

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.29

Влияние карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP) на FcεRI-зависимую продукцию цитокинов клетками RBL-2H3**А.Н. Павлюченкова^{1,2} , М.С. Смирнов^{1,2} , М.А. Челомбитко^{1,*} **¹*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;*²*Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73***e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru*

Ключевое значение в развитии аллергических заболеваний имеют тучные клетки (ТК). Основную роль в активации ТК при аллергии играет взаимодействие антигенов с иммуноглобулином E и последующее связывание этих комплексов с рецептором FcεRI, что в конечном счете приводит к быстрому экзоцитозу гранул и последующей продукции цитокинов. Имеются данные о роли мембранного потенциала митохондрий в FcεRI-зависимой активации ТК. Так, применение классических разобщителей окислительного фосфорилирования снижает уровень дегрануляции ТК. Однако их влияние на продукцию цитокинов ТК не изучено. В настоящей работе было продемонстрировано, что предварительная обработка ТК линии RBL-2H3 разобщителем карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразоном (FCCP) приводит к уменьшению не только уровня FcεRI-зависимой дегрануляции, но и продукции цитокинов TNFα и IL-4. При этом FCCP препятствует фосфорилированию адаптерной молекулы LAT, а также киназы Erk1/2, что может лежать в основе ингибирующего влияния разобщителя на FcεRI-зависимую активацию клеток линии RBL-2H3. Полученные данные свидетельствуют о том, что мембранный потенциал митохондрий играет важную роль в FcεRI-зависимой активации ТК, а разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания митохондрий с помощью разобщителей может использоваться для регуляции этого процесса.

Ключевые слова: *тучные клетки, разобщители, митохондрии, аллергия, FcεRI-зависимая активация, FCCP*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-4

Ключевое значение в развитии аллергических заболеваний играют тучные клетки (ТК). Они выполняют свои функции за счет секреции широкого спектра биологически активных соединений. Медиаторы ТК можно разделить на две категории: предварительно сформированные медиаторы, которые запасаются в секреторных гранулах, и вновь синтезированные медиаторы, образуемые только после стимуляции клеток. Секреторные гранулы ТК содержат лизосомальные белки (такие как β-гексозаминидаза), биогенные амины (такие как гистамин и серотонин), гликозаминогликаны (такие как сульфаты гепарина и хондроитина) и ферменты (такие как триптаза и химаза). Ко второй группе медиаторов относятся метаболиты арахидоновой кислоты, цитокины, хемокины и факторы роста [1–4].

Основную роль в активации ТК при аллергии играет взаимодействие антигенов с иммуноглобулином E (IgE) и последующее связывание этих комплексов с его высокоафинным рецептором FcεRI, что в конечном счете приводит к быстрому

экзоцитозу гранул и последующей продукции вновь синтезированных медиаторов [5].

В литературе имеются данные о роли мембранного потенциала митохондрий (ΔΨ_m) в FcεRI-зависимой активации ТК. Так, разобщитель карбонилцианид-4-хлорфенилгидразон ингибирует антиген-индуцированную секрецию β-гексозаминидазы в линии ТК крыс RBL-2H3 [6]. Разобщитель карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон (FCCP) также подавлял уровень IgE-опосредованной дегрануляции ТК костного мозга мышей и клеток RBL-2H3 [7].

Многие природные и синтетические соединения обладают разобщающей активностью. Одним из таких соединений является антибактериальный и противогрибковый агент триклозан. Триклозан вызывает снижение ΔΨ_m и продукции АТФ, а также способствует фрагментации митохондрий и образованию активных форм кислорода (АФК) в нестимулированных клетках RBL-2H3. При стимуляции ТК триклозан ингибирует полимериза-

цию микротрубочек и транслокацию митохондрий к плазматической мембране, а также подавляет поступление внеклеточного Ca^{2+} через плазматическую мембрану. В то же время триклозан увеличивает экспрессию цитокина TNF α [8, 9]. Влияние классических разобщителей на продукцию вновь синтезированных медиаторов исследовано не было. Среди классических разобщителей FCCP является одним из наиболее широко используемых агентов и помимо непосредственного разобщения окислительного фосфорилирования может оказывать влияние на такие клеточные процессы, как аутофагия, синтез АФК, перемещение митохондрий, поддержание гомеостаза кальция, регуляция рН лизосом [10]. В частности, существует ряд работ в рамках исследования возможных механизмов действия FCCP на активацию ТК [7, 11, 12]. В связи с этим нами было изучено воздействие разобщителя FCCP на продукцию вновь синтезированных цитокинов в клетках базофильной лейкемии крыс RBL-2H3.

Материалы и методы

Клетки и схема их обработки. Исследования проводили на клеточной линии базофильной лейкемии крысы (RBL-2H3). Для культивирования клеток использовали смесь сред α -MEM (ПанЭко, Россия) и RPMI (ПанЭко, Россия) в соотношении 7:2, с добавлением 0,3 г/л L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), при 37°C и 5% CO_2 . Клетки пассировали с использованием смеси растворов Версена и трипсина (ПанЭко, Россия). Эксперименты проводили на 6- и 12-луночных планшетах для адгезионных культур (Eppendorf, США).

