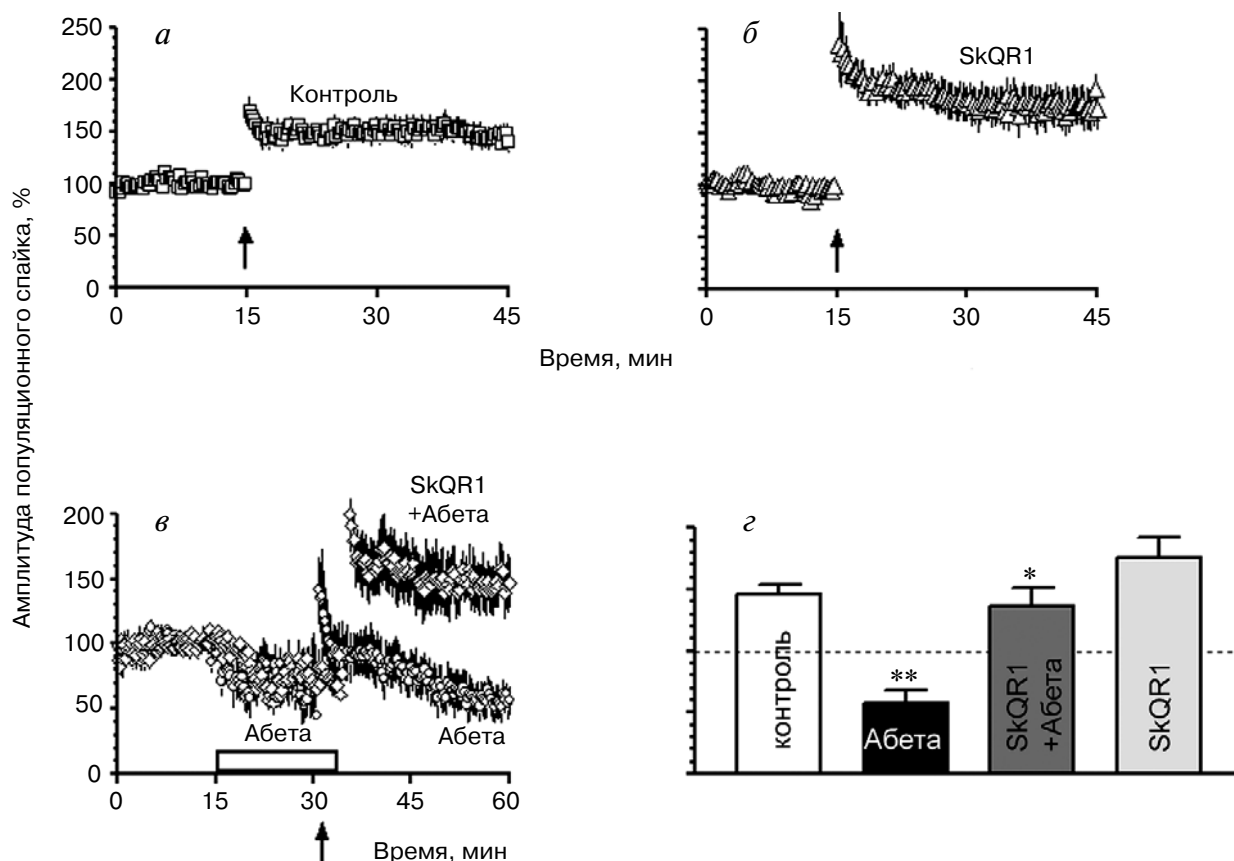
Перфузия срезов раствором, содержащим 200 нМ Абета, не вызывала достоверного изменения базального ПС, но нарушала способность пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа формировать ДП после ВЧС (рисунков, в). Среднее значение амплитуды ПС после 15-минутной перфузии срезов раствором с Абета (до ВЧС) составило $73,0 \pm 13,4\%$, а через 30 мин после ВЧС – $57,1 \pm 10,8\%$ ($n = 5$). Последнее значение достоверно отличается от контрольного ($P < 0,01$, рисунок, в).

