

УДК: 612.112.93;577.334

**ВЛИЯНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННОГО АНТИОКСИДАНТА  
SKQ1 НА СЕКРЕЦИЮ ГИСТАМИНА ТУЧНЫМИ КЛЕТКАМИ**

М.А. ЧЕЛОМБИТЬКО, Т.В. ВАСИЛЬЕВА, А.В. ФЕДОРОВ, И.А. ФРИДМАН, В.С. ШИШКИНА,  
О.П. ИЛЬИНСКАЯ

*Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, г. Москва, 119991, Россия*

**Аннотация.** Тучные клетки представляют собой клеточную популяцию соединительной ткани, играющую ключевую роль в поддержании ее нормального гомеостаза, а также участвующую в инициации и регуляции процесса воспаления. Тучные клетки выполняют свои функции за счет содержащихся в специфических гранулах веществ, выделяющихся из клетки путем экзоцитоза. Известно, что этот процесс, называемый дегрануляцией, сопровождается генерацией активных форм кислорода. Однако данные об источниках активных форм кислорода и их роли в активации процесса дегрануляции тучных клеток до сих пор мало изучены. Одним из таких источников в клетках служат митохондрии. Для изучения роли митохондриальных активных форм кислорода в различных процессах используют митохондриально-направленные антиоксиданты, накапливающиеся в митохондриях благодаря остатку липофильного катиона. Одним из таких антиоксидантов является 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония бромид (SkQ1). В настоящей работе показано, что SkQ1 снижает секрецию гистамина тучных клеток в модели подкожного «воздушного мешка» у мышей, а также ингибирует дегрануляцию клеток линии RBL-2H3. Помимо этого продемонстрировано отсутствие влияния SkQ1 на проницаемость стенки сосудов у мышей при локальном подкожном введении гистамина. Полученные данные свидетельствуют об участии митохондриальных активных форм кислорода в регуляции дегрануляции тучных клеток и связанной с ней секрецией гистамина. Поскольку гистамин способствует повышению проницаемости стенок сосудов и миграции лейкоцитов в область воспаления, подавление активации тучных клеток с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов может оказывать противовоспалительное действие.

**Ключевые слова:** тучные клетки, гистамин,  $\beta$ -гексозаминидаза, активные формы кислорода, митохондриально-направленные антиоксиданты, SkQ1.

**EFFECT OF MITOCHONDRIA-TARGETED ANTIOXIDANT SKQ1 ON HISTAMINE SECRETION  
BY MAST CELLS AND HISTAMINE-INDUCED EDEMA**

M.A. CHELOMBITKO, T.V. VASILYEVA, A.V. FEDOROV, V.S. SHISHKINA, O.P. ILINSKAYA

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiegory, 1, building 12, Moscow, 119234, Russia*

**Abstract.** Mast cells (MCs) are the cell population of connective tissue which maintain local tissue homeostasis and participate in initiation and regulation of inflammation. MCs perform their functions due to biologically active compounds that are stored in the specific granules and released during degranulation. Recent studies have demonstrated that MC degranulation is accompanied by reactive oxygen species (ROS) generation. However, the sources of ROS and the involvement of ROS in the MCs activation are still poorly studied. Mitochondria are one of the sources of ROS. The role of mitochondrial ROS (mtROS) in different processes had been studied using mitochondria-targeted antioxidants that are selectively accumulated in mitochondria due to the presence of lipophilic cations. One of them is 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium bromide (SkQ1). Here, we demonstrated that SkQ1 decreases histamine secretion by MCs in the mouse air-pouch model and inhibits degranulation of RBL-2H3 cells. In the same time SkQ1 produces no significant effect on vascular permeability during histamine-induced edema. These results suggest that mtROS are involved in the regulation of MCs degranulation and histamine release. Since histamine contributes to increased vascular permeability and migration of leukocytes to the site of inflammation, inhibition of MCs activation by mitochondria-targeted antioxidants can have an anti-inflammatory effect.