Тест на цитотоксичность. Влияние FCCP (Sigma, США) на жизнеспособность клеток линии RBL-2H3 оценивали с использованием резазуринового теста. Клетки высевали в 96-луночный планшет (10 тыс. клеток на лунку) и обрабатывали FCCP в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 2 ч при 37°C и 5% CO_2 . Далее клетки отмывали в среде и через 24 ч анализировали их жизнеспособность. Для этого к клеткам добавляли 25 мкл стокового раствора резазурина в концентрации 1,25 мМ (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в течение 3 ч при 37°C и 5% CO_2 . Уровень флуоресценции резорурфина, образующегося в результате восстановления резазурина в образцах, регистрировали при длинах волн поглощения и эмиссии 560 нм и 590 нм соответственно с использованием планшетного флуориметра Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, США).

Сенсибилизация и антигенная стимуляция клеток. Сенсибилизацию клеток проводили путем инкубации в течение ночи с мышиными моноклональными антителами изотипа IgE к динитрофенилу (Sigma, #D8406, США) в концентрации 0,2 мкг/мл. Для последующей антигенной

стимуляции сенсибилизированные клетки отмывали в буфере Хэнкса (ПанЭко, Россия) (эксперименты по оценке уровня дегрануляции) или в среде (эксперименты по оценке уровня продукции цитокинов и исследования сигналинга), затем на различное время (указано в подписях к рисункам) добавляли 1 мкг/мл динитрофенола, конъюгированного с бычьим сывороточным альбумином (ДНФ-БСА) (Molecular probes, #A23018, США). Перед антигенной стимуляцией к клеткам добавляли FCCP в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкМ и инкубировали 37°C и 5% CO_2 в течение 1 ч.

Оценка уровня дегрануляции клеток. Уровень спонтанной (в отсутствие стимуляции) и Fc ϵ RI-зависимой дегрануляции клеток линии RBL-2H3 оценивали путем выявления активности β -гексозаминидазы в кондиционированной среде и лизате клеток, которую измеряли по высвобождению p-нитрофенола из субстрата (4-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид, Sigma, США) по стандартной методике [13]. Флуоресценцию образцов регистрировали при помощи планшетного флуориметра Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 460 нм (длина волны поглощения 355 нм) и программного обеспечения Ascent Software ver. 2.6. Уровень высвобождения β -гексозаминидазы (%) в образце определяли по формуле $A/(A+B) \times 100\%$, где A – интенсивность флуоресценции в кондиционированной среде, B – интенсивность флуоресценции клеточного лизата.

Выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени. Выделение РНК проводили по протоколу с реагентами Quick-RNATM MiniPrep (Zymo Research, США). Измерение концентрации РНК проводили с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и программного обеспечения ND-1000 ver. 3.8.1. кДНК получали с использованием набора RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием реакционной смеси, состоящей из флуоресцентного интеркалирующего красителя EvaGreen, референсного красителя ROX, ДНК-полимеразы SynTaq, набора дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, глицерина, Tween 20, KCl, TrisHCl (pH 8,8) и MgCl_2 (Синтол, Россия). Амплификацию осуществляли с использованием CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) и программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager ver. 3.1 в следующих условиях: 95°C 3' → (95°C 15' → 56°C 15' → 72°C 15') × 40. Для расчета изменений относительной экспрессии генов применяли метод $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. В качестве референсного гена для нормирования данных об экспрессии мРНК целевых генов использовали

ген *18S* рибосомальной РНК. Последовательности праймеров указаны в табл. 1.

Вестерн-блот. Для разделения образцов методом электрофореза в SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel) при денатурирующих условия использовали 5%-й концентрирующий и 12%-й разделяющий гели. Идентификацию молекулярных масс белков проводили с использованием коммерческой смеси лизатов окрашенных белков PageRuler™ (Thermo Fisher Scientific, США). После этого осуществляли электроблоттинг образцов с геля на мембрану LF PVDF (Bio-Rad, США) в течение 120 мин при постоянной силе тока 200 мА. Для блокирования неспецифического связывания вторичных антител мембраны инкубировали в течение 20 мин в блокирующем буфере, содержащем 5%-е обезжиренное молоко, 0,1% детергента Tween 20 (AppliChem, Германия) в физиологическом растворе с трис-буфером, а далее на мембраны последовательно наносили раствор первичных и вторичных антител (табл. 2) с соответствующими промывками. Инкубацию с первичными антителами осуществляли в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами – в течение 1 ч при комнатной температуре. Для проявления сигнала использовали набор SuperSignal West Dura (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Реакцию визуализировали при помощи прибора ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США), дальнейшую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad, США).

Определение концентрации цитокинов *IL-4* и *TNFα*. Определение уровня цитокинов *IL-4* и *TNFα* в среде культивирования осуществлялось с помощью коммерческих наборов для иммуно-

ферментного анализа (MyBioSource, США) согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 путем сравнения групп с помощью двухстороннего дисперсионного анализа (ANOVA) и теста множественных сравнений Тьюки.

