

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

The influence of melatonin and its derivatives on oxidative modification of proteins and lipids and activity of respiratory complexes in rat liver mitochondria under t-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress *in vitro* was studied. It was shown, that melatonin and its metabolites partly prevented the damage of proteins, lipids and the decreasing of respiratory complexes activity.

Митохондрии являются одним из основных источников активных форм кислорода (АФК) в клетке. Утечка электронов на уровнях I и III дыхательных комплексов приводит к генерации пероксида водорода и супероксидного анион-радикала, которые способны повреждать макромолекулы клетки (белки, липиды) [1]. Поскольку в митохондриях в физиологических условиях постоянно происходит генерация АФК, митохондрии обладают собственной антиоксидантной системой [2]. Особый интерес в плане неферментативной защиты митохондрий от АФК представляет мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин), наибольшая внутриклеточная концентрация которого обнаружена в данных органеллах [3]. Мелатонин не только является сильнейшим эндогенным антиоксидантом, но и способен активировать комплексы I и IV дыхательной цепи [4]. Роль мелатонина в антиоксидантной защите митохондрий достаточно хорошо изучена, чего нельзя сказать о его метаболитах. Известно, что мелатонин метаболизируется в митохондриях с образованием 6-ОН-мелатонина, N-ацетилсеротонина и N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамина (АФМК) [5], которые, как и исходное соединение, могут проявлять антиоксидантную активность.

Учитывая отсутствие в литературе данных о биологической роли метаболитов мелатонина в митохондриях, в настоящей работе была изучена их способность предотвращать окислительное повреждение белков, липидов и дыхательных комплексов митохондрий печени крыс в условиях экспериментального окислительного стресса.

Материал и методика

Митохондриальную фракцию печени самцов белых крыс получали методом дифференциального центрифугирования [6]. В митохондриальной фракции концентрацию белка определяли методом, описанным в [7], оценивали общее содержание карбонильных соединений [8] и продуктов перекисного окисления липидов [9].

Для получения субмитохондриальных частиц митохондрии (1 мг/мл) озвучивали на льду. Обработка включала 3 цикла по 10 с при мощности 15 Вт и два перерыва продолжительностью 30 с.

Активности НАДН : убихинон-оксидоредуктазы, убихинол : феррицитохром c-оксидоредуктазы, цитохромоксидазы дыхательной цепи определяли как описано в [10]. Активность сукцинат : убихинон-оксидоредуктазы измеряли согласно методике [11]. Для индукции окислительного повреждения дыхательных комплексов митохондрии инкубировали 20 мин в реакционной смеси с гидропероксид трет-бутилом (ГПТБ) (150 мкМ), после чего получали субмитохондриальные частицы. При изучении антиоксидантных свойств мелатонина, N-ацетилсеротонина, 6-ОН-мелатонина и АФМК в реакционную смесь вносили эквимоллярные концентрации данных соединений. Для повреждения белков и липидов митохондрии инкубировали с ГПТБ (1 мМ). Антиоксидантное действие мелатонина и его производных изучали в диапазоне концентраций 10 нМ÷100 мкМ.

Статистическую обработку данных осуществляли при помощи пакета статистических программ Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

В качестве индуктора окислительного повреждения макромолекул был использован ГПТБ, который способен непосредственно повреждать биомacroмолекулы. Он также снижает митохондриальный мембранный потенциал, вызывает изменения в кальциевом гомеостазе [12], нарушает антиоксидантно-прооксидантный баланс митохондрий за счет ингибирования активности глутатион-редуктазы и истощения пула глутатиона восстановленного – одного из основных антиоксидантов митохондрий [3]. С учетом этого ГПТБ был использован в настоящей работе для моделирования окислительного повреждения митохондриальных белков и липидов.

Установлено, что инкубация митохондрий печени крыс с ГПТБ приводит к увеличению содержания карбонильных соединений (маркеров окислительного повреждения белков) в 2,1 раза (рис. 1), а ТБК-активных продуктов (продуктов перекисного окисления липидов) – в 4 раза (рис. 2) по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют об окислительной модификации белков и липидов в присутствии органического гидропероксида.

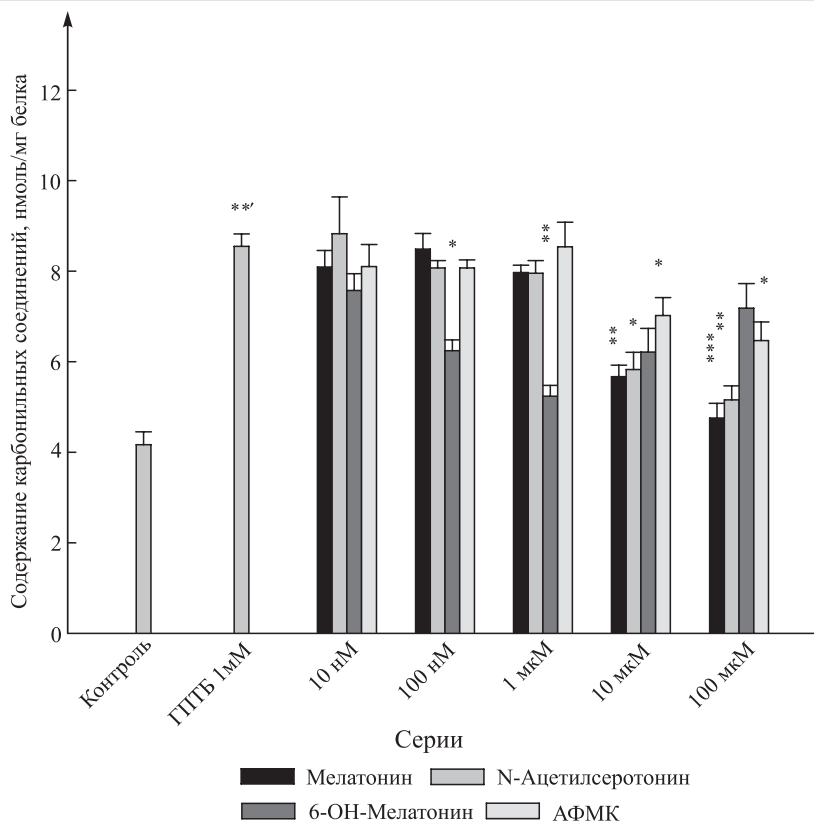


Рис. 1. Накопление карбонильных соединений в присутствии ГПТБ (1 мМ) в зависимости от различных концентраций мелатонина, N-ацетилсеротонина, 6-ОН-мелатонина и АФМК (достоверность рассчитывалась по отношению к контролю (***) $p < 0,01$) и к содержанию карбонильных соединений в присутствии ГПТБ (1 мМ) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ при $n = 3$)

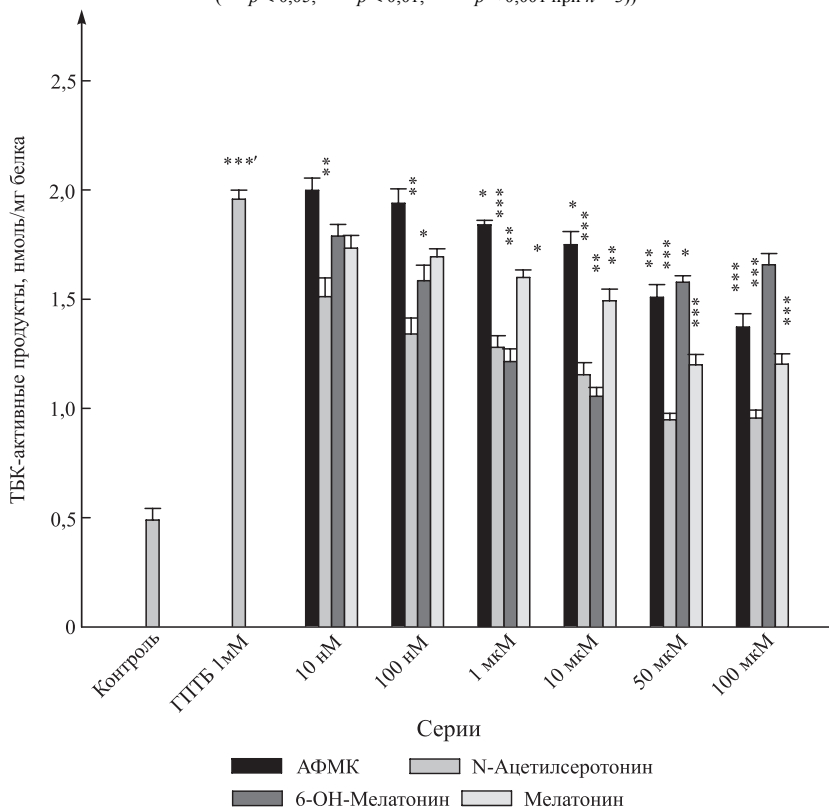


Рис. 2. Накопление ТБК-активных продуктов при инкубации митохондрий печени крыс с ГПТБ (1 мМ) в присутствии различных концентраций (10 нМ÷100 мкМ) АФМК, N-ацетилсеротонина, 6-ОН-мелатонина и мелатонина (достоверность рассчитывалась по отношению к контролю (***) $p < 0,01$) и к содержанию ТБК-активных продуктов в присутствии ГПТБ (1 мМ) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ при $n = 3$)

Белки составляют основу мембраносвязанных ферментативных комплексов ЭТЦ митохондрий, а липиды участвуют в их стабилизации в мембране. Очевидно, что окислительное повреждение данных макромолекул не может не сказаться на функционировании комплексов. Действительно, инкубация митохондрий в присутствии ГПТБ (150 мкМ) приводит к снижению активности НАДН:убихинон-оксидоредуктазы (комплекс I), сукцинат:убихинон-оксидоредуктазы (комплекс II), убихинол:феррицитохром *c*-оксидоредуктазы (комплекс III) и цитохромоксидазы (комплекс IV) на 57,4, 33, 44,4 и 42 % соответственно (рис. 3). ГПТБ способен модифицировать железосерные кластеры различных ферментов [12], что объясняет чувствительность комплексов I, II и III к данному гидропероксиду. Наиболее устойчивым к повреждению оказался комплекс II, наименее – комплекс I, что согласуется с данными литературы [12]. Действие ГПТБ на цитохромоксидазу обусловлено взаимодействием пероксида с цитохромом *c*, в результате чего образуются свободные радикалы, способные повреждать цитохромоксидазу [13].

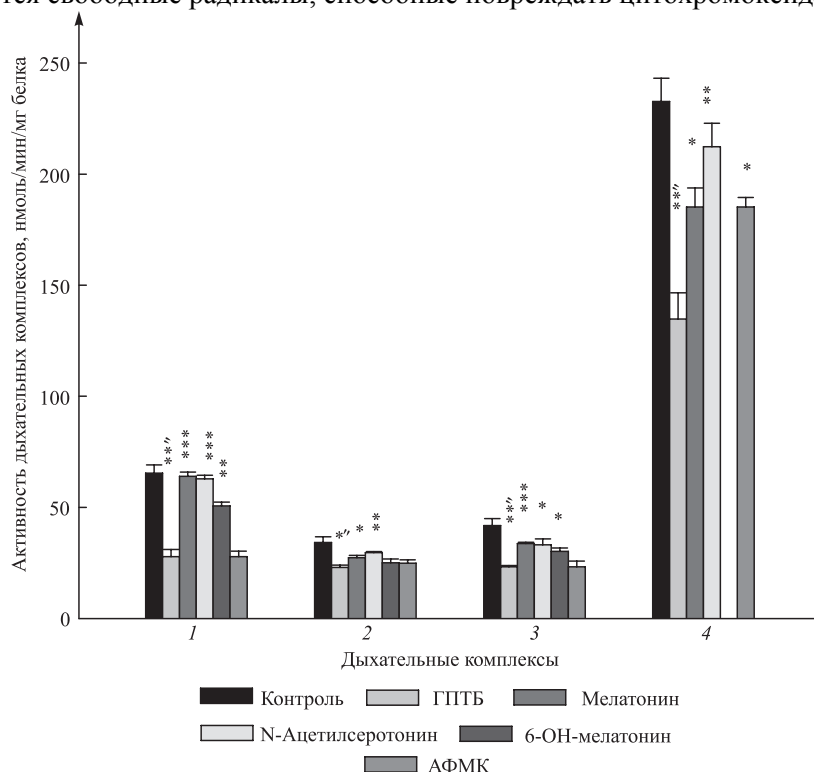


Рис. 3. Влияние мелатонина, N-ацетилсеротонина (NAS), 6-ОН-мелатонина и АФМК на активность дыхательных комплексов митохондрий печени крыс в присутствии ГПТБ (150 мкМ): 1 – НАДН: убихинон-оксидоредуктаза, 2 – сукцинат: убихинон-оксидоредуктаза, 3 – убихинол: феррицитохром *c*-оксидоредуктаза, 4 – цитохромоксидаза (достоверность рассчитывалась по отношению к контролю (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$) и к активности дыхательных комплексов в присутствии ГПТБ (150 мкМ) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ при $n = 3$))

На следующем этапе была изучена способность мелатонина и его метаболитов предотвращать повреждение белков и липидов ГПТБ.

Мелатонин, N-ацетилсеротонин и АФМК в концентрации 10 мкМ снизили содержание карбонильных соединений на 33,7, 35,9 и 16,6 %, а в концентрации 100 мкМ – на 44,3, 43,3 и 23,2 % соответственно. Следует отметить, что в случае 6-гидроксимелатонина концентрационная зависимость имела сложный характер. Наибольший эффект 6-ОН-мелатонин оказал при концентрации 1 мкМ, снизив содержание карбонильных соединений на 36,6 %. При более высоких концентрациях антиоксидантное действие данного соединения было менее выраженным, по-видимому, за счет реализации прооксидантных свойств 6-гидроксимелатонина (см. рис. 1).

Анализ влияния мелатонина и его метаболитов на перекисное окисление липидов показал, что наиболее эффективным протектором является N-ацетилсеротонин, который в концентрации 10 нМ снижал содержание продуктов перекисного окисления липидов на 22,8 %. 6-ОН-Мелатонин оказал наибольший эффект в концентрации 10 мкМ, при дальнейшем повышении концентрации антиоксидантный эффект данного соединения снижался за счет реализации прооксидантных свойств. Мелатонин и АФМК оказывали дозозависимый эффект на содержание продуктов ПОЛ. В концентрации 10 мкМ АФМК и мелатонин снижали содержание продуктов ПОЛ на 13,2 и 19,2 %, 50 мкМ – на 25,1 и 35,1 % соответственно (см. рис. 2).

Как уже отмечалось, снижение активности дыхательных комплексов, индуцированное ГПТБ, может быть обусловлено окислительным повреждением белков, составляющих основу ферментативных комплексов, и липидов, стабилизирующих дыхательные комплексы в мембране. Мы предположили, что мелатонин и его производные благодаря своим антиоксидантным свойствам способны предотвращать снижение активности дыхательных комплексов в условиях экспериментального окислительного стресса, индуцированного ГПТБ. Действительно, оказалось, что в присутствии ГПТБ мелатонин (150 мкМ) восстанавливал активность комплексов I, II, III и IV митохондрий печени на 55,2, 13, 25 и 21,7 %, N-ацетилсеротонин (150 мкМ) – на 53,6, 19,7, 23,6 и 33,3 % соответственно. В свою очередь, 6-ОН-мелатонин восстанавливал активность комплекса I и III в митохондриях печени на 35 и 16,7 % соответственно и не оказывал защитного действия в случае комплекса II (см. рис. 3). Влияние 6-ОН-мелатонина на цитохромоксидазу не изучалось, так как данное соединение эффективно восстанавливает цитохром c, что не позволяет корректно измерять цитохромоксидазную активность.

АФМК (150 мкМ) препятствовал снижению активности цитохромоксидазы (комплекс IV) в присутствии ГПТБ (150 мкМ) на 21,7 % и не предотвращал падение активности дыхательных комплексов I–III.

Таким образом, мелатонин и его производные препятствуют снижению активности дыхательных комплексов в присутствии ГПТБ, что, скорее всего, обусловлено способностью данных соединений предотвращать окислительное повреждение белков и липидов. Полученные данные расширяют существующие представления о биологической активности метаболитов мелатонина в митохондриях.

1. Szewczyk A., Wojtczak L. // Pharmacological Reviews. 2002. Vol. 54. № 1. P. 101.
2. Terrens J. F. // The Physiol. 2003. Vol. 552. № 2. P. 335.
3. Tan D. X., Terron M. P., Manchester L. C. // J. Pineal res. 2007. P. 28.
4. Martin M., Macias M. // The FASEB J. 2000. Vol. 14. № 12. P. 1677.
5. Semak I., Korik E., Antonova M., Wortsman J. // J. Pineal res. 2008. Vol. 45. № 4. P. 515.
6. Petrosillo G., Ruggiero F. M., Pistolese M., Paradies G. // The J. of Biological Chemistry. 2004. Vol. 79. № 51. P. 53103.
7. Peterson G. L. // Anal. Biochem. 1977. Vol. 83. № 2. P. 346.
8. Jian Li Campian, Mingwei Qian, Xueshan Gao // The J. of Biological Chemistry. 2004. Vol. 279. № 45. P. 46580.
9. Орехович В. Н. Современные методы биохимии. М., 1977. С. 66.
10. Kwong L. K., Sohal R. S. // Archives of biochemistry and biophysics. 2000. Vol. 373. № 1. P. 16.
11. Briet F. // Am. J. Clin. Nutr. 2001. Vol. 73. P. 975.
12. Drahota Z., Krivakova P. // Psysiological research. 2005. Vol. 54. P. 67.
13. Barr D. P., Mason R. P. // The J. of Biological Chemistry. 1995. Vol. 270. № 21. P. 12709.

Поступила в редакцию 09.02.12.

Екатерина Игоревна Кузнецова – аспирант кафедры биохимии. Научный руководитель – И.В. Семак.
Игорь Викторович Семак – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии.