

---

---

## БИОФИЗИКА И БИОХИМИЯ

---

---

# СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫХ 10-(6'-ПЛАСТОХИНОНИЛ) ДЕЦИЛТРИФЕНИЛФОСФОНΙΑ БРОМИДА (SkQ1) И ДОДЕЦИЛТРИФЕНИЛФОСФОНΙΑ БРОМИДА (C12TRP) НА ПРОЦЕСС ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННОГО КАРРАГИНАНОМ, В МОДЕЛИ ПОДКОЖНОГО ВОЗДУШНОГО МЕШКА У МЫШЕЙ

М.А.Челомбитько, О.А.Аверина\*\*, Т.В.Васильева,  
Е.Е.Дворянинова, М.В.Егоров\*\*, О.Ю.Плетюшкина\*, Е.Н.Попова\*,  
А.В.Федоров, В.П.Ромащенко\*, О.П.Ильинская

*Биологический факультет, \*НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского,  
\*\*НИИ митоинженерии МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ*

---

Исследовано воздействие митохондриально-направленного антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония бромида (SkQ1) и додецилтрифенилфосфония бромида (C12TRP), обладающих свойствами слабых разобщителей дыхания и окислительного фосфорилирования, на процесс острого воспаления, индуцированного каррагинаном в подкожном воздушном мешке у мышей. SkQ1 в этой модели оказал выраженный противовоспалительный эффект, проявляющийся в уменьшении абсолютного числа клеток воспаления, в основном нейтрофилов, снижении их относительного содержания при увеличении доли макрофагов и тучных клеток в воспалительном экссудате. Кроме того, выявлена тенденция к уменьшению в нем концентрации провоспалительного цитокина ИЛ-6. Существенного влияния C12TRP на процесс воспаления не наблюдалось.

**Ключевые слова:** митохондриально-направленные антиоксиданты, SkQ1, C12TRP, острое воспаление, каррагинан

Митохондриальные АФК (мтАФК) стимулируют продукцию ряда провоспалительных цитокинов и обеспечивают ответ врожденного иммунитета [8]. Для селективного изучения роли мтАФК в физиологических и патологических условиях используют митохондриально-направленные соединения, состоящие из молекулы антиоксиданта, присоединенной углеводородной цепью к липофильному катиону, за счет которого происходит

их аккумуляция в митохондриях [1]. Одним из перспективных соединений такого рода является SkQ1, что обусловлено широким диапазоном концентраций (от 0.1 нМ до 1000 мМ), в которых он проявляет антиоксидантное действие, а также его относительной химической стабильностью [13]. Ранее обнаружена способность SkQ1 подавлять острую воспалительную реакцию и способствовать репарации ран [2-4,6,10].

Молекула SkQ1 представляет собой производное липофильного катиона додецилтрифенилфосфония (C12TRP), который, в отличие от

SkQ1, не имеет остатка пластохинона, обладающего антиоксидантными свойствами. Механизмы накопления SkQ1 и C12TPP в митохондриях сходны, обе молекулы способны вызывать разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования [12]. Показано, что разобщители снижают негативные последствия окислительного стресса в тканях [7]. SkQ1 и C12TPP подавляют экспрессию молекул адгезии лейкоцитов (E-селектин, ICAM1 и VCAM1) на поверхности эндотелия, а также собственно адгезию нейтрофилов к эндотелию, стимулированную провоспалительным цитокином ФНО- $\alpha$  [11]. Поскольку оба вещества обладают указанными общими свойствами *in vitro*, а SkQ1 при этом демонстрирует противовоспалительное действие *in vivo* [2-4,6,10], возникает вопрос о возможном наличии собственной противовоспалительной активности у C12TPP.

Целью данной работы являлось сравнительное изучение действия митохондриально-направленных веществ — антиоксиданта SkQ1 и катионного разобщителя C12TPP — на процесс острого асептического воспаления в подкожном воздушном мешке у мышей.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу проводили на самцах мышей SPF-статуса (без специфической патогенной микрофлоры) линии C57Bl/6 в возрасте 12-15 нед, полученных из питомника лабораторных животных “Пушино”. Животных содержали в испытательном центре “Виварно-экспериментального комплекса ООО “НИИ Митоинженерии МГУ”. Все процедуры с животными проводили в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (FELASA).

