НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

КУШКЕВИЧ МАР'ЯНА ВАСИЛІВНА

УДК 57.017.23+112.7:352.465:151.643

ОНТОГЕНЕТИЧНІ ЗМІНИ ЛОКАЛІЗАЦІЇ І ВМІСТУ КЛІТИННОГО ПРІОНА ТА ЙОГО ЗВ'ЯЗОК З АКТИВНІСТЮ АТФ-АЗ

03.00.04 – біохімія

дисертаційна робота
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник –
доктор ветеринарних наук,
професор, академік НААН,
заслужений діяч науки і техніки України
Влізло Василь Васильович

Львів – 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……4

ВСТУП..... 6

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... 12

1.1. Біохімічні особливості пріонних протеїнів…..... 12

1.1.1.Біохімічна роль Na^{+}–K^{+}-АТФ-ази у пріонних перетвореннях.....15

1.1.2.Субклітинна локалізація PrP^{C} у нервовій тканині……17

1.2. Участь клітинного пріона у регуляції транспорту Ca^{2+}……..……... 20

1.2.1. Загальна характеристика Ca^{2+}-транспортувальних систем клітини……..……20

1.2.2. Фізіологічна роль PrP^{C} у підтриманні гомеостазу Ca^{2+}……23

1.3. Пріонні нейропатології та гомеостаз Ca^{2+}..……30

РОЗДІЛ 2. ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ..... 37

2.1. Вибір напрямів досліджень..... 37

2.2. Визначення вмісту клітинного пріона…….. 39

2.2.1. Приготування протеїнових екстрактів тканин…….. 39

2.2.2. Дот блот аналіз загального вмісту PrP^{C} ……..…….. 39

2.2.3. Вестерн блот аналіз молекулярних форм PrP^{C}……..39

2.3. Імуногістохімічний аналіз тканин..... 40

2.4. Дослідження активності та кінетичних параметрів АТФ-аз……..41

2.4.1. Визначення активності Na^{+}–K^{+}-АТФ-ази……...41

2.4.2. Визначення активності Ca^{2+}-АТФ-аз……..42

2.4.3. Визначення кінетичних параметрів ензимів……..…42

2.5. Визначення вмісту іонів натрію і калію..……..…….....43

2.6. Визначення вмісту загального кальцію..... 44

2.7. Статистичне опрацювання результатів..... 45

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ……...…46
3.1. Вміст клітинного пріона в органах щурів різного віку……... 46
3.1.1. Загальний вміст клітинного пріона у тканинах щурів, визначений методом дот блот аналізу …..... 46
3.1.2. Вміст молекулярних форм PrP^C у тканинах щурів, визначений методом вестерн блот аналізу..... 51
3.2. Імуногістохімічне виявлення клітинного пріона у тканинах щурів різного віку……...…….. 60
3.2.1. Локалізація клітинного пріона у периферійних пріон-реплікувальних та інших органах щурів.....….....….…60
3.2.2. Локалізація клітинного пріона у головному мозку щурів..... 78
3.3. Активність іонних транспортерів та вміст іонів натрію та калію в органах щурів різного віку…….…….…. 87
3.3.1. Активність і кінетичні параметри Na^+–K^+-АТФ-ази та вміст Na^+ і K^+ у тканинах щурів різного віку…..…… 87
3.3.2. Активність та кінетичні параметри Ca^{2+}-АТФ-аз і вміст загального кальцію у тканинах щурів різного віку…….. 105
3.4. Визначення залежності між віковими змінами вмісту PrP^C, активності АТФ-аз, вмісту Na^+, K^+ і загального кальцію …… 133
3.4.1. Кореляційний аналіз між вмістом PrP^C, активністю АТФ-аз, вмістом Na^+, K^+ і загального кальцію ……..…..... 133
3.4.2. Двофакторний дисперсійний аналіз онтогенетичних змін вмісту клітинного пріона, активності АТФ-аз, вмісту Na^+, K^+ і кальцію……..148
3.4.3. Моделі вікових змін вмісту PrP^C, активності АТФ-аз, вмісту іонів та кальцію у пріон-реплікувальних органах…… 150

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ……..…… 154
ВИСНОВКИ..... 164
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... 167

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГАМК – γ-аміномасляна кислота;

ГФІФ – глікозил–фосфатидил–інозитольний фрагмент;

ЕПС – ендоплазматична сітка;

САФ – скрейпі-асоційовані фібрили;

СГШШ – синдром Ґерстмана–Штраусслера–Шейнкера;

ТСЕ – трансмісивна спонгіоформна енцефалопатія;

ХКЯ – хвороба Крейтцфельдта–Якоба;

$Ф_н$ – неорганічний фосфор;

ЦНС – центральна нервова система;

CaKC – Ca^{2+}-активовані K^+-канали;

CaMKII – Ca^{2+}-кальмодулін-залежна кіназа II;

CAN – фосфатаза кальциневрину;

DAG – диацилгліцерол;

Gp PLC – G-протеїн-активована фосфоліпаза C;

IP_3 – інозитол–1,4,5–трифосфат;

IP_3R – IP_3-чутливі рецептори Ca^{2+}-каналів;

Ln-γ_1 – γ_1 ланцюг ламініну;

MAPKs – мітоген-активованна кіназа;

$mGluR_{1/5}$ – метаботропні глутаматні рецептори;

NCKX – Na^+–Ca^{2+}–K^+-обмінник;

NCX – Na^+–Ca^{2+}-обмінник цитоплазматичної мембрани;

NMDA – рецепторкеровані Ca^{2+}-канали N-метил-D-аспарагінової кислоти;

NMDARs – рецептори глутамату;

NR_2D – субодиниця NMDA;

PKC – протеїнкіназа C;

PMCA – Ca^{2+}-помпа плазматичної мембрани;

PIP_2 – фосфатидилінозитол –4,5–бісфосфат;

PKA – протеїнкіназа A;

PLC – фосфоліпаза С;

PrP^{C} – клітинний пріон;

PrP^{Sc} – патологічний пріон;

RyR – ріанодин;

SERCA – Ca^{2+}-помпа сарко(ендо)плазматичної сітки;

SOCE – депокеровані Ca^{2+}-канали;

STI_1 – стресіндукований протеїн 1;

TKR – тирозинкіназа;

TRP – рецепторкеровані Ca^{2+}-канали;

VGCC, CaV – потенціалкеровані Ca^{2+}-канали;

α_7nAChR – α_7 нікотиновий рецептор ацетилхоліну Ca^{2+}-каналу.

ВСТУП

Актуальність теми. Трансмісивні спонгіоформні (губчастоподібні) енцефалопатії (ТСЕ) є хворобами з летальним наслідком, спричинені збудниками протеїнової природи – пріонами (PrP). Вони мають дуже тривалий інкубаційний період, що необхідний для реплікації та нагромадження певної кількості збудника [1–4].

