

Аддукт фуллерена C_{60} с поливинилпирролидоном предупреждает нарушение формирования долговременной памяти

© И.Я. Подольский, Е.В. Кондратьева, И.В. Щеглов, М.А. Думпис, Л.Б. Пиотровский

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,
142290 Пущино, Московская обл., Россия

E-mail: podolski@venus.iteb.serpukhov.su

Показано, что микроинъекция производного аддукта C_{60} /ПВП в дорзальный гиппокамп полностью предотвращает нарушение пространственной памяти, вызванное введением высокой дозы циклогексимида, подавляющей синтез белка в центральной нервной системе более чем на 90%. Предполагается, что микроинъекция аддукта C_{60} /ПВП в гиппокамп предупреждает гибель его нейронов, и это может быть одним из существенных факторов, предотвращающих нарушение формирования долговременной памяти, вызванное подавлением синтеза белка. Однако возможны и другие механизмы действия фуллеренов, которые остаются неизвестными.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 01-04-49826, грантом Российского фонда фундаментальных исследований "Ведущие научные школы" № 0015-07880 и грантом "Фундаментальные исследования в области естественных наук" № E00-6.0-284.

1. В конце 90-х годов на нескольких экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* были показаны высокая антиоксидантная активность фуллеренов и их способность защищать нейроны от запрограммированной клеточной гибели (апоптоза) [1,2]. Это позволило предположить, что эти вещества могут оказаться эффективными нейропротекторами для лечения таких нейродегенеративных заболеваний человека, как амиотрофический латеральный склероз и паркинсонизм [1–3], а также для предотвращения радиационных повреждений [4].

При многих заболеваниях головного мозга (болезнь Альцгеймера, атеросклероз сосудов мозга, черепно-мозговая травма) нарушается процесс регистрации и хранения информации в долговременной памяти [5]. Подавление синтеза белка в головном мозге ингибиторами является одной из наиболее хорошо изученных моделей нарушения формирования долговременной памяти. Ингибиторы синтеза белка, не влияя на процесс научения, грубо нарушают сохранение информации [6]. Недавно показано, что высокие дозы ингибиторов синтеза белка вызывают апоптоз нейронов [7,8]. В формировании долговременной памяти ключевую роль играет гиппокамп, двустороннее повреждение которого нарушает этот процесс у человека и животных [5]. Задача настоящей работы состояла в выяснении следующего вопроса: могут ли фуллерены и их производные, вводимые в гиппокамп, предупреждать нарушение формирования долговременной памяти у млекопитающих, вызванное ингибитором синтеза белка.

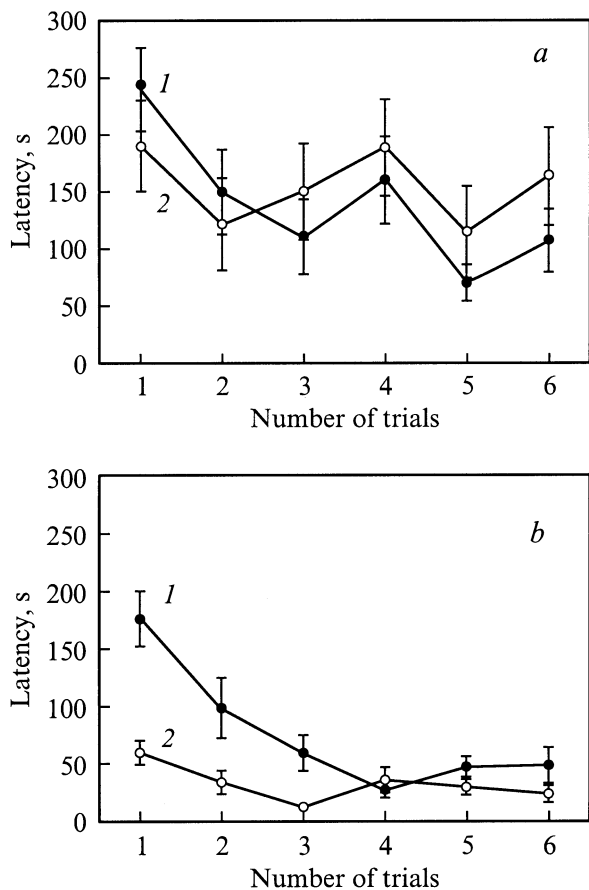
2. Хронические опыты выполнены на самцах крыс линии Вистар, массой 250–300 г. Пространственную память тестировали по модифицированной нами методике Морриса. Принцип метода Морриса заключается в том, что животное должно научиться находить невидимую платформу в бассейне, заполненном непрозрачной водой [9]. Помещение крысы в бассейн и время нахождения на платформе автоматически регистрировались на

самописце. Научение проводили в одном опытном сеансе из шести проб. Крысу помещали в один и тот же сектор бассейна. В первой пробе животное, пытаясь спастись из воды, случайно находило платформу. По внешним ориентирам, находящимся в лабораторной комнате, крысы за шесть проб научались находить платформу примерно в 10 раз быстрее, чем в первой пробе. Через 24 h такой же опыт повторяли. Во втором сеансе крысы находили платформу в 2–3 раза быстрее, чем в первом. Это показывало, что животные научились находить цель в пространстве и сохранили в памяти информацию о ее местоположении.

Нарушение памяти у крыс вызывали билатеральным введением в боковые желудочки мозга высокой дозы циклогексимида (400 μg), ингибитора синтеза белка на уровне трансляции, за 3 h до научения. При этом синтез белка в головном и спинном мозге подавлялся более чем на 90% в течение 4 h [10].

