

УДК 581.1

МЕЛАТОНИН ИНГИБИРУЕТ ПРОДУКЦИЮ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА МИТОХОНДРИЯМИ РАСТЕНИЙ

П. А. Буцанец, А. С. Баик, А. Г. Шугаев*, член-корреспондент РАН Вл. В. Кузнецов

Поступило 15.08.2019 г.

Изучено влияние мелатонина на дыхание и продукцию (выделение) перекиси водорода при окислении сукцината в митохондриях, изолированных из семян люпина и эпикотилей проростков гороха. Впервые показано, что мелатонин (10^{-7} – 10^{-3} М) оказывал существенное ингибирующее действие на выделение пероксида водорода митохондриями растений, которое характеризовалось концентрационной зависимостью и видоспецифичностью. В то же время мелатонин (в концентрации до 100 мкМ) практически не влиял на скорость дыхания митохондрий и величину коэффициента дыхательного контроля. Полученные результаты подтверждают антиоксидантную функцию мелатонина и свидетельствуют о том, что он вовлекается в регуляцию уровня АФК и поддержание редокс-баланса в митохондриях растений.

Ключевые слова: мелатонин, митохондрии растений, дыхание, перекись водорода.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524892205-208>

В эукариотических клетках, включая клетки растений, основная функция митохондрий заключается в генерации энергии в виде АТФ в процессе окислительного фосфорилирования. При этом в ходе дыхания неизбежно происходят “утечка” небольшой части электронов в ЭТЦ и частичное (одноэлектронное) восстановление кислорода с образованием супероксида (супероксид-анион радикала) — первичной формы АФК, который далее может восстанавливаться в митохондриях до перекиси водорода и наиболее токсичного гидроксильного радикала [1, 2]. В низких концентрациях АФК, прежде всего перекись водорода, выходя из митохондрий, играют важную физиологическую роль в клеточном сигналинге. Однако в неблагоприятных условиях среды (засуха, засоление, экстремальные температуры, техногенное загрязнение и т.д.) уровень АФК в клетках растений значительно повышается, что может привести к развитию окислительного стресса, следствием чего является повреждение макромолекул, мембран, нарушение нормального функционирования митохондрий и в конечном счёте гибель клеток [3–5]. Это позволяет считать способность организма регулировать уровни АФК одним из принципиальных условий выживания и адаптации растений к повреждающему действию стрессоров.

Митохондрии являются одним из основных центров продукции АФК в клетках растений и одновременно одной из наиболее уязвимых мишеней

окислительного стресса. Это делает актуальным выяснение механизмов поддержания в митохондриях баланса АФК в условиях стресса, среди которых ключевую роль играют антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные органические антиоксиданты. Среди последних особое место в настоящее время отводится мелатонину, нейrogормону животных, который выполняет важную регуляторную роль практически во всех живых организмах, включая растения. Постулируется, что этот гормон может синтезироваться в митохондриях и хлоропластах, а также транспортироваться в эти органеллы извне и накапливаться в них в достаточно высоких концентрациях [6–8]. На клетках животных и изолированных митохондриях показано, что мелатонин, будучи сильным антиоксидантом, способен нейтрализовать практически все формы АФК, включая перекись водорода, и, таким образом, защищать митохондрии от окислительного стресса при патологических состояниях и старении организма [6, 8].

В многочисленных исследованиях было продемонстрировано, что обработка мелатонином растений также способствовала повышению стресс-толерантности благодаря, как полагают, его антиоксидантным свойствам [9]. Тем не менее в литературе отсутствуют экспериментальные данные о влиянии данного гормона на метаболическую активность митохондрий растений, включая продукцию АФК.

Цель настоящей работы — исследовать влияние мелатонина на дыхание и продукцию перекиси водорода митохондриями, изолированными из семян

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской Академии наук, Москва*

*E-mail: ag-shugaev@ifr.moscow; ag_shugaev@ippras.ru

долей люпина (*Lupinus angustifolius* L.) и эпикотилей проростков гороха (*Pisum sativum* L.).

