

УДК 612.112.93;577.334

МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЙ АНТИОКСИДАНТ SkQ1 (10-(6'-ПЛАСТОХИНОНИЛ) ДЕЦИЛТРИФЕНИЛФОСФОНИЙ БРОМИД) ИНГИБИРУЕТ ДЕГРАДУЛЯЦИЮ ТУЧНЫХ КЛЕТОК *in vivo* И *in vitro*

© 2017 М.А. Челомбитко^{1*}, О.А. Аверина², Т.В. Васильева¹,
О.Ю. Плетюшкина³, Е.Н. Попова³, А.В. Федоров¹,
Б.В. Черняк³, В.С. Шишкина¹, О.П. Ильинская¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
биологический факультет, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: atma69@yandex.ru

² НИИ Митохондженирии, Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.08.17

После доработки 17.09.17

Ранее в экспериментальных моделях острого воспаления и репарации ран был показан терапевтический эффект митохондриально-направленного антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония бромида (SkQ1). Предполагается, что основной механизм противовоспалительного действия SkQ1 связан с его способностью подавлять воспалительную активацию эндотелия и проникновение нейтрофилов из сосудов в ткани. В данной работе показано, что SkQ1 способен подавлять активацию тучных клеток (ТК), ведущую к их дегрануляции и выбросу гистамина, в различных моделях *in vivo* и *in vitro*. В модели подкожного «воздушного мешка» при интраперитонеальном введении SkQ1 у мышей выявлена тенденция к уменьшению содержания лейкоцитов в смывах из полости мешка и значимое снижение содержания в них гистамина. Кроме того, обнаружено достоверное уменьшение степени дегрануляции ТК в стенках мешка. Непосредственное влияние SkQ1 на ТК исследовано *in vitro* на клетках линии базофильной лейкемии крыс RBL-2H3. В данной модели SkQ1 ингибировал индуцированную дегрануляцию клеток. Результат указывает на участие митохондриальных активных форм кислорода в процессе активации ТК. Поскольку, секретирова гистамин, ТК играют важнейшую роль в регуляции проницаемости сосудистой стенки, снижение степени их дегрануляции под действием SkQ1 может играть ключевую роль в противовоспалительной активности этого митохондриально-направленного антиоксиданта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: воспаление, тучная клетка, дегрануляция, гистамин, митохондриально-направленный антиоксидант.

Тучные клетки (ТК) составляют одну из важнейших клеточных популяций соединительной ткани. Они обеспечивают местный тканевой гомеостаз и выполняют множество различных функций: регулируют проницаемость стенки сосудов, свертываемость крови, участвуют в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета и аллергии [1–3]. Свойства ТК обусловлены широким спектром биологически активных веществ, нахо-

дящихся в их специфических гранулах, содержание которых высвобождается после активации клеток. ТК служат ключевыми инициаторами и регуляторами процесса воспаления, секретирова медиаторы воспаления, среди которых важнейшую роль играет гистамин. Гистамин вызывает увеличение проницаемости стенок сосудов и отек окружающих тканей, способствуя тем самым миграции лейкоцитов в область воспаления [4–6].

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; мтАФК – митохондриальные АФК; ТК – тучная клетка; ФНО – фактор некроза опухоли; anti-DNP IgE – мышинные моноклональные антитела изотипа IgE против динитрофенила; DNP-BSA – динитрофенил, связанный с бычьим сывороточным альбумином; РМА – форболовый эфир; RBL-2H3 – линия клеток базофильной лейкемии крыс; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний бромид; TGF-β1 – трансформирующий фактор роста β1.

* Адресат для корреспонденции.

Исследования последних лет показывают, что в различных аспектах физиологии ТК важную роль играют активные формы кислорода (АФК) [7–10]. Высвобождение медиаторов воспаления из гранул ТК после их активации как химическими агентами, так и физиологическими стимулами, сопровождается генерацией АФК [10, 11]. Однако данные об источниках АФК и их роли во внутриклеточном сигналинге ТК до сих пор мало изучены [10]. Известно, что одним из таких источников в клетках служат митохондрии. Для изучения роли митохондриальных АФК (мтАФК) во внутриклеточном сигналинге используют митохондриально-направленные антиоксиданты, которые избирательно накапливаются в митохондриях, благодаря остатку мембранофильного катиона. Одним из наиболее изученных митохондриально-направленных антиоксидантов является 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония бромид (SkQ1) [12].

SkQ1 оказывает терапевтическое действие в ряде моделей заболеваний, ассоциированных с острым или хроническим воспалением [13–21]. Показано, что SkQ1 предотвращает гибель мышечной ткани, вызванную внутривенным введением летальной дозы фактора некроза опухоли (ФНО) [22]. Это модель отчасти воспроизводит синдром системного воспалительного ответа, который является одной из основных причин летальности в отделениях интенсивной терапии [23]. Данный антиоксидант ускоряет заживление полнослойных кожных ран у старых и диабетических мышей, во многом благодаря ускоренному разрешению воспалительной фазы раневого процесса [16, 19]. Близкий аналог SkQ1, отличающийся лишь катионной частью, SkQR1 предотвращает развитие пиелонефрита в мышечной модели [15], а также оказывает терапевтическое действие при ишемическом поражении почек и мозга [24, 25]. Длительный прием SkQ1 существенно подавлял воспалительную активацию эндотелия (экспрессию молекул адгезии) в аортах старых мышей [20], что указывает на важную роль мтАФК в хроническом воспалении. В экспериментах *in vitro* в культуре эндотелиальных клеток SkQ1 подавлял вызванную ФНО экспрессию молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1, а также E-селектина, что, в свою очередь, приводило к снижению адгезии нейтрофилов к эндотелиальному монослою [20]. В этой модели SkQ1 также снижал секрецию провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 [20], предотвращал разборку межклеточных контактов [21, 22, 26], а также апоптоз [27]. Предполагается, что подавление чрезмерной активации эндотелия сосудов лежит в основе противовоспалительного действия SkQ1. Наряду с этим было ус-

тановлено, что SkQ1 подавляет активацию нейтрофилов под действием *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (fMLP), пептида характерного для белков бактериальной стенки. В этих клетках мтАФК оказались критичны для их дегрануляции и активации NADPH-оксидазы, которая служит основным источником АФК, определяющим бактерицидное действие нейтрофилов [28].

Для дальнейшего изучения противовоспалительного действия SkQ1 мы использовали модель каррагинан-индуцированного воспаления в подкожном «воздушном мешке» у мышей. Известно, что в этой модели основную роль в привлечении лейкоцитов в область воспаления играют цитокины, вырабатываемые, в основном, макрофагами, фибробластами и ТК, расположенными в стенке кожного мешка [29]. Под влиянием каррагинана в тканях мешка увеличивается число ТК и усиливается их дегрануляция [30]. Индукция каррагинанового воспаления у мышей линии WBC6F1/J-SI/ SI(d), дефицитных по ТК, приводила к значительному (на 40%) снижению количества лейкоцитов в экссудате [31]. Наши исследования на этой модели показали, что SkQ1 существенно уменьшает число клеток в экссудате [21]. В данной работе было изучено влияние SkQ1 на содержание и состояние ТК в стенках мешка, а также концентрацию гистамина и количество клеток в смывах из полости подкожного мешка в отсутствие провоспалительной стимуляции каррагинаном. Непосредственное влияние SkQ1 на ТК было исследовано *in vitro* на клетках базофильной лейкемии крыс линии RBL-2H3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты, выполненные *in vivo*, проведены на самцах мышей-гибридов первого поколения CBAxС57Bl/6. Животные были любезно предоставлены сотрудниками виварно-экспериментального комплекса НИИ митоинженерии МГУ. Все процедуры проводили в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (FELASA). Травматичные для мышей манипуляции проводили, используя золотильный наркоз (Virbac, 40 мг/кг массы тела).

10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония бромид – SkQ1 был любезно предоставлен НИИ митоинженерии МГУ.

Влияние SkQ1 на популяцию ТК в модели подкожного «воздушного мешка» при интраперитонеальном введении. Работа выполнена на мышцах

возрастом 18 месяцев. Контрольные животные ($n = 5$) получали 0,9%-ный раствор NaCl (физраствор), опытные ($n = 5$) – SkQ1 в физрастворе в дозе 250 нмоль/кг массы тела. Все вещества в объеме 5 мл/кг вводили внутривнутрибрюшинно один раз в сутки в течение 7 дней от начала формирования подкожного «воздушного мешка». Для создания мешка мышам инъецировали 4 мл стерильного воздуха под кожу в межлопаточной области, а через 4 дня – еще 2 мл [32]. На 7-й день мышей выводили из эксперимента. В подкожный мешок вводили 2 мл ФСБ с 5,4 мМ ЭДТА и затем аспирировали содержимое, определяли его объем и число клеток в нем с помощью камеры Горяева. Для определения внутриклеточного содержания гистамина после центрифугирования смыва из мешка (5 мин при 1100 г (r_{cp} 8 см) и 4 °С) клеточный осадок лизировали путем добавления 250 мкл 0,1%-ного раствора Triton на ФСБ с последующей инкубацией 15 мин при 37 °С. Для определения содержания гистамина в жидкой фазе пробы, полученные после лизирования клеток, центрифугировали с ускорением 4390 г (r_{cp} 8 см) в течение 7 мин при 4 °С.