Пріонні інфекції виявляють у тварин і людей [2], під час їх розвитку відбуваються губчастоподібні зміни тканин органів центральної нервової системи (ЦНС) [1, 5]. До таких захворювань належать хвороба Крейтцфельдта–Якоба (ХКЯ) [6], клінічна картина якої характеризується швидко прогресуючим слабоумством, міоклонусом та помітними порушеннями рухів і закінчується смертю [5]. На відміну від усіх відомих пріонопатій, для ХКЯ характерно, що у 85 % випадків вона виникає спорадично, переважно в людей старшого віку (40–69 років) [2].

У патогенезі пріонних інфекцій важливу роль відіграє не лише патологічний або інфекційний пріон (PrP^{Sc}, Sc – від scrapie – скрейпі), а й клітинний (PrP^{C}, C – від Cellular – клітинний), який може бути субстратом для перетворення у PrP^{Sc} [7]. Трансформація клітинного 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 їхнє відмирання [4, 8]. Патологічний пріон спричиняє виникнення хвороби лише за наявності клітинного, що підтверджують результати експериментів на мишах. Показано, що за умов видалення гену пріон-протеїну ($Prnp_{0/0}$), тварини ставали нечутливими до PrP^{Sc} і у них хвороба не виникала [9–11].

Незважаючи на велику кількість інформації про пріонні протеїни, роль PrP^{C} в живому організмі до кінця не з'ясована. Цей протеїн є еволюційно консервативним, оскільки виявлений в багатьох ссавців, птахів і навіть нижчих евкаріотів [12]. 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 окиснювального стресу, підтримує циркадні ритми в організмі [12, 13]. Встановлено участь клітинного пріона у клітинній адгезії, трансмембранній взаємодії, антиапоптичному захисті тощо [14–17].

Зважаючи на ці дані, існують припущення [2–7], що пріон-індуковані нейродегенерації виникають внаслідок порушення різних ланок метаболізму не лише за наявності екзогенного PrP^{Sc} (через токсичність його агрегатів – амілоїдних комплексів), але й через втрату ендогенним PrP^{C} своєї функції у результаті конверсії у патологічну форму.

На основі результатів багатьох досліджень клітинних моделей пріонних інфекцій показано зв'язок між пріонною патологією та порушенням Ca^{2+}-обміну [18–21]. Іони цього елемента контролюють просторово-часові показники електрохімічних сигналів, синаптичної пластичності, ріст аксонів, синаптогенез [22, 23]. Підтримання гомеостазу Ca^{2+} має важливе значення для фізіологічного функціонування нейронів, які є найбільше чутливими до зміни концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} [24, 25]. Він підтримується функціонуванням систем пасивного (кальцієві канали) та активного або енергозалежного (кальцієві помпи та обмінники) транспорту, які локалізовані у субклітинних мембранних структурах [26–28].

Проте, незважаючи на численні дослідження фізіологічної ролі PrP^{C} у метаболізмі клітини, участь PrP^{C} у регуляції транспортування Ca^{2+} є мало вивченою. Зокрема, є відомості про регуляцію клітинним пріоном Ca^{2+}-каналів [29, 30], проте не встановлена участь цього протеїну у функціонуванні Ca^{2+}-АТФ-аз на різних етапах онтогенезу.

Нейродегенерації супроводжується утворенням патологічного пріона із його фізіологічного (клітинного) попередника не лише у клітинах нервової системи, а також у периферійних пріон-реплікувальних органах, оскільки PrP^{C} є сіалоглікопротеїном, який розміщений на поверхні клітинної мембрани [1,7]. Очевидно, що поширення інфекції залежить від рівня продукції клітинного пріона в тканинах організму. Є відомості про наявність клітинного пріона у різних органах [31, 32], проте його вміст і тканинна локалізація в організмі,

залежно від віку, а також взаємовідносини з функціонуванням іонних транспортерів не встановлені.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є частиною планових наукових тем лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН: 28.03/017-01. «Вивчення етіологічних факторів і біологічних механізмів розвитку пріонних хвороб, розробка методів ранньої діагностики трансмісивних спонгіформних енцефалопатій у тварин» (№ ДР 0106U003050) та 31.00.04.01.Ф «Вивчення механізмів розвитку, розробка засобів лікування і профілактики пріонних інфекцій тварин з використанням сучасних методів молекулярної діагностики та клітинної біології» (№ ДР 0111U006149). Автор досліджувала вікові зміни локалізації, вмісту клітинного пріона й активності АТФ-аз у пріон-реплікувальних тканинах щурів різного віку.

Метою роботи було з'ясувати вікові особливості вмісту й локалізації клітинного пріона, активності іонних транспортерів у тканинах щурів і визначити залежність між цими параметрами.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати такі **завдання**:

- дослідити загальний вміст PrP^C у порожній кишці, селезінці, печінці, нирках, м'язі, довгастому мозку та мозочку щурів різного віку за допомогою дот блот аналізу;
- визначити вміст молекулярних форм PrP^C у тканинах щурів різного віку методом вестерн-блот аналізу;
- виявити локалізацію PrP^C у різних тканинах організму щурів на тлі онтогенетичних змін;
- встановити вікову динаміку активності Na^+–K^+-АТФ-ази та кінетичні властивості її ензиматичної реакції у пріон-реплікувальних та інших тканинах;
- дослідити активність і кінетичні характеристики гідролізу АТФ Ca^{2+}-АТФ-азами у тканинах щурів різних вікових груп;

- визначити вміст іонів натрію, калію та загального кальцію у пріон-реплікувальних та інших органах залежно від віку тварин;
- встановити кореляційну залежність між онтогенетичними змінами вмісту пріона, активності ензимів, вмісту Na^+, K^+ і загального кальцію;
- провести дисперсійний аналіз і визначити частки впливу віку і тканинної локалізації на зміни досліджуваних показників.

Об'єкт дослідження: біохімічні властивості клітинного пріона, активність іонних транспортерів, а також вікові зміни вмісту Na^+, K^+ і загального кальцію.

Предмет дослідження: локалізація, загальний вміст і розподіл молекулярних форм клітинного пріона, активність і кінетичні показники гідролізу АТФ Na^+–K^+- та Ca^{2+}-АТФ-азами, вміст Na^+, K^+ і загального кальцію у тканинах тварин на різних етапах онтогенезу.

Методи дослідження: гістологічні (імуногістохімічні), біохімічні (імуноензиматичні, спектрофотометричні), біофізичні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше за допомогою методу імуногістохімічного аналізу виявлена локалізація PrP^C у довгастому мозку, мозочку, а також у периферичних пріон-реплікувальних (порожній кишці, селезінці) та інших органах (печінці, нирках, стегновому м'язі) щурів у віковому аспекті. Уперше визначено кількісні зміни загального вмісту та молекулярних ізоформ PrP^C у тканинах організму щурів залежно від віку. Визначено активність Na^+–K^+- та Ca^{2+}-АТФ-аз, а також кінетичні параметри гідролізу ними АТФ у пріон-реплікувальних органах щурів різного віку. Уперше показана кореляційна залежність між віковими змінами вмісту PrP^C й активністю іонних транспортерів, а також між вмістом Na^+, K^+ і загального кальцію у тканинах щурів, визначено частку впливу віку і тканинної локалізації на зміни досліджуваних показників. Побудовано моделі, які відображають вікову динаміку вмісту PrP^C, активності АТФ-аз, вмісту іонів Na^+, K^+ і кальцію.

