

## ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА

УДК 577.15:611.81:599.323.4

А. В. Разыграев, К. Ю. Воловик, К. И. Паньшина

## АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ В-ТИПА В ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

С использованием бензиламина в качестве окисляемого субстрата и селегилина в качестве селективного ингибитора определена активность моноаминоксидазы типа В в эпифизах крыс среднего возраста и у стареющих крыс. Активность фермента повышена у стареющих животных. Сопряженность увеличения активности моноаминоксидазы типа В со снижением активности глутатионпероксидазы, выявленным ранее в эпифизах крыс при старении, может способствовать усилению окислительных процессов в шишковидной железе и, таким образом, вносить вклад в функциональную инволюцию данного органа. Библиогр. 18 назв. Ил. 1.

*Ключевые слова:* аминоксидаза, эпифиз, бензиламин, крысы, старение.

## ACTIVITY OF B-TYPE MONOAMINE OXIDASE IN THE PINEAL GLAND OF RATS OF DIFFERENT AGES

A. V. Razygraev<sup>1</sup>, K. Yu. Volovik<sup>2</sup>, K. I. Panshina<sup>2</sup>

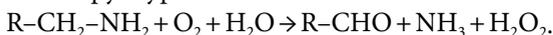
<sup>1</sup> D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Mendeleevskaya liniya, 3, St. Petersburg, 199034, Russian Federation; alexeyrh@mail.ru

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russian Federation; ksu\_volovik@mail.ru, kseniya.panshina@gmail.com

B-type monoamine oxidase (MAO B) activity in the pineal gland of middle-aged and aging male Wistar rats (6–8 and 14–15 months old, respectively) was determined using benzylamine as a substrate and selegiline as a selective inhibitor. The rate of conversion of benzylamine to benzaldehyde was measured spectrophotometrically at 250 nm. The initial concentration of benzylamine was 3.7 mM, which is the saturation concentration for the rat pineal gland MAO B. Activity of the enzyme in the pineal gland of aging rats was found to be elevated when compared with that of middle-aged rats ( $p$  less than 0.02, the Wilcoxon-Mann-Whitney test). The increase of MAO B activity accompanied by the decrease of glutathione peroxidase activity, which was found in the previous study, may promote the increase of oxidative damage and, as a consequence, the pineal gland functional involution. Refs 18. Figs 1.

*Keywords:* amine oxidase, epiphysis, benzylamine, rats, aging.

Моноаминоксидазы (MAO) (КФ 1.4.3.4) представляют собой широко распространенные ферменты, катализирующие окислительное дезаминирование соединений аминной структуры по схеме:



---

А. В. Разыграев (alexeyrh@mail.ru): НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3; К. Ю. Воловик (ksu\_volovik@mail.ru), К. И. Паньшина (kseniya.panshina@gmail.com): Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

У человека и животных среди флавиновзависимых ферментов данной группы выделяют MAO двух типов — А и В (MAO А и MAO В соответственно), для каждого из которых известны специфичные субстраты и ингибиторы [1].

Известно, что в процессе старения у человека и животных наблюдается снижение активности большинства ферментов в различных органах и тканях. Редким исключением является MAO В. Ранее было установлено, что активность и содержание этого фермента, окисляющего дофамин *in vivo*, возрастают в головном мозге млекопитающих в процессе старения. При этом активность MAO А не меняется или меняется незначительно [2]. Поскольку результатом MAO-опосредованного окисления моноаминов является продукция  $H_2O_2$ , при увеличении активности MAO в ткани мозга и в других органах происходит интенсификация окислительных процессов [3]. Таким образом, в отношении органов и тканей наблюдается соответствие между повышением активности MAO В и прогрессированием их функциональной инволюции в процессе старения, сопровождаемой усилением продукции активных форм кислорода.

В то время как повышение активности MAO В в ткани мозга млекопитающих в процессе старения уже продемонстрировано, до сих пор было неясно, происходит ли возрастное изменение активности MAO В в шишковидной железе (эпифизе), которая является органом, участвующим в гуморальном контроле процессов, связанных со старением [4]. Ранее были получены данные, свидетельствующие в пользу того, что общая активность MAO возрастает в эпифизах крыс, достигших возраста 12 месяцев [5], но при этом не определяли активность отдельных изоферментов MAO. Настоящее исследование посвящено проверке гипотезы о наличии возрастного изменения активности MAO В в эпифизе крыс. Задача исследования — определить уровни активности MAO В в эпифизах относительно молодых и стареющих крыс и сравнить полученные результаты.

## Материалы и методы

**Животные.** Самцы и самки крыс линии Вистар были получены из питомника «Рапполово» РАМН, содержались в виварии НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН со стандартным световым режимом (12 ч света: 12 ч темноты) и получали стандартный корм и воду. Потомство полученных крыс, рожденное и выращенное в условиях вивария, использовалось для исследования. Исследование выполняли на самцах двух возрастных групп: 6–8 и 14–15 месяцев ( $n=7$  для обеих групп).

**Предварительная обработка биоматериала.** Крыс декапитировали во второй половине дневной фазы фотоцикла после наркотизации трихлорметаном. Эпифиз извлекали сразу после декапитации, замораживали и хранили при  $-85^{\circ}C$ . Замораживание ткани являлось необходимым этапом предварительной обработки. Ткань гомогенизировали в 0,25М растворе сахарозы, приготовленном на К-Na-фосфатном буфере (рН 8,0), с использованием стеклянного гомогенизатора. Для проведения ферментативной реакции применялся супернатант, полученный в результате центрифугирования гомогенатов при 1000 g в течение 10 мин.

**Определение активности MAO В.** Активность фермента определяли, используя спектрофотометрический метод, основанный на реакции окислительного дезаминирования бензиламина в бензальдегид [6]; метод применяли с предварительной проверкой параметров и соответствующей модификацией для работы с тканью эпифиза. Реакционная смесь (общий объем — 1,125 мл) состояла из раствора бензиламина

(гидрохлорид бензиламина, Sigma) в К-Na-фосфатном буфере (рН 8,0) и супернатанта гомогената ткани. Концентрация бензиламина в реакционной смеси составляла 3,7мМ (насыщающая концентрация). Инкубацию проводили при 37°C в индивидуальных кварцевых кюветах для каждого образца ткани. Прирост оптической плотности регистрировали с помощью спектрофотометра Beckman DU-65 (Beckman Coulter, США) при длине волны 250 нм. Периодические измерения позволили наблюдать постоянство скорости реакции. Каждое измерение проводили сразу после недолгого, тщательного перемешивания. Также, посредством добавления селегилина (R-депренила, селективного ингибитора MAO В) в реакционную смесь до концентрации, равной 2мкМ, убежились в том, что наблюдаемая величина активности полностью принадлежит исследуемому изоферменту (MAO В) [7].

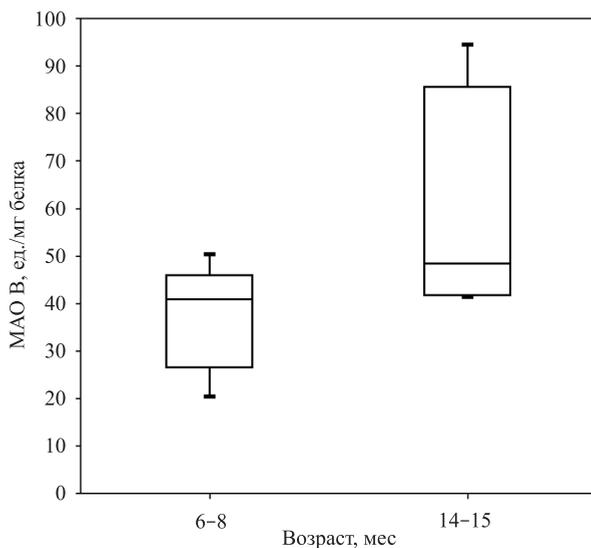
Результаты определения ферментативной активности выражали в единицах количества фермента [6, 8], отнесенных к массе белка (в миллиграммах) в перерасчете на 1 мл реакционной смеси. Одна единица означала количество фермента в 1 мл реакционной смеси, которое обуславливает повышение оптической плотности на 0,001 за 1 мин при 250 нм. Содержание белка определяли по методу из работы [9], регистрируя оптическую плотность при 500 нм [10].

**Статистика.** Поскольку форма распределения изучаемого признака для каждой из сформированных выборок не может быть надежно определена при  $n = 7$ , результаты представлялись в виде медианы и процентилей, Me (8,3–91,7%), что помогло избежать возможного искажения информации о выборке. По той же причине уровни активности между двумя выборками сравнивались с использованием непараметрического, свободного от формы распределения метода — критерия Манна—Уитни—Уилкоксона для независимых выборок [11, 12]. Точное значение вероятности ошибки первого рода высчитывалось с использованием программной среды R (версия 2.13.1).

### Результаты и обсуждение

Медиана и процентиля, Me (8,3–91,7%), для группы крыс возраста 14–15 месяцев составили 48,3 (41,4–85,8), тогда как в группе крыс возраста 6–8 месяцев значения тех же параметров составили 40,8 (26,3–46,0) ед./мг белка (рисунок). Вероятность ошибки первого рода, вычисленная при статистическом сравнении, составила 1,748%, т. е. нулевая гипотеза о случайном характере различий между группами отвергается на высоком уровне значимости. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о повышении активности MAO В в эпифизе крыс при старении.

Существование высокого, хорошо определяемого уровня MAO В в эпифизах крыс предполагает ее важную роль в функционировании этого органа. Известно, что дофамин является основным натуральным субстратом для MAO В. Полученные ранее данные указывают на то, что дофамин может быть нейротрансмиттером в шишковидной железе. К ним относятся такие факты, как 1) наличие в эпифизах грызунов (объект — хомяки) волокон, иммунореактивных к тирозингидроксилазе (ферменту биосинтеза дофамина) и к дофамин- $\beta$ -гидроксилазе (ферменту, превращающему дофамин в норадреналин), 2) наличие циркадных ритмов концентрации дофамина в эпифизах крыс и других животных с максимумами в ночное время суток, 3) ингибирующий эффект дофамина в низких концентрациях и его стимулирующий эффект в высоких концентрациях на арилалкиламин-N-ацетилтрансферазную активность и на выделение



Уровни активности моноаминоксидазы типа В в эпифизах самцов крыс двух возрастных групп

Линия внутри бокса — медиана; верхняя и нижняя границы бокса — 91,7 и 8,3 процентиля соответственно; границы верхнего и нижнего «усов» — max и min соответственно. Различия между двумя группами статистически значимы,  $p < 0,02$  (критерий Манна—Уитни—Уилкоксона).

мелатонина в культивируемых эпифизах крыс, 4) наличие специфических дофаминовых рецепторов в эпифизе [13].

С использованием цитохимических методов ранее было изучено распределение изоферментов MAO в эпифизе. В шишковидной железе крыс и других животных MAO А локализована преимущественно в норадренергических нервных окончаниях, в то время как MAO В выявлена в пинеалоцитах [14, 15]. Эти факты означают, что в эпифизе дофамин и MAO В локализованы отдельно друг от друга, при этом пути их взаимодействия неясны. Высказывалось предположение о том, что в пинеалоцитах происходит окисление 5-метокситриптамина посредством MAO В [15]. Кроме того, ранее было показано, что MAO В в обилии присутствует в клетках мозга, содержащих большое количество серотонина [16]. По всей видимости, пинеалоциты являются клетками, для которых справедлив тот же принцип.

Результат настоящего исследования подтверждает гипотезу о том, что увеличение активности MAO В при старении — феномен, характерный как для головного мозга, так и для анатомически и функционально связанной с ним шишковидной железы. Если MAO В действительно опосредует метаболизм дофамина в эпифизе, то обнаруженное возрастное изменение активности MAO В может быть причиной сниженного уровня дофамина, наблюдаемого ранее в эпифизах стареющих крыс [17].

В нашем предыдущем исследовании было показано, что активность глутатионпероксидазы в ткани эпифиза крыс, по всей вероятности, снижается при старении [18]. Сопряженность снижения активности этого фермента, восстанавливающего пероксид водорода, и увеличения активности MAO В, фермента, производящего  $H_2O_2$ , может

способствовать развитию окислительного стресса в шишковидной железе у стареющих крыс. Это может являться одним из объяснений функциональной инволюции данного органа при старении. Полученные результаты особенно интересны в связи с тем, что сам эпифиз является органом, контролирующим процессы, связанные со старением.

## Литература

1. Binda C., Mattevi A., Edmondson D. E. Structural properties of human monoamine oxidases A and B // *Int. Rev. Neurobiol.* 2011. Vol. 100. P. 2–13.
2. Nicotra A., Pierucci F., Parvez H., Senatori O. Monoamine oxidase expression during development and aging // *Neurotoxicology.* 2004. Vol. 25. P. 155–165.
3. Van der Schyf C. J., Geldenhuys W. J. Multimodal drugs and their future for Alzheimer's and Parkinson's disease // *Int. Rev. Neurobiol.* 2011. Vol. 100. P. 107–125.
4. Анисимов В. Н., Соловьев М. В. Эволюция концепций в геронтологии. СПб.: Эскулап, 1999. 130 с.
5. Разыграев А. В., Арутjunян А. В. Моноаминоксидазная активность ткани эпифиза и структур головного мозга крыс разного возраста // *Успехи геронтологии.* 2008. Т. 21, № 3. С. 402–405.
6. Tabor C. W., Tabor H., Rosenthal S. M. Purification of amine oxidase from beef plasma // *J. Biol. Chem.* 1954. Vol. 208, N 2. P. 645–661.
7. Razygraev A. V., Arutjunyan A. V. Monoamine oxidase activity in several structures of rat brain // *Neurochemical J.* 2007. Vol. 1, N 3. P. 204–207.
8. The presence of an inhibitor of benzylamine oxidase in human blood plasma / Buffoni F., Banchelli G., Ignesti G., Pirisino R., Raimondi L. // *Biochem. J.* 1983. Vol. 211, N 3. P. 767–769.
9. Vera J. C. Measurement of microgram quantities of protein by a generally applicable turbidimetric procedure // *Anal. Biochem.* 1988. Vol. 174. P. 187–196.
10. Activity of monoamine oxidase in the medial preoptic area and median eminence of female rats of different ages / Razygraev A. V., Arutjunyan A. V., Stepanov M. G., Milyutina Yu. P., Mazur T. A. // *Neurochemical J.* 2008. Vol. 2, N 3. P. 193–196.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
12. Матюшичев В. Б. Элементы статистической обработки результатов биохимического эксперимента. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та. 1990. 132 с.
13. Simonneau 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.
14. Masson-Pevet M., Pevet P. Cytochemical localization of type-A and -B monoamine oxidase in the rat pineal gland // *Cell and Tissue Research.* 1989. Vol. 255, N 2. P. 299–305.
15. Przybylska-Gornowicz B., Lewczuk B., Ciesielska-Myszka L., Wyrzykowski Z. Cytochemical localization of monoamine oxidase in the pig pineal gland // *Folia Histochem. Cytobiol.* 1994. Vol. 32, N 3. P. 161–166.
16. Differential subcellular location of mitochondria in rat serotonergic neurons depends on the presence and the absence of monoamine oxidase type B / Arai R., Karasawa N., Kurokawa K., Kanai H., Horiike K., Ito A. // *Neuroscience.* 2002. Vol. 114, N 4. P. 825–835.
17. Miguez J. M., Recio J., Sánchez-Barceló E., Aldegunde M. Changes with age in daytime and nighttime contents of melatonin, indoleamines, and catecholamines in the pineal gland: a comparative study in rat and syrian hamster // *J. Pineal Res.* 1998. Vol. 25, N 2. P. 106–115.
18. Razygraev A. V. Pineal gland glutathione peroxidase activity in rats and its age-associated change // *Advances in Gerontology.* 2011. Vol. 1, N 3. P. 252–254.

Статья поступила в редакцию 17 января 2014 г.

## Сведения об авторах

Разыграев Алексей Вячеславович — кандидат биологических наук  
Воловик Ксения Юрьевна — студент  
Паньшина Ксения Игоревна — студент

Razygraev Alexej V. — Ph.D.  
Volovik Kseniya Yu. — student  
Panshina Kseniya I. — student