Выявление ТК в содержимом полости мешка проводили на высушенных мазках после фиксации 1%-ном формалином и окрашивания 0,1%-ном толуидиновым синим по наличию в них специфических метакроматически окрашенных гранул. Подсчет ТК проводили на 1000 клеток, используя микроскоп Leica DM1000.

Определение содержания гистамина в супернатанте и лизате клеток проводили с помощью реакции с ортофталевым альдегидом по стандартной методике [33]. Из каждой пробы отбирали по 100 мкл в 96-луночный планшет, добавляли по 20 мкл 1 М NaOH, а затем 5 мкл 1%-ного раствора ортофталевого альдегида («Sigma», США). Флуорофор, образовавшийся в результате реакции, стабилизировали 3 М HCl. Для калибровочной кривой готовили стандартные разведения гистамина («Sigma») от 500 до 1,95 нг/мл. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре «Thermo Fluoroscan Ascent» при 460 нм (длина волны возбуждения 355 нм).

Для гистологического изучения кожу стенок «воздушного мешка» иссекали сразу после забора смыва из мешка. Полученный кожный лоскут фиксировали 10%-ным формалином на ФСБ в течение 24 ч, подвергали рутинной гистологической обработке и помещали в парафин. Готовили поперечные гистологические срезы толщиной 4 мкм. ТК выявляли после окрашивания срезов 0,1%-ным водным раствором толуидинового синего. Подсчет клеток проводили в области наружной (верхней) стенки воздушного мешка в 20 полях зрения (10 – для дермы и 10 – для

субдермального слоя), используя объектив $\times 40$. Для оценки функционального состояния популяции ТК выделяли следующие их виды: «темные» клетки – плотно заполненные метакроматическими гранулами, отдельные гранулы плохо различимы; «светлые» клетки – рыхло заполненные хорошо различимыми гранулами (рис. 1). Определение соотношения этих двух типов ТК проводили на основании подсчета 100 ТК, используя объектив $\times 100$. Также подсчитывали процент дегранулирующих ТК, вокруг которых располагались метакроматические гранулы.

Влияние интраперитонеального введения SkQ1 на популяцию перитонеальных ТК. Исследование выполнено на мышах возрастом 16 недель ($n = 22$).

В первой части работы мыши опытной группы ($n = 4$) за 6 ч до выведения животных из эксперимента и выделения клеток перитонеальной жидкости получили путем интраперитонеальной инъекции SkQ1 в физрастворе в дозе 250 нмоль/кг, а животные контрольной группы ($n = 3$) – физраствор, не содержащий антиоксиданта, объемом 5 мл/кг.

Для второй части исследования животные также были разделены на 2 группы: мыши опытной группы ($n = 8$) в течение 7 сут ежедневно получали путем интраперитонеальных инъекций SkQ1 в физрастворе в дозе 250 нмоль/кг, а животные контрольной группы ($n = 7$) – физраствор в том же объеме (5 мл/кг). На 8-е сут животных выводили из эксперимента. Для выделения клеток из перитонеальной жидкости мышам после эвтаназии внутривнутрибрюшинно вводили 5 мл ФСБ с 5,4 мМ ЭДТА. После массажа брюшной стенки ее надрезали, собирали жидкость, определяли ее объем и содержание клеток в камере Горяева, готовили мазки, на которых проводили подсчет ТК после фиксации 1%-ным формалином и окрашивания толуидиновым синим.

Определение содержания гистамина в жидкой фазе перитонеального смыва и лизатах клеток проводили с помощью реакции с ортофталевым альдегидом по методике, указанной выше для клеток полости подкожного мешка.

Влияние SkQ1 на дегрануляцию клеток линии RBL-2H3. В данной части исследования поставлена задача выяснить, оказывает ли антиоксидант SkQ1 непосредственное воздействие на функциональную активность ТК, о чем, в первую очередь, может свидетельствовать изменение их способности к дегрануляции. В качестве клеточной модели ТК были использованы клетки линии RBL-2H3 (любезно предоставлены сотрудником лаборатории клеточной биологии ИБР им. Н.К. Кольцова РАН Киселевой Е.В.). Данная коммерческая линия клеток, близких по функциональным характеристикам ТК, получе-

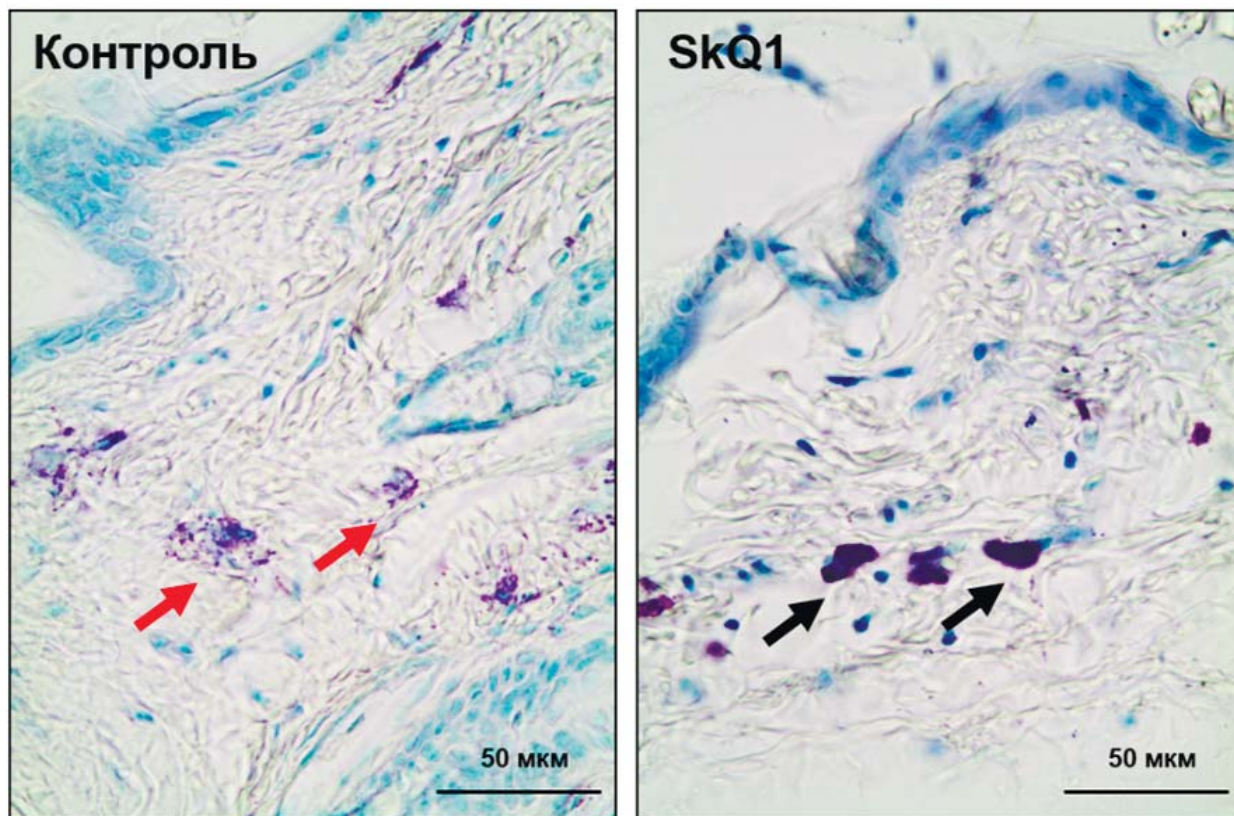


Рис. 1. Гистологические срезы стенок подкожного «воздушного мешка» у контрольных (получали физраствор) и опытных (получали SkQ1) мышей. Окраска толуидиновым синим, стрелками обозначены ТК с характерными метахроматическими гранулами, видны «темные» (черные стрелки) и «светлые» (красные стрелки) ТК

на из периферической крови крыс Вистар с химически индуцированной базофильной лейкемией и широко используется в качестве экспериментальной модели для изучения механизмов активации ТК и базофилов [34].

