

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ТИМОХИНОНА С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

А. В. Вчерашняя*, И. В. Мартинович, Г. Г. Мартинович,
О. И. Шадыро, С. Н. Черенкевич

УДК 535.375.5;543.424.2;577.3'32/.36

Белорусский государственный университет,
220030, Минск, Беларусь; e-mail: vcherashniaya@gmail.com

(Поступила 12 марта 2020)

С применением методов флуоресцентного анализа и спектроскопии комбинационного рассеяния света исследованы механизмы действия 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинона (timoquinone) на клетки карциномы гортани человека линии HEp-2. Обнаружено, что тимохинон характеризуется более выраженным токсическим действием по сравнению с 1,4-бензохиноном и 2,3,5-триметил-1,4-бензохиноном. Показано, что при действии тимохинона наблюдаются снижение митохондриального потенциала и высвобождение цитохрома c из митохондрий, что свидетельствует об активации программируемой гибели опухолевых клеток по митохондриально-опосредованному пути. Полученные результаты указывают на перспективность применения метода спектроскопии комбинационного рассеяния света в исследовании программируемой гибели клеток.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния света, апоптоз, тимохинон, опухолевые клетки.

The mechanisms of 2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone (thymoquinone) action on human larynx carcinoma cells of the HEp-2 line were studied using methods of fluorescence assay and Raman spectroscopy. It was found that thymoquinone has a more pronounced toxic effect compared to 1,4-benzoquinone and 2,3,5-trimethyl-1,4-benzoquinone. A decrease of the mitochondrial potential and the release of cytochrome c from the mitochondria are observed under the action of thymoquinone, which indicates the activation of apoptosis of the tumor cells along the mitochondrial-mediated pathway. The obtained results demonstrate the prospects of using Raman spectroscopy in the study of programmed cell death.

Keywords: Raman spectroscopy, apoptosis, thymoquinone, cancer cells.

Введение. Поиск новых регуляторов программируемой гибели опухолевых клеток и детальное изучение механизмов их действия — одно из приоритетных направлений современной медицинской биофизики. Среди основных механизмов гибели клеток выделяют некроз, апоптоз и аутофагию [1]. Апоптоз и аутофагию относят к физиологическим запрограммированным механизмам гибели клеток, тогда как некроз является нерегулируемой гибелью клеток при действии повреждающих факторов [2—4]. Нарушение механизмов регуляции гибели клеток наблюдается при многих патологических процессах, включая онкологические, поэтому поиск эффективных индукторов программируемой клеточной смерти и разработка новых методов исследования молекулярных, биохимических и биофизических показателей, позволяющих дифференцировать различные типы гибели клеток, являются важными этапами развития современных биомедицинских технологий.

Среди регуляторов процессов гибели опухолевых клеток особое место занимают пара-бензохиноны и их производные, которые наряду с противоопухолевой проявляют противовирусную и противовоспалительную активность [5—7]. К таким высокоэффективным биорегуляторам относят-

STUDY OF MECHANISMS OF THYMOQUINONE ANTITUMOR ACTION USING RAMAN SPECTROSCOPY

A. V. Vcherashniaya*, I. V. Martinovich, G. G. Martinovich, O. I. Shadyro, S. N. Cherenkevich
(Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus, e-mail: vcherashniaya@gmail.com)

ся тимохинон (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон) — основной компонент эфирного и нелетучего масел черного тмина (*Nigella sativa*) [7—9]. Образующиеся в опухолевых клетках при действии тимохинона активные формы кислорода (АФК) являются участниками редокс-сигнальных процессов, ведущих к формированию митохондриальных пор высокой проницаемости и запуску программируемой гибели клеток [10]. Поскольку увеличение продукции АФК и формирование митохондриальных пор высокой проницаемости наблюдаются на сигнальных стадиях аутофагии и апоптоза, для детализации механизмов и дифференциации программируемой гибели клеток важно выявление этапа запуска эффекторной (следующей за сигнальной) стадии программы, в связи с чем для дальнейшего обоснования детального механизма действия тимохинона необходимо изучить последующие стадии клеточной гибели. Важнейшим участником активации митохондриально-опосредованного апоптоза является белок цитохром *c*, выполняющий роль триггера активации каспазного каскада, приводящего к разрушению макромолекул и последующей фрагментации клетки на апоптотические тельца [11]. Таким образом, изучение процессов распределения цитохрома *c* позволит выявить инициацию апоптоза до проявления морфологических изменений клетки.