При перфузии (с добавлением 200 нМ Абета) срезов гиппокампа крыс, предобработанных SkQR1, было обнаружено, что SkQR1 устраняет ингибирующее влияние Абета на индукцию ДП. В таком случае среднее значение амплитуды ПС после инкубации 15 мин с Абета составило $74,1 \pm 5,5\%$, а через 30 мин после ВЧС $135,7 \pm 16,2\%$ ($n = 6$). Последняя величина достоверно превышает соответствующее значение, полученное в растворе с Абета, на срезах, полученных из гиппокампа крыс, не обработанных SkQR1, при уровне значимости $P < 0,01$ (рисунков, в, г).

Таким образом, в нашей работе впервые продемонстрировано, что введение животным антиоксиданта SkQR1 устраняет ингибирующий эффект Абета на ДП в гиппокампе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что крайне малые (нМ) концентрации митохондриально-адресованных антиоксидантов производных пластохинона (SkQ1 и SkQR1) действуют как высокоэффективные антиоксиданты в водных растворах, липидных мицеллах, липосомах, изолированных митохондриях и клеточных культурах [14]. Эти проникающие катионы можно также ис-



SkQR1 устраняет ингибирующее влияние бета-амилоидного пептида 1–42 (Абета) на длительную потенциацию в гиппокампе. Стрелка указывает момент ВЧС, а толстая линия – время присутствия 200 нМ Абета в растворе. *a* – Временной ход изменений амплитуды суммарных ПС срезов гиппокампа, полученных от контрольных животных и перфузированных раствором без Абета ($n = 6$); *b* – временной ход изменений амплитуды суммарных ПС срезов гиппокампа, полученных от животных, предобработанных 1 мкМ/кг SkQR1 и перфузированных раствором без Абета ($n = 6$); *c* – временной ход изменений амплитуды суммарных ПС при аппликации 200 нМ Абета к срезам гиппокампа, контрольных животных, не получавших SkQR1 ($n = 5$) (обозначены кружками), и срезам от животных, предобработанных 1 мкМ/кг SkQR1 ($n = 6$) (обозначены ромбами); *d* – средние величины амплитуд популяционного спайка, зарегистрированного через 30 мин после ВЧС. * $P < 0,01$ по сравнению с Абета (1–42), ** $P < 0,01$ по сравнению с контролем

пользовать как средства терапии для лечения целого ряда возрастных заболеваний, которые опосредованы АФК, таких как сердечная аритмия, инфаркт миокарда и почки, а так же инсульт головного мозга [15–17]. Нами было продемонстрировано, что единичная внутрибрюшинная инъекция SkQR1 (0,5–2 мкмоль/кг веса тела) крысам уменьшает зону инфаркта, вызванную компрессионной ишемией или окклюзией средней мозговой артерии [15, 17]. В последнем случае уменьшение очага поражения четко коррелировало со снижением неврологического дефицита [17]. Ранее положительное антиишемическое действие другого митохондриально-адресованного антиоксиданта (MitoQ) было продемонстрировано при моделировании ишемии сердца [18], однако защитного действия этого

вещества при ишемии головного мозга не было обнаружено [19].

Очень распространенным возрастным заболеванием, по-видимому, опосредованным митохондриальными АФК, является болезнь Альцгеймера. Эта патология характеризуется постепенной потерей памяти и других когнитивных функций. Ключевым пунктом в развитии этого заболевания является образование Абета из его белкового предшественника [4]. Накопление Абета в клетках приводит к синаптической дисфункции и нарушению памяти [2, 20–21]. Патологический каскад, инициированный Абета на самых начальных стадиях, может быть обусловлен митохондриальным окислительным стрессом, что приводит к экспрессии на терминальном этапе проапоптотического белка GSK3 β

[22]. Логично предположить, что патологическое увеличение количества АФК при этом заболевании, а значит и нарушение памяти, может быть устранено посредством митохондриально-адресованных антиоксидантов [13].

Моделью синаптических изменений, лежащих в основе формирования обучения и памяти, может служить электрический ответ срезов гиппокампа, а именно длительная потенциация синаптической передачи в гиппокампе [23]. Используя эту модель, мы показали, что за 15 мин Абета в концентрации 200 нМ нарушает индукцию длительной посттетанической потенциации популяционного спайка пирамидных нейронов поля СА1 срезов гиппокампа крысы. Внутривенное введение животным митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQR1 производного пластохинона (1 мкмоль/кг веса) за 24 ч до приготовления срезов устраняет ингибирующий эффект Абета на ДП в срезах. Следует отметить, что одновременно с нами Ма и сотр. [5] исследовали действие другого митохондриально-адресованного антиоксиданта MitoQ [5], который был использован для предотвращения действия Абета на ДП. Причем, авторы добавляли антиоксидант *in vitro*, т.е. к срезам гиппокампа, тогда как в наших экспериментах SkQR1

вводили *in vivo*. Последнее свидетельствует об эффективности митохондриально-адресованных антиоксидантов как потенциальных фармакологических препаратов для лечения болезни Альцгеймера. Важным наблюдением Ма и др. [5] является то, что добавление Абета к гиппокампальным срезам вызывает в них гиперпродукцию митохондриальных АФК, которую предотвращает добавленный MitoQ.

В целом, результаты, полученные в группе Ма и др. [5] и нашей лаборатории, указывают на то, что митохондриальные антиоксиданты способны корректировать нарушения глутаматергической передачи, вызванные Абета и лежащие в основе нарушения памяти и других когнитивных функций при болезни Альцгеймера. Мы предполагаем, что SkQR1 может быть в этом случае более эффективен, чем MitoQ, так как способен работать в более низких концентрациях [24], и не только непосредственно ингибировать продукцию митохондриальных АФК, но и при введении *in vivo* повышать ишемическую толерантность, в частности, проявляющуюся в увеличении уровня эритропоэтина [25], что, в свою очередь, вызывает снижение активности проапоптотического белка GSK3 β , участвующего в токсическом каскаде Абета в нейронах [13, 22].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991) *Ann. Neurol.*, **30**, 572–580.
2. Selkoe, D.J. (2002) *Science*, **298**, 789–791.
3. Kimura, M., Akasofu, S., Ogura, H., and Sawada, K. (2005) *Brain Res.*, **1047**, 72–84.
4. Pagani, L., and Eckert, A. (2011) *Int. J. Alzheimer's Dis.*, DOI: 10.4061/2011/925050.
5. Ma, T., Hoeffler, C.A., Wong, H., Massaad, C.A., Zhou, P., Iadecola, C., Murphy, M.P., Pautler, R.G., and Klann, E. (2011) *J. Neurosci.*, **31**, 5589–5595.
6. Tillement, L., Lecanu, L., and Papadopoulos, V. (2011) *Mitochondrion*, **11**, 13–21.
7. Cardoso, S.M., Swerdlow, R.H., and Oliveira, C.R. (2002) *Brain Res.*, **931**, 117–125.
8. Yan, S.D., Xiong, W.C., and Stern, D.M. (2006) *J. Alzheimer's Dis.*, **9**, 127–137.
9. Newington, J.T., Pitts, A., Chien, A., Arseneault, R., Schubert D., and Cumming, R.C. (2011) *PLoS One*, **6**, e19191.
10. Hansson Petersen, C.A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P.F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E., and Ankarcona, M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13145–13150.
11. Singh, P., Suman, S., Chandna, S., and Das, T.K. (2009) *Bioinformation.*, **3**, 440–445.
12. Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.O., Zweier, J.L., and Sollott, S.J. (2000) *J. Exp. Med.*, **192**, 1001–1014.
13. Skulachev, V.P. (2011) *J. Alzheimer Dis.*, **28**, DOI: 103233/JAD-2011-111391.
14. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Черняк Б.В., Чертков В.А., Домнина Л.В., Иванова О.Ю., Изюмов Д.С., Хайлова Л.С., Коршунова Г.А., Лямзаев К.Г., Мунтян, М.С., Непряхина, О.К., Пашковская А.А., Плетюшкина О.Ю., Пустовидко А.В., Рогинский В.А., Рокитская Т.И., Рууге Э.К., Сапрунова В.Б., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев И.В., Скулачев М.В., Сумбатьян Н.В., Свириева И.В., Ташлитский В.Н., Васильев Ю.М., Высоких М.Ю., Ягужинский Л.С., Замятин А.А., Скулачев В.П. (2008) *Биохимия*, **73**, 1589–1606.
15. 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) *Биохимия*, **73**, 1607–1621.
16. 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, V.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) *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437–461.
17. Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Чупыркина А.А., Даньшина 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) *Биохимия*, **75**, 177–184.
18. Adlam, V.J., Harrison, J.C., Porteous, C.M., James, A.M., Smith, R.A., Murphy, M.P., and Sammut, I.A. (2005) *FASEB J.*, **19**, 1088–1095.
 19. Hobbs, C.E., Murphy, M.P., Smith, R.A., and Oorschot, D.E. (2008) *Pediatr. Int.*, **50**, 481–488.
 20. Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla F.M. (2003) *Neuron*, **39**, 409–421.
 21. Haas, C., and Selkoe, D.J. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **8**, 101–112.
 22. Lloret, A., Badia, M.C., Giraldo, E., Ermak, G., Alonso, M.D., Pallardo, F.V., Davies, K.J.A., and Vina, J. (2011) *J. Alzheimer's disease*, DOI: 10.3233/JAD-2011-110890.
 23. Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1999) *Science* **285**, 1870–1874.
 24. Skulachev, M.V., Antonenko, Y.N., Anisimov, V.N., Chernyak, B.V., Cherepanov, D.A., Chistyakov, V.A., Egorov, M.V., Kolosova, N.G., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Plotnikov, E.Y., Roginsky, V.A., Savchenko, A.Y., Severina, I.I., Severin, F.F., Shkurat, T.P., Tashlitsky, V.N., Shidlovsky, K.M., Vyssokikh, M.Y., Zamyatnin, A.A. J., Zorov, D.B., and Skulachev, V.P. (2011) *Curr. Drug Targets*, **12**, 800–826.
 25. Plotnikov, E.Y., Chupyrkina, A.A., Jankauskas, S.S., Pevzner, I.B., Silachev, D.N., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1812**, 77–86.