Культивирование и активацию клеток линии RBL-2H3 проводили в культуральных флаконах на среде α -MEM, содержащей 2 мМ L-глутамин, 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (HI-FBS) («ПанЭко», Россия). Клетки пассировали раз в три дня с кратностью пассажа 1 : 4–1 : 8. Для эксперимента клетки рассаживали на 24- и 48-луночных планшетах в концентрации 100 тыс кл/мл. После прикрепления клеток к пластику в среду культивирования добавляли раствор SkQ1 в конечных концентрациях 0,2, 2,0, 20,0, 200,0 и 400,0 нМ. Клетки росли в инкубаторе в течение 4 сут при 37 °С и 5%-ной CO₂. Дегрануляцию ТК вызывали двумя различными способами. В первом эксперименте в среду культивирования добавляли на 5-е сут на 24 ч смесь, содержащую 50 нМ форболового эфира (PMA) («Sigma») и 1 мкМ кальциевого ионофора A23187 («Sigma»). Во втором случае на 5-е сут предварительно прово-

дили сенсibilизацию клеток в среде, содержащей 0,4 мкг/мл anti-DNP IgE (мышинные моноклональные антитела изотипа IgE против динитрофенила) («Sigma») в течение 16 ч с последующей отмывкой и активацией клеток в буфере Тирод (135 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 20 мМ HEPES, 1,8 мМ CaCl₂, 1,0 мМ MgCl₂, 6 мМ глюкоза, 1 мг/мл BSA, pH 7,4), содержавшего 0,1 мкг/мл DNP-BSA (динитрофенил-бычий сывороточный альбумин) («Molecular probes», США) в течение 18 мин [35]. За 4 ч перед экспериментом среду культивирования заменяли на бессывороточную (в случае стимуляции клеток PMA и кальциевым ионофором A23187) или на свежую среду (в случае сенсibilизации клеток anti-DNP IgE с последующей стимуляцией DNP-BSA).

Оценку уровня дегрануляции активированных клеток линии RBL-2H3 проводили, выявляя активность β -гексозаминазы, которую измеряли в кондиционированной среде и лизате клеток по высвобождению *p*-нитрофенола из 4-нитрофенил-*N*-ацетил- β -D-глюкозаминида (субстрат) («Sigma») по стандартной методике [36]. После активации дегрануляции проводили забор среды культивирования. Клетки лизировали путем

добавления равного по объему количества 0,1%-ного раствора Triton в среде без сыворотки или в буфере Тирода и инкубировали 15 мин при 37 °С. Кондиционированную среду центрифугировали в течение 5 мин при 4390 g (r_{cp} 8 см) и 4 °С. В собранных пробах супернатанта после внесения раствора субстрата определяли содержание β -гексозаминидазы. Реакцию останавливали через 2 ч добавлением 0,2 М буфера глицин-NaOH. Свето-поглощение готовых проб измеряли на спектрофотометре «iMARK Microplate Reader» при длине волны 410 нм. Относительное содержание (%) β -гексозаминидазы в пробе определяли по формуле $A/(A + B) \times 100\%$, где А – оптическая плотность кондиционированной среды, В – оптическая плотность лизата клеток.

Для оценки цитотоксического действия антиоксиданта SkQ1 использовали МТТ-тест. Клетки линии RBL-2H3 рассаживали на 96-луночные планшеты в концентрации 100 тыс. в мл среды. После прикрепления клеток к пластику в среду культивирования добавляли раствор SkQ1 в концентрациях от 0,02, до 2000 нМ. Клетки росли в инкубаторе при 37 °С и 5%-ной CO_2 в течение 4 сут. На 5-е сут к клеткам добавляли 20 мкл МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) («СНЕМ-IMPEX INT'L INC», США) в концентрации 5 мг/мл и инкубировали 3 ч при 37 °С и 5%-ной CO_2 . Преципитат растворяли в 100 мкл DMSO. Свето-поглощение готовых проб измеряли на спектрофотометре «iMARK Microplate Reader» при длине волны 540 нм.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 8.0, построение графиков – программы GraphPad Prism6. Для оценки статистической значимости отличий применяли двусторонний непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$, тенденцией считали отличия при $p < 0,1$. Данные на всех графиках представлены в виде медианного значения, верхней и нижней квартилей (в ряде случаев интерквартильным размахом), а также максимальных и минимальных значений по выборке (в ряде случаев не представлены).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние SkQ1 на популяцию ТК в модели «воздушного мешка» при интраперитонеальном введении. Как было отмечено ранее, ТК играют ведущую роль в формировании воспалительного экссудата, в частности, в модели каррагинан-индуцированного воспаления в «воздушном мешке» у мышей. При этом показано, что струк-

тура кожной стенки мешка во многом определяет характер воспалительного ответа на вводимый ирритант [29]. Ранее нами были получены данные о том, что SkQ1 в условиях острого воспаления, вызванного каррагинаном, существенно уменьшает число клеток в воспалительном экссудате подкожного «воздушного мешка» у мышей [21]. Исходя из этого, мы предположили, что одним из механизмов, объясняющих противовоспалительный эффект SkQ1, может быть его влияние на ТК стенки мешка. Для проверки этой гипотезы, мы исследовали влияние SkQ1 на активацию ТК стенки мешка в отсутствии стимуляции каррагинаном.

Исследование смыва из подкожного мешка у мышей опытной группы, получавшей SkQ1, по сравнению с контрольной выявило тенденцию к уменьшению абсолютного числа клеток в нем в 1,4 раза ($p = 0,08$) (рис. 2, а). Морфологический анализ экссудата показал присутствие нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов/макрофагов, а также небольшого количества эритроцитов и тромбоцитов. ТК не были обнаружены ни в опытной, ни контрольной группах.

Результаты определения содержания гистамина в супернатанте смыва из мешка показали, что его количество у мышей опытной группы в два раза ниже ($p = 0,02$), чем у контрольных животных (рис. 2, б), что, очевидно, было связано со снижением дегрануляции ТК в стенке мешка, о чем будет сказано далее. Гистамин также был выявлен, хотя и в незначительном количестве, в лизатах клеток (рис. 2, в). Это можно объяснить как способностью нейтрофилов и макрофагов фагоцитировать гистамин-содержащие гранулы ТК [37], так и способностью тромбоцитов его синтезировать [38]. При этом содержание гистамина в лизатах клеток контрольной и опытной групп не различалось (рис. 2, в).

Подсчет ТК на гистологических срезах в стенке мешка не выявил значимой разницы в их числе у опытной и контрольной групп мышей (рис. 2, г), однако число «темных» ТК, плотно заполненных метахроматическими гранулами, в которых отдельные гранулы плохо различимы, в опытной группе было значимо больше, а число «светлых», рыхло заполненных хорошо различимыми гранулами, соответственно, меньше, чем в группе контроля ($p = 0,01$) (рис. 2, д). Однако число дегранулирующих ТК, вокруг которых располагались метахроматические гранулы, у опытных животных было в два раза ниже по сравнению с контрольными ($p = 0,04$) (рис. 2, е).

Полученные данные показывают, что ежедневное внутрибрюшинное введение SkQ1 в дозе 250 нмоль/кг в течение 7 сут не влияет на количество ТК в стенке подкожного «воздушного

