

ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ И ПРОГРАММИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ ТИМОХИНОНА – БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО КОМПОНЕНТА *Nigella sativa*

© 2016 г. Г.Г. Маргинович, И.В. Маргинович, А.В. Вчерашняя,
О.И. Шадыро, С.Н. Черенкевич

Белорусский государственный университет, 220030, Минск, просп. Независимости, 4, Республика Беларусь

E-mail: martinovichgg@bsu.by

Поступила в редакцию 19.02.16 г.

С применением методов флуоресцентного и ингибиторного анализа исследованы механизмы отклика опухолевых клеток на действие 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинона (тимохинона) и 1,4-бензохинона. Обнаружено, что хиноны усиливают внутриклеточную продукцию активных форм кислорода, вызывают снижение митохондриального мембранного потенциала и индуцируют гибель опухолевых клеток по различным механизмам. Показано, что тимохинон, инициирующий более низкий выход активных форм кислорода в сравнении с 1,4-бензохиноном, является более токсичным в отношении опухолевых клеток. Установлено, что образующиеся при действии тимохинона активные формы кислорода являются участниками редокс-сигнальных процессов, ведущих к формированию митохондриальных пор высокой проницаемости и запуску программируемой клеточной гибели. Полученные результаты позволяют предположить, что важным условием функционирования установленного редокс-сигнального механизма является колокализация митохондриальных оксидоредуктаз, вовлеченных в образование активных форм кислорода, и мишеней действия активных форм кислорода, участвующих в механизме запуска апоптоза.

Ключевые слова: активные формы кислорода, бензохинон, тимохинон, митохондрии, апоптоз, редокс-сигнализация.

Поиск и установление новых механизмов регуляции функциональной активности клеток является необходимым этапом развития новых клеточных технологий и относится к числу актуальных направлений современной биофизики. Среди разнообразных регуляторов функциональной активности клеток особое место занимают редокс-активные соединения, способные регулировать протекание окислительно-восстановительных процессов в клетках [1,2]. Неослабевающий интерес к изучению механизмов действия редокс-активных соединений в биологических системах объясняется чрезвычайно широким спектром их физиологических эффектов.

Показано, что эндогенные (пероксид водорода, глутатион, убихинон и др.) и экзогенные (антиоксиданты, прооксиданты и др.) редокс-

активные соединения участвуют в регуляции регенеративных и адаптационных процессов, иммунного ответа, дифференцировки, пролиферации и апоптоза [3–6]. В результате сопряженного функционирования оксидоредуктаз и низкомолекулярных редокс-активных соединений в клетках поддерживается определяющий их жизнедеятельность редокс-гомеостаз, для количественной характеристики которого нами обоснованы новые физико-химические параметры – эффективный редокс-потенциал и редокс-буферная емкость [7–9]. Показано, что биологический эффект действия редокс-активных соединений определяется не конкретной молекулой, а группой взаимодействующих участников, образующих электрон-транспортные цепи, и зависит от величин параметров редокс-гомеостаза [10,11].

Одним из следствий нарушения клеточных электрон-транспортных процессов является повышенное образование активных форм кислорода (АФК), обуславливающее развитие окислительного стресса и гибель клеток. Длительное повышение концентрации окислителей играет

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, CM-H₂DCF – 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин, mPTPs – митохондриальные поры высокой проницаемости, $\Delta\theta_m$ – митохондриальный мембранный потенциал, TMRE – этиловый эфир тетраметилродамина.

важную роль в процессах старения организма и развитии ряда заболеваний, включая онкологические и сердечно-сосудистые заболевания [12]. Поэтому фармакологические препараты, способные регулировать клеточные редокс-процессы, используются в сердечно-сосудистой и противоопухолевой терапии [13].

К актуальным задачам современной медицинской биофизики относится разработка эффективных средств и технологий регуляции электрон-транспортных процессов. Технологии управления функциональными свойствами клеток на основе регуляции клеточных электрон-транспортных процессов представляют собой новую группу биотехнологий, которую можно назвать редокс-технологиями [14]. Необходимым этапом развития таких технологий является изучение молекулярного состава и физико-химических принципов функционирования клеточных электрон-транспортных цепей.

Эффективными регуляторами электрон-транспортных процессов в клетках являются *пара*-бензохиноны и их производные. Эндогенные производные *n*-бензохинонов участвуют в переносе электронов в процессах клеточного дыхания и фотосинтеза, являясь компонентами митохондриальной и фотосинтетической электрон-транспортных цепей. Ряд природных и синтетических *n*-бензохинонов проявляют противовирусную, противовоспалительную и противоопухолевую активность. К таким высокоэффективным биорегуляторам относится тимохинон (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон), основной компонент эфирного и нелетучего масел черного тмина (*Nigella sativa*), обладающий антиоксидантными, противовоспалительными, иммуномодулирующими и противоопухолевыми свойствами [15,16]. Однако механизмы действия хинона в биологических системах, определяющие его биологическую активность, включая противоопухолевую, остаются неизученными.

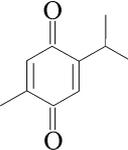
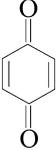
Предполагается, что регуляция клеточной активности при действии тимохинона осуществляется путем изменения клеточного редокс-состояния. Показано, что введение тимохинона стимулирует активность НАД(Ф)Н:хинон оксидоредуктазы 1 (NQO1, EC 1.6.5.2) в различных тканях мыши [17]. В клетках с участием NQO1 тимохинон восстанавливается до дигидротимохинона – эффективного перехватчика супероксидного анион-радикала, гидроксильного радикала и синглетного кислорода [18,19]. С другой стороны, с участием митохондриальной НАДН:убихинон оксидоредуктазы (EC 1.6.5.3) и микросомальных НАДФН-цитохром P₄₅₀-редуктазы (EC 1.6.2.4) и НАДН-цитохром b₅-редуктазы (EC 1.6.2.2) осуществляется одноэлектронное восстановление тимохинона до семи-

хинонового радикала, окисление которого кислородом сопровождается образованием супероксидного анион-радикала [20]. Таким образом, тимохинон в биологических системах может проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства.

Предполагается, что прооксидантные свойства тимохинона определяют его цитотоксичность в отношении ряда типов клеток [20]. При этом протекторные свойства тимохинона обнаружены при изучении действия ряда токсических веществ, механизм действия которых реализуется через активацию окислительного стресса. Показано, что в почках тимохинон снижает токсическое действие цисплатина [21], доксорубина [22] и гентамицина [23]. Кардиотоксичность доксорубина и циклофосфамида также уменьшается при действии тимохинона [24,25]. Наряду с этим в опухолевых клетках действие противоопухолевых агентов, таких как доксорубин и цисплатин, усиливается тимохиноном [21,26]. Внутриклеточные физико-химические условия, формирующиеся в результате поддержания клеточного редокс-гомеостаза, определяют протекание ряда метаболических и регуляторных процессов и специфичность отклика клеток на действие редокс-активных соединений [1,8,27].

Следует также отметить, что важным фактором, определяющим биологический эффект действия АФК в клетках, является внутриклеточная локализация структур, их продуцирующих [28]. Ранее нами было показано, что механизм аскорбат-зависимой регуляции Ca²⁺-сигнализации клеток включает усиление локальной продукции АФК в клетках за счет участия специфических оксидоредуктаз – НАДН:убихинон-оксидоредуктазы и убихинол:цитохром c-оксидоредуктазы (EC 1.10.2.2) [29]. Согласно предложенному механизму кроме редокс-активных соединений и их мишеней в редокс-регуляторных процессах участвуют также белки-ферменты – оксидоредуктазы, локализация которых вблизи белков-мишеней определяет специфический отклик клеток. Роль АФК в механизмах действия тимохинона требует детального изучения, поскольку с участием АФК реализуются как регуляторные, так и повреждающие эффекты действия редокс-активных соединений. В данной работе исследованы влияние тимохинона на пролиферативную активность опухолевых клеток и роль редокс-зависимых сигнальных механизмов в реализации отклика опухолевых клеток на его действие. Анализ механизма действия тимохинона в опухолевых клетках проведен в сравнении с действием 1,4-бензохинона, содержащим аналогичные тимохинону редокс-активные функциональные группы.

Структура и физико-химические свойства хинонов

	Тимохинон	1,4-бензохинон
Структура		
Редокс-потенциал пары Q/Q ^{•-} , мВ	-70	99
Редокс-потенциал пары Q/QH ₂ , мВ	-428	286

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон (тимохинон) и 1,4-бензохинон (все *para*-бензохиноны от Sigma-Aldrich, США). Тимохинон и 1,4-бензохинон являются близкими по структуре соединениями с различными физико-химическими характеристиками (таблица). Молекула тимохинона, так же как и молекула 1,4-бензохинона, содержит две карбонильные группы в 1 и 4 положениях. В отличие от 1,4-бензохинона в структуре тимохинона содержатся изопропильная и метильная группы, определяющие взаимодействие с гидрофобным окружением. Редокс-потенциал тимохинона значительно ниже, чем у 1,4-бензохинона [30].

В работе использовали клетки карциномы гортани человека линии HEP-2, которые культивировали в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 8–10% эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицина (0,08 мг/мл) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. При определении влияния препаратов на пролиферативную активность опухолевых клеток исследуемое соединение добавляли в чашки Петри через 24 ч после пересева клеток. Подсчет клеток проводили через трое суток культивирования. Для получения суспензии клетки снижали раствором трипсин-версен в соотношении 1:3 через шесть суток культивирования.

Оценку внутриклеточной продукции АФК проводили на основе анализа скорости окисления флуоресцентного зонда 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (CM-H₂DCF) эндогенными окислителями, аналогично используемому ранее нами методу анализа скорости окисления для 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина [31,32]. Модифицированная форма флуоресцеина CM-H₂DCF содержит дополнительные группы, способствующие снижению утечки зонда из клетки по сравнению с 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеином. Определяли скорость окисления CM-H₂DCF (v₀) эндогенными окислителями в контроле, начальную скорость окисления CM-H₂DCF после добавления

хинона (v₁) и конечную скорость окисления CM-H₂DCF после добавления хинона (v₂).

Измерения проводили при температуре 37°C в сбалансированном буферном солевом растворе следующего состава: NaCl – 131 мМ, KCl – 5 мМ, CaCl₂ – 1,3 мМ, MgSO₄ – 1,3 мМ, KH₂PO₄ – 0,4 мМ, HEPES – 20 мМ, глюкоза – 6 мМ, pH 7,4. Суспензию клеток нагружали диацетатом CM-H₂DCF (CM-H₂DCF-DA, Sigma-Aldrich, США) в процессе инкубации в сбалансированном буферном солевом растворе с 10 мкМ зонда в течение 45 мин при температуре 37°C. Интенсивность флуоресценции 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлорофлуоресцеина, образующегося при окислении CM-H₂DCF, измеряли с использованием спектрофлуориметра CM 2203 («СОЛАР», Республика Беларусь). Длина волны возбуждения составляла 488 нм, длина волны испускания – 530 нм.

Мониторинг изменений митохондриального мембранного потенциала (Δθ_m) проводили с использованием этилового эфира тетраметилродамина (TMRE, Sigma-Aldrich, США) [33]. Суспензию клеток нагружали TMRE в процессе инкубации в сбалансированном буферном солевом растворе с 0,1 мкМ зонда в течение 30 мин при температуре 37°C. Интенсивность флуоресценции TMRE измеряли при длине волны регистрации флуоресценции 590 нм (длина волны возбуждения – 545 нм). Для определения направления изменения митохондриального мембранного потенциала использовали протонатор карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон (Sigma-Aldrich, США). В работе также использовали антимицин А – ингибитор убинолинцитохром с-оксидоредуктазы и циклоспорин А – ингибитор сборки митохондриальных пор высокой проницаемости (все ингибиторы от Sigma-Aldrich, США). Концентрация циклоспорина А в экспериментах с суспензией клеток составляла 100 мкМ. В культуру клеток добавляли циклоспорин А в концентрации от 0,3 мкМ до 5 мкМ. Карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон использовали в концентрации 50 мкМ.

Приведенные в работе кинетические зависимости являются типичными для серии из трех–пяти независимых экспериментов. Результаты представлены как средние значения плюс–минус стандартное отклонение среднего для трех–пяти независимых экспериментов. Достоверность значений определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что рост клеток карциномы гортани человека линии Нер-2 в культуре при действии исследуемых хинонов угнетается дозозависимо (рис. 1). Тимохинон проявляет более высокую токсичность в сравнении с более гидрофильным 1,4-бензохиноном. Величина концентрации 50%-го ингибирования (IC_{50}) роста клеток в культуре для тимохинона составила 8 мкМ, а IC_{50} для 1,4-бензохинона – 25 мкМ.

После добавления хинонов в суспензию клеток скорость окисления 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (СМ-Н₂DCF) увеличивалась, что указывает на усиление внутриклеточной продукции АФК. При этом отклик внутриклеточных редокс-систем на введение 1,4-бензохинона и тимохинона в суспензию клеток различался. На рис. 2а представлена кинетика изменения интенсивности флуоресценции 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлорофлуоресцеина в клетках при действии тимохинона (линия 2) и 1,4-бензохинона (линия 3). В процессе окисления зонда, индуцированного хинонами, можно выделить две стадии: на первой стадии наблюдается высокая скорость окисления СМ-Н₂DCF, на второй – скорость окисления СМ-Н₂DCF значительно ниже, чем на первой. Выход АФК при действии тимохинона, наблюдаемый на первой стадии, оказался значительно ниже, чем выход АФК при действии 1,4-бензохинона. Изменение начальной скорости окисления СМ-Н₂DCF (v_1) и конечной скорости окисления СМ-Н₂DCF (v_2) при изменении концентрации хинона также зависело от типа хинона.

Показано, что при увеличении концентрации 1,4-бензохинона внутриклеточная продукция АФК увеличивалась, что приводило к росту скорости окисления СМ-Н₂DCF на первой стадии (рис. 2б). При действии тимохинона величина скорости окисления СМ-Н₂DCF на первой стадии не изменялась при увеличении концентрации агента (рис. 2в). С другой стороны, при действии тимохинона на второй стадии редокс-отклика клеток наблюдалось снижение эндогенной продукции АФК в сравнении с контролем. При увеличении концентрации тимохинона снижение внутриклеточной продукции АФК, индуцируемое агентом, увеличивалось. Величи-

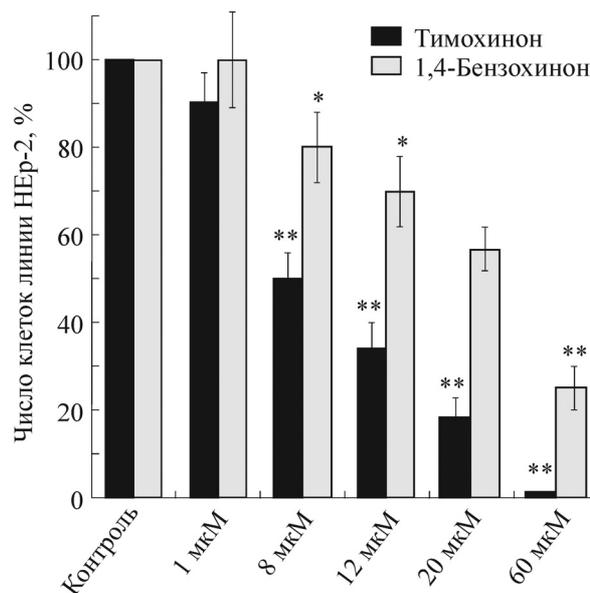


Рис. 1. Изменение числа клеток линии Нер-2 при культивировании с хинонами. Здесь и на рис. 2 и 4: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

на скорости окисления СМ-Н₂DCF на второй стадии при действии 1,4-бензохинона не изменялась при увеличении концентрации агента и была сравнима с величиной скорости окисления СМ-Н₂DCF в контроле (рис. 2б). Выявленные отличия в редокс-отклике клеток на действие хинонов свидетельствуют об участии различных механизмов внутриклеточной продукции АФК, активируемых в клетках при действии агентов.

Ранее нами было показано, что внутриклеточная продукция активных форм кислорода в клетках карциномы гортани человека осуществляется с участием митохондриальных оксидоредуктаз и НАДФН-оксидазы [32]. Образование АФК с участием компонентов дыхательной цепи зависит от величины митохондриального мембранного потенциала [34]. Увеличение $\Delta\theta_m$ приводит к усилению продукции АФК митохондриями, уменьшение – к снижению выхода АФК.

Известно, что АФК, продуцируемые в митохондриях, являются участниками сигнальных путей, инициирующих запуск программируемой клеточной гибели. Однако механизм их образования и конкретные мишени в деталях не установлены. Предполагается, что образование Н₂O₂ может осуществляться при взаимодействии проапоптотического белка р66^{Shc}, расположенного в межмембранном пространстве митохондрий, с цитохромом *c* [35]. С другой стороны, в дыхательной цепи митохондрий происходит образование супероксидного анион-радикала в результате переноса электронов от промежуточных элементов цепи на кислород.

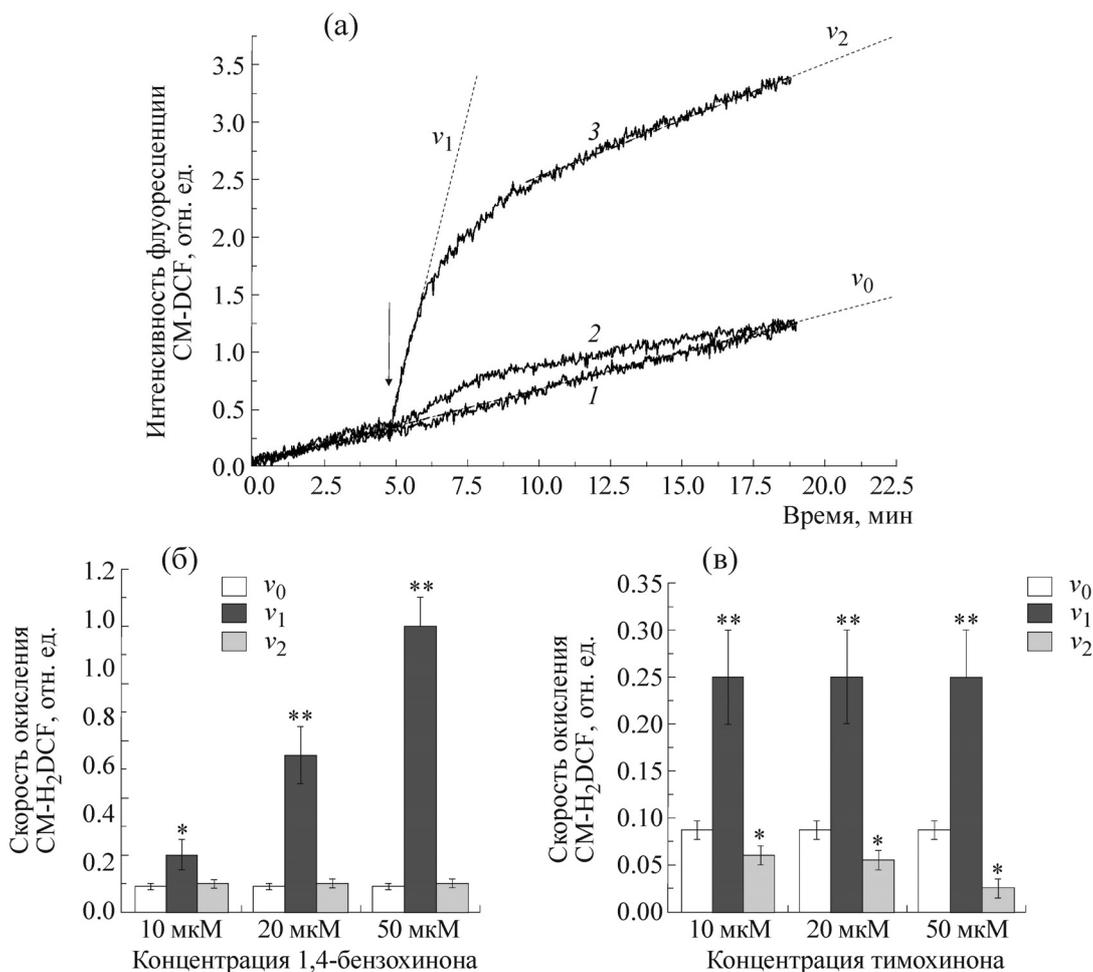


Рис. 2. Влияние хинонов на продукцию АФК клетками карциномы гортани человека линии НЕР-2. (а) – Кинетика изменения интенсивности флуоресценции 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлорофлуоресцеина в клетках при действии тимохинона (кривая 2) и 1,4-бензохинона (кривая 3), стрелкой обозначен момент добавления соединения, кривая 1 – кинетика изменения интенсивности флуоресценции внутриклеточного 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлорофлуоресцеина в контроле, концентрация хинонов – 20 мкМ. (б) – Изменение скорости окисления CM-H₂DCF на первой и второй стадиях редокс-отклика клеток на действие 1,4-бензохинона; (в) – изменение скорости окисления CM-H₂DCF на первой и второй стадиях редокс-отклика клеток при действии тимохинона.

Семихиноны, генерируемые в электрон-транспортной цепи, идентифицированы как доноры электронов для восстановления молекулы кислорода [36]. Дисмутация супероксида присутствующей в митохондриальном матриксе Mn-супероксиддисмутазой (EC 1.15.1.1) ведет к образованию H₂O₂. Образующийся в митохондриях H₂O₂, в свою очередь, вызывает окисление сульфгидрильных групп переносчика адениновых нуклеотидов, известного также как АДФ/АТФ-транслоказа. Образование дисульфидов в переносчике адениновых нуклеотидов индуцирует его связывание с потенциал-зависимым анионным каналом и циклофилином D, что приводит к формированию пор высокой проницаемости (mPTPs) и запуску программируемой гибели клеток [37,38]. Открытие mPTPs, в свою очередь, приводит к снижению $\Delta\theta_m$ и

уменьшению продукции АФК, что вызывает наблюдаемое при действии тимохинона снижение скорости окисления CM-H₂DCF. С ростом концентрации тимохинона снижается активность ферментов в митохондриях, участвующих во внутриклеточной продукции АФК, что приводит к увеличению величины снижения скорости окисления CM-H₂DCF на второй стадии редокс-отклика (рис. 2в).

Обнаружено, что при добавлении тимохинона в суспензию клеток наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции ТМРЕ, что указывает на снижение величины митохондриального мембранного потенциала (рис. 3а). Снижение $\Delta\theta_m$ увеличивалось с ростом концентрации тимохинона. Для проверки участия митохондриальных пор высокой проницаемости в индуцированном тимохиноном снижении $\Delta\theta_m$

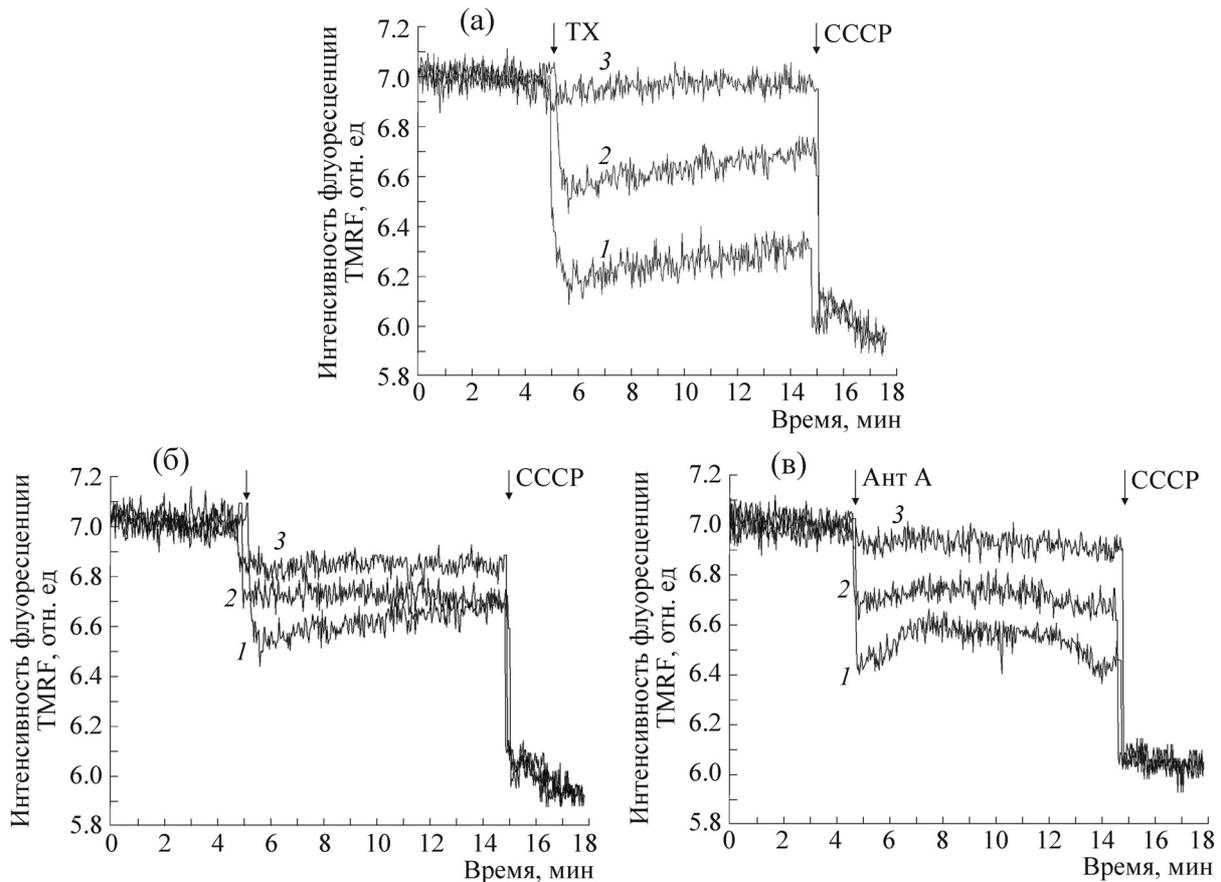


Рис. 3. Влияние тимохинона, 1,4-бензохинона и антимицина А на величину митохондриального мембранного потенциала в клетках карциномы гортани человека линии НЕР-2: (а) – кинетика изменения интенсивности флуоресценции ТМРЕ в клетках при действии тимохинона (ТХ), стрелкой обозначен момент добавления соединения; (б) – кинетика изменения интенсивности флуоресценции ТМРЕ в клетках при действии тимохинона и 1,4-бензохинона; (в) – кинетика изменения интенсивности флуоресценции ТМРЕ в клетках при действии антимицина А (Ант А). Концентрация тимохинона (а): 1 – 50 мкМ; 2 – 20 мкМ; 3 – 20 мкМ (клетки 60 мин инкубировали с циклоспорином А). Концентрация хинонов (б): 1 – 20 мкМ тимохинона, 2 – 20 мкМ 1,4-бензохинона, 3 – 20 мкМ 1,4-бензохинона (клетки 60 мин инкубировали с циклоспорином А). Концентрация антимицина А (в): 1 – 20 мкМ; 2 – 10 мкМ; 3 – 10 мкМ (клетки 60 мин инкубировали с циклоспорином А).

