УДК: 636.2: 612.015.3: 591.175

ОКИСНИЙ МЕТАБОЛІЗМ У ДОВГАСТОМУ МОЗКУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В ЗВ'ЯЗКУ З ВІКОМ

В. В. ВЛІЗЛО, Д. Д. ОСТАПІВ, А. З. ПИЛИПЕЦЬ, І. М. ПЕТРУХ

Інститут біології тварин УААН

Наведені дані про ендогенне споживання кисню мітохондріями, вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (гідроперекисів ліпідів, малонового діальдегіду) та білків зони пріон-протеїна у довгастому мозку великої рогатої худоби в пренатальний та постнатальний періоди. Встановлено зниження дихальної активності мітохондрій і вмісту білків зони пріон-протеїна та підвищення продуктів перекисного окиснення ліпідів у мозку корів 4-7- річного віку, порівняно з молодняком (12-15 міс.) та плодами великої рогатої худоби, що може визначати схильність повновікових корів до розвитку губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби.

Ключові слова: ВЕЛИКА РОГАТА ХУДОБА, ГУБЧАСТОПОДІБНА ЕНЦЕФАЛОПАТІЯ, ДОВГАСТИЙ МОЗОК, ДИХАЛЬНА АКТИВНІСТЬ МІТОХОНДРІЙ, ПРІОН-ПРОТЕЇН, ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ.

На сьогоднішній день встановлено, що збудником губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби (ГЕ ВРХ) є патологічна форма пріона (PrP^{SC}). Основною причиною поширення хвороби у країнах світу стало згодовування коровам м'ясо-кісткового борошна, ураженого збудником [1, 2]. Після встановлення етіологічного фактора та причини епізоотії було запроваджено активні профілактичні заходи, зокрема повну заборону згодовування тваринного борошна, тваринних білків та жирів, добавок тваринного походження жуйним, знищення хворих у латентному періоді, а також їх нащадків і тварин, які утримувалися або контактували із хворими. Це спричинило зниження кількості клінічних випадків ГЕ ВРХ, але не призвело до повної ліквідації захворювання. Водночас кількість країн, неблагополучних щодо ГЕ ВРХ, зросло із 10 у середині 90-х років XX століття до 27 у 2006 році. Інколи захворювання виявляється у тварин, які не споживали тваринних кормів і не контактували з хворими. Отже, етіологія інфекції є ще повністю не з'ясована.

Існує ряд теорій виникнення пріонних захворювань, у тому числі губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби. Однією із них є "теорія нагромадження помилок синтезу білків" [3, 4, 5]. Відомо, що мозок особливо чутливий до окисного навантаження, оскільки багатий на ненасичені жирні кислоти і має відносний дефіцит антиоксидантного захисту, порівняно з іншими органами [6]. Порушення окисного метаболізму, який може виникати в процесі онтогенезу тварин, спричиняє зміни інтенсивності використання субстратів і зменшення синтезу АТФ, зниження вмісту антиоксидантів та активності антиоксидантних систем, зростання кількості та нагромадження продуктів перекисного окиснення [5, 7]. На цьому фоні, збільшується кількість "помилок" синтезу білків (ізоформ білків), зокрема, можливе утворення патологічного пріона та розвиток енцефалопатій. Подібні зміни характерні для швидкостаріючих організмів [8].

Метою нашої роботи було вивчити особливості дихальної активності мітохондрій, вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків зони пріон-протеїна (27-35 кДа) у довгастому мозку клінічно здорової великої рогатої худоби в пренатальний та постнатальний періоди.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували довгастий мозок великої рогатої худоби пренатального (плоди 5-8-місячного віку) та постнатального (10-15-місячний молодняк і 4-7-річні корови) періодів. Для дослідження кисень-залежних процесів з тканин довгастого мозку виділяли мітохондрії (процедура виділення мітохондрій проведена при $t = 0\text{-}4\ ^0C$).

Проби з тканин (5-7 г) гомогенізували в середовищі виділення, яке містило (мМ): сахарозу 280, трис-HCl –10 (pH 7,4), ЕДТА-1, БСА-0,2 %. Середовище суспендування та інкубування мало такий самий склад за виключенням ЕДТА. Досліджували інтенсивність дихання мітохондрій полярографічно (нг-атом О/ мг білка за хв) при t +37 ^{0}С. Для оцінки дихального ланцюга мітохондрій використовували інгібітори НАД-залежної ділянки – аммітал ($5\cdot10^{-3}$ М) та термінальної (цитохромоксидази) – азид натрію (10^{-2} М). У зрізах довгастого мозку визначали вміст гідроперекисів та малонового діальдегіду [9]. У гомогенаті тканини мозку (1:10 10 мМ трис-HCl; pH 7,4) досліджували вміст білків зони пріон-протеїна (%) шляхом електрофорезу в 12,5 % поліакриламідному гелі в присутності 0,1 % додецилсульфата натрію. Ідентифікували зону пріон-протеїна білками-маркерами з молекулярними масами (ММ) 43,0; 30,0; 20,1 кДа. Отримані цифрові дані опрацьовували статистично.

Результати й обговорення

При дослідженні довгастого мозку плодів великої рогатої худоби встановлено, що споживання кисню мітохондріями у них є максимальним і складає 6,1$\pm$0,78 нг-атом О/ мг білка за хв (рис.). У молодняку споживання кисню мітохондріями знижується на 9,9 %, у корів на 23,0 % і є найменшим (4,7$\pm$0,41нг-атом О/ мг білка за хв). Отже, зі збільшенням віку тварин споживання кисню мітохондріями довгастого мозку знижується. Споживання кисню за рахунок використання субстратів циклу трикарбонових кислот, навпаки, високе у корів (32,0 %) дещо нижче у молодняку (27,3 %) і плодів (26,3 %). Це свідчить про те, що з віком у тканині довгастого мозку зростає участь НАД-шляху транспорту електронів і знижується частка альтернативних джерел постачання та використання субстратів у дихальному ланцюзі. Однак, поряд із підвищенням частки НАД-залежних субстратів у споживанні кисню його реалізація термінальною ланкою дихального ланцюга (цитохромоксидазою) з віком тварин знижується. Зокрема, відсоток реалізованого кисню за рахунок азидчутливої компоненти від загальної кількості спожитого акцептора електронів у плодів та молодняку складає 44,2 % та 45,4 %, а у корів тільки 21,2 %. Отже, у корів, порівняно із плодами та молодняком, синтез АТФ мітохондріями довгастого мозку знижений, оскільки потік електронів від НАД-залежної ланки до термінальної зменшений і не відбувається ресинтез макроерга у ділянці дихального ланцюга, яка представлена цитохромами.

Поряд із зниженням ендогеннного споживання кисню, із віком зростав відсоток азидрезистентного (немітохондрійного) споживання кисню у мітохондріях довгастого мозку. У плодів відсоток немітохондрійного споживання кисню є низьким (26,2 %). Він дещо вищий у молодняку (27,2 %) і максимальний у корів (31,9 %). Таким чином, з віком зростають окисні процеси не повязані з синтезом АТФ, що може бути зумовлено процесами перекисного окиснення ліпідів у структурах органел. Отримані дані узгоджуються з дослідженнями, в яких при вивченні активності мітохондрійного дихання, окремих ланок дихального ланцюга виявлено із збільшенням віку утворення активних форм кисню ($O_2^{\cdot-}$, OH^-, H_2O_2) в процесі ресинтезу АТФ, порушення проникності мембран мітохондрій, пошкодження мДНК і ДНК ядра клітин, утворення ізоформ білків [10, 11, 12].

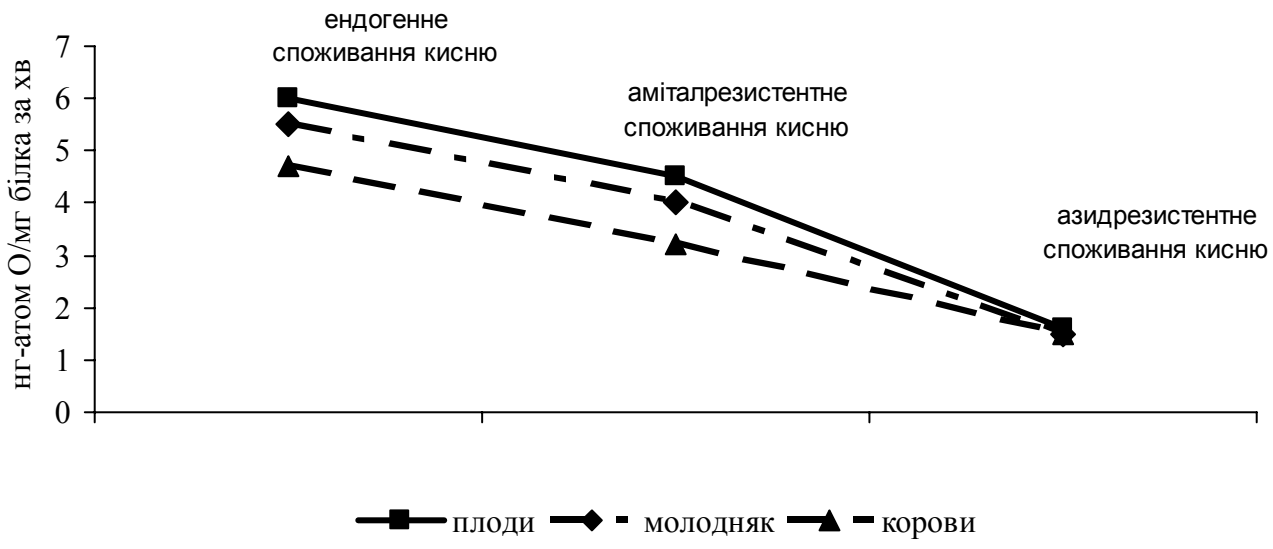

Рис. **Дихальна активність мітохондрій довгастого мозку великої рогатої худоби**

При вивченні вмісту гідроперекисів ліпідів у довгастому мозку виявлено, що у плодів їх вміст є низьким (18,8±1,52 Е 480/мл). У постнатальний період їх кількість зростає у молодняку до 26,1±2,79 Е480/мл ($p<0,01$), а у корів - до 30,9±1,76 Е480/мл ($p<0,001$; табл.).

Подібно до змін гідроперекисів ліпідів у довгастому мозку зростала концентрація малонового діальдегіду. Вміст його, порівняно з плодами (48,8±3,56 нмоль/мл), зростав у молодняку на 33,7 % ($p<0,001$), а у корів - на 35,7 % ($p<0,001$). Отже, з віком у тканині мозку великої рогатої худоби посилюються процеси перекисного окиснення ліпідів та нагромаджуються їх продукти. Такі зміни можуть бути обумовлені структурними компонентами клітин мозку, зокрема фосфоліпідами, у складі яких із віком тварин зменшується вміст насичених і мононенасичених жирних кислот та збільшується поліненасичених жирних кислот [13].

При вивченні вмісту білків зони пріон-протеїна було встановлено подібні зміни (табл.). Так, у плодів кількість білків була високою (14,1±2,82 %), у молодняку та у корів знижувалася (3,4 % і 6,8 %; $p<0,05$). Оскільки в склад зони білків 27-35 кДа входить пріон-протеїн – мідь-зв'язуючий сіалоглікопротеїд з СОД-подібною дією, який підвищує стійкість клітин до дії вільних радикалів кисню та інтоксикації міддю [14, 15], то можна припустити, що з віком тварин знижується антиоксидантний захист.

Таблиця

Показники окисного метаболізму довгастого мозку в зв'язку із віком великої рогатої худоби (M+m)

Групи тварин	n	Гідроперекиси, Е480/мл	Малоновий діальдегід, нмоль/мл	Вміст білків зони пріон-протеїна, %
Плоди	5	18,8±1,52	48,8±3,56	14,1±2,82
Молодняк	3	26,1±2,79**	73,6±3,10**	10,7±2,59

Корови	7	30,9±1,76***	75,8±2,46***	7,3±1,57*

Примітка. Різниця статистично вірогідна порівнянно до плодів *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Отже, у клінічно здорових корів, порівняно з молодняком та плодами, у довгастому мозку при пониженій дихальній активності мітохондрій, високій активності у НАД-залежній та низькій у термінальній ланках ланцюга дихання, зростає немітохондрійне споживанням кисню, яке на фоні низького вмісту білків зони пріон-протеїна (27-35 кДа) супроводжується зростанням продуктів перекисного окиснення ліпідів (гідроперекисів ліпідів та малонового діальдегіда). Такі зміни метаболізму можуть спричиняти мутації та помилки у синтезі пріонного білка з утворенням патологічного пріона, який викликає трансмісивні губчастоподібні енцефалопатії. Водночас виявлена залежність між показниками окисних процесів у довгастому мозку великої рогатої худоби в зв'язку із віком тварин, що може свідчити про схильність повновікових корів до розвитку енцефалопатій.

Висновки

1. Дихальна активність мітохондрій та реалізація електронів у дихальному ланцюзі термінальною ланкою (цитохромоксидазою) знижується з віком тварин.
2. Вміст продуктів ПОЛ (гідроперекисів ліпідів і малонового діальдегіду) у довгастому мозку великої рогатої худоби зростає з віком, водночас кількість білків зони пріон-протеїна знижується.
3. Зниження дихальної активності мітохондрій, зростання немітохондрійних процесів, зменшення вмісту білків зони пріон-протеїна, які володіють антиоксидантними властивостями, а також накопичення продуктів ПОЛ у довгастому мозку може спричинити порушення синтезу білків з утворенням патологічного пріона.

V. V. Vlizlo, D. D. Ostapiv, A. Z. Pylypets, I. M. Petrukh

OXIDATIVE METABOLISM IN CATTLE PROLATE BRAIN IN CONNECTION WITH AGE

S u m m a r y

The data on mitochondria endogenous oxygen consumption, lipid peroxidation (lipid hydroperoxides, malone dialdehyd) and prion-protein zone proteins in prolate brain of cattle in natal and postnatal period have beed represented. Decrease in mitochondria respiratory activity and maintenance of prion-protein zone proteins and increase in lipid peroxidation products level in the brain of 4-7-year-old cows compared to saplings (12-15 mon.) and cattle embrio have been detected, which can determine propensity of full age cows to bovine spongioform encephalopathy development.

The Institute of Animal Biology of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

1. Prionen und Prionkrankheiten. / hrsg. Von Beat Hoernlimann. – Berlin; New York: de Gruyter, 2001. – 602 s.
2. *Вербицький П. І.* Губчастоподібна енцефалопатія великої рогатої худоби та інші пріонні інфекції. Київ: Ветінформ, 2005, - 238 с.
3. Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. / O. Milhavet, H. E. Mc Mahon, W. Rachidi et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000. –V. 97. –P. 13937–13942.
4. *Melov S., Schneider J. A., Day B. J.* A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. // Nat. Genet. – 1998. – V. 18. -P. 159-163.
5. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. / M. Y. Aksenov, M. V. Aksenova, D. A. Butterfield et al. // Neuroscience. -2001. –V. 103 (2). -P. 373 -83.
6. *Floyd R. A.* Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. // Proc. Soc. Exper. Bio. Med. -1999. –V. 222. –P. 236 -245.
7. Halliwell B. Reactive oxygen species the central nervous system. // J. Neurochem.- 1992.- V.59.- № 5.- P.1609-1623.
8. *Lenaz G.* Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. - V.1366. – P. 53 -67.

9. Довідник: Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. / Відпов. редак. В. В. Влізло. – Львів, 2004. – 399 с.
10. *Wei Yau-Huei, Lee Hsin-Chen.* Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Impairment of Antioxidant Enzymes in Aging1. // Experimental Biology and Medicine. -2002. –V. 227. – P. 671-682.
11. *Jacobson J., Duchen M. R.* Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes — requirement for stored Ca2+ and sustained opening of the permeability transition pore. // J. Cell Sci. – 2002. – V. 115. – P. 1175-1188.
12. *Trifunovic A., Hansson A., Wredenberg A*. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. -2005. - V. 102 (50). – P. 17993–17998.
13. *Янович В. Г., Лагодюк П. З.* Обмен липидов у животных в онтогенезе.- М.: Агропромиздат, 1991.- 317 с.
14. *Brown D. R., Schmidt B., Kretzschmar H. A.* Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. // J. Neurochem. - 1998. –V. 70 - P.1686–1693.
15. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. / D. R. Brown, W. J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt, H. A. Kretzschmar // Exp. Neurol. – 1997. – 146. - P. 104–112.