

УДК 577.3'32/'36

Г. Г. МАРТИНОВИЧ, И. В. МАРТИНОВИЧ, А. В. ВЧЕРАШНЯЯ,
О. И. ШАДЫРО, академик С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И МЕХАНИЗМОВ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПАРА-БЕНЗОХИНОНАМИ

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

martinovichgg@bsu.by; parkun@bsu.by; tuata_de_danann@mail.ru; shadyro@open.by; cherenkevich@bsu.by

Установлено, что тимохинон (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон) и 1,4-бензохинон регулируют внутриклеточную продукцию активных форм кислорода (АФК) и индуцируют гибель опухолевых клеток по различным механизмам. Показано, что токсическое действие 1,4-бензохинона связано с ингибированием переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи и развитием клеточного окислительного стресса. Тимохинон, инициирующий выход АФК более низкий в сравнении с 1,4-бензохиноном, является более токсичным для опухолевых клеток. Обнаружено, что образующиеся при действии тимохинона АФК являются участниками редокс-сигнальных процессов, ведущих к формированию митохондриальных пор высокой проницаемости и запуску программируемой гибели клеток.

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

G. G. MARTINOVICH, I. V. MARTINOVICH, A. V. VCHERASHNIAYA, O. I. SHADYRO, S. N. CHERENKEVICH

DIFFERENTIAL REGULATION OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION AND THE MECHANISMS OF TUMOR CELL DEATH BY PARA-BENZOQUINONES

Belarusian State University, Minsk, Belarus

martinovichgg@bsu.by; parkun@bsu.by; tuata_de_danann@mail.ru; shadyro@open.by; cherenkevich@bsu.by

It is established that thymoquinone (2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone) and 1,4-benzoquinone regulate the intracellular reactive oxygen species (ROS) production and induce the death of tumor cells by different mechanisms. It is shown that the toxic action of 1,4-benzoquinone is associated with the inhibition of electron transfer in the mitochondrial respiratory chain and with the development of cellular oxidative stress. Thymoquinone initiating a lower level of ROS production in comparison with 1,4-benzoquinone is more toxic to tumor cells. It is established that thymoquinone-induced ROS are involved in the redox signaling processes that lead to the opening of mitochondrial transition pores of high permeability and the activation of the programmed death of cells.

Keywords: reactive oxygen species, benzoquinone, thymoquinone, mitochondria, apoptosis, redox signaling.

Введение. Необходимым этапом развития современных биомедицинских технологий является изучение механизмов передачи и обработки информации внутри клеток. Один из важнейших путей передачи информации в клетках реализуется на основе электрон-транспортных процессов, протекающих с участием редокс-активных соединений и белков [1]. Физико-химические и биологические свойства редокс-активных соединений позволяют их выделить в отдельную группу биорегуляторов, основными отличительными свойствами которых, в сравнении с другими биологически активными веществами, являются широкий спектр клеточных ответов, определяемых величиной концентрации соединений, и отсутствие специфических молекулярных мишеней в клетках [2]. Биологический эффект действия редокс-активных соединений определяется не конкретной молекулой, а группой взаимодействующих молекул, образующих электрон-транспортные цепи [3; 4]. Близкие по структуре редокс-активные соединения могут выступать участниками разных электрон-транспортных цепей, запуская при этом различные клеточные ответы.

Ранее нами было показано, что водорастворимые фенольные серосодержащие антиоксиданты 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфат натрия (ТС-13) и 3,5-диметил-4-гидроксибензилтиоэтанат калия (БЭК-11-К) вызывают эффекты противоположно направленного действия на рост опухолевых клеток [5; 6]. Обнаружено, что БЭК-11-К стимулирует пролиферацию, а индуктор сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE – фенольный антиоксидант ТС-13 – ингибирует рост опухолевых клеток в культуре. Установлено, что при действии ТС-13 из-за открытия пор высокой проницаемости индуцируется запуск митохондриально-опосредованного апоптоза [5]. Активация апоптоза происходит через редокс-зависимый механизм [6], и, вероятно, в ней участвуют активные формы кислорода (АФК). Однако роль внутриклеточных АФК в механизмах действия экзогенных регуляторов требует детального изучения, поскольку с участием этих посредников реализуются как регуляторные, так и повреждающие эффекты действия соединений.