Практичне значення отриманих результатів. У результаті проведених досліджень адаптовано метод імуногістохімічного аналізу для визначення тканинної локалізації PrP^C. Отримані результати розкривають особливості

фізіологічних функцій пріон-протеїну і можуть бути використані під час вивчення етіології та патогенетичних механізмів пріонних захворювань. Результати кореляційного аналізу між вмістом пріона й активністю іонних транспортерів і вмістом іонів можуть бути застосовані для прогнозування розвитку патології за цих захворювань. Отримані результати впроваджені у навчальний процес кафедри біохімії біологічного факультету ЛНУ імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Дисертант опрацювала наукову літературу за темою дисертації, виконала експериментальну частину роботи, провела математичний аналіз і статистичну обробку отриманих результатів, написала й оформила дисертацію.

Спільно з науковим керівником – професором В.В. Влізлом, дисертант визначила основні напрями досліджень, вибрала методи досліджень, провела аналіз, інтерпретацію, узагальнення та публікування отриманих результатів.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на засіданнях секції біохімії Наукового товариства імені Шевченка (Львів, 2011, 2016), Міжнародному семінарі «Програма контролю губчастоподібної енцефалопатії ВРХ та інших видів пріонних інфекцій» (Київ, 2011), конкурсі на здобуття премії Президії НААН «За кращу наукову доповідь молодого ученого НААН з фундаментальних та прикладних досліджень» (Київ, 2015), де була нагороджена дипломом «Золота фортуна», Міжнародній конференції для молодих вчених Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (Київ, 2015), Конференції для молодих вчених Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України (Київ, 2016), Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми емерджентних хвороб тварин» ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН» (Одеса, 2016), International Congress of Medical Sciences (Sofia, Bulgaria, 2016), Міжнародній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» Інституту біології тварин НААН (Львів, 2015, 2016), Всеукраїнських конференціях «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» Інституту біології

тварин НААН (Львів, 2010, 2011, 2015, 2016).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 6 статей у фахових журналах, 2 статті у вісниках, із них 1 одноосібна, 6 зазначені у міжнародних наукометричних базах даних, 6 тез доповідей на конференціях, отримано 1 патент на корисну модель.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біохімічні особливості пріонних протеїнів

Пріонні захворювання належать до повільних нейродегенеративних розладів людей і тварин, які закінчуються летально [1, 3]. Клінічно вони супроводжуються виникненням недоумства, атаксії, психічних розладів. Під час гістопатологічних досліджень ураженого головного мозку зазвичай виявляють вакуолізацію (від якої походить термін «губчастоподібна» – «спонгіоформна»), обширні астрогліози і стійкі до дії протеаз агрегати патологічного пріона (амілоїди) [33]. До трансмісивних спонгіоформних енцефалопатій (ТСЕ) людини належать хвороба Крейтцфельдта-Якоба (КЯХ), синдром Ґерстмана-Штраусслера-Шейнкера (ГШШС), фатальне родинне безсоння, куру, в овець і кіз діагностують скрейпі, хронічну виснажливу хворобу оленів, трансмісивну енцефалопатію норок, губчастоподібну енцефалопатію великої рогатої худоби, тощо [1, 34, 35]. Встановлено, що ці захворювання є проявом молекулярної патології, за якої клітинний (фізіологічний) пріон (PrP^{C}) зазнає структурних змін і перетворюється в інфекційний (PrP^{Sc}), утворюючи одночасно стійкі до протеаз амілоїдні комплекси [3, 36].

PrP^{C} локалізований на поверхні клітин ссавців і складається з сіалоглікопротеїнів, які утворені приблизно 210 амінокислотами, з’єднані з плазматичною мембраною глікозил-фосфатидил-інозитольним фрагментом (ГФІФ). Клітинний пріон містить два N-глікани й октапептидні повтори, які зв’язують купрум та переносять його за допомогою ендоцитозу всередину клітини [13, 37]. PrP^{C} експресується майже у всіх тканинах ссавців, особливо багато його у ЦНС і лімфоїдних органах [38]. PrP^{C} містить гнучкі ділянки з N-кінцями та кулясті α-спіралі з С-кінцевими ділянками [39], натомість PrP^{Sc} має більшу кількість β-структур [4]. Така зміна конформації зумовлює нові

фізико-хімічні та біологічні властивості PrP^{Sc}, зокрема здатність утворювати амілоїдні β-структури і розповсюджуватися в організмі [4, 40]. Проте, незважаючи на досягнення в розумінні перетворення PrP^{C} до PrP^{Sc} і шляхів проникнення екзогенних пріонів до ЦНС, нейродегенеративні процеси за участю пріонів, як і фізіологічні функції PrP^{C}, є досі мало досліджені.

Відомо, що конверсія клітинного пріон-протеїну в його інфекційну ізоформу – посттрансляційний процес [13]. Аналіз вторинної структури патологічного пріона довів, що цей перехід характеризується змінами структури молекули. Зокрема, клітинний пріон містить 42 % α-спіралей і майже не містить β-структур (всього близько 3 %), в той час як інфекційний – 30 % α-спіралей і 43 % β-структур [3, 4, 15] (рис. 1.1). Обробка клітинного пріона реагентами, що інгібують утворення β-структур, призводить до зменшення інфекційності переродженого пріона. Одночасно знижується і стійкість PrP^{Sc} до дії протеази К, чутливість до якої вважається маркером, що відрізняє PrP^{C} від PrP^{Sc} [4, 41]. Тобто набуття інфекційних властивостей клітинним пріоном зумовлене утворенням β-структур.

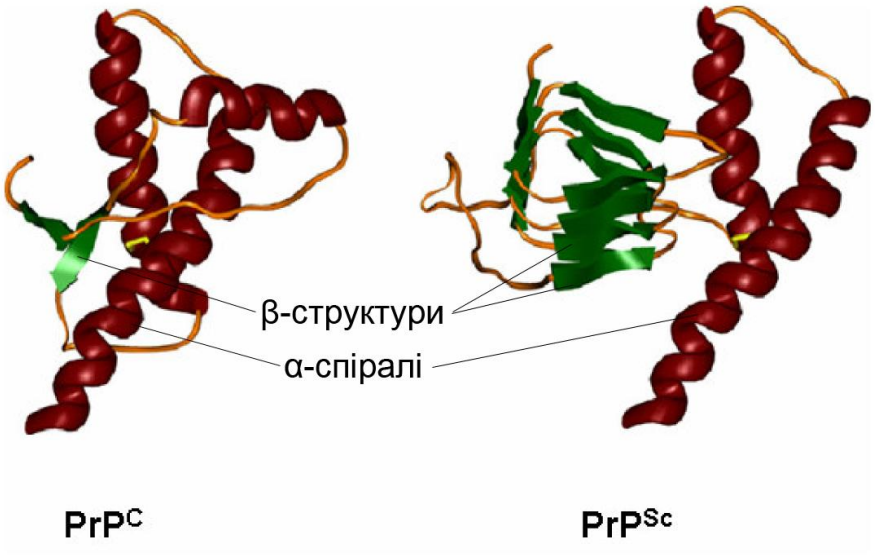


Рис. 1.1. Схема будови клітинного (PrP^{C}) та патологічного (PrP^{Sc}) пріонів [42]

