

**ВЛИЯНИЕ КАТИОННОГО
ПРОИЗВОДНОГО ПЛАСТОХИНОНА –
10-(6'-ПЛАСТОХИНОНИЛ)ДЕЦИЛТРИФЕНИЛФОСФОНИЯ
(SkQ1) – НА СОДЕРЖАНИЕ СТЕРОИДНЫХ
ГОРМОНОВ И УРОВЕНЬ NO У КРЫС**

© 2010 г. В.А. Чистяков^{1*}, В.А. Сереженков², А.А. Александрова¹,
Н.П. Милютина¹, В.Н. Прокофьев¹, Е.В. Машкина¹,
Л.В. Гутникова¹, С.В. Демьяненко¹

¹ НИИ биологии Южного федерального университета,
344090 Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1;
электронная почта: vladimirchi@yandex.ru

² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва, ул. Косыгина, 4

Поступила в редакцию 26.04.10
После доработки 06.07.10

Введение самцам крыс производного пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1) – ежедневно в течение двух недель вызывает повышение содержания 17β-эстрадиола в сыворотке крови на 33% при введении SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг в день и на 41% при введении в дозе 250 нмоль/кг в день. Содержание нитратов и нитритов в плазме крови крыс увеличивается соответственно на 49 и 34%. Исследование изменения содержания оксида азота методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса со спиновой ловушкой на основе дитиокарбаматов и солей двухвалентного железа показало более чем двукратное увеличение содержания NO в легких, но не в крови, печени и кишечнике, после введения SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SkQ1, проникающие катионы, эстрадиол, нитраты, нитриты, оксид азота.

В ходе исследований геропротекторных свойств катионного производного пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1) – была показана его способность вызывать изменения в системе размножения млекопитающих, в частности увеличивать плодовитость и продолжительность репродуктивного периода самок белых мышей [1, 2]. В связи с этим было изучено влияния SkQ1 на гормональный статус животных. В первую очередь внимание было обращено на наиболее тесно связанные с репродукцией стероидные гормоны. Обнаружено, что SkQ1 способствует повышению содержания эстрадиола у самцов крыс.

Принятые сокращения: SkQ1 – производное пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний, АФК – активные формы кислорода, NOS – NO-синтаза, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат натрия, МНЖК – мононитрозильный комплекс железа, StAR – steroidogenic acute regulatory protein.

* Адресат для корреспонденции.

Одной из функций эстрадиола является регуляция уровня антиоксидантной защиты организма [3–5]. Реагируя с митохондриальным рецептором, эстрадиол через MAP-киназу и транскрипционный фактор NF-κB усиливает экспрессию марганцевой супероксиддисмутазы и селензависимой глутатионпероксидазы.

Эстрадиол ингибирует УФ-индуцированный выход цитохрома *c* из митохондрий, уменьшение потенциала митохондриальной мембраны, рост генерации активных форм кислорода (АФК) и целый ряд других проявлений апоптоза [6]. Способность эстрадиола усиливать активность естественной антиоксидантной системы митохондрий считают одним из главных факторов, определяющих более высокую продолжительность жизни женского пола у ряда млекопитающих, в том числе и человека [3].

Другой важной функцией эстрадиола является регуляция содержания оксида азота, осуществляемая через увеличение активности NO-синтазы (NOS) [7]. Известно, что влияние эст-

рогенов на сосудистую стенку включает в себя ряд воздействий, не зависящих от транскрипции (так называемый негеномный путь). Результаты многочисленных исследований показали, что во время связанного с овуляцией пика секреции эстрогенов в крови значительно повышается концентрация NO [7, 8]. Эстрадиол (но не прогестерон) повышал активность кальций-зависимых NOS в тканях как самцов, так и самок морских свинок [9]. Введение физиологических концентраций 17 β -эстрадиола в культуру эндотелиальных клеток человека и сегментов артерий как мужчин, так и женщин привело к зависимому от дозы увеличению активности конститутивных форм NOS за счет увеличения количества кальция внутри клетки [10]. Таким образом, есть серьезные основания полагать, что эстрадиол и другие эстрогены запускают регуляторные каскады, активирующие транспорт кальция, необходимого для активизации NO-синтазы [11]. В связи с этим исследовано влияние SkQ1 на содержание NO и его метаболитов в плазме крови и различных тканях крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были крысы-самцы Wistar (аутбредный сток) в возрасте 45 дней, полученные из Питомника лабораторных животных филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