Результаты

Клеточная линия базофильной лейкемии крыс RBL-2H3 использовалась в данном исследовании в качестве модели ТК. Эти клетки используются в качестве общепринятой модели в исследованиях FcεRI-зависимой активации базофилов и ТК [14]. Для оценки цитотоксичности FCCP был применен резазуриновый тест. FCCP ни в одной из исследуемых нами концентраций не снижал жизнеспособность клеток (рис. 1А). Также мы подтвердили полученные другими авторами данные об ингибирующем влиянии FCCP на уровень FcεRI-зависимой дегрануляции клеток линии RBL-2H3. Так, предобработка клеток FCCP в концентрации 10 мкМ приводила к значимому снижению уровня высвобождения β-гексозаминидазы, в то время как более низкие концентрации не вызывали такого эффекта (рис. 1Б).

На следующем этапе мы оценили влияние FCCP на уровень экспрессии генов цитокинов *IL-4* и *TNFα*. Анализ результатов данного эксперимента показал, что предварительная инкубация клеток RBL-2H3 с FCCP в концентрации 10 мкМ приводит к значимому снижению FcεRI-зависимой продукции мРНК гена *IL-4*, но не оказывает влияния на продукцию мРНК гена *TNF* (рис. 1В и 1Г).

Таблица 1

Последовательности праймеров для количественной ПЦР

Целевой ген	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>rIL-4</i>	TTACGGCAACAAGGAACAC	TTCTTCAAGCACGGAGGTA
<i>rTNF</i>	TTATCTACTCCCAGGTTCT	TGGTATGAAATGGCAAATC
<i>r18S</i>	GACAGGATTGACAGATTGAT	TTATCGGAATTAACCAGACAA

Таблица 2

Перечень антител, использованных для вестерн-блоттинга

Антиген	Производитель антител	Тип антител	Разведение
LAT	Cell Signaling Technology #45533	Кроличьи моноклональные	1:1000
Phospho-LAT (Tyr220)	Cell Signaling Technology #3584	Кроличьи поликлональные	1:1000
p38 MAPK	Cell Signaling Technology #9212	Кроличьи IgG	1:1000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technology #4631	Кроличьи IgG	1:1000
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling Technology #4695	Кроличьи IgG	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology #4370	Кроличьи IgG	1:1000
PI3 Kinase p85	Cell Signaling Technology #4257	Кроличьи моноклональные IgG	1:500
Phospho-PI3 Kinase p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199)	Cell Signaling Technology #4228	Кроличьи поликлональные	1:500
Anti-Mouse IgG (Fab-specific)	Sigma-Aldrich A9917	Козьи поликлональные	1:30000
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)	Sigma-Aldrich A0545	Козьи поликлональные	1:30000

