

УДК 577.1

ТИМОХИНОН ВЫЗЫВАЕТ ПОВРЕЖДЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ И ГИБЕЛЬ ЗЕРНИСТЫХ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА*

© 2020 Е.В. Стельмашук¹, Н.С. Четвериков², С.А. Гольшев³,
Е.Е. Генрихс¹, Н.К. Исаев^{1,2**}

¹ Научный центр неврологии, 125367 Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: nisaev61@mail.ru

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 11.07.2019

После доработки 11.11.2019

Принята к публикации 13.11.2019

Тимохинон (TQ) обладает широким спектром биологической активности. Большинство исследований, направленных на изучение нейротоксического действия TQ, проводится на моделях раковых клеточных линий. Данная работа проведена для определения токсических концентраций TQ в первичных культурах нейронов. Показано, что добавление 0,04–0,05 мМ TQ на 24 ч индуцировало дозозависимую гибель культивированных зернистых нейронов мозжечка (КЗН). Используя CellROX Green и MitoSOX Red, обнаружено, что гибели клеток предшествует увеличение образования свободных радикалов. Конфокальная и электронная микроскопия показали, что добавление 0,05 мМ TQ в течение 5 ч индуцировало необычное изменение локализации митохондрий в клетке, увеличение размеров этих органелл и набухание клеток. Антиоксидант *N*-ацетил-L-цистеин (НАС, 2 мМ) значительно защищал КЗН от этого токсического действия. В совокупности полученные данные позволяют предположить, что TQ может быть токсичным для нормальных нейронов, а ROS-зависимые процессы изменения митохондрий являются одной из основных причин повреждения и смерти нейронов, вызванной тимохиноном.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тимохинон, митохондрия, зернистые нейроны мозжечка, *N*-ацетил-L-цистеин.

DOI: 10.31857/S0320972520020074

Тимохинон (2-метил-5-изопропил-1,4-бензохинон, TQ) был определен как один из основных компонентов и активный ингредиент в масле семян *Nigella sativa* [1]. Этот хинон обладает широким спектром положительной биологической активности, такой как иммуностимулирующая, противовоспалительная и антимуtagenная [2–4]. Тимохинон способен инактивировать супероксид, гидроксил радикал и молекулы синглетного кислорода [5]. Показано, что TQ оказывает защитное действие посредством ингибирования процесса перекисного окисления липидов при ишемическом/реперфузионном повреждении гиппокампа крысы [6], а также защищает культивированные первичные нейроны

крысы от нейротоксичности, вызванной бета-амилоидом (Абета) [7], путем снижения дисфункции митохондрий, ингибируя окислительный стресс [8]. Обнаружено, что TQ защищает культивированные клетки SH-SY5Y и гиппокампа крысы от цитотоксичности, индуцированной мышьяком, снижая дисфункцию митохондрий [9, 10], а также первичную мезенцефальную клеточную культуру от дофаминергической гибели клеток, вызванной 1-метил-4-фенилпиридинием [11]. Кроме того, митохондриально-направленные антиоксиданты, содержащие тимохинон, обладают нейропротекторными свойствами [12, 13]. Существует растущий интерес к терапевтическому потенциалу TQ в различных областях исследований, особенно в терапии рака. Недавние исследования показали, что TQ проявляет цитотоксичность для нескольких линий раковых клеток [14–16], в том числе полученных из нервной ткани [17–20]. Окислительные или антиоксидантные эффекты TQ зависят от его концентрации. TQ (как хинон) может быть восстановлен различными редуктазами, образуя

Принятые сокращения: TQ – тимохинон; КЗН – культивированные зернистые нейроны; НАС – *N*-ацетил-L-цистеин; ROS – активные формы кислорода.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-215, 23.12.2019.

** Адресат для корреспонденции.

семихинон или тимогидрохинон. Как сообщалось, последняя молекула обладает антиоксидантным действием, в то же время семихинон действует как прооксидант путем генерации активных форм кислорода (ROS) [14, 21]. Видимо, TQ индуцирует апоптотическую гибель раковых клеток посредством окислительного стресса [14]. Однако следует отметить, что большинство исследований токсического действия TQ сделано на моделях раковых клеточных линий. В настоящее время исследования действия TQ, выполненные на нормальных культивируемых нейронах центральной нервной системы, немногочисленны. Данное исследование было выполнено для тестирования токсического действия TQ в первичных культурах нейронов *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичные культуры нейронов мозжечка крыс.

Первичные культуры получали из мозжечка 7–8-дневных крыс линии Вистар, как описано ранее [22]. Мозжечки отмывали PBS (Дульбекко), не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} , затем инкубировали в растворе 0,05%-ного трипсина и 0,02%-ной ЭДТА («Invitrogen», UK) 15 мин при 37 °С. После инкубации ткань дважды промывали в PBS и диссоциировали повторным пипетированием в питательной среде следующего состава: фетальная телячья сыворотка (10%), минимальная среда Игла (MEM 90%), глутамин (2 мМ) и NEPES (10 мМ). После мягкого центрифугирования клетки ресуспендировали в необходимом объеме питательной среды того же состава, содержащей 25 мМ KCl. Суспензию клеток добавляли в 96-луночный планшет, в чашки Петри диаметром 35 мм со стеклянным дном или на покровные стекла, покрытые поли-L-лизинном (0,1, 0,2 или 0,8 мл соответственно). Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе (5%-ная CO_2 , $36,5 \pm 0,5$ °С) до шести–семи дней *in vitro* (без смены среды).