Перетворення нормального протеїну в патогенний, імовірно, відбувається внаслідок протеїн-протеїнових взаємодій, незалежно від того, потрапляє PrP^{Sc} в

організм ззовні чи виникає в ньому спонтанно (у випадку спорадичних і спадкових пріонних захворювань) [43–45]. Існують дві моделі, які описують це перетворення [15]. Згідно з гетеродимерною моделлю, клітинний пріон є мономером і фізична взаємодія PrP^{Sc} з PrP^{C} каталізує перетворення $PrP^{C} \rightarrow PrP^{Sc}$. У результаті цієї взаємодії утворюються гомодимери PrP^{Sc}–PrP^{Sc}, які можуть дисоціювати, запускаючи нові ланки конформаційного перетворення, або агрегувати. Процес нагадує ланцюгову реакцію і відбувається досить швидко, проте залишається незрозумілим механізм утворення амілоїдних структур [2–4].

Друга модель розглядає патологічний пріон як упорядкований полімер [46]. Процес його утворення внаслідок конформаційної перебудови PrP^{C}, відповідно до цієї теорії, нагадує кристалізацію, яку запускає олігомер PrP^{Sc}. Під час цього формується ядро – олігомер PrP^{Sc}, що є інтермедіатом пріонного перетворення. Нагромадження PrP^{Sc} (у вигляді амілоїдів) у тканині мозку хворих людей зазвичай містять ниткоподібні агрегати цього протеїну, що вказує на впорядковану полімеризацію [47, 48]. Відповідно до цієї моделі є два можливих варіанти пріонного переходу. Перший передбачає, що PrP^{C} і PrP^{Sc} співіснують у термодинамічній рівновазі, яка зміщена у напрямі до PrP^{C}, і PrP^{Sc} утворюється після приєднання мономера PrP до ядра. У результаті цього мономер PrP^{Sc} входить до складу полімеру PrP^{Sc}. Якщо мономер PrP^{Sc} не приєднався до ядра, то відбувається зворотне перетворення $PrP^{Sc} \rightarrow PrP^{C}$ [15].

Другий варіант полімеризаційної моделі передбачає, що конформаційна перебудова відбувається в момент приєднання мономеру PrP^{C} до олігомерів PrP^{Sc} [15].

Згодом було показано існування інтермедіаторів пріонного перетворення – олігомерних комплексів, які менше структуровані, ніж пріонні фібрили і нагадують міцели [49]. Для того, щоб такий олігомерний комплекс міг каталізувати пріонний перехід, він повинен сформувати стабільне ядро, що складається із PrP^{Sc}. До нього можуть приєднуватися як мономери PrP^{C}, так і олігомерний комплекс і, як наслідок, перетворюватися у PrP^{Sc} [1–4]. Тобто, ядро є матрицею для утворення полімерів інфекційного пріона.

Отже, клітинний пріон є протеїном, який розміщений на поверхні клітинної мембрани та виконує важливі функції. Проте, за певних умов він може перетворюватися у патологічну форму, змінюючи під час цього конформацію молекули. Припускають можливі схеми, за якими відбувається така перебудова. Інфекційна форма пріона (скрейпі-конформація) спричиняє нейродегенеративні захворювання.

1.1.1. Біохімічна роль Na^+–K^+-АТФ-ази у пріонних перетвореннях. Виявлено кілька протеїнів, які можуть брати участь у пріонній конверсії та специфічно взаємодіяти зі скрейпі-асоційованими фібрилами (САФ). Одними із них є α-субодиниця Na^+–K^+-АТФ-ази, а також ізоформа гуанін-нуклеотид зв'язувального протеїну. Під час *in vitro* досліджень механізмів конверсії пріонів у культурі скрейпі-інфікованих нейронів миші, було виявлено, що Na^+–K^+-АТФ-аза здатна модулювати неправильне згортання клітинного пріона, та припускають, що вона може бути недеформованим специфічним каталізатором пріонного перетворення в умовах *in vivo*. Іншими авторами показаний подібний взаємозв'язок у культурі астроцитів. Це підтверджує припущення про те, що нейродегенерації виникають внаслідок втрати обома протеїнами (клітинним пріоном та α-субодиницею Na^+–K^+-АТФ-ази) своїх функцій [50].

Під час досліджень були отримані препарати скрейпі-асоційованих фібрил із нейронів ТСЕ-інфікованих мишей. Використання специфічної методики дозволило зберегти цілісність структури і функціональну здатність інших протеїнів, які можуть брати певну участь у пріонній конверсії. За результатами вестерн блот аналізу було підтверджено приналежність досліджуваних протеїнів до пріонної конверсії та виявлено протеїни, які не беруть участі у цьому процесі. За даними мас-спектрометричного аналізу у трьох досліджуваних зразках САФ, які отримані з мозку мишей, інфікованими різними штамами PrP^{Sc}, була виявлена α-субодиниця Na^+–K^+-АТФ-ази. Наявність інших мембранних протеїнів у цих зразках підтверджує той факт, що пріонна конверсія відбувається на плазматичній мембрані. Вони можуть

взаємодіяти з PrP^C за нормальних умов, локалізовані поруч. За даними вестерн блот аналізу з використанням специфічних антитіл до Na^+–K^+-АТФ-ази, встановлено наявність трьох ізоформ α-субодиниці цього ензиму: α2- та α3-ланцюги [50]. Як відомо, α2-ізоформа експресується переважно гліальними клітинами, тоді як α3-ізоформа – нейронами, проте цей ензим не є тканиноспецифічним і експресується в усіх тварин, забезпечуючи підтримання асиметричного розподілу іонів натрію та калію по обидва боки мембрани. Такий розподіл одновалентних катіонів є важливим для формування мембранного потенціалу, транспорту метаболітів крізь мембрану та регуляції внутрішньоклітинних реакцій обміну речовин [51].

У нейронах внаслідок функціонування Na^+–K^+-АТФ-ази відбувається деполяризація мембрани, внаслідок чого відкриваються іонні канали, кальцій надходить і відбуваються різні важливі процеси. Тому, можливо, мутації і дефекти в структурі обох α2- та α3-ланцюгів ензиму зумовлені нейродегенеративними розладами [52].

За допомогою різних методів, зокрема афінної хроматографії [53], імунопреципітації [54, 55] виявлено, що клітинний пріон здатний безпосередньо або опосередковано взаємодіяти з Na^+–K^+-АТФ-азою. Це є підтвердженням припущення щодо можливої участі ензиму у пріонній конверсії.

