

УДК 577.23

**ПРОАПОПТОТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ МЕЛАТОНИНА
НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ (mPTP)
В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫС**

© 2019 г. Ю. Л. Бабурина¹, *, И. В. Одинокова¹, О. В. Крестинина¹

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

Поступила в редакцию 07.06.2018 г.

После доработки 20.07.2018 г.

Принята к публикации 08.08.2018 г.

Мелатонин (МЕЛ) является гормоном, вырабатываемом шишковидной железой. Легко проникая через клеточную мембрану, он способен накапливаться в митохондриях в высоких концентрациях и улучшать их функциональное состояние. Однако существуют также данные, показывающие, что действие МЕЛ на митохондрии может сильно варьировать, т.е. имеет высокую специфичность в зависимости от видов тканей, условий введения, состава и структурных особенности молекул-мишеней. В настоящей работе мы исследовали влияние МЕЛ на функциональное состояние митохондрий мозга крыс при его непосредственном добавлении к митохондриям в условиях открытия неспецифической поры митохондрий (mPTP), а также на изменение уровней регуляторов mPTP (VDAC и CNPaзы) и основных субъединиц комплексов электронной транспортной цепи (ЭТЦ). Было обнаружено, что непосредственное добавление МЕЛ в концентрации 10 нМ и 100 нМ к митохондриям приводит к изменению уровня субъединиц I и IV комплексов ЭТЦ, инициации открытия mPTP, а также к уменьшению уровней белков регуляторов функционирования mPTP. Полученные данные позволяют показать возможный потенциал МЕЛ как проапоптотического агента, что может иметь важное биологическое и фармакологическое значение.

Ключевые слова: митохондрии мозга крысы, мелатонин, митохондриальная неспецифическая пора, потенциал-зависимый анионный канал (VDAC), 2',3'-циклонуклеотид-3'-фосфодиэстераза (CNPaза)

DOI: 10.1134/S102781331902002X

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин или, согласно аббревиатуре IUPAC, N-[2-(5-метокси-1H-индол-3-ил)этил]ацетамид, МЕЛ) – это нейроэндокринный гормон, вырабатываемый шишковидной железой (эпифизом). МЕЛ широко распространен в природе, его присутствие показано в клетках и тканях позвоночных, беспозвоночных, растений, одноклеточных эукариот, водорослей и даже бактерий [1–5]. Благодаря своей амфифильной природе, молекулы МЕЛ способны легко проникать через мембраны, что позволяет ему свободно распространяться по всему организму и достигать всех субклеточных структур [6]. Обладая всеми свойствами, характерными для гормонов, МЕЛ также имеет особенности, отличающие его от классических гормонов. Синтезируемый шишковидной железой, он переносится в свободной или альбумин-связанной форме [7–9] и может действовать через специфические G-бе-

лок-связанные мембранные рецепторы (MT1 или MTRN1a, MT2 или MTRN1b и MT3) [10, 11], а также, предположительно, через ядерные ретиноидные рецепторы RZR/ROR [12, 13]. Следует отметить, что механизмы действия МЕЛ по удалению свободных радикалов считают рецептор-независимыми [14].

Свободное распространение и функциональное разнообразие МЕЛ обуславливает широкий диапазон его функций. На данный момент, помимо функции регуляции циркадных ритмов, показано его противовоспалительное, антиоксидантное, онкостатическое действие [15]. Существует также множество данных о влиянии МЕЛ на функции митохондрий. Как известно, митохондрии играют ключевую роль в большом количестве физиологических процессов в клетке. Нарушение функций митохондрий рассматривается как основной фактор процессов старения, ишемии/реперфузии, септического шока и нейродегенеративных заболеваний [16, 17]. МЕЛ способен, проникая через клеточные мембраны, накапли-

* Адресат для корреспонденции: 142290 Россия, Московская обл., г. Пушино, ул. Институтская, д. 3; тел.: (4967) 73-91-46; e-mail: byul@rambler.ru.

ваться в митохондриях в высоких концентрациях, в сотни раз превышающих его концентрацию в цитозоле [18, 19]. Многочисленные исследования показывают, что МЕЛ способен улучшать функциональное состояние митохондрий. Хроническое введение МЕЛ в фармакологической дозе предотвращает нарушение функций митохондрий в моделях экспериментального диабета и интоксикации, демонстрируя митохондриально-специфическую активность МЕЛ [20–22]. Являясь хорошо известным антиоксидантом, МЕЛ способен эффективно связывать свободные радикалы всех типов [23], однако, кроме непосредственного снижения токсического действия активных форм кислорода (АФК), действие МЕЛ направлено на восстановление активности ферментов-антиоксидантов и предотвращение увеличения проницаемости внутренней мембраны митохондрий. Эксперименты *in vitro* показали, что МЕЛ увеличивает активность митохондриальной ЭТЦ, защищает митохондрии от окислительного стресса, вызванного т-бутилгидропероксидом [24]. Было показано, что действие МЕЛ в митохондриях может быть направлено на регуляцию Ca^{2+} -индуцированной, циклоспорин А-чувствительной поры (Mitochondrial Permeability Transition Pore, мПТР), которая формируется вследствие накопления сверхпороговых концентраций Ca^{2+} или в ответ на окислительный стресс и которая считается начальной стадией апоптоза [25]. В этих условиях в митохондриях наблюдается разобщение дыхания и фосфорилирования, ингибирование АТР-синтетазной активности, активация АТР-азной активности, и как следствие, увеличение гидролиза АТР [25]. Обнаружено, что введение МЕЛ способно не только предотвращать индукцию мПТР, но также и поддерживать митохондриальный потенциал ($\Delta\Psi_m$) и сохранять $\Delta\Psi_m$ -зависимое образование АТФ [26]. Недавно мы показали защитное действие МЕЛ при его хроническом введении на индукцию мПТР при старении [27, 28].