Фармакологическая обработка. Эксперименты по определению выживаемости культивированных зернистых нейронов мозжечка (КЗН) крысы проводили в MEMe с добавлением 1%-ного B-27minus AO, 0,5 мМ глутамин, 25 мМ KCl, 10 мМ NEPES и 2 г/л NaHCO_3 , в состав которой в зависимости от эксперимента вносили тимохинон (0,01–0,06 мМ) или другие реагенты. Эксперименты по определению свободных радикалов и визуализации митохондрий с помощью родамина 123 проводили в сбалансированном солевом растворе следующего состава (в мМ): NaCl (154), KCl (25), CaCl_2 (2,3), MgCl_2

(1), NaHCO_3 (3,6), Na_2HPO_4 (0,35), глюкоза (5,6), NEPES (10), pH 7,3. Уровень хлорида калия в инкубационном растворе был таким же, как и в среде культивирования, чтобы предотвратить снижение уровня внутриклеточного кальция и инициацию апоптоза [23].

Определение выживаемости нейронов. В экспериментах по изучению токсичности TQ или защитного действия NAC выживаемость КЗН определяли как описано ранее [22]. После инкубации с TQ (0,01–0,05 мМ, 24 ч) клеточные культуры фиксировали смесью этанол–формальдегид–уксусная кислота (7 : 2 : 1) и окрашивали трипановым синим. Для световой микроскопии использовали инвертированный микроскоп Olympus SKX41 (Япония) с камерой CC12. Процент выживших нейронов оценивали путем подсчета морфологически неповрежденных ядер КЗН в пяти смежных, следующих друг за другом встык последовательных полях зрения по диаметру лунки планшета при объективе $\times 40$, что обеспечивает точную оценку выживаемости нейронов. Выживаемость необработанных контрольных культур принимали за 100%, а выживаемость экспериментальных культур подсчитывали в процентах от контроля.

Определение свободных радикалов. CellROX Green и MitoSOX Red являются флуоресцентными красителями, используемыми для измерения уровня ROS. Эти красители могут проникать в клетку и флуоресцируют только при окислении. Через 5 ч после начала эксперимента культуры окрашивали CellROX Green (0,005 мМ) или MitoSOX Red (0,005 мМ) (30 мин при $36,5 \pm 0,5$ °С) и трижды промывали сбалансированным соевым раствором. Краситель добавляли в то время, когда такие же культуры демонстрировали выраженные морфологические изменения в митохондриях, обнаруживаемые с помощью родамина 123. Флуоресценцию CellROX Green возбуждали синим светом с длиной волны 485 нм. Излучение регистрировали при 530 нм с помощью микропланшетного флуоресцентного сканера (SpectraMax M2, Molecular Devices USA). Флуоресценцию MitoSOX Red возбуждали зеленым светом с длиной волны 510 нм. Излучение регистрировали при длине волны 580 нм.

Визуализация митохондрий. После 5-часовой инкубации с TQ (0,05 мМ) клетки загружали 0,005 мМ родамина 123 в течение 15 мин при $36,5 \pm 0,5$ °С с последующей тройной промывкой в сбалансированном солевом растворе. Визуализацию митохондрий проводили с помощью конфокального микроскопа Olympus IX71 (Япония) со встроенными спиннинг-диском, объективом $\times 100$ и лазером OBIS (США) с

длиной волны 488 нм, и управляемого программой Coherent Connection 3. Флуоресцентные изображения клеток для визуализации митохондрий были сделаны с излучением при >500 нм и возбуждением при 488 нм.

Электронная микроскопия. Для исследований с помощью электронного микроскопа были использованы культуры, выращенные на покровных стеклах, покрытых поли-L-лизинном и помещенных в чашки Петри диаметром 40 мм [24]. Клетки культивировали в течение 6–7 дней *in vitro*. После 4–6-часовой обработки TQ (0,05 мМ) образцы фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида («SPI Inc.»), 100 мМ какодилата натрия в течение 48 ч при температуре 4 °C [25]. Фиксированные образцы дважды промывали свежим 100 мМ раствором какодилата натрия и фиксировали в течение 60 мин при температуре 4 °C 1%-ным тетроксидом осмия, растворенным в 100 мМ какодилата натрия. Затем образцы обезвоживали в серии возрастающих концентраций этанола. Дегидратация включала окрашивание 2%-ным уранилацетатом в 70%-ном этаноле в течение 1 ч при температуре 4 °C. За этанолом следовали ацетон и увеличивающаяся серия смесей ацетона и смолы и далее две смены чистой свежеприготовленной смолы. Наконец, покровные стекла помещали в силиконовые формы, заполненные смолой Spi-pon 812 («SPI Inc.»), США) и полимеризовали при 70 °C в течение 72 ч. Твердые блоки обрезали бритвенными лезвиями, а ультратонкие срезы (90 нм) готовили с использованием ультрамикротомата Ultracut E («Reichert-Jung», Германия), оснащенного алмазным ножом Ultra 45 («Diatome», Швейцария). Срезы монтировали на покрытых формваром медных сетках и дополнительно контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата в течение 40 мин и цитратом свинца в течение 3 мин. Образцы исследовали с получением электронных микрофотографий с помощью электронного микроскопа Jeol JEM-1400 («JEOL», Япония), работающего при 100 кВ и оснащенного CCD-камерой Quemesa («Olympus Soft Imaging Solutions»).

Статистика. Все результаты получены на 9–12 отдельных культурах в 3–4 независимых экспериментах. Данные исследуемых параметров имели нормальное распределение и анализировали с помощью *t*-теста или однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с критерием Ньюмена–Кейлса или Бонферрони. Значения $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимые. Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего ($M \pm SEM$).

Реагенты. Все среды и добавки, используемые в эксперименте (если не указано другое),

были получены от «Biochrom KG» (Германия); CellROX Green, MitoSOX Red и родамин 123 – от «Invitrogen» (США). Тимохинон и другие реагенты – «Sigma Chemicals» (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Токсичность тимохинона. Была исследована токсичность тимохинона в диапазоне концентраций 0,01–0,05 мМ. Обнаружено, что добавление TQ (0,04–0,05 мМ, 24 ч) в культуры приводит к появлению пикнотических ядер в зернистых нейронах мозжечка. Их образование достоверно указывает на гибель клеток. Выживаемость клеток оценивали путем подсчета морфологически интактных КЗН (рис. 1). Степень токсичности тимохинона зависела от его концентрации в среде культивирования. Для дальнейшей работы были выбраны концентрации тимохинона, которые по литературным данным проявляли токсичность для раковых клеток.

Определение окислительного стресса. Измерения уровня ROS с помощью флуоресцентных зондов показали, что 5-часовое воздействие 0,05 мМ TQ приводило к увеличению флуоресценции CellROX Green в живых КЗН до $334 \pm \pm 50\%$, а MitoSOX Red – до $144 \pm 10\%$ по сравнению с контролем (рис. 2). Реагент MitoSOX Red проникает в живые клетки, где он избирательно накапливается митохондриями. Этот зонд быстро окисляется супероксидом. Окисленный продукт флуоресцирует при связывании с нуклеиновыми кислотами. CellROX Green – это проникающий в клетки краситель, который проявляет после окисления ROS ярко-зеленую фотостабильную флуоресценцию.

Электронная микроскопия. Для исследования морфологических изменений, вызванных обработкой TQ зернистых нейронов мозжечка, использовали электронную микроскопию. Изучение клеточной ультраструктуры показало, что контрольные зернистые нейроны мозжечка, культивируемые в нормальных условиях, имели округлую форму тела, большую часть которого занимало ядро с диффузным хроматином и небольшими скоплениями (глыбками) конденсированного хроматина. Ультраструктура митохондрий была типичной для нормальных клеток: митохондрии не были увеличены и имели овальную или удлинненную форму. Кристы были хорошо видны, а митохондриальный матрикс имел более высокую электронную плотность, чем окружающая цитоплазма (рис. 3). Митохондрии обычно располагались вокруг ядра и в зонах отхождения отростков. В нейронах, обработанных TQ в течение 5 ч, митохондрии выгляде-

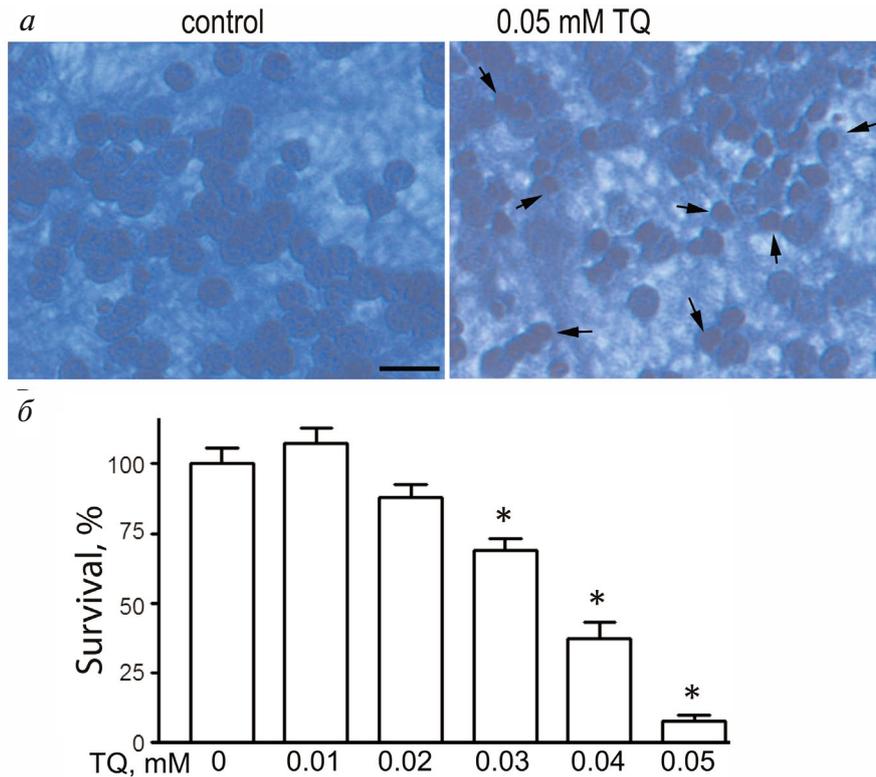


Рис. 1. Влияние тимохинона (TQ) на жизнеспособность зернистых нейронов мозжечка. *a* – Культуры фиксировали смесью этанол-формальдегид-уксусная кислота (7 : 2 : 1) и окрашивали трипановым синим. Пикнотические ядра КЗН обозначены стрелками. Масштабный отрезок 15 мкм; *б* – количественная оценка выживаемости нейронов путем подсчета морфологически неповрежденных зернистых нейронов мозжечка. Статистически значимое отличие от контрольных значений (0 мкМ TQ), ** $p < 0,01$.

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

ли гипертрофированными, но электронная плотность их матрикса существенно не изменялась. Сами митохондрии собирались в группу в цитоплазме. Электронная плотность цитоплазмы и ядер нейронов была заметно ниже, чем в

контроле, что, по-видимому, было связано с набуханием клеток (рис. 3).

НАС защищает от токсичности тимохинона.

Визуализацию митохондрий проводили путем окрашивания родамином 123 с использованием конфокальной микроскопии. В митохондриях нейронов контрольных культур активно накапливался родамин 123, который имел зеленую флуоресценцию при облучении синим светом. Вокруг ядра располагались митохондрии одинаковой толщины в форме палочек (рис. 4). В нейронах, обработанных 0,05 мМ TQ в течение 5 ч, митохондрии были сосредоточены в одной части клетки, и некоторые из них выглядели набухшими. Обработка культур антиоксидантом NAC (2 мМ) предотвращала аномальное изменение положения митохондрий в нейронах и набухание этих органелл (рис. 4).

Подсчет нейронов с нормальной морфологией в гистологических препаратах показал, что после воздействия TQ (0,05 мМ, 24 ч) выжило $24 \pm 5\%$ клеток. В этих же условиях введение 2 мМ антиоксиданта NAC защищало нейроны

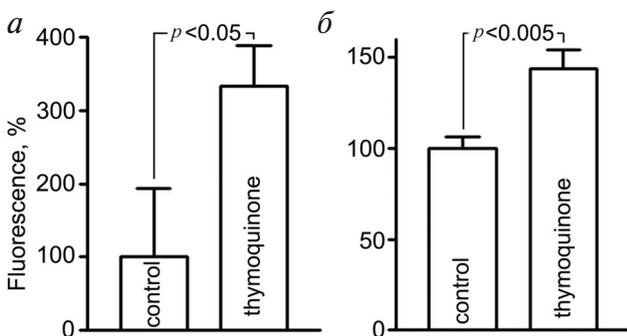


Рис. 2. Увеличение флуоресценции CellROX Green (*a*) и MitoSOX Red (*б*) (продукция свободных радикалов) в зернистых нейронах мозжечка (5-часовая обработка тимохиноном, 0,05 мМ) в среде культивирования. Количественная оценка специфической флуоресценции зонда

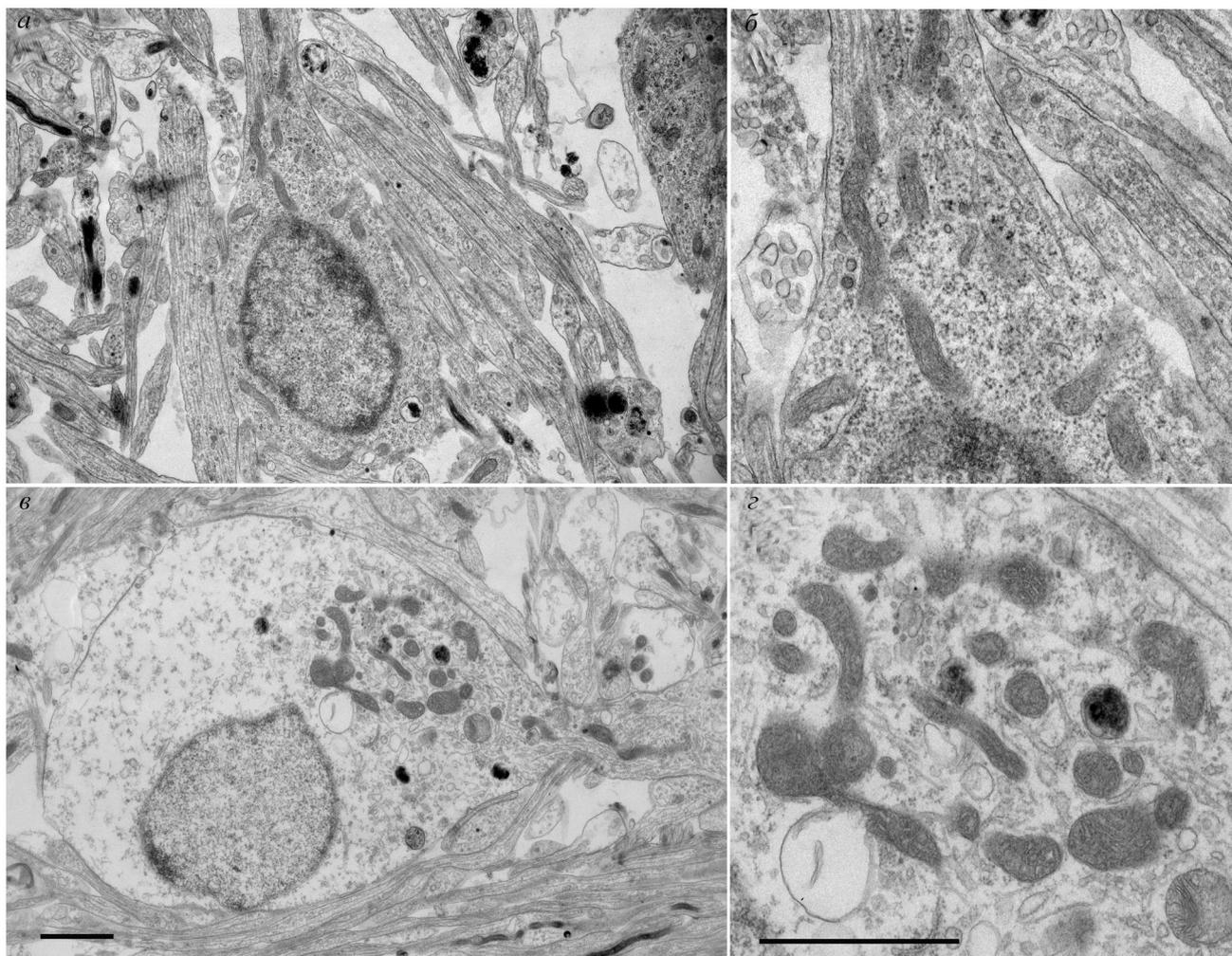


Рис. 3. Трансмиссионная электронная микрофотография культивированных зернистых нейронов мозжечка. *а–б*) Контрольную культуру инкубировали в нормальной питательной среде. Митохондрии и другие компартменты выглядят неповрежденными; *в–г*) клетки после 5-часового воздействия 0,05 мМ ТQ в среде культивирования. Отмечается увеличение размеров митохондрий. Сами митохондрии группируются в цитоплазме в непосредственной близости от места отхождения отростка. Наблюдается заметное набухание тела клетки и ядра. Масштабный отрезок 1,5 мкм

от токсического воздействия (рис. 5): выживаемость нейронов увеличивалась до $82 \pm 2\%$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

TQ проявляет широкий спектр биологической активности, включая антиоксидантный, нейропротекторный, антипролиферативный, антиметастатический, цитотоксический, проапоптотический и связанные с действием натуральных киллеров цитотоксические эффекты [26–30]. Противоопухолевые эффекты TQ, в основном, связаны с индукцией остановки клеточного цикла в G2/M фазах и стимуляции апоптотических путей с ингибированием аутофагии, ангиогенеза, инвазии и миграции, а так-

же с повышением эффективности химиотерапевтических препаратов [31]. Несколько исследований показали, что TQ проявляет терапевтический эффект при лечении опухолей центральной нервной системы. Тимохинон ингибирует рост клеток медуллобластомы человека, индуцируя окислительный стресс и каспазозависимый апоптоз, одновременно подавляя сигнализацию NF- κ B и экспрессию IL-8 [32]. Он также уменьшает миграцию и инвазию клеток глиобластомы человека [33]. Большинство исследований нейротоксического действия TQ выполнено на моделях раковых клеточных линий. В настоящее время исследования действия TQ, выполненные на нормальных культивируемых нейронах центральной нервной системы, немногочисленны. Данное исследование проводи-

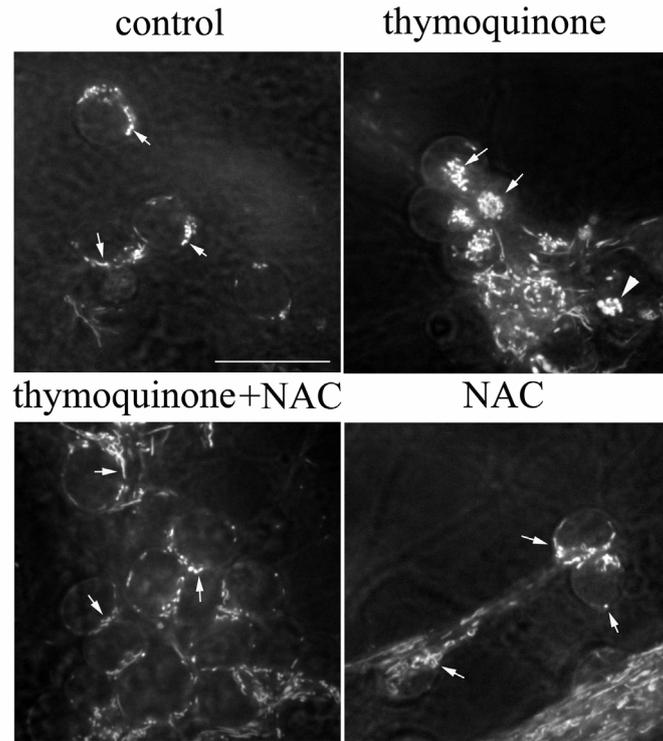


Рис. 4. NAC предотвращает вызванное тимохиноном (0,05 мМ, 5 ч) изменение локализации митохондрий в теле нейрона и набухание этих органелл. Живые зернистые нейроны мозжечка в диссоциированной культуре окрашивали родамином 123. Митохондрии указаны стрелками. Треугольники указывают на набухание митохондрий. Масштабный отрезок 15 мкм

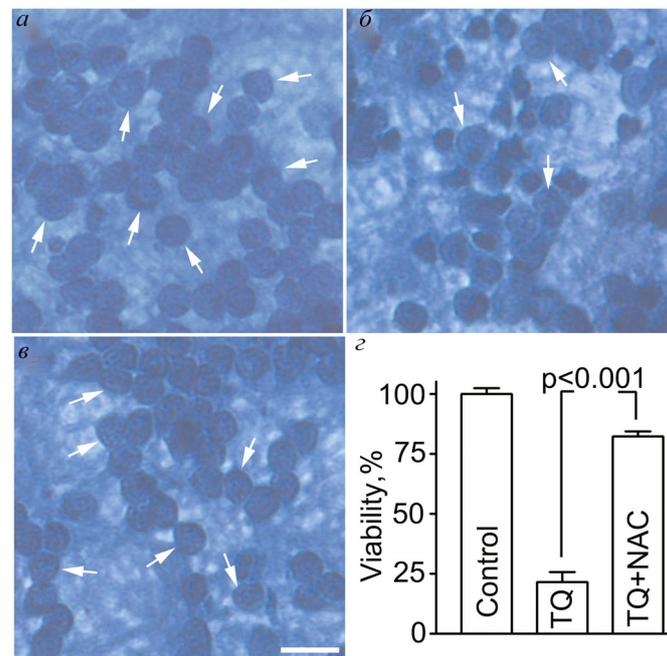


Рис. 5. Антиоксидант NAC ослабляет токсическое действие TQ в культивируемых зернистых нейронах мозжечка. Культуры фиксировали смесью спирт-формальдегид-уксусная кислота (7 : 2 : 1) и окрашивали трипановым синим. Нормальные ядра КЗН обозначены стрелками. *a* – Контроль; *b* – TQ; *c* – TQ+NAC. Масштабный отрезок 15 мкм; *d* – количественная оценка выживаемости нейронов.

С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

ли на диссоциированных культурах нейронов мозжечка крыс. Большим преимуществом такой культуры клеток является морфологическая и нейрхимическая однородность нейронов, что делает ее хорошей моделью для изучения патологических процессов в нейронах, в том числе, цитотоксичности [22, 25, 34, 35]. Показано, что введение 0,03–0,05 мМ ТQ индуцировало дозо-зависимую гибель нейронов в культурах. По-видимому, токсическое действие ТQ связано с нарушением ионного баланса в цитоплазме и набуханием клеток, так как при исследовании ультраструктуры нейронов выявлено снижение электронной плотности цитоплазмы и ядер этих клеток. В более ранних работах интервал токсических концентраций ТQ был определен на клетках медуллобластомы человека, нейробластомы мыши (Neuro-2a) и глиобластомы человека [18, 32, 33]. Авторы отмечали, что ТQ проявлял цитотоксическое действие на клетки глиобластомы в концентрации 0,05 мМ, не оказывая существенного влияния на жизнеспособность нормальных астроцитов или фибробластов [33]. Токсичность ТQ в концентрации 0,05 мМ показана и для клеток медуллобластомы. Это вещество приводило к увеличению уровня ROS, который отвечает за индукцию апоптоза в клетках медуллобластомы [32]. Используя CellROX Green и MitoSOX Red в качестве зондов для определения внутриклеточных свободных радикалов, мы показали, что ТQ вызывает избыточное образование свободных радикалов в нормальных нейронах в условиях культивирования. Тот факт, что антиоксидант NAC защищает нейроны от гибели, вызванной тимохиноном, также подтверждает участие окислительного стресса в механизме повреждения нейронов при этом токсическом воздействии. MitoSOX Red – это флуоресцентный краситель, специально направленный на митохондрии живых клеток; с помощью этого реагента можно обнаружить продукцию супероксида митохондриями [36, 37]. Митохондрии являются не только важными источниками ROS в клетке, но и одной из главных мишеней для этих химически активных молекул. Продукция свободных радикалов, вызванная тимохиноном, в культурах нейронов сопровождалась изменением локализации митохондрий. Как правило, митохон-

дрии КЗН располагаются вокруг ядра, тогда как ТQ вызывал необычное скопление этих органелл в ограниченной области цитоплазмы. Кроме того, ТQ приводил к увеличению размеров этих органелл и их набуханию. Присутствие антиоксиданта NAC в среде культивирования предотвращало все изменения митохондрий, вызванные токсическим действием ТQ, что может указывать на роль свободных радикалов в повреждении митохондрий, вызванном тимохиноном. Следует отметить, что в клетках рака мочевого пузыря ТQ в концентрациях, токсичных для нейронов, может индуцировать цитотоксичность, а также вызывать дисфункцию митохондрий [38]. Интересно, что одним из механизмов защитного действия ТQ является его антиоксидантное действие [39]. Однако известно, что многие антиоксиданты в высоких концентрациях проявляют прооксидантную активность, могут вызывать окислительный стресс и гибель клеток. Проявление прооксидантных свойств зависит от химической природы антиоксиданта, наличия металлов переменной валентности используемой концентрации, например, сильным антиоксидантом является SkQ1 (10 (6'-пластохинонил) децил-трифенилфосфоний), который в высоких концентрациях проявляет свойства прооксиданта [40].

Таким образом, все эти факты позволяют предположить, что ТQ может быть токсичным для нормальных нейронов, а ROS-зависимые процессы деструкции митохондрий могут быть одной из основных причин повреждения и гибели нейронов, вызванной тимохиноном.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводили исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций. Обращение и экспериментальные процедуры с животными выполняли в соответствии с директивами Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burits, M., and Bucar, F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, *Phytother. Res.*, **14**, 323–328.
2. Hajhashemi, V., Ghannadi, A., and Jafarabadi, H. (2004) Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and anti-inflammatory drug, *Phytother. Res.*, **18**, 195–199, doi: 10.1002/ptr.1390.
3. Ahmed, A.M., Al-Olayan, E.M., Aboul-Soud, M.A., and Al-Khedhairi, A.A. (2010) The immune enhancer, thymoquinone, and the hope of utilizing the immune system of *Aedes caspius* against disease agents, *Afr. J. Biotechnol.*, **9**, 3183–3195.
4. Khader, M., Bresgen, N., and Eckl, P.M. (2010) Antimutagenic effects of ethanolic extracts from selected

- Palestinian medicinal plants, J. Ethnopharmacol.*, **127**, 319–324, doi: 10.1016/j.jep.2009.11.001.
5. Al-Majed, A.A., Al-Omar, F.A., and Nagi, M.N. (2006) Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus, *Eur. J. Pharmacol.*, **543**, 40–47, doi: 10.1016/j.ejphar.2006.05.046.
 6. Hosseinzadeh, H., Parvardeh, S., Asl, M.N., Sadeghnia, H.R., and Ziaee, T. (2007) Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus, *Phytomedicine*, **14**, 621–627, doi: 10.1016/j.phymed.2006.12.005.
 7. Alhebshi, A.H., Gotoh, M., and Suzuki, I. (2013) Thymoquinone protects cultured rat primary neurons against amyloid β -induced neurotoxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **433**, 362–367, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.139.
 8. Khan, A., Vaibhav, K., Javed, H., Khan, M.M., Tabassum, R., Ahmed, M.E., Srivastava, P., Khuwaja, G., Islam, F., Siddiqui, M.S., Safhi, M.M., and Islam, F. (2012) Attenuation of $A\beta$ -induced neurotoxicity by thymoquinone via inhibition of mitochondrial dysfunction and oxidative stress, *Mol. Cell Biochem.*, **369**, 55–65, doi: 10.1007/s11010-012-1368-x.
 9. Firdaus, F., Zafeer, M.F., Anis, E., Ahmad, F., Hossain, M.M., Ali, A., and Afzal, M. (2019) Evaluation of phyto-medicinal efficacy of thymoquinone against Arsenic induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in SH-SY5Y cells, *Phytomedicine*, **54**, 224–230, doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.197.
 10. Firdaus, F., Zafeer, M.F., Waseem, M., Ullah, R., Ahmad, M., and Afzal, M. (2018) Thymoquinone alleviates arsenic induced hippocampal toxicity and mitochondrial dysfunction by modulating mPTP in Wistar rats, *Biomed Pharmacother.*, **102**, 1152–1160, doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.159.
 11. Radad, K.S., Al-Shraim, M.M., Moustafa, M.F., and Rausch, W.D. (2015) Neuroprotective role of thymoquinone against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced dopaminergic cell death in primary mesencephalic cell culture, *Neurosciences (Riyadh)*, **20**.
 12. Genrikhs, E.E., Stelmashook, E.V., Popova, O.V., Kapay, N.A., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skrebitsky, V.G., Skulachev, V.P., and Isaev, N.K. (2015) Mitochondria-targeted antioxidant SkQT1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat and prevents amyloid- β -induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices, *J. Drug Target.*, **23**, 347–352, doi: 10.3109/1061186X.2014.997736.
 13. Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Genrikhs, E.E., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Kapkaeva, M.R., and Skulachev, V.P. (2016) Neuroprotective properties of mitochondria-targeted antioxidants of the SkQ-type, *Rev. Neurosci.*, **27**, 849–855, doi: 10.1515/revneuro-2016-0036.
 14. El-Najjar, N., Chatila, M., Moukadem, H., Vuorela, H., Ocker, M., Gandesiri, M., Schneider-Stock, R., and Galim Muhtasib, H. (2010) Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling, *Apoptosis*, **15**, 183–195, doi: 10.1007/s10495-009-0421-z.
 15. Park, E.J., Chauhan, A.K., Min, K.J., Park, D.C., and Kwon, T.K. (2016) Thymoquinone induces apoptosis through downregulation of c-FLIP and Bcl-2 in renal carcinoma Caki cells, *Oncol. Rep.*, **36**, 2261–2267, doi: 10.3892/or.2016.5019.
 16. Assaf, M.D., Semaan, J., El-Sabban, M., Al-Jaouni, S.K., Azar, R., Kamal, M.A., and Harakeh, S. (2018) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by thymoquinone via modulation of TGF family, p53, p21 and Bcl-2 α in leukemic cells, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **18**, 210–215, doi: 10.2174/1871520617666170912133054.
 17. Gurung, R.L., Lim, S.N., Khaw, A.K., Soon, J.F., Shenoy, K., Mohamed Ali, S., Jayapal, M., Sethu, S., Baskar, R., and Hande, M.P. (2010) Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells, *PLoS One*, **5**, e12124, doi: 10.1371/journal.pone.0012124.
 18. Paramasivam, A., Sambantham, S., Shabnam, J., Raghunandhakumar, S., Anandan, B., Rajiv, R., Vijayashree Priyadharsini, J., and Jayaraman, G. (2012) Anti-cancer effects of thymoquinone in mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells through caspase-3 activation with down-regulation of XIAP, *Toxicol. Lett.*, **213**, 151–149, doi: 10.1016/j.toxlet.2012.06.011.
 19. Paramasivam, A., Raghunandhakumar, S., Priyadharsini, J.V., and Jayaraman, G. (2015) *In vitro* anti-neuroblastoma activity of thymoquinone against Neuro-2a cells via cell-cycle arrest, *Asian. Pac. J. Cancer Prev.*, **16**, 8313–8319, doi: 10.7314/apjcp.2015.16.18.8313.
 20. Elmaci, I., and Altinoz, M.A. (2016) Thymoquinone: an edible redox-active quinone for the pharmacotherapy of neurodegenerative conditions and glial brain tumors. A short review, *Biomed. Pharmacother.*, **83**, 635–640, doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.018.
 21. Mansour, M.A., Nagi, M.N., El-Khatib, A.S., and Al-Bekairi, A.M. (2002) Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action, *Cell. Biochem. Funct.*, **20**, 143–151, doi: 10.1002/cbf.968.
 22. Isaev, N.K., Genrikhs, E.E., Aleksandrova, O.P., Zelenova, E.A., and Stelmashook, E.V. (2016) Glucose deprivation stimulates Cu^{2+} toxicity in cultured cerebellar granule neurons and Cu^{2+} -dependent zinc release, *Toxicol. Lett.*, **250–251**, 29–34, doi: 10.1016/j.toxlet.2016.04.002.
 23. Galli, C., Meucci, O., Scorziello, A., Werge, T.M., Calissano, P., and Schettini, G. (1995) Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis, *J. Neurosci.*, **15**, 1172–1179.
 24. Stelmashook, E.V., Genrikhs, E.E., Mukhaleva, E.V., Kapkaeva, M.R., Kondratenko, R.V., Skrebitsky, V.G., and Isaev, N.K. (2019) Neuroprotective effects of methylene blue *in vivo* and *in vitro*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 445–455, doi: 10.1007/s10517-019-04548-3.
 25. Isaev, N.K., Avilkina, A., Golyshev, S.A., Genrikhs, E.E., Alexandrova, O.P., Kapkaeva, M.R., and Stelmashook, E.V. (2018) *N*-acetyl-L-cysteine and Mn^{2+} attenuate Cd^{2+} -induced disturbance of the intracellular free calcium homeostasis in cultured cerebellar granule neurons, *Toxicology*, **393**, 1–8, doi: 10.1016/j.tox.2017.10.017.
 26. Ebrahimi, S.S., Oryan, S., Izadpanah, E., and Hassanzadeh, K. (2017) Thymoquinone exerts neuroprotective effect in animal model of Parkinson's disease, *Toxicol. Lett.*, **276**, 108–114, doi: 10.1016/j.toxlet.2017.05.018.
 27. Majdalawieh, A.F., Fayyad, M.W., and Nasrallah, G.K. (2017) Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **57**, 3911–3928, doi: 10.1080/10408398.2016.1277971.
 28. Ullah, I., Ullah, N., Naseer, M.I., Lee, H.Y., and Kim, M.O. (2012) Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons, *BMC Neurosci.*, **13**, 11, doi: 10.1186/1471-2202-13-11.

29. Kanter, M. (2011) Protective effects of thymoquinone on the neuronal injury in frontal cortex after chronic toluene exposure, *J. Mol. Histol.*, **42**, 39–46, doi: 10.1007/s10735-010-9305-3.
30. Kanter, M. (2008) *Nigella sativa* and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats, *Neurochem. Res.*, **33**, 579–588.
31. Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Hozeifi, S., and Azimi-Nezhad, M. (2017) Therapeutic effects of thymoquinone for the treatment of central nervous system tumors: a review, *Biomed. Pharmacother.*, **96**, 1440–1444, doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.013.
32. Ashour, A.E., Ahmed, A.F., Kumar, A., Zoheir, K.M., Aboul-Soud, M.A., Ahmad, S.F., Attia, S.M., Abd-Allah, A.R., Cheryan, V.T. and Rishi, A.K. (2016) Thymoquinone inhibits growth of human medulloblastoma cells by inducing oxidative stress and caspase-dependent apoptosis while suppressing NF- κ B signaling and IL-8 expression, *Mol. Cell Biochem.*, **416**, 141–155, doi: 10.1007/s11010-016-2703-4.
33. Kolli-Bouhaf, K., Boukhari, A., Abusnina, A., Velot, E., Gies, J.P., Lugnier, C., and Rondé, P. (2012) Thymoquinone reduces migration and invasion of human glioblastoma cells associated with FAK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation, *Invest. New Drugs*, **30**, 2121–2131, doi: 10.1007/s10637-011-9777-3.
34. Thangnipon, W., Kingsbury, A., Webb, M., and Balazs, R. (1983) Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes, *Brain Res.*, **313**, 177–189, doi: 10.1016/0165-3806(83)90215-8.
35. Costa, L.G., Tagliaferri, S., Roqué, P.J., and Pellacani, C. (2016) Role of glutamate receptors in tetrabrominated diphenyl ether (BDE-47) neurotoxicity in mouse cerebellar granule neurons, *Toxicol. Lett.*, **241**, 159–166, doi: 10.1016/j.toxlet.2015.11.026.
36. Robinson, K.M., Janes, M.S., Pehar, M., Monette, J.S., Ross, M.F., Hagen, T.M., Murphy, M.P., and Beckman, J.S. (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15038–15043 doi: 10.1073/pnas.0601945103.
37. Johnson-Cadwell, L.I., Jekabsons, M.B., Wang, A., Polster, B.M., and Nicholls, D.G. (2007) “Mild Uncoupling” does not decrease mitochondrial superoxide levels in cultured cerebellar granule neurons but decreases spare respiratory capacity and increases toxicity to glutamate and oxidative stress, *J. Neurochem.*, **101**, 1619–1631.
38. Zhang, M., Du, H., Huang, Z., Zhang, P., Yue, Y., Wang, W., Liu, W., Zeng, J., Ma, J., Chen, G., Wang, X., and Fan, J. (2018) Thymoquinone induces apoptosis in bladder cancer cell via endoplasmic reticulum stress-dependent mitochondrial pathway, *Chem. Biol. Interact.*, **292**, 65–75, doi: 10.1016/j.cbi.2018.06.013.
39. Gökce, E.C., Kahveci, R., Gökce, A., Cemil, B., Aksoy, N., Sargon, M.F., Kisa, Ü., Erdoğan, B., Güvenç, Y., Alagöz, F., and Kahveci, O. (2016) Neuroprotective effects of thymoquinone against spinal cord ischemia-reperfusion injury by attenuation of inflammation, oxidative stress and apoptosis, *J. Neurosurg. Spine.*, **24**, 49–59, doi: 10.3171/2015.10.SPINE15612.
40. Stelmashook, E.V., Genrikhs, E.E., Kapkaeva, M.R., Zelenova, E.A., and Isaev, N.K. (2017) *N*-acetyl-L-cysteine in the presence of Cu²⁺ induces oxidative stress and death of granule neurons in dissociated cultures of rat cerebellum, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1176–1182, doi: 10.1134/S0006297917100108.

THYMOQUINONE INDUCES MITOCHONDRIAL DAMAGE AND DEATH OF CEREBELLAR GRANULE NEURONS*

E. V. Stelmashook¹, N. S. Chetverikov², S. A. Golyshev³, E. E. Genrikhs¹, and N. K. Isaev^{1,2,**}

¹ Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234, Moscow, Russia; E-mail: nisaev61@mail.ru

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Received July 11, 2019

Revised November 11, 2019

Accepted November 13, 2019

Thymoquinone (TQ) exhibits a wide spectrum of biological activities. Most studies on the neurotoxic action of TQ have been carried out in cancer cell lines. Here, we studied the toxic effect of TQ in primary neuronal cultures *in vitro*. Incubation with 0.04–0.05 mM TQ for 24 h induced the death of cultured cerebellar granule neurons (CGNs) in a dose-dependent manner. Neuronal death was preceded by an increase in the reactive oxygen species (ROS) generation, as demonstrated using CellROX Green and MitoSOX Red. Confocal and electron microscopy showed that incubation with 0.05 mM TQ for 5 h induced changes in the intracellular location of mitochondria and mitochondria hypertrophy and cell swelling. The antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine (2 mM) protected CGNs from the toxic action of TQ. Taken together, these facts suggest that TQ is toxic for normal neurons, while ROS-induced changes in the mitochondria can be one of the major causes of the TQ-induced neuronal damage and death.

Keywords: thymoquinone, mitochondria, cerebellar granule neurons, *N*-acetyl-L-cysteine