Під час дослідження 3 штамів скрейпі-асоційованих фібрил встановлено, що за інгібування Na^+–K^+-АТФ-ази відбувається формування структури, яка стійка до дії протеїнази К. За її наявності, але без внесення САФ, такий продукт не утворюється. Проте під час внесення обох зразків Na^+–K^+-АТФ-ази та САФ відбувається утворення протеазостійкого комплексу, причому його кількість зростає зі збільшенням концентрації Na^+–K^+-АТФ-ази. Тобто наявність останьої сприяє пріонній конверсії у САФ [50].

Також вивчали вплив Na^+–K^+-АТФ-ази на фібрилізацію рекомбінантного клітинного пріона під час процесу неправильного його згортання, спричиненого гідрохлоридом гуанідину [50]. Як відомо, фібрилізація призводить до появи захворювання та утворення структур, які можуть мати

певне фізіологічне значення [56]. Під час дослідження утворення фібрил за нормальних умов без впливу Na^+–K^+-АТФ-ази процес активізувався через 200 хв після початку експерименту, а за наявності ензиму, залежно від його концентрації, цей час зростав до 600 – 700 хв. Тобто, Na^+–K^+-АТФ-аза негативно впливає на фібрилізацію PrP^C, переважно внаслідок пригнічення фази елонгації [50].

За нормальних умов потужність функціонування Na^+–K^+-АТФ-ази становить 30 % від можливої максимальної. Проте за певних стресових умов ця потужність зростає, оскільки необхідно підтримувати електрохімічний градієнт мембрани, створюючи сприятливі умови для функціонування інших структур, наприклад, синапсів. У PrP-нокаутованих мишей показано зниження активності Na^+–K^+-АТФ-ази, тобто відсутність клітинного пріона негативно впливає на діяльність ензиму, а за умов стресу в таких тварин негативний ефект останнього суттєво посилюється, що зумовлює виникнення різних патологій [20].

PrP^C здатний утворювати комплекс з Na^+–K^+-АТФ-азою, проте у цьому процесі можуть брати участь інші протеїни, наприклад 29,39-циклічний нуклеотид 39-фосфодіестерази (CNP1) [57]. CNP1 є мембранним ензимом, який бере участь у синтезі мієлінової оболонки нейронів.

Виникло запитання, чи здатна Na^+–K^+-АТФ-аза підтримувати пріонний інфекційний процес у PrP-нокаутованих тварин, при цьому гомозиготнісь тварин по α2- та α3-ланцюгах призводять до летальності. У гемізиготних мишей спостерігали поведінкові і фізіологічні аномалії [58].

Отже, Na^+–K^+-АТФ-аза наявна у САФ, які отримані з нейронів скрейпі-інфікованих тварин. Цей протеїн підсилює клітинну вільну конверсію рекомбінантного PrP^C, проте негативно впливає на фібрилізацію PrP^C. Тобто він може бути невід'ємним фактором PrP^C перетворення в природних умовах.

1.1.2.Субклітинна локалізація PrP^C у нервовій тканині. Використання світлової та електронної мікроскопії, імуноцитохімічних досліджень дало можливість встановити, що PrP^C після синтезу у сомі нейрона, внаслідок

антероградного транспорту, потрапляє в аксон і досягає пресинаптичної мембрани. Згодом, щоб набути функціональної активності, PrP^C специфічно зв'язується з клітинною мембраною або позаклітиннимих рецепторами, утворюючи мультипротеїнові комплекси [7, 14, 59].

За допомогою методу імунофлуоресцентної мікроскопії встановлено, що PrP^C розташований у головному мозку переважно в нейроглії, у значній кількості виявлено у гіпокампі. Дендрити пірамідальних клітин, в основному, є пріоннегативними всередині, проте назовні містять пріонпозитивну облямівку. Це підтверджує мембранну локалізацію PrP^C.

Під час проведення електронної мікроскопії гіпокампу показано, що у структурі нейроглії PrP^C локалізований переважно на плазматичній мембрані дендритів, в тому числі шипів, а також дендритних транспортних везикул, ендосом, аксолем, аксонів транспортних везикул і мієлінових оболонок. Крім того, мембрани синапсів, у тому числі пре- і постсинаптичні, а також синаптичних пухирців також виявилися позитивними щодо вмісту клітинного пріона. Проте, за даними кількісного аналізу, його вміст суттєво знижується у мембранах синаптичних везикул. Крім того, PrP^C локалізований на постсинаптичній мембрані вільно або зв'язано з екзосомами [60].

Аналізуючи нейрональні і гліальні клітини, PrP^C був виявлений на мембранах ЕПС, комплексу Гольджі, непокритих транспортних везикул, і плазматичній мембрані, які є важливими частинами його біосинтезувального і ендоцитотичного шляху. Пріон-протеїна не виявлено у мітохондріальних і ядерних структурах. Відомо також, що нейрони експресують більшу кількість клітинного пріона, порівняно з гліальними клітинами, оскільки навколо гліоцитів виявляють більшу кількість пріон-протеїну, ніж у їх власних структурах. Локуси PrP^C помітні навколо тих нейронів, структури яких також є пріон-позитивними [60].

Наявність клітинного пріона у різних ділянках (утворах) плазматичної мембрани, не лише в аксонах і структурах синапсів, зокрема дендритних мембранах, де його вміст є найбільшим, вказує на те, що PrP^C може виконувати більш різноманітну фізіологічну функцію, а не лише участь у роботі синапсів.

Це узгоджується із повідомленнями про залучення клітинного пріона у різноманітні механізми [12–14]. Оскільки PrP^C наявний у лізосомальних та ендосомальних структурах, то вони можуть бути місцем його деградації або конверсії у патологічну форму. Локалізація на плазматичних мембранах нейронів і відсутність спеціальних механізмів утримання зумовлює безперешкодну дифузію PrP^C уздовж мембран цих клітин. Це відіграє важливу роль у поширенні PrP^{Sc}, оскільки встановлено, що дефектний швидкий аксональний транспорт сприяє пріонній нейроінвазії. Є припущення, що у молекулі PrP^{Sc} зберігається ГФІФ, і це дозволяє приєднуватися до інших молекул PrP^C та мігрувати на мембрани сусідніх клітин. Наявність значної кількості пріон-протеїну в мієлінових оболонках вказує на можливу участь олігодендроцитів у поширенні пріонних захворювань [60].

PrP^C здатен селективно зв'язувати іони купруму і здійснює ендоцитоз, особливо в поєднанні з лігандами. Комплекс Cu^{2+}-PrP^C бере участь у сигнальних шляхах та механізмах антиоксидантного захисту. Припускають, що ендоцитоз PrP^C відбувається через клатринові везикули за участю протеїнів Rab і Grb_2. PrP^C активує внутрішньоклітинні протеїнкінази (fyn-кінази), які входить до складу сигнальних шляхів нейропротекції або нейропластичності. PrP^C бере участь у нейротрансмісії, взаємодіючи з синапсином$_1$ і синаптофізином, які беруть участь у процесі екзо-ендоцитотичного циклу синаптичних міхурців [59, 60].

