

Возможный механизм противовоспалительного действия митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1: роль тучных клеток

М.А. Челомбитько¹, Т.В. Васильева¹, И.И. Галкин², А.В. Федоров¹, О.П. Ильинская¹

¹Кафедра клеточной биологии и гистологии (зав. Г.Е. Онищенко), Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

²Отдел математических методов в биологии (зав. А.В. Алексеевский) Институт Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова;

Адрес М.А. Челомбитько: 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12. Тел. +7-906-742-13-29. e-mail: atma69@yandex.ru.

В настоящей работе показано, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 способен подавлять дегрануляцию тучных клеток (ТК) *in vivo* и *in vitro*. Секретируя в процессе дегрануляции гистамин, ТК играют важнейшую роль в регуляции проницаемости сосудистой стенки. Снижение секреции гистамина под действием SkQ1 может играть ключевую роль в противовоспалительной активности этого антиоксиданта.

Here, we demonstrated that mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits mast cell (MCs) degranulation *in vivo* and *in vitro*. It is known that MCs play a crucial role in regulation of vascular permeability by secreting histamine. Suppression of histamine release from MC by SkQ1 might be a significant factor in the antiinflammatory activity of this antioxidant.

Введение

Для изучения роли митохондриальных активных форм кислорода в различных процессах используют митохондриально - направленные антиоксиданты. Одним из таких антиоксидантов является 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония бромид (SkQ1) [1]. Ранее на модели воспаления в подкожном «воздушном мешке» у мышей было показано противовоспалительное действие SkQ1, обусловленное снижением лейкоцитарной инфильтрации [2]. Важную роль в привлечении лейкоцитов в этой модели играют ТК стенки мешка [3]. В данной работе исследуется действие SkQ1 на ТК *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы

Первая часть работы выполнена на самцах мышей-гибридов первого поколения CBAxС57Bl/6 возрастом 18 месяцев. Контрольные животные ($n = 5$) получали 0,9% раствор NaCl, опытные ($n = 5$) – SkQ1 (предоставлен НИИ Митоинженерии МГУ) в 0,9% растворе NaCl в дозе 250 нмоль/кг массы тела. Все вещества в объеме 5 мл/кг вводили внутривнутрибрюшинно 1 раз в сутки в течение 7 дней от начала формирования «воздушного мешка». Для создания мешка мышам инъецировали 4 мл стерильного воздуха под кожу в межлопаточной области, на 4-ый день – еще 2 мл. На 7-ой день в подкожный мешок вводили 2 мл ФСБ с 5,4 mM ЭДТА, аспирировали содержимое, определяли число клеток в нем. Содержание гистамина в супернатанте и лизатах клеток из смыва подкожного мешка определяли по стандартной методике с помощью реакции с ортофталевым альдегидом («Sigma», США) [4]. Выявление ТК на гистологических срезах ткани стенки мешка проводили с помощью окрашивания 0,1% толуидиновым синим.

Вторая часть работы была выполнена на клетках базофильной лейкемии крыс линии RBL-2H3 (модель для изучения дегрануляции ТК). Клетки культивировали в среде α -MEM, содержащей 2 mM L-глутамин, 10% HI-FBS («ПанЭко», Россия) при 37° и 5% CO₂. Клетки (100 тыс/мл) рассаживали на 24-х и 48-луночных планшетах и после прикрепления добавляли раствор SkQ1 в концентрациях 0,2, 2,0, 20,0, 200,0 и 400,0 нМ. На 5-е сут стимулировали дегрануляцию клеток двумя способами: 1) добавляли 50 нМ форболовый эфир (PMA) («Sigma», США) и 1 мкМ кальциевый ионофор A23187 («Sigma», США) на 24 часа; 2) сенсibilизировали клетки действием 0,4 мкг/мл anti-DNP IgE («Sigma», США) в течение 16 часов с последующей антигенной стимуляцией с помощью 1 мкг/мл DNP-BSA («Molecular probes», США) в течение 18 мин. Оценку уровня дегрануляции проводили, определяя содержание β -гексозаминидазы по стандартной методике с помощью реакции с 4-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминидом («Sigma», США) [5].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 8.0. Для оценки статистической значимости отличий применяли двусторонний непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$, тенденцией считали отличия при $p < 0,1$.

Результаты и обсуждение

Исследование смыва из подкожного мешка у мышей опытной группы выявило значимое снижение содержания медиатора воспаления гистамина в 2 раза по сравнению с контрольной. Также выявлена тенденция к уменьшению числа клеток в 1,4

раза. Не было обнаружено разницы в числе ТК в ткани подкожного мешка у опытных мышей по сравнению с контрольными. Однако число дегранулирующих среди них было в 2 раза ниже, что коррелирует со снижением содержания гистамина. В сочетании с данными о важной роли ТК в развитии воспаления в модели «воздушного мешка» [3, 4], а также о снижении лейкоцитарной инфильтрации под влиянием SkQ1 [2] наши результаты указывают, что действие антиоксиданта на активацию ТК может опосредовать механизм его противовоспалительных свойств.

Чтобы оценить прямое воздействие SkQ1 на ТК, было исследовано его влияние на уровень дегрануляции модельных клеток RBL-2H3. В случае индукции дегрануляции совместным действием 1 мкМ A23187 и 50 нМ РМА наблюдалось ее подавление в 2 раза под влиянием 2 и 200 нМ SkQ1. При антигенной стимуляции дегрануляции наблюдалось ее значимое снижение на 20-30% при действии 0,2, 20 и 200 нМ SkQ1.

Сделан вывод, что снижение секреции гистамина ТК под действием SkQ1 может играть ключевую роль в противовоспалительной активности этого антиоксиданта.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №14-50-00029).

Список литературы

1. Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., et al. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: Synthesis and in vitro studies// *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. – Vol. 73. – P. 1273-1287.
2. Chelombitko M.A., Averina O.A., Vasilieva T.V. et al. Comparative effects of mitochondria-targeted antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium bromide and a fragment of its molecule dodecyltriphenylphosphonium on the carrageenan induced acute inflammation using an air pouch model in mice// *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2017. – Vol. 162 – P. 730-733.
3. García-ramallo E., Marques T., Prats N. et al. Resident Cell Chemokine Expression Serves as the Major Mechanism for Leukocyte Recruitment During Local Inflammation// *J Immunol.* – 2002. – Vol. 169. – P. 6467–6473.
4. Shore P.A., Burkhalter A., Cohn, V.H. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues// *J Pharmacol Exp Ther.* – 1959. – Vol. 127. – P. 182-186.
5. McShane M.P., Friedrichson T., Giner A. et al. A Combination of Screening and Computational Approaches for the Identification of Novel Compounds That Decrease Mast Cell Degranulation// *J Biomol Screen.* – 2015. – Vol. 20. – P. 720-728.