Однако следует отметить, что действие МЕЛ на митохондрии может варьироваться в зависимости от экспериментальных условий, а также имеет высокую специфичность в отношении разных органов и тканей [29]. Так, наряду с антиапоптотическим действием МЕЛ, было показано, что МЕЛ индуцирует митохондриально-опосредованный апоптоз в клетках HL-60 [30]. Кроме того, он может проявлять себя в качестве восстановительного или окислительного агента, в зависимости от структурных особенностей молекул-мишеней и их среды, времени инкубации и используемых концентраций [31]. В данной работе было исследовано влияние непосредственного добавления различных концентраций МЕЛ (10 и 100 нМ) к суспензии митохондрий мозга крыс на функциональное состояние митохондрий, изменения уровней субъединиц комплексов

ЭТЦ, а также на изменение содержания митохондриальных белков таких как VDAC и CNPaза, принимающих участие в функционировании мПТР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий мозга. Митохондрии мозга крысы выделяли по методу Симса [32], модифицированному в нашей лаборатории. Изолированный мозг измельчали, очищали от кровеносных сосудов и разрушали в десятикратном объеме среды, содержащей 320 мМ сахарозу, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 0.5 мМ K^+ -EDTA, 0.5 мМ EGTA, 0.2% бычий сывороточный альбумин (БСА) (все реактивы фирмы Sigma, США), с помощью стеклянного гомогенизатора. Гомогенат центрифугировали при 2000 g в течение 3 мин, осадок удаляли, а супернатант центрифугировали повторно для более полного удаления ядер и поврежденных клеток. Осадок митохондрий, полученный центрифугированием при 12500 g в течение 10 мин, промывали при 11500 g в течение 10 мин средой выделения, не содержащей EGTA, EDTA и БСА, и суспендировали в той же среде. Все процедуры выполняли при температуре 4°C. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд. Концентрация белка в изолированных митохондриях мозга составляла 25–30 мг/мл.

Определение митохондриальных функций. Митохондриальные параметры измеряли в термостабируемой ячейке с вмонтированными микроэлектродами, селективными к ионам Ca^{2+} (“Нико Аналит”, Россия). С помощью Ca^{2+} -селективного электрода оценивали транспорт Ca^{2+} митохондриями. Селективные электроды измеряют концентрацию соответствующих ионов во внешней среде, т.е. уменьшение концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубации митохондрий означает их вход в митохондрии, а увеличение – выход. Митохондрии инкубировали в среде, содержащей 125 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (рН 7.4), 0.4 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ сукцинат калия. В качестве субстрата дыхания использовали глутамат (5 мМ) и малат (5 мМ). Дыхательный контроль (respiratory control index, RCI) измеряли в закрытой ячейке после добавления 200 мкМ АДФ. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 1 мг/мл. Открытие мПТР в митохондриях индуцировали последовательным увеличением концентрации внешнего Ca^{2+} на 50 мкМ до достижения пороговой концентрации, при которой происходил выход Ca^{2+} из митохондрий. МЕЛ добавляли в выбранной концентрации однократно после инкубации с митохондриями. Для численной оценки параметров митохондрий использовали значения пороговой концентрации Ca^{2+} , необходимого для инициации мПТР.

Набухание митохондрий мозга крысы определяли по изменению рассеивания в митохондриальной суспензии при длине волны 540 нм (спектрофотометр Tecan I Control Infinite 200). Стандартная среда инкубации содержала 125 мМ KCl, 10 мМ Tris, 2 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 5 мМ сукцинат калия, 2,5 мкМ ротенон. Концентрация белка в кювете составляла 0,35 мг/мл, измерения проводили при 25°C.

Электрофорез и Вестерн блот анализ. Для получения образцов при определении изменений уровней митохондриальных комплексов, аликвоты (2 мг/мл) нативных митохондрий мозга крысы помещали в пробирку и растворяли в буфере Лэммли. Образцы нагревали до 37°C в течение 3 мин. Для определения уровней митохондриальных белков (VDAC и CNPазы) из ячейки отбирали аликвоту объемом 50 мкл, и добавляли буфер Лэммли для солиubilизации митохондриальных белков. Образцы нагревали до 95°C в течение 5 мин. На каждую дорожку геля наносили по 20 мкг митохондриального лизата. В качестве маркеров использовали наборы фирмы Bio-Rad (США), содержащие маркерные белки от 10 до 250 кДа. Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США, 0,2 мкм) осуществляли на аппарате для полусухого переноса (Bio-Rad), используя буфер для переноса (Bio-Rad) методом Вестерн блот.

Изменения в уровнях субъединиц ЭТС были обнаружены с помощью коктейля антител Total Oxphos Rodent WB Antibody Cocktail (ab 110413, моноклональные антитела). Коктейль состоит из альфа-субъединицы комплекса V (CV-ATP5A-55 кДа), core protein 2 комплекса III (CIII-UQCRC2-48 кДа), субъединицы I комплекса IV (CIV-MTCO1-40 кДа), субъединицы 30 комплекса II (CII-SDHB-30 кДа), субъединицы NDUFB8-20 кДа комплекса I (C1-NDUFB8). Моноклональные антитела к COX IV (Calbiochem) и к Tom20 при разбавлении 1 : 1000 (Cell Signaling, USA) использовали для нормирования белковой нагрузки.