Следует также отметить, что внутриклеточные физико-химические условия, сформированные в результате поддержания клеточного редокс-гомеостаза, определяют протекание ряда метаболических и регуляторных процессов и специфичность отклика клеток на действие редокс-активных соединений [1; 7]. Важным фактором, определяющим биологический эффект действия АФК в клетках, является также внутриклеточная локализация структур, их продуцирующих [8]. Ранее нами было показано, что механизм аскорбат-зависимой регуляции Ca^{2+} -сигнализации клеток включает усиление локальной продукции АФК в клетках за счет участия митохондриальных оксидоредуктаз [9]. 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.

Поиск новых регуляторов продукции АФК и изучение детальных механизмов их действия является актуальной задачей современной медицинской биофизики. Эффективными регуляторами продукции АФК в клетках являются *para*-бензохиноны и их производные. Ряд природных и синтетических *para*-бензохинонов проявляют противовирусную, противовоспалительную и противоопухолевую активность [10; 11]. Однако механизмы действия хинонов в биологических системах, определяющие их биологическую активность, включая противоопухолевую, остаются не изученными. В данной работе исследованы реализующиеся с участием внутриклеточных АФК механизмы отклика опухолевых клеток на действие *para*-бензохинонов.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон (тимохинон) и 1,4-бензохинон (все *para*-бензохиноны фирмы Sigma-Aldrich, США). Тимохинон и 1,4-бензохинон являются близкими по структуре соединениями с различными физико-химическими характеристиками. Молекула тимохинона, так же как и молекула 1,4-бензохинона, содержит две карбонильные группы в 1 и 4 положении. В отличие от 1,4-бензохинона в структуре тимохинона содержится изопропильная и метильная группы, определяющие его взаимодействие с гидрофобным окружением. Редокс-потенциал тимохинона значительно ниже, чем у 1,4-бензохинона [12].

В работе использовали клетки карциномы гортани человека линии Нер-2, которые культивировали в среде DMEM (Sigma-Aldrich) с добавлением 8–10 % эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицина (0,08 мг/мл) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 . 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 снимали раствором трипсин-версен в соотношении 1 : 3 через 6 сут. культивирования.

Оценку внутриклеточной продукции АФК проводили на основе анализа скорости окисления флуоресцентного зонда 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (CM- H_2DCF , Sigma-Aldrich) эндогенными окислителями, аналогично используемому ранее нами методу анализа скорости окисления для 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H_2DCF) [5; 13]. Определяли скорость окисления CM- H_2DCF (v_0) эндогенными окислителями в контроле, начальную скорость окисления CM- H_2DCF после добавления хинона (v_1) и конечную скорость окисления CM- H_2DCF после добавления хинона (v_2).

Мониторинг изменений митохондриального мембранного потенциала (ψ_m) проводили с использованием этилового эфира тетраметилпродамина (TMRE, Sigma-Aldrich) [14]. Для определения направления изменения митохондриального мембранного потенциала использовали протонофор карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон (CCCP, Sigma-Aldrich). В работе также использовали антимицин А – ингибитор убухинол-цитохром *c* оксидоредуктазы, циклоспорин А – ингибитор сборки митохондриальных пор высокой проницаемости, и водорастворимый антиоксидант N-ацетил-L-цистеин (все соединения фирмы Sigma-Aldrich).

Измерения проводили при температуре 37 °С в сбалансированном буферном солевом растворе (СБСР) следующего состава: NaCl – 131 мМ, KCl – 5 мМ, CaCl₂ – 1,3 мМ, MgSO₄ – 1,3 мМ, КН₂Р₄ – 0,4 мМ, Нерес – 20 мМ, глюкоза – 6 мМ, рН 7,4. Интенсивность флуоресценции внутриклеточных зондов измеряли с использованием спектрофлуориметра SM 2203 (СОЛАР, Республика Беларусь).