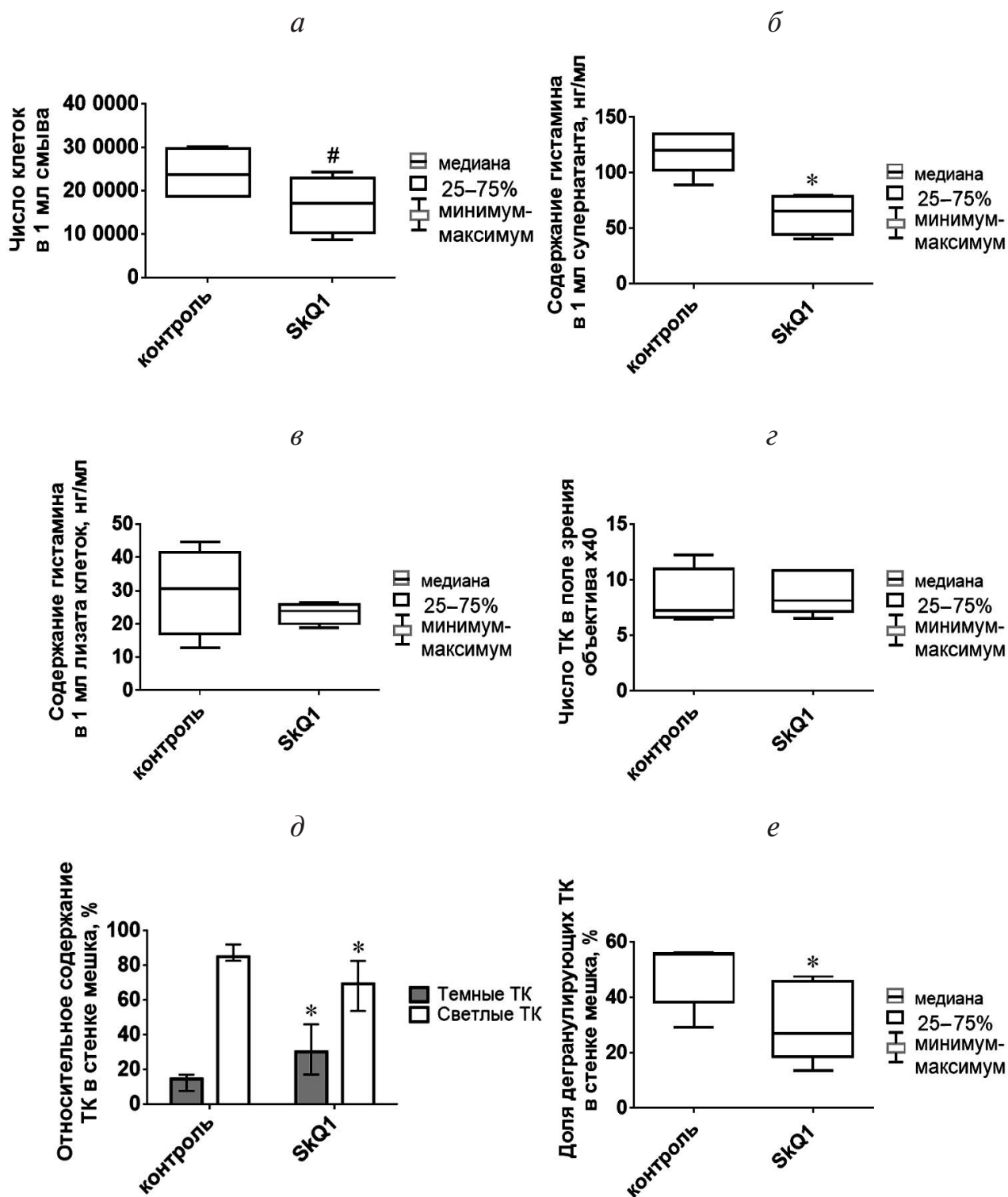


Рис. 2. Сравнение содержания клеток и гистамина в смыве из «воздушного» подкожного мешка, а также оценка состояния популяции ТК в стенке мешка у контрольных (получали физраствор, $n = 5$) и опытных (получали SkQ1, $n = 5$) мышей. Сравнение показателей численности клеток в 1 мл смыва: *а* – абсолютное число клеток. Сравнение показателей содержания гистамина: *б* – содержание гистамина в 1 мл супернатанта; *в* – содержание гистамина в лизате клеток. Сравнение показателей численности ТК в стенке мешка: *г* – число ТК; *д* – процентное содержание темных и светлых ТК; *е* – доля (в процентах) дегранулирующих ТК. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$), решеткой – тенденция к отличию ($p < 0,1$). Данные на графике 2, *д* представлены в виде медианного значения и интерквартильного размаха

мешка» у мышей, но заметно подавляет их дегрануляцию, что приводит к снижению уровня гистамина и числа лейкоцитов в полости «воздушного мешка».

Влияние интраперитонеального введения SkQ1 на популяцию перитонеальных ТК. В представленных здесь экспериментах на «воздушных мешках», как и в некоторых других моделях *in vivo* [15, 21, 22] SkQ1 вводили интраперитонеально в дозе 250 нмоль/кг массы тела и его расчетная концентрация в момент введения составляла ~44 мкМ с учетом количества введенного вещества (10 нмоль), объема введения (200 мкл) и среднего объема перитонеальной жидкости (~20 мкл) [39]. Через 6 ч после введения SkQ1 наблюдалось небольшое повышение уровня гистамина в перитонеальной жидкости (рис. 3, а), которое могло быть как результатом дегрануляции ТК, так и, возможно, результатом их гибели от токсического воздействия локально высокой для них дозы антиоксиданта. Однако достоверного снижения содержания гистамина в лизатах клеток у опытных мышей обнаружено не было, возможно, из-за недостаточности выборки (рис. 3, б). На 8-е сут после введения SkQ1 (после семи ежедневных инъекций) число зрелых (содержащих метакроматические гранулы) ТК в брюшной полости значительно снижалось ($p = 0,006$) (рис. 4, б). Одновременно снижалось и содержание гистамина в лизатах перитонеальных клеток ($p = 0,002$) (рис. 4, в). При этом не было обнаружено значимых отличий по показателям содержания гистамина, приходящегося на одну ТК (рис. 4, г), а также в супернатанте перитонеального смыва (рис. 4, д).

Популяция клеток перитонеальной жидкости животных, в том числе мышей, характеризуется постоянным наличием небольшого числа

ТК наряду с лейкоцитами [40]. В нашем эксперименте ТК составляли, в среднем, 2,3% от общей популяции клеток у контрольных животных, поэтому снижение их числа у опытных мышей слабо отразилось на общем количестве клеток в перитонеальных смывах (рис. 4, а).

Таким образом, внутрибрюшинное введение SkQ1 в высокой концентрации не приводит к заметному снижению общего объема клеточной перитонеальной жидкости, но оказывает селективное воздействие на субпопуляцию ТК.

Влияние SkQ1 на дегрануляцию клеток линии RBL-2H3. Чтобы проверить может ли наблюдаемое *in vivo* подавление дегрануляции ТК быть результатом прямого воздействия на них SkQ1, было исследовано влияние антиоксиданта на уровень спонтанной и индуцированной дегрануляции клеток базофильной лейкемии крыс линии RBL-2H3. Эти клетки являются общепринятой моделью для изучения активации ТК. Сигнальные механизмы, определяющие дегрануляцию, и содержимое секреторных гранул в клетках RBL-2H3 практически идентичны тем, что наблюдаются в первичных ТК и базофилах [41]. Фермент β -гексозаминидаза, который использовали в качестве маркера дегрануляции содержится в тех же секреторных гранулах, что и гистамин.

Перед экспериментом была проведена оценка цитотоксичности различных концентраций SkQ1. Оказалось, что SkQ1 значительно снижает жизнеспособность клеток в концентрациях 800 нМ и выше (рис. 5). Исходя из этого, в экспериментах по изучению влияния SkQ1 на дегрануляцию клеток RBL-2H3 исследовалось действие антиоксиданта в диапазоне концентраций, не оказывающих цитотоксического эффекта.

Исследование спонтанной дегрануляции клеток RBL-2H3 не выявило значимых эффектов SkQ1

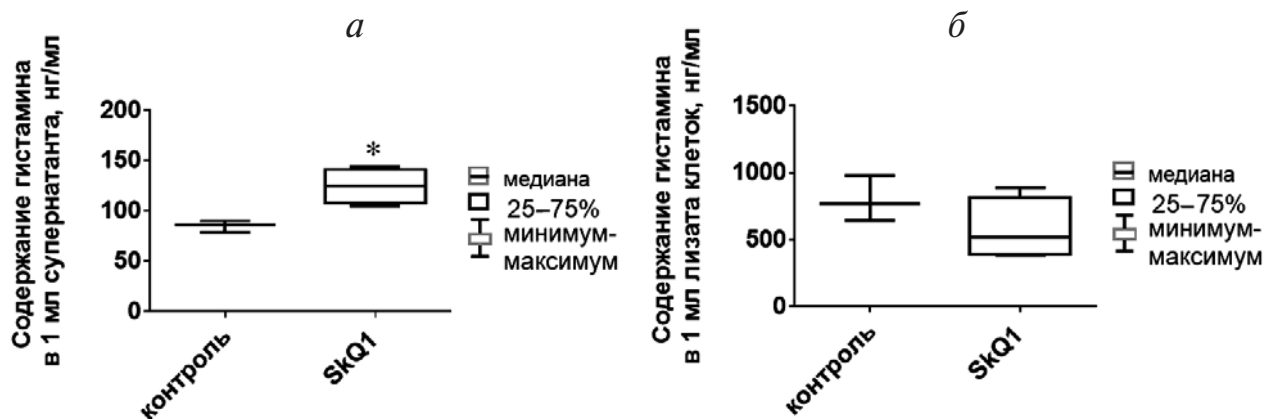


Рис. 3. Сравнение содержания гистамина в перитонеальном смыве у контрольных (получили физраствор, $n = 3$) и опытных (получили SkQ1, $n = 4$) мышей через 6 ч после однократной интраперитонеальной инъекции: а – содержание гистамина в 1 мл супернатанта; б – содержание гистамина в лизате перитонеальных клеток. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

