

Л. В. КИРЕЙЧИКОВА¹, А. В. БОГДАНОВА^{2, 3}, Н. В. АМАЭГБЕРИ¹,
Н. Г. КРЫЛОВА¹, Т. А. КУЛАГОВА², Т. Э. ВЛАДИМИРСКАЯ⁴,
Г. Н. СЕМЕНКОВА⁴

ТИМОХИНОН РЕГУЛИРУЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета,
Минск, Беларусь

³Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

⁴Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь
E-mail: bahdanavanastasya@gmail.com

Введение. Тимохинон (TQ) или 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон является основным компонентом масла черного тмина (*Nigella sativa*). Как было показано с использованием многих моделей *in vivo* и *in vitro*, это природное соединение обладает потенциальным терапевтическим действием при воспалительных заболеваниях, поскольку проявляет антирадикальные и антиоксидантные свойства, способен регулировать про- и антиапоптотические процессы. Выявлено, что TQ способен регулировать в стадии канцерогенеза: инициацию, промоцию, прогрессию. Например, в присутствии TQ зарегистрировано подавление роста и метастазирования опухолей посредством активации внутриклеточных путей трансдукции сигнала, в которые вовлечены 5-LO, COX, MAPK, Nrf2 и NF-κB, что приводит к ингибированию синтеза

провоспалительных цитокинов, активации экспрессии антиоксидантных ферментов [1].

Одним из индукторов воспаления является оксидативный стресс, вызванный перепроизводством свободных радикалов и других оксидантов. В зоне воспаления источником активных форм кислорода и хлора (АФКХ) являются преимущественно нейтрофилы. Эти клетки при активации НАДФН-оксидазы генерируют супероксидные анион-радикалы, которые превращаются в субстрат миелопероксидазы (МПО) – пероксид водорода. МПО катализирует образование хлорноватистой кислоты (НОСl), которая является основным микробицидным агентом и источником свободных радикалов. Гиперпродукция АФКХ в процессе формирования респираторного взрыва нейтрофилов приводит к повреждению жизненно важных молекул, нарушению клеточных функций или цитодеструкции [2, 3]. Мы полагаем, что ТQ, благодаря антиоксидантным свойствам, способен снижать последствия оксидативного стресса в организме.

Цель работы – установить механизмы влияния ТQ на функциональную активность нейтрофилов крови.

Материалы и методы. В работе использованы: декстран-500, гистопак-1077, Triton X-100, *Micrococcus lysodeikticus*, питательная среда RPMI-1640, ТQ, 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтил-бензамидозолокарбоцианин (JC-1), Нерес, йодистый пропилий (PI) производства Sigma-Aldrich (Германия), Fura 2-AM производства Thermofisher Scientific (США). Компоненты для приготовления среды Эрла и буферных растворов (НТПК Анализ-Х, Республика Беларусь), гепарин (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь).

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной периферической крови человека в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике. Влияние ТQ на жизнеспособность нейтрофилов изучали флуоресцентным методом с использованием PI ($\lambda_{ex} = 530$ нм, $\lambda_{em} = 640$ нм) на спектрофлуориметре СМ 2203 (Solar, Республика Беларусь). Генерацию АФКХ и супероксидных анион-радикалов нейтрофилами исследовали методом хемиллюминесценции (ХЛ). В качестве усилителей ХЛ использовали 50 мкмоль/л люминола (Люм-ХЛ) и 12,5 мкмоль/л люцигенина (Люц-Х). Генерацию АФКХ клетками стимулировали адгезией к поверхности стекла. Интегральную интенсивность ХЛ регистрировали на биохемиллюминетре «БХЛ-1» (Минск, Республика Беларусь).

Изменение митохондриального потенциала клеток оценивали с помощью флуоресцентного зонда JC-1 ($\lambda_{ex} = 490$ нм, $\lambda_{em} = 530$ нм, 590 нм). Концентрацию ионов несвязанного цитозольного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) определяли с помощью флуоресцентного зонда Fura 2-AM ($\lambda_{ex} = 340, 380$ нм, $\lambda_{em} = 510$ нм) на спектрофлуориметре (СМ 2203 Solar, Республика Беларусь). Секреторную дегрануляцию анализировали по выходу лизоцима из клеток. Активность лизоцима в супернатанте измеряли по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрическим методом ($\lambda = 450$ нм).

Результаты статистически обработаны с использованием однофакторного дисперсионного анализа one-way ANOVA.

Результаты и их обсуждение. Показано, что 1 мкмоль/л TQ снижает интенсивность Люм-ХЛ и Люц-ХЛ нейтрофилов на 25 и 54 % соответственно, тогда как 10 мкмоль/л TQ практически полностью подавляет как Люм-ХЛ, так и Люц-ХЛ. Это свидетельствует о способности TQ с высокой эффективностью снижать продукцию АФКХ. Причем выход супероксидных анион-радикалов за счет ингибирования НАДФН-оксидазы подавляется в значительно большей степени, чем выход НОС1.

Снижение выхода НОС1 может быть связано с уменьшением образования пероксида водорода – субстрата МПО, влиянием TQ на активность этого фермента либо уменьшением секреции МПО во внеклеточную среду. Выявлено, что действие TQ в концентрациях 1 и 10 мкмоль/л на нейтрофилы не приводит к изменению секреторной дегрануляции. Можно предположить, что уменьшение продукции НОС1, зарегистрированное с помощью Люм-ХЛ, связано с влиянием исследуемого хинона на активность как МПО, так и НАДФН-оксидазы.

Активация нейтрофилов и генерация ими АФКХ сопряжена с повышением концентрации внутриклеточных ионов кальция посредством выхода из кальциевых депо или поступления из внеклеточной среды через плазматическую мембрану. Ионы кальция являются вторичными мессенджерами в процессах внутриклеточной сигнализации, вовлеченных в формирование респираторного взрыва. Нами изучено влияние TQ на концентрацию ионов кальция в цитозоле нейтрофилов в течение 60 мин стимуляции. Добавление к нейтрофилам TQ в концентрации 1 мкмоль/л не приводит к изменению динамики и интенсивности этого процесса. Однако при добавлении 10 мкмоль/л TQ к клеткам зарегистрировано значительное, более чем в 3; 2,2 и 2 раза повышение концентрации $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле нейтрофилов через 20, 40, 60 мин соответственно.

Увеличение концентрации несвязанных ионов кальция в цитозоле может быть связано с подавлением редокс-активности митохондрий. Перегрузка митохондрий ионами кальция приводит к деполяризации мембраны, открытию пор, выходу цитохрома С в цитоплазму клеток и последующему развитию апоптотического процесса. Действительно, при инкубировании нейтрофилов с TQ (1–10 мкмоль/л) в течение 30 мин зарегистрировано снижение митохондриального мембранного потенциала на $39,5 \pm 1,6$ – $66,3 \pm 2,9$ %. Следовательно, при действии TQ вероятно развитие апоптоза в нейтрофилах, что предотвращает воспалительный процесс.

Полученные результаты не связаны со снижением жизнеспособности клеток при действии TQ.

Выводы. Таким образом, TQ оказывает модулирующее влияние на функциональные свойства нейтрофилов за счет изменения механизмов формирования респираторного взрыва, что может приводить к предотвращению развития оксидативного стресса и, как следствие, воспаления.

Литература

1. Thymoquinone: A novel strategy to combat cancer: A review / M. Imran, A. Rauf, I. A. Khan [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – Vol. 106. – P. 390–402.
2. Othman, A. Roles of neutrophil granule proteins in orchestrating inflammation and immunity / A. Othman, M. Sekheri, J. G. Filep // *The FEBS Journal.* – 2022. – Vol. 289, N 14. – P. 3932–3953.
3. Hawkins, C. L. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins / C. L. Hawkins, D. I. Pattison, M. J. Davies // *Amino Acids.* – 2003. – Vol. 25 (3–4). – P. 259–274.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Совет молодых ученых

МОЛОДЕЖЬ В НАУКЕ 2025

Тезисы докладов
XXII Международной
научной конференции
молодых ученых
(Минск, 16–18 сентября 2025 г.)

В четырех частях

Часть 2

Биологические
и медицинские
науки

Минск
«Беларуская навука»
2025