

УДК 577.3

НИЗКИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАЗОБЩИТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ПРЕДОТВРАЩАЮТ ВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВАЦИЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ВЫЗВАННУЮ ФАКТОРОМ НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ

© 2015 В.П. Ромашенко^{1,2}, Р.А. Зиновкин^{1,3,4}, И.И. Галкин¹,
В.В. Захарова^{1,2}, А.А. Пантелеева¹, А.В. Токарчук^{1,2}, К.Г. Лямзаев^{1,4},
О.Ю. Плетюшкина^{1,4}, Б.В. Черняк^{1,4}, Е.Н. Попова^{1,4*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; электронная почта: k_porova_ch@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ Митоинженерии, 119991 Москва

Поступила в редакцию 25.12.14
После доработки 12.01.15

Митохондрии в эндотелиальных клетках выполняют важные регуляторные функции как при нормальных физиологических процессах, так и при патологических состояниях, связанных с воспалением. Мы исследовали влияние низких концентраций разобщителей окислительного фосфорилирования на воспалительную активацию эндотелиальных клеток, используя как классические разобщители 2,4-динитрофенол (ДНФ) и 4,5,6,7-тетрахлоро-2-трифторметилбензимидазол (ТТФБ), так и митохондриально-направленный катионный разобщитель додецилтифенилфосфоний (C₁₂ТРР). Было показано, что разобщители подавляли экспрессию Е-селектина и молекул адгезии ICAM1 и VCAM1, а также адгезию нейтрофилов на поверхности эндотелия, стимулированную фактором некроза опухолей (TNF). Механизм противовоспалительного действия разобщителей был, по крайней мере, отчасти, связан с подавлением активации транскрипционного фактора NFκB за счет снижения фосфорилирования его ингибирующей субъединицы IκBα. Диапазон концентраций C₁₂ТРР, при которых наблюдалось подавление экспрессии ICAM1, был на 3 порядка шире, чем у классических разобщителей. Предположительно при снижении мембранного потенциала уменьшается накопление проникающих катионов в митохондриях, что снижает их разобщающую активность и предотвращает дальнейшее падение потенциала. Восстановление мембранного потенциала после удаления разобщителей не отменяло их противовоспалительное действие. Таким образом, «мягкое» разобщение может быть стимулом для активации механизмов, обеспечивающих резистентность эндотелиальных клеток к действию TNF. Мы не обнаружили заметного влияния разобщителей на биогенез митохондрий и активацию аутофагии, однако было отмечено уменьшение фракции фрагментированных митохондрий, что указывало на вероятное изменение их сигнальных свойств. Ранее мы показали, что как классические, так и митохондриально-направленные антиоксиданты подавляют NFκB-зависимую активацию эндотелия под действием TNF. Полученные данные позволяют предположить, что противовоспалительное действие «мягкого» разобщения связано с его антиоксидантным действием.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: воспаление, эндотелий, молекулы адгезии, митохондрии, разобщение окислительного фосфорилирования, проникающие катионы семейства SkQ.

Принятые сокращения: ДНФ – 2,4-динитрофенол; ТТФБ – 4,5,6,7-тетрахлоро-2-трифторметилбензимидазол; C₁₂ТРР – додецилтифенилфосфоний; SkQ1 – пластохинолил-10(6'-децилтрифенил)фосфоний; TNF – фактор некроза опухолей; АФК – активные формы кислорода; NAC – N-ацетилцистеин; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; ТМРМ – метиловый эфир тетраметилпродамина; мтДНК – митохондриальная ДНК; яДНК – ядерная ДНК.

* Адресат для корреспонденции.

Повышение уровня фактора некроза опухоли (TNF) в крови вызывает аномальную активацию эндотелия и его повреждение (эндотелиальные дисфункции) [1–4]. Один из основных механизмов активации эндотелия под действием воспалительных цитокинов заключается в индукции экспрессии молекул адгезии (таких как ICAM1 и VCAM1) и селектинов (таких как E-селектин и P-селектин) на поверхности эндотелиальных клеток. Эти молекулы обеспечивают адгезию и последующую трансмиграцию лейкоцитов через сосудистый барьер в ткани [5]. Основным регулятором экспрессии молекул адгезии при действии TNF – транскрипционный фактор NFκB [6].

Исследования последних лет показали, что митохондрии модулируют ответ различных клеток на воспалительные стимулы [7–9]. В эндотелиальных клетках митохондрии, не являясь основным источником АТФ [10], играют важнейшую сигнальную роль как в норме, так и при патологических состояниях эндотелия [9, 11–13]. Предполагается, что митохондрии эндотелиальных клеток являются гомеостатическими регуляторами кальциевой сигнальной системы [14], а также генерации NO и активных форм кислорода (АФК) [15]. Показано, что активация эндотелия, вызванная TNF, снижается под действием ингибитора первого комплекса дыхательной цепи митохондрий и ингибиторов открытия митохондриальной поры [16]. АФК играют важную роль в сосудистой физиологии и патофизиологии [17]. Ранее мы показали, что в эндотелиальных клетках митохондриальные АФК передают сигнал апоптоза, вызванного высокими дозами TNF [18]. Известно, что TNF вызывает продукцию АФК, в т.ч. митохондриальных [19, 20]. Недавно мы показали [21], что у старых мышей, длительное время получавших митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1, снижается экспрессия молекул адгезии в аортах. В эндотелиальных клетках SkQ1, а также классические антиоксиданты в тысячекратно более высоких концентрациях ингибировали TNF-зависимую активацию NFκB [21]. Активация NF-κB может регулироваться различными редокс-чувствительными компонентами сигнальных путей, однако противоречивые данные, полученные в разных лабораториях, не позволяют составить полную картину происходящего [22].

Известно, что небольшое снижение мембранного потенциала митохондрий, не останавливая синтез АТФ (так называемое «мягкое» разобщение), может значительно снизить генерацию АФК в митохондриях [23–25]. В клетках эндотелия как разобщители окислительного фосфорилирования, так и повышенная экс-

прессия митохондриальных разобщающих белков (UCP) снижали генерацию АФК митохондриями [26–29]. В модели *ex vivo* на коронарных артериях старых крыс разобщитель карбонилцианид-4-трифторметоксибензилгидразон (FCCP) снижал митохондриальный окислительный стресс и NFκB-зависимую экспрессию молекул адгезии [30]. Предполагается, что в клетках разобщители могут действовать, во-первых, не допуская гиперполяризации митохондрий и тем самым подавляя генерацию АФК [25], и, во-вторых, индуцируя экспрессию антиоксидантных ферментов [31].

Ранее было показано, что проникающие катионы могут проявлять свойства «мягких» митохондриально-направленных разобщителей [24, 25]. Эти соединения способствуют циклическому трансмембранному переносу жирных кислот, стимулируя их протонофорную активность. Снижение мембранного потенциала уменьшает накопление катионов в митохондриях и тем самым снижает их разобщающую активность. Таким образом, липофильные катионы приобретают свойства саморегулирующихся разобщителей, вызывая ограниченную деполяризацию мембраны митохондрий в широком диапазоне концентраций.

Целью нашей работы было изучение механизма действия митохондриально-направленных разобщителей на воспалительную активацию клеток эндотелия. Мы показали, что длительное воздействие липофильного катиона C₁₂TPP, а также классических разобщителей (ДНФ, ТТФБ) приводит к подавлению NFκB-зависимой экспрессии молекул адгезии и снижению сорбции нейтрофилов на поверхности клеток эндотелия, стимулированных TNF.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры. Человеческие эндотелиальные клетки линии EA.hy926 растили на среде DMEM («Gibco», США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («HyClone», США) и НАТ (гипоксантин/аминоптерин/тирозин) («Sigma», США). Первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES), которые были любезно предоставлены М.А. Лагарьковой (Институт общей генетики РАН), выращивали на среде для первичных культур эндотелиальных клеток, содержащей все необходимые добавки (EGM-2 BulletKit, «Lonza», США), и использовали в экспериментах на 2–4 пассажах. Культуральные матрасы и планшеты, используемые для HUVES, предварительно обрабатывали 2%-ным водным

раствором желатина («Sigma», США). Клетки человеческой промиелоцитной лимфомы линии HL-60 выращивали на среде RPMI 1640 («Gibco», США), содержащей 10% ЭТС («HyClone», США). Все клетки культивировали при 37° в присутствии 5%-ного CO₂.

Проникающие катионы (C₁₂TTPP и SkQ1; синтезированы Г.А. Коршуновой и Н.В. Сумбатьян, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова); разобщители (ДНФ и ТТФБ), олигомицин и дезоксиглюкозу («Sigma», США) добавляли к полностью конфлюэнтному монослою клеток EA.hy926 за 3 ч до измерения мембранного потенциала митохондрий или за 12 ч до измерения содержания АТФ. Во всех остальных опытах эндотелиальные клетки культивировали до полностью конфлюэнтного монослоя (3 дня) в присутствии проникающих катионов, разобщителей и антиоксидантов, а затем меняли культуральную среду на новую, содержащую 0,2%-ную ЭТС, и через 12 ч добавляли TNF (любезно предоставлен Л.Н. Шингаровой, ИБХ РАН).

Оценка мембранного потенциала митохондрий. Мембранный потенциал митохондрий оценивали, используя флуоресцентный зонд TMRM («Sigma», США), который электрофоретически накапливается в митохондриях. Клетки инкубировали с TMRM (100 нМ, 15 мин), затем снимали с планшетов раствором трипсина с ЭДТА («Gibco», США) и измеряли флуоресценцию с помощью проточного цитофлуориметра (Beckman Coulter Cytomics FC 500, «Beckman Coulter», США).

Измерение содержания АТФ в клетках. Содержание АТФ в клетках измеряли, используя набор «ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II» («Hoffmann-La Roche», Швейцария). Пробы подготавливали согласно рекомендациям производителя. Измерения проводили на планшетном люменометре (Victor X5, «PerkinElmer», США).

Выделение ДНК, РНК и обратная транскрипция. ДНК выделяли с помощью набора «DNeasy Blood & Tissue» («Qiagen», США), а РНК — с помощью набора «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США). Качество выделенной РНК определяли спектрофотометрически, измеряя отношение поглощения A₂₆₀/A₂₈₀ и A₂₆₀/A₂₃₀. РНК обрабатывали ДНКазой («Fermentas», Литва). кДНК получали следующим образом: 2 мкг денатурированной РНК, 0,1 мкг случайных гексамерных праймеров, 0,2 мкг oligo-dT и 0,5 мМ дНТФ инкубировали в 1× буфере («Invitrogen», США) с 200 ед ревертазы Superscript III в течение 50 мин при 43°.

ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler iQ («Bio-Rad», США). Для определения экспрессии целевых генов исполь-

зовали смесь EVA Green («Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Последовательности праймеров приведены в таблице.

Перед началом реакции смесь прогревали при 95° в течение 3 мин. ПЦР проводили по протоколу (45 циклов): денатурация (95°) — 15 с, отжиг (56°) — 30 с, элонгация (72°) — 30 с. На стадии элонгации фиксировалась интенсивность флуоресценции. После завершения ПЦР для определения специфичности реакции анализировали кривую плавления в диапазоне 55–95°. Для каждого образца ДНК или кДНК использовали три повтора. Эффективность амплификации с выбранными парами праймеров составила 95–102%. Расчеты уровня экспрессии проводили с учетом эффективности амплификации праймеров. Значения экспрессии мРНК целевых генов нормировали на значения экспрессии генов RPL32, аналогичным образом определяли относительный уровень мтДНК/ядДНК.

Оценка адгезии нейтрофилов на эндотелии. Клетки линии EA.hy926 инкубировали с 5 нг/мл TNF в течение 8 ч, дважды промывали свежей средой RPMI 1640 и затем инкубировали 30 мин при 37° с суспензией клеток HL-60, меченых BCECF-DA («Molecular Probes», США). Несвязавшиеся клетки смывали RPMI 1640, фиксировали препарат 2%-ным параформальдегидом и получали изображения с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 250 («Carl Zeiss», Германия).

Вестерн-блот. Иммуноблоттинг проводили, как описано ранее [18]. Использовались первичные антитела против p-IκBα, GAPDH и COXIV («Cell Signaling», США) и тубулина («Sigma», США). В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена антитела против иммуноглобулинов кролика или мыши («Sigma», США). Визуализацию проводили с набором ECL («Amersham», США) в соответствии с протоколом производителя.

Оценка количества аутофагосом и структуры митохондриального ретикулума. Аутофагосомы визуализировали в живых клетках, используя набор Cyto-ID® Autophagy Detection Kit («Enzo», США) согласно рекомендациям производителя. Одновременно для выявления митохондрий к клеткам добавляли 200 нМ MitoTracker Red («Molecular Probes», США). Изображения получали с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 250 («Carl Zeiss», Германия). Число аутофагосом и длину митохондрий в клетках определяли в автоматическом режиме с помощью программы MotionTracking 8.84.3 (<http://motiontracking.mpi-cbg.de>). Митохондрии считали фрагментированными, если их длина была менее 2 мкм.

Праймеры для определения содержания мРНК методом ПЦР в реальном времени

Мишень	Праймеры	
	прямой	обратный
<i>RPL32</i>	5'-CATCTCCTTCTCGGCATCA-3'	5'-AACCCCTGTTGTCAATGCCTC-3'
<i>ICAM1</i>	5'-TGTCATCATCACTGTGGTAGC-3'	5'-CTTGTGTGTTTCGGTTTCATGG-3'
Е-селектин	5'-TGGTTGAGTGTGATGCTGTG-3'	5'-CGTTGGCTTCTCGTTGTCC-3'
<i>VCAM1</i>	5'-CTTCTCGTGCTCTATTTTG-3'	5'-TTGACTTCTGTGCTTCTAC-3'
<i>MnSOD</i>	5'-CGTGACTTTGGTTCCTTTG-3'	5'-GCTCCCACACATCAATCC-3'
яДНК	5'-ACCTGCTCCTGAATGACTA-3'	5'-GATTCTGGTATGTGGTGTCTT-3'
мтДНК	5'-ACCSTATGTGCGAGTATCTGTC-3'	5'-ATGATGTCTGTGTGAAAGTGG-3'

Статистическая обработка результатов. Изображения анализировали, используя программу ImageJ (<http://imagej.nih.gov/>). Статистическую обработку результатов проводили в программе «Статистика 6.0». На всех гистограммах и графиках данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Статистическую значимость определяли, используя *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние проникающих катионов и классических разобщителей на мембранный потенциал митохондрий и синтез АТФ. Ранее было показано, что проникающие катионы семейства SkQ являются митохондриально-направленными разобщителями окислительного фосфорилирования [24, 25]. Сейчас мы подтвердили, что в клетках EA.hy926 липофильные катионы C_{12} TPP и SkQ1 снижают мембранный потенциал митохондрий (рис. 1, *a*), как и классические разобщители (рис. 1, *b*). Любопытно, что в этой клеточной модели C_{12} TPP оказался более эффективным разобщителем по сравнению с SkQ1, что не соответствует данным, ранее полученным на изолированных митохондриях [24]. Возможно, присутствие реакционноспособного остатка хинона в молекуле SkQ1 приводит к его частичному связыванию с клеточными структурами и снижает эффективность накопления в митохондриях. Мы обнаружили, что небольшое (на 7–10%) снижение мембранного потенциала под действием низких концентраций катионных соединений и классических разобщителей не сопровождалось полным прекращением окислительного фосфорилирования в клетках EA.hy926. Этот вывод основан на том, что ингибитор АТФ-синтазы митохондрий олигомицин (5 мкг/мл)

повышал мембранный потенциал в присутствии C_{12} TPP (20 нМ), ДНФ (5 мкМ) и ТТФБ (0,1 мкМ) (рис. 1, *в*).

Следует отметить, что даже полное блокирование митохондриальной АТФ-синтазы олигомицином существенно не влияло на уровень АТФ в клетках EA.hy926, и лишь подавление гликолиза добавлением 5 мМ дезоксиглюкозы приводило к его снижению (рис. 1, *г*). Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными о том, что в эндотелии АТФ образуется главным образом за счет гликолиза [10]. Таким образом, при выбранных концентрациях как проникающие катионы, так и классические разобщители вызывают «мягкое» разобщение, снижая мембранный потенциал митохондрий без полной остановки окислительного фосфорилирования и падения уровня АТФ.

«Мягкое» разобщение подавляет NFκB-зависимую активацию эндотелиальных клеток, стимулированных TNF. Для исследования действия «мягкого» разобщения на воспалительный ответ эндотелиальных клеток (EA.hy926 и HUVEC) мы использовали подходы *in vitro*, в которых активацию клеток проводили TNF [21]. Критериями для оценки активации были возрастание экспрессии мРНК молекул адгезии (ICAM1 и VCAM1) и Е-селектина и возрастание адгезии клеток промиелоцитарной лимфомы линии HL-60 к монослою эндотелиальных клеток. Ранее мы показали, что TNF в этих условиях также стимулирует накопление молекул адгезии на поверхности клеток и секрецию провоспалительных интерлейкинов-6 и -8 [21]. Из данных, представленных на рис. 2, *a* видно, что в эндотелиальных клетках линии EA.hy926 проникающие катионы C_{12} TPP и SkQ1 подавляли экспрессию ICAM1 в широком диапазоне концентраций (0,2–20 нМ), и их эффективность мало различалась. ДНФ и ТТФБ в концентрациях,

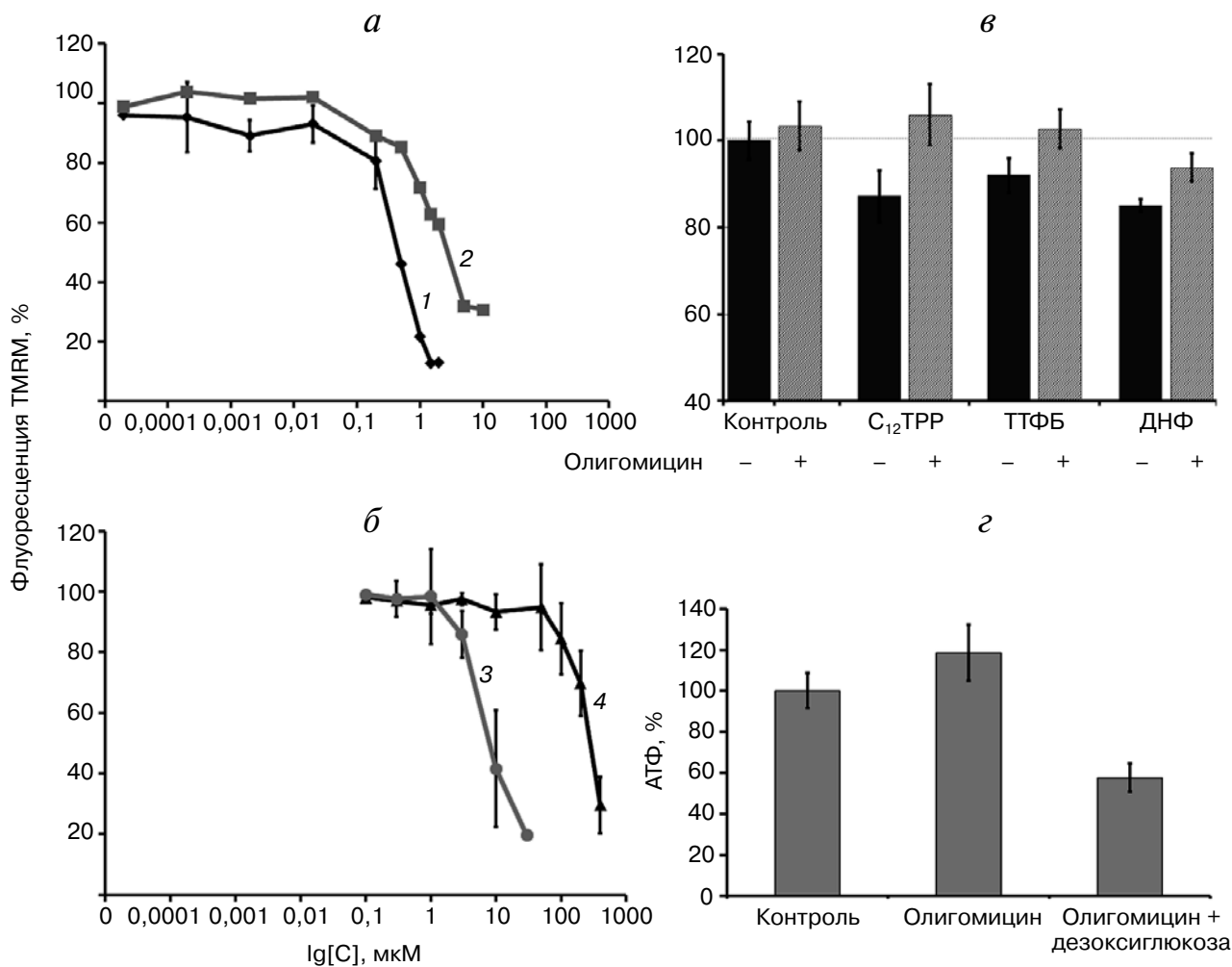


Рис. 1. Влияние проникающих катионов и классических разобщителей на мембранный потенциал митохондрий в клетках EA.hy926. Деполяризация митохондрий: *а* – под действием проникающих катионов (1 – C₁₂TPP, 2 – SkQ1), *б* – под действием разобщителей (3 – TTФБ, 4 – ДНФ). *в* – Олигомицин (5 мкг/мл) предотвращает деполяризацию митохондрий, вызванную низкими дозами C₁₂TPP (0,2 нМ), ДНФ (5 мкМ) и TTФБ (1 мкМ); *г* – действие олигомицина (5 мкг/мл) и дезоксиглюкозы (5 мМ) на содержание АТФ в клетках

при которых деполяризация митохондрий не превышала 7–10%, также подавляли экспрессию ICAM1, однако небольшое повышение концентрации разобщителей отменяла или даже обращала этот эффект (рис. 2, б). Диапазон действующих концентраций у классических разобщителей был значительно (на 3 порядка) уже, чем у проникающих катионов C₁₂TPP и SkQ1 (рис. 2, а, б). Различия между двумя типами разобщителей, возможно, связаны с тем, что при снижении мембранного потенциала уменьшается накопление проникающих катионов в митохондриях, что снижает их разобщающую активность и ведет к стабилизации потенциала. Важно отметить, что проникающие катионы и разобщители подавляли экспрессию ICAM1 в

той же мере, что и классические антиоксиданты (рис. 2, в).