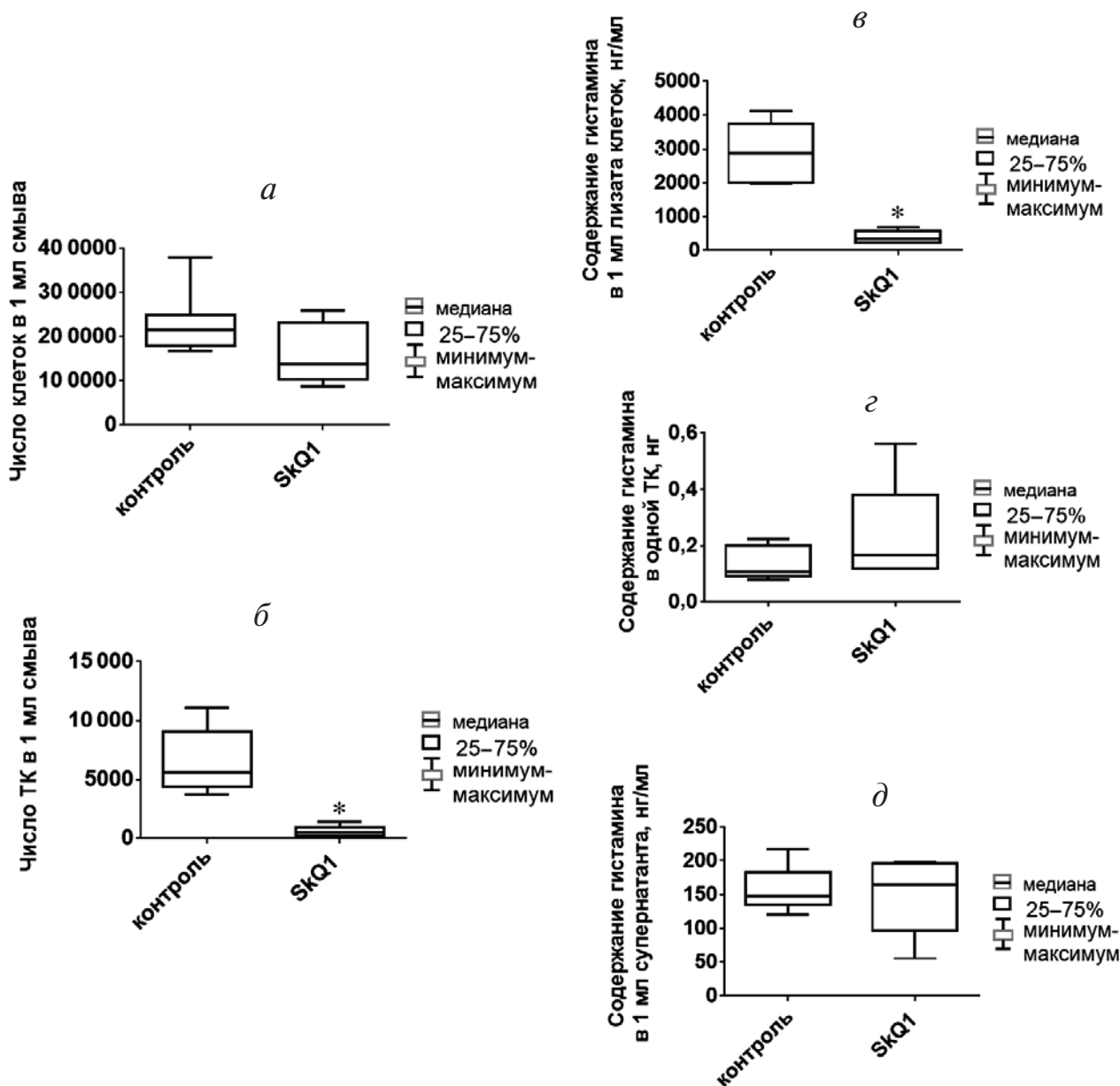


Рис. 4. Сравнение содержания абсолютного числа клеток, ТК и гистамина в перитонеальном смыве у контрольных (получали физраствор, $n = 7$) и опытных (получали SkQ1, $n = 8$) мышей на 8-е сут после семи ежедневных интраперитонеальных инъекций. Сравнение показателей численности клеток: *a* – общее число клеток в 1 мл смыва; *б* – содержание ТК в 1 мл смыва. Сравнение показателей содержания гистамина: *в* – содержание гистамина в лизате перитонеальных клеток; *г* – среднее содержание гистамина в одной ТК; *д* – содержание гистамина в 1 мл супернатанта. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

в концентрациях от 0,2 нМ до 400 нМ (рис. 6, *a*). Однако в случае дегрануляции, индуцированной при совместном воздействии 1 мкМ кальциевого ионофора A23187 и 50 нМ форболового эфира (PMA) наблюдалось ее двухкратное подавление под действием 2 и 200 нМ SkQ1 (рис. 6, *б*). При антигенной стимуляции дегрануляции, включающей в себя этап сенсибилизации клеток под действием anti-DNP IgE с последующей активацией с помощью DNP-BSA, наблюдалось

значимое снижение дегрануляции на 20–30% под влиянием 0,2, 20 и 200 нМ SkQ1 (рис. 6, *в*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение противовоспалительного действия митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 в модели подкожного «воздушного

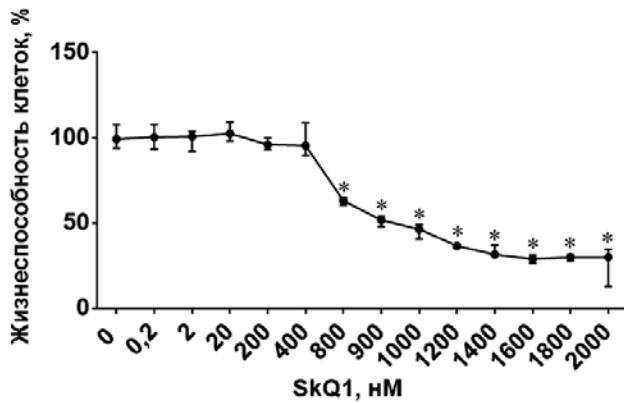


Рис. 5. Оценка цитотоксического эффекта различных концентраций SkQ1, $n = 3$. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$). Данные на графике представлены медианой и интерквартильным размахом

мешка» у мышей показало, что в результате интраперитонеального введения SkQ1 наблюдается тенденция к снижению содержания суммарной численности клеток (нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов/макрофагов) в полости мешка (рис. 2, а). Эти результаты согласуются с нашими данными о том, что SkQ1 подавляет острое воспаление, вызванное введением в «воздушный мешок» каррагинана [21]. Мы обнаружили, что SkQ1 не влияет на число ТК в стенке мешка, однако снижает степень их дегрануляции и концентрацию гистамина в экссудате (рис. 2, б). В сочетании с литературными данными о важной роли ТК в развитии каррагинан-зависимого воспаления в модели «воздушного мешка» [30, 31], наши результаты указывают на то, что влияние SkQ1 на активацию ТК может быть одним

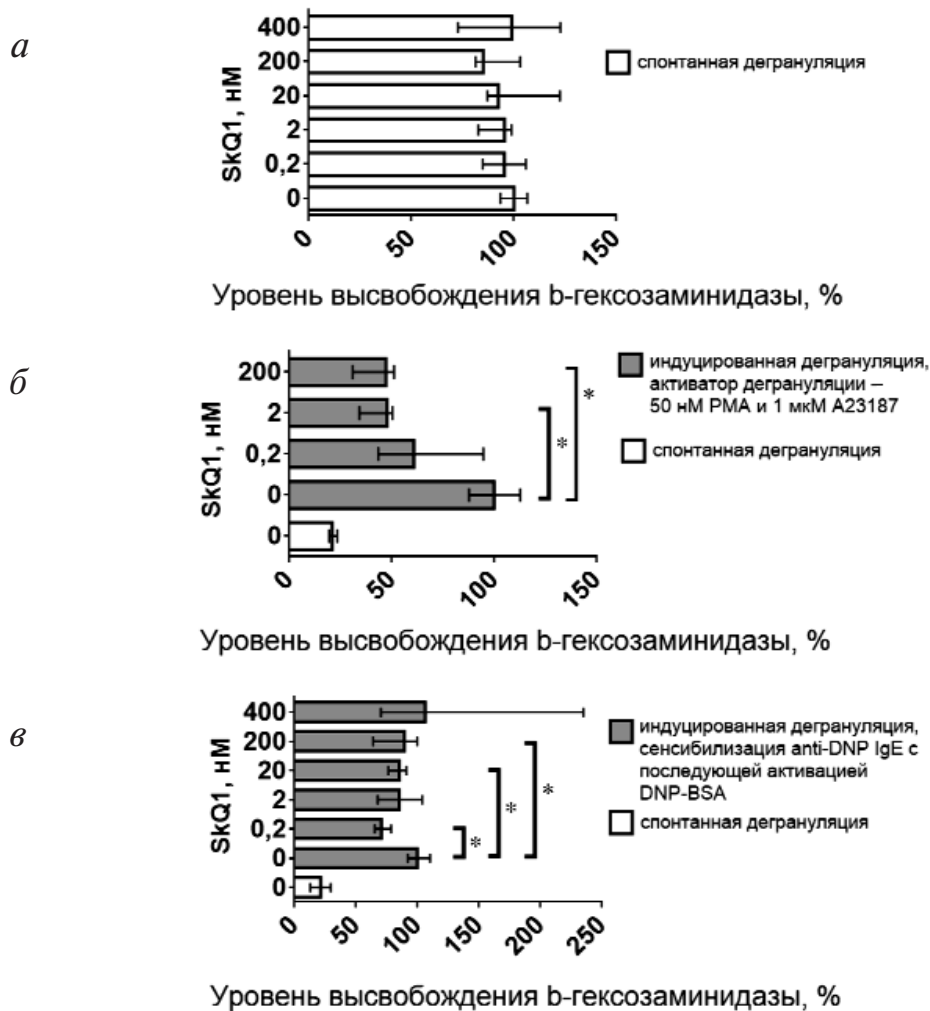


Рис. 6. Влияние различных концентраций SkQ1 на уровень спонтанной (а) и индуцированной (б, в) дегрануляции клеток линии RBL-2H3 ($n = 3$) под действием следующих агентов: смесь 50 нМ PMA и 1 мкМ A23187 в течение 24 ч (б); 0,4 мкг/мл anti-DNP IgE в течение 16 ч и 0,1 мкг/мл DNP-BSA в течение 18 мин (в). Линиями со звездочкой отмечены достоверные отличия между показателями уровня дегрануляции ($p < 0,05$). Данные на графиках представлены медианой и интерквартильным размахом

из механизмов его противовоспалительного действия.