Результаты представлены как средние значения плюс-минус стандартное отклонение среднего для 3–5 независимых экспериментов. Достоверность значений определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что при действии исследуемых бензохинонов скорость роста клеток в культуре снижается. Величина концентрации 50-процентного ингибирования (IC₅₀) роста клеток в культуре для тимохинона составила 8 мкМ, а IC₅₀ для 1,4-бензохинона – 25 мкМ. После добавления хинонов в суспензию клеток скорость окисления SM-H₂DCF увеличивалась, что указывает на усиление внутриклеточной продукции АФК. В процессе внутриклеточного окисления зонда, индуцированного действием хинонов, можно выделить две стадии: на первой стадии наблюдается высокая скорость окисления SM-H₂DCF, на второй – скорость окисления SM-H₂DCF значительно ниже, чем на первой (рис. 1). Выход АФК при действии тимохинона, наблюдаемый на первой стадии, оказался значительно ниже, чем выход АФК при действии 1,4-бензохинона.

С другой стороны, при действии тимохинона на второй стадии редокс-отклика клеток наблюдалось снижение эндогенной продукции АФК в сравнении с контролем. С ростом концентрации тимохинона снижение внутриклеточной продукции АФК, индуцируемое агентом, увеличивалось (рис. 2). Величина скорости окисления SM-H₂DCF на второй стадии при действии 1,4-бензохинона не изменялась при увеличении концентрации агента и была сравнима с величиной скорости окисления SM-H₂DCF в контроле. Выявленные отличия в редокс-отклике клеток на действие хинонов свидетельствуют об участии различных механизмов внутриклеточной продукции АФК, активируемых в клетках при действии агентов.

Согласно полученным результатам, при действии тимохинона усиливается продукция АФК в митохондриях. Повышение продукции АФК в митохондриях вызывает окисление сульфгидрильных групп АДФ/АТФ-транслоказы (АНТ) внутренней мембраны митохондрий, что приво-

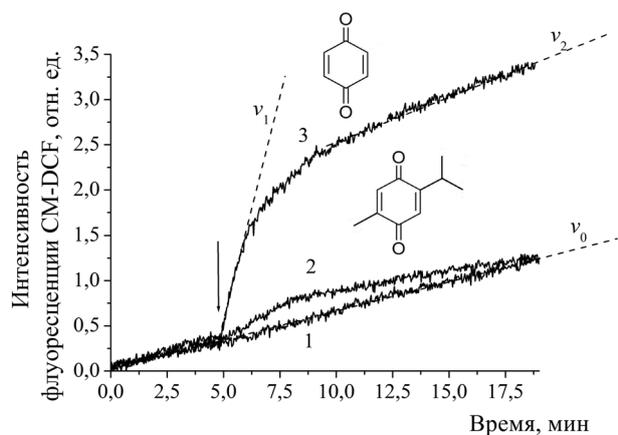


Рис. 1. Влияние хинонов на продукцию АФК клетками линии НЕР-2: 1 – контроль, 2 – 20 мкМ тимохинона, 3 – 20 мкМ 1,4-бензохинона

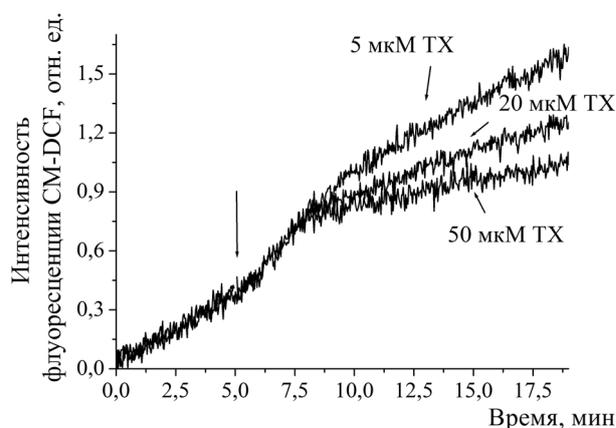


Рис. 2. Кинетика изменения интенсивности флуоресценции SM-DCF в клетках линии НЕР-2 при действии тимохинона (TX)

дит к образованию пор высокой проницаемости в результате формирования комплексов с участием циклофилина D, ANT и потенциал-зависимого анионного канала (VDAC) внешней мембраны митохондрий. Открытие пор высокой проницаемости (mPTPs) является ключевым этапом сигнальной стадии митохондриально-опосредованного апоптоза, сопровождаемым снижением ψ_m и высвобождением цитохрома *c* и апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) [15]. Деполяризация внутренней мембраны митохондрий, индуцированная открытием mPTPs, приводит к уменьшению продукции АФК, что и вызывает наблюдаемое при действии тимохинона снижение скорости окисления CM-H₂DCF.

Снижение величины митохондриального мембранного потенциала при действии тимохинона было установлено с использованием флуоресцентного зонда TMRE. При добавлении тимохинона в суспензию клеток наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции TMRE. С ростом концентрации тимохинона величина снижения ψ_m увеличивалась (рис. 3). Показано, что циклоспорин А (ингибитор открытия mPTPs), предварительно введенный в суспензию клеток, ингибировал снижение ψ_m при действии хинона (рис. 3). Снижение митохондриального мембранного потенциала индуцировалось также 1,4-бензохиноном (рис. 3). Однако величина снижения ψ_m при действии 1,4-бензохинона была меньше, чем величина снижения ψ_m , индуцированного тимохиноном. Кроме того, снижение ψ_m , индуцированное действием 1,4-бензохинона, не блокировалось циклоспорином А (рис. 3). Вероятно, механизм снижения величины митохондриального мембранного потенциала с участием 1,4-бензохинона происходит без формирования mPTPs и включает ингибирование трансмембранного переноса протонов компонентами дыхательной цепи митохондрий. Нами показано, что при незначительном снижении ψ_m , индуцированным протонофором СССР в нетоксических дозах (0,5 мкМ), ингибирование роста клеток при действии 1,4-бензохинона усиливалось, а снижение роста клеток при действии тимохинона не изменялось (рис. 4).

В работе обнаружено, что усиление митохондриальной продукции АФК, индуцированное антимицином А (ингибитором переноса электронов в комплексе III), также приводит к дозозависимому снижению величины митохондриального мембранного потенциала (рис. 3). Механизм рассматриваемого явления включает формирование mPTPs, поскольку снижение ψ_m , индуцированное антимицином А, блокировалось циклоспорином А.

Результаты экспериментов, проведенных с культурой клеток карциномы гортани линии Нер-2, также подтвердили роль митохондриально-опосредованного пути гибели клеток в механизме действия тимохинона. Показано, что при введении в культуру опухолевых клеток Нер-2 циклоспорина А уменьшается индуцированное тимохиноном снижение скорости роста клеток. Цито-

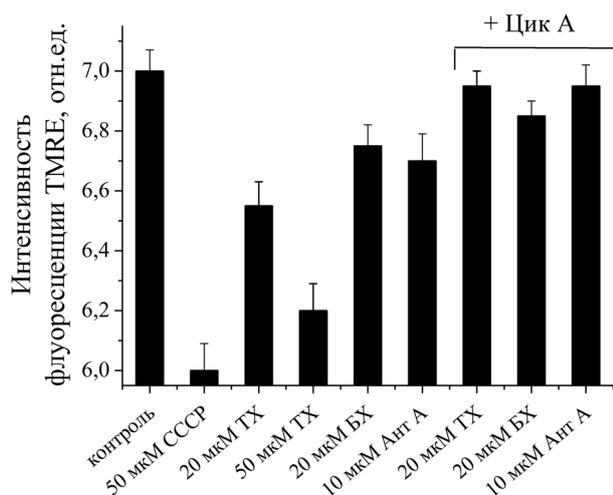


Рис. 3. Влияние хинонов и ингибиторов на величину митохондриального потенциала в клетках линии Нер-2: БХ – 1,4-бензохинон, Ант А – антимицин А, Цик А – циклоспорин А

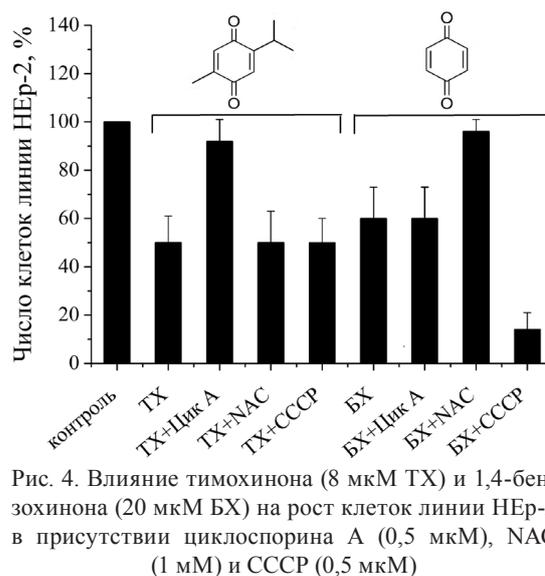


Рис. 4. Влияние тимохинона (8 мкМ ТХ) и 1,4-бензохинона (20 мкМ БХ) на рост клеток линии Нер-2 в присутствии циклоспорина А (0,5 мкМ), НАС (1 мМ) и СССР (0,5 мкМ)