В течение 14 дней крысам вводили SkQ1 по 25 и 250 нмоль/кг в день. Рассчитанную дозу препарата, растворенную в 100 мкл 0,2%-ного раствора этанола в дистиллированной воде, вводили в защитные мешки животным. Животные контрольной группы получали в течение 14 дней по 100 мкл 0,2%-ного этанола.

Содержание 17 β -эстрадиола в сыворотке определяли с помощью тест-системы Estradiol ELISA № EIA-2693 (DRG <http://www.drg-diagnostics.de>), содержание прогестерона, тестостерона и кортизола – с помощью тест-систем стероидИФА (прогестерон-01), стероидИФА (тестостерон-01), стероидИФА (кортизол-01) («АлкорБио», Россия; <http://www.alkorbio.ru>). Исследования были выполнены на автоматическом иммуноферментном анализаторе («Alisei», Италия).

Одним из наиболее токсичных метаболитов оксида азота является пероксинитрит. Количество этого нестойкого соединения оценивают по содержанию стабильного продукта его окисления – нитротирозина [12]. Количество нитротирозина в сыворотке крови определяли с помощью тест-системы ELISA KIT FOR NITRO-

TYROSINE (Nycult Biotechnology <http://www.hbt.nl/Site/>), количество нитрита/нитрата (NO_x) в плазме крови – методом Голикова и соавт. [13] с использованием реактива Грисса с предварительным восстановлением нитрата в нитрит с помощью гранулированного кадмия.

Эксперименты по определению содержания NO в органах и тканях крыс проводили в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (Москва) с помощью спектроскопии ЭПР и спиновой ловушки. Метод основан на введении животным экзогенной ловушки оксида азота – дитиокарбаматов и солей железа (2⁺). В данной работе использовали липидорастворимую ловушку-ДЭТК и сульфат железа [14]. При взаимодействии этих соединений с оксидом азота, непосредственно в тканях животных образуются моонитрозильные комплексы железа (МНКЖ), которые парамагнитны, что позволяет зарегистрировать ЭПР при 77 К и при комнатной температуре. Концентрацию NO в тканях животных оценивали путем сопоставления площадей пиков, определенных методом двойного интегрирования ЭПР-спектров экспериментальных и стандартного препаратов. В качестве стандарта использовали растворы известной концентрации солей дитиокарбамата натрия и сульфата железа (2⁺), обработанные газобразным оксидом азота в колбе Тунберга, из которой предварительно удалили кислород.

По завершении введения препарата SkQ1, ДЭТК вводили внутрибрюшинно в дозе 500 мг/кг, комплекс Fe/цитрат вводили подкожно в бедро (FeSO₄ – 37,5, цитрат Na – 187,5 мг/кг массы тела). Через 30 мин после введения компонентов спиновой метки животных декапитировали, собирали кровь, быстро, в течение 2–3 мин, извлекали необходимые органы и замораживали при температуре жидкого азота.

Сигналы ЭПР регистрировали на спектрометре ECS-106 («Bruker», ФРГ), имеющем резонатор TE-102. При обработке спектров использовали программное обеспечение ЭПР-спектрометра, реализованное на базе компьютера Motorola. Количественную оценку осуществляли методом двойного интегрирования, сопоставляя полученные данные со стандартом. В качестве стандартного препарата, содержащего известное количество спинов, использовали анаэробно синтезированный моонитрозильный комплекс дитиокарбоната железа.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартным формулам; в качестве показателя разброса значений для всех опытов использовали стандартную ошибку среднего значения [15]. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия

Колмогорова–Смирнова. Средние значения сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Достоверно различающимися признавали значения с $p < 0,05$. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Statistica 5.5 и Excel 2007. Во всех вариантах опытов было исследовано по десять животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание прогестерона, тестостерона и кортизола в сыворотке крови крыс после введения двух разных доз SkQ1 статистически значимо не отличалось от контрольных значений. В сыворотке крови крыс-самцов отмечено повышение содержания эстрадиола в среднем на 33 и на 41% при введении SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг в день и при введении в 10 раз большей дозы препарата (рис. 1).