Моноклональные анти-CNP-антитела (анти-CNP Ab) получали, как описано [33], и использовали при разведении 1 : 10000, антитела к VDAC (Calbiochem) – 1 : 1000. Иммунореактивность детектировали с использованием соответствующих вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA). Пероксидазная активность определялась с помощью ECL (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) с использованием ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad). Количественный анализ проводили с помощью денситометрии (программа Image Lab, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Статистический анализ. Для статистического анализа брали среднее значение параметров из 5–6 экспериментов \pm SD. Статистическую досто-

верность считали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способность MEL действовать как скавенджер (поглотитель) свободных радикалов обусловлена его электронно-донорными свойствами [34]. Так как ЭТЦ связана с окислительным фосфорилированием, увеличение синтеза АТФ является одним из последствий действия MEL в митохондриях. Поскольку, в литературе имеются сведения о способности MEL увеличивать активность комплексов ЭТЦ, снижая формирование АФК в комплексах I и IV [35], мы провели исследование влияния MEL при непосредственном его добавлении к митохондриям на изменение уровней главных субъединиц комплексов ЭТЦ как в контрольных условиях, так и в условиях открытия мРТР. Для этого к митохондриям однократно добавляли MEL в выбранных концентрациях, инкубировали в среде (состав среды и условия инкубации описаны в разделе “Материалы и методы”), после чего готовили образцы для последующего анализа. Согласно литературным данным, добавление MEL в концентрации 10 нМ к митохондриям мозга крыс способно увеличивать активность комплексов ЭТЦ, а в концентрации 100 нМ – значительно усиливать синтез АТФ [36], поэтому для исследования мы выбрали эти концентрации. На рис. 1, панель *a* представлен иммуноблот, отражающий результаты исследования, на панелях *b–e* – количественный анализ изменений уровня комплексов митохондриальной ЭТЦ. Как видно из рисунка, добавление выбранных концентраций MEL вызывает увеличение уровня IV и I комплексов, что согласуется с литературными данными. Мы не заметили каких-либо значимых изменений в других комплексах в наших экспериментальных условиях. Следует отметить, что недавно мы показали что в митохондриях сердца крыс при острой сердечной недостаточности, MEL был способен влиять на комплексы ЭТЦ [37]. Таким образом, в митохондриях в условиях мРТР возможно специфическое взаимодействие MEL с комплексами I и IV, что позволяет защищать их от повреждающего действия АФК и окислительного стресса [36].

Далее мы измерили дыхательный контроль (respiratory control index, RCI) митохондрий мозга в наших экспериментальных условиях. RCI показывает эффективность митохондрий способствовать окислительному фосфорилированию и, таким образом, указывает на сопряжение между потреблением кислорода и продукцией АТФ. На рисунке показаны значения RCI для митохондрий в контрольных условиях и при непосредственном добавлении в среду инкубации различных концентраций MEL. Представленные данные говорят об