Крім того, існує також цитозольна форма клітинного пріона, проте, розташовується вона нерівномірно і зміщена до периферії клітини. Ці молекули утворюють мультикомплекси, можливо, за участю інших факторів, та не дифундують у ядро. Теоретично у результаті функціонування протеасомних систем ці протеїни повинні бути деструктуризовані. Молекули пріона також можуть надходити з інших нейронів внаслідок функціонування синапсів. Пріон-позитивні клітини об'єднуються у конгломерати.

Цитозольна локалізація PrP^C може відображати певний стан нейрона, що виникає в результаті дисфункції механізму, який генерує синтез і модифікацію протеїнів. Чи є нагромадження PrP^C в цитоплазмі наслідком стресу або

пошкодження клітин, невідомо. Проте, після детального морфологічного дослідження цих нейронів не було виявлено набряку органел (мітохондрій, ЕПС, комплексу Гольджі), збільшення полірибосом, розривів ядерних мембрани, які є явними ознаками нейронального некрозу. Крім того, не було виявлено будь-яких апоптичних ознак, таких як злипання хроматину, конденсація цитоплазматичного вмісту або нагромадження продуктів аутофагії лізосом. Мітохондрії у таких клітинах мали добре організовану структуру крист, внутрішніх і зовнішніх мембран. Тобто такі клітини є фізіологічно нормальними, як і форма локалізації PrP^C. Подібні властивості, тобто здатність бути локалізованими одночасно у різних компартментах клітини, мають інші протеїни, наприклад, активатор плазміногену. Наявність такої форми клітинного пріона найімовірніше зумовлена процесами глікозилювання [60]. Також цитоплазматичні молекули PrP^C мають поліаденіляційні-елемент-зв'язувальні властивості та залучені в пре- і постсинаптичні молекулярні реакції [61].

Отже, клітинний пріон наявний в ендосомах і в плазматичній мембрані нейронів головного мозку, пре- і постсинаптичних мембранах, проте не виявлений у синаптичних везикулах. Відома також цитозольна форма PrP^C.

1.2. Участь клітинного пріона у регуляції транспорту Ca^{2+}

1.2.1. Загальна характеристика Ca^{2+}-транспортувальних систем клітини. Гомеостаз кальцію у клітині підтримується у результаті функціонування систем пасивного (кальцієві канали) та активного або енергозалежного (кальцієві помпи та обмінники) транспорту, які локалізовані у субклітинних мембраних структурах [62, 63].

Пасивне надходження Ca^{2+} з навколишнього середовища у цитоплазму клітини відбувається через специфічні Ca^{2+}-канали плазматичної мембрани. Іншим джерелом Ca^{2+} є внутрішньоклітинні Ca^{2+}-депо різних компартментів

ендоплазматичної сітки (ЕПС) та кальцисоми [22]. Структура та особливості функціонування і регуляції цих каналів дуже різноманітні. Розрізняють рецепторкеровані та потенціалкеровані кальцієві канали плазматичної мембрани [26]. Цей поділ умовний, оскільки для багатьох потенціалкерованих каналів показана пряма регуляція рецепторами. Існують дані, які вказують на можливість регуляції рецепторкерованих каналів потенціалом мембран [27].

Рецепторкеровані Ca^{2+}-канали (TRP) утворені тетрамерними протеїнами. До цієї групи належать як власне Ca^{2+}-канали, так і низькоселективні катіонні канали, проникні для одновалентних катіонів, але здатні також транспортувати Ca^{2+}. Регуляцію їх активності здійснює фосфоліпаза С (PLC), яка активується рецепторами G-протеїну (GPCRs) або тирозинкінази (TKR) [53].

G-протеїнкеровані канали активуються внаслідок зв’язування з G-протеїном. Такі рецептори (GPCRs), зокрема Gq_{11}, можуть активувати β-субодиницю фосфоліпази С (PLCβ), а рецептори тирозинкінази (TKR) – γ-субодиницю (PLCγ), які потім розщеплюють фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат (PIP_2) в 1,4,5-інозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3) і диацилгліцерол (DAG). Інозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3) зв’язується IP_3-рецепторами (IP_3R) ЕПС, що спричиняє витік Ca^{2+} у цитоплазму, внаслідок чого його концентрація зростає від ~ 100 нм до ~ 1 мкм упродовж кількох секунд. IP_3-чутливі Ca^{2+}-канали сприяють виділенню Ca^{2+} із депо. Це тетрамери, які утворені з 3000 амінокислот. За будовою Ca^{2+}-канал розділяють на три ділянки: N-кінцевий домен, який зв’язує IP_3, змінюючи свою конформацію, що спричиняє відкривання каналу; С-кінцевий домен, що містить шість трансмембранних сегментів, які формують канал, та центральний регуляторний домен, що містить сайти зв’язування для модуляторів (Ca^{2+}, кальмодулін і АТФ) [27, 65].

Ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали (RyR) регулюються Ca^{2+}. За низьких концентрацій канал відкривається і Ca^{2+} вивільняється з ЕПС, а за високих – закривається [66].

Потенціалкеровані Ca^{2+}-канали (CaV) функціонують дуже швидко. CaV канал проводить близько одного мільйона Ca^{2+} за секунду. Ці канали активуються внаслідок зміни мембранного потенціалу клітини. Якщо

концентрація Ca^{2+} у позаклітинному просторі є низькою, то через ці канали відбувається потік Na^{+} та K^{+}, якщо ж вона зростає, то це ініціює переміщення кількох протеїнів, наприклад, протеїнкінази С, в інші ділянки мембрани [64, 66, 67].

Депокеровані кальцієві канали (CRAC) регулюють вивільненням Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо (ЕПС, кальцисоми та ін.). Подальше заповнення депо відбувається не тільки внаслідок зворотного транспорту Ca^{2+} з цитоплазми АТФ-азами, але й в результаті прямого надходження туди позаклітинного Ca^{2+}. Утворюється фізичний контакт між плазматичною мембраною і мембраною внутрішньоклітинних Ca^{2+}-депо. У місці контакту утворюється пора, через яку надходить кальцій. В активації цих каналів бере участь певний мобільний фактор, що вивільняється з ЕПС. Таким фактором можуть бути G-протеїни, різні ліпіди, протеїнкінази й інші речовини [26, 68].

Крім того, існують системи, які регулюють внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} зміною своєї функціональної активності. Це спеціальні Ca^{2+}-зв'язувальні протеїни цитоплазми [64].