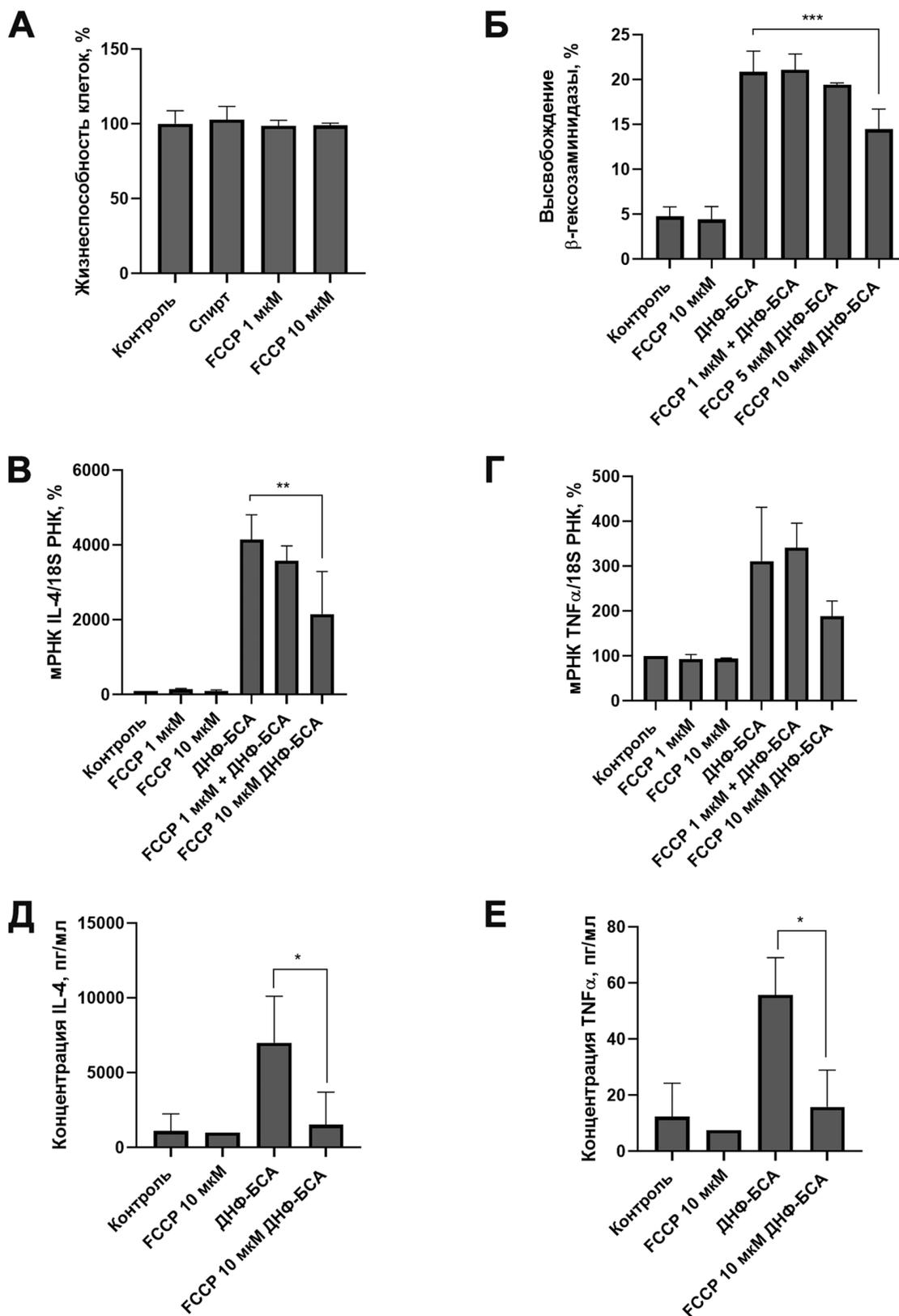


Рис. 1. FCCP подавляет FcεRI-зависимую активацию клеток линии RBL-2H3. Клетки сенсibilizировали мышинными моноклональными антителами изотипа IgE против динитрофенола в концентрации 0,2 мкг/мл в течение ночи. Далее клетки обрабатывали 1 и 10 мкМ FCCP в течение 2 ч, после чего стимулировали FcεRI-зависимую активацию путем добавления 1 мкг/мл динитрофенола, конъюгированного с бычьим сывороточным альбумином (ДНФ-БСА). Уровень дегрануляции определяли через 20 мин после стимуляции, уровень мРНК генов *IL-4* и *TNFα* – через 2 ч, концентрацию цитокинов *IL-4* и *TNFα* – через 24 ч. Влияние FCCP: А – на жизнеспособность клеток. Б – на уровень спонтанной (в отсутствие ДНФ-БСА) и ДНФ-БСА-индуцированной дегрануляции клеток. В–Г – на базовый (в отсутствие ДНФ-БСА) и ДНФ-БСА-индуцированный уровень мРНК генов *IL-4* (В) и *TNFα* (Г). Д–Е – на базовый (в отсутствие ДНФ-БСА) и ДНФ-БСА-индуцированный уровень цитокинов *IL-4* (Д) и *TNFα* (Е). Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n ≥ 3); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

Более низкая концентрация не влияет на FcεRI-зависимое образование мРНК генов *IL-4* и *TNF*. В то же время результаты иммуноферментного анализа продемонстрировали ингибирующее влияние 10 мкМ FCCP на уровень FcεRI-зависимой секреции цитокинов IL-4 и TNFα (рис. 1Д и 1Е).

Для того чтобы выяснить механизм ингибирующего влияния FCCP на FcεRI-зависимую дегрануляцию клеток линии RBL-2H3 и секрецию ими цитокинов IL-4 и TNFα, мы проверили его действие на активацию ключевых компонентов FcεRI-зависимого сигналинга. Мы обнаружили, что предварительная инкубация клеток с FCCP в концентрации 10 мкМ приводит к снижению базового уровня фосфорилирования адаптерной молекулы LAT (линкерный белок для активации Т-клеток) (рис. 2). Фосфорилирование данной молекулы киназами Syk и Lyn приводит к сборке сигнального комплекса, активирующего фосфолипазу Cγ и Ca²⁺-зависимую дегрануляцию, а также активацию митоген-активируемых протеинки-

наз (MAPKs) — Erk1/2, p38 и JNK, что приводит к продукции цитокинов [15, 16].

Через 1 мин после стимуляции клеток ДНФ-БСА наблюдалось значимое увеличение уровня фосфорилирования адаптерной молекулы LAT, уже через 15 мин уровень фосфорилирования падал практически до уровня контроля. FCCP предотвращал увеличение фосфорилирования LAT (рис. 2). Кроме того, FcεRI-зависимая активация сопровождалась увеличением активности MAP-киназ Erk1/2 и p38, а также киназы PI3K уже через 1 мин после стимуляции и сохранялась через 15 мин (рис. 2). При этом FCCP значимо снижал уровень фосфорилирования киназы Erk1/2, не оказывал влияние на активность киназы PI3K и увеличивал уровень фосфорилирования киназы p38 (рис. 2).