В настоящее время в исследованиях биологических систем широко применяется метод спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР) [12, 13]. В отличие от флуоресцентных методов, требующих предварительной маркировки специфическими зондами исследуемых биомолекул или внутриклеточных компартментов, метод спектроскопии КР позволяет получить информацию о локальном химическом составе любой части исследуемого образца [14]. Спектроскопия КР обладает высоким пространственным и временным разрешением и является неинвазивным методом, что позволяет осуществлять наблюдение и анализ биохимических процессов в живых клетках. С помощью КР спектроскопии исследовано внутриклеточное распределение цитохрома *c*, индуцированное действием тимохинона. Цитохром *c* поглощает свет при 530 нм и благодаря резонансному поглощению возбуждающего света с $\lambda = 532$ нм можно наблюдать интенсивный спектр КР [15]. Для исследования внутриклеточного распределения белка используется полоса с максимумом в КР-спектре 750 см^{-1} , характерная для колебательной моды пиррольного кольца в молекуле цитохрома *c* [16, 17].

Материалы и методы. Использованы клетки эпидермальной карциномы гортани человека линии НЕр-2. Культивирование клеток проводили в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 8—10 % эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицина (0.08 мг/мл) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Ведение культуры осуществлялось в стерильных пластиковых флаконах с площадью дна 25 см², снабженных фильтрами для воздуха. При исследовании действия *para*-бензохинонов (1,4-бензохинона, 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинона и 2,3,5-триметил-1,4-бензохинона) на пролиферативную активность клетки культивировались в стерильных пластиковых чашках Петри диаметром 35 мм. При пересеве концентрация клеток составляла $1 \cdot 10^5$ кл/мл. Соединения добавляли в чашки Петри через 24 ч после посева клеток. Подсчет клеток проводили на четвертые сутки культивирования.

Для проведения измерений спектрально-оптическими методами использован сбалансированный буферный солевой раствор (СБСР) состава: 131 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1.3 мМ CaCl₂, 1.3 мМ MgSO₄, 0.4 мМ KН₂РO₄, 20 мМ Нерес, 6 мМ глюкоза, рН 7.4.

Для исследований методами флуоресцентного анализа и КР спектроскопии культивирование клеток осуществляли на кремниевых пластинах в стерильных чашках Петри. При пересеве концентрация клеток составляла $0.3 \cdot 10^5$ кл/мл. На третьи сутки культивирования образовавшийся на кремниевой пластине монослой клеток дважды отмывали СБСР.

Исследование внутриклеточного распределения цитохрома *c* проводили методом КР спектроскопии с помощью спектрально-аналитического комплекса на основе сканирующего конфокального микроскопа Nanofinder HighEnd (LOTIS-III, Беларусь–Япония) и лазера с $\lambda = 532$ нм (3.2 мВт, время накопления сигнала 2 с, шаг сканирования 1 мкм).