До системи енергозалежного транспорту іонів кальцію належать Ca^{2+}-помпа (PMCA) та Na^{+}–Ca^{2+}-обмінник (NCX) цитоплазматичної мембрани, Ca^{2+}-помпа сарко(ендо)плазматичної сітки (SERCA), Ca^{2+}-транспортна система мітохондрій, H^{+}–Ca^{2+}- та Na^{+}–Ca^{2+}-обмінні системи мітохондрій [62, 69]. Ці ензими переносять іони кальцію із клітини в позаклітинне середовище або внутрішньоклітинні депо ЕПС, використовуючи енергію гідролізу АТФ і підтримуючи тим самим їх низьку концентрацію у цитоплазмі. PMCA видаляє Ca^{2+} через плазматичну мембрану, а SERCA – закачує його в ЕПС. Цей процес здійснює регуляцію функцій через збільшення проникності клітинних мембран для Ca^{2+} [62, 63].

PMCA ефективно підтримує низькі концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі (~ 100 нм). Молекула PMCA, як і більшість АТФ-аз Р-типу, складається із десяти трансмембранних α-спіральних ділянок, а її N- і С-кінцеві ділянки знаходяться в цитоплазмі. С-кінцева ділянка здатна взаємодіяти з кальмодуліном і виконує роль інгібітора. Зв'язування з цією ділянкою

кальмодуліну за наявності Ca^{2+} спричиняє активацію ензиму. Важливе значення у цьому процесі має взаємодія іонів Ca^{2+} з негативно зарядженими амінокислотними залишками С-кінцевої ділянки. Таким чином, у відповідь на збільшення внутрішньоклітинного Ca^{2+} активність PMCA зростає, що призводить до прискорення видалення Ca^{2+} із клітини і її переходу в стан спокою [70].

Внаслідок функціонування SERCA відбувається акумуляція Ca^{2+} у внутрішньоклітинному депо. SERCA є подібною до попереднього ензиму за структурою активного центру та високою спорідненістю до іонів кальцію, але відрізняється тим, що її С-кінець не містить ділянки зв'язування кальмодуліну. Специфічно інгібується тапсигаргіном. SERCA наявна у мембранах комплексу Гольджі, зовнішній мембрані ядра [22].

Іонообмінники цитоплазматичної мембрани сприяють виділенню іонів кальцію у позаклітинне середовище. Na^{+}–Ca^{2+}-(NCX) та Na^{+}–Ca^{2+}–K^{+}-(NCKX) обмінники здійснюють обмін одного іона кальцію на три іони натрію та котранспотр іонів калію та кальцію в обмін на чотири іони натрію, відповідно. Внутрішньоклітинний Ca^{2+} активує K^{+}-канали, а в деяких клітинах і Cl^{-}-канали. За умов деполяризації плазматичної мембрани і збільшення рівня внутрішньоклітинного Na^{+} обмінник може працювати у зворотному напрямку, сприяючи потоку Ca^{2+} у цитоплазму [26].

У деяких випадках, особливо за патологічних станів, у видаленні Ca^{2+} з цитоплазми можуть брати участь мітохондрії [71, 72].

Отже, підтримання Ca^{2+}-гомеостазу клітини відбувається внаслідок функціонування різних систем, найважливішими з яких є Ca^{2+}-канали, іонообмінними та Ca^{2+}-АТФ-ази.

1.2.2. Фізіологічна роль PrP^{C} у підтриманні гомеостазу Ca^{2+}. Вивчення фізіологічної ролі PrP^{C} у багатьох клітинних процесах є важливим для з'ясування причин виникнення нейродегенеративних змін, які спричинені безпосередньою нейротоксичною дією пріонів чи втратою функціональності PrP^{C}. Крім цього, вивчення фізіологічної ролі PrP^{C} може пришвидшити

розробку ефективних терапевтичних стратегій для боротьби з ТСЕ.

Відомо, що PrP-нокаутовані тварини мають імунітет до пріонних інфекцій [73], нормально розвиваються без нейродегенеративних ознак [74], проте у них наявні нейрофізіологічні та поведінкові розлади [75–77]. Наприклад, показано, що у PrP-нокаутованих мишей порушений процес утворення гемопоетичних лімфоцитів [38] і пригнічена регенерація скелетних м'язів [78].

Дослідження функції PrP^C *in vitro* та *in vivo* показали, що цей протеїн залучений не лише у метаболізм купруму і механізми захисту від окиснювального стресу й апоптозу клітин, але також у клітинній адгезії, міграції, проліферації та диференціації, взаємодії з позаклітинними компонентами [12, 34]. Крім того, клітинний пріон бере учать у формуванні синаптичної структури та її функціонуванні [14, 59, 79], оскільки дисфункція синапсів є основною молекулярною патологією за пріонних інфекцій [61, 80].

Одним із важливих показників нормального функціонування клітини є гомеостаз кальцію. Як уже згадувалося, він підтримується внаслідок функціонування систем пасивного (кальцієві канали) й активного, або енергозалежного (кальцієві помпи та обмінники) транспорту, які локалізовані у субклітинних мембраних структурах.

На основі результатів багатьох досліджень клітинних моделей пріонних інфекцій показано зв'язок між пріонною патологією та порушенням Ca^{2+}-обміну [18–21, 81, 82]. Існують дві гіпотези щодо способу регуляції Ca^{2+}-транспортних систем клітинним пріоном. Перша з них передбачає, що PrP^C безпосередньо взаємодіє з системами (Ca^{2+}-канали або метаботропні рецептори), що забезпечують підтримання гомеостазу Ca^{2+}, а також модулює активність цих систем. Друга гіпотеза полягає в тому, що PrP^C розглядають як складову багатокомпонентних комплексів сигналізації клітинної поверхні, що регулює певні механізми і контролює експресію Ca^{2+}-транспортних протеїнів [83, 84].

G.W. Zamponi зі співав. [85] запропонував механізм функціональної взаємодії PrP^C і Ca^{2+}-транспортних систем. Встановлено, що PrP^C блокує активність NMDA-Ca^{2+}-каналів у результаті взаємодії з NR_2D-субодиницею,

перешкоджаючи надходженню іонів кальцію у цитоплазму нейронів [85, 86] (рис. 1.2). Це сприяє зниженню збудливості нейронів гіпокампу внаслідок блокування виділення глутамату, який є основним збуджувальним нейромедіатором ЦНС.

Натомість у CA_1-ділянці гіпокампу скрейпі-інфікованих тварин довготривале потенціювання відбувається завдяки надходженю Ca^{2+} через рецепторкеровані Ca^{2+}-канали N-метил-D-аспарагінової кислоти (NMDA), що містять рецептори глутамату (NMDARs). У результаті рівень цитозольного Ca^{2+} зростає, що стимулює зростання активності Ca^{2+}-кальмодулін-залежної кінази II (CaMKII) і підсилює довготривале потенціювання внаслідок збільшення функціональності α-аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазол-пропіонової кислоти (AMPA)-глутаматних рецепторів Ca^{2+}-каналів на постсинаптичних ділянках [87–89]. Тобто PrP^C виконує нейропротекторну функцію за умов збільшення активності NMDAR-Ca^{2+}-каналів [85, 86, 90, 91]. Оскільки експресія Ca^{2+}-кальмодулін-залежної кінази II встановлена лише у PrP^{Sc}-інфікованих клітин [92], то з цього випливає, що пріонопатія виникає внаслідок втрати PrP^C регуляторної функції через можливу його конверсію у PrP^{Sc}.