По данным, накопленным на сегодняшний день, внутрибрюшинное введение SkQ1 и его аналогов оказывает значимый терапевтический эффект в моделях различных патологий, связанных с острым и хроническим воспалением [14–25]. Использованные в данной работе дозы и способ введения SkQ1 были выбраны на основании предшествующих исследований [15, 21, 22]. Однако при такой схеме введения, возможно, создается высокая локальная концентрация SkQ1 в перитонеальной полости, что может сказаться на состоянии популяции клеток, населяющих ее, а также брюшины. Наши данные показали, что введение SkQ1 мало меняет общую численность клеток в перитонеальной полости, но резко снижает в ней содержание зрелых ТК (рис. 4, б). Нельзя исключать возможности, что ТК избирательно более чувствительны к возможному токсическому действию SkQ1 по сравнению с лейкоцитами.

При этом мы наблюдали увеличение содержания гистамина в перитонеальном смыве через 6 ч после однократного внутрибрюшинного введения SkQ1 (рис. 3, а), а также снижение числа зрелых перитонеальных ТК через 7 сут с ежедневными инъекциями SkQ1 в перитонеальную полость (рис. 4, б). Это может свидетельствовать о том, что внутрибрюшинное введение антиоксиданта в дозе 250 нмоль/кг ведет к дегрануляции перитонеальных ТК и/или к их гибели, что в итоге приводит к опустошению пула зрелых ТК. При этом отсутствие зрелых, то есть способных к дегрануляции перитонеальных ТК, по данным ряда исследований, может оказывать положительное влияние на воспалительный процесс в перитонеальной полости, приводя к снижению лейкоцитарной инфильтрации [42] и уменьшению уровня ряда провоспалительных цитокинов и хемокинов, в частности ФНО [43]. Помимо этого, имеются сведения, что отсутствие перитонеальных ТК ведет к повышению уровня выживаемости в модели бактериального сепсиса у мышей [44].

Однако стоит отметить, что снижение численности перитонеальных ТК, по-видимому, не может объяснять противовоспалительные свойства SkQ1, наблюдаемые в различных моделях, не связанных с инициацией воспалительных процессов в брюшной полости. Поскольку в ряде работ подавление нейтрофильной инфильтрации в ране под действием SkQ1 наблюдалось при длительном пероральном введении [16, 19], при подкожных инъекциях [14] и при введении в составе раневых покрытий (данные не опубликованы). Эти способы введения не создают вы-

сокой локальной концентрации антиоксиданта в перитонеальной полости и, как следствие, вероятно, практически не влияют на численность перитонеальных ТК. Несмотря на это, а также на отсутствие заметных побочных эффектов после внутрибрюшинных инъекций SkQ1 и его аналогов, способность SkQ1 уменьшать число зрелых перитонеальных ТК (а, возможно, и клеток каких-то других субпопуляций перитонеальной жидкости) необходимо учитывать при выборе способа введения антиоксиданта.

Эффекты, наблюдаемые в исследовании по изучению влияния внутрибрюшинного введения SkQ1 на популяцию перитонеальных ТК, могут быть вызваны влиянием антиоксиданта непосредственно на жизнеспособность ТК. С этой гипотезой согласуются как результаты нашего исследования *in vitro* о том, что концентрации SkQ1 выше 800 нМ оказывают цитотоксическое действие на клетки базофильной лейкемии крыс линии RBL-2H3, так и известные из литературы данные о том, что АФК играют важную роль в поддержании жизнеспособности ТК [7–9]. Также SkQ1 может влиять на выработку другими клетками перитонеального экссудата и брюшины регуляторных факторов, необходимых для поддержания жизнеспособности ТК. Так, например, известно, что TGF- β 1, вырабатываемый фибробластами может снижать жизнеспособность ТК *in vivo* [45]. В то же время показано, что SkQ1 усиливает синтез активного TGF- β 1 фибробластами *in vitro* [13]. Также полученные нами результаты могут быть связаны с усилением дегрануляции перитонеальных ТК под влиянием высокой дозы SkQ1. Такое объяснение согласуется с данными о возможном прооксидантном действии высоких концентраций SkQ1 [12] и результатами, показывающими, что индуцированный оксидативный стресс может вызывать дегрануляцию ТК [46]. Возможно, что антиоксидант SkQ1, вводимый непосредственно в перитонеальную полость, оказывает прямое воздействие на клетки, мигрирующие в нее из крови. Известно, что миграция и созревание предшественников ТК занимает достаточно длительное время. Так, например, после лизиса перитонеальных клеток крыс дистиллированной водой небольшое количество незрелых предшественников ТК без метахроматических гранул в перитонеальной полости появляется через два дня. Более зрелые ТК с гранулами появляются на 6-й день, а восстановление популяции зрелых ТК происходит лишь к 10 сут после воздействия [47] и даже позднее [44]. В связи с этим, можно предположить, что SkQ1 может оказывать регулирующее воздействие на миграцию клеток перитонеальной жидкости, в част-

ности, ТК. Для этого необходимы дальнейшие эксперименты, в которых будет исследована динамика восстановления популяции ТК после воздействия SkQ1.

Для исследования непосредственного действия SkQ1 на ТК были использованы клетки базофильной лейкемии крыс линии RBL-2H3. SkQ1 в концентрациях от 0,2 нМ до 400 нМ не влиял на спонтанную дегрануляцию этих клеток (рис. 6, а), но ингибировал дегрануляцию, стимулированную при совместном воздействии кальциевого ионофора A23187 и форболового эфира (PMA) (рис. 6, б). При активации клеток DNP-BSA, предварительно сенсibilизированных anti-DNP IgE, SkQ1 также подавлял дегрануляцию в широком диапазоне концентраций (рис. 6, в). Увеличение концентрации SkQ1 свыше 800 нМ приводило к снижению жизнеспособности клеток RBL-2H3 (рис. 5), что согласуется с данными о высокой чувствительности ТК к токсическому действию SkQ1 в перитонеальной полости (рис. 5, б).

Известно, что дегрануляция ТК сопровождается генерацией АФК. Однако, существуют противоречивые данные об источниках и роли АФК в активации ТК [10, 48]. Полученные результаты о снижении степени дегрануляции ТК под влиянием низких концентраций SkQ1 *in vivo* и *in vitro* согласуются с рядом литературных данных о снижении дегрануляции ТК в присутствии различных ингибиторов продукции АФК и антиоксидантов [49–53]. Особый интерес представляет роль мтАФК в активации ТК. Так, тапсигагрин — один из агентов, стимулирующих дегрануляцию ТК, вызывает увеличение внутриклеточного уровня АФК напрямую через продукцию супероксид-аниона O_2^- в митохондриях. При этом продукция мтАФК тесно связана с поступлением Ca^{2+} в митохондрии [11]. Кроме того, имеются сведения о влиянии мтАФК на синтез гистамина в ТК. Так, например, ТК из костного мозга Ucp2-дефицитных мышей (Ucp2 — белок внутренней мембраны митохондрий, регулирующий продукцию мтАФК) содержат по-

вышенное количество гистамина, которое снижается под действием миметика супероксиддисмутазы MnTBAP, преимущественно накапливающегося в митохондриях [54]. Следует отметить, что процесс дегрануляции сопровождается перемещением митохондрий к плазматической мембране ТК, а также их фрагментацией, опосредованной белком Drp1, оказывающем антиоксидантный эффект [55]. При этом фрагментация митохондрий в клетках также может быть связана с мтАФК [56, 57]. Кроме того, АФК, продуцируемые митохондриями, как и АФК, вырабатываемые в других клеточных компартментах, могут оказывать непосредственное влияние на GseRI-зависимый сигналинг, играющий ключевую роль в активации ТК [10]. Таким образом, мтАФК могут участвовать в активации ТК, влияя на синтез гистамина, митохондриальную концентрацию Ca^{2+} , перемещение и фрагментацию митохондрий, а также регулируя GseRI-зависимый сигналинг.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что мтАФК играют важную роль в активации ТК, ведущей к их дегрануляции и секреции гистамина. Поскольку гистамин способствует повышению проницаемости стенок сосудов и миграции лейкоцитов в область воспаления, подавление активации ТК под действием митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 может вносить существенный вклад в его противовоспалительное действие. Этот эффект, а также описанное ранее подавление воспалительной активации эндотелиальных клеток [20, 22, 26, 27] и нейтрофилов [28], возможно, лежит в основе терапевтического действия SkQ1 и его аналогов в моделях различных патологий, связанных с воспалением.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-50-00029, эксперименты *in vivo*) и РФФИ (проект 16-04-01074, эксперименты *in vitro*).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Омеляненко Н.П., Слущкий Л.И. (2009) Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия), Известия, Москва, т. 1, с. 378.
2. Ярилин А.А. (2010) Иммунология, ГЭОТАР-Медиа, Москва, с. 752.
3. Da Silva, E., Jamur, M., and Oliver, C. (2014) Mast cell function: a new vision of an old cell, *J. Histochem. Cytochem.*, **62**, 698–738.
4. Stankiewicz, E., Wypasek, E., and Plytycz, B. (2001) Short communication opposite effects of mast cell degranulation by compound 48/80 on peritoneal inflammation in Swiss and CBA mice, *J. Pharmacol.*, **53**, 149–155.
5. Bieta, E.L., Aczkowska, K.O., Arnold, B., and Ytzyz, B.P. (2008) Mast cell involvement in zymosan-induced peritonitis in C57Bl / 6 mice, **33**, 91–97.
6. Theoharides, T.C., Alysandratos, K.D., Angelidou, A., Delivanis, D.A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., and Kalogeromitros, D. (2012) Mast cells and inflammation, *BBA*, **1822**, 21–33.
7. Sly, L.M., Kalesnikoff, J., Lam, V., Wong, D., Song, C., Omeis, S., Chan, K., Lee, C.W., Siraganian, R.P., Rivera, J.,

