

2. Свиридов Д. В. Сонохимическая пассивация алюминия и алюминиевых сплавов / Д. В. Свиридов, Д. Г. Шукин, Т. В. Свиридова // Свиридовские чтения: Сб. ст. Вып. 6. Минск. 2010. С. 37–40.
3. Andreeva D. V. Nanoengineered Metal Surface Capsules: Construction of a metal-protective system / D. V. Andreeva, D. V. Sviridov, A. Masic et al. // Small. 2012. Vol. 8. № 6. P. 820–825.
4. Skorb E. V., Andreeva D. V. Surface nanoarchitecture for bioapplications: self-regulating intelligent interfaces // Adv. Funct. Mater. 2013. Vol. 23. P. 4483–4506.
5. Phillis J. W., Estevez A. Y., O'Regan M. H. Protective effects of the free radical scavengers, dimethyl sulfoxide and ethanol, in cerebral ischemia in gerbils // Neurosci Lett. 1998. Vol. 244. № 2. P. 109–111.
6. Cherepanov P. V., Melnyk I., Andreeva D. V. Effect of HIUS on binary AlNi alloy crystallite size // Ultrasonics Sonochemistry. 2015. Vol. 23. P. 26–30.

ТИМОХИНОН-ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ

**М. С. Дробыш, А. В. Маликова, М. Х. Гарлыева, Н. Г. Крылова,
Г. Н. Семенкова, О. И. Шадыро**

Тимохинон (2-метил-5-изопропил-1,4-бензохинон, TQ), который является природным компонентом семян черного тмина, проявляет противоопухолевую активность по отношению к различным типам рака *in vivo* и *in vitro* [1–2]. Показано, что TQ способен индуцировать гибель раковых клеток по механизму апоптоза. Представленные в работах [1–4] данные демонстрируют, что при действии TQ могут активироваться различные внутриклеточные пути запуска апоптоза. Выявлено, что TQ подавляет активацию *NF-κB*, модулирует активность белков семейства *Bax/Bcl2*, приводит к активации каспаз 3, 8 и 9 и белка *p53*. Кроме того, в развитии TQ-индуцированного апоптоза вовлечены продуцируемые опухолевыми клетками активные формы кислорода (АФК). В то же время, молекулярные механизмы, лежащие в основе редокс-опосредованной противоопухолевой активности TQ, остаются до конца не выясненными. Целью данной работы было изучение редокс-зависимых механизмов TQ-индуцированного апоптоза в клетках глиомы.

В работе оценивали пролиферативную активность и жизнеспособность клеток глиомы крысы линии С6 флуоресцентным методом с использованием иодида пропидиума (PI). Процент апоптотической гибели клеток изучали с использованием аннексина V, меченого FITC, на проточном цитофлуориметре. Продукция пероксида водорода и уровень восстановленного глутатиона в клетках при действии TQ в различных концентрациях оценивали с использованием 2,7-дихлор-дигидрофлуоресцеин-диацетата (DCF) и монохлоробимана, соответственно.

На рисунке 1 представлены результаты измерения пролиферации и жизнеспособности клеток глиомы при действии тимохинона (TQ) в различных концентрациях в течение 24 ч. Видно, что тимохинон оказывает цитотоксическое и цитостатическое действие в диапазоне концентраций 10–100 мкМ с $ID_{50} = 60$ мкМ. При повышении концентрации тимохинона до 70–100 мкМ регистрировалась гибель всех клеток.

Известно, что PI проникает только в некротические клетки, но не в живые или апоптотические клетки, для которых характерно сохранение целостности плазматической мембраны. Из рисунка 1Б видно, что при действии тимохинона в концентрации 30 мкМ и выше регистрируется увеличение доли некротических клеток: от (15 ± 10) % при действии 30 мкМ TQ до (49 ± 7) % при концентрации TQ 70 мкМ. Интересно, что при действии TQ в концентрации 20 мкМ наблюдается значительное снижение числа клеток на (26 ± 4) % (рисунок 1А), в то время как жизнеспособность клеток остается на уровне контрольных значений. Можно предположить, что TQ в концентрации 20 мкМ индуцирует преимущественно апоптоз клеток глиомы.

Методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина-V было установлено, что тимохинон индуцирует апоптоз в клетках глиомы. На рисунке 2 представлены гистограммы распределения клеток C6, меченых аннексин V-FITC и PI, в контрольных образцах (А) и инкубированных с тимохиноном в концентрации 20 мкМ (Б) и 50 мкМ (В) в течение 6 ч. Видно, что в образцах, подвергавшихся воздействию TQ, дозозависимо возрастает доля клеток, погибших по пути некроза и апоптоза. Так, в контрольных образцах доля апоптотических клеток составляет около 7 %, а при действии 20 мкМ и 50 мкМ TQ это значение возрастает до 20 и 30 %, соответственно.

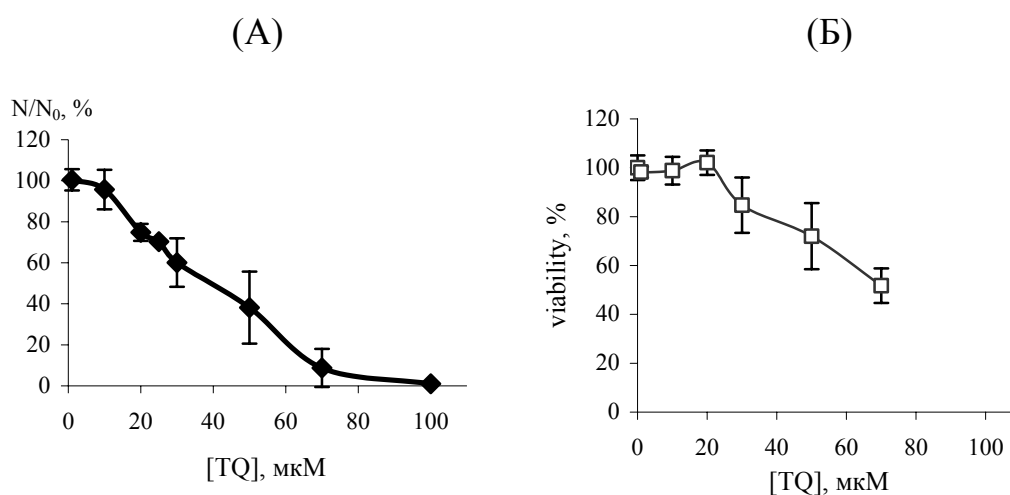


Рис. 1. Пролиферативная активность (А) и жизнеспособность (Б) клеток глиомы при 24 ч воздействии тимохинона в различных концентрациях

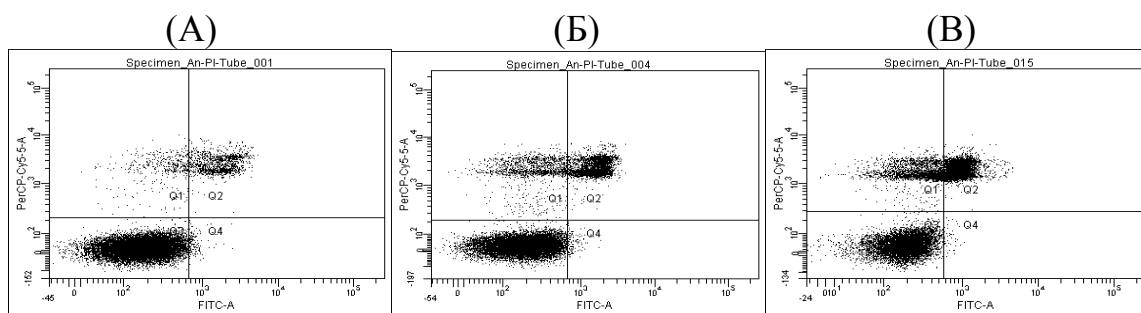


Рис. 2. Гистограммы распределения клеток С6, меченых аннексин V-FITC и PI, в контрольных образцах (А) и инкубированных с тимохиноном в концентрации 20 мкМ (Б) и 50 мкМ (В) в течение 6 ч

Известно, что в клетках хиноны могут участвовать в редокс-цикле с образованием АФК: хинон восстанавливается по одно- ($1e^-$) или двух-электронному ($2e^-$) механизму внутриклеточными редуктазами до семихинона или хинола, соответственно. Среди редуктаз, способных $1e^-$ восстанавливать хиноны, выделяют НАДФН-цитохром Р450-редуктазу, НАДН-цитохром b5-редуктазу, НАДН:убихинон оксидоредуктазу и др. [5] Семихиноны в свою очередь передают электроны на молекулы кислорода, приводя к образованию супероксидных анион-радикалов.

$2e^-$ -Восстановление осуществляется ДТ-диафоразой. Хинолы обладают высоким окислительно-восстановительным потенциалом и проявляют антиоксидантную активность, однако, показано, что в зависимости от своих физико-химических параметров некоторые хинолы могут подвергаться автоокислению или участвовать в реакции диспропорционирования, что приводит к дополнительной генерации АФК.

С целью установления роли редокс-превращений TQ в процессах гибели клеток С6, нами изучена продукция пероксида водорода при действии этого хинона. Нами установлено, что воздействие тимохинона в концентрации выше 20 мкМ индуцирует генерацию H_2O_2 в клетках глиомы. На рисунке 3А представлена концентрационные зависимости интегральной интенсивности флуоресценции зонда DCF за 10 минут, которые отражают суммарный выход пероксида водорода в клетках, инкубированных с тимохиноном в присутствии или отсутствие дикумарола - ингибитора ДТ-диафоразы. Видно, что в отсутствие дикумарола зависимость имеет колоколообразный вид: регистрируется дозозависимое повышение продукции H_2O_2 в диапазоне концентраций TQ от 20 до 70 мкМ, а при дальнейшем повышении концентрации TQ до 100 мкМ, выход H_2O_2 снижается в 1,3 раза относительно максимума.

В то же время, ингибирование ДТ-диафоразы дикумаролом приводит к подавлению продукции H_2O_2 при действии 20–50 мкМ TQ и значительному (в 1,3–1,4 раза) снижению выхода H_2O_2 при действии 70 мкМ TQ. Воздействие дикумарола не влияло на образование H_2O_2 , индуцированное добавлением TQ в концентрации 100 мкМ. Таким образом, как $1e^-$ - так и $2e^-$ -восстановление вносят вклад в TQ-индуцированную продукцию АФК, причем $2e^-$ -восстановление имеет определяющую роли при действии TQ в низких концентрациях.

Установлено, что тимохинон в диапазоне концентраций 10–100 мкМ дозозависимо снижает концентрацию внутриклеточного восстановленного глутатиона. Значения уровня GSH в С6 клетках после 30 мин воздействия TQ представлены на рисунке 3Б. 50 %-ое снижение концентрации GSH регистрируется уже при 20 мкМ TQ. При действии TQ в концентрации 100 мкМ детектируется полное истощение пула GSH. Из сравнения зависимостей выхода H_2O_2 и уровня GSH (рисунки 3А и 3Б) очевидно, что снижение GSH имеет более интенсивный характер. Это может быть обусловлено тем, что снижение GSH происходит не только за счет продукции АФК, но и при непосредственном присоединении к тимохинону с образованием TQ-SG конъюгатов.

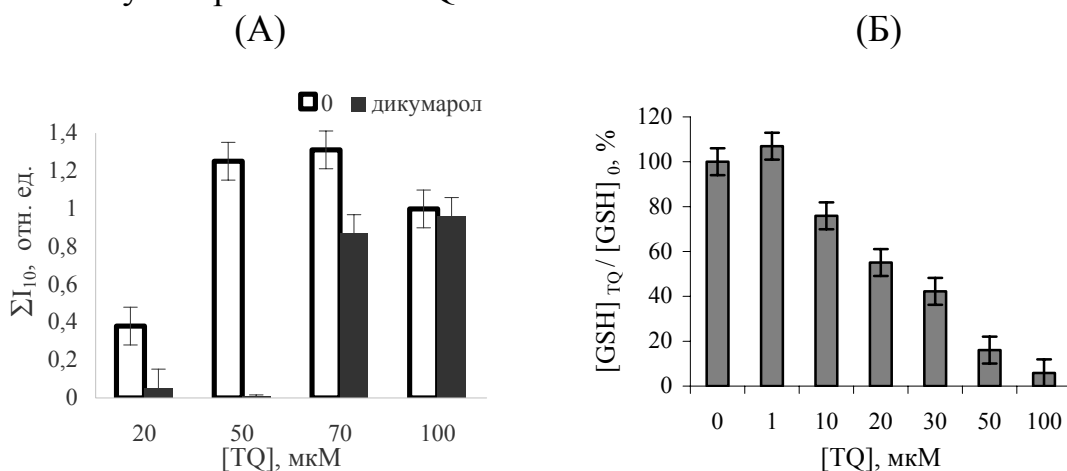


Рис. 3. Зависимости интегральной интенсивности флуоресценции DCF за 10 мин (А) и концентрации GSH (Б) в клетках С6 от концентрации добавленного TQ: значения уровня GSH в клетках после 30 мин воздействия TQ $[GSH]_{TQ}$ нормированы на концентрацию GSH в контрольном образце $[GSH]_0$

С целью установления молекулярных механизмов индукции апоптоза был проведен ингибиторный анализ ряда редокс-зависимых киназ, участие которых в редокс-регуляции клеточных функций хорошо известно [6]. Выявлено, что в условиях ингибирования ERK1/2, p38 и протеинкиназы С воздействие 20 мкМ тимохинона, также как и в контрольных образцах без ингибиторов, индуцирует гибель 25–30 % клеток С6. В то же

время, на фоне ингибирования фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и JNK киназы тимохинон не влияет на пролиферацию клеток глиомы. Методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина-V было показано, что ингибирование PI3K снижает долю апоптотических клеток с 20 до 13 % при воздействии 20 мкМ TQ в течение 6 ч. Таким образом, в TQ-индуцированный апоптоз клеток глиомы вовлечен PI3K/JNK сигнальный путь.

На основании полученных данных можно сделать следующий вывод: тимохинон, восстанавливаясь ДТ-диафоразой до хинола, индуцирует образование активных форм кислорода с последующим ингибированием PI3K/JNK сигнального пути и развитием апоптоза в клетках глиомы.

Литература

1. *Schneider-Stock R., Fakhoury I.H., Zaki A., El-Baba C., Gali-Muhtasib H.U.* Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models // *Drug Discov Today*, 2013. Vol. 1252. P. 1–13.
2. *Darakhshan S., Pour A. B., Colagar A. H., Sisakhtnezhad S.* Thymoquinone and its therapeutic potentials // *Pharmacol. Res.*, 2015. Vol. 2799. P. 1–21.
3. *Chu S., Hsieh Y., Yu C., Lai Y., Chen P.* Thymoquinone induces cell death in human squamous carcinoma cells via caspase activation-dependent apoptosis and LC3-II activation-dependent autophagy // *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9(7). P. e101579.
4. *Woo C., Hsu A., Kumar A., Sethi G., Tan K.* Thymoquinone inhibits tumor growth and induces apoptosis in a breast cancer xenograft mouse model: The role of p38 MAPK and ROS // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8(10). P. e75356.
5. *Крылова Н.Г., Кулагова Т.А., Семенкова Г.Н., Шадыро О.И., Черенкевич С.Н.* Молекулярные механизмы хинонопосредованной регуляции клеточных сигнальных путей // *Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук*. 2014. № 3. С.105–116.
6. *Trachootham D., Lu W., Ogasawara M.A., Rivera-del Valle N., Huang P.* Redox regulation of cell survival // *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 2008, Vol. 10(8). P. 1343–1374.

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ В СПИРТСОДЕРЖАЩЕЙ ПРОДУКЦИИ

А. Л. Корбан, А. А. Махомет

Поскольку алкогольная продукция является пищевым продуктом, то она подлежит обязательному государственному надзору по контролю качеством и безопасности. Основным показателем качества является содержание летучих токсичных микропримесей, наличие которых обусловлено технологий производства. Эти примеси в заметном количестве оказывают на организм человека пагубное воздействие. Государственному надзору подлежат следующие примеси: простейшие эфиры, спир-