Результаты экспериментов позволяют предположить, что вызванного SkQ1 увеличения содержания эстрадиола достаточно для активации системы генерации NO. Так, введение препарата в дозах 25 и 250 нмоль/кг в день вызывало увеличение содержания нитратов и нитритов в плазме крови крыс на 49 и 34% соответственно (рис. 2). Рост содержания нитритов и нитратов может отражать как увеличение генерации NO, так и другие изменения метаболизма азота. Поэтому были проведены эксперименты по непосредственному измерению содержания NO в тканях крыс методом ЭПР.

На рис. 3 приведены характерные спектры, полученные в ходе исследования. Спектры 1 и 2 представляют собой ЭПР-сигналы MNКЖ ДЭТК и некоторых других парамагнитных цент-

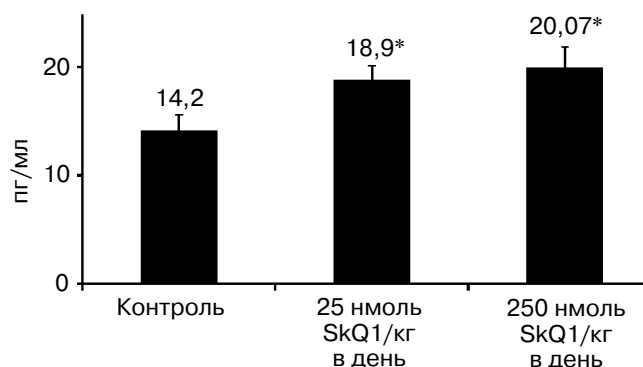


Рис. 1. Содержание эстрадиола в сыворотке крови крыс после введения SkQ1. * – Здесь и на рис. 2 и 4 различия с контролем статистически значимы (*t*-критерий, $p < 0,05$; $n = 10$)

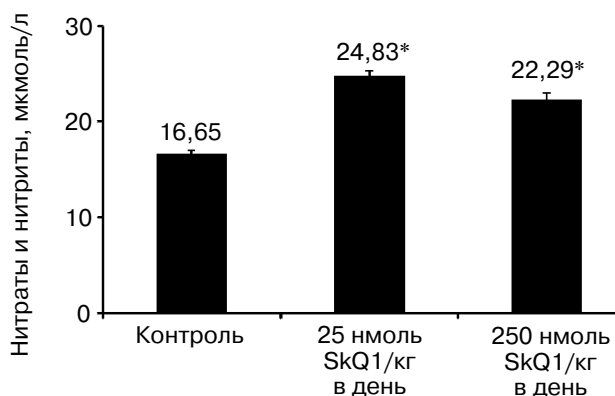


Рис. 2. Содержание нитритов и нитратов в плазме крови крыс после введения SkQ1

ров опытного и контрольного животных. Исходные спектры в интересующей нас части представляют собой суперпозицию комплексов меди и ДЭТК (рис. 3, спектр 4), сложного сигнала марганца и сигнала MNКЖ ДЭТК. После проведения процедуры вычитания мы наблюдаем хорошо выраженный триплетный сигнал MNКЖ ДЭТК со средним *g*-фактором 2,035. Спектр 4 – ЭПР-сигнал MNКЖ ДЭТК в «чистом виде»; для сравнения приводится ЭПР-сигнал стандарта (рис. 3, спектр 3). Следует обратить внимание на то, что по ЭПР-сигналу контрольного животного можно судить о некотором базальном уровне оксида азота – виден небольшой триплетный сигнал MNКЖ ДЭТК.