Таким образом, FCCP снижает не только уровень FcεRI-зависимой дегрануляции клеток линии RBL-2H3, но и продукцию ими цитокинов IL-4 и TNFα, а также препятствует фосфорилированию адаптерной молекулы LAT и киназы Erk1/2.

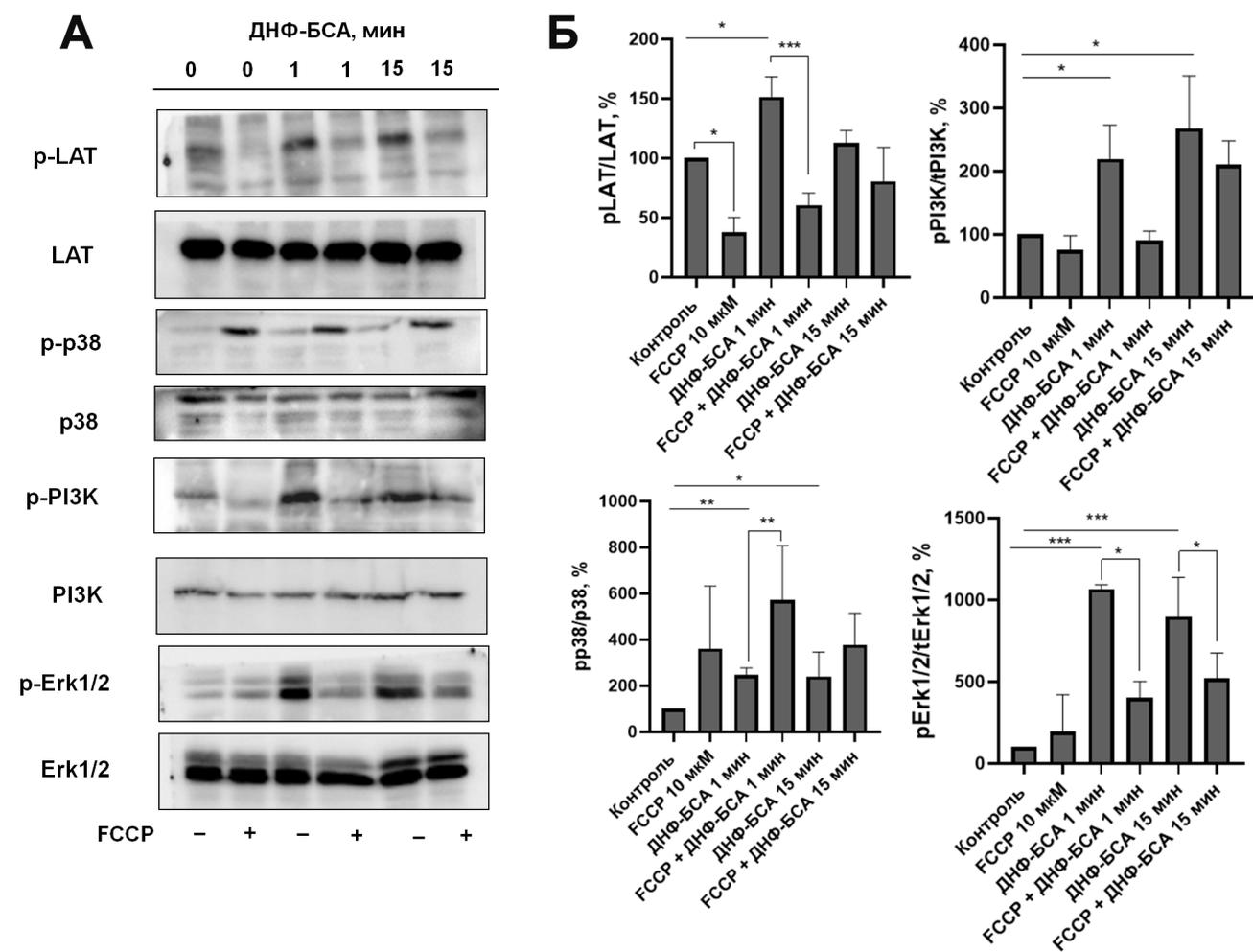


Рис. 2. Влияние FCCP на ключевые компоненты FcεRI-зависимого сигналинга клеток линии RBL-2H3. Клетки сенсibilizировали мышинными моноклональными антителами изотипа IgE против динитрофенола в концентрации 0,2 мкг/мл в течение ночи. Далее клетки обрабатывали 1 и 10 мкМ FCCP в течение 2 ч, после чего вызывали FcεRI-зависимую активацию путем добавления 1 мкг/мл динитрофенола, конъюгированного с бычьим сывороточным альбумином (ДНФ-БСА) в течение 1 и 15 мин. А — Вестерн-блоттинг клеточных лизатов. Б — Гистограммы, отражающие относительное количество фосфорилированных форм белков. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n ≥ 3); #p ≤ 0,1, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