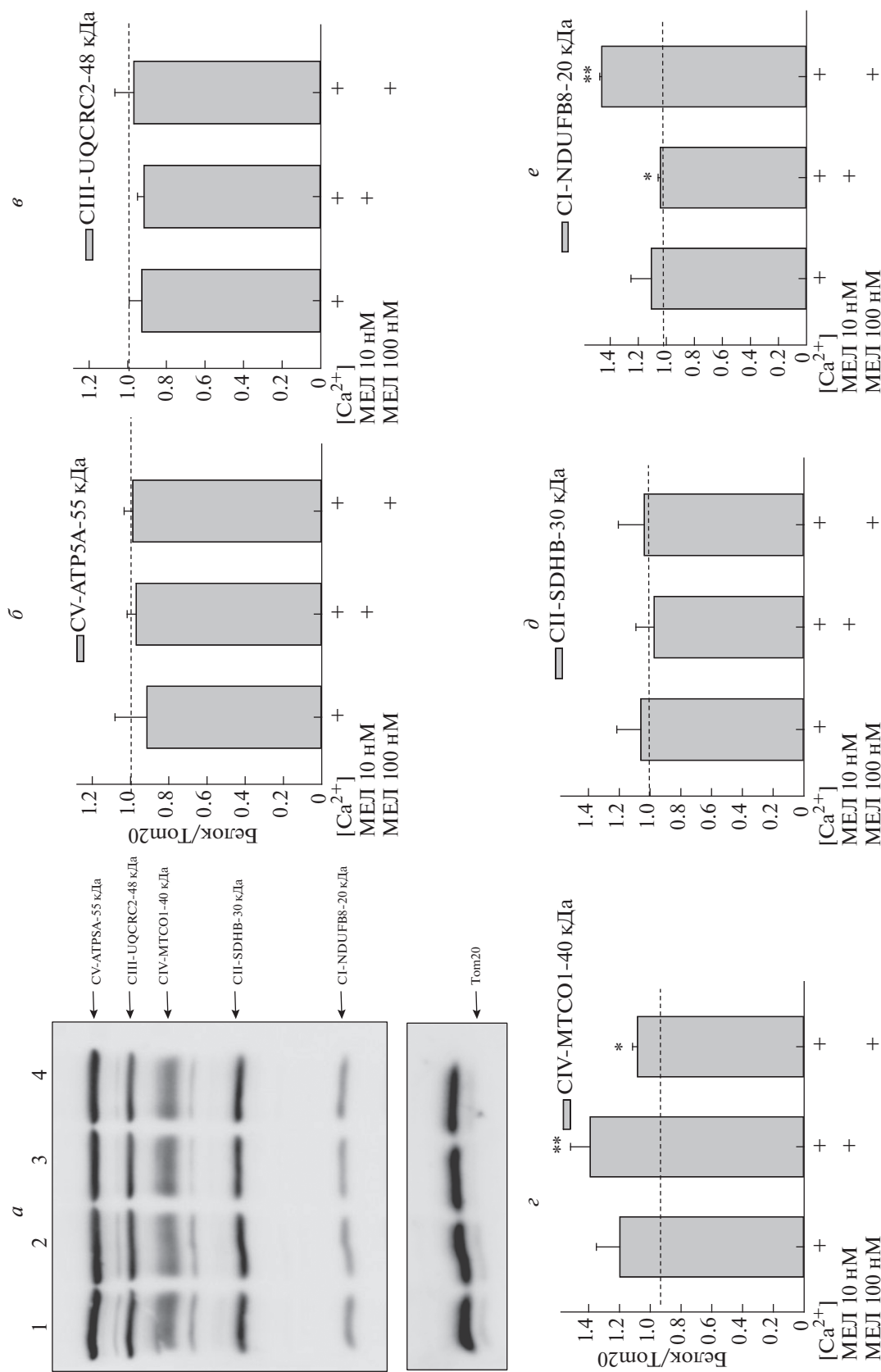


Рис. 1. Изменения в митохондриальных комплексах ЭТЦ в присутствии/отсутствии МЕЛ при нагрузке митохондрий мозга пороговыми [Ca²⁺]. Образцы белка экстрагировали и подвергли Вестерн блот анализу. Изменения в митохондриальных комплексах исследовали с использованием коктеля антител Total OXPHOS Reagent WB Antibody Cocktail. **а** – Мембрана иммуноблота, окрашенная соответствующими антителами. Дорожка 1 – контроль, 2 – в присутствии пороговой [Ca²⁺], 3, 4 – в присутствии пороговой [Ca²⁺], а также 10 и 100 нМ МЕЛ соответственно, **б** – диаграмма, отражающая количественные изменения в альфа-субъединице комплекса V (CV-ATP5A-55 кДа), **в** – *с* – *с* – субъединицы I комплекса III, **г** – субъединицы I комплекса IV (CIV-MTSCO1-40 кДа), **д** – субъединицы 30 комплекса II (CII-SDHB-30 кДа), **е** – субъединицы I комплекса I (CI-NDUFB8). В качестве контроля белковой нагрузки использовали антитела к Том20. Количественные изменения отражены в единицах относительно контроля. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01.

интактности изолированных митохондрий и сопряженности системы синтеза/гидролиза АТФ. Как видно из рис. 2, никаких существенных изменений в RCI при добавлении МЕЛ к митохондриям мозга крысы не наблюдалось, что указывает на отсутствие изменений в митохондриальной мембране в данных условиях. Можно предположить, что МЕЛ при непосредственной инкубации с митохондриями не способен оказывать воздействие на систему сопряжения окислительного фосфорилирования и производства АТФ в митохондриях.

Ранее в наших исследованиях мы показали, что хроническое потребление животными МЕЛ способствует увеличению пороговой $[Ca^{2+}]$ для открытия мРТР, снижает скорость набухания митохондрий, а также препятствует освобождению проапоптотических факторов, таких как цитохром *c* и митохондриальной СNРазы [28]. В рамках данного исследования мы проверили влияние МЕЛ на параметры функционирования мРТР при непосредственном его добавлении к митохондриям. Одним из главных параметров, характеризующих пору, является способность митохондрий удерживать Ca^{2+} в матриксе, количественной характеристикой данного параметра является пороговая концентрация Ca^{2+} т.е. та концентрация, при которой происходит активация мРТР. На рис. 3а можно увидеть кривые изменения потоков Ca^{2+} в митохондриях мозга крыс в контрольных условиях и при добавлении МЕЛ (10 нМ и 100 нМ). На панели б представлены значения пороговых концентраций Ca^{2+} в данных условиях. Как видно из рисунка, пороговая концентрация Ca^{2+} достоверно снижается в присутствии 10 нМ МЕЛ на 14%, а в присутствии 100 нМ МЕЛ – на 21%. Это указывает на то, что МЕЛ облегчает открытие мРТР в митохондриях мозга крыс. Чтобы подтвердить данный эффект, мы исследовали другой параметр, характеризующий открытие мРТР – кальций-индуцированное набухание митохондрий. Добавление Ca^{2+} в пороговой концентрации к суспензии митохондрий, инкубированных в стандартной среде, вызывает уменьшение светорассеяния, что свидетельствует о набухании, и митохондриальные мембраны становятся проницаемыми для веществ с низкой молекулярной массой. Мы сравнили набухание митохондрий мозга крыс в контрольных условиях, и в присутствии МЕЛ. Количественно процесс набухания характеризовался временем достижения полумаксимального сигнала светорассеяния ($T_{1/2}$). На рис. 4 показано, что МЕЛ увеличивает скорость набухания митохондрий, причем 100 нМ МЕЛ оказывает более сильное воздействие, чем 10 нМ. Так, в контроле $T_{1/2}$ составляет в среднем 500 секунд, что на 40% больше, чем при добавлении 10 нМ МЕЛ, и более чем в 2 раза больше, чем при добавлении 100 нМ

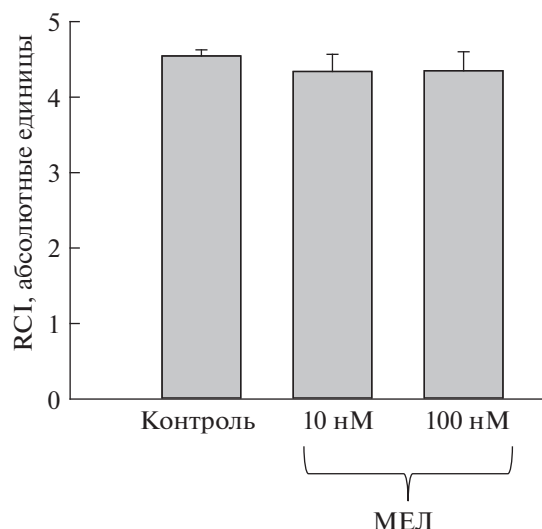


Рис. 2. Влияние МЕЛ на дыхательный контроль (RCI) митохондрий мозга крыс. Митохондрии мозга крысы инкубировались в стандартной среде, как описано в разделе “Материалы и методы”. К суспензии митохондрий добавляли 100 мкМ АДФ, измерение проводили в закрытой ячейке.