***In vivo* INJECTED MITOCHONDRIA-TARGETED
PLASTOQUINONE ANTIOXIDANT SkQR1 PREVENTS
THE β -AMYLOID-INDUCED DECAY OF THE LONG-TERM
POTENTIATION IN RAT HIPPOCAMPAL SLICES**

**N. A. Kapay^{1*}, N. K. Isaev^{1,2,3*}, E. V. Stelmashook^{1,3},
O. V. Popova¹, D. B. Zorov^{2,3}, V. G., Skrebitsky¹,
V. P. Skulachev^{2,3}**

¹ *Department of Brain Research, Research Center of Neurology,
Russian Academy of Medical Science, per. Obukha 5, Moscow 105064,
Russia; fax: (495)939-3181, E-mail: kapayn@gmail.com*

² *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow S
tate University, Moscow 119991, Russia; fax: (495)939-3181,
E-mail: isaev@genebee.msu.ru*

³ *Institute of Mitoengineering, Moscow State University,
Moscow 119991, Russia*

Received September 13, 2011
Revision received October 17, 2011

200 nM β -amyloid 1–42 (A β) impairs the induction of a long-term post-tetanic potentiation (LP) of a population spike (PS) in pyramid neurons of the CA1 field of rat hippocampal slice. Intraperitoneal injection to the animals of a mitochondria-targeted plastoquinone-derivative SkQR1 (1 micromol/kg of weight given 24 hrs before slices were made) abolishes the deleterious effect of A β on LP. These data demonstrate that the SkQR1 therapy is capable to compensate the A β -induced impairments of long-term synaptic plasticity in the hippocampus, which are the main cause loss of memory and other cognitive functions, associated with the Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's disease, β -amyloid, long-term memory, long-term potentiation, neurons, hippocamp, mitochondria-targeted antioxidants, SkQR1