Обсуждение

ТК представляют собой важную популяцию клеток соединительной ткани, играющую критическую роль в поддержании ее гомеостаза. ТК являются важными участниками реакций, как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Эти клетки наиболее известны своим участием в IgE-ассоциированных реакциях гиперчувствительности немедленного типа и других аллергических заболеваниях. Основной тип активации ТК осуществляется путем взаимодействия антигенов с IgE и его последующим связыванием с высокоафинным рецептором FcεRI. Это приводит к запуску внутриклеточного FcεRI-сигналинга, экзоцитозу гранул с преформированными медиаторами и продукции вновь образованных медиаторов, к которым относятся метаболиты арахидоновой кислоты, цитокины, хемокины и факторы роста [17]. Связывание комплексов, состоящих из антигена и молекул IgE, с рецептором FcεRI приводит к фосфорилированию тирозинов в участках ITAM (тирозинсодержащие активационные последовательности остатков аминокислот) киназой Lyn из семейства киназ Src. Кроме того, Lyn активирует другую киназу из семейства Src – Syk. Субстратом для Syk является LAT, фосфорилирование которого инициирует сборку сигнального комплекса белков [15], что в конечном счете стимулирует фосфолипазу C_γ и Ca²⁺-зависимую дегрануляцию, а также активацию RAF-зависимого сигнального пути. В свою очередь это приводит к фосфорилированию и активации киназы Erk1/2 (киназы, регулируемой внеклеточным сигналом 1/2). Аналогичным образом увеличивается активность аминотерминальной киназы MAPK-каскада JUN (JNK) и p38 [16], но механизмы регуляции этих реакций изучены в меньшей степени. Все эти молекулы (Erk1/2, p38 и JNK), в свою очередь, активируют факторы транскрипции – включая компоненты белка-активатора 1 (AP1) FOS и JUN, ядерный фактор активированных T-клеток (NFAT) [15] и ядерный фактор-κB (NF-κB) [18]. Активация данных транскрипционных факторов ведет к продукции цитокинов. Каскад MAPK-киназ также участвует в регуляции FcεRI-индуцированной продукции липидных медиаторов (эйкозаноидов) через фосфолипазу A₂, которая транслоцируется из цитозоля в ответ на увеличение содержания в нем Ca²⁺ [19]. Существует также LAT-независимый путь активации ТК, осуществляемый киназой Fyn, фосфорилирующей адаптерную молекулу NTAL, в свою очередь активирующую фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K). Считается, что данный путь обеспечивает поддержание активированного состояния ТК [20].

В литературе имеются данные о роли мембранного потенциала митохондрий (ΔΨ_m) в FcεRI-зависимой активации мастоцитов. Так, использова-

ние классических разобщителей карбонилцианид-м-хлорфенилгидразона и FCCP ингибирует FcεRI-зависимую секрецию β-гексозаминидазы ТК *in vitro* [6, 7, 11]. Кроме того, антибактериальный и противогрибковый агент триклозан, обладающий разобщающей активностью, также снижал уровень дегрануляции ТК, но при этом увеличивал экспрессию цитокина TNFα [8, 9].

В нашей работе мы показали, что обработка клеток линии RBL-2H3 разобщителем FCCP не только снижает FcεRI-зависимую секрецию β-гексозаминидазы, но и снижает уровень мРНК гена цитокина IL-4, а также подавляет секрецию TNFα и IL-4 (рис. 1). Это свидетельствует о том, что FCCP снижает как уровень FcεRI-зависимой дегрануляции ТК, так и продукцию ими цитокинов. Результаты исследования активации ключевых сигнальных молекул, участвующих в FcεRI-зависимом сигналинге, показали, что FCCP препятствует фосфорилированию адаптерной молекулы LAT, а также киназы Erk1/2, что может лежать в основе ингибирующего влияния разобщителя на FcεRI-зависимую активацию клеток линии RBL-2H3. В литературе имеются данные о влиянии разобщения на регуляцию уровня активности Erk1/2. Как было написано выше, дефицит разобщающего белка митохондрий UCP2 в ТК костного мозга мышей приводит к повышению уровней FcεRI-зависимой дегрануляции, продукции IL-6 и простагландина D₂, а также фосфорилирования Erk1/2 [21].

FCCP не оказывал значимого влияния на уровень фосфорилирования киназы PI3K, являющейся частью LAT-независимого пути, и увеличивал базовый уровень фосфорилирования MAP-киназы p38 (рис. 2). Однако через 15 мин после антигенной стимуляции данный эффект исчезал. Активация p38 под действием FCCP может происходить в результате активации киназы AMPK (AMP-activated protein kinase) [22, 23]. Так, известно, что активация киназы AMPK вследствие падения уровня АТФ является одним из первых и ключевых ответов клетки на разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания в митохондриях [24]. Кроме того, имеются сведения о том, что AMPK подавляет активность киназы Erk1/2 [25, 26]. Также интересно отметить, что AMPK является негативным регулятором FcεRI-зависимой активации ТК [27, 28]. Это могло бы вносить свой вклад в механизм ингибирующего влияния FCCP. Чтобы понять, является ли наблюдаемое в нашей системе увеличение уровня фосфорилирования киназы p38 следствием активации AMPK, требуются дополнительные эксперименты.