Для мониторинга изменения митохондриального мембранного потенциала использован этиловый эфир тетраметилродамина (TMRE). Клетки в СБСР инкубировались с 0.1 мкМ зонда в течение 30 мин при температуре 37 °С. Зарегистрированы кинетические зависимости изменения митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi$) спектрофлуориметром CM 2203 (“Солар”, Беларусь). Интенсивность флуоресценции TMRE измерена при $\lambda_{\text{возб}} = 545$ нм и $\lambda_{\text{рег}} = 590$ нм. Для определения направления изменения митохондриального мембранного потенциала использован протонофор СССР концентрацией 5 мкМ. Изучение распределения митохондрий в опухолевых клетках, а также качественная оценка изменения митохондриального мембранного потенциала проведены с помощью спек-

трально-аналитического комплекса на основе сканирующего конфокального микроскопа Nanofinder HighEnd (LOTIS-ТII, Беларусь–Япония) и лазера с $\lambda = 532$ нм (мощность 3.2 мВт, время накопления сигнала 1 с, шаг сканирования 0.4 мкм). Флуоресценция TMRE зарегистрирована на $\lambda = 590$ нм.

Приведенные кинетические зависимости типичны для серии трех-пяти независимых экспериментов. Результаты представлены как средние значения плюс-минус стандартное отклонение от среднего для трех-пяти независимых экспериментов. Достоверность определена с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом достоверных различий при уровне значимости $p < 0.05$ ($*p < 0.05$ по сравнению с контролем).

Результаты и их обсуждение. Исследовано действие *para*-бензохинонов (1,4-бензохинона, тимохинона и 2,3,5-триметил-1,4-бензохинона) в концентрациях 0.8–80 мкМ на пролиферативную активность клеток карциномы гортани человека линии НЕР-2 (рис. 1). Как видно, *para*-бензохиноны в исследуемых концентрациях вызывают дозозависимое снижение числа опухолевых клеток в культуре в сравнении с контрольным образцом. Наиболее токсичным из исследуемых *para*-бензохинонов является тимохинон. Концентрация 50 %-го ингибирования (IC_{50}) роста клеток в культуре для тимохинона 8 мкМ, для 1,4-бензохинона 25 мкМ, для 2,3,5-триметил-1,4-бензохинона 30 мкМ.

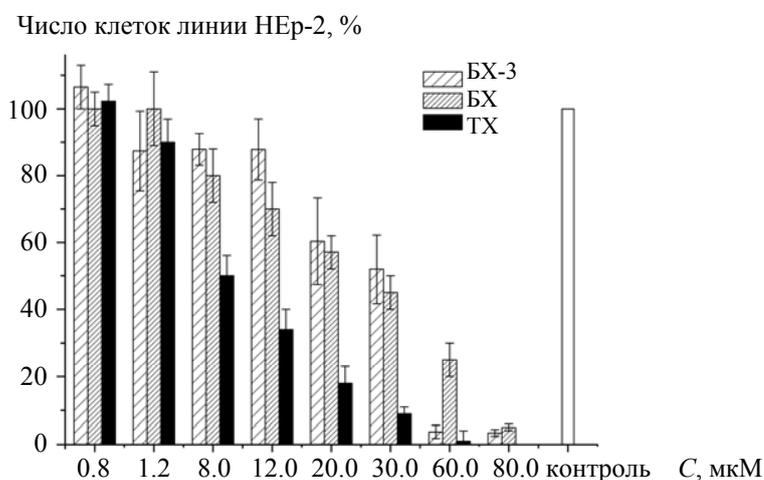


Рис. 1. Изменение числа клеток линии НЕР-2 при культивировании с *para*-бензохинонами: БХ-3 — 2,3,5-триметил-1,4-бензохинон, БХ — 1,4-бензохинон, ТХ — тимохинон

Для установления механизмов токсического действия *para*-бензохинонов проведена оценка изменения митохондриального мембранного потенциала. Обнаружено, что при добавлении *para*-бензохинонов в суспензию опухолевых клеток уменьшается интенсивность флуоресценции TMRE, что указывает на снижение митохондриального потенциала. На рис. 2, а представлены зависимости изменения митохондриального потенциала клеток от концентрации тимохинона и 2,3,5-триметил-1,4-бензохинона. Снижение митохондриального мембранного потенциала увеличивается с ростом концентрации *para*-бензохинонов и для тимохинона является более выраженным. Различие в зависимости снижения митохондриального потенциала от концентрации соединения для тимохинона и 2,3,5-триметил-1,4-бензохинона позволяет предположить различие механизмов токсического действия данных соединений на опухолевые клетки. Для изучения роли митохондриальных пор высокой проницаемости в индуцированном хинонами снижении митохондриального мембранного потенциала использован циклоспорин А — ингибитор открытия пор высокой проницаемости. Циклоспорин А, предварительно введенный в суспензию клеток, ингибировал снижение митохондриального мембранного потенциала при действии тимохинона (рис. 2, б). При этом снижение митохондриального потенциала, индуцированное действием 1,4-бензохинона и 2,3,5-триметил-1,4-бензохинона, не блокировалось циклоспорином А.

