

УДК 577.3'32/'36

*Г. Г. МАТИНОВИЧ, И. В. МАТИНОВИЧ, 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 ( $\psi_m$ ) 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, CaCl<sub>2</sub> – 1,3 мМ, MgSO<sub>4</sub> – 1,3 мМ, КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub> – 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 (IC<sub>50</sub>) роста клеток в культуре для тимохинона составила 8 мкМ, а IC<sub>50</sub> для 1,4-бензохинона – 25 мкМ. После добавления хинонов в суспензию клеток скорость окисления SM-H<sub>2</sub>DCF 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-H<sub>2</sub>DCF, на второй – скорость окисления SM-H<sub>2</sub>DCF 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-H<sub>2</sub>DCF на второй стадии при действии 1,4-бензохинона не изменялась при увеличении концентрации агента и была сравнима с величиной скорости окисления SM-H<sub>2</sub>DCF 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-

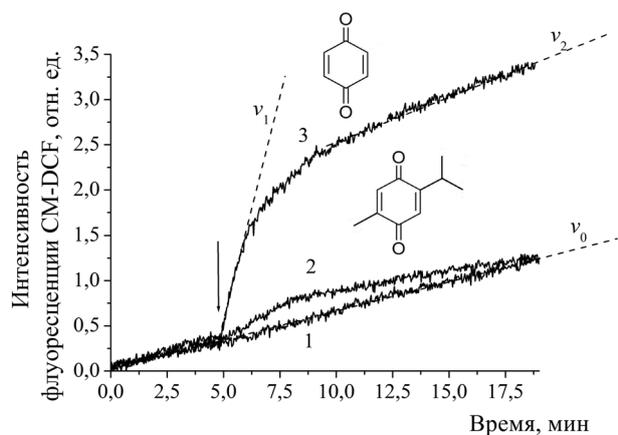


Рис. 1. Влияние хинонов на продукцию АФК клетками линии НЕР-2: 1 – контроль, 2 – 20 мкМ тимохинона, 3 – 20 мкМ 1,4-бензохинона

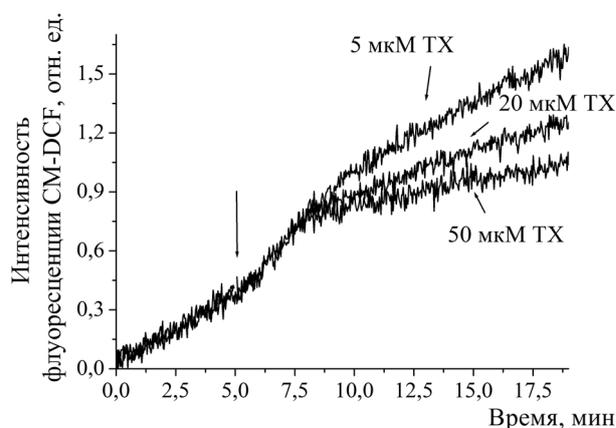


Рис. 2. Кинетика изменения интенсивности флуоресценции SM-DCE в клетках линии НЕР-2 при действии тимохинона (ТХ)

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  $\psi_m$  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-H<sub>2</sub>DCF.

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  $\psi_m$  увеличивалась (рис. 3). Показано, что циклоспорин А (ингибитор открытия mPTPs), предварительно введенный в суспензию клеток, ингибировал снижение  $\psi_m$  при действии хинона (рис. 3). Снижение митохондриального мембранного потенциала индуцировалось также 1,4-бензохиноном (рис. 3). Однако величина снижения  $\psi_m$  при действии 1,4-бензохинона была меньше, чем величина снижения  $\psi_m$ , индуцированного тимохиноном. Кроме того, снижение  $\psi_m$ , 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  $\psi_m$ , 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  $\psi_m$ , 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-

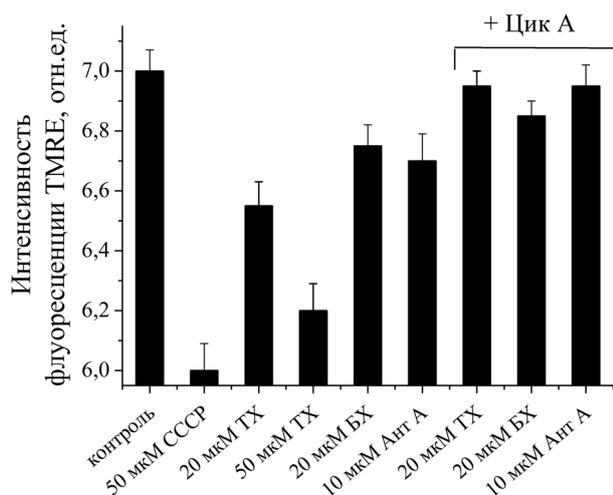


Рис. 3. Влияние хинонов и ингибиторов на величину митохондриального потенциала в клетках линии Нер-2: БХ – 1,4-бензохинон, Ант А – антимицин А, Цик А – циклоспорин А

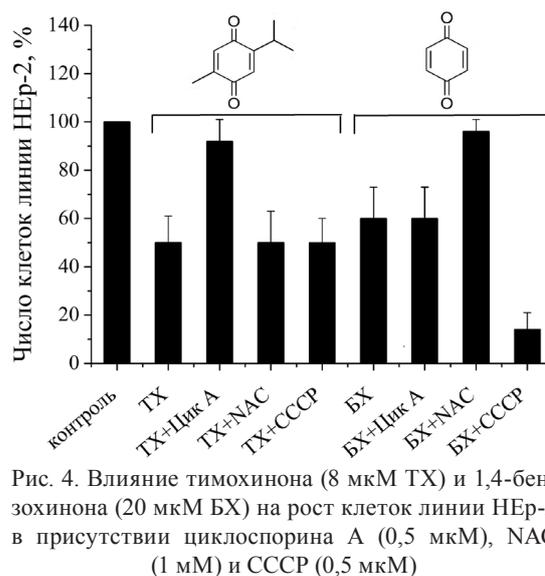


Рис. 4. Влияние тимохинона (8 мкМ ТХ) и 1,4-бензохинона (20 мкМ БХ) на рост клеток линии Нер-2 в присутствии циклоспорина А (0,5 мкМ), НАС (1 мМ) и СССР (0,5 мкМ)

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. *Мартинович, Г. Г.* Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г. Г. Мартинович, 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. *Мартинович, Г. Г.* Редокс-регуляция клеточных процессов: биофизическая модель и эксперимент / Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, 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. Мартинович [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. Мартинович [и др.] // *Докл. НАН Беларусі.* – 2015. – Т. 59, № 3. – С. 82–87.
7. *Мартинович, Г. Г.* Редокс-гомеостаз клеток / Г. Г. Мартинович, 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. *Мартинович, Г. Г.* Утилизация пероксида водорода эпителиальными клетками амниона человека / Г. Г. Мартинович, 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