Анализ полученных данных показал более чем двукратное увеличение содержания NO в легких после введения SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг в день (рис. 4). Для других тканей статистически значимых отличий от контроля не зарегистрировано. Как известно, оксид азота – нестойкое соединение; время его жизни в водной фазе измеряется миллисекундами. По-видимому, увеличение содержания нитритов и нитратов в плазме крови является результатом увеличения содержания NO в легких. Интересно, что в экспериментах по определению суммарного содержания нитритов и нитратов после действия препарата в таких же дозах также наблюдали больший эффект при введении меньшей дозы.

Эксперименты свидетельствуют и об отсутствии опасного для организма уровня генерации пероксинитрита, оцениваемого по содержанию нитротирозина в сыворотке животных при введении исследованных доз SkQ1 (данные не приводятся, содержание нитротирозина ниже порога чувствительности метода).

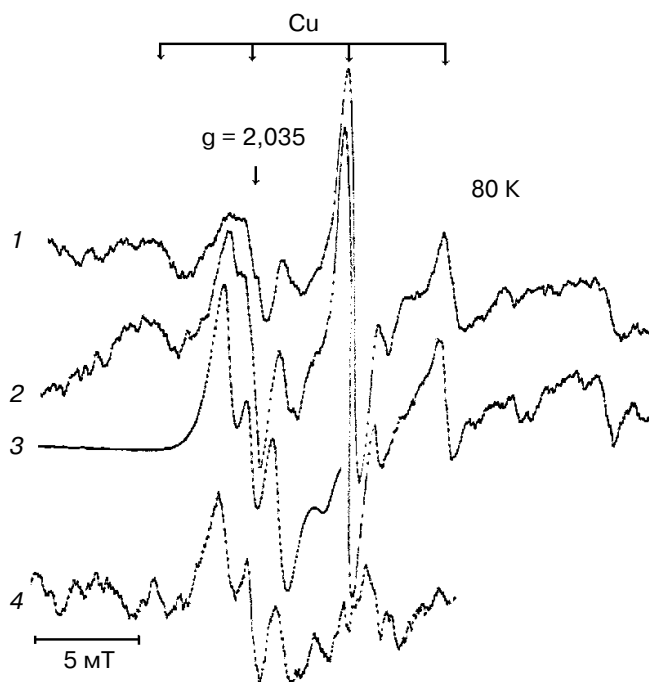


Рис. 3. Спектры ЭПР легкого крысы. 1 – Спектр ЭПР легкого крысы после введения животному 25 нмоль/кг препарата SkQ1, 2 – то же, но для контрольного животного (вводили растворитель препарата), 3 – спектр ЭПР стандартного препарата МНКЖ ДЭТК, 4 – разностный спектр ЭПР МНКЖ ДЭТК после вычитания спектра 2 из спектра 1. Условия регистрации: $H = 336$ мТ, развертка поля – 20 мТ, мощность СВЧ-источника – 10–20 мВт, усиление – 10^3 – 10^5 , амплитуда модуляции – 0,5 мТ, $\tau = 0,163$ с, температура записи спектров 77 К

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание любого вещества, участвующего в метаболизме, определяется соотношением скоростей синтеза, распада и/или выведения из организма. Рассматривая с этой точки зрения возможные механизмы повышения содержания эстрадиола при действии SkQ1, следует отметить, что одна из ключевых стадий синтеза стероидов у самцов млекопитающих, превращение холестерина в прегненолон, проходит в митохондриях, где от поступающего холестерина под влиянием фермента Р-450_{ssc} (холестерин-20,22-гидроксилазы, 20,22-десмолазы) происходит отщепление боковой цепи. Скорость процесса определяется не уровнем активности Р-450_{ssc}, а скоростью переноса холестерина между внешней и внутренней мембранами митохондрий, осуществляемого с помощью лабильного фосфопротеина StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) [16]. Известно также, что SkQ1 и

близкий к нему по структуре додецилтрифенилфосфоний стимулируют трансмембранный транспорт катионов жирных кислот [17]. Можно предположить, что такая активность проявляется и в случае транспорта вновь синтезированного StAR через внешнюю мембрану митохондрий. Не исключено также, что обладающие гидрофобными и гидрофильными фрагментами молекулы SkQ1 способны облегчать упаковку холестерина в «гидрофобный туннель», находящийся внутри белковой глобулы StAR [18].

