

## ОКИСНО-ВІДНОВНІ ПРОЦЕСИ У ТКАНИНАХ МИШЕЙ ПРИ ЗГОДОВУВАННІ ЇМ МОЗКУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

*В. В. Влізло, Д. Д. Остапів, І. М. Петрух, А. З. Пилипець, А. О. Кульбачна*

Інститут біології тварин УААН, м. Львів

*Додавання до раціону мишей головного мозку великої рогатої худоби, який є тканиною особливого ризику щодо губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби, спричиняє гальмування дихальної активності мітохондрій та зростання продуктів перекисного окиснення ліпідів у організмі. Поїдання мишами тваринних тканин приводило до зростання активності СОД та вмісту пріон-протеїна у мозку мишей і зниження у селезінці та стінці кишечника. Зменшення активності СОД та вмісту пріон-протеїна стимулює процеси вільно радикального окиснення структур тканин і може бути передумовою розвитку нейродегенеративних процесів.*

**Ключові слова:** ЛАБОРАТОРНІ ТВАРИНИ, МАЛОНОВИЙ ДІАЛЬДЕГІД, ГУБЧАСТОПОДІБНА ЕНЦЕФАЛОПАТІЯ, МІТОХОНДРІЇ, ПРИОН, СОД, ГІДРОПЕРЕКИСІ ЛПІДІВ.

На сьогоднішній день до кінця нез'ясована функція клітинного (фізіологічного; PrP<sup>C</sup>) пріона в організмі. Відомо, що пріони проявляють супероксиддисмутазну дію, підвищують стійкість клітин проти дії вільних радикалів кисню та інтоксикації міддю. Нейрони мишей з нульовою експресією гену PrP<sup>C</sup> (Prnp<sup>0/0</sup>), порівняно з тваринами дикого типу, мають пониженою активність Cu/Zn-СОД, більш чутливі до активних форм кисню та надлишку міді, а метаболічні зміни і дефекти в мітохондріях характерні для патологій, що розвиваються в тканинах при спонгіформних енцефалопатіях [6, 9, 10]. При цьому, миші *sod2*-нулізиготи гинуть передчасно. Отже, причиною розвитку нейродегенеративних процесів в органах мишей можуть бути зміни, які обумовлені зміщенням окисно-відновної рівноваги в бік зростання окисних процесів. Це сприяє утворенню активних форм кисню, зниженню вмісту природних антиоксидантів та активності ферментів антиоксидантного захисту [8, 12]. За цих умов, можливі пошкодження та модифікація ДНК, мембран клітин та органел, що спричиняє зміни енергогенеруючої та синтетичної активності клітин і утворення ізоформ білків [11], виникнення патологічних пріонів. Підставою для такого припущення стало встановлення збудника GE ВРХ, який є модифікованою формою фізіологічного пріона [7]. У зв'язку з цим, становить інтерес дослідження впливу посилення перекисного окиснення ліпідів в організмі мишей на вміст пріонів у різних органах і тканинах. З метою вивчення цього питання мишам згодовували мозок великої рогатої худоби, який характеризується високим вмістом поліненасичених жирних кислот (докозапентоєнової, докозагексоєнової), які ініціюють перекисне окиснення і визначають вміст продуктів ПОЛ, активність антиоксидантних ферментів у ряді органів і тканин — печінці, селезінці, стінці кишечника.

### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували зразки головного мозку, селезінки і стінки кишечника білих безпородних мишей, яких утримували в стандартних умовах віварію. Тварин розділили на дві групи — контрольну (n=5), якій згодовували стандартний раціон та дослідну (n=6), якій згодовували той самий раціон з добавкою головного мозку великої рогатої худоби в кількості 50 мг/гол. Дослід тривав 270 діб.

Після ефірного наркозу тварин декапітували і відбирали мозок, селезінку та тонкий відділ кишечника. Для дослідження кисеньзалежних процесів досліджуваних органів виділяли мітохондрії (процедуру виділення проводили при температурі 0–4 °С). Тканини гомогенізували у середовищі виділення, яке містило (ммоль/л): сахарозу — 280; тріс-НСІ — 10 (рН 7,4); ЕДТА — 1. Інкубаційне середовище мало такий само склад, за виключенням

ЕДТА, яка була відсутня. Інтенсивність дихання мітохондрій досліджували полярографічно (нг-атом О/мг білка за хв) при температурі 37 °С [2]. Для встановлення азидрезистентного споживання кисню інгібували термінальну ланку дихального ланцюга (цитохромоксидазу) — азидом натрію ( $10^{-2}$  М).

Електрофорез білків тканин проводили в 12,5 % ДСН — ПААГ. Ідентифікували окремі білки за допомогою стандартного набору білків-маркерів з молекулярною масою (ММ): 94,0; 66,2; 45,0; 31,0; 21,5; 14,4 кДа. Після електрофорезу у 12,5 % ДСН — ПААГ і препаративного імуноелектрофорезу пріон ідентифікували на фореграмах шляхом використання моноклональними антитілами 6Н4 і антимишиним імуноглобуліном-АР. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі, а також визначали вміст гідроперекисів ліпідів, малонового діальдегіду та активність супероксиддисмутази [3].

## Результати й обговорення

Проведені дослідження показали, що швидкість поглинання кисню мітохондріями мозку мишей контрольної групи становила  $0,17 \pm 0,07$  нг-атом О/мг білка за хв, мітохондріями селезінки —  $0,14 \pm 0,04$ , мітохондріями кишечника —  $0,13 \pm 0,08$  (рис. 1).

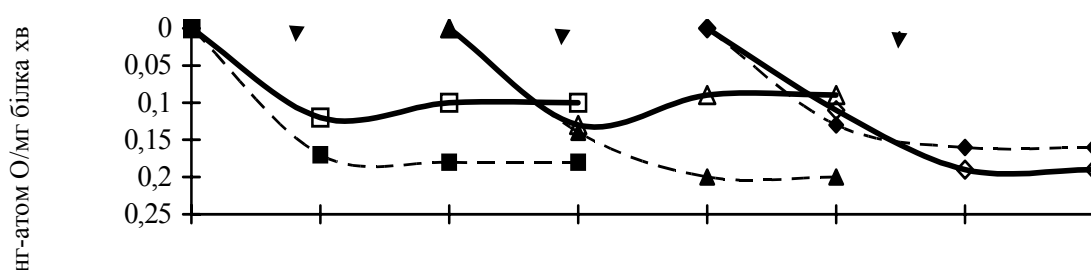


Рис. 1. Споживання кисню мітохондріями органів мишей при дії азиду натрію: мозок — ■ — контроль, □ — дослід; селезінка — ▲ — контроль, △ — дослід; кишечник — ◆ — контроль, ◇ — дослід; — додавання азиду натрію

При згодовуванні мишам дослідної групи мозку великої рогатої худоби поглинання кисню мітохондріями всіх органів зменшувалося: у мозку на 29,5 % ( $0,12 \pm 0,03$  нг-атом О/мг білка за хв), у селезінці — на 21,5 % ( $0,11 \pm 0,02$  нг-атом О/мг білка за хв), у кишечнику — на 15,4 % ( $0,11 \pm 0,04$  нг-атом О/мг білка за хв). З цих даних видно, що згодовування тканини мозку великої рогатої худоби мишам призводить до гальмування дихальної активності мітохондрій досліджуваних органів і, відповідно, синтезу АТФ. Азидрезистентне дихання характеризує окисні процеси не зв'язані з синтезом АТФ у дихальному ланцюзі мітохондрій і вільнорадикальне окиснення структур в мітохондріях. У мітохондріях мозку мишей контрольної групи тварин, під впливом інгібітора, зменшується поглинання кисню до його повної зупинки ( $0,01 \pm 0,002$  нг-атом О/мг білка за хв.), а в селезінці та кишечнику вона становила  $0,06 \pm 0,02$  і  $0,03 \pm 0,02$  нг-атом О/мг білка за хв. У тварин дослідної групи при додаванні азиду натрію, мітохондрії мозку і селезінки генерували кисень, що характерно для процесів вільнорадикального окиснення із утворення активних форм кисню. Ступінь генерації кисню у мітохондріях мозку становив  $0,02 \pm 0,004$  нг-атом О/мг білка за хв, у мітохондріях селезінки —  $0,04 \pm 0,01$ , у мітохондріях кишечника —  $0,08 \pm 0,05$ . Загалом різниця у азидрезистентному споживанні кисню мітохондріями мозку становила  $0,03$  нг-атом О/мг білка за хв ( $p < 0,001$ ), мітохондріями селезінки —  $0,10$  ( $p < 0,001$ ) та мітохондріями кишечника —  $0,05$  нг-атом О/мг білка за хв. Отже, згодовування мишам тканини мозку великої рогатої худоби спричиняє зниження дихальної активності мітохондрій, зокрема, їх енергогенеруючої частки, а також вірогідне зростання окисних процесів, що є характерним для змін дихальної активності органел в тканинах тварин при старінні [1, 4].

Для встановлення причин зростання азидрезистентного дихання в досліджуваних органах мишей при згодовуванні мозку визначали активність супероксиддисмутази та вміст пріон-протеїна, який має СОД — подібні властивості. Активність СОД у досліджуваних органах мишей контрольної групи становила: в мозку —  $13,0 \pm 2,35$ , селезінці —  $19,8 \pm 3,11$ , кишечнику —  $12,7 \pm 2,48$  у.о./мг білка за хв (рис. 2).

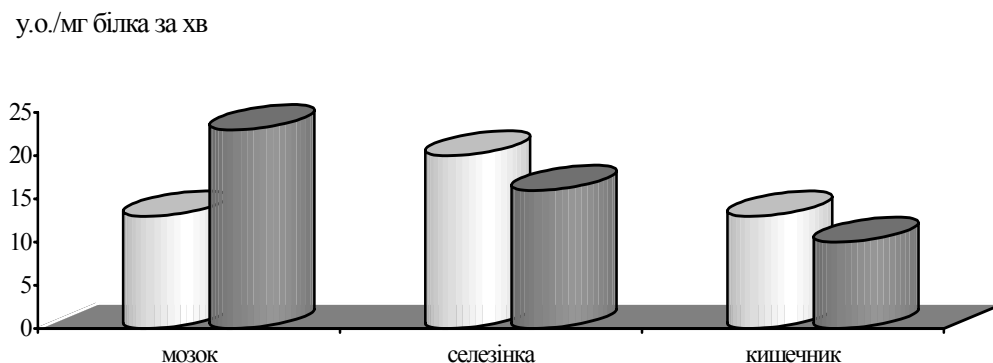


Рис. 2. Активність СОД в мітохондріях органів і тканин мишей при згодовуванні тканини мозку великої рогатої худоби: □ — контроль, ■ — дослід

Тривале згодовування мишам мозку великої рогатої худоби неоднаково впливало на активність супероксиддисмутази. У мітохондрійній фракції тканини головного мозку дослідних тварин, порівняно до контролю, виявлено зростання активності СОД на 76,9 % (із  $13,0 \pm 2,35$  до  $23,0 \pm 5,24$  у.о./мг білка за хв), тоді як у селезінці активність ферменту знизилась на 20,8 % (із  $19,8 \pm 3,11$  до  $15,7 \pm 2,87$  у.о./мг білка за хв), у тонкому відділі кишечнику — на 19,7 % (із  $12,7 \pm 2,48$  до  $10,2 \pm 2,33$  у.о./мг білка за хв). З цих даних випливає, що згодовування мозку великої рогатої худоби мишам гальмує активність СОД у мітохондріях кишечника і селезінки та підвищує її у мітохондріях мозку.

Отже, тенденція до зниження активності СОД та вірогідне зростання азидрезистентного дихання в мітохондріях досліджуваних органів мишей свідчить про нагромадження активних форм кисню при згодовуванні мозку великої рогатої худоби. Відомо, що такі зміни метаболізму характеризують пошкодження мембран і органел, зокрема мітохондрій, які можуть викликати мутації ДНК мітохондрій і ядра та впливати на утворення фізіологічного пріона. Зростання активності ферменту у мітохондріальній фракції головного мозку мишей свідчить про високу адаптивно-захисну здатність цього органу до елімінації активних форм кисню при згодовуванні їм мозку великої рогатої худоби.

Зважаючи на те, що пріон-протеїн має СОД-подібну дію проведено визначення його вмісту в тканинах мишей. При цьому виявлено, що згодовування мозку великої рогатої худоби мишам викликає зміни вмісту пріон-протеїну в досліджуваних органах. Так, його вміст зріс на 9,3 % (із  $9,8 \pm 1,63$  до  $10,8 \pm 0,67$  мг білка/г сирової тканини) у мозку тварин дослідної групи, порівняно з контрольною (рис. 3.).

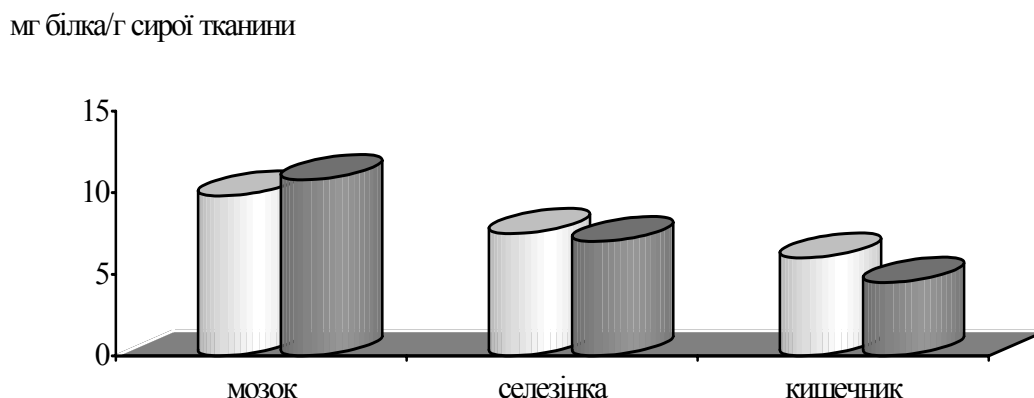


Рис. 3. Вміст пріон-протеїна у органах піддослідних мишей: □ - контроль, ■ - дослід

У кишечнику та селезінці, навпаки, вміст пріона у тварин дослідної групи знижувався на 25,0 % (із  $6,0 \pm 0,87$  до  $4,5 \pm 0,83$  мг білка/г сирової тканини) та 6,7 % (із  $7,5 \pm 0,53$  до  $7,0 \pm 0,62$  мг білка/г сирової тканини), відповідно. Отже, у тварин, яким згодовували мозок великої рогатої худоби, знижується синтез пріон-протеїну.

При вивченні вмісту гідроперекисів ліпідів у досліджуваних органах мишей встановлено, що кількість їх в стінці кишечнику тварин дослідної групи зростає на 41,7 % (із  $38,9 \pm 6,10$  до  $66,2 \pm 7,90$  E<sub>480</sub>/мл,  $p < 0,02$ ), у селезінці — на 30,1 % (із  $247,5 \pm 112,21$  до  $353,5 \pm 4,92$  E<sub>480</sub>/мл), тоді як у мозку знижується на 30,3 % (із  $149,0 \pm 81,47$  до  $104,0 \pm 8,02$  E<sub>480</sub>/мл. рис. 4.).

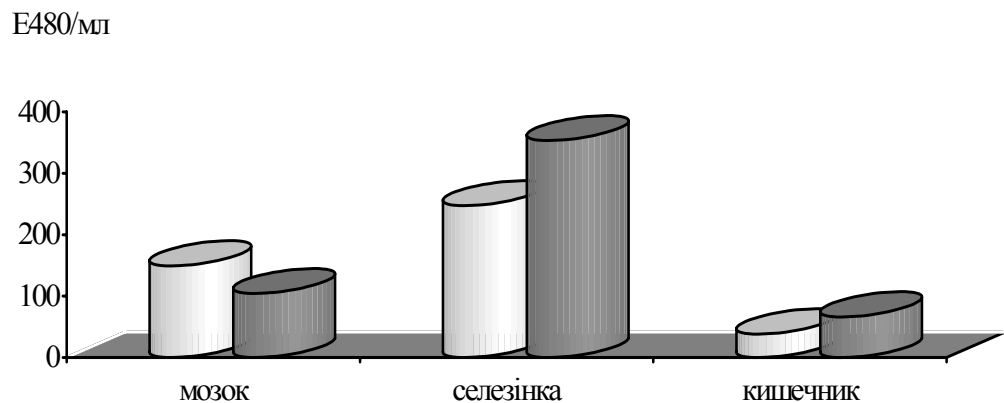


Рис. 4. Вміст гідроперекисів ліпідів у органах піддослідних мишей:

□ — контроль, ■ — дослід

Встановлено збільшення вмісту малонового діальдегіду у селезінці на 73,3 % (із  $10,4 \pm 3,30$  до  $28,3 \pm 5,55$  нмоль/мл,  $p < 0,02$ ); у стінці кишечнику — на 22,5 % (із  $3,5 \pm 0,88$  до  $4,0 \pm 1,62$  нмоль/мл) та зниження в мозку на 22,7 % (із  $5,3 \pm 2,20$  до  $4,1 \pm 0,39$  нмоль/мл.; рис. 5.).

нмоль/мл

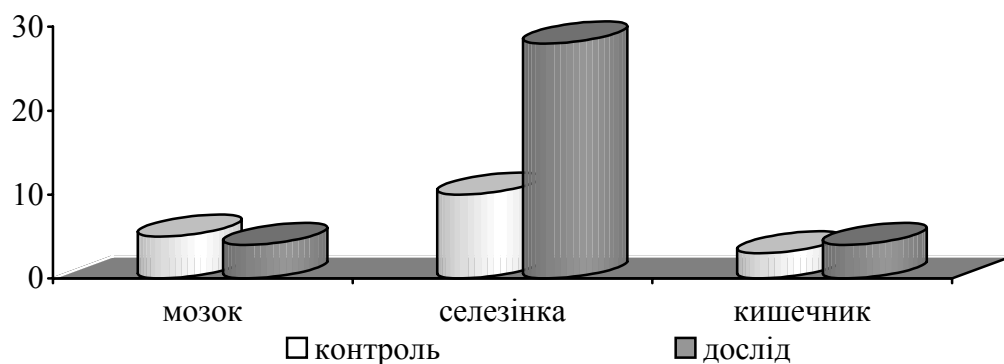


Рис. 5. Вміст малонового діальдегіду у органах піддослідних мишей:

□ — контроль, ■ — дослід

Отже, зниження активності СОД та вмісту пріона в органах мишей дослідних груп призводить до стимулювання процесів вільнорадикального окиснення ліпідів у мембранах мітохондрій, зростання азид-резистентного дихання та збільшенням утворення продуктів ПОЛ у тканинах дослідних тварин. Отримані результати узгоджуються із даними про каталітичну СОД-активність PrP<sup>C</sup> [5]. Як свідчать результати досліджень, стимулюючим фактором вільнорадикального окиснення була добавка до раціону мишей головного мозку великої рогатої худоби, який характеризується високим вмістом поліненасичених жирних кислот, які ініціюють перекисне окиснення ліпідів.

## Висновки

Додавання до раціону мишей головного мозку великої рогатої худоби, який містить значну кількість пріона та характеризується високим вмістом поліненасичених жирних кислот, спричиняє гальмування дихальної активності мітохондрій. При цьому, активність СОД та вмісту пріон-протеїна у мозку мишей зростає, а в селезінці та стінці кишечника — знижується. Зменшення активності СОД та вмісту пріон-протеїна стимулює процеси вільнорадикального окиснення в мітохондріях органів мишей, і може бути передумовою розвитку нейродегенеративних процесів.

*V. V. Vlizlo, D. D. Ostapiv, A. Z. Pylypets, I. M. Petruch, A. O. Kulbachna*

## REDOX PROCESSES IN ORGANS AND TISSUES OF MICE UNDER THE FEEDING OF BRAIN

### Summary

The addition to the mice ratio of the cattle brain — the tissue of high risk concerning to bovine spongiform encephalopathy, inhibits the respiratory activity of mitochondria, the synthesis of ATP and the increase of oxidative processes in organism. The animal tissue caused the increase of superoxide dismutase activity and the content of prion-protein in the mice brain and decrease of these indices in spleen and intestine. The diminution of SOD activity and the prion-protein content stimulates the processes of free radical oxidation of tissue structures and may be a precondition for development of neurodegenerative processes.

Institute of Animal Biology, UAAS

1. Дихальна активність мітохондрій довгастого мозку в пре- та постнатальні періоди розвитку великої рогатої худоби / В. В. Влізло, В. В. Каплінський, Д. Д. Остапів та ін. // Матеріали міжн. конф., присвяченої пам'яті проф. Шостаковської І. В. — Львів, 2002. — С. 94.
2. Практикум по біохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. — М: МГУ, 1989. — 509 с.
3. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині // Під ред. В. В. Влізла, Р. С. Федорука, І. А. Макара та ін. — Львів, 2004. — 399 с.
4. *Behl C.* Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches // *Prog. Neurobiol.* — 1999. — V. 57. — P. 301–323.
5. Consequences of manganese replacement of cooper for prion protein function and proteinase resistance / D. R. Brown, F. Hafiz, L. L. Glassmith et al. // *EMBO J.* — 2000. — V. 19. — N. 6. — P. 1180–1186.
6. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase / Y. Li, T. T. Huang, E. J. Carlson et al. // *Nat. Genet.* — 1995. — V. 11. — P. 376–381.
7. Immunologic and molekular biologic studies of prion protein in bovine spongiform encephalopathy / S. B. Prusiner et al. // *J. Infect. Dis.* — 1993. — V. 167. — P. 602–613.
8. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. / Schapira A. H., Cooper J. M., Dexter D. et al. // *Lancet.* — 1989. — V. 1. — P. 1269.
9. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice / S. Melov, P. Coskun, M. P. Tuinstra et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — V. 96. — P. 846–851.
10. *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.
11. 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.
12. Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation / Taylor E. R., Hurrell F., Shannon R. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2003. — V. 278. — P. 19603–19610.