Мыши были разделены на 3 группы. Контрольная группа ( $n=11$ ) получала 0.9% раствор NaCl, опытная — SkQ1 ( $n=11$ ) в дозе 250 нмоль/кг массы тела, группа сравнения — C12TPP ( $n=11$ ) в аналогичной дозе. Все вещества вводили внутривентриально, однократно, в течение 7 сут до индукции воспаления. SkQ1 и C12TPP были предоставлены НИИ митоинженерии МГУ. Все травматичные для животных манипуляции проводили под наркозом (золетил, 40 мг/кг массы тела; “Virbac”). В 1-е сутки эксперимента в межлопаточной области мышцей формировали подкожные мешки путем инъекции 4 мл стерильного воздуха; на 4-е сутки повторно вводили 2 мл воздуха. На 7-е сутки внутри мешка индуцировали острое воспаление инъекцией 1 мл 1% раствора I-каррагинана (“Sigma”) в 0.9% NaCl; через 4 ч после этого мышцей

выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. Из подкожного мешка забирали воспалительный экссудат, определяли его объем и содержание клеток в нем. После центрифугирования (15 мин при 1500g и 4°C) супернатант использовали для выявления ИЛ-6 с помощью готового набора для ИФА (“eBioscience”). Из клеточного осадка готовили мазки для идентификации типов клеток, фиксировали метанолом, окрашивали по Романовскому—Гимзе, а также иммуноцитохимически выявляли моноциты-макрофаги с помощью крысиных моноклональных антител (1:100) к маркеру f4/80 (“Serotec”). Вторичными антителами служили биотинилированные козы антикрысиные поликлональные антитела (1:400; “Vector”). Для визуализации связанных антител наносили конъюгат авидина D с пероксидазой хрена и диаминобензидин (“Vector”). Нейтрофилы определяли по характерной форме ядра и наличию специфических гранул. Тучные клетки идентифицировали как метакроматически окрашенные f4/80-отрицательные клетки с несегментированным ядром размером более 15 мкм. Различные клеточные формы подсчитывали на мазках на 1000 клеток, используя микроскоп “Leica DM1000”.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе “Statistica 8.0”. Для оценки значимости различий применяли двусторонний непараметрический критерий Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p<0.05$ , тенденцией — при  $p<0.1$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

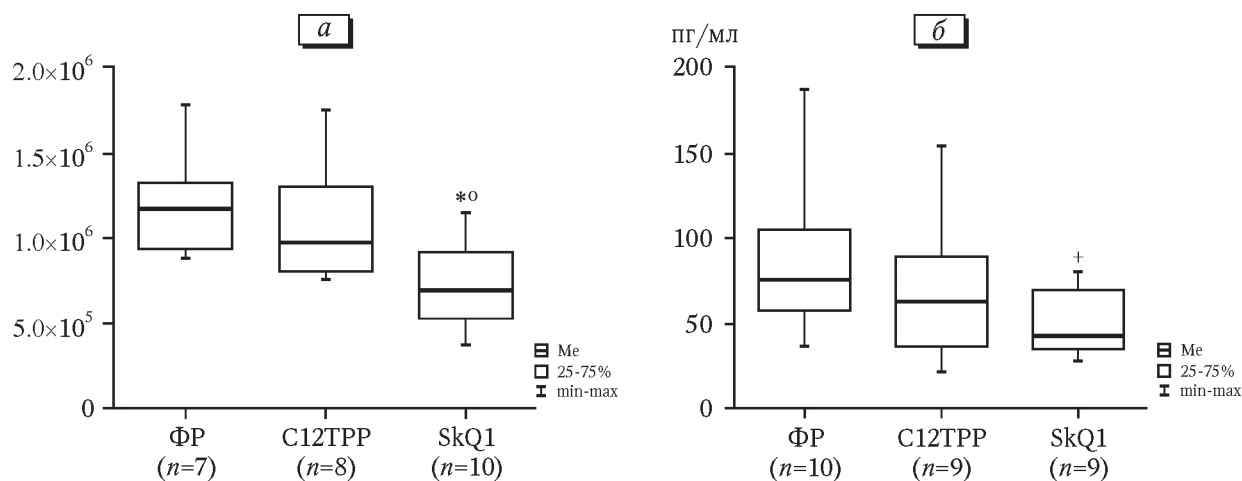
У мышцей опытной группы, получавшей SkQ1, уменьшалось абсолютное число клеток воспаления в 1.87 раза ( $p<0.05$ ) по сравнению с контролем (рис. 1, а), около 90% которых составляли нейтрофилы (идентификацию клеток проводили на мазках). Кроме того, наблюдалась тенденция к снижению концентрации провоспалительного цитокина ИЛ-6 в 1.78 раза (рис. 1, б). Снижение содержания ИЛ-6 можно объяснить пропорциональным снижением числа клеток, продуцирующих этот цитокин под действием SkQ1.

Идентификация и подсчет клеток из экссудата на мазках показал, что относительная численность нейтрофилов достоверно уменьшалась на 4%, а моноцитов/макрофагов и тучных клеток — возросла на 42 и 19% соответственно ( $p<0.05$ ) у животных, получавших антиоксидант, по сравнению с контрольными (рис. 2). Ранее *in vitro* были получены данные о способности SkQ1 снижать уровень экспрессии молекул адгезии лейкоцитов на эндотелии, а также интенсивность нейтрофильной

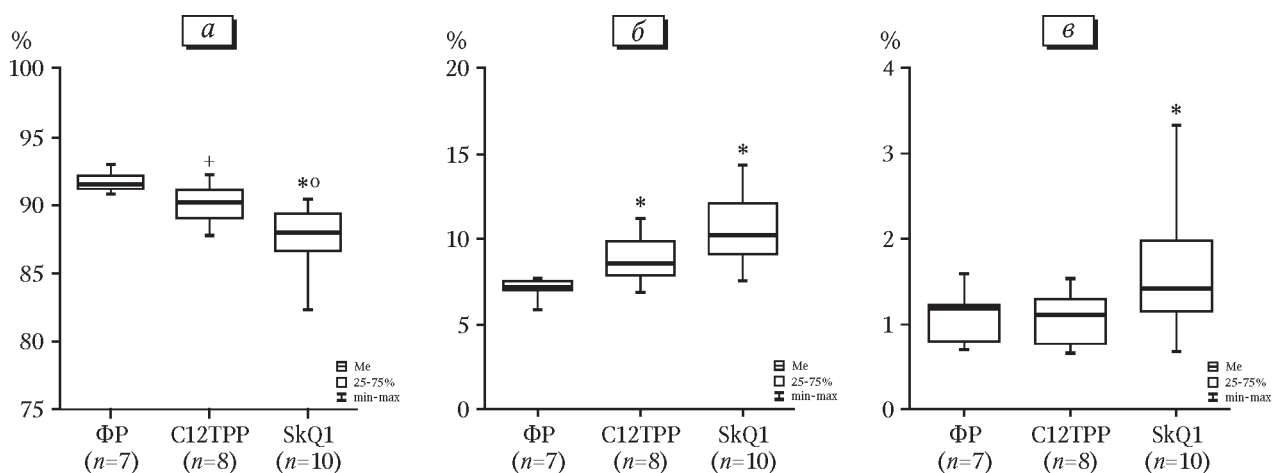
трансэндотелиальной миграции [9,14]. Кроме того, снижение нейтрофильной инфильтрации очага воспаления было продемонстрировано в условиях *in vivo* при септическом и асептическом воспалении и заживлении ран [3,4]. Эти факты позволяют предположить, что в условиях проведенного нами эксперимента SkQ1 способствовал снижению интенсивности привлечения нейтрофилов в очаг воспаления, вызванного действием мощного индуктора острой фазы воспаления каррагинана [5]. Важно отметить, что в предварительных экспериментах каррагинан за 5 ч воздействия увеличивал абсолютное число клеток воспаления в воздушном мешке у мышей более чем в 100 раз (данные не представлены). Поэтому снижение

числа клеток в экссудате, преимущественно представленных нейтрофилами, под влиянием SkQ1 в 1.87 раза является весьма убедительным фактом, свидетельствующим о выраженном противовоспалительном действии антиоксиданта. При этом SkQ1, по-видимому, оказывает влияние скорее на миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, чем на продукцию ими цитокинов.

