

УДК 577.24:577.175.642

**ВЛИЯНИЕ КАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО
ПЛАСТОХИНОНА – 10-(6'-ПЛАСТОХИНОНИЛ)
ДЕЦИЛТРИФЕНИЛ ФОСФОНИЯ (SkQ1)
НА ЭСТРАЛЬНЫЙ ЦИКЛ И УРОВЕНЬ
ЭСТРАДИОЛА У КРЫС**

© 2012 г. В.А. Чистяков^{1,2*}, С.В. Демьяненко^{1,2}, А.А. Александрова¹,
Л.В. Гутникова¹, В.Н. Прокофьев¹, О.Н. Кошелева¹

¹ НИИ биологии Южного федерального университета,
344090 Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1; факс: (863)299-5661,
электронная почта: vladimirchi@yandex.ru

² Ростовский государственный медицинский университет,
344022 Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29;
факс: (863)2504201

Поступила в редакцию 03.03.12
После доработки 28.04.12

Введение самкам крыс с регулярным эстральным циклом производного пластохинона – 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония (SkQ1) ежедневно в течение двух недель в дозе 25 нмоль/кг (но не 250 нмоль/кг) в день приводит к увеличению продолжительности стадии проэструса за счет снижения длительности межтечковой фазы. Статистически значимых изменений в содержании 17β-эстрадиола в сыворотке крови животных не выявлено ни в одной из фаз цикла при введении SkQ1 в обеих дозах. Однако относительное удлинение стадии проэструса при использовании меньшей дозы препарата ведет к повышению среднего за цикл уровня эстрадиола на 20%.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SkQ1, проникающие катионы, эстрадиол, эстральный цикл.

Данные физиологических экспериментов о способности SkQ1 вызывать изменения в системе размножения млекопитающих [1, 2] позволяют предположить возможность влияния препарата на уровень эстрадиола у самок крыс репродуктивного возраста. Ранее нами было показано, что происходит повышение содержания 17β-эстрадиола в сыворотке крови молодых крыс-самцов Wistar при введении SkQ1 в дозе 25 и 250 нмоль/кг в день в течение двух недель [3]. Основной задачей данного исследования стала оценка действия SkQ1 в тех же дозах на содержание 17β-эстрадиола в сыворотке артериальной крови самок крыс в стадии диэструса (dioestrus), проэструса (prooestrus) и эструса (oestrus). Также было проведено исследование влияния SkQ1 на

структуру эстрального цикла крыс с регулярным циклированием.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Самки крыс Wistar в возрасте 10–11 недель получены из питомника лабораторных животных филиала ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Учитывая циркадные биоритмы регуляции и функционирования женской репродуктивной системы и связанные с ними колебания интенсивности обменных процессов [4], все манипуляции проводили в одно и то же время суток. Работа выполнена с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.).

Эксперименты проводили в августе–октябре 2010 г., всего было изучено 40 особей.

Начиная с 12–13 недели жизни крыс, в течение не менее двух недель ежедневно в 12 час дня

Принятые сокращения: SkQ1 – производное пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний; АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; АФК – активные формы кислорода; O₂⁻ – супероксид-анион-радикал.

* Адресат для корреспонденции.

брали влагиалищные мазки для определения стадии эстрального цикла [5]. Мазки окрашивали метиленовым синим и изучали под микроскопом Carl Zeiss Axioskop 40, объектив Zeiss A-plan 40×/0,65, окуляр W-Pl 10×/23, бинокулярная насадка 1×, фотоаппарат Canon PowerShot A640. Определяли коэффициент эструса (Кэ), метаэструса-диэструса (Км + д) и проэструса (Кп) у интактных животных и при введении SkQ1 по формуле: $K = a/b \times 100\%$, где К – коэффициент периода цикла, а – количество дней, приходящихся на данный период цикла за время наблюдения, b – общая длительность полных циклов (в сут) [6]. В эксперимент отбирали животных, показавших при тестировании не менее трех последовательных 4-дневных циклов.