**Key words:** mast cells, histamine,  $\beta$ -hexosaminidase, reactive oxygen species, mitochondria-targeted antioxidants, SkQ1

**Актуальность.** Тучные клетки (ТК) представляют собой клеточную популяцию соединительной ткани, играющую ключевую роль в поддержании ее нормального гомеостаза, а также участвующую в инициации и регуляции процесса воспаления. ТК выполняют свои функции за счет содержащихся в спе-

цифических гранулах биологически активных веществ (БАВ), выделяющихся из клетки в ходе процесса дегрануляции [6]. Среди медиаторов ТК, участвующих в регуляции воспаления, важную роль играет гистамин, увеличивающий проницаемость стенок сосудов, что вызывает отек окружающих тканей и способствует миграции лейкоцитов в область воспаления [2]. В настоящее время существует немало данных, свидетельствующих об участии активных форм кислорода (АФК) в дегрануляции ТК [5]. Однако данные о роли митохондриальных АФК (мтАФК) в этом процессе практически отсутствуют. Для изучения роли мтАФК в различных процессах используют митохондриально-направленные антиоксиданты. Одним из таких антиоксидантов является 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония бромид (*SkQ1*) [1]. Изучение влияния *SkQ1* на секреторную активность ТК, а также на проницаемость сосудов под действием гистамина не только расширит представление о роли мтАФК в функциональной активности ТК, но и позволит создать научную основу для разработки новых противовоспалительных препаратов.

**Цель исследования** – изучить влияние митохондриально - направленного антиоксиданта *SkQ1* на секреторную активность ТК *in vivo* и *in vitro*, а также на проницаемость стенки сосудов у мышей при локальном подкожном введении гистамина.

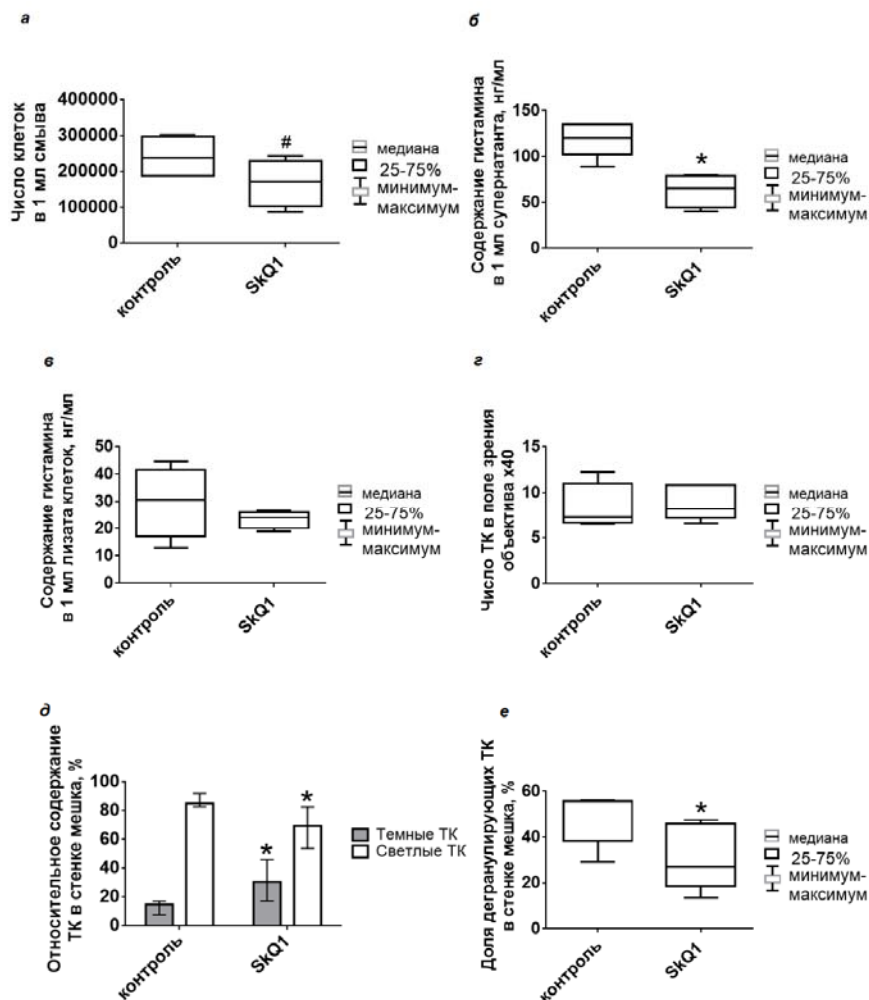
**Материалы и методы исследования.** В первой части работы проведена оценка влияния митохондриально-направленного антиоксиданта *SkQ1* на функциональную активность ТК в модели подкожного «воздушного мешка» у самцов мышей-гибридов первого поколения СВА×С57Bl/6 возрастом 18 месяцев. Для этого животные были разделены на 2 группы: контрольные мыши ( $n=5$ ) получали 0,9% раствор *NaCl*, опытные ( $n=5$ ) – *SkQ1* (любезно предоставлен НИИ Митоинженерии МГУ) в 0,9% растворе *NaCl* в дозе 250 нмоль/кг массы тела. Все вещества в объеме 5 мл/кг вводили внутривентриально 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. Перед введением воздуха мышам вводили внутривентриально золотильный наркоз («Virbac», Франция) в дозе 40 мг/кг массы тела. На 7-ой день мышей выводили из эксперимента путем передозировки хлороформом. В подкожный мешок вводили 2 мл фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с 5,4 мМ 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) [9]. Выявление ТК на гистологических срезах в ткани стенок мешка проводили с помощью окрашивания 0,1% толуидиновым синим.