В процессах модификации эстрадиола, предшествовавших его переходу в гидрофильные метаболиты и выведению, есть стадии, связанные с формированием циклов окисления/восстановления, опосредованных генерацией АФК [19]. Подавление этих реакций антиоксидантом SkQ1 также может вести к росту содержания эстрадиола.

При интерпретации данных по оксиду азота и его метаболитам необходимо учитывать, что стимулы, влияющие на такой важный физиологический показатель, отнюдь не исчерпываются изменением содержания эстрадиола. Увеличение количества NO в легких и нитритов/нитратов в плазме может быть результатом многих причин. Известно, в частности, что оксид азота может непосредственно вступать в реакцию с $O_2^{\cdot-}$ с образованием пероксинитрита. Следовательно, снижение количества клеточных АФК будет способствовать сохранению некоторой части продуцируемого клетками NO, из-за чего его биодоступность увеличится. Сложность механизмов, координирующих содержание эстрадиола и NO, проявляется и в том, что большая доза SkQ1, вызывающая рост первого показателя, не влияет статистически значимо на второй. Причины этого явления требуют специального исследования.

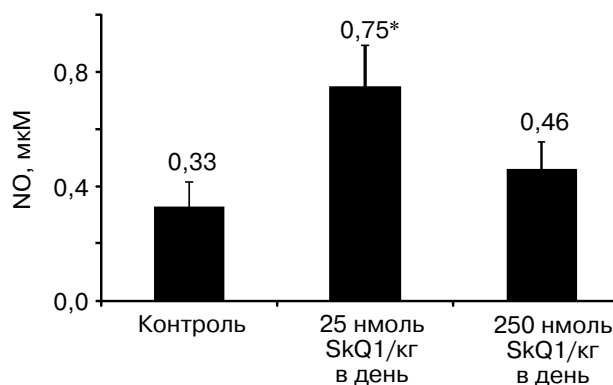


Рис. 4. Содержание NO в легких крыс, получавших SkQ1

Главный феноменологический результат наших исследований — демонстрация того, что двухнедельное ежедневное введение SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг способствует умеренному повышению содержания эстрадиола и NO. Антиоксидантный эффект сходных доз препарата был зарегистрирован в многочисленных экспериментах, как *in vitro*, так и *in vivo* [1, 2, 20]. Такое сочетание эффектов довольно редкое и может быть перспективным для лечения ряда заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом.

Можно предположить, что описанный ранее защитный эффект SkQ1 при ишемии/реперфузии в почках, сердце и головном мозге [20] также может быть частично связан с протекторным эффектом индукции NO.

Описанные результаты получены на самцах, что связано с необходимостью унификации схе-

мы эксперимента при исследовании влияния SkQ1 на разные параметры. Известно, что метаболизм и функции эстрадиола у разных полов значительно различаются. Проверка способности SkQ1 повышать содержание этого гормона у самок представляет безусловный интерес и, надеемся, станет предметом дальнейших исследований.