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 защечные мешки животных. Животные контрольной группы получали в течение 14 дней по 100 мкл 0,2%-ного этанола. Начало введения препарата было индивидуально для каждого животного и приходилось на стадию эструса. Во время введения препарата контролировали эстральный цикл крыс с помощью влагиалищных мазков. На 14-й день введения SkQ1 начинали прижизненный забор крови из подключичной артерии (a. subclavia) под эфирной анестезией для определения уровня эстрадиола. Кровь брали в течение 4-х дней на фоне введения препарата. Начало забора крови приходилось на первый день диэструса и заканчивалось на стадии эструса. Суммарное время введения SkQ1 составляло 17 сут.

Содержание эстрадиола в сыворотке определяли с помощью тест-системы «DRG» Estradiol Sensitive EIA-4399 (DRG <http://www.drg-diagnostics.de>). Исследования выполнены на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Alisei» (Radim, Италия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартным формулам по программе Statistica 6. В качестве показателя разброса значений для всех опытов использовали ошибку репрезентативности среднего значения. Данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тестирование животных с целью установления длительности и структуры эстрального цикла показало, что 77,5% самок крыс имели устой-

чивый 4-дневный цикл. У 22,5% животных цикл, в среднем, составлял 3–5 дней, эти животные были исключены из дальнейшего анализа.

На течковый период (проэструс и эструс) и межтечковый период (метаэструс и диэструс) у крыс с 4-дневным эстральным циклом при взятии мазков в полдень, в среднем, приходилось по двое суток, что соответствует данным литературы [6–8].

Высокий процент животных с неустойчивым эстральным циклом, либо циклом более 4-х сут в осенний период, является следствием сезонности эстральной функции крыс. Показано, что соотношение эструс/диэструс зависит от изменения освещенности, и составляет в весенне-летний период 1 : 1, в осенне-зимний период 1 : 3 [9].

Не было статистически значимых различий в длительности стадий эстрального цикла и его средней продолжительности в группе крыс до начала введения SkQ1 и в группе животных, не получавших препарат вообще. Показатели коэффициентов стадий эстрального цикла интактных животных, в среднем, были равны: Кп = $23,36 \pm 0,52\%$; Кэ = $25,38 \pm 0,47\%$; Кпэ = $48,74 \pm 0,47\%$; Кдм = $51,26 \pm 0,47\%$ (рис. 1).

При введении SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг в день выявлены статистически значимые изменения длительности стадий эстрального цикла (рис. 2). Результаты наблюдений за структурой эстрального цикла крыс при введении SkQ1 в двух дозах относительно периода времени, когда эти же животные не получали препарат представлены на рис. 3. Как видно на рисунках, при введении SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг наблюдалось повышение длительности течкового периода ($p = 0,04$; $n = 9-12$) за счет роста продолжительности ста-

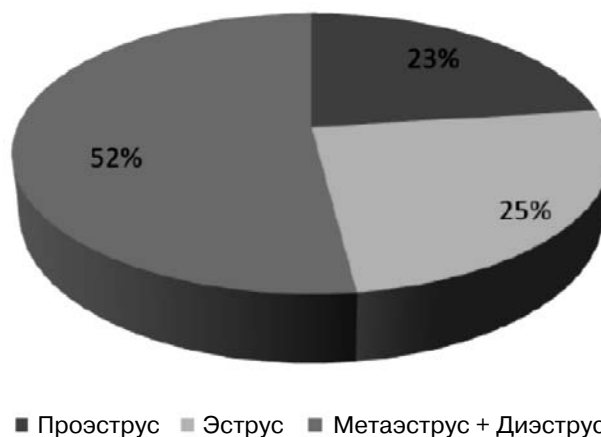


Рис. 1. Доля каждой стадии в эстральном цикле интактных крыс ($n = 31$)



Рис. 2. Доля каждой стадии в эстральном цикле крыс за время введения SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг в день ($n = 12$)

дии проэструса ($p = 0,03$; $n = 9-12$) и снижения продолжительности межтечковой фазы ($p = 0,04$; $n = 9-12$), длительность овуляторной стадии не отличалась от показателей, полученных до введения препарата. Увеличения средней длительности эстрального цикла не происходило.

Данные по содержанию 17β -эстрадиола в сыворотке артериальной крови крыс, с регулярным 4-дневным циклом, у которых не было нарушения эстрального цикла непосредственно перед взятием и в процессе взятия крови представлены на рис. 4.

Статистически значимых изменений в содержании 17β -эстрадиола не выявлено ни в одной из фаз цикла, как при введении SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг, так и при введении 250 нмоль/кг.

Расчеты показывают, что средний уровень эстрадиола в течение цикла составляет в группе контроля 4,54 пг/мл, после введения SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг в день – 5,46 пг/мл (увеличение на 20%). После введения большей дозы этот показатель меняется незначительно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования структуры эстрального цикла молодых крыс с регулярным 4-дневным циклом свидетельствуют о способности низких доз SkQ1 (25 нмоль/кг в день) повышать продолжительность течкового периода за счет увеличения длительности стадии проэструса и

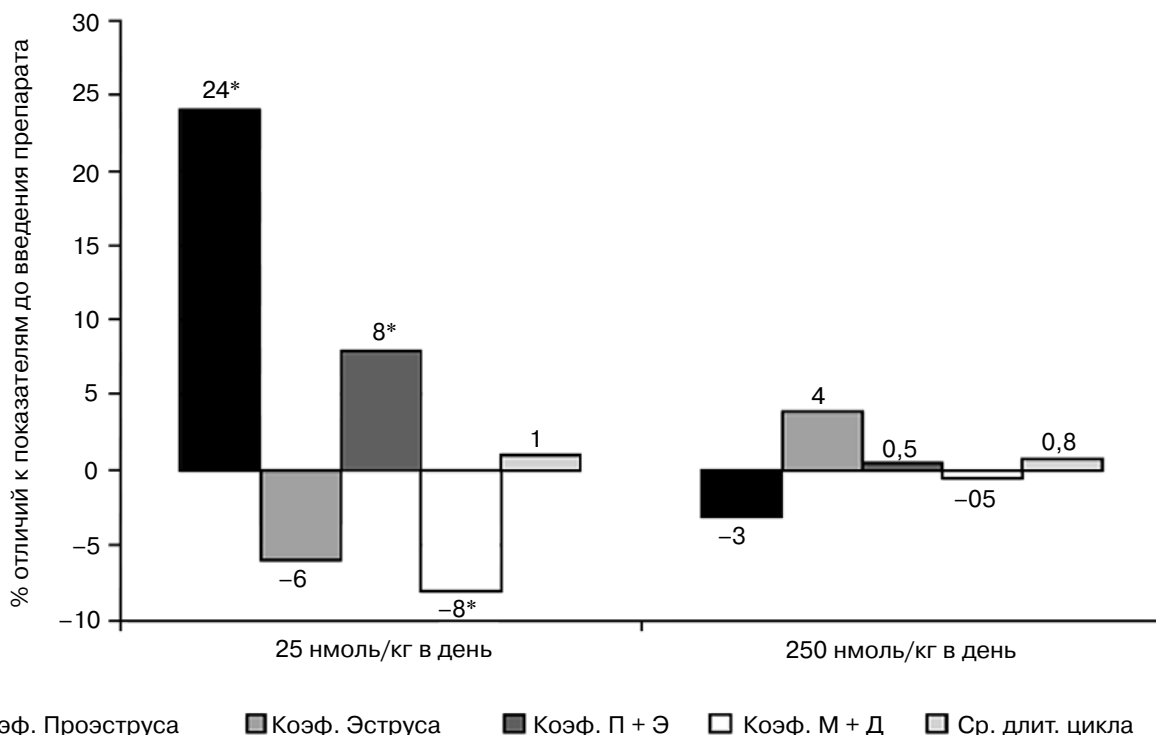


Рис. 3. Изменение продолжительности фаз эстрального цикла и средней длительности цикла при введении SkQ1 в дозе 25 и 250 нмоль/кг в день относительно показателей до введения препарата у одних и тех же животных. * – Различия с контролем статистически значимы (t – критерий, $p < 0,05$, $n = 10-12$)

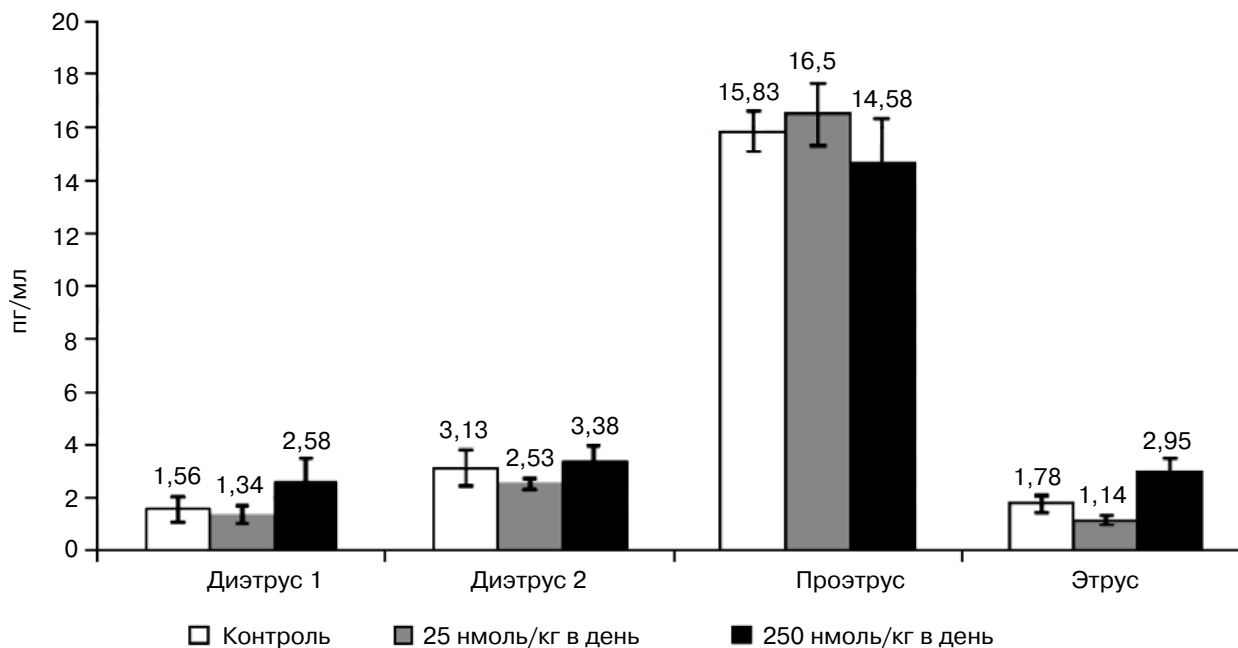


Рис. 4. Содержание 17β-эстрадиола в сыворотке крови крыс на разных стадиях эстрального цикла, ($n = 7-11$)

снижения длительности межтечковой фазы. При этом не наблюдается изменения фазовой структуры цикла и продолжительности овуляторной фазы.

Интересно отметить тот факт, что у грызунов, находящихся в стадии проэструса наблюдается повышение познавательной деятельности и снижение уровня тревоги в поведенческих тестах, что опосредовано рецепторами эстрадиола ERβ в гиппокампе и повышенным уровнем эстрадиола в крови и мозге животных [10].

Наиболее интересные заключения для понимания природы гормональных эффектов, вызываемых SkQ1, можно сделать на основе сопоставления данных по уровню эстрадиола и структуре эстрального цикла самок крыс. Кратко резюмируя данные биохимических тестов можно утверждать, что статистически значимого изменения концентрации эстрадиола в сыворотке крови ни в одной из стадий цикла обнаружено не было. Однако при изучении структуры цикла мы наблюдали увеличение продолжительности стадии проэструса (рис. 2), без увеличения общей продолжительности цикла.