использовали циклоспорин А – ингибитор открытия mPTPs. Циклоспорин А связывается с циклофилином D, блокируя его ассоциацию с другими белками при формировании поры высокой проницаемости. Показано, что циклоспорин А, предварительно введенный в суспензию клеток, ингибировал снижение $\Delta\theta_m$ при действии хинона (рис. 3а).

Снижение митохондриального мембранного потенциала индуцировалось также 1,4-бензохиноном (рис. 3б). Однако величина снижения $\Delta\theta_m$ при действии 1,4-бензохинона была меньше, чем величина снижения $\Delta\theta_m$, индуцированного тимохиноном. Кроме этого, снижение $\Delta\theta_m$, индуцированное действием 1,4-бензохинона, не блокировалось циклоспорином А (рис. 3б). Вероятно, механизм снижения величины митохондриального мембранного потенциала с участием 1,4-бензохинона происходит без формиро-

вания пор высокой проницаемости. Ранее на выделенных митохондриях было показано, что 1,4-бензохинон приводит к снижению $\Delta\theta_m$ в результате ингибирования трансмембранного переноса протонов компонентами дыхательной цепи митохондрий [39].

Поскольку в описанном выше механизме действия тимохинона ключевую роль играют митохондриальные АФК, в данной работе изучено их участие в индуцированном снижении $\Delta\theta_m$. Одним из главных источников продукции АФК в митохондриях является убихинол:цитохром с-оксидоредуктаза, известная также как комплекс III дыхательной цепи [40]. Ранее нами было показано, что усиление эндогенной продукции АФК митохондриями, индуцированное антимицином А – ингибитором комплекса III, снижает рост клеток карциномы гортани человека в культуре [32]. В данном исследовании

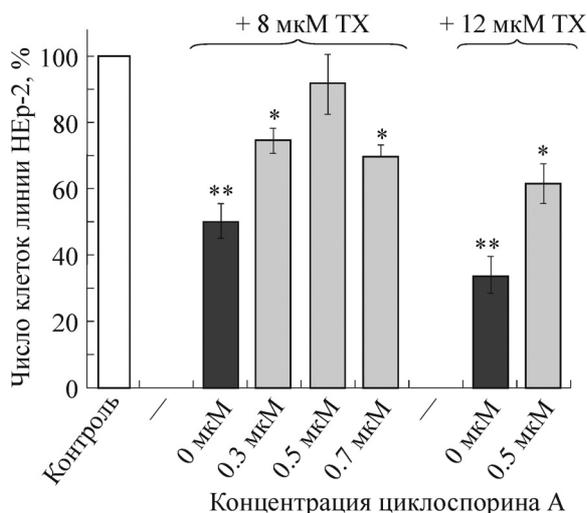


Рис. 4. Изменение числа клеток линии HEp-2 при культивировании с тимохиноном и циклоспорином А.

обнаружено, что усиление митохондриальной продукции АФК, индуцированное антимицином А, также приводит к дозозависимому снижению величины митохондриального мембранного потенциала (рис. 3в). Механизм рассматриваемого явления включает формирование mPTPs, поскольку снижение $\Delta\theta_m$, индуцированное антимицином А, блокировалось циклоспорином А (рис. 3в).

Результаты экспериментов, проведенных на культуре клеток карциномы гортани линии HEp-2, также подтвердили роль митохондриально-опосредованного пути гибели клеток в механизме действия тимохинона. Показано, что введение в культуру опухолевых клеток HEp-2 циклоспоринона А в концентрациях до 5 мкМ не влияло на их пролиферативную активность, но уменьшало индуцированное тимохиноном снижение роста клеток. На рис. 4 представлена зависимость изменения числа клеток в культуре при их культивировании с тимохиноном и циклоспорином А. Максимальное снижение токсического действия тимохинона в культуре опухолевых клеток наблюдается при введении циклоспоринона А в концентрации 0,5 мкМ. Цитотоксическое действие 1,4-бензохинона не блокировалось циклоспорином А. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что в опухолевых клетках при действии тимохинона запускается митохондриально-опосредованный апоптоз в результате открытия пор высокой проницаемости в мембранах митохондрий. Токсическое действие 1,4-бензохинона опосредовано, вероятно, повреждением биомолекул в результате развития клеточного окислительного стресса.

Согласно точке зрения ряда исследователей токсичность действия хинонов в биологических системах, включая тимохинон, обусловлена прооксидантными свойствами этих соединений [20]. Предполагается, что при действии хинона с более высокой токсичностью в клетках будет наблюдаться более высокий выход АФК в сравнении с эффектом при действии менее токсичных хинонов. Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что тимохинон, обуславливающий более низкий выход АФК в сравнении с 1,4-бензохиноном, тем не менее является более токсичным в отношении опухолевых клеток. Более высокая токсичность тимохинона обусловлена активацией специфического редокс-сигнального механизма, функционирование которого при невысоком уровне внутриклеточных АФК обеспечивается колокализацией митохондриальных оксидоредуктаз, вовлеченных в образование АФК, и соответствующего редокс-сенсора – переносчика адениновых нуклеотидов, участвующего в механизме запуска апоптоза.

На основе имеющихся данных можно предложить следующий механизм действия тимохинона в опухолевых клетках (рис. 5). Тимохинон вследствие гидрофобных свойств локализуется в мембранах и является наиболее вероятным участником мембранных цепей транспорта электрона. Кроме этого, тимохинон имеет низкое значение редокс-потенциала, что позволяет ему участвовать в электрон-транспортных процессах в митохондриях на участке между комплексом I и комплексом III. Показано, что хиноны с редокс-потенциалом одноэлектронного восстановления ($Q/Q^{\bullet-}$) от -170 мВ до $+50$ мВ являются субстратами комплекса I, стимулируя окисление НАДН и продукцию АФК [41]. 1,4-бензохинон, имеющий более высокий редокс-потенциал, не участвует в электрон-транспортных процессах с участием компонентов дыхательной цепи митохондрий [42].

При усилении продукции АФК с участием компонентов электрон-транспортной цепи митохондрий при действии тимохинона в результате окисления сульфгидрильных групп АДФ/АТФ-транслоказы индуцируется формирование пор высокой проницаемости. Открытие mPTPs, в свою очередь, приводит к снижению $\Delta\theta_m$ и уменьшению продукции АФК, являясь, таким образом, защитным механизмом клетки против токсического действия, проявляемого АФК в высоких концентрациях.

Ингибирование циклоспорином А образования mPTPs блокирует снижение митохондриального мембранного потенциала и гибель клеток в культуре, индуцированные действием тимохинона. С другой стороны, усиление продукции митохондриальных АФК в результате бло-

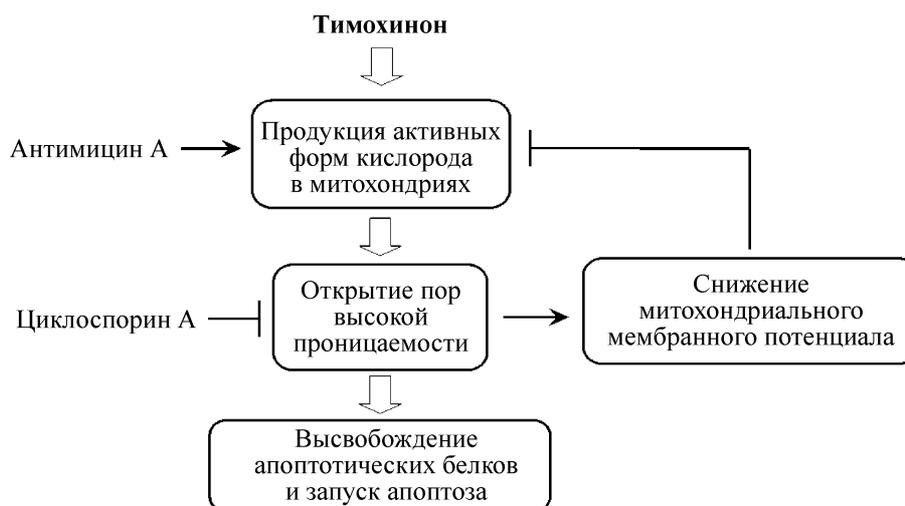


Рис. 5. Обобщенная схема механизма действия тимохинона в опухолевых клетках.

кирования переноса электронов в комплексе III антимицином А вызывает формирование mPTPs, снижение $\Delta\theta_m$ и запуск апоптоза.

В настоящее время ведутся интенсивные исследования, направленные на поиск и разработку новых технологий противоопухолевой терапии, задачей которых является регуляция окислительно-восстановительных процессов в клетках [14,43]. Регуляция внутриклеточной продукции АФК при действии экзогенных факторов является необходимым этапом развития таких технологий. В данной работе основное внимание уделено сигнальной стадии апоптоза и участию АФК в этой стадии. Показано, что механизмы регуляции скорости роста опухолевых клеток, запускаемые при действии 1,4-бензохинона и 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинона, зависят от структуры боковых функциональных групп хинонов, влияющих на их распределение в клетках и величину редокс-потенциала. В опухолевых клетках при действии тимохинона (но не при действии 1,4-бензохинона) в результате кратковременного усиления локальной продукции активных форм кислорода с участием митохондриальных оксидоредуктаз происходит активация митохондриально-опосредованного апоптоза. При действии тимохинона активируется редокс-сигнальный механизм, ключевым элементом которого является колокализация митохондриальных оксидоредуктаз, участвующих в продукции окислителей, и соответствующего редокс-сенсора – переносчика адениновых нуклеотидов, функциональное состояние которого регулируется путем окисления/восстановления сульфгидрильных групп. Индукция митохондриально-опосредованного апоптоза в опухолевых клетках в результате локального повышения продукции АФК при действии тимохинона – биологически активного

компонента *Nigella sativa* – указывает на перспективность дальнейшего исследования агента в качестве противоопухолевого препарата.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № М15-019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Окислительно-восстановительные процессы в клетках* (БГУ, Минск, 2008).
2. Y. M. Janssen-Heininger, B. T. Mossman, N. H. Heintz, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **45**, 1 (2008).
3. W. Droge, *Physiol. Rev.* **82** (1), 47 (2002).
4. D. P. Jones, *J. Intern. Med.* **268**, 432 (2010).
5. N. R. Love, Y. Chen, S. Ishibashi, et al., *Nature Cell Biol.* **15** (2), 222 (2013).
6. С. Н. Черенкевич, Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и др., *Изв. Национальной академии наук Беларуси. Сер. биол. наук*, №1, 92 (2013).
7. G. G. Martinovich, S. N. Cherenkevich, and H. Sauer, *Eur. Biophys. J.* **34** (7), 937 (2005).
8. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Успехи физиол. наук* **39** (3), 29 (2008).
9. G. G. Martinovich, I. V. Martinovich, S. N. Cherenkevich, et al., *Cell Biochem. Biophys.* **58** (2), 75 (2010).
10. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биофизика* **56** (3), 465 (2011).
11. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Е. Б. Меньщикова и др., *Докл. Национальной академии наук Беларуси* **59** (3), 82 (2015).
12. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, В. З. Ланкин и др., *Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания* (АРГА, Новосибирск, 2008).
13. G. T. Wondrak, *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 3013 (2009).

14. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Е. Н. Голубева и др. Изв. Национальной академии наук Беларуси. Сер. мед. наук, № 2, 85 (2012).
15. S. Banerjee, S. Padhye, A. Azmi, et al., *Nutrition and Cancer* **62** (7), 938 (2010).
16. R. Schneider-Stock, I. H. Fakhoury, A. M. Zaki, et al., *Drug Discovery Today* **19** (1), 18 (2014).
17. M. A. Mansour, M. N. Nagi, A. S. El-Khatib, et al., *Cell Biochem. Funct.* **20**, 143 (2002).
18. M. N. Nagi and M. A. Mansour, *Pharmacol. Res.* **41**, 283 (2000).
19. O. A. Badary, R. A. Taha, A. M. Gamal El-Din, et al., *Drug Chem. Toxicol.* **26**, 87 (2003).
20. S. Darakhshan, A. Bidmeshki Pour, A. Hosseinzadeh Colagar, et al., *Pharmacol. Res.* **95–96**, 138 (2015).
21. O. A. Badary, M. N. Nagi, O. A. Al-Shabanah, et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 1356 (1997).
22. O. A. Badary, A. B. Abdel-Naim, M. H. Abdel-Wahab, et al., *Toxicology* **143**, 219 (2000).
23. M. M. Sayed-Ahmed and M. N. Nagi, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 399 (2007).
24. M. N. Nagi and M. A. Mansour, *Pharmacol. Res.* **41**, 283 (2000).
25. M. N. Nagi, O. A. Al-Shabanah, M. M. Hafez, et al., *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **25**, 135 (2011).
26. K. Effenberger-Neidnicht and R. Schobert, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **67**, 867 (2011).
27. С. Н. Черенкевич, Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и др., *Журн. Гродненского гос. мед. ун-та* **2** (26), 9 (2009).
28. L. S. Terada, *J. Cell Biol.* **174**, 615 (2006).
29. G. G. Martinovich, E. N. Golubeva, I. V. Martinovich, et al., *J. Biophys.* **2012**, ID 921653 (2012).
30. Y. Song and G. R. Buettner, *Free Radic. Biol. Med.* **49** (6), 919 (2010).
31. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биомед. химия* **51** (6), 626 (2005).
32. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Н. К. Зенков и др., *Биофизика* **60** (1), 120 (2015).
33. D. G. Nicholls, in *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols*, Ed. by C. M. Palmeira and A. J. Moreno (Humana Press, New York, 2012).
34. S. S. Korshunov, V. P. Skulachev and A.A. Starkov, *FEBS Lett.* **416**, 15 (1997).
35. M. Giorgio, E. Migliaccio, F. Orsini, et al., *Cell* **122**, 221 (2005).
36. S. Raha and B. H. Robinson, *Trends Biochem. Sci.* **25**, 502 (2000).
37. A. P. Halestrap, K. Y. Woodfield, and C. P. Connern, *J. Biol. Chem.* **272**, 3346 (1997).
38. G. Kroemer and J. C. Reed *Nat. Med.* **6**, 513 (2000).
39. T. R. Henry and K. B. Wallace, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **134** (2), 195 (1995).
40. Q. Chen, E. J. Vazques, S. Moghaddas, et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 36027 (2003).
41. G. Powis and P. L. Appel, *Biochem. Pharmacol.* **29** (19), 2567 (1980).
42. G. Powis, B. A. Svingen, and P. Appel, *Mol. Pharmacol.* **20** (2), 387 (1981).
43. D. Trachootham, J. Alexandre, and P. Huang, *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579 (2009).

Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production and Programmed Tumor Cell Death Induced by Thymoquinone, a Biologically Active Constituent of *Nigella sativa*

**G.G. Martinovich, I.V. Martinovich, A.V. Vcherashniaya,
O.I. Shadyro, and S.N. Cherenkevich**

Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Republic of Belarus

Mechanisms of tumor cell responses on 2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone (thymoquinone) and 1,4-benzoquinone were studied based on a fluorescence and inhibition assay. Quinones were found to enhance intracellular production of reactive oxygen species, cause a decline in mitochondrial membrane potential and induce tumor cell death through different pathways. It was shown that thymoquinone, which kept reactive oxygen species production at a lower level than 1,4-benzoquinone, is more toxic to tumor cells. It was established that thymoquinone-induced reactive oxygen species are involved in redox signaling processes leading to the formation of mitochondrial permeability transition pores and activation of programmed cell death. The results obtained suggest that an important condition of the functioning of the established redox signaling mechanism is colocalization of mitochondrial oxidoreductases, involved in reactive oxygen species formation, and reactive oxygen species targets, involved in mechanism of apoptosis activation.

Key words: reactive oxygen species, benzoquinone, thymoquinone, mitochondria, apoptosis, redox signaling