Во второй части работы исследовано влияние *SkQ1* на спонтанную и индуцированную дегрануляцию клеток базофильной лейкемии крыс линии RBL-2H3, широко применяемой в качестве модели для изучения активации ТК и базофилов. В качестве маркера дегрануляции использовали фермент  $\beta$ -гексозаминидазу, находящуюся в тех же секреторных гранулах, что и гистамин. Клетки культивировали в среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 2 мМ L-глутамин, 10% HI-FBS («ПанЭко», Россия) при 37° и 5% CO<sub>2</sub>. 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 форболового эфира (PMA) («Sigma», США) и 1 мкМ кальциевого ионофора A23187 («Sigma», США) на 24 часа; 2) сенсibiliзировали клетки действием 0,4 мкг/мл *anti-DNP1gE* («Sigma», США) в течение 16 часов с последующей антигенной стимуляцией с помощью 1 мкг/мл *DNP-BSA* («Molecularprobes», США) в течение 18 мин. Содержание  $\beta$ -гексозаминидазы в кондиционированной среде и лизатах клеток определяли по стандартной методике с помощью реакции с 4-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидом («Sigma», США) [7].

В третьей части исследования было изучено действие *SkQ1* на проницаемость сосудов при локальном подкожном введении гистамина мышам-гибридам первого поколения СВА×С57Bl/6 возрастом 15-16 недель. Мыши были разделены на 2 группы: контрольные ( $n=10$ ) получали 0,9% раствор *NaCl*, опытные ( $n=9$ ) – *SkQ1* в 0,9% растворе *NaCl* в дозе 250 нмоль/кг массы тела. Все вещества в объеме 5 мл/кг вводили внутривентриально 1 раз в сутки в течение 4 дней до индукции локального отека. В день стимуляции развития отека в системный кровоток мышей через хвостовую вену вводили 1% раствор красителя Эванса голубого, который, связываясь с альбумином плазмы крови, проникает в ткани в области повышенной проницаемости сосудов, окрашивая их в синий цвет [8]. Через 5 минут после этого всем животным подкожно с левой стороны от позвоночника инъецировали 20 мкл физраствора с гистамином (5 мкг), а с правой – аналогичный объем физраствора без гистамина. Через 15 минут мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. Окрашенные в местах отека кожные лоскуты площадью ~ 1 см<sup>2</sup> иссекали, помещали в микропробирки с 500 мкл раствора формамида и инкубировали при 55° в течение 48 часов. Количество экстрагированного красителя определяли, измеряя светопоглощение проб на спектрофотометре *iMARK Microplate Reader* при длине волны 610 нм.

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 их обсуждение.** Ранее нами были получены данные о снижении лейкоцитарной инфильтрации под влиянием митохондриально-направленного антиоксиданта *SkQ1* в модели каррагинан-индуцированного воспаления в подкожном «воздушном мешке» у мышей [3]. Известно, что важную роль в привлечении лейкоцитов в очаг воспаления играют ТК [10]. Исходя из этого, мы предположили, что наблюдаемый противовоспалительный эффект *SkQ1* может быть обусловлен его влиянием на ТК стенки мешка. Для проверки данной гипотезы мы исследовали действие *SkQ1* на численность ТК и их секреторную активность в модели подкожного «воздушного мешка» у мышей в отсутствии провоспалительной стимуляции каррагинаном.



**Рис. 1.** 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 2д представлены в виде медианного значения и интерквартильного размаха [4]

Морфологический анализ клеточного состава смыва из полости подкожного мешка выявил присутствие лимфоцитов, моноцитов/макрофагов и небольшого числа нейтрофилов. ТК не были обнаружены ни в опытной, ни в контрольной группах животных. Подсчет клеток смыва обнаружил тенденцию к уменьшению абсолютного их числа у опытных мышей по сравнению с контрольными в 1,4 раза (рис. 1а). Анализ смыва у мышей опытной группы, получавшей *SkQ1*, продемонстрировал значимое снижение содержания воспалительного медиатора ТК – гистамина, в 2 раза по сравнению с контрольной группой, получавшей физраствор (рис. 1б). В незначительном количестве гистамин также был выявлен в лизатах клеток (рис. 1в), при этом его содержание не различалось между группами животных (рис. 1в). Наличие

гистамина в лизатах клеток может объясняться способностью нейтрофилов и макрофагов фагоцитировать гистамин-содержащие гранулы ТК. Морфометрический анализ числа ТК на поперечных срезах стенок мешка опытных и контрольных мышей не выявил значимой разницы между группами (рис. 1г). Оценка функциональной активности ТК в соединительной ткани стенки мешка позволила обнаружить двукратное уменьшение числа дегранулирующих ТК у опытных мышей по сравнению с контрольными (рис. 1е). С этим согласуются данные о том, что содержание «темных» ТК, плотно заполненных метакроматическими гранулами, у мышей опытной группы было достоверно больше, а число «светлых», рыхло заполненных отчетливо различимыми гранулами, соответственно, меньше, чем у контрольных мышей (рис. 1д). Результаты оценки функциональной активности ТК стенки подкожного мешка коррелируют со снижением содержания гистамина в смыве из его полости.

Поскольку высвобождение медиаторов, в том числе гистамина, происходит в результате дегрануляции ТК, на следующем этапе исследования была проведена оценка способности *SkQ1* оказывать непосредственное влияние на процесс дегрануляции *in vitro*. Для этого мы исследовали результат воздействия антиоксиданта на спонтанную и индуцированную дегрануляцию модельных клеток *RBL-2H3* путем определения уровня секреции ими  $\beta$ -гексозаминидазы. В отсутствие стимуляции процесса дегрануляции *SkQ1* не влиял на уровень секреции этого фермента (рис. 2а). В случае индукции дегрануляции совместным действием 1 мкМ A23187 и 50 нМРМА наблюдалось ее подавление в 2 раза под влиянием 2,0 и 200,0 нМ *SkQ1* (рис. 2б). При антигенной стимуляции дегрануляции наблюдалось ее значимое снижение на 20 – 30% при действии 0,2, 2,0 и 200,0 нМ *SkQ1* (рис. 2в).

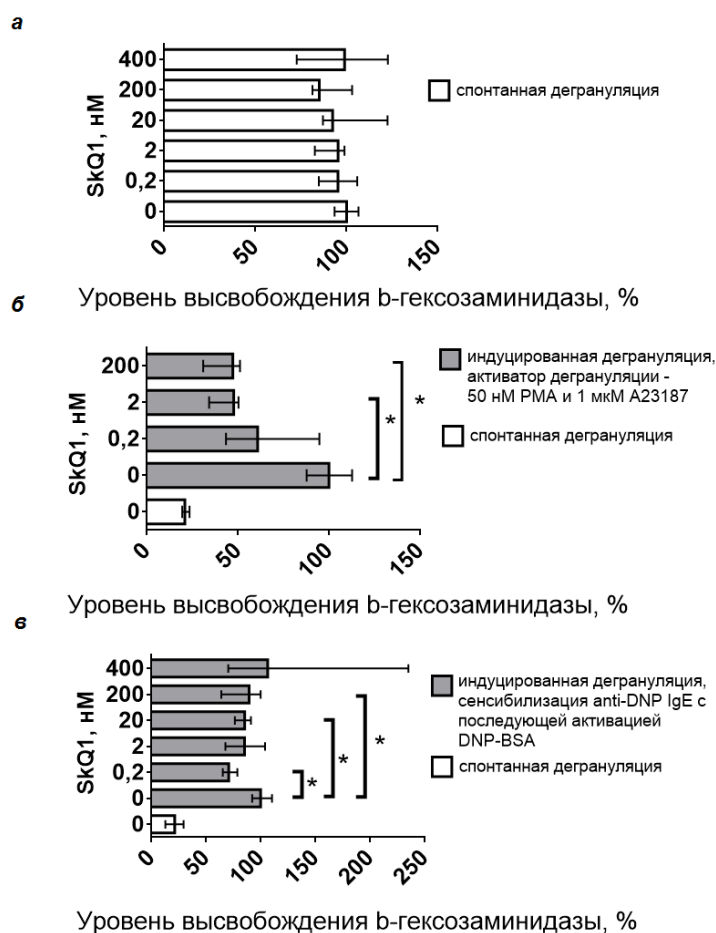


Рис. 2. Влияние различных концентраций *SkQ1* на уровень спонтанной (а) и индуцированной (б, в) дегрануляции клеток линии *RBL-2H3* ( $n=3$ ) под действием следующих агентов: смесь 50 нМ РМА и 1 мкМ A23187 в течение 24 часов (б); 0,4 мкг/мл *anti-DNP IgE* в течение 16 часов и 0,1 мкг/мл *DNP-BSA* в течение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

После того, как в экспериментах *in vivo* и *in vitro* нами была продемонстрирована способность *SkQ1* уменьшать дегрануляцию ТК и, следовательно, снижать уровень секретируемого ими гистамина, мы проверили с помощью физиологического теста, может ли изучаемый антиоксидант оказывать протек-

торное действие на проницаемость стенки сосудов в коже у мышей под действием субдермально инъецированного гистамина на фоне системного введения *SkQ1* (ежедневно интраперитонеально в течение 4-х суток). Используя метод экстравазации красителя Эванса голубого в окружающую ткань в области повышенной проницаемости сосудов, провели спектрофотометрическую оценку количества экстрагированного из проб кожи красителя в области инъекции гистамина по сравнению с физраствором. Оказалось, что через 15 мин после введения гистамина контрольным мышам, не получавшим *SkQ1*, проницаемость стенки сосудов в коже увеличилась в 3,5 раза, а в опытной группе мышей, получавших антиоксидант, в 3,6 раза по сравнению с животными, которым под кожу вводили физраствор. При этом не было обнаружено значимой разницы между опытными и контрольными мышами (рис. 3). Таким образом, в условиях данного эксперимента не выявлено протекторного действия антиоксиданта на проницаемость сосудов. Полученный результат свидетельствует о том, что антиоксидант не оказывает прямого протекторного действия на проницаемость стенки сосудов при гистамин-индуцированном локальном подкожном отеке.

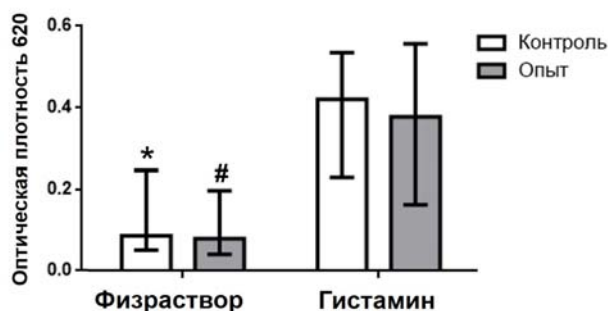


Рис. 3. Сравнение показателей оптической плотности при длине волны 620 нм раствора красителя Эванса голубого, экстрагированного из фрагментов кожи, изъятых из области субдермального введения физраствора и гистамина у контрольных (получали физраствор,  $n=10$ ) и опытных (получали *SkQ1*,  $n=9$ ) мышей. Звездочкой отмечено достоверное отличие показателей у контрольных, решеткой – у опытных мышей. Данные на графиках представлены медианой и интерквартильным размахом