Крім того, є дані, що пріонні нейродегенерації [93] та ішемічні ушкодження головного мозку [94, 95] супроводжуються порушенням синтезу і секреції нейромедіаторів, зокрема глутамату, на рівні парасимпатичних нервових закінчень. Проте під час вивчення участі PrP^C у механізмах контролювання гомеостазу Ca^{2+} необхідно враховувати те, що різні типи клітин експресують різні кількості PrP^C [96].

Під час дослідження культури клітин мікроглії PrP-нокаутованих мишей встановлено, що клітинний пріон здатний формувати іонні канали у ліпідному бішарі плазматичної мембрани, які є вільнопроникними для найбільш поширених фізіологічних іонів, зокрема Ca^{2+}, K^+ і Na^+ [97, 98].

Додатково вивчений механізми взаємодії PrP^C з позаклітинними протеїнами, що сприяють росту аксонів, нейрональній диференціації та їх виживанню. Крім того, відомо, що PrP^C зв'язується з γ_1 ланцюгом ламініну (Ln-γ_1) і цей комплекс активує групу I метаботропних глутаматних рецепторів

($mGluR_{1/5}$). У свою чергу, mGluRs стимулюють утворення інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3) з фосфатидилінозитол 4,5-бісфосфату (PIP_2) за участю G-протеїн(Gp)-активованої фосфоліпази C (PLC). Після цього IP_3 зв'язується з рецепторами IP_3-чутливих Ca^{2+}-каналів (IP_3R) ЕПС і відбувається вивільнення Ca^{2+} з ЕПС у цитоплазму (рис. 1.2). Зростання концентрації цитозольного Ca^{2+} сприяє синтезу протеїнкінази C (PKC), яка активує $ERK_{1/2}$, що є посередником нейрогенезу [90, 94].

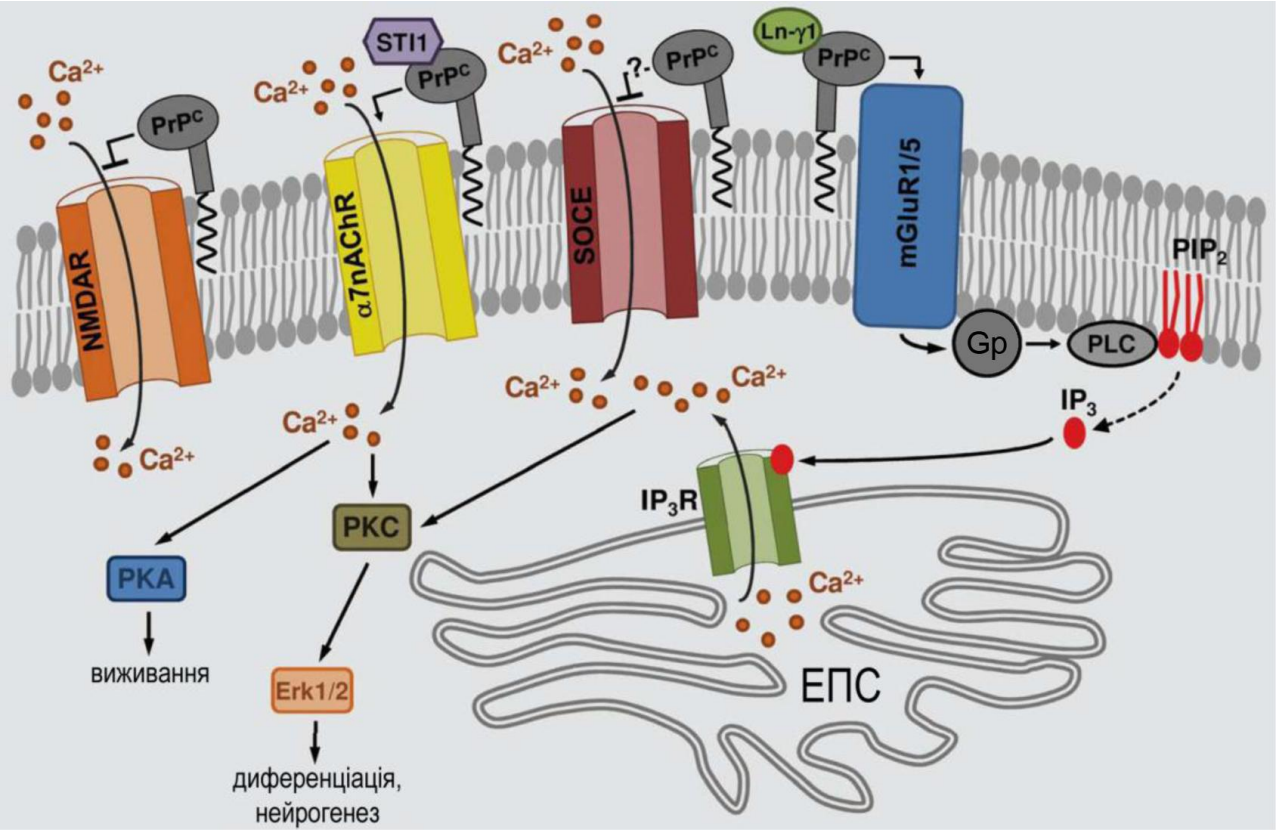


Рис. 1.2. Взаємодія PrP^C із Ca^{2+}-транспортувальними системами нейронів [30]

Описано аналогічний механізм взаємодії PrP^C з позаклітинним стресіндукованим протеїном 1 (STI_1) [99, 100]. Комплекс PrP^C -STI_1 активує α_7 нікотиновий рецептор ацетилхоліну (α_7nAChR) Ca^{2+}-каналу. У результаті збільшується концентрація цитозольного Ca^{2+}, внаслідок чого відбувається диференціювання нейронів або їх виживання, залежно від способу надходження Ca^{2+}: за опосередкованою участю мітоген-активованої кінази (MAPKs) $Erk_{1/2}$ чи протеїнкінази A (PKA), відповідно [101] (рис. 1.2).

Підвищення рівня Ca^{2+} може впливати на здатність PrP^C регулювати експресію генів через активацію різних сигнальних шляхів [21, 102, 103]. Використання методів протеоміки та транскриптоміки допомогло встановити, що PrP^C впливає на рівень експресії Ca^{2+}-зв'язувальних протеїнів [16, 104–105].

Порівняння механізмів Ca^{2+}-обміну у нейронах мозочка нормальних та PrP-нокаутованих тварин показало, що у нейронах останніх підвищений вміст Ca^{2+} у цитоплазмі та зменшений в ЕПС корелює зі зниженою активністю двох основних транспортувальних систем Ca^{2+} (PMCA та SERCA) [106, 107]. Нейрони PrP-нокаутованих тварин також експресують меншу кількість протеїну Orai-2, який є пороутворювальною субодиницею депокерованих Ca^{2+}-каналів (SOCE). Щоб пояснити цей парадокс можна припустити можливість активуючої