

ФІЗІОЛОГІЧНИЙ ПРІОН І АКТИВНІСТЬ Na^+ , K^+ - ТА Ca^{2+} -АТРАЗ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ КЛІТИН ДОВГАСТОГО МОЗКУ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

М. В. КУШКЕВИЧ, В. В. ВЛІЗЛО, Ю. В. МАРТИН

Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: m_kushkevych@ukr.net

На основі результатів імуногістохімічного аналізу тканини довгастого мозку щурів показано локалізацію фізіологічного пріона. У щурів одномісячного віку він розміщений в сірій речовині поблизу тіл нейронів та мікрогліоцитів, а в тварин шести- та тридцятимісячного віку – в ядрі оливи та тілах висхідного тракту. Фізіологічний пріон локалізований вздовж нервових відростків та відсутній в тілах нейронів. У довгастому мозку тварин віком шість місяців його кількість є найбільшою порівняно з тваринами іншого віку. Активність АТРАз плазматичної мембрани в цій тканині зменшується з віком, вміст іонів натрію та кальцію зростає, а калію – майже не змінюється.

Ключові слова: довгастий мозок, фізіологічний пріон, Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} -АТРАзи, іони натрію, калію та кальцію.

У кінці ХХ століття були відкриті пріони – збудники багатьох нейродегенеративних захворювань, під час розвитку яких відбуваються губкоподібні зміни тканин органів центральної нервової системи [1], що є несумісними з життям. Пріонні інфекції, або трансмісивні спонгіоформні енцефалопатії (ТСЕ), реєструються у тварин і в людей [2]. Серед таких захворювань передусім виділяють хворобу Крейтцфельда–Якоба (ХКЯ) [3], клінічна картина якої представлена швидко прогресуючим слабоумством, міоклонусом і помітними порушеннями рухів, що, як правило, впродовж декількох місяців спричинює смерть [4]. На відміну від усіх відомих пріонопатій, для ХКЯ характерно, що у 85% випадків вона виникає спорадично, переважно в людей старшого віку (40–69 років), в 10–15% випадків – спадково і менш ніж в 1–5% випадків – інфекційно, тобто внаслідок зовнішнього зараження, обумовленого медичними маніпуляціями [2].

У патогенезі пріонних інфекцій важливу роль відіграє не лише патологічний пріон (PrP^{Sc}), а й фізіологічний (PrP^{C}), що є субстратом для перетворення PrP^{Sc} у разі інфекції [5]. Трансформація фізіологічного пріона у патологічний відбувається після їх контакту, а полімеризація утворених молекул PrP^{Sc} забезпечує його саморепродукцію й утворення амілоїдів в уражених нервових клітинах, виникнення вакуолей та відмирання їх [1, 6].

Незважаючи на велику кількість результатів у вивченні пріонних протеїнів, роль PrP^{C} в живому організмі до кінця невідома. Цей протеїн є еволюційно консервативним, оскільки виявлений в багатьох ссавців, птахів і навіть нижчих евкаріотів [7]. Він відіграє важливу роль у життєдіяльності організму: бере участь у транспортуванні іонів крізь мембрану, передачі нервових імпульсів між закінченнями нервових волокон, сприяє збереженню стійкості нейронів і клітин глії до окислювального стресу, залучений у процеси регуляції вмісту внутрішньоклітинного кальцію в нейронах, підтримує циркадні ритми в організмі. Фізіологічний пріон є сіалоглікопротеїном, який розміщений на поверхні клітинної мембрани [8, 9]. Проте дані про тканинну локалізацію фізіологічного пріона та його вміст в організмі залежно від віку відсутні.

Метою нашої роботи було вивчити локалізацію та вміст фізіологічного пріона, а також активність Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} -АТРАзи плазматичної мембрани і вміст іонів натрію, калію та кальцію в головному мозку щурів різного віку.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на самцях лабораторних щурів *Rattus norvegicus var. alba*, лінії Wistar, яких утримували в стандартних умовах віварію. Тварин віком один, шість та тридцять

місяців декапітували під ефірним наркозом і відбирали довгастий мозок для досліджень.

Маніпуляції із тваринами проводили з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і ухвали «Першого національного конгресу з біоетики» (Київ, 2001).

Для імуногістохімічних досліджень фіксування тканини, промивання, зневоднення та формування парафінових блоків проводили за стандартною методикою [10].

Зрізи товщиною 7 мкм нарізали на мікротомі Microm HM 340E. Антиген активували за впливу мікрохвильового випромінювання у середовищі 10 мМ цитратного буфера, рН 6,0. Блокували ендогенну лужну фосфатазу 0,3 н НСІ.

Зрізи промивали у TBST, рН 7,6 (0,05 М трис, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, H₂O). У подальшому їх інкубували з моноклональними первинними антитілами (*Antibody mAB6H4*; Prionics, Швейцарія) при +4 °С впродовж 12 год. Використовували набір реактивів для імуногістохімії фірми Dako (Данія), який містив полімер-імуноглобуліновий комплекс (Rabbit mouse link), полімер-ензимний комплекс (AP Enzyme), субстратний буфер та хромоген (Permanent Red). Після промивання зрізи фарбували гематоксиліном Майєра та поміщали в середовище «Aqueous permanent mounting medium» (Dako, Данія). Гістологічні дослідження проводили на мікроскопі Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина). Контрольними вважали зрізи тканин, зафарбовані лише гематоксиліном.

Визначення кількості фізіологічного пріона на гістопрепаратах проводили методом оцифрування фотографій тканин однакового збільшення, використовуючи програму ВідеоТест 5.0 [11].

Проводили дот-блотинг аналіз. Для цього тканину спочатку лізували у спеціальному буфері (10%-й N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилмалеїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері, рН 7,4 з додаванням 0,001% суміші інгібіторів протеїназ) (Sigma, Німеччина) та центрифугували. У лізатах об'ємом 0,4 мл визначали концентрацію протеїну методом Лоурі [12]. Зразки з однаковою концентрацією протеїну наносили на полівінілдіфторидну (PVDF) мембрану (Millipore, США), яку інкубували з моноклональними первинними антитілами (*Antibody mAB6H4*; Prionics, Швейцарія) при 4 °С впродовж 12 год,

поліклональними вторинними козячими антимишиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, Німеччина) при 22 °С впродовж 60 хв. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням субстрату для лужної фосфатази — CDP-Star (Tropix, Велика Британія). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки Retina XBM (Лізоформ медікал, Україна) та набору для проявлення плівок (Kodak, Японія) [10].

Для визначення активності Na⁺,K⁺- та Ca²⁺-АТРази зразки тканини гомогенізували протягом 1–2 хв на гомогенізаторі Omni GLH-220 у середовищі сахарози. Після повторного центрифугування отримували мембранну фракцію тканин [13, 14], в якій визначали досліджувані показники.

Активність ензимів визначали в інкубаційному середовищі. Мітохондріальну АТРази блокували 1 мМ NaN₃. Активність Na⁺,K⁺-АТРази розраховували за різницею між активністю загальної та убаїннечутливої, яку визначали в середовищі з 1 мМ убаїну (Sigma, Німеччина). Активність Ca²⁺-АТРази плазматичної мембрани розраховували за різницею між активністю, яку визначали в середовищі 1 мкМ тапсигаргіну (Sigma, Німеччина) за наявності та відсутності Ca²⁺. Мірою активності була концентрація P_i, яку виражали у мкмоль P_i/хв на 1 мг протеїну [15].

Вміст Na⁺ та K⁺ визначали у тканині з використанням комерційних наборів фірми Фелісіт-Діагностика (Україна) [16], а Ca²⁺ — за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра С-115М [10].

Для оцінки вірогідної різниці між статистичними характеристиками альтернативних сукупностей даних вираховували коефіцієнт Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця за $P < 0,05$ – $0,001$ [17].

Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel та Origin.

Результати та обговорення

На одержаних гістозрізах тканини довгастого мозку тварин різного віку спостерігали зміни морфо-цитологічних характеристик. Нейрони молодих тварин мали округлу форму з розташованим у центрі великим ядром. Осміофільний матеріал рівномірно розподілений по каріоплазмі (рис. 1, а). Встановлено, що з віком відбувається збільшення довжини і ширини нейронів та їхніх ядер, що може бути спричинене ростом організму (рис. 2, а). Зі збільшенням віку тварин розміри

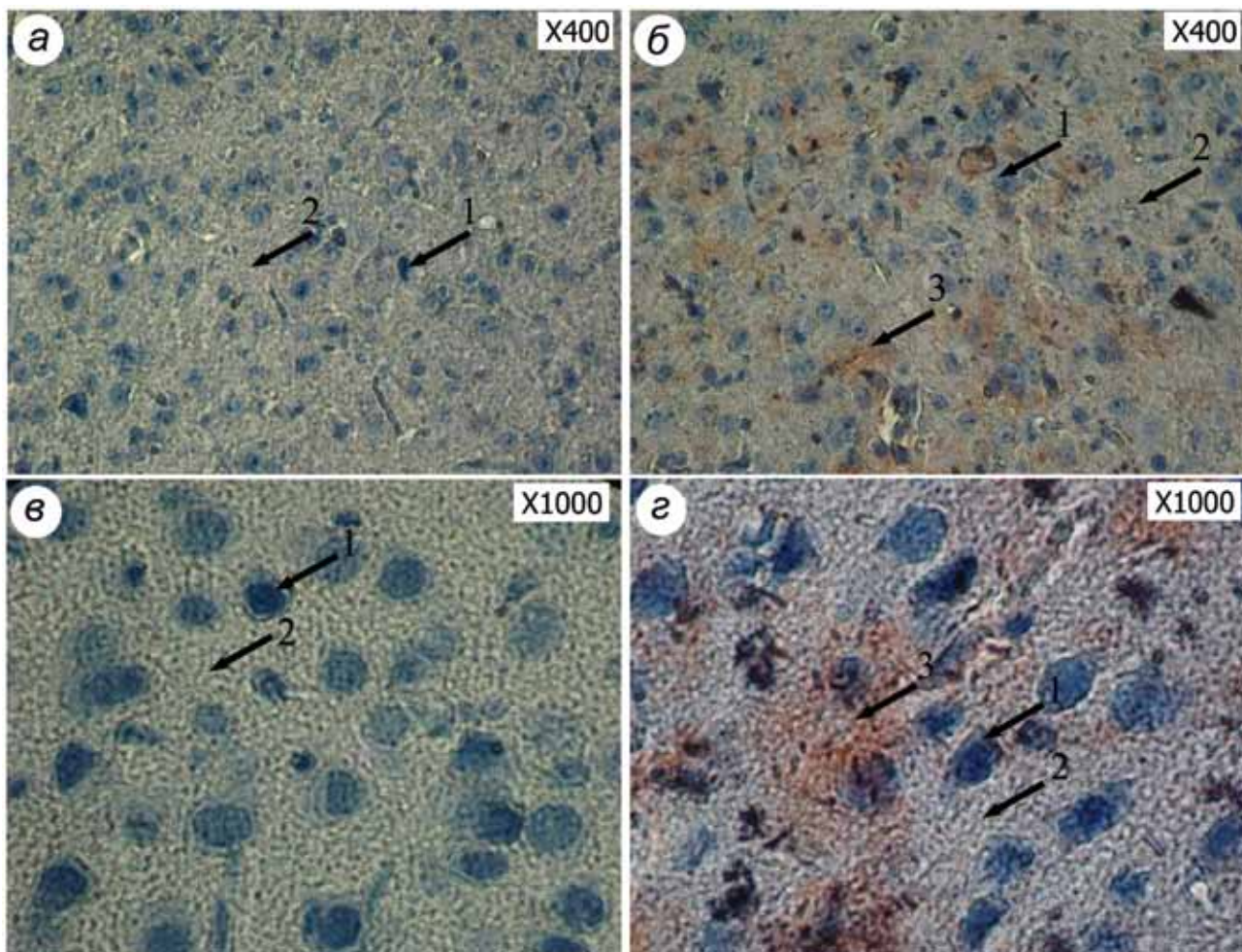


Рис. 1. Довгастий мозок щурів віком один місяць: а, в – контроль; б, г – імуногістохімія; 1 – ядро нейрона; 2 – нервеве волокно; 3 – фізіологічний пріон (зафарбований гематоксиліном)

та щільність нейронів зменшуються, що обумовлене їх загибеллю. Вони частково втрачають базофільну речовину, ядра ущільнюються, їхній контур стає нерівним. Периваскулярний простір навколо кровоносних судин розширюється (рис. 3, а).

Проведений імуногістохімічний аналіз довгастого мозку щурів різного віку дозволив встановити локалізацію та вміст фізіологічного пріона. Зокрема, у довгастому мозку одномісячних щурів фізіологічний пріон виявлено в сірій речовині поблизу тіл нейронів та мікроглоцитів (рис. 1, б). Під час проведення кількісного визначення PrP^C на оцифрованих мікрофотографіях встановлено $359,54 \pm 8,95$ ум. од. фізіологічного пріона в тканині молодих тварин.

У довгастому мозку тварин віком шість місяців фізіологічний пріон виявлено в ядрі оливи (рис. 2, б), нейрони якого беруть участь у координації рухів та підтриманні рівноваги.

Пріон наявний також у тілах висхідного тракту (рис. 2, в), який іде в напрямку від спинного мозку до мозочка [18]. На великому збільшенні помітно, що PrP^C локалізований уздовж нервових відростків та відсутній в тілах нейронів (рис. 2, г). У тканині довгастого мозку цих тварин кількість пріона є найбільшою порівняно з тваринами іншого віку ($525 \pm 4,76$ ум. од.).

У довгастому мозку тварин віком тридцять місяців фізіологічний пріон має подібну локалізацію, як і у шестимісячних (рис. 3), проте його кількість є істотно меншою ($232 \pm 8,51$ ум. од.).

Отже, з віком відбувається нагромадження фізіологічного пріона в ядрі оливи та висхідному тракті довгастого мозку щурів, а зі старінням організму його кількість загалом зменшується.

Вміст фізіологічного пріона в довгастому мозку щурів різного віку визначали також методом дот-блотинг аналізу. Як і в попередніх

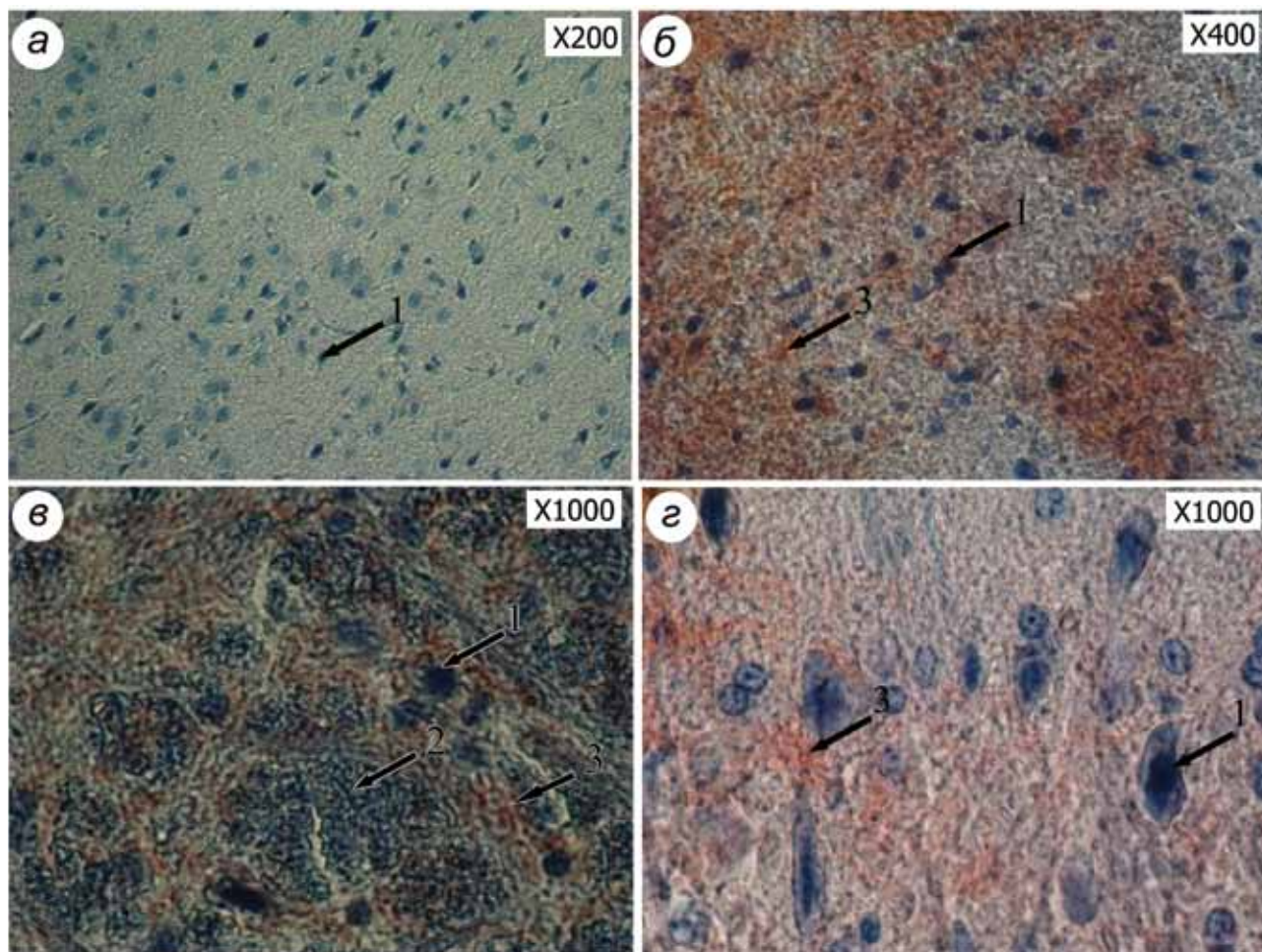


Рис. 2. Довгастий мозок щурів віком шість місяців: а – контроль; б, в, г – імуногістохімія; 1 – ядро нейрона; 2 – тіло висхідного тракту; 3 – фізіологічний пріон (зафарбований гематоксилином)

дослідженнях, його кількість зростала у тканині зрілих тварин (6 міс.) утричі порівняно з молодими (1 міс.). У тканині старших тварин (30 міс.) вміст фізіологічного пріона значно зменшився (на 54%) порівняно зі зрілими (рис. 4).

Подібні результати одержали М. Cuadrado-Tejedor і співавт. [19], проаналізувавши ділянку кори та гіпокампа головного мозку методом вестерн-блот аналізу. В обох ділянках кількість PrP^C збільшувалася в дорослих щурів (38 тижнів) порівняно з молодими (6 тижнів), а в старих тварин (56 тижнів) – зменшувалася. Крім того, з віком збільшувалася кількість неглікозильованої форми протеїну.

Оскільки фізіологічний пріон бере участь у різних процесах в організмі, зокрема залучений у транспортування іонів [5, 6], то на наступному етапі ми досліджували активність Na⁺,K⁺- та Ca²⁺-АТРази плазматичної мембрани і вміст відповідних іонів у довгастому

мозку щурів різного віку. Встановлено зниження активності досліджуваних ензимів зі збільшенням віку тварин. Зокрема, активність Na⁺,K⁺-АТРази зменшується відповідно на 26 та 60% у довгастому мозку тварин віком шість та тридцять місяців порівняно з одномісячними тваринами. У старших щурів активність Ca²⁺-АТРази плазматичної мембрани на 57% є нижчою порівняно з молодими (рис. 5, а).

Вміст Na⁺ у тканині довгастого мозку зрілих і старших тварин збільшується відповідно на 31–35% порівняно з молодими, тоді як калію – зменшується на 20%. Натомість вміст Ca²⁺ істотно збільшується (у 3 рази) в тканині старших тварин (рис. 5, б).

Отже, з віком вміст іонів натрію та кальцію зростає, а калію – майже не змінюється за умов зменшення активності Na⁺,K⁺- та Ca²⁺-АТРази плазматичної мембрани. Це, можливо, обумовлене тим, що з віком погіршується функція трансмембранної субодиниці обох

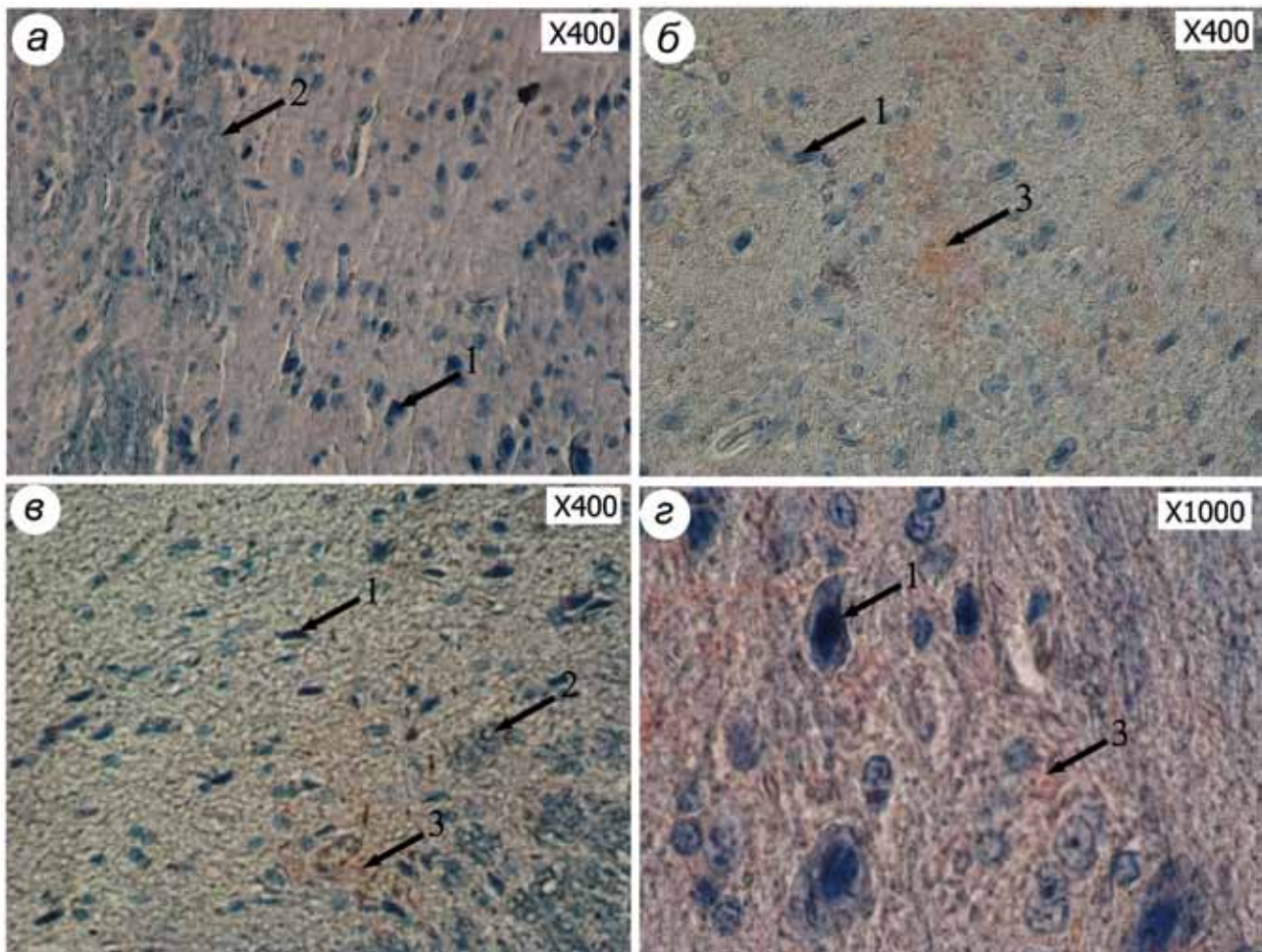


Рис. 3. Довгастий мозок щурів віком тридцять місяців: а – контроль; б–г – імуногістохімія; 1 – ядро нейрона; 2 – тіло висхідного тракту; 3 – фізіологічний пріон (зафарбований гематоксиліном)

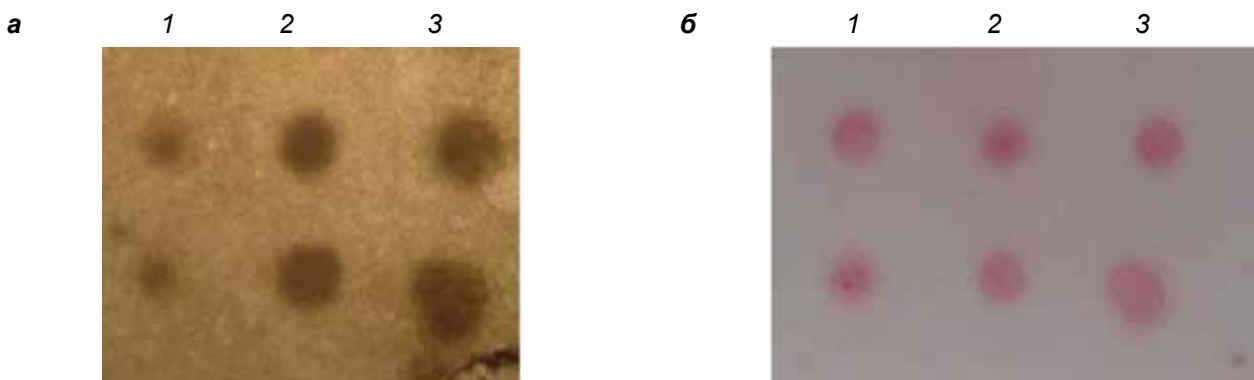


Рис. 4. Аналіз вмісту PrP^{Sc} у довгастому мозку щурів різного віку; а – дот-блотинг, б – вміст загального протеїну у зразках був однаковим (зафарбований понсо червоним): 1 – один; 2 – шість; 3 – тридцять місяців

ензимів, яка зв'язує іони та є чутливою до АТР, який є основним субстратом.

На основі одержаних даних ми дійшли висновку, що вміст фізіологічного пріона

зростає у тканині довгастого мозку щурів шестимісячного віку і спадає – у тварин віком тридцять місяців. Такі зміни, очевидно, впливають на активність мембранних АТРаз

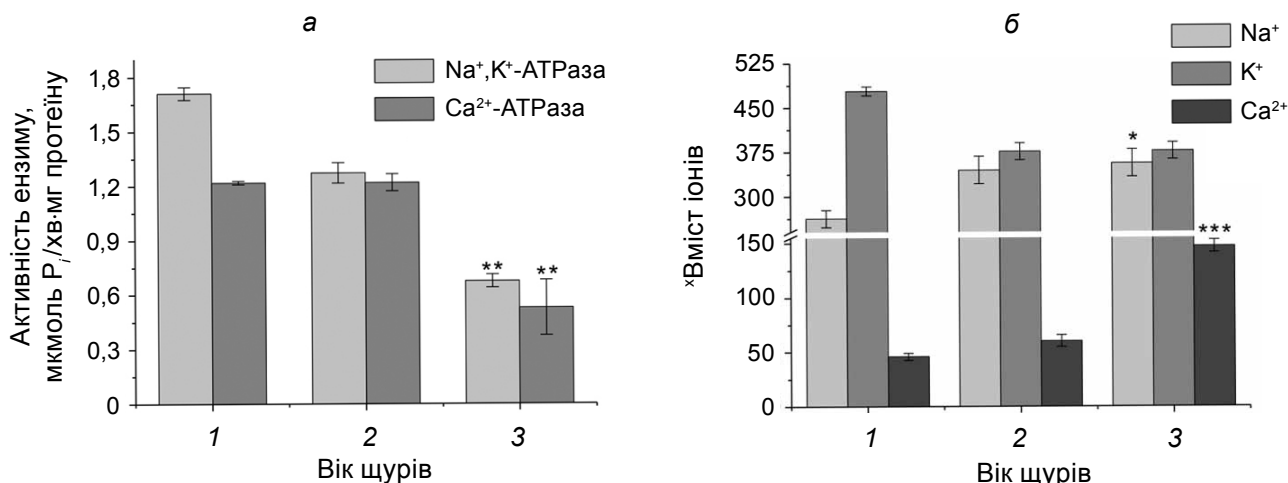


Рис. 5. Активність АТРаза плазматичної мембрани (а) і вміст іонів (б) у довгастому мозку щурів різного віку: 1 – один; 2 – шість; 3 – тридцять місяців. *Вміст Na⁺ і K⁺ виражено у ммоль/г, а Ca²⁺ – у мг/кг тканини (M ± m; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 порівняно зі щурами віком один місяць)

та розподіл іонів. Імовірно залежність між активністю ензимів та вмістом фізіологічного пріона обумовлена тим, що обидва протеїни виконують подібні функції та мають подібну локалізацію в організмі. Зокрема, β-субодиниця Na⁺,K⁺-АТРази як і фізіологічний пріон є сіалоглікопротеїном, вмонтованим у мембрану на зовнішній поверхні клітини.

Таким чином: 1) методом імуногістохімічного аналізу виявлено локалізацію фізіологічного пріона в довгастому мозку щурів різного віку. Зокрема, його знайдено в ядрі оливи та висхідному тракті довгастого мозку; 2) вміст фізіологічного пріона є найменшим у довгастому мозку молодих тварин, після чого відбувається його інтенсивне нагромадження у досліджуваній тканині тварин віком шість місяців. Зі збільшенням віку щурів кількість фізіологічного пріона в довгастому мозку зменшується; 3) активність АТРаза плазматичної мембрани в довгастому мозку знижується з віком тварин. Водночас, відбувається нагромадження іонів кальцію в цій тканині. Вміст іонів натрію також незначно зростає, а калію – не змінюється.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРИОН И АКТИВНОСТЬ Na⁺,K⁺- И Ca²⁺-АТРаза ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

М. В. Кушкевич, В. В. Влизло, Ю. В. Мартын

Институт биологии животных
НААН Украины, Львов;
e-mail: m_kushkevych@ukr.net

На основании результатов иммуногистохимического анализа ткани продолговатого мозга крыс установлено локализацию физиологического пріона. У крыс месячного возраста физиологические пріоны размещены в сером веществе вблизи тел нейронов и микроглиоцитов, а у животных шести и тридцатимесячного возраста – в ядре оливы и телах восходящего тракта. Физиологический пріон локализован вдоль нервных отростков и отсутствует в телах нейронов. В продолговатом мозгу животных возрастом шесть месяцев его количество является наибольшим по сравнению с животными иного возраста. Активность АТРаза плазматической мембраны в этой ткани уменьшается с возрастом, содержание ионов натрия и кальция возрастает, тогда как калия – почти не изменяется.

Ключевые слова: продолговатый мозг, физиологический пріон, Na⁺,K⁺- и Ca²⁺-АТРаза, ионы натрия, калия и кальция.

PHYSIOLOGICAL PRION AND ACTIVITY OF PLASMA MEMBRANE Na^+ , K^+ - AND Ca^{2+} -ATPase IN THE MEDULLA OBLONGATA OF RATS OF DIFFERENT AGES

M. V. Kushkevych, V. V. Vlizlo, U. V. Martyn

Institute of Animal Biology, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: m_kushkevych@ukr.net

Based on the results of immunohistochemical analysis of the rat medulla tissue the localization of physiological prion has been established. Specifically, in rats aged one month they are placed in the gray matter near the bodies of neurons and mikrohliocytes and in animals of six and thirty months – in olive kernel core and upward path bodies. Physiological prion is localized along the nerve processes and is absent in the neuron bodies. In the medulla oblongata of animals aged six months its amount is the highest compared to animals of other age. The activity of plasma membrane ATPases in this tissue decreases with age, the content of sodium and calcium ions increases, while that of potassium is almost unchanged.

Key words: medulla oblongata, physiological prion, Na^+ , K^+ - and Ca^{2+} -ATPase, sodium, potassium and calcium ions.

1. Prusiner S. B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – N 95. – P. 13363–13383.
2. Prusiner S. B. // Arch. Neurol. – 1993. – 50. – P. 1129–1153.
3. Hill A. F., Butterworth R. J., Joiner S. et al. // Lancet. – 1999. – 353, N 9148. – P. 183–189.
4. Hegde R. S., Tremblay P., Groth D. et al. // Nature. – 1999. – 402. – P. 822–826.
5. Влізло В. В., Вербицький П. І. // Вісник аграрної науки. – 2002. – № 5. – С. 32–35.
6. Kovacs G., Budka H. // Am. J. Pathol. – 2008. – 172, N 3. – P. 555–565.
7. Linden R. // Physiol Rev. – 2008. – 88. – P. 673–728.
8. Westergard L., Christensen H., Harris D. // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – 1772. – P. 629–644.
9. Влізло В. В., Стадник В. В., Майор Х. Я., Вербицький П. І. // Біологія тварин. – 2008. – 10, № 1–2. – С. 9–23.
10. Влізло В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. – Львів: Сполом, 2012. – 764 с.
11. Електрон. ресурс. – Режим доступу: <http://www.videotest.ru>.
12. Lowry O. N., Rosenbrough N. I., Forr A. R. et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265–275.
13. Остапченко Л. І., Михайлик І. В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій. – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2006. – 215 с.
14. Jorgensen P. L. // Methods Enzymol. – 1988. – 156. – P. 29–43.
15. Rathbun W., Betlach V. // Anal. Biochem. – 1969. – 28. – P. 436–447.
16. Тица Н. Энциклопедия клин. лаб. тестов. – Москва: Лабинформ, 1997. – С. 225–226.
17. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
18. Кузнецов С. Л., Мушамбаров Н. Н., Горякина В. Л. Руководство-атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии. – Москва: ДиаМорф, 1999.
19. Cuadrado-Tejedor M., Irujo A., Paternain B. et al. // Neurosci. Med. – 2011. – 2. – P. 384–391.

Отримано 15.10.2012