**Выводы.** В работе показано, что митохондриально-направленный антиоксидант *SkQ1* снижает секрецию гистамина ТК в модели подкожного «воздушного мешка» у мышей, ингибирует индуцированную дегрануляцию клеток линии *RBL-2H3*, но не предупреждает повышения проницаемости сосудистой стенки при прямом воздействии на нее гистамина. Полученные данные свидетельствуют об участии мТАФК в регуляции дегрануляции ТК и связанной с ней секрецией гистамина. Поскольку гистамин способствует повышению проницаемости стенок сосудов и миграции лейкоцитов в область воспаления, подавление активации ТК с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов может оказывать противовоспалительное действие.

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

### Литература

1. Antonenko Y.N. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies // *Biochemistry (Mosc)*. 2008. Vol.73, №12. P. 1273–1287.
2. Benly P. Role of Histamine in Acute Inflammation // *J. Pharm. Sci. & Res.* 2015. Vol. 7, №6. P. 373–376.
3. Chelombitko M.A. Comparison of the Effects of Mitochondria-Targeted Antioxidant 10-(6'-Plastoquinonyl)Decyltriphenylphosphonium Bromide (*SkQ1*) and a Fragment of its Molecule Dodecyltriphenylphosphonium on Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mouse Model of Subcutaneous Air Pouch // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. Vol. 162, №6. P. 730–733.
4. Chelombitko M.A. Mitochondria-Targeted Antioxidant *SkQ1* (10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium Bromide) Inhibits Mast Cell Degranulation in vivo and in vitro // *Biochemistry (Mosc)*. 2017. Vol.82, №12. P. 1493–1503.
5. Chelombitko M.A. Role of Reactive Oxygen Species in Mast Cell Degranulation // *Biochemistry (Mosc)*. 2016. Vol. 81, №12. P. 1564–1577.
6. Da Silva E., Jamur M., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell // *J. Histochem. Cytochem.* 2014. Vol. 62, №10. P. 698–738.

7. Radinger M. Assay of mast cell mediators // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1220. P. 307–323.
8. Radu M., Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability // *J. Vis. Exp.* 2013. Vol. 73. e50062.
9. 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.
10. Wilgus T.A., Wulff B.C. The Importance of Mast Cells in Dermal Scarring // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014. Vol. 3, №4. P. 356–365.

#### References

1. Antonenko YN. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies. *Biochemistry (Mosc)*. 2008;73(12):1273-87.
2. Benly P. Role of Histamine in Acute Inflammation. *J. Pharm. Sci. & Res.* 2015;7(6):373-6.
3. Chelombitko MA. Comparison of the Effects of Mitochondria-Targeted Antioxidant 10-(6'-Plastoquinonyl)Decyltriphenylphosphonium Bromide (SkQ1) and a Fragment of its Molecule Dodecyltriphenylphosphonium on Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mouse Model of Subcutaneous Air Pouch. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017;162(6):730-3.
4. Chelombitko MA. Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 (10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium Bromide) Inhibits Mast Cell Degranulation in vivo and in vitro. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(12):1493-503.
5. Chelombitko MA. Role of Reactive Oxygen Species in Mast Cell Degranulation. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(12):1564-77.
6. Da Silva E, Jamur M, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem.* 2014;62(10):698-38.
7. Radinger M. Assay of mast cell mediators. *Methods Mol. Biol.* 2015;1220:307-23.
8. Radu M, Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J. Vis. Exp.* 2013;73:e50062.
9. Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959;127:182-6.
10. Wilgus TA, Wulff BC. The Importance of Mast Cells in Dermal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(4):356-65.

---

#### Библиографическая ссылка:

Челомбитко М.А., Васильева Т.В., Федоров А.В., Фридман И.А., Шишкина В.С., Ильинская О.П. Влияние митохондриально-направленного антиоксиданта *SKQ1* на секрецию гистамина тучными клетками // *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание.* 2018. №6. Публикация 3-13. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-6/3-13.pdf> (дата обращения: 12.12.2018). \*

\* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-6/e2018-6.pdf>