Авторы выражают глубокую благодарность В.П. Скулачеву за помощь при планировании экспериментов и интерпретации их результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИИ митоинженерии МГУ и Министерства науки и образования РФ (грант «Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2010 гг.)» № 2.1.1/5628).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов В.Н., Бакеева Л.Е., Егормин П.А., Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф., Манских В.Н., Михельсон В.М., Пантелеева А.А., Пасюкова Е.Г., Пилипенко Д.И., Пискунова Т.С., Попович И.Г., Рощина Н.В., Рыбина О.Ю., Сапрунова В.Б., Самойлова Т.А., Семенченко А.В., Скулачев М.В., Спивак И.М., Цыбулько Е.А., Тындык М.Л., Высоких М.Ю., Юрова М.Н., Забежинский М.А., Скулачев В.П. (2008) *Биохимия*, **73**, 1655–1670.
2. Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Erichev, 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) *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437–461.
3. Vina, J., Sastre, J., Pallardo, V.F., Gambini, J., and Borras, C. (2008) *Biol. Chem.*, **389**, 273–277.
4. Hamden, K., Carreau, S., Ellouz, F., Masmoudi, H., and Elfeki, A. (2007) *J. Physiol. Biochem.*, **63**, 195–201.
5. Hamden, K., Carreau, S., Boujbiha, M.A., Lajmi, S., Aloulou, D., Kchaou, D., and Elfeki, A. (2008) *Steroids*, **73**, 495–501.
6. Pedram, A., Razandi, M., Wallace, D.C., and Levin, E.R. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 2125–2137.
7. Weiner, C.P., Lizasoain, I., Baylis, S.A., Knowles, G., Charles, I.C., and Moncada, S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5212–5216.
8. Simoncini, T., and Genazzani, A.R. (2003) *Eur. J. Endocrinol.*, **148**, 281–292.
9. Cicinelli, E., Ignarro, L.J., Lograno, M., Galantino, P., Balzano, G., and Schonauer, L.M. (1996) *Fertil. Steril.*, **66**, 1036–1038.
10. Stefano, G.B., Prevot, V., Beauvillain, J.-C., Cadet, P., Fimiani, C., Welters, I., Fricchione, G.L., Breton, C., Lassalle, P., Salzet, M., and Bilfinger, T.V. (2000) *Circulation*, **101**, 1594–1597.
11. Murphy, E., and Steenbergen, C. (2007) *Cardiovascular Res.*, **75**, 478–486.
12. Tarpey, M.M., and Fridovich, I. (2001) *Circulation Res.*, **89**, 224–236.
13. Голиков П.П. (2004) *Оксид азота в клинике неотложных заболеваний*, Медпрактика, Москва.
14. Микоян В.Д., Сереженков В.А., Бражникова Н.В., Кубрина Л.Н., Хачатрян Г.Н., Ванин А.Ф. (2004) *Биофизика*, **49**, 121–127.
15. Гланц С. (1998) *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва.
16. Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.J., and Azhar, S. (2010) *Nutr. Metab. (Lond.)*, **7**, 47–73.
17. Severin, F.F., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., Rokitskaya, T.I., Cherepanov, D.A., Mokhova, E.N., Vyssokikh, M.Y., Pustovidko, A.V., Markova, O.V., Yaguzhinsky, L.S., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663–668.
18. Strauss, J.F., III, Kishida, T., Christenson, L.K., Fujimoto, T., and Hiroi, H. (2003) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **202**, 59–65.
19. Nilsen, J. (2008) *Front Neuroendocrinol.*, **29**, 463–475.
20. Бакеева Л.Е., Барсков И.В., Егоров М.В., Исаев Н.К., Капелько В.И., Казаченко А.В., Кирпатовский В.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.

**INFLUENCE OF PLASTOQUINONE DERIVATIVE –
10-(6'-PLASTOQUINONYL)DECYLTRIPHENYLPHOSPHONIUM
(SkQ1) – ON THE CONTENT OF STEROID HORMONES
AND NITRIC OXIDE LEVEL FOR RATS**

**V. A. Chistyakov^{1*}, V. A. Serezhenkov², A. A. Alexandrova¹,
N. P. Milutina¹, V. N. Prokof'ev¹, E. V. Mashkina¹,
L. V. Gutnikova¹, S. V. Dem'yanenko¹**

¹ *Research Institute of Biology, Southern Federal University,
prosp. Stachky 194/1, Rostov-na-Donu 344090, Russia;
E-mail: vladimirchi@yandex.ru*

² *N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian
Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow 119991, Russia*

Received April 26, 2010

Revision received July 6, 2010

Plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium (SkQ1) was introduced daily into male Wistar rats for two weeks at doses of 25 and 250 nmol/kg. This caused increase of estradiol level in blood serum by 33 and 41% at the lower and higher dose, respectively. The content of nitrates and nitrites in rat blood plasma increases by 49 and 34%, respectively. Study of nitric oxide level by EPR spectroscopy with NO spin traps based on iron complexes with diethyldithiocarbamate showed more than doubling of NO generation in lungs but not in blood, liver, and intestines after introduction of SkQ1 at the dose of 25 nmol/kg.

Key words: SkQ1, penetrating cations, estradiol, nitrates, nitrites, nitric oxide