- and Krystal, G. (2008) IgE-induced mast cell survival requires the prolonged generation of reactive oxygen species, *J. Immunol.*, **181**, 3850–3860.
8. Shin, J., Pan, H., and Zhong, X.P. (2012) Regulation of mast cell survival and function by tuberous sclerosis complex, *Blood*, **119**, 3306–3314.
 9. Zhou, Y., Tung, H.Y., Tsai, Y.M., Hsu, S.C., Chang, H.W., Kawasaki, H., Tseng, H.C., Plunkett, B., Gao, P., Hung, C.H., Vonakis, B.M., and Huang, S.K. (2013) Aryl hydrocarbon receptor controls murine mast cell homeostasis, *Blood*, **121**, 3195–3204.
 10. Chelombitko, M.A., Fedorov, A.V., Ilyinskaya, O.P., Zinovkin, R.A., and Chernyak, B.V. (2016) The role of reactive oxygen in mast cell degranulation, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1564–1577.
 11. Inoue, T., Suzuki, Y., Yoshimaru, T., and Ra, C. (2008) Reactive oxygen species produced up- or downstream of calcium influx regulate proinflammatory mediator release from mast cells: role of NADPH oxidase and mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 789–802.
 12. Antonenko, Y.N., Avetisyan, A.V., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Chertkov, V.A., Domnina, L.V., Ivanova, O.Y., Izyumov, D.S., Khailova, L.S., Klislin, S.S., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Muntyan, M.S., Nepryakhina, O.K., Pashkovskaya, A.A., Pletjushkina, O.Y., Pustovidko, A.V., Roginsky, V.A., Rokitskaya, T.I., Ruuge, E.K., Saprunova, V.B., Severina, I.I., Simonyan, R.A., Skulachev, I.V., Skulachev, M.V., Sumbatyan, N.V., Sviryaeva, I.V., Tashlitsky, V.N., Vassiliev, J.M., Vyssokikh, M.Y., Yaguzhinsky, L.S., Zamyatnin, A.A., and Skulachev, V.P. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. I. Cationic plastoquinone derivatives: Synthesis and *in vitro* studies, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1273–1287.
 13. Popova, E.N., Pletjushkina, O.Y., Dugina, V.B., Domnina, L.V., Ivanova, O.Y., Izyumov, D.S., Skulachev, V.P., and Chernyak, B.V. (2010) Scavenging of reactive oxygen species in mitochondria induces myofibroblast differentiation, *Antioxid. Redox Signal.*, **13**, 1297–1307.
 14. Demianenko, I.A., Vasilieva, T.V., Domnina, L.V., Dugina, V.B., Egorov, M.V., Ivanova, O.Y., Ilinskaya, O.P., Pletjushkina, O.Y., Popova, E.N., Sakharov, I.Y., Fedorov, A.V., and Chernyak, B.V. (2010) Novel mitochondria-targeted antioxidants, «Skulachev-Ion» derivatives, accelerate dermal wound healing in animals, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 274–280.
 15. Plotnikov, E.Y., Morosanov, M.A., Pevzner, I.B., Zorova, L.D., Manskikh, V.N., Pulkova, N.V., Galkina, S.I., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (2013) Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants in an acute bacterial infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 3100–3108.
 16. Demyanenko, I.A., Popova, E.N., Zakharova, V.V., Ilyinskaya, O.P., Vasilieva, T.V., Romashchenko, V.P., Fedorov, A.V., Manskikh, V.N., Skulachev, M.V., Zinovkin, R.A., Pletjushkina, O.Yu., Skulachev, V.P., and Chernyak, B.V. (2015) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice, *Aging (Albany, NY)*, **7**, 475–485.
 17. Shipounova, I.N., Svinareva, D.A., Petrova, T.V., Lyamzaev, K.G., Chernyak, B.V., Drize, N.I., and Skulachev, V.P. (2010) Reactive oxygen species produced in mitochondria are involved in age-dependent changes of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells in mice. A study with the novel mitochondria-targeted antioxidant SkQ1, *Mech. Ageing Dev.*, **131**, 415–421.
 18. Manskikh, V.N., Gancharova, O.S., Nikiforova, A.I., Krasilshchikova, M.S., Shabalina, I.G., Egorov, M.V., Karger, E.M., Milanovsky, G.E., Galkin, I.I., Skulachev, V.P., and Zinovkin, R.A. (2015) Age-associated murine cardiac lesions are attenuated by the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1, *Histol. Histopathol.*, **30**, 353–360.
 19. Demyanenko, I.A., Zakharova, V.V., Ilyinskaya, O.P., Vasilieva, T.V., Fedorov, A.V., Manskikh, V.N., Zinovkin, R.A., Pletjushkina, O.Y., Chernyak, B.V., Skulachev, V.P., and Popova, E.N. (2017) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves dermal wound healing in genetically diabetic mice, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 1–10.
 20. Zinovkin, R.A., Romashchenko, V.P., Galkin, I.I., Zakharova, V.V., Pletjushkina, O.Y., Chernyak, B.V., and Popova, E.N. (2014) Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium, *Aging (Albany, NY)*, **6**, 661–674.
 21. Chelombitko, M.A., Averina, O.A., Vasilieva, T.V., Dvorianinova, E.E., Egorov, M.V., Pletjushkina, O.Yu., Popova, E.N., Fedorov, A.V., Romashchenko, V.P., and Ilyinskaya, O.P. (2017) 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.*, **162**, 730–733.
 22. Zakharova, V.V., Pletjushkina, O.Yu., Galkin, I.I., Zinovkin, R.A., Chernyak, B.V., Krysko, D.V., Bachert, C., Krysko, O., Skulachev, V.P., and Popova, E.N. (2017) Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF induced endothelial permeability and lethality in mice, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 968–977.
 23. Zakharova, V.V., Pletjushkina, O.Y., Zinovkin, R.A., Popova, E.N., and Chernyak, B.V. (2017) Mitochondria-targeted antioxidants and uncouplers of oxidative phosphorylation in treatment of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS), *J. Cell. Physiol.*, **232**, 904–912.
 24. Silachev, D.N., Plotnikov, E.Y., Zorova, L.D., Pevzner, I.B., Sumbatyan, N.V., Korshunova, G.A., Gulyaev, M.V., Pirogov, Y.A., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (2015) Neuroprotective effects of mitochondria-targeted plastoquinone and thymoquinone in a rat model of brain ischemia/reperfusion injury, *Molecules*, **20**, 14487–14503.
 25. Jankauskas, S.S., Andrianova, N.V., Alieva, I.B., Prusov, A.N., Matsievsky, D.D., Zorova, L.D., Pevzner, I.B., Savchenko, E.S., Pirogov, Y.A., Silachev, D.N., Plotnikov, E.Y., and Zorov, D.B. (2016) Dysfunction of kidney endothelium after ischemia/reperfusion and its prevention by mitochondria-targeted antioxidant, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1538–1548.
 26. Galkin, I.I., Pletjushkina, O.Yu., Zinovkin, R.A., Zakharova, V.V., Chernyak, B.V., and Popova, E.N. (2016) Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 reduces TNF-induced endothelial permeability *in vitro*, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1188–1197.
 27. Galkin, I.I., Pletjushkina, O.Yu., Zinovkin, R.A., Zakharova, V.V., Birjukov, I.S., Chernyak, B.V., and Popova, E.N. (2014) Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNF α -induced endothelial cell damage, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 124–130.
 28. Vorobjeva, N., Prikhodko, A., Galkin, I., Pletjushkina, O., Zinovkin, R., Sud'ina, G., Chernyak, B., and Pinegin, B. (2017) Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*, *Eur. J. Cell. Biol.*, **96**, 254–265.
 29. Garcia-ramallo, E., Marques, T., Prats, N., Beleta, J., Kunkel, S.L., and Godessar, N. (2002) Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation, *J. Immunol.*, **169**, 6467–6473.
 30. Sin, Y.M., Sedgwick, A.D., Chea, E.P., and Willoughby, D.A. (1986) Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: a six day air pouch model in the mouse, *Ann. Rheum. Dis.*, **45**, 873–877.