Митохондрии выделяли из этиолированных семядолей люпина и эпикотилей гороха [10, 11]. Поглощение кислорода митохондриями при окислении сукцината изучали в стандартных условиях (состав среды инкубации указан в подписи к табл. 1) полярографическим методом в закрытой ячейке с платиновым электродом типа Кларка при 25 °С (концентрация белка 0,6–0,7 мг/мл). Скорость поглощения кислорода и величину коэффициента дыхательного контроля по Чансу (ДК) рассчитывали по методу [12].

Продукцию перекиси водорода при окислении сукцината изолированными митохондриями тестировали по скорости её выделения из органелл, используя непроницающий флуоресцентный индикатор Amplex Red (AR) в комбинации с пероксидазой хрена (НР). Измерения проводили в инкубационной среде, состав которой был аналогичен среде, используемой при изучении дыхания органелл, содержащей дополнительно 5 мкМ AR и 1 Е/мл НР, а также 0,25–0,35 мг/мл белка митохондрий. Образование резорфина регистрировали фотометрически, следя за изменением дифференциальной абсорбции ($\Delta A_{573-595}$) на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) за вычетом базальной абсорбции, обусловленной внесением митохондрий в отсутствие субстрата, уровень которой минимизировали добавлением PMSF в среду инкубации [13]. Скорость эмиссии перекиси водорода рассчитывали по калибровочной кривой, которая была построена с использованием свежеприготовленного раствора H_2O_2 .

Во всех случаях биологическая повторность экспериментов была 5–7-кратная. Данные табл. 1 и рис. 1 являются средними арифметическими из полученных величин с указанием стандартного отклонения.

Митохондрии, изолированные из семядолей люпина и эпикотилей гороха, отвечали основным кри-

териям физиологической интактности. В частности, они характеризовались высокой скоростью окисления дыхательных субстратов (сукцината) в состоянии 3 (в присутствии АДФ), а также прочным сопряжением процессов окисления и фосфорилирования, индикатором которого является высокий (около 3) дыхательный контроль по Чансу (ДК) (табл. 1). Результаты исследований показали, что присутствие в среде инкубации мелатонина (вплоть до 100 мкМ) не оказывало существенного влияния на скорость окисления сукцината митохондриями в разных метаболических состояниях и величину ДК.

Известно, что окисление субстратов ЦТК в митохондриях растений и животных сопровождается образованием АФК в трёх точках ЭТЦ (комплексы I, II и III) [1, 2, 14]. Однако нами было обнаружено, что наибольшая скорость продукции перекиси водорода в митохондриях (0,30–0,35 нмоль H_2O_2 в 1 мин на 1 мг белка) наблюдалась при окислении сукцината с участием сукцинатдегидрогеназы (СДГ), которая на 85–95% подавлялась ингибиторами СДГ (малонатом и теноилтрифторацетатом). Кроме того, не было обнаружено заметного подавления выделения H_2O_2 митохондриями после добавки в реакционную среду ротенона (ингибитора комплекса I и обратного транспорта электронов в ЭТЦ), что свидетельствовало об отсутствии значительного вклада этого комплекса в её образование при окислении сукцината.

Присутствие мелатонина в среде инкубации заметно снижало скорость выделения пероксида водорода при окислении сукцината митохондриями растений. В митохондриях семядолей люпина это снижение было выражено более значительно (до 50% ингибирования выделения H_2O_2 в присутствии 100 мкМ мелатонина) и зависело от концентрации гормона начиная с 0,1 мкМ (рис. 1а). Более высокие, но, по-видимому, нефизиологические концентрации мелатонина (1 мМ) снижали выделение перекиси митохондриями семядолей на 70–75% по отношению к контролю. В то же время митохондрии, вы-

Таблица 1. Влияние мелатонина на скорости окисления сукцината в разных метаболических состояниях и величину дыхательного контроля (ДК) в митохондриях семядолей люпина и эпикотилей гороха

Объект	Вариант	Состояние 3 (V_3)	Состояние 4 (V_4)	ДК (V_3/V_4)
Митохондрии семядолей люпина	Контроль	223 ± 15	68 ± 3	3,3 ± 0,03
	100 мкМ мелатонина	208 ± 11	61 ± 4	3,4 ± 0,02
Митохондрии эпикотилей гороха	Контроль	277 ± 13	98 ± 11	2,8 ± 0,03
	100 мкМ мелатонина	301 ± 15	104 ± 10	2,9 ± 0,04

Примечание. Среда инкубации содержала 0,3 М сахарозу, 20 мМ HEPES-Трис буфер (pH 7,2), 5 мМ KH_2PO_4 , 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ сукцинат, 5 мМ глутамат. Дополнительные добавки: АДФ (100 мкМ), суспензия митохондрий (0,6–0,7 мг белка/мл), V_3 — скорость окисления субстрата в присутствии АДФ (состояние 3), V_4 — скорость окисления субстрата после истощения АДФ (состояние 4). Скорости окисления сукцината выражены в нг-атом O_2 /(мин мг белка).

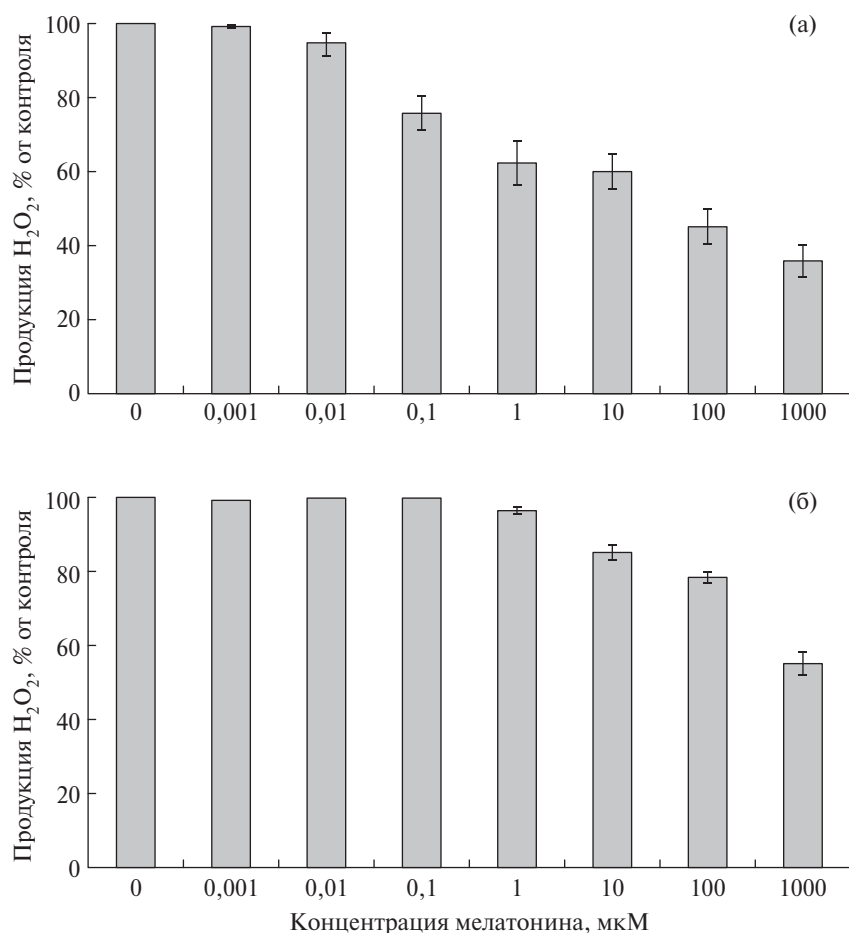


Рис. 1. Ингибирование мелатонином продукции перекиси водорода при окислении сукцината митохондриями семян люпина (а) и эпикотилей гороха (б). Состав среды инкубации приведён в табл. 1; дополнительно вносили суспензию митохондрий (0,25–0,35 мг белка/мл), 5 мкМ AR, 1 Е/мл НР, 100 мкМ PMSF и указанные концентрации мелатонина.

деленные из эпикотилей гороха, оказались менее чувствительными к действию мелатонина. Достоверное снижение эмиссии H₂O₂ под влиянием гормона при сравнении с контролем в этих органеллах наблюдалось начиная с концентрации 10 мкМ мелатонина (рис. 1б).

Пока неизвестно, чем обусловлены указанные различия в действии мелатонина на продукцию АФК в митохондриях, выделенных из исследуемых растительных объектов. Однако, учитывая, что мелатонин не оказывал заметного влияния на дыхание митохондрий люпина и гороха в разных метаболических состояниях, очевидно, что снижение скорости выделения перекиси водорода органеллами в присутствии гормона было связано или с активацией антиоксидантной системы митохондрий, или с антиоксидантными свойствами самого гормона. Кроме того, если принять, что большая часть перекиси водорода при окислении сукцината образуется в матриксе, то можно предположить, что различное

действие на этот процесс мелатонина обусловлено его неодинаковой проницаемостью через внутреннюю мембрану митохондрий двух видов сравниваемых растений.

Таким образом, на изолированных митохондриях растений нами впервые получены экспериментальные результаты, подтверждающие антиоксидантную функцию мелатонина, благодаря которой он может участвовать в регуляции уровня АФК и поддержании клеточного редокс-баланса у растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Murphy M.P.* // *Biochem. J.* 2009. V. 417. P. 1–13.
2. *Андреев А.Ю., Кушнарёва Ю.Е., Мерфи А.Н. и др.* // *Биохимия.* 2015. Т. 80. С. 612–630.
3. *Van Breusegem F., Dat J.F.* // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 384–390.
4. *Huang S., Van Aken O., Schwarzlander M., et al.* // *Plant Physiol.* 2016. V. 171. P. 1551–1559.

5. Wang Y., Berkowitz O., Selinski J., et al. // Free Radical Biol. Med. 2018. V. 122. P. 28–39.
6. Lopez A., Garsia J.A., Escames G., et al. // J. Pineal Res. 2009. V. 46. P. 188–198.
7. Tan D.-X., Manchester L.C., Rosales-Corral S.A., et al. // J. Pineal Res. 2012. V. 54. P. 127–138.
8. Reiter J.R., Tan D.X., Rosales-Corral S., et al. // Molecules. 2018. V. 23. E509.
9. Fan J., Xie Y., Zhang Z., Chen L. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 1528–1542.
10. Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Шугаева Н.А. // Физиол. растений. 2014. Т. 61. С. 555–564.
11. Генерозова И.П., Маевская С.Н., Шугаев А.Г. // Физиол. растений. 2009. Т. 56. С. 45–52.
12. Chance B., Williams G.R. // Adv. Enzymol. 1956. V. 17. P. 65–134.
13. Miva S., Treumann A., Bell A., et al. // Free Rad. Biol. Med. 2014. V. 90. P. 173–183.
14. Belt K., Huang S., Thatcher L.F., et al. // Plant Physiol. 2017. V. 173. P. 2029–2040.
15. Tan D.-X., Reiter R.J. // Melatonin Res. 2019. V. 2. P. 44–66.

MELATONIN INHIBITS PEROXIDE PRODUCTION IN PLANT MITOCHONDRIA

**P. A. Butsanets, A. S. Baik, A. G. Shugaev,
Corresponding Member of the RAS V. V. Kuznetsov**

*K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

Received August 15, 2019

The effect of melatonin on respiration and production (release) of hydrogen peroxide during succinate oxidation in mitochondria isolated from lupine cotyledons and epicotyls of pea seedlings was studied. It has been shown for the first time that melatonin (10^{-7} – 10^{-5} M) had a significant inhibitory effect on the production of peroxide by plant mitochondria, which was characterized by concentration dependence and species specificity. At the same time, melatonin (at a concentration of up to 100 microns) had virtually no effect on mitochondrial respiration rate and respiratory control coefficient. The results confirm the antioxidant function of melatonin and indicate that it is involved in the regulation of ROS levels and maintenance of redox balance in plant mitochondria.

Keywords: melatonin, plant mitochondria, respiration, hydrogen peroxide.