«Мягкое» разобщение ингибировало и другие признаки активации эндотелия под действием TNF. На эндотелиальных клетках HUVEC проникающие катионы C₁₂TPP (0,2 нМ) и SkQ1 (0,2 нМ), так же как и классические разобщители ДНФ (5 мкМ) и TTФБ (0,1 мкМ), наряду с ICAM1, подавляли экспрессию E-селектина и VCAM1 (рис. 2, г).

Молекулы адгезии и селектины обеспечивают остановку роулинга и прикрепление лимфоцитов к эндотелию сосудов, что необходимо для трансмиграции лимфоцитов в ткани [5]. Для оценки функциональной активности молекул адгезии мы исследовали адгезию клеток проми-

елоцитарной лимфомы человека линии HL-60 (эти клетки экспрессируют на своей поверхности лиганды для молекул адгезии и селектинов) к монослою клеток EA.hy926. Как проникающие катионы, так и классические разобщители подавляли адгезию клеток HL-60 к поверхности эндотелиальных клеток (рис. 2, *д*).

Основным регулятором экспрессии молекул адгезии при активации эндотелия под действием TNF является транскрипционный фактор NFκB [6]. Ранее мы показали, что ингибирование NFκB в клетках EA.hy926 в значительной мере подавляет стимулированную TNF экспрессию ICAM1 [21]. Активация NFκB под действи-

ем TNF включает фосфорилирование и последующий протеолиз ингибирующей субъединицы IκBα, которая удерживает NFκB в цитоплазме [32]. Все использованные нами разобщители подавляли фосфорилирование IκBα в тех же концентрациях, в которых они подавляли экспрессию ICAM1 (рис. 3).

Таким образом, было показано, что длительное «мягкое» разобщение окислительного фосфорилирования приводит к подавлению NFκB-зависимой активации эндотелиальных клеток под действием TNF.

«Мягкое» разобщение может индуцировать механизмы, обеспечивающие резистентность эн-

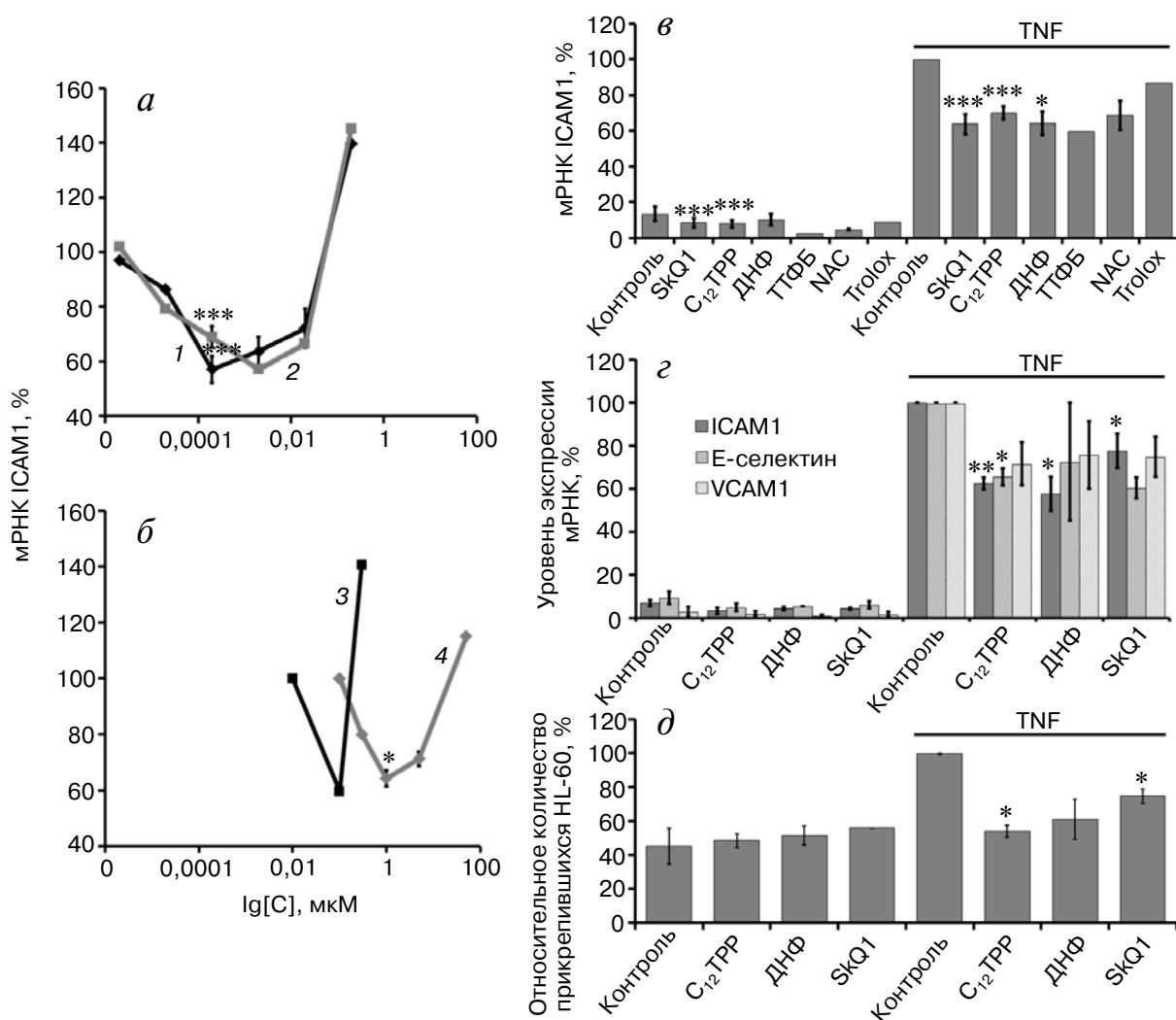


Рис. 2. Проникающие катионы, классические разобщители и антиоксиданты подавляют активацию эндотелиальных клеток, вызванную TNF. *а–в* – Экспрессия мРНК ICAM1 в клетках EA.hy926 после стимуляции TNF (0,25 нг/мл, 4 ч). 1 – SkQ1, 2 – C₁₂TRP, 3 – ТТФБ, 4 – ДНФ. *г* – Экспрессия мРНК ICAM1, VCAM1 и E-селектина в клетках HUVEC. *д* – Адгезия клеток HL-60 к клеткам EA.hy926, активированным TNF (5 нг/мл, 12 ч). Концентрации добавленных соединений (*в–д*): SkQ1 (0,2 нМ), C₁₂TRP (0,2 нМ), ДНФ (5 мкМ), ТТФБ (1 мкМ), NAC (5 мМ) и Trolox (200 мкМ). N ≥ 4, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001

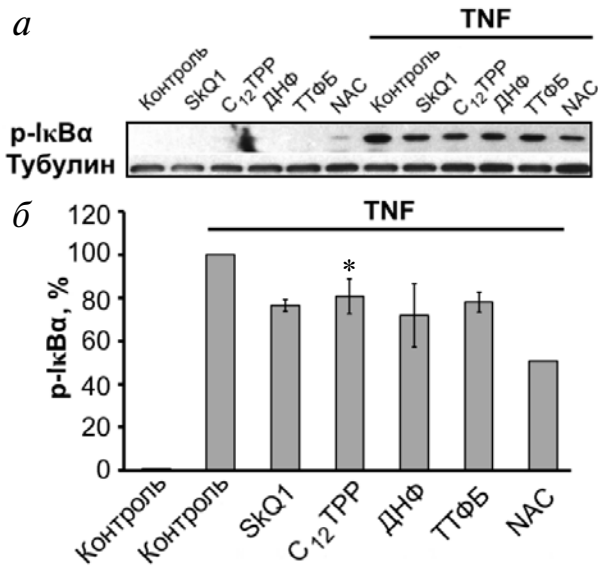


Рис. 3. Проникающие катионы, классические разобшители и антиоксидант подавляют стимулированное TNF фосфорилирование IκBα. Клетки EA.hy926 стимулировали TNF (0,5 нг/мл, 15 мин). Концентрации добавленных соединений – как на рис. 2, в–д. *a* – Результаты типичного вестерн-блота; *б* – статистическая обработка результатов денситометрического анализа вестерн-блотов. N = 5, * *p* ≤ 0,05

дотелиальных клеток к активирующему действию TNF. Противовоспалительное действие проникающих катионов C₁₂TPP и SkQ1 проявлялось лишь после длительной (3 дня) обработки ими клеток. Подобное отложенное действие SkQ1 мы наблюдали ранее во многих клеточных моделях [18, 33–35]. Мы обнаружили, что удаление из среды как проникающих катионов (C₁₂TPP, SkQ1), так и классических разобшителей (ДФН и ТТФБ) за 12 ч до добавления TNF не влияло на их способность подавлять экспрессию ICAM1 и других маркеров воспаления (см. раздел «Методы исследования»). Используя высокие концентрации разобшителей, мы показали, что удаление из среды ДНФ (400 мкМ) приводит к полному восстановлению мембранного потенциала митохондрий, в то время как после удаления из среды C₁₂TPP (1 мкМ) митохондрии остаются деполаризованными по крайней мере в течение 12 ч. Это указывало на то, что классические разобшители способны индуцировать механизмы, которые ингибируют провоспалительное действие TNF в отсутствие разобщения. В то же время действие проникающих катионов может помимо этого обеспечиваться их прямым разобщающим эффектом.

Одним из основных индуцибельных антиоксидантных ферментов митохондрий является

марганцевая супероксиддисмутаза (MnSOD). Мы проверили возможность ее индукции, но не обнаружили стимуляции экспрессии этого фермента под действием разобшителей (рис. 4, а).

Возможные механизмы индукции противовоспалительных эффектов «мягкого» разобщения. Слабые митохондриальные стрессы, такие как частичная деполаризация мембраны, торможение синтеза АТФ, усиление генерации АФК, избыточное накопление Ca²⁺, способны индуцировать механизмы усиления биоэнергетических функций, контроля качества и антиоксидантной защиты митохондрий, что ведет к усилению адаптации клеток к неблагоприятным условиям [31]. Например, у мышей длительный прием низких доз ДНФ приводил к увеличению средней продолжительности жизни, и при этом наблюдалось подавление окислительных повреждений мембран, белков и ДНК, а также стимуляция биогенеза митохондрий в мышцах и жировой ткани [36, 37].

Мы оценили влияние длительного «мягкого» разобщения на количество и структуру митохондрий, а также на общую аутофагию и специфическую аутофагию митохондрий (миитофагию). В клетках EA.hy926 разобшители не вызывали существенного изменения содержания мтДНК (рис. 4, б) и экспрессии маркерного белка внутренней мембраны – субъединицы IV цитохром-оксидазы (COXIV) (рис. 4, в, г). Можно предполагать, что частичное разобщение в этих условиях не запускает механизмы «ретроградного сигналинга», которые включаются, например, при голодании, и стимулируют биогенез митохондрий, поскольку уровень АТФ в этих клетках практически не зависел от окислительного фосфорилирования (рис. 1, з).

«Мягкое» разобщение может способствовать повышению качества митохондриальной популяции, стимулируя механизмы контроля качества и элиминации поврежденных органелл. При высоких концентрациях разобшители вызывают интенсивное накопление аутофагосом [38]. В то же время длительная инкубация с разобшителями в низких концентрациях, вызывавших противовоспалительное действие, не приводила к усилению липидизации белка LC3, которая необходима для индукции аутофагии (рис. 5, а, б), и не влияла на содержание аутофагосом в этих клетках (рис. 5, в, г). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии стимуляции массовой аутофагии при «мягком» разобщении, однако не позволяют судить о миитофагии. Для анализа этого процесса мы одновременно окрашивали митохондрии и аутофагосомы, но существенной колокализации аутофагосом с митохондриями не наблюдалось ни в исходных клетках,

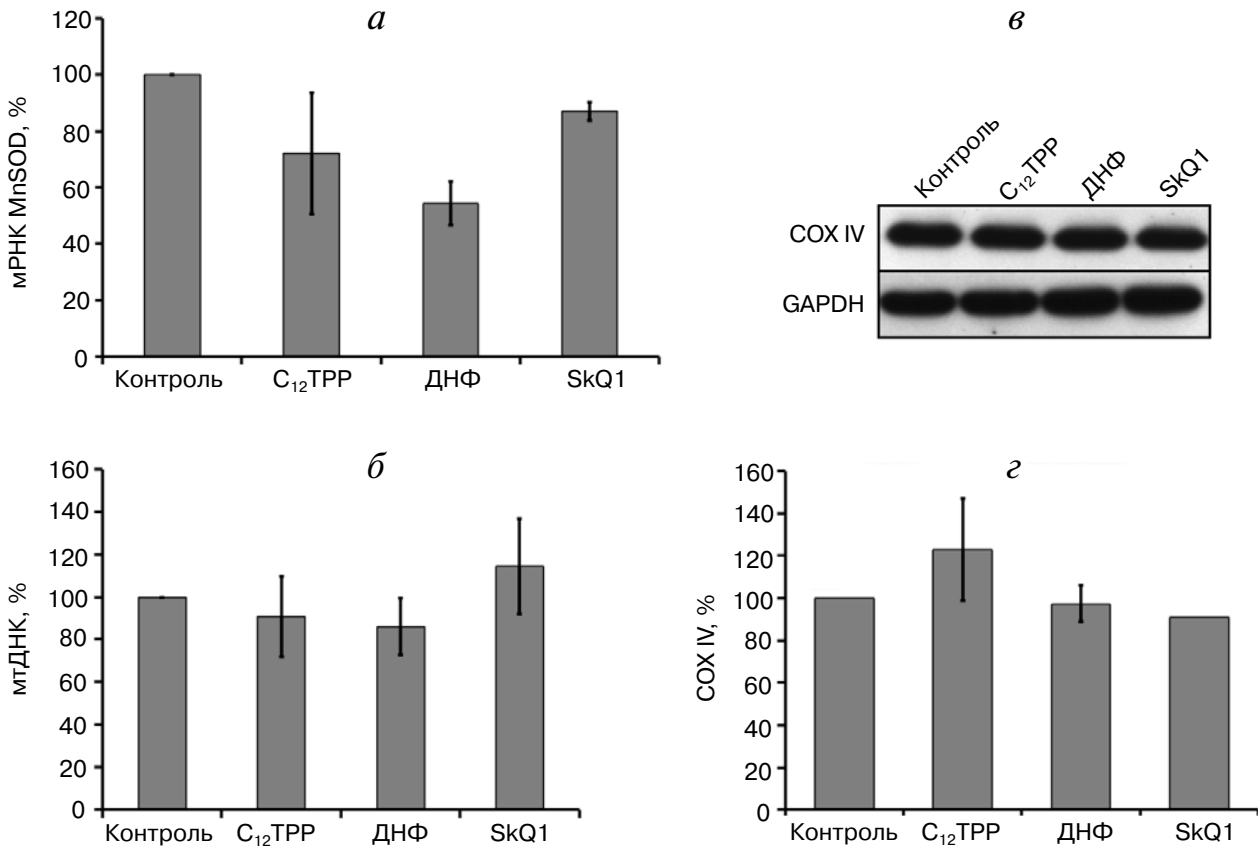


Рис. 4. Проникающие катионы и разобщители не влияют на содержание мтДНК и митохондриального белка COXIV, а также на экспрессию MnSOD в эндотелиальных клетках. *а* – Экспрессия мРНК MnSOD в клетках HUVEC; *б* – содержание мтДНК в клетках EA.hy926. Содержание COXIV в клетках EA.hy926: *в* – типичный вестерн-блот; *г* – статистическая обработка результатов денситометрического анализа вестерн-блотов, N = 3. Концентрации добавленных соединений – как на рис. 2, *в–д*

ни после инкубации с разобщителями (данные не приведены).

Не увеличивая содержание митохондрий в клетках эндотелия, длительное «мягкое» разобщение приводило к изменению структуры митохондриального ретикулума (рис. 5, *в, д*). Ранее мы показали, что митохондрии в клетках EA.hy926, которые образуют полностью конглоэнтный монослой, чрезвычайно гетерогенны. Среди них наблюдалась ярко выраженная популяция раздробленных митохондрий с низким потенциалом [18]. Аналогичная гетерогенность митохондрий наблюдалась и в фибробlastах [34]. Длительная обработка (4 дня) эндотелиальных клеток низкими концентрациями C₁₂TPP (0,2 нМ) и ДНФ (5 мкМ) приводила к снижению количества полностью фрагментированных митохондрий в клетках (рис. 5, *в, д*). Эти изменения могли явиться следствием одновременной активации биогенеза митохондрий и избирательной митофагии без изменения общего

количества митохондрий. С другой стороны, влияние длительного «мягкого» разобщения на структуру митохондрий могло быть следствием антиоксидантного действия. Ранее мы показали, что митохондрии являются чувствительными сенсорами окислительного стресса в клетках. Прооксиданты вызывали фрагментацию протяженных митохондрий, а антиоксиданты, как классические, так и митохондриально-направленные, предотвращали этот эффект [39]. Можно предполагать, что уменьшение фракции фрагментированных митохондрий с низким потенциалом может способствовать снижению митохондриальной продукции АФК. Основным указанием на то, что механизм противовоспалительного действия разобщителей может быть связан со снижением содержания АФК, является тот факт, что классические антиоксиданты NAC (1–5 мМ) и Trolox (100–200 мкМ) заметно подавляли вызванную TNF активацию NFκB (рис. 3) и экспрессию ICAM1 в клетках EA.hy926 (рис. 2, *а*).

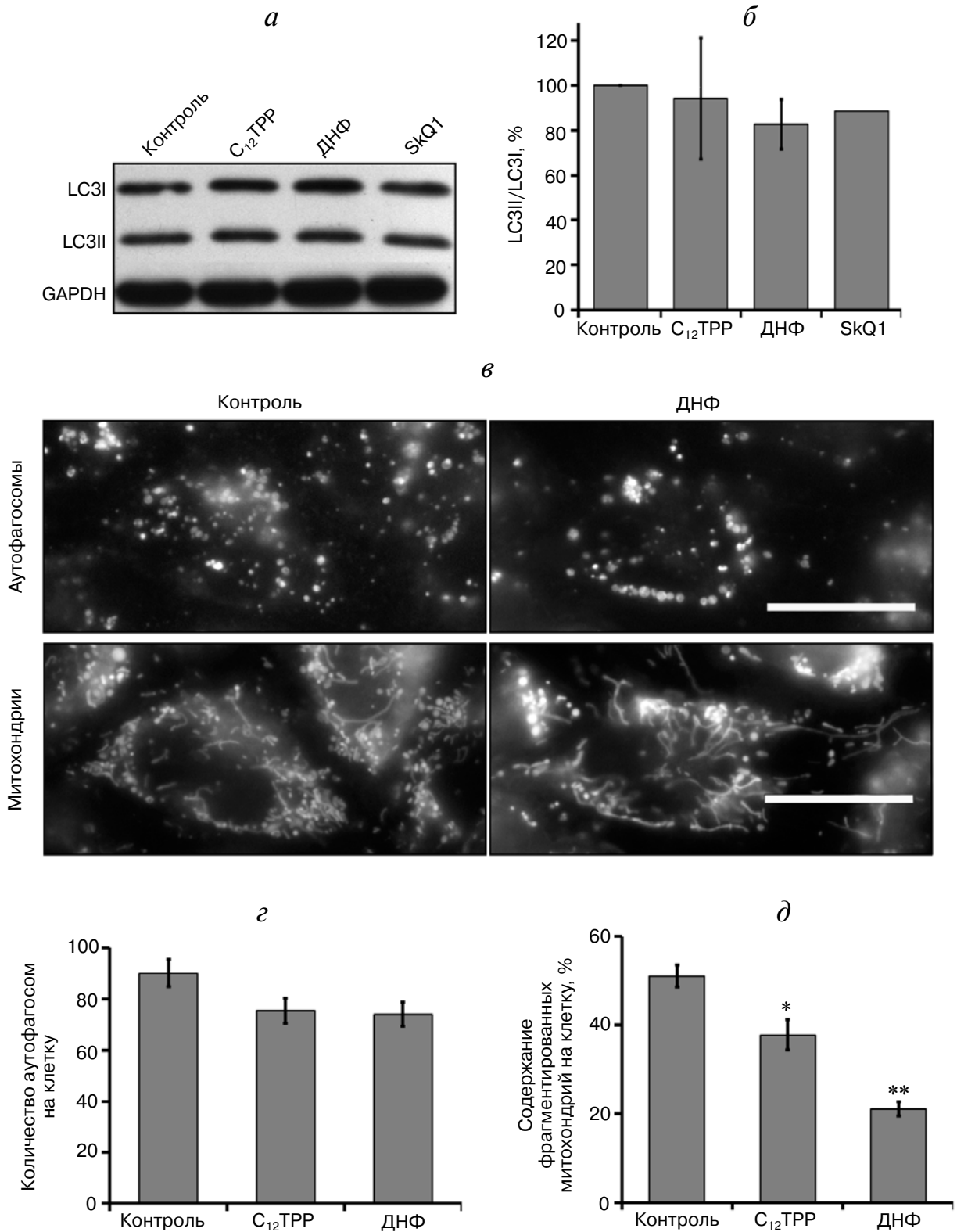


Рис. 5. Влияние C₁₂TPP и ДНФ на количество аутофагосом и структуру митохондрий в клетках EA.hy926. Содержание двух форм белка LC-3, исходной (I) и липидизированной (II): *а* – типичный вестерн-блот; *б* – статистическая обработка результатов денситометрического анализа вестерн-блотов, N = 3; *в* – флуоресцентная микроскопия, масштабная линейка – 15 мкм; *з* – количество аутофагосом на клетку, N = 11–15; *д* – относительное содержание полностью фрагментированных митохондрий на клетку. N = 7–10, * $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,001$

Полученные данные указывают на то, что длительное «мягкое» разобщение окислительного фосфорилирования приводит к индукции резистентности эндотелиальных клеток к провоспалительному действию TNF, активирующему NF κ B-зависимый сигнальный путь. Возможно, одной из причин их противовоспалительного действия является снижение генерации АФК в митохондриях. Известно, что повышенный уровень TNF в крови сопутствует множеству патологических состояний, а также старению [40]. Основной мишенью повреждающего действия TNF является эндотелий, дисфункции которого приводят к развитию различных сердечно-сосудистых патологий [41]. Ранее в моделях ишемического поражения почек и мозга была показана высокая терапевтическая эффективность катионных разобщителей [42]. Мы предполагаем, что основным механизмом, обуславливающим терапевтическое действие разобщителей, является их противовоспалительное действие на эндотелий сосудов.

Мы впервые обнаружили, что даже небольшое снижение мембранного потенциала митохондрий способно изменить физиологическое состояние эндотелия и защитить его от деструктивного действия провоспалительных цитокинов. Эти результаты открывают перспективы использования «мягких» митохондриально-

направленных разобщителей в качестве эффективных ангиопротекторов для терапии различных патологий, связанных с избыточным воспалением.

Авторы выражают глубокую благодарность В.П. Скулачеву за постоянный интерес к нашей работе и поддержку. Мы от всей души поздравляем Владимира Петровича с днем рождения и желаем ему долгих лет плодотворной работы на благо науки.

Авторы также благодарны Л.Н. Шингаровой (ИБХ РАН), М.А. Лагарьковой (Институт общей генетики РАН), С.А. Евфратову (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) и Я.Л. Калайдзидису (факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова) за предоставленные материалы и программное обеспечение, а также помощь в работе.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 14-14-00055, опыты с митохондриальными разобщителями) и РФФИ (грант 13-04-40309-Н, опыты с антиоксидантами).

Измерения относительного количества АТФ проводили на приборе VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader («PerkinElmer», США), приобретенному в рамках приоритетного направления развития МГУ им. М.В. Ломоносова (ПНР X5-13).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bruunsgaard, H., Skinhoj, P., Pedersen, A.N., Schroll, M., and Pedersen, B.K. (2000) Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis, *Clin. Exp. Immunol.*, **121**, 255–260.
- Chung, H.Y., Sung, B., Jung, K.J., Zou, Y., and Yu, B.P. (2006) The molecular inflammatory process in aging, *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 572–581.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Koller, A., Edwards, J.G., and Kaley, G. (2003) Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries, *FASEB J.*, **17**, 1183–1185.
- Dandona, P., Aljada, A., and Bandyopadhyay, A. (2004) Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes, *Trends Immunol.*, **25**, 4–7.
- Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell*, **76**, 301–314.
- Roebuck, K.A., and Finnegan, A. (1999) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression, *J. Leukoc. Biol.*, **66**, 876–888.
- Park, J., Choi, H., Min, J.S., Park, S.J., Kim, J.H., Park, H.J., Kim, B., Chae, J.I., Yim, M., and Lee, D.S. (2013) Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in microglial cells, *J. Neurochem.*, **127**, 221–232.
- West, A.P., Shadel, G.S., and Ghosh, S. (2011) Mitochondria in innate immune responses, *Nature Rev. Immunol.*, **11**, 389–402.
- Davidson, S.M., and Duchon, M.R. (2007) Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease, *Circ. Res.*, **100**, 1128–1141.
- Culic, O., Gruwel, M.L., and Schrader, J. (1997) Energy turnover of vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol.*, **273**, 205–213.
- Addabbo, F., Ratliff, B., Park, H.C., Kuo, M.C., Ungvari, Z., Csiszar, A., Krasnikov, B., Sodhi, K., Zhang, F., Nasjletti, A., and Goligorsky, M.S. (2009) The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial dysfunction: proteomic approach, *Am. J. Pathol.*, **174**, 34–43.
- Madamanchi, N.R., and Runge, M.S. (2007) Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis, *Circ. Res.*, **100**, 460–473.
- Schulz, E., Doppeide, J., Schuhmacher, S., Thomas, S.R., Chen, K., Daiber, A., Wenzel, P., Munzel, T., and Kearney, J.F., Jr. (2008) Suppression of the JNK pathway by induction of a metabolic stress response prevents vascular injury and dysfunction, *Circulation*, **118**, 1347–1357.
- Wrzosek, A., Lukasiak, A., Gwozdz, P., Malinska, D., Kozlovski, V.I., Szewczyk, A., Chlopicki, S., and Dolowy, K. (2009) Large-conductance K⁺ channel opener CGS7184 as a regulator of endothelial cell function, *Eur. J. Pharmacol.*, **602**, 105–111.
- Poburko, D., Lee, C.H., and van Breemen, C. (2004) Vascular smooth muscle mitochondria at the cross roads of Ca(2+) regulation, *Cell Calcium*, **35**, 509–521.