Как из литературных данных, так и из результатов наших исследований, известно, что для стадии проэструса характерно наиболее высокое содержание эстрадиола. Поэтому относительное удлинение этой стадии, даже без увеличения (но и без снижения) содержания эстрадиола во время нее, свидетельствует об увеличении

выработки эстрадиола в течение цикла. Таким образом, полученные данные подтверждают способность SkQ1 стимулировать выработку эстрадиола не только у самцов, но и у самок крыс. По-видимому, на стадии проэструса механизм синтеза эстрадиола работает с максимальной возможной активностью (во всяком случае, на этой стадии достигается максимальный для самок крыс уровень гормона), поэтому стимулирующее действие SkQ1 проявляется в виде расширения временных рамок стадии цикла с максимальной «мощностью» синтеза.

Рассматривая возможные пути реализации эффектов SkQ1 на репродуктивную систему молодых крыс необходимо отметить некоторые факты.

В период овуляции, имплантации яйцеклетки и развития беременности происходит повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), активных форм кислорода (АФК) и ферментов антиоксидантной защиты. Уровень супероксид-анион-радикала в стадии проэструса повышается в шесть раз, по сравнению с другими стадиями цикла, в то время как экспрессия супероксиддисмутазы снижается. Высокий уровень O_2^- связан с клеточной пролиферацией в эстральном цикле и с увеличением текучести и полярности мембран в период имплантации яйцеклетки [11]. Показано, что скорость спонтанного ПОЛ в стадиях проэструса и метаэструса у крыс выше, чем в стадиях диэструса и эструса. Скорость аскорбатзависимого ПОЛ

и исходный уровень малонового диальдегида максимальны в стадии проэструса [12]. Можно предположить, что дополнительная антиоксидантная активность SkQ1 позволяет снизить уровень разрушительного действия АФК на стадии проэструса и, как следствие, растянуть эту важную для познавательной активности стадию [10].

Известно также, что с увеличением размеров яичника в пролиферативные фазы эстрального цикла наблюдается увеличение количества митохондрий, скорости поглощения митохондриями кислорода, а также повышение митохондриальной продукции NO и активности цитохромоксидазы. Относительно низкий уровень NO является сигналом для клеток к росту фолликула, тогда как повышение концентрации NO служит пусковым механизмом для митохондриально-зависимого апоптоза фолликула [13]. У человека eNOS и iNOS ограничены железистым эпителием в небеременной матке, слабая иммунореактивность iNOS обнаружена в клетках стромы [14]. У крыс в ткани яичника присутствуют индуцибельная и эндотелиальная формы NOS [15]. Полученные нами ранее данные [3] о способности SkQ1 в малых концентрациях усиливать генерацию NO в легких самцов позволяют сделать предположение о возможном влиянии препарата на уровень эстрадиола и эстральный цикл путем изменения баланса NO в тканях репродуктивной системы самок крыс. Однако это предположение нуждается в экспериментальной проверке.

Заслуживает внимание и тот факт, что SkQ1 оказывал свое биологическое действие, в дан-

ном случае на уровень эстрадиола, в низкой концентрации, не проявляя подобного эффекта в более высокой концентрации. В случае с SkQ эффект усиления может быть обусловлен накоплением в митохондриях [2]. Тем не менее, действие антиоксидантов в сверхмалых дозах (10^{-12} – 10^{-13} М и ниже) описано для веществ разного происхождения и природы: синтетических и природных антиоксидантов: токоферола, фенолов, оксипиридинов и др. [16, 17]. Известно, что общие закономерности действия сверхмалых доз антиоксидантов наиболее ярко проявляются при изучении зависимости «доза–эффект». В ряде случаев эта зависимость бимодальная: эффект регистрируется при сверхмалых дозах препарата, достигает максимума, а затем по мере увеличения дозы, уменьшается, сменяется «мертвой зоной» и далее вновь усиливается, иногда в дозовой зависимости обнаруживается стадия «перемены знака» эффекта. Мы считаем, что перспективным может быть поиск физиологических эффектов SkQ в фенто- и пиколярных концентрациях, значительно меньших, испытанных в настоящее время.