токсическое действие 1,4-бензохинона не блокировалось циклоспорином А. С другой стороны, эксперименты, проведенные с использованием антиоксиданта **N-ацетил-L-цистеина (НАС)**, накапливающегося в цитозоле клеток, привели к результатам с противоположным эффектом. При добавлении в культуру клеток НАС наблюдалось уменьшение токсического эффекта 1,4-бензохинона. Токсическое действие тимохинона не блокировалось НАС (рис. 4).

Заключение. Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что токсическое действие 1,4-бензохинона связано с ингибированием переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи и повреждением биомолекул в результате развития клеточного окислительного стресса. Тимохинон, индуцирующий выход АФК более низкий 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 – АДФ/АТФ-транслоказы, участвующего в механизме запуска апоптоза. Таким образом, методы направленной регуляции продукции АФК в клетках с использованием редокс-активных соединений и модуляторов активности АФК-продуцирующих ферментов могут быть использованы для управления клеточными функциями, включая программы клеточной гибели.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ (грант М15-019).

Список используемой литературы

1. *Мартинovich, Г. Г.* Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г. Г. Мартинovich, С. Н. Черенкевич. – Минск: БГУ, 2008.
2. Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы / С. Н. Черенкевич [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2013. – № 1. – С. 92–108.
3. *Jones, D. P.* Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling / D. P. Jones // *J. Intern. Med.* – 2010. – Vol. 268. – P. 432–448.
4. *Мартинovich, Г. Г.* Редокс-регуляция клеточных процессов: биофизическая модель и эксперимент / Г. Г. Мартинovich, И. В. Мартинovich, С. Н. Черенкевич // *Биофизика.* – 2011. – Т. 56, № 3. – С. 465–474.
5. Индуктор экспрессии ARE-регулируемых генов фенольный антиоксидант ТС-13 вызывает гибель опухолевых клеток через митохондриально-опосредованный путь / Г. Г. Мартинovich [и др.] // *Биофизика.* – 2015. – Т. 60, № 1. – С. 120–128.
6. Редокс-свойства опухолевых клеток и их пролиферативная активность при действии фенольных антиоксидантов / Г. Г. Мартинovich [и др.] // *Докл. НАН Беларусі.* – 2015. – Т. 59, № 3. – С. 82–87.
7. *Мартинovich, Г. Г.* Редокс-гомеостаз клеток / Г. Г. Мартинovich, С. Н. Черенкевич // *Успехи физиолог. наук.* – 2008. – Т. 39, № 3. – С. 29–44.
8. *Terada, L. S.* Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally / L. S. Terada // *J. Cell Biology.* – 2006. – Vol. 174. – P. 615–623.
9. Redox regulation of calcium signaling in cancer cells by ascorbic acid involving the mitochondrial electron transport chain / G. G. Martinovich [et. al.] // *J. of Biophys.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 921653.
10. Thymoquinone and its therapeutic potentials / S. Darakhshan [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2015. – Vol. 95–96. – P. 138–158.
11. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection / N. El-Najjar [et al.] // *Photochem. Rev.* – 2011. – Vol. 10. – P. 353–370.
12. *Song, Y.* Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide / Y. Song, G. R. Buettner // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 49, N 6. – P. 919–962.
13. *Мартинovich, Г. Г.* Утилизация пероксида водорода эпителиальными клетками амниона человека / Г. Г. Мартинovich, С. Н. Черенкевич // *Биомедицинская химия.* – 2005. – Т. 51, № 6. – С. 626–633.
14. *Nicholls, D. G.* Fluorescence measurement of mitochondrial membrane potential changes in cultured cells / D. G. Nicholls // *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols* / ed.: C. M. Palmeira, A. J. Moreno. – New York, 2012.
15. *Kroemer, G.* Mitochondrial control of cell death / G. Kroemer, J. C. Reed // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6. – P. 513–519.

Поступило в редакцию 27.06.2016