В работе использовался аддукт фуллерена C_{60} с поливинилпирролидоном (C_{60} /ПВП), синтезированный в Институте экспериментальной медицины РАМН. Содержание C_{60} в препарате составляло 0.8%, молекулярная масса ПВП — 10 000. Вещества разводили в 0.9% NaCl. С помощью стереотаксиса в боковые желудочки и дорзальный гиппокамп (поле CA1) билатерально вживляли канюли. В контроле ($n = 10$) в гиппокамп вводили раствор ПВА (208 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ /канюля), а в опыте ($n = 11$) — препарат фуллерена (1.7 μg C_{60} /206.3 μg ПВП/1 μl /канюля) за 1 h до инъекции циклогексимида (200 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ /канюля). Через 3 h после введения циклогексимида проводили научение. Положение канюль определяли на срезах гиппокампа, полученных на замораживающем микротоме. Статистическую значимость результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

3. В контроле при интрагиппокампальном введении ПВП крысы за шесть проб научались находить плат-



Влияние билатеральной инъекции в дорзальный гиппокамп (поле CA1) поливинилпирролидона (a) и аддукта C₆₀/ПВП (b) на нарушение памяти у крыс, вызванное внутрижелудочковым введением циклогексимида (ингибитор синтеза белка). Пространственную память изучали в водном лабиринте по модифицированной методике Морриса. По оси абсцисс — номер пробы в сеансе научения; по оси ординат — время реакции спасения из воды. 1 — первый сеанс научения, 2 — второй сеанс научения.

форму (различия времени реакции спасения из воды между пробами 1–3, 1–5 и 1–6 статистически значимы при $p < 0.05$). Второй сеанс научения, проведенный через 24 h, показал, что сохранения приобретенной информации не было (графики 1 и 2 статистически не различаются, см. рисунок, a).

В отличие от этого крысы, которым в гиппокамп вводили небольшую дозу фуллерена C₆₀ (1.7 μg), показали нормальное научение и сохранение приобретенного навыка (различия между кривыми 1 и 2 статистически значимы при $p < 0.01$, см. рисунок, b). Таким образом, предварительная билатеральная микроинъекция фуллерена C₆₀ в дорзальный гиппокамп предупреждала грубое нарушение пространственной памяти, вызванное циклогексимидом.

Как можно объяснить этот результат? Согласно современным представлениям, формирование долговременной памяти критически зависит от синтеза белка de novo,

обеспечивающих установление новых связей между нейронами [5]. Считается, что для нарушения формирования долговременной памяти необходимо применение высоких доз ингибиторов, вызывающих подавление синтеза белка не менее чем на 90% [6]. Циклогексимид в высоких дозах обладает токсическим эффектом и вызывает апоптоз в различных тканях, в том числе и в нервной [7,8]. Это позволило нам предположить, что ингибиторы синтеза белка вызывают амнезию не только путем подавления синтеза белка, но и в результате апоптоза и/или некроза клеток центральной нервной системы. Производные фуллеренов предупреждают апоптоз нейронов в культуре клеток гиппокампа, мозжечка и черной субстанции, защищая их от токсического действия активных форм кислорода [2,3,11,12].

Мы предполагаем, что микроинъекция фуллерена C₆₀ в гиппокамп предупреждает гибель его нейронов, и это может быть одним из существенных факторов, предотвращающих нарушение формирования долговременной памяти, вызванное подавлением синтеза белка. Однако возможны и другие механизмы действия, которые остаются неизвестными.

Список литературы

- [1] L.L. Dugan, D.M. Turetsky, Ch. Du, D. Lobner, M. Wheeler, C.R. Almlie, C.K.-F. Shen, T.-Y. Luh, D.W. Choi, T.S. Lin. PNAS **94**, 17, 9434 (1997).
- [2] A.M. Lin, B.Y. Chyi, S.D. Wang, H.H. Yu, P.P. Kanakamma, T.Y. Luh, C.K. Chou, L.T. Ho. J. Neurochem. **72**, 4, 1634 (1999).
- [3] J. Lotharius, L.L. Dugan, K.L. O'Malley. J. Neurosci. **15**, 19, 4, 1284 (1999).
- [4] H.S. Lin, T.S. Lin, R.S. Lai, T. D'Rosario, T.Y. Luh. Int. J. Radiat Biol. **77**, 2, 235 (2001).
- [5] B. Milner, E.R. Squire, E.R. Kandel. Neuron **20**, 2, 445 (1998).
- [6] H.P. Davis, L.R. Squire. Psychol. Bull. **96**, 3, 518 (1984).
- [7] S.K. Rehen, M.H. Varela, F.G. Freitas, M.O. Moraes, R. Linden. Development **122**, 5, 1439 (1996).
- [8] W.M. Blom, H.J. de Bony, I. Meijerman, G.J. Mulder, J.F. Nagelkerke. Biochem Pharmacol. **15**, 58, 1891 (1991).
- [9] R. Morris. J. Neurosci. Meth. **11**, 1, 47 (1984).
- [10] И.В. Щеглов, Е.В. Кондратьева, И.Я. Подольский. Нейрохимия **3**, в печати (2001).
- [11] M. Bisaglia, B. Natalini, R. Pellicciari, E. Straface, W. Malorni, D. Monti, C. Franceschi, G. Schettini. J. Neurochem. **74**, 3, 1197 (2000).
- [12] M.C. Tsai, Y.H. Chen, L.Y. Chiang. J. Pharm. Pharmacol. **49**, 4, 438 (1997).