16. Joo, H.K., Lee, Y.R., Lim, S.Y., Lee, E.J., Choi, S., Cho, E.J., Park, M.S., Ryoo, S., Park, J.B., and Jeon, B.H. (2012) Peripheral benzodiazepine receptor regulates vascular endothelial activations via suppression of the voltage-dependent anion channel-1, *FEBS Lett.*, **586**, 1349–1355.
17. Feletou, M., and Vanhoutte, P.M. (2006) Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture), *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **291**, 985–1002.
18. Галкин И.И., Плетюшкина О.Ю., Зиновкин Р.А., Захарова В.В., Бирюков И.С., Черняк Б.В., Попова Е.Н. (2014) Митохондриально-направленные антиоксиданты предотвращают апоптоз эндотелиальных клеток, вызванный фактором некроза опухоли, *Биохимия*, **79**, 169–176.
19. Rahman, A., Kefer, J., Bando, M., Niles, W.D., and Malik, A.B. (1998) E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation, *Am. J. Physiol.*, **275**, L533–544.
20. Deshpande, S.S., Angkeow, P., Huang, J., Ozaki, M., and Irani, K. (2000) Rac1 inhibits TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species, *FASEB J.*, **14**, 1705–1714.
21. Zinovkin, R.A., Romaschenko, 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 N.Y.)*, **6**, 671–674.
22. Brigelius-Flohe, R., and Flohe, L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors, *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 2335–2381.
23. Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., and Starkov, A.A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15–18.
24. Severin, F.F., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., Rokitskaya, T.I., Cherepanov, D.A., Mokhova, E.N., Vysokikh, M.Y., Pustovidko, A.V., Markova, O.V., Yaguzhinsky, L.S., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663–668.
25. Skulachev, V.P., Antonenko, Y.N., Cherepanov, D.A., Chernyak, B.V., Izyumov, D.S., Khailova, L.S., Klishin, S.S., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Pletjushkina, O.Y., Roginsky, V.A., Rokitskaya, T.I., Severin, F.F., Severina, I.I., Simonyan, R.A., Skulachev, M.V., Sumbatyan, N.V., Sukhanova, E.I., Tashlitsky, V.N., Trendeleva, T.A., Vysokikh, M.Y., and Zvyagil'skaya, R.A. (2010) Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs), *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 878–889.
26. Duval, C., Negre-Salvayre, A., Dogilo, A., Salvayre, R., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2002) Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells, *Biochem. Cell Biol.*, **80**, 757–764.
27. Fink, B.D., Reszka, K.J., Herlein, J.A., Mathahs, M.M., and Sivitz, W.I. (2005) Respiratory uncoupling by UCP1 and UCP2 and superoxide generation in endothelial cell mitochondria, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **288**, 71–79.
28. Lee, K.U., Lee, I.K., Han, J., Song, D.K., Kim, Y.M., Song, H.S., Kim, H.S., Lee, W.J., Koh, E.H., Song, K.H., Han, S.M., Kim, M.S., Park, I.S., and Park, J.Y. (2005) Effects of recombinant adenovirus-mediated uncoupling protein 2 overexpression on endothelial function and apoptosis, *Circ. Res.*, **96**, 1200–1207.
29. Park, J.Y., Park, K.G., Kim, H.J., Kang, H.G., Ahn, J.D., Kim, H.S., Kim, Y.M., Son, S.M., Kim, I.J., Kim, Y.K., Kim, C.D., Lee, K.U., and Lee, I.K. (2005) The effects of the overexpression of recombinant uncoupling protein 2 on proliferation, migration and plasminogen activator inhibitor 1 expression in human vascular smooth muscle cells, *Diabetologia*, **48**, 1022–1028.
30. Ungvari, Z., Orosz, Z., Labinsky, N., Rivera, A., Xiangmin, Z., Smith, K., and Csizsar, A. (2007) Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF-kappaB activation in aged rat arteries, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, 37–47.
31. Barbour, J.A., and Turner, N. (2014) Mitochondrial stress signaling promotes cellular adaptations, *Int. J. Cell Biol.*, **2014**, 156020.
32. Tilstra, J.S., Clauson, C.L., Niedernhofer, L.J., and Robbins, P.D. (2011) NF-kappaB in aging and disease, *Aging Dis.*, **2**, 449–465.
33. 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.
34. Изюмов Д.С., Домнина Л.В., Непряхина О.К., Аветисян А.В., Гольшев С.А., Иванова О.Ю., Коротецкая М.В., Лямзаев К.Г., Плетюшкина О.Ю., Попова Е.Н., Черняк Б.В. (2010) Митохондрии как источники активных форм кислорода при окислительном стрессе. Исследование с помощью новых митохондриально-направленных антиоксидантов на основе «ионов Скулачева», *Биохимия*, **75**, 149–157.
35. Агапова Л.С., Черняк Б.В., Домнина Л.В., Дугина В.Б., Ефименко А.Ю., Фетисова Е.К., Иванова О.Ю., Калинина Н.И., Личиницер М.Р., Лукашев А.Н., Хромова Н.В., Копнин Б.П., Коротецкая М.В., Плетюшкина О.Ю., Попова Е.Н., Шагиева Г.С., Скулачев М.В., Степанова Е.В., Титова Е.В., Ткачук В.А., Васильев Ю.М., Скулачев В.П. (2008) Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 3. SkQ1 подавляет развитие опухолей из p53-дефицитных клеток, *Биохимия*, **73**, 1620–1638.
36. Caldeira da Silva, C.C., Cerqueira, F.M., Barbosa, L.F., Medeiros, M.H., and Kowaltowski, A.J. (2008) Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity, *Aging Cell*, **7**, 552–560.
37. Cerqueira, F.M., Laurindo, F.R., and Kowaltowski, A.J. (2011) Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, akt and mitochondrial biogenesis, *PLoS One*, **6**, e18433.
38. Lyamzaev, K.G., Izyumov, D.S., Avetisyan, A.V., Yang, F., Pletjushkina, O.Y., and Chernyak, B.V. (2004) Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis, *Acta Biochim. Pol.*, **51**, 553–562.
39. 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.
40. Bradley, J.R. (2008) TNF-mediated inflammatory disease, *J. Pathol.*, **214**, 149–160.
41. Hirata, Y., Nagata, D., Suzuki, E., Nishimatsu, H., Suzuki, J.-I., and Nagai, R. (2010) Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease, *Int. Heart J.*, **51**, 1–6.
42. Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Янкаускас С.С., Рокитская Т.И., Чупыркина А.А., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Исаев Н.К., Антоненко Ю.Н., Скулачев В.П., Зоров Д.Б. (2012) Частичное разобщение дыхания и фосфорилирования как один из путей реализации нефро- и нейропротекторного действия проникающих катионов семейства SkQ, *Биохимия*, **77**, 1240–1250.

UNCOUPLERS OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AT LOW CONCENTRATIONS PREVENT INFLAMMATORY ACTIVATION OF ENDOTHELIAL CELLS BY TUMOR NECROSIS FACTOR

V. P. Romaschenko^{1,2}, R. A. Zinovkin^{1,3,4}, I. I. Galkin¹,
V. V. Zakharova^{1,2}, A. A. Panteleeva¹, A. V. Tokarchuk^{1,2},
K. G. Lyamzaev^{1,4}, O. Yu. Pletyushkina^{1,4}, B. V. Chernyak^{1,4},
E. N. Popova^{1,4*}

¹ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991,
Russia; fax: +7(495)939-0338, E-mail: k_popova_ch@mail.ru

² M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty
of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow 119991, Russia

³ M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Moscow 119991, Russia

⁴ M. V. Lomonosov Moscow State University, Institute
of Mitoengineering, Moscow 119991, Russia

Received December 25, 2014

Revision Received January 12, 2015

Mitochondria in endothelial cells play an important regulatory role in physiology as well as in pathophysiology related to excessive inflammation. We have studied the effect of low doses of mitochondrial uncouplers on inflammatory activation of endothelial cells using classic uncouplers 2,4-dinitrophenol (DNP) and 4,5,6,7-tetrachloro-2-trifluoromethylbenzimidazole (TTFB) as well as mitochondria-targeted cationic uncoupler dodecyltriphenylphosphonium (C₁₂TPP). All studied uncouplers suppressed expression of E-selectin, adhesion molecules ICAM1 and VCAM1, as well as adhesion of neutrophils to endothelium induced by tumor necrosis factor (TNF). The antiinflammatory action of the uncouplers was at least in part mediated by the inhibition of NFκB activation due to decrease in phosphorylation of the inhibitory subunit IκBα. The dynamic concentration range for inhibition of ICAM1 expression by C₁₂TPP was three orders of magnitude higher than with the classic uncouplers. Probably decrease in membrane potential inhibited accumulation of penetrating cations into mitochondria, thus lowering uncoupling activity and preventing further loss of mitochondrial potential. Membrane potential recovery after removal of the uncouplers did not abolish its antiinflammatory action. Thus, mild uncoupling could induce TNF resistance in endothelial cells. We did not find significant stimulation of mitochondrial biogenesis and autophagy by the uncouplers. However, we observed a decrease in the relative amount of fragmented mitochondria. The latter might significantly change signaling properties of the mitochondria. Earlier, we showed that both classic and mitochondria-targeted antioxidants inhibited TNF-induced NFκB-dependent activation of endothelium. The present data suggest that the antiinflammatory effect of mild uncoupling is related to its antioxidant action.

Key words: inflammation, endothelium, adhesion molecules, mitochondria, uncoupling of oxidative phosphorylation, penetrating cations of SkQ family