

А. В. Разыграев

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ В ТКАНИ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС И ЕЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПРИ СТАРЕНИИ

НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, 199034 Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3;
e-mail: alexeyrh@mail.ru

Глутатионпероксидазная активность была исследована в ткани шишковидной железы (эпифиза) молодых (2–4 мес) и стареющих (17–19 мес) самок крыс линии *Wistar*. Для сравнения активность была определена также в сером (обонятельные бугорки) и белом (пирамиды) веществах головного мозга. Определение проводили с использованием H_2O_2 в качестве восстанавливаемого субстрата и 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) для детекции убыли концентрации восстановленной формы глутатиона. Активность глутатионпероксидазы в эпифизе найдена более высокой при сравнении с исследованными структурами мозга. Ферментативная активность (мкмоль *GSH*/(мин · мг белка), $M \pm m$) в ткани эпифиза молодых крыс составила $1,52 \pm 0,07$, у стареющих животных — $1,27 \pm 0,06$ ($p < 0,05$). Снижение глутатионпероксидазной активности в ткани эпифиза при старении, возможно, связано с возрастным уменьшением содержания селена в данном органе и может являться одним из проявлений возрастной инволюции шишковидной железы.

Ключевые слова: глутатионпероксидаза, шишковидная железа, старение

Изменение активности компонентов антиоксидантной системы в различных органах и тканях при старении часто привлекает внимание исследователей, занимающихся проблемами геронтологии. Нередко выявляемое снижение содержания или активности какого-либо антиоксиданта в стареющем организме не без основания рассматривается как причина интенсификации накопления продуктов свободнорадикального окисления.

Глутатионпероксидаза (ГПО) является одним из ферментов антиоксидантной системы, осуществляющим восстановление пероксидов как органической, так и неорганической (H_2O_2) природы, образующихся *in vivo*. Возрастные изменения активности ГПО исследовали на различных объектах в разных тканях [6, 7, 9, 13]. Однако что касается, например, ткани головного мозга, то можно обнаружить противоречивые сведения: в одних случаях сообщается об уменьшении активности ГПО с возрастом (это могут рассматривать как причину накопления окислительных повреждений при ста-

рени), в других — об увеличении (тогда говорят о компенсаторном механизме, направленном против повышения генерации активных форм кислорода) [7, 13]. Что же касается ткани шишковидной железы (эпифиза), то в мировой литературе имеются весьма скудные сведения об активности ГПО в этом органе [4]; при этом данные по возрастным изменениям активности ГПО эпифиза отсутствуют. Между тем, такие сведения представляют очень большой интерес, поскольку эпифиз контролирует ряд важных процессов и функций в организме, таких как старение, поддержание циркадианной ритмичности, регуляция репродуктивной функции, реакция на стресс [5]. Поскольку в ткани эпифиза содержится в больших количествах серотонин, служащий предшественником в биосинтезе мелатонина [11], метаболизм этого моноамина по моноаминоксидазному пути (то есть с генерацией H_2O_2), должен, по всей видимости, отражаться на уровне активности ГПО. Снижение с возрастом продукции мелатонина, обладающего выраженными антиоксидантными свойствами [1, 11], вероятно, затрагивает активность других антиоксидантов в ткани эпифиза, в частности ГПО.

Целью настоящей работы явилось исследование уровня активности ГПО в эпифизе и его изменения при старении. Для этого была поставлена задача изучить уровни активности ГПО у молодых (2–4-месячных) и старых (17–19 мес) самок крыс с применением H_2O_2 в качестве субстрата, поскольку метаболизм моноаминов посредством моноаминоксидазы ведет к увеличению продукции именно этого пероксида. Для сравнения уровней активности ГПО между эпифизом и нервной тканью активность фермента была определена в сером и белом веществах головного мозга.

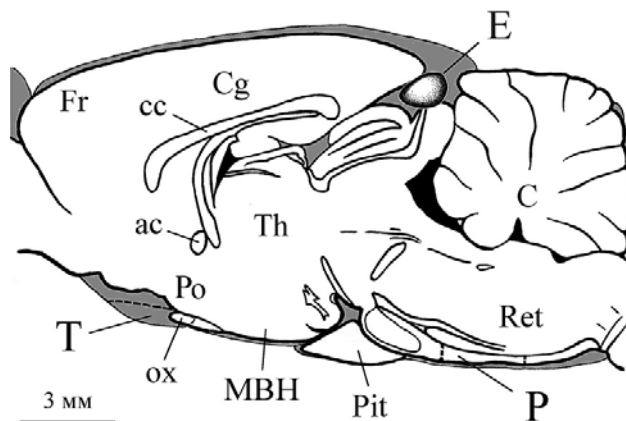
Материалы и методы

Для эксперимента было использовано 12 самок крыс линии *Wistar*, полученных из питомника «Рапполово» РАМН: 6 крыс возраста 2–4 мес и 6 крыс 17–19-месячного возраста. Животные находились в виварии с режимом освещения 12 ч света : 12 ч темноты. Крыс декапитировали в период с 6 ч от включения света до окончания дневной фазы экспериментальных суток.

Сразу после декапитации производили вскрытие черепной коробки и извлекали эпифиз и головной мозг, выделенный материал затем замораживали при -85°C и хранили при указанной температуре до приготовления гомогенатов. В качестве образцов серого и белого вещества головного мозга выделяли обонятельные бугорки и пирамиды, соответственно (рисунки), пользуясь атласом анатомии головного мозга крыс [10]. Ткань гомогенизировали в 0,05 М трис-*HCl* буфере (pH 8,5), содержащем 0,34 мМ ЭДТА, гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g, супернатант использовали как биологический материал для определения активности ГПО.

Определение глутатионпероксидазной активности осуществляли с применением модифицированного метода, описанного в работе [3]. Определение проводили при температуре 37°C в реакционной смеси, состоящей из 0,05 М трис-*HCl* буфера с 0,34 мМ ЭДТА (pH 8,5), 1 мМ GSH (восстановленный глутатион), 0,38 мМ H_2O_2 , 10 мМ NaN_3 и биологического материала (конечная концентрация белка в реакционной среде — от 0,15 до 0,60 мг/мл). Для оценки уровня неферментативного окисления глутатиона посредством пероксида водорода в данных условиях вместо биологического материала использовали буфер для приготовления гомогенатов.

Раствор GSH и NaN_3 в трис-*HCl* буфере с ЭДТА (90 мкл, 1,16 мМ GSH и 11,6 мМ NaN_3) преинкубировали в течение нескольких минут при 37°C , после чего вносили 10 мкл биологического материала (либо трис-*HCl* буфера с ЭДТА с целью оценки неферментативного окисления GSH). Далее через 60 с вносили 4 мкл 10 мМ H_2O_2 . Реакцию останавливали внесением 20 мкл 30% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) через 30 с после добавления пероксида. Для выявления значений, соответствующих начальной концентрации GSH, раствор ТХУ добавляли в пробы, не содержащие биологического материала, сразу после внесения H_2O_2 (0 с). Для обонятельных бугорков и пирамид



Топография структур, использовавшихся для определения глутатионпероксидазной активности (парагиттальный разрез головного мозга крысы (0,4 мм латеральнее плоскости симметрии), схема).

Использованные структуры: E — эпифиз (изображен целиком в соответствии с естественным местоположением), P — пирамида продолговатого мозга, T — обонятельный бугорок. Прочие структуры: ac — передняя комиссура, C — мозжечок, cc — мозолистое тело, Cg — пооясная кора, Fr — фронтальная кора, MBH — медialный базальный гипоталамус, ox — перекрест зрительных нервов (хиазма), Pit — гипофиз, Po — медialная преоптическая область, Ret — ретикулярная формация, Th — таламус

использовали удлиненное время инкубации (60 с вместо 30), что было учтено при последующих расчетах удельной активности ГПО.

После добавления ТХУ денатурированный белок осаждали центрифугированием (1000 g, 10 мин), затем отбирали 90 мкл супернатанта для окрашивания в реакции с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ). К белковому осадку с остаточным супернатантом (общий объем 34 мкл) добавляли 70 мкл 1М NaOH и тщательно перемешивали до растворения осадка. Полученный раствор хранили при $+3^{\circ}\text{C}$ и затем использовали для определения содержания белка турбидиметрическим методом с применением ТХУ и регистрацией оптической плотности при 340 нм [12].

К 90 мкл супернатанта, отобранного после центрифугирования, содержащего непрореагировавший GSH, добавляли 1,4 мл трис-*HCl* буфера (pH 8,5), через 5 мин в реакционную смесь вносили 15 мкл раствора ДТНБ в метаноле (4 мг/мл абсолютного метанола). Оптическую плотность регистрировали при 412 нм через 5 мин после внесения ДТНБ.

Далее производили расчеты по формуле: $(E_{\text{нфо}} - E_{\text{опыт}}) / E_{\text{с}}$, где $E_{\text{нфо}}$ — оптическая плотность для пробы, не содержащей фермент (для оценки уров-

ня неферментативного окисления GSH), $E_{\text{опыт}}$ — оптическая плотность для пробы, содержащей биологический материал, и E_c — оптическая плотность для пробы, не содержащей фермент, и временем инкубации, равным 0 с, и соответствующая концентрации GSH , равной 1 мкмоль/мл реакционной смеси. Полученный результат (умноженный на два в случае ткани эпифиза) делили на содержание белка в реакционной смеси (мг/мл) и получали значение удельной активности ГПО, выраженное в мкмоль GSH /(мин · мг белка).

Статистические сравнения проводили с использованием непараметрического T -критерия Уайта.

Результаты и обсуждение

В ткани эпифиза молодых и стареющих самок крыс были выявлены следующие уровни глутатионпероксидазной активности (мкмоль GSH /(мин · мг белка), $M \pm m$): 2–4-месячные животные — $1,52 \pm 0,07$ ($n=6$); 17–19-месячные — $1,27 \pm 0,06$ ($n=6$); при объединении выборок (молодые и стареющие) — $1,39 \pm 0,06$ ($n=12$). Различия между стареющими и молодыми крысами достоверны ($p < 0,05$).

Для ткани пирамид продолговатого мозга выявленное значение активности ГПО составило $0,97 \pm 0,06$, для ткани обонятельных бугорков — $0,71 \pm 0,04$ ($n=8$, молодых крыс — 5, стареющих — 3). Различия между структурами мозга достоверны ($p < 0,01$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для эпифиза характерна относительно высокая активность ГПО, превышающая активность фермента в исследованных областях головного мозга. Известно, что глутатионпероксидазная активность в ткани шишковидной железы крыс приблизительно в 4 раза ниже, чем в печени [4]. В ткани печени крыс активность ГПО, восстанавливающей пероксид водорода, в 8 раз превышает активность ГПО головного мозга (мозг исследовали без выделения отдельных областей) [8]. Таким образом, результаты настоящего исследования в целом согласуются с данными из предыдущих работ.

В настоящей работе, очевидно, представлены первые данные о возрастных изменениях $GSH:H_2O_2$ -оксидоредуктазной активности в ткани шишковидной железы крыс. Полученные данные позволяют говорить о сниженном уровне активности ГПО в эпифизе старых животных. Более низкие значения скорости ферментативного окисления GSH в пробах для группы стареющих крыс

также могли бы быть получены в случае наличия высоких концентраций GSH в ткани эпифиза данных животных, что приводило бы к увеличению действительной начальной концентрации GSH в реакционной смеси, содержащий материал эпифиза старых крыс. Однако факт наличия более высокого содержания SH -групп в эпифизе у старых животных представляется весьма маловероятным, поскольку хорошо известно, что при старении происходит не увеличение, а снижение концентраций свободных SH -групп в тканях, что показано, например, для восстановленной формы глутатиона в ткани головного мозга [13]. Поэтому с большой вероятностью можно утверждать, что низкие значения, полученные для группы стареющих животных, действительно вызваны сниженной активностью фермента.

Вывод о снижении активности глутатионпероксидазы в эпифизе при старении хорошо согласуется с данными о возрастной динамике содержания селена в шишковидной железе. Ранее для ткани эпифиза крыс было показано снижение содержания селена при увеличении возраста животных (возрастной диапазон — от 4 до 12 мес), причем обогащение рациона селеном не отменяло возрастное снижение концентрации селена в шишковидной железе [5]. Такие данные представляют большой интерес, поскольку наиболее значительный вклад в $GSH:H_2O_2$ -оксидоредуктазную активность в различных тканях вносят формы фермента, биосинтез которых критическим образом зависит от содержания селена в организме [2]. В связи с этим, обнаруженный в настоящем исследовании сниженный уровень активности ГПО, исходя из данных, представленных в работе [5], является предсказуемым и, вероятно, связан с ограничением накопления селена в шишковидной железе в процессе старения.

Приведенные в настоящей работе данные согласуются с представлением о том, что при старении происходит ослабление антиоксидантного потенциала тканей. Подобные результаты, в которых продемонстрировано снижение активности антиоксидантов ткани шишковидной железы, особенно интересны, поскольку сам эпифиз является органом, осуществляющим контроль над процессами, ассоциированными со старением [1].

Автор выражает благодарность проф. А.В. Арутюняну за содействие в проведении данного исследования, а также Ю. П. Милутиной и И. В. Залозней за техническую помощь.

Литература

1. Анисимов В. Н., Соловьев М. В. Эволюция концепций в геронтологии. СПб.: Эскулап, 1999.
2. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Успехи соврем. биол. 1993. Т. 113. Вып. 1. С. 107–122.
3. Разыграев А. В. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) // Клинико-лабораторный консилиум. 2004. № 4. С. 19–22.
4. Campa A., Abdalla D. S., Omoto P., Cipolla Neto J. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in rat pineal gland // Biochem. Int. 1992. Vol. 27. № 3. P. 407–415.
5. Demajo M., Jozanov-Stankov O., Đujić I. Content of microelements in the rat pineal gland at different ages and the effects of selenium supplementation // Arch. Biol. Sci. (Belgrade). 2006. Vol. 58. № 2. P. 69–75.
6. Kedziora-Kornatowska K., Szewczyk-Golec K., Czuczejko J. et al. Effect of melatonin on the oxidative stress in erythrocytes of healthy young and elderly subjects // J. Pineal Res. 2007. Vol. 42. № 2. P. 153–158.
7. Kishido T., Unno K., Yoshida H. et al. Decline in glutathione peroxidase activity is a reason for brain senescence: consumption of green tea catechin prevents the decline in its activity and protein oxidative damage in ageing mouse brain // Biogerontology. 2007. Vol. 8. № 4. P. 423–430.
8. Lawrence R. A., Burk R. F. Species, tissue and subcellular distribution of non-Se-dependent glutathione peroxidase activity // J. Nutr. 1978. Vol. 108. P. 211–215.
9. Manda K., Bhatia A. L. Melatonin-induced reduction in age-related accumulation of oxidative damage in mice // Biogerontology. 2003. Vol. 4. № 3. P. 133–139.
10. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego. 1982.
11. Simonneaux V., Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters // Pharmacol. Rev. 2003. Vol. 55. P. 325–395.
12. Vera J. C. Measurement of microgram quantities of protein by a generally applicable turbidimetric procedure // Analyt. Biochem. 1988. Vol. 174. P. 187–196.
13. Zhu Y., Carvey P. M., Ling Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain // Brain Res. 2006. Vol. 1090. № 1. P. 35–44.

Adv. gerontol. 2010. Vol. 23, № 3. P. 392–395

A. V. Razygraev

PINEAL GLAND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY IN RATS AND ITS AGE-ASSOCIATED CHANGE

D. O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS, 3 Mendeleevskaya liniya, St. Petersburg 199034, Russia; e-mail: alexeyrh@mail.ru

Glutathione peroxidase activity has been studied in the pineal gland (epiphysis) of young and aging female *Wistar* rats (2–4 and 17–19 month old). For comparison the same activity was studied in the pyramids of medulla oblongata and in the olfactory tubercle. These two brain structures represent white and gray matter respectively. The determination of the activity was performed with H_2O_2 substrate and with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) for estimation of the decrease of restored of glutathione concentration. The glutathione peroxidase activity was higher in the pineal gland than in the brain structures used. Pineal glutathione peroxidase activities (micromole of GSH per minute per milligram of protein, $M \pm m$) in young and old rats were $1,52 \pm 0,07$ and $1,27 \pm 0,06$ respectively ($p < 0,05$). The potential reason for the declined enzymatic activity found in the aged rats is the age-associated decrease of the selenium content in the pineal gland. The decline found may be one of the reflections of the pineal gland functional involution.

Key words: glutathione peroxidase, epiphysis, aging