Для детализации механизма программируемой гибели клеток, активируемой при действии тимохинона, исследовано внутриклеточное распределение цитохрома *c* до и после добавления агента. На рис. 3, а и б представлены изображения опухолевых клеток, реконструированные по распределению интенсивности характерного для цитохрома *c* пика $KP\ 750\ \text{см}^{-1}$ до и после добавления тимохинона; на рис. 3, в и г — соответствующие им профили интенсивности пика $KP\ 750\ \text{см}^{-1}$ для попереч-

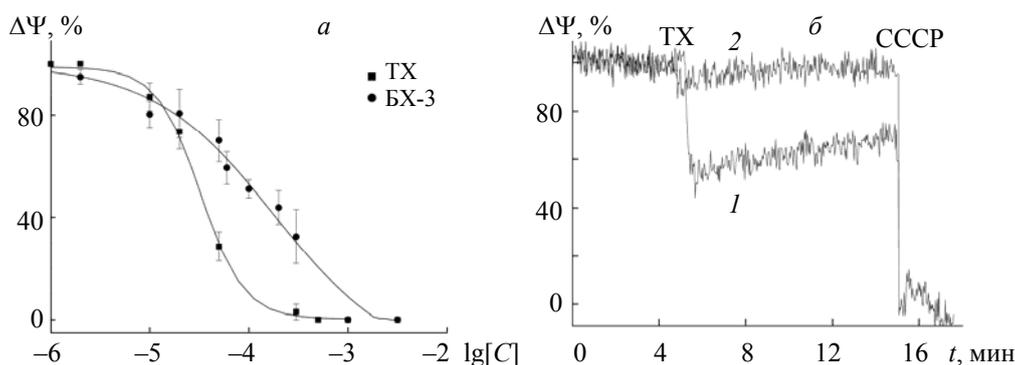


Рис. 2. Действие *para*-бензохинонов на митохондриальный мембранный потенциал клеток Нер-2: зависимости $\Delta\Psi$ от концентрации тимохинона и 2,3,5-триметил-1,4-бензохинона (а); действие тимохинона на $\Delta\Psi$: 20 мкМ тимохинона (1); 20 мкМ тимохинона (клетки 60 мин инкубировали с циклоспорином А) (2) (б)