Работа выполнена при финансовой поддержке компании «НИИ Митоинженерии МГУ» и Министерства науки и образования РФ, Министерства здравоохранения и социального развития РФ.

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

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., 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., Vysokikh, M.Y., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437–461.
3. Чистяков В.А., Серезенков В.А., Александрова А.А., Милютин Н.П., Прокофьев В.Н., Машкина Е.В., Гутникова Л.В., Демьяненко С.В. (2010) *Биохимия*, **75**, 1571–1576.
4. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. (2000) *Хронобиология и хрономедицина*. М.: Триада-Х, 488 с.
5. Кабак Я.М. (1968) Практикум по эндокринологии. Основные методики экспериментально-эндокринологических исследований. М.: Изд. МГУ, 153с.
6. Бессалова Е.Ю. (2006) *Клин. анат. та опер. хірургія*, **5** (3), 85–90.
7. Smith, M.S., Freeman, M.E., and Neill, J.D. (1975) *Endocrinology*, **96** (1), 219–226.
8. Steinberg, R.M., Walker, D.M., Juenger, T.E., and Woller, M.J. (2008) *Biol. Reprod.*, **78**, 1091–1101.
9. Виноградова И.А., Чернова И.В. (2006) *Успехи геронтологии*, **19**, 60–65.
10. Wolf, A.A., Koonce, C., Manley, K., and Frye, C.A. (2009) *Behav Brain Res.*, **196**, 254–260.
11. Duran, R.G., Gomez, Melendez, M.R., and Hicks Comez, J.J. (1998) *Ginecol. Obstet. Mex.*, **66**, 371–376.
12. Ломтева Н.А. (2008) *Проблемы репродукции*, **6**, 12–15.
13. Navarro, A., and Torrejon, R. (2007) *Front Biosci*, **1**, 1164–1173.
14. Cameron, I.T., and Campbell, S. (1998) *Hum. Reprod. Update*, **4**, 565–569.

15. Van Voorhis, B.J., Moore, K., Strijbos, P.J.L., Nelson, S., Baylis, S.A., Grzybicki, D., and Weiner, C.P. (1995) *J. Clin. Invest.*, **96**, 2719–2726.
16. Бурлакова Е.Б., Греченко Т.Н., Соколов Е.Н., Терехова С.Ф. (1986) *Биофизика*, **34**, 9–21.
17. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П., Лелекова Т.В. (1999) *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)*, **5**, 21 с.

**EFFECT OF PLASTOQUINONE
DERIVATIVE 10-(6'-PLASTOQUINONYL)
DECYLTRIPHENYLPHOSPHONIUM
(SkQ1) ON ESTROUS CYCLE AND
17 β -ESTRADIOL LEVEL IN RATS**

**V. A. Chistyakov^{1,2*}, S. V. Dem'yanenko^{1,2}, A. A. Alexandrova¹,
L. V. Gutnikova¹, V. N. Prokof'ev¹, O. N. Kosheleva¹**

¹ *Research Institute of Biology of Southern Federal University,
prosp. Stachky 194/1, Rostov-na-Donu 344090, Russia;
fax: (863)299-5661, E-mail: vladimirchi@yandex.ru*

² *Rostov State Medical University, Central Research Laboratory,
ul. Nahichevansky 29, Rostov-on-Don 344022, Russia*

Received March 3, 2012

Revision of received April 28, 2012

Administration of the plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) to female Wistar rats with regular estrous cycle once a day for two weeks in doses of 25 nmol/kg (but not 250 nmol/kg) increases proestrus duration by reducing the phase of metestrus. Both doses made no significant changes in serum 17 β -estradiol level for any stage of the cycle. However, relative elongation of the proestrus stage leads to an increase in average per cycle estradiol levels by 20%.

Key words: SkQ1, penetrating cations SkQ1, estradiol, estrous cycle