Снижение числа клеток в экссудате у опытных мышей под воздействием SkQ1 по сравнению с группой, получавшей C12TPP, было в 1.6 раза больше ( $p < 0.05$ ) (рис. 1, а). Достоверных различий в содержании провоспалительного цитокина ИЛ-6 в сравниваемых группах выявлено не было (рис. 1, б).



**Рис. 1.** Абсолютное число клеток (а) и концентрация провоспалительного цитокина ИЛ-6 (б) в 1 мл экссудата из воздушного мешка животных, получавших физиологический раствор (ΦР), C12TPP и SkQ1.  
 $^+p < 0.1$  по сравнению с ΦР;  $p < 0.05$  по сравнению с \*ΦР, °C12TPP.



**Рис. 2.** Относительное содержание нейтрофилов (а), макрофагов (б) и тучных клеток (в) на мазках экссудата мышей, получавших физиологический раствор (ΦР), C12TPP и SkQ1, выраженное в процентах от общего числа клеточных форм.

$^*p < 0.05$  по сравнению с \*ΦР,  $^+p < 0.1$  по сравнению с ΦР,  $^{\circ}p < 0.1$  по сравнению с C12TPP.

В группе сравнения не наблюдалось достоверных различий с контрольной группой по содержанию в экссудате как клеток, так и ИЛ-6 (рис. 1). Однако достоверно различалось соотношение клеточных форм на мазках: относительное содержание нейтрофилов было меньше на 2%, а моноцитов/макрофагов — больше на 19% (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о некотором сдвиге нейтрофильной фазы воспаления в сторону макрофагальной под действием С12ТРР, т.е. о наличии у него слабого противовоспалительного действия. Существует вероятность, что в более высокой дозе С12ТРР мог бы оказать более заметный противовоспалительный эффект.