31. Romano, M., Faggioni, R., Sironi, M., Sacco, S., Echtenacher, B., Di Santo, E., Salmons, M., and Ghezzi, P. (1997) Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor, *Mediators Inflamm.*, **6**, 32–38.
32. Duarte, D.B., Vasko, M.R., and Fehrenbacher, J.C. (2016). Models of inflammation: carrageenan air pouch, *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **72**, 1–9.
33. Shore, P.A., Burkhalter, A., and Cohn, V.H. (1959) A method for the fluorometric assay of histamine in tissues, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182–186.
34. Barsumian, E.L., Isersky, C., Petrino, M.G., and Siraganian, R.P. (1981) IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones, *Eur. J. Immunol.*, **11**, 317–323.
35. McShane, M.P., Friedrichson, T., Giner, A., Meyenhofer, F., Barsacchi, R., Bickle, M., and Zerial, M. (2015) A combination of screening and computational approaches for the identification of novel compounds that decrease mast cell degranulation, *J. Biomol. Screen.*, **20**, 720–728.
36. Radinger, M., Jensen, B.M., Swindle, E., and Gilfillan, A.M. (2015) Assay of mast cell mediators, *Methods Mol. Biol.*, **1220**, 307–323.
37. Oliani, S.M., Lim, L.H.K., Christian, H.C., Pell, K., Das, A.M., and Perretti, M. (2001) Morphological alteration of peritoneal mast cells and macrophages in the mouse peritoneal cavity during the early phases of an allergic inflammatory reaction, *Cell. Biol. Int.*, **25**, 795–803.
38. Benly, P. (2015) Role of histamine in acute inflammation, *J. Pharm. Sci. Res.*, **7**, 373–376.
39. Hartveit, F., and Thunold, S. (1966) Peritoneal fluid volume and the oestrus cycle in mice, *Nature*, **210**, 1123–1125.
40. Cassado, A.A., D'Imperio, L.M.R., and Bortoluci, K.R. (2015) Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function, *Front. Immunol.*, **6**, 1–9.
41. Rashid, A., Sadroddiny, E., Ye, H.T., Vratimos, A., Sabban, S., Carey, E., and Helm, B. (2012) Review: diagnostic and therapeutic applications of rat basophilic leukemia cells, *Mol. Immunol.*, **52**, 224–228.
42. Kolaczowska, E., Seljelid, R. and Plytycz, B. (2001) Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice, *J. Leukoc. Biol.*, **69**, 33–42.
43. Ajuebor, M.N., Das, A.M., Virag, L., Flower, R.J., Szabo, C., and Perretti, M. (1999) Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10, *J. Immunol.*, **162**, 1685–1691.
44. Dahdah, A., Gautier, G., Attout, T., Fiore, F., Lebourdais, E., Msallam, R., Daeron, M., Monteiro, R.C., Benhamou, M., Charles, N., Davoust, J., Blank, U., Malissen, B., and Launay, P. (2014) Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis, *J. Clin. Invest.*, **24**, 4577–4589.
45. Norozian, F., Kashyap, M., Ramirez, C.D., Patel, N., Kepley, C.L., Barnstein, B.O., and Ryan, J.J. (2006) TGFβ1 induces mast cell apoptosis, *Exp. Hematol.*, **34**, 579–587.
46. Melendez, G.C., Voloshenyuk, T.G., McLarty, G.L., Levick, S.P., and Brower, G.L. (2010) Oxidative stress-mediated cardiac mast cell degranulation, *Toxicol. Environ. Chem.*, **92**, 1293–1301.
47. Jamur, M.C., Moreno, A.N., Mello, L.F.C., Junior, D.A.S., Campos, M.R.C., Pastor, M.V.D., Grodzki, A.C.G., de Silva C., and Oliver C. (2010) Mast cell repopulation of the peritoneal cavity: contribution of mast cell progenitors versus bone marrow derived committed mast cell precursors, *BMC Immunol.*, **11**, 1–12.
48. Swindle, E.J., and Metcalfe, D.D. (2007) The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell dependent inflammatory processes, *Immunol. Rev.*, **217**, 186–205.
49. Chen, S., Gong, J., Liu, F., and Mohammed, U. (2000) Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cell activation, *Immunology*, **100**, 471–480.
50. Suzuki, Y., Yoshimaru, T., Matsui, T., Inoue, T., Niide, O., Nunomura, S., and Ra, C. (2003) FcεRI signaling of mast cells activates intracellular production of hydrogen peroxide: role in the regulation of calcium signals, *J. Immunol.*, **171**, 6119–6127.
51. Matsui, T., Suzuki, Y., Yamashita, K., Yoshimaru, T., Suzuki-Karasaki, M., Hayakawa, S., Yamaki, M., and Shimizu, K. (2000) Diphenyleiiodonium prevents reactive oxygen species generation, tyrosine phosphorylation, and histamine release in RBL-2H3 mast cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 742–748.
52. Masinia, E., Banib, D., Vannaccia, A., Pierpaolia, S., Mannaionia, P.F., Comhair, S.A.A., Xuc, W., Muscolid, C., Erzurum, S.C., and Salvemini, D. (2005) Reduction of antigen induced respiratory abnormalities and airway inflammation in sensitized guinea pigs by a superoxide dismutase mimetic, *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 520–531.
53. Han S.Y., Bae J.Y., Park S.H., Kim Y.H., Park J.H.Y., and Kang Y.H. (2013) Resveratrol inhibits IgE-mediated basophilic mast cell degranulation and passive cutaneous anaphylaxis in mice, *J. Nutr.*, **143**, 632–639.
54. Tegen, M., Elorza, A., Kempuraj, D., Boucher, W., Kepley, C.L., Shirihai, O.S., and Theoharides, T.C. (2009) Mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits mast cell activation and reduces histamine content, *J. Immunol.*, **183**, 6313–6319.
55. Zhang, B., Alysandratos, K.D., Angelidou, A., Asadi, S., Sismanopoulos, N., Delivanis, D.A., Weng, Z., Miniati, A., Vasiadi, M., and Katsarou-Katsari, A., Miao, B., Leeman, S.E., Kalogeromitros, D., and Theoharides, T.C. (2011) Human mast cell degranulation and preformed TNF secretion require mitochondrial translocation to exocytosis sites: relevance to atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**, 1522–1531.
56. Pletjushkina, O.Y., Lyamzaev, K.G., Popova, E.N., Nepryakhina, O.K., Ivanova, O.Y., Domnina, L.V., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2006) Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 518–524.
57. Wu, S., Zhou, F., Zhang, Z., and Xing, D. (2011) Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins, *FEBS J.*, **278**, 941–954.

**MITOCHONDRIA-TARGETED ANTIOXIDANT
SkQ1 (10-(6'-PLASTOQUINONYL)
DECYLTRIPHENYLPHOSPHONIUM BROMIDE)
INHIBITS MAST CELLS DEGRANULATION
in vivo AND *in vitro***

**M. A. Chelombitko^{1*}, O. A. Averina², T. V. Vasilyeva¹,
O. Yu. Pletiuskina³, E. N. Popova³, A. V. Fedorov¹,
B. V. Chernyak³, V. S. Shishkina¹, and O. P. Ilinskaya¹**

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
119991 Moscow, Russia; E-mail: atma69@yandex.ru*

² *Lomonosov Moscow State University Institute
of Mitoengineering, 119992 Moscow, Russia*

³ *Lomonosov Moscow State University Institute
of Physico-Chemical Biology, 119991 Moscow, Russia*

Received August 15, 2017

Revision received September 17, 2017

Earlier, in experimental models of acute inflammation and wound repair, a therapeutic effect of the mitochondria-targeted antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium bromide (SkQ1) was shown. We suggest that the main mechanism of antiinflammatory effects of SkQ1 is due to its ability to suppress inflammatory activation of the vascular endothelium and neutrophil migration into tissues. In the present work, we show that SkQ1 inhibits mast cell (MC) activation leading to their degranulation and histamine release in various models *in vivo* and *in vitro*. In addition, a significant decrease in the degree of degranulation of MC in the walls of the bag was found. In the mouse air pouch model, intraperitoneal injections of SkQ1 resulted in a tendency towards reduction in the number of leukocytes in the cavity of the air pouch and significantly decreased histamine content in it. In addition, a decrease in MC degranulation in tissue of the air pouch was found. The direct effect of SkQ1 on MC was studied *in vitro* on basophilic leukemia cells of rats RBL-2H3. SkQ1 inhibited induced degranulation of these cells. These results indicate that mitochondrial reactive oxygen species are involved in the activation of MC. It is known that MC play a crucial role in the regulation of vascular permeability by secreting histamine. Reduction of MC degranulation by SkQ1 can play an important role in the antiinflammatory activity of this mitochondria-targeted antioxidant.

Keywords: inflammation, mast cell, degranulation, histamine, mitochondria-targeted antioxidant