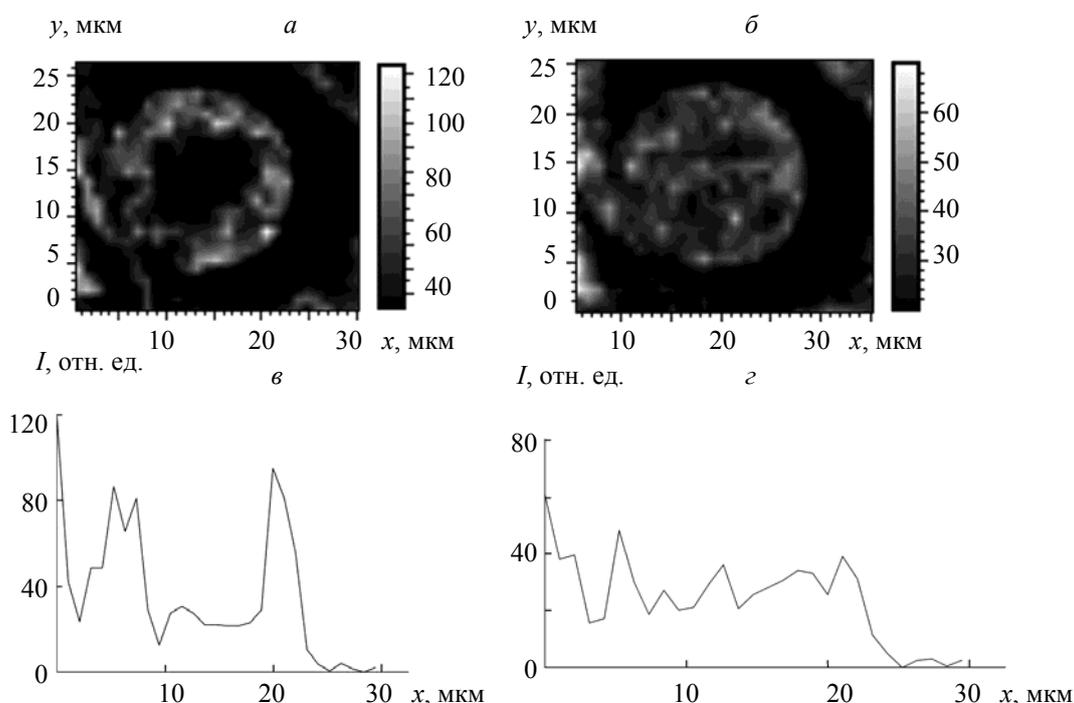


Рис. 3. Распределение интенсивности пика 750 см^{-1} в клетках карциномы гортани линии Нер-2: контрольные клетки (а, в); клетки в присутствии тимохинона концентрацией 20 мкМ (б, г)

ного сечения $y = 15\text{ мкм}$. Исследование профиля интенсивности пика 750 см^{-1} показывает, что до стимуляции тимохиноном выявляется наличие пиков интенсивности в примембранных областях клеток, свидетельствующее о компартиментализации белка. Как показано на рис. 3, б, добавление тимохинона приводит к внутриклеточному перераспределению цитохрома *c*. При этом в спектрах клеток, стимулированных тимохиноном, наблюдается относительно равномерное распределение интенсивности пика 750 см^{-1} , что указывает на выход цитохрома *c* из матрикса митохондрий в цитозоль клетки (рис. 3, б и г).

Исследование роли митохондрий в процессе компартиментализации цитохрома *c* проведено с помощью лазерной конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентного зонда TMRE. TMRE является липофильным катионом с делокализованным зарядом, который избирательно накапливается в самой электроотрицательной области клеток — матриксе митохондрий. Количество зонда TMRE в митохондриях зависит от потенциала на внутренней мембране митохондрий. На рис. 4 представлены флуоресцентные изображения опухолевых клеток, окрашенных TMRE, в контроле и после

добавления тимохинона. Преимущественное накопление зонда указывает на локализацию митохондрий в примембранных областях контрольных клеток. После добавления тимохинона наблюдается снижение митохондриального мембранного потенциала, сопровождающееся частичным выходом флуоресцентного зонда из митохондрий и соответствующим изменением внутриклеточного распределения интенсивности флуоресценции зонда.

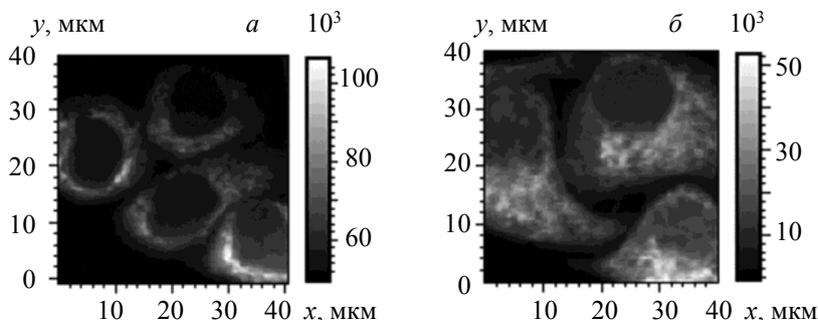


Рис. 4. Флуоресценция TMRE в клетках карциномы гортани человека линии Hep-2: *a* — контрольные клетки; *б* — концентрация тимохинона 20 мкМ

На основании полученных данных о распределении цитохрома *c* и внутриклеточной локализации митохондрий можно сделать вывод, что при действии тимохинона индукция программируемой гибели опухолевых клеток осуществляется по митохондриально-опосредованному пути.

Заключение. Полученные с использованием методов флуоресцентного анализа и спектроскопии комбинационного рассеяния света данные о высвобождении цитохрома *c* из матрикса митохондрий при действии тимохинона свидетельствуют об активации митохондриально-опосредованного апоптоза в опухолевых клетках. Исследование внутриклеточного распределения цитохрома *c* методом спектроскопии комбинационного рассеяния позволяет изучать ранние стадии апоптоза, что является важным преимуществом метода по сравнению с биохимическими и морфологическими методами изучения программируемой гибели клеток.

- [1] N. N. Danial, S. J. Korsmeyer. *Cell*, **116** (2004) 205—219
- [2] J. Kerr, A. Wyllie, A. Currie. *Br. J. Cancer.*, **26** (1972) 239—257
- [3] J. Doherty, E. H. Baehrecke. *Nat. Cell. Biol.*, **20** (2018) 1110—1117
- [4] Q. Chen, J. Kang, C. Fu. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, **3**, N 18 (2018) 1—11
- [5] P. R. Dandawate, A. C. Vyas, S. B. Padhye, M. W. Singh, J. B. Baruah. *Min. Rev. Med. Chem.*, **10**, N 5 (2010) 436—454
- [6] P. S. Shuveksh, K. Ahmed, S. Padhye, R. Schobert, B. Biersack. *Curr. Med.*, **24**, N 18 (2017) 1998—2009
- [7] C. C. Wooa, A. P. Kumara, G. S. Kwong, H. B. Tana. *Biochem. Pharmacol.*, **83**, N 4 (2012) 443—451
- [8] S. Banerjee, S. Padhye, A. Azmi, Z. Wang, P. A. Philip, O. Kucuk, F. H. Sarkar, R. M. Mohammad. *Nutr. Cancer.*, **62**, N 7 (2010) 938—946
- [9] R. Schneider-Stock, I. H. Fakhoury, A. M. Zaki, C. O. El-Baba, H. U. Gali-Muhtasib. *Drug. Discov. Today*, **19**, N 1 (2014) 18—30
- [10] G. G. Martinovich, I. V. Martinovich, A. V. Vcherashniaya, O. I. Shadyro, S. N. Cherenkevich. *Biophys.*, **61**, N 6 (2016) 963—970
- [11] J. Cai, J. Yang, D. P. Jones. *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, N 1-2 (1998) 139—149
- [12] H. Butler, L. Ashton, B. Bird. *Nat. Protoc.*, **11** (2016) 664—687
- [13] R. Smith, K. L. Wright, L. Ashton. *Analyst*, **141**, N 12 (2016) 3590—3600
- [14] K. Klein, A. M. Gigler, T. Aschenbrenner, R. Monetti, W. Bunk, F. Jamitzky, G. Morfill, R. W. Stark, J. Schlegel. *Biophys. J.*, **102** (2012) 360—368
- [15] A. F. Palonpon, M. Sodeoka, K. Fujita. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17** (2013) 708—715
- [16] S. Hu, I. K. Morris, J. P. Singh, K. M. Smith, T. G. Spiro. *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993) 12446—12458
- [17] M. Okada, N. Smith, A. Palonpon, H. Endo, S. Kawata, M. Sodeoka, K. Fujita. *Nat. Acad. Sci. USA*, **109** (2011) 28—32