В целом результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что антиоксидант SkQ1 обладает способностью подавлять острую воспалительную реакцию на этапе нейтрофильной инфильтрации. Сравнительный анализ влияния С12ТРР и SkQ1 на исследованные параметры острого воспаления у животных, получавших вещества в одинаковых дозах, показал, что антиоксидант в условиях данного эксперимента обладал существенно более выраженной противовоспалительной активностью. Опираясь на ранее опубликованные данные [2-4,6,10,11], можно предположить, что наблюдаемые эффекты SkQ1 обеспечиваются как антиоксидантными свойствами пластохинона, так и разобщающим эффектом трифенилфосфония.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 14-50-00029) и РФФИ (грант № 16-04-01074-а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Черняк Б.В., Чертков В.А., Домнина Л.В., Иванова О.Ю., Изюмов Д.С., Хайлова Л.С., Клишин С.С., Коршунова Г.А., Лямзаев К.Г., Мунтян М.С., Непряхина О.К., Пашковская А.А., Плетюшкина О.Ю., Пустовидко А.В., Рогинский В.А., Рокицкая Т.И., Рууге Э.К., Сапрунова В.Б., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев И.В., Скулачев М.В., Сумбатьян Н.В., Свириева И.В., Ташлицкий В.Н., Васильев Ю.М., Высоких М.Ю., Ягужинский Л.С., Замятнин (мл.) А.А., Скулачев В.П. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения 1. Катионные производные пластохинона: синтез и исследование *in vitro* // Биохимия. 2008. Т. 73, № 12. С. 1589-1606.
2. Демьяненко И.А., Васильева Т.В., Галкин И.И., Егоров М.В., Ильинская О.П., Манских В.Н., Попова Е.Н., Фёдоров А.В. Новый митохондриально-направленный антиоксидант ускоряет репаративные процессы в полнослойной кожной ране у мышей C57BLKS-LEPRDB/J с генетически обусловленными нарушениями углеводного и липидного обмена // Морфологические ведомости. 2011. № 4. С. 23-29.
3. Демьяненко И.А., Васильева Т.В., Домнина Л.В., Дугина В.Б., Егоров М.В., Иванова О.Ю., Ильинская О.П., Плетюшкина О.Ю., Попова Е.Н., Сахаров И.Ю., Фёдоров А.В., Черняк Б.В. Новые митохондриально-направленные антиоксиданты на основе "ионов Скулачева" ускоряют заживление кожных ран у животных // Биохимия. 2010. Т. 75, № 3. С. 337-345.
4. Моросанова М.А., Плотников Е.Ю., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Зоров Д.Б. Гибель клеток почки при воспалении: роль окислительного стресса митохондрий // Биологические мембраны. 2013. Т. 30, № 5-6. С. 1-9.
5. Borthakur A., Bhattacharyya S., Anbazhagan A.N., Kumar A., Dudeja P.K., Tobacman J.K. Prolongation of carcinogen-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NFκB-BCL10 loop // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1822, N 8. P. 1300-1307.
6. 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.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice // Aging (Albany NY). 2015. Vol. 7, N 7. P. 475-485.
7. Jin Y., McEwen M.L., Nottingham S.A., Maragos W.F., Dragicovic N.B., Sullivan P.G., Springer J.E. The mitochondrial uncoupling agent 2,4-dinitrophenol improves mitochondrial function, attenuates oxidative damage, and increases white matter sparing in the contused spinal cord // J. Neurotrauma. 2004. Vol. 21, N 10. P. 1396-1404.
8. Li X., Fang P., Mai J., Choi E.T., Wang H., Yang X.F. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers // J. Hematol. Oncol. 2013. Vol. 6. P. 19. doi:10.1186/1756-8722-6-19.
9. 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., Zinovkin R.A. Age-associated murine cardiac lesions are attenuated by the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 // Histol. Histopathol. 2015. Vol. 30, N 3. P. 353-360.
10. Popova E.N., Pletjushkina O.Y., Dugina V.B., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izumov D.S., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Scavenging of reactive oxygen species in mitochondria induces myofibroblast differentiation // Antioxid. Redox Signal. 2010. Vol. 13, N 9. P. 1297-1307.
11. Romashchenko V.P., Zinovkin R.A., Galkin I.I., Zakharova V.V., Panteleeva A.A., Tokarchuk A.V., Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Y., Chernyak B.V., Popova E.N. Low concentrations of uncouplers of oxidative phosphorylation prevent inflammatory activation of endothelial cells by tumor necrosis factor // Biochemistry (Mosc). 2015. Vol. 80, N 5. P. 610-619.
12. Severin F.F., Severina I.I., Antonenko Y.N., Rokitskaya T.I., Cherepanov D.A., Mokhova E.N., Vyssokikh M.Y., Pustovidko A.V., Markova O.V., Yaguzhinsky L.S., Korshunova G.A.,

- Sumbatyan N.V., Skulachev M.V., Skulachev V.P.* Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107, N 2. P. 663-668.
13. *Skulachev M.V., Antonenko Y.N., Anisimov V.N., Chernyak B.V., Cherepanov D.A., Chistyakov V.A., Egorov M.V., Kolosova N.G., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Plotnikov E.Y., Roginsky V.A., Savchenko A.Y., Severina I.I., Severin F.F., Shkurat T.P., Tashlitsky V.N., Shidlovsky K.M.,*
- Vysokikh M.Y., Zamyatnin A.A. Jr, Zorov D.B., Skulachev V.P.* Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies // *Curr. Drug Targets.* 2011. Vol. 12, N 6. P. 800-826.
14. *Zinovkin R.A., Romaschenko V.P., Galkin I.I., Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Chernyak B.V., Popova E.N.* Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium // *Aging (Albany NY).* 2014. Vol. 6, N 8. P. 661-674.

Получено 25.02.16

---