Еще одним эффектом разобщения может являться снижение генерации АФК [24]. Многие из молекул FcεRI-зависимого сигналинга являются АФК-чувствительными, в том числе LAT и Erk1/2 [29]. Наряду с другими тирозинфосфатазами, АФК окисляют активный центр SPH-2

и снижают тем самым ее каталитическую активность, что приводит к избыточному фосфорилированию ее мишеней-участников FcεRI-зависимого сигналинга, в частности Syk [30]. Также было показано, что продукция эндогенных АФК, наравне с экзогенными, повышает активность киназы Lyn, находящейся в самом начале каскада сигнальных белков [31].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что применение разобщителя FCCP приводит к снижению как уровня FcεRI-зависимой дегрануляции клеток линии RBL-2H3, так и секреции цитокинов IL-4 и TNFα, а также препятствует фосфорилированию компонентов

FcεRI-зависимого сигналинга – адаптерной молекулы LAT и киназы Erk1/2. Полученные данные свидетельствуют о том, что ΔΨm играет важную роль в FcεRI-зависимой активации ТК, а разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания митохондрий с помощью разобщителей может использоваться для регуляции этого процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00081). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. da Silva E.Z.M., Jamur M.C., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem.* 2014;62(10):698–738.
2. Krystel-Whittemore M., Dileepan K.N., Wood J.G. Mast cell: A multi-functional master cell. *Front. Immunol.* 2015;6:620.
3. Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14(7):478–494.
4. Pejler G., Hu Frisk J.M., Sjöström D., Paivandy A., Öhrvik H. Acidic pH is essential for maintaining mast cell secretory granule homeostasis. *Cell Death Dis.* 2017;8(5):e2785.
5. Kanagaratham C., El Ansari Y.S., Lewis O.L., Oettgen H.C. IgE and IgG antibodies as regulators of mast cell and basophil functions in food allergy. *Front. Immunol.* 2020;11:603050.
6. Mohr F. C., Fewtrell C. The relative contributions of extracellular and intracellular calcium to secretion from tumor mast cells. Multiple effects of the proton ionophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *J. Biol. Chem.* 1987;262(22):10638–10643.
7. Suzuki Y., Yoshimaru T., Inoue T., Ra C. Mitochondrial Ca²⁺ flux is a critical determinant of the Ca²⁺ dependence of mast cell degranulation. *J. Leukoc. Biol.* 2006;79(3):508–518.
8. Weatherly L.M., Shim J., Hashmi H.N., Kennedy R.H., Hess S.T., Gosse J.A. Antimicrobial agent triclosan is a proton ionophore uncoupler of mitochondria in living rat and human mast cells and in primary human keratinocytes. *J. Appl. Toxicol.* 2016;36(6):777–789.
9. Weatherly L.M., Nelson A.J., Shim J., Riitano A.M., Gerson E.D., Hart A.J., de Juan-Sanz J., Ryan T.A., Sher R., Hess S.T., Gosse J.A. Antimicrobial agent triclosan disrupts mitochondrial structure, revealed by super-resolution microscopy, and inhibits mast cell signaling via calcium modulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018;349:39–54.
10. Demine S., Renard P., Arnould T. Mitochondrial uncoupling: A key controller of biological processes in physiology and diseases. *Cells.* 2019;8(8):795.
11. Sagi-Eisenberg R., Pecht I. Resolution of cellular compartments involved in membrane potential changes accompanying IgE-mediated degranulation of rat basophilic leukemia cells. *EMBO J.* 1984;3(3):497–500.
12. Inoue T., Suzuki Y., Ra C. Epigallocatechin-3-gallate inhibits mast cell degranulation, leukotriene C4 secretion, and calcium influx via mitochondrial calcium dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 2010;49(4):632–640.
13. Rådinger M., Jensen B.M., Swindle E., Gilfillan A.M. Assay of mast cell mediators. *Mast cells. Methods in molecular biology, vol 1220.* Eds. M. Hughes and K. McNagny. N.Y.: Humana Press; 2015:307–323.
14. Falcone F.H., Wan D., Barwary N., Sagi-Eisenberg R. RBL cells as models for *in vitro* studies of mast cells and basophils. *Immunol. Rev.* 2018;282(1):47–57.
15. Turner H., Kinet J.P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature.* 1999;402(6760):B24–B30.
16. Saitoh S.I., Odom S., Gomez G., Sommers C.L., Young H.A., Rivera J., Samelson L.E. The four distal tyrosines are required for LAT-dependent signaling in FcεRI-mediated mast cell activation. *J. Exp. Med.* 2003;198(5):831–843.
17. Fitzsimmons C.M., Falcone F.H., Dunne D.W. Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity. *Front. Immunol.* 2014;5:61.
18. Marquardt D.L., Walker L.L. Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor-κB activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;105(3):500–505.
19. Murakami M., Taketomi Y. Secreted phospholipase A2 and mast cells. *Allergol. Int.* 2015;64(1):4–10.
20. Gilfillan A.M., Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol. Rev.* 2009;228(1):149–169.
21. Tagen M., Elorza A., Kempuraj D., Boucher W., Kopley C.L., Shirihai O.S., Theoharides T.C. Mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits mast cell activation and reduces histamine content. *J. Immunol.* 2009;183(10):6313–6319.
22. Li J., Miller E.J., Ninomiya-Tsuji J., Russell R.R., Young L.H. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ. Res.* 2005;97(9):872–879.
23. Lanna A., Henson S.M., Escors D., Akbar A.N. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nat. Immunol.* 2014;15(10):965–972.
24. Demine S., Renard P., Arnould T. Mitochondrial uncoupling: a key controller of biological processes in physiology and diseases. *Cells.* 2019;8(8):795.
25. Tong S., Zhou T., Meng Y., Xu D., Chen J. AMPK decreases ERK1/2 activity and cancer cell sensitivity to nutrition deprivation by mediating a positive feedback loop involving eEF2K. *Oncol. Lett.* 2020;20(1):61–66.

26. Meng R., Pei Z., Zhang A., Zhou Y., Cai X., Chen B., Liu G., Mai W., Wei J., Dong Y. AMPK activation enhances PPAR α activity to inhibit cardiac hypertrophy via ERK1/2 MAPK signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011;511(1–2):1–7.

27. Hwang S.L., Li X., Lu Y., Jin Y., Jeong Y.T., Kim Y.D., Lee I.K., Taketomi Y., Sato H., Cho Y.S., Murakami M., Chang H.W. AMP-activated protein kinase negatively regulates Fc ϵ RI-mediated mast cell signaling and anaphylaxis in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;132(3):729–736.

28. Lin K.C., Huang D.Y., Huang D.W., Tzeng S.J., Lin W.W. Inhibition of AMPK through Lyn-Syk-Akt enhances Fc ϵ RI signal pathways for allergic response. *J. Mol. Med.* 2016;94(2):183–194.

29. Chelombitko M.A., Fedorov A.V., Ilyinskaya O.P., Zinovkin R.A., Chernyak B.V. Role of reactive oxygen species in mast cell degranulation. *Biochemistry (Mosc.)* 2016;81(12):1564–1577.

30. Jang J. Y., Min J.H., Chae Y.H., Baek J.Y., Wang S.B., Park S.J., Oh G.T., Lee S.H., Ho Y.S., Chang T.S. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via SHP-2 oxidation. *Antioxid. Redox Signal.* 2014;20(16):2528–2540.

31. Yoo S.K., Starnes T.W., Deng Q., Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction *in vivo*. *Nature.* 2011;480(7375):109–112.

Поступила в редакцию 18.03.2023

После доработки 05.05.2023

Принята в печать 10.05.2023

RESEARCH ARTICLE

Effect of 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone carbonyl cyanide (FCCP) on Fc ϵ RI-dependent cytokine production by RBL-2H3 cells

A.N. Pavlyuchenkova^{1,2} , M.S. Smirnov^{1,2} , M.A. Chelombitko^{1,3,*} 

¹*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie gory, Moscow, 119992, Russia;*

²*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 1–73 Leninskie gory, Moscow, 119992, Russia*

*e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru

Mast cells (MCs) play a key role in the development of allergic diseases. The interaction of antigens with immunoglobulin E and the subsequent binding of these complexes to the Fc ϵ RI receptor, which ultimately leads to rapid exocytosis of granules and subsequent production of cytokines, play a major role in MC activation in allergy. There is data on the role of the mitochondrial membrane potential in the Fc ϵ RI-dependent activation of MC. Thus, the use of classical uncouplers of oxidative phosphorylation reduces MC degranulation. However, their effect on the production of MC cytokines has not been studied. In the present work, it was demonstrated that pretreatment of RBL-2H3 mast cells with the uncoupler carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) leads to a decrease not only in Fc ϵ RI-dependent degranulation, but also in a decrease in the production of TNF α and IL-4 cytokines. At the same time, FCCP prevents the phosphorylation of the LAT adapter molecule, as well as the Erk1/2 kinase, which may underlie the inhibitory effect of the uncoupler on Fc ϵ RI-dependent activation of RBL-2H3 cell line. The data obtained indicate that the mitochondrial membrane potential plays an important role in the Fc ϵ RI-dependent activation of MC, and the uncoupling of oxidative phosphorylation and respiration of mitochondria with the help of uncouplers can be used to regulate this process.

Keywords: mast cells, uncouplers, mitochondria, allergy, Fc ϵ RI-dependent activation, FCCP

Funding: The research was supported by Russian Science Foundation (project No 22-74-00081).

Сведения об авторах

Павлюченкова Анастасия Никитична – аспирантка факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, инженер 1-й категории отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: anabella.gen@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3694-8007>

Смирнов Максим Сергеевич – студент факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, ст. лаборант отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: maksimsmirnov1028@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-8897-1517>

Челомбитко Мария Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3902-7812>