МЕЛ. Эти данные подтверждают описанные выше результаты исследования пороговой концентрации Ca^{2+} , и позволяют сделать вывод, что непосредственное добавление МЕЛ к митохондриям приводит к инициации открытия мРТР. В то же время, как отмечалось ранее, в исследованиях нашей и других, хроническое введение МЕЛ приводит к противоположному эффекту, предотвращая открытие мРТР в митохондриях [26–28]. В связи с этим необходимо отметить, что ранее уже появлялись работы о противоречивости действий МЕЛ в зависимости от разных экспериментальных условий, состояния органелл, а также от специфичности органов и тканей [38, 39]. Так, Мартинис и соавторы показали, что в изолированных митохондриях печени крысы добавление МЕЛ в присутствии пороговых концентраций Ca^{2+} вызывало индукцию мРТР, увеличение окислительного стресса и освобождение проапоптотических факторов. Авторы связывают это явление с окислительным стрессом, вызванным пороговыми концентрациями Ca^{2+} и МЕЛ, что приводит к образованию перекиси водорода, и, как следствие к окислению тиоловых групп, глутатиона и пиридиновых нуклеотидов [29]. Следует отметить, что при накоплении в матриксе митохондрий критических концентраций АФК, когда антиоксидантные системы перестают справляться с защитой, возможен кратковременный переход мРТР в состояние низкой проводимости (superoxide flashes), при этом происходит выход АФК из митохондрий [40, 41].

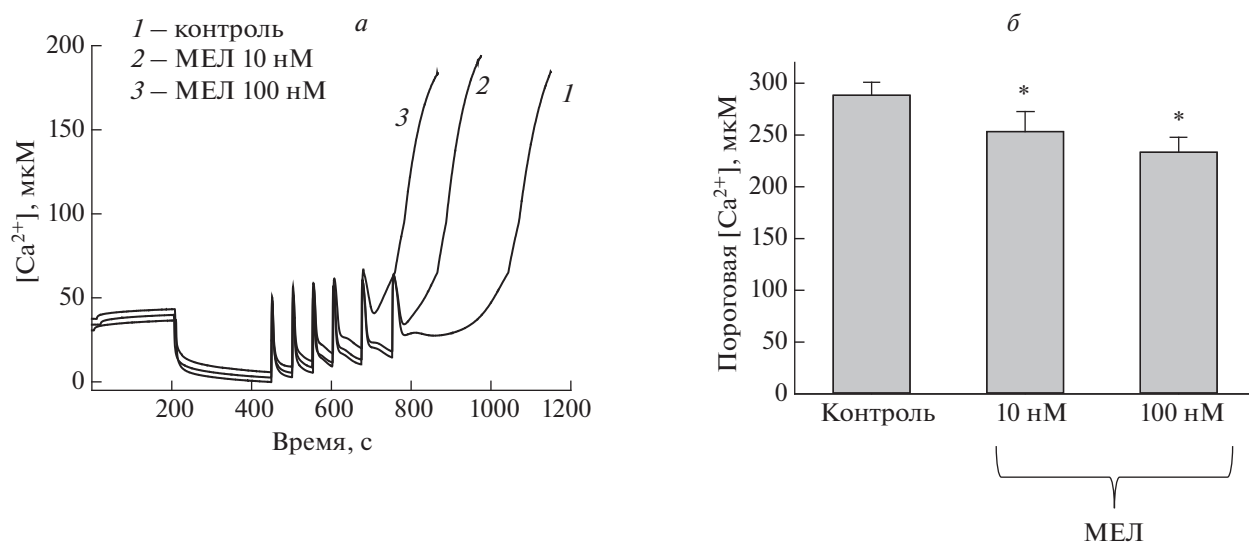


Рис. 3. Сравнительный анализ пороговой $[Ca^{2+}]$ в присутствии/отсутствии МЕЛ в митохондриях мозга крыс. Стандартная среда инкубации описана в разделе “Материалы и методы”. Перед добавлением пороговой $[Ca^{2+}]$ митохондрии инкубировались с МЕЛ в течение 5 минут. *a* – Транспорт Ca^{2+} в митохондриях, *б* – количественный анализ пороговой $[Ca^{2+}]$. * $p < 0.05$ сравнение относительно соответствующего контроля.

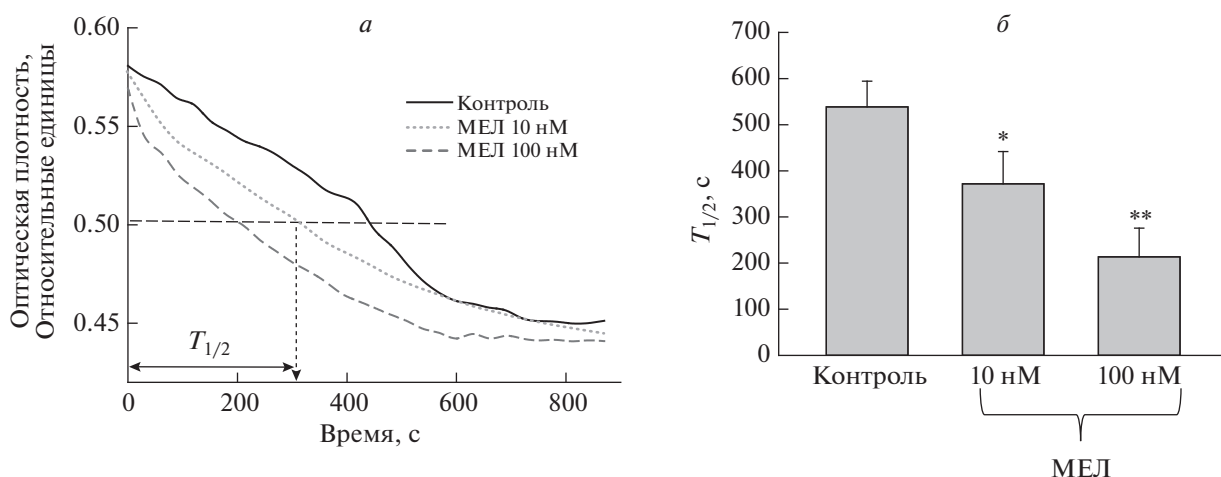


Рис. 4. Влияние МЕЛ на набухание митохондрий мозга крыс. Набухание митохондрий крыс инициировали добавлением $300 \text{ nM } Ca^{2+}$ на 1 mg белка и измеряли как изменение адсорбции митохондриальной суспензии при 540 nm при комнатной температуре. Панель *a* – кривые набухания митохондрий мозга в отсутствие/присутствии мелатонина, *б* – полупериод набухания ($T_{1/2}$) митохондрий. Концентрация белка в кювете составляла 0.35 mg/ml . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ сравнение относительно соответствующего контроля.

Выход же проапоптотических белков из митохондрий при функционировании мРТР рассматривают как ключевое событие митохондриального пути апоптоза. Недавно мы показали, что при открытии мРТР наряду с выходом проапоптотических белков происходит и выход CNРазы [42], белка, функции которого в митохондриях до недавнего времени оставались малоизученными. Кроме того, мы показали, что CNРаза является регулятором мРТР, а ее субстраты, 2',3'-цАМФ и 2',3'-цНАДФ, способны индуцировать открытие

мРТР [43]. В рамках настоящей работы мы проверили, как изменяется уровень CNРазы в условиях открытия мРТР в присутствии различных концентраций МЕЛ. Результаты, представленные на рис. 5*a*, показывают, что в присутствии только пороговых концентраций Ca^{2+} , уровень CNРазы не меняется по сравнению с контрольными условиями, что согласуется с нашими данными, полученными ранее [43]. Однако, в присутствии МЕЛ, уровень CNРазы значительно снижается (~30%), причем этот эффект не зависит от концентрации

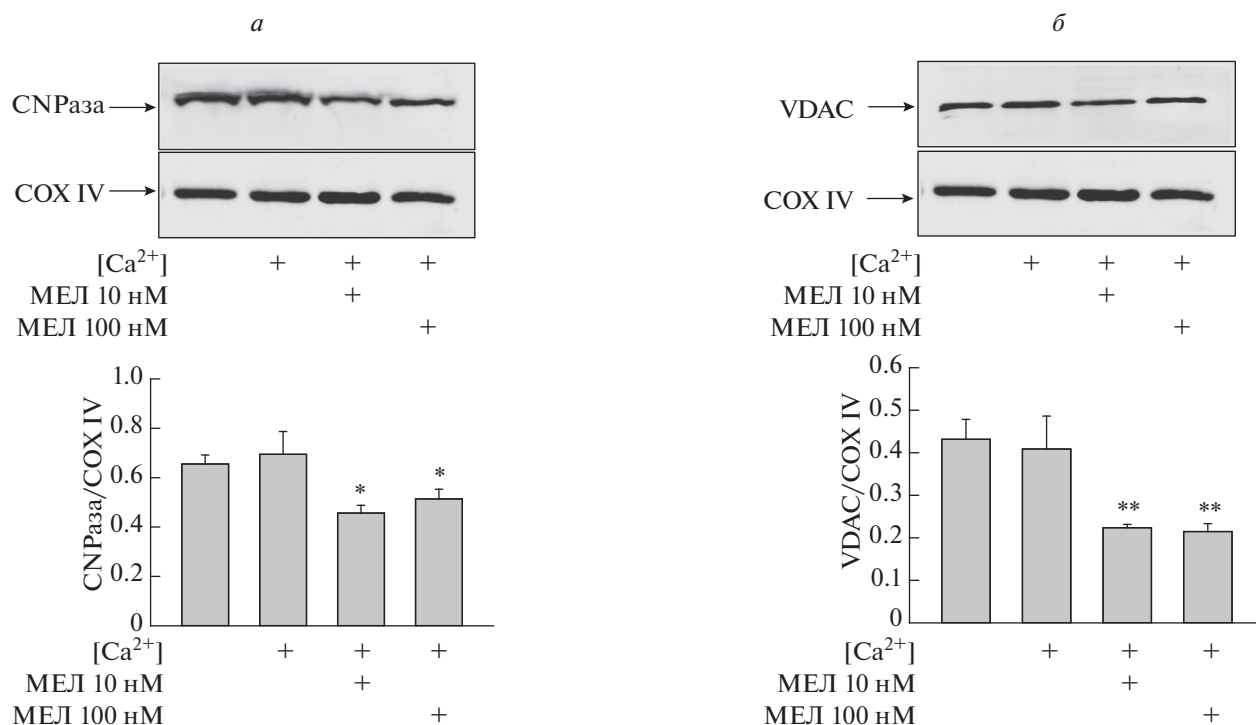


Рис. 5. Изменение содержания CNPазы (а) и VDAC (б) в митохондриях мозга крыс в отсутствие/присутствии пороговой [Ca²⁺] и мелатонина. В качестве контроля белковой нагрузки использовали антитела к COX IV. Верхняя часть рисунка – иммуноблоты, окрашенные соответствующими антителами, нижняя часть – диаграммы, количественно отражающие изменения в содержании CNPазы в абсолютных единицах, нормированных на COX IV. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ сравнение относительно соответствующего контроля.

добавленного МЕЛ, достоверных различий между изменением уровня CNPазы при 10 и 100 нМ МЕЛ мы не наблюдали. Ранее мы показали, что уменьшение экспрессии CNPазы в митохондриях приводило к инициации открытия мРТР [43, 44], а также, что хроническое потребление МЕЛ способствовало удержанию CNPазы внутри митохондрий, возможно, для защиты клеток от повреждений [28]. Следовательно, можно предположить, что CNPаза может являться одной из мишеней для МЕЛ в митохондриях, а механизм воздействия МЕЛ на CNPазу, по-видимому, различается в случае хронического накопления и при непосредственном добавлении МЕЛ к митохондриям. Ранее мы показали, что в митохондриях мозга крысы VDAC колокализован с CNPазой [45], кроме того, известно, что VDAC принимает участие в регуляции мРТР [46, 47], поэтому мы проверили изменение уровня VDAC в аналогичных условиях. Как показано на рис. 5б, влияние МЕЛ на изменение содержания VDAC оказалось схожим с действием МЕЛ на уровень CNPазы. Уровень VDAC не менялся при открытии мРТР, однако, снижался в два раза при добавлении как 10, так и 100 нМ МЕЛ. Этот эффект можно объяснить, по-видимому, существованием комплекса белков в митохондриальных мембранах, включаю-

щий в себя CNPазу и VDAC, который способен принимать участие в регуляции мРТР, и может являться мишенью непосредственного действия МЕЛ в митохондриях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что непосредственное добавление МЕЛ в концентрации 10 и 100 нМ к изолированным митохондриям мозга приводит к изменению уровня субъединиц комплексов I и IV ЭТЦ, инициации открытия мРТР, а также к уменьшению уровня белков регуляторов функционирования мРТР. Следует отметить, что данные результаты, полученные на изолированных митохондриях, предполагают продолжение исследований на более сложных биологических системах, однако, вместе с литературными данными, позволяют показать возможный потенциал МЕЛ как проапоптотического агента, что может иметь важное биологическое и фармакологическое значение.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана мегагрантом Правительства Российской Федерации № 14.Z50.31.0028 а также

грантами РФФИ 17-44-500229 и 17-04-00747. В настоящей работе были использованы приборы ЦКП ИТЭБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Roopin M., Levy O.* // J. Pineal Res. 2012. V. 53. P. 259–269.
2. *Migliori M.L., Romanowski A., Simonetta S.H., Valdez D., Guido M., Golombek D.A.* // J. Pineal Res. 2012. V. 53. P. 38–46.
3. *Byeon Y., Park S., Kim Y.S., Park D.H., Lee S., Back K.* // J. Pineal Res. 2012. V. 53. P. 107–111.
4. *Gomez F.J., Raba J., Cerutti S., Silva M.F.* // J. Pineal Res. 2012. V. 52. P. 349–355.
5. *Stehle J.H., Saade A., Rawashdeh O., Ackermann K., Jilg A., Sebesteny T., Maronde E.* // J. Pineal Res. 2011. V. 51. P. 17–43.
6. *Slominski A., Tobin D.J., Zmijewski M.A., Wortsman J., Paus R.* // Trends Endocrinol. Metab. 2008. V. 19. P. 17–24.
7. *Morin D., Simon N., Depres-Brummer P., Levi F., Tilletment J.P., Urien S.* // Pharmacology. 1997. V. 54. P. 271–275.
8. *Pardridge W.M., Mietus L.J.* // J. Neurochem. 1980. V. 34. P. 1761–1763.
9. *Cardinali D.P., Lynch H.J., Wurtman R.J.* // Endocrinology. 1972. V. 91. P. 1213–1218.
10. *Dubocovich M.L., Delagrange P., Krause D.N., Sugden D., Cardinali D.P., Olcese J.* // Pharmacol. Rev. 2010. V. 62. P. 343–380.
11. *Dubocovich M.L., Markowska M.* // Endocrine. 2005. V. 27. P. 101–110.
12. *Smirnov A.N.* // Biochemistry (Mosc.). 2001. V. 66. P. 19–26.
13. *Becker-Andre M., Wiesenberg I., Schaeren-Wiemers N., Andre E., Missbach M., Saurat J.H., Carlberg C.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 28531–28534.
14. *Kilic U., Yilmaz B., Ugur M., Yuksel A., Reiter R.J., Hermann D.M., Kilic E.* // J. Pineal Res. 2012. V. 52. P. 228–235.
15. *Reiter R.J., Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M., Alatorre-Jimenez M., Qin L.* // J. Pineal Res. 2016. V. 61. P. 253–278.
16. *Miquel J., Economos A.C., Fleming J., Johnson J.E., Jr.* // Exp. Gerontol. 1980. V. 15. P. 575–591.
17. *Papa S., Skulachev V.P.* // Mol. Cell. Biochem. 1997. V. 174. P. 305–319.
18. *Acuna-Castroviejo D., Escames G., Leon J., Carazo A., Khaldy H.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 527. P. 549–557.
19. *Lopez A., Garcia J.A., Escames G., Venegas C., Ortiz F., Lopez L.C., Acuna-Castroviejo D.* // J. Pineal Research. 2009. V. 46. P. 188–198.
20. *Cheshchevik V.T., Dremza I.K., Lapshina E.A., Zabrodskaya S.V., Kujawa J., Zavodnik I.B.* // Cell Biochem. Funct. 2011. V. 29. P. 481–488.
21. *Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Cheshchevik V.T., Dremza I.K., Kujawa J., Zabrodskaya S.V., Reiter R.J.* // J. Physiol. Pharmacol. 2011. V. 62. P. 421–427.
22. *Cheshchevik V.T., Lapshina E.A., Dremza I.K., Zabrodskaya S.V., Reiter R.J., Prokopchik N.I., Zavodnik I.B.* // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2012. V. 261. P. 271–279.
23. *Petrosillo G., Casanova G., Matera M., Ruggiero F.M., Paradies G.* // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 6311–6316.
24. *Martin M., Macias M., Escames G., Leon J., Acuna-Castroviejo D.* // FASEB J. 2000. V. 14. P. 1677–1679.
25. *Halestrap A.* // Nature. 2005. V. 434. P. 578–579.
26. *Jou M.J.* // J. Pineal Res. 2011. V. 50. P. 427–435.
27. *Krestinina O.V., Baburina Y.L., Azarashvili T.S.* // Biol. Membrany. 2014. V. 31. P. 95–103.
28. *Baburina Y., Odinkova I., Azarashvili T., Akatov V., Lemasters J.J., Krestinina O.* // Bba-Biomembranes. 2017. V. 1859. P. 94–103.
29. *Martinis P., Zago L., Maritati M., Battaglia V., Grancara S., Rizzoli V., Agostinelli E., Bragadin M., Toninello A.* // Amino Acids. 2012. V. 42. P. 1827–1837.
30. *Bejarano I., Redondo P.C., Espino J., Rosado J.A., Paredes S.D., Barriga C., Reiter R.J., Pariente J.A., Rodriguez A.B.* // J. Pineal Res. 2009. V. 46. P. 392–400.
31. *Osseni R.A., Rat P., Bogdan A., Warnet J.M., Touitou Y.* // Life Sci. 2000. V. 68. P. 387–399.
32. *Sims N.R.* // J. Neurochem. 1990. V. 55. P. 698–707.
33. *Stricker R., Lottspeich F., Reiser G.* // Biol. Chem. Hoppe Seyler. 1994. V. 375. P. 205–209.
34. *Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Plummer B.F., Limson J., Weintraub S.T., Qi W.* // Free Radic. Biol. Med. 2000. V. 29. P. 1177–1185.
35. *Acuna-Castroviejo D., Martin M., Macias M., Escames G., Leon J., Khaldy H., Reiter R.J.* // J. Pineal Res. 2001. V. 30. P. 65–74.
36. *Martin M., Macias M., Leon J., Escames G., Khaldy H., Acuna-Castroviejo D.* // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2002. V. 34. P. 348–357.
37. *Odinkova I., Baburina Yu., Kruglov A., Fadeeva I., Zvyagina A., Sotnikova L., Akatov V. and Krestinina O.* // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 1–16.
38. *Buyukavci M., Ozdemir O., Buck S., Stout M., Ravindranath Y., Savasan S.* // Fundam. Clin. Pharmacol. 2006. V. 20. P. 73–79.
39. *Srinivasan V., Spence D.W., Pandi-Perumal S.R., Trakht I., Cardinali D.P.* // Integr. Cancer Ther. 2008. V. 7. P. 189–203.
40. *Hou T., Zhang X., Xu J., Jian C., Huang Z., Ye T., Hu K., Zheng M., Gao F., Wang X., Cheng H.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 4602–4612.
41. *Ma Q., Fang H., Shang W., Liu L., Xu Z., Ye T., Wang X., Zheng M., Chen Q., Cheng H.* // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 27573–27581.
42. *Baburina Y., Azarashvili T., Grachev D., Krestinina O., Galvita A., Stricker R., Reiser G.* // Neurochemistry International. 2015. V. 90. P. 46–55.
43. *Azarashvili T., Krestinina O., Galvita A., Grachev D., Baburina Y., Stricker R., Evtodienko Y., Reiser G.* // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2009. V. 296. P. C1428–C1439.
44. *Krestinina O., Azarashvili T., Baburina Y., Galvita A., Grachev D., Stricker R., Reiser G.* // Neurochemistry Int. 2015. V. 80. P. 41–50.

45. Baburina Y., Azarashvili T., Grachev D., Krestinina O., Galvita A., Stricker R., Reiser G. // *Neurochem Int.* 2015. V. 90. P. 46–55.
46. Azarashvili T., Stricker R., Reiser G. // *Biol. Chem.* 2010. V. 391. P. 619–629.
47. Baines C.P., Kaiser R.A., Sheiko T., Craigen W.J., Molkenkin J.D. // *Nat. Cell Biol.* 2007. V. 9. P. 550–555.

Proapoptotic Effect of Melatonin on the Functioning of Nonspecific Mitochondrial Pore (mPTP) in Rat Mitochondria

Yu. L. Baburina^a, I. V. Odinkova^a, and O. V. Krestinina^a

^a*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia*

Received June 7, 2018;

Revised July 20, 2018;

Accepted August 8, 2018

Melatonin (MEL) is a hormone produced by the pineal gland. It easily penetrates the cell membrane and may be accumulated in the mitochondria at high concentrations and improve their functional state. However, there are also data showing that the effect of MEL on mitochondria may greatly vary, i.e., it depends on the type of tissue, the conditions of administration, and the composition and structural features of the target molecules. In the present work, we studied the effect of MEL on the functional state of rat brain mitochondria when it is directly added to mitochondria under conditions of opening of nonspecific mitochondrial permeability transition pore (mPTP), as well as the effect on the levels of mPTP regulators (VDAC and CNPase) and the main subunits of the electron transport chain (ETC). It was found that the direct addition of MEL at a concentration of 10 nM and 100 nM to mitochondria leads to a change in the protein level of the first and fourth ETC complexes, initiation of the mPTP opening, as well as a decrease in the levels of proteins regulating the mPTP functioning. The obtained data suggest that MEL may act as a pro-apoptotic agent, which may have important biological and pharmacological significance.

Keywords: rat brain mitochondria, melatonin, non-specific mitochondrial permeability transition pore, potential-dependent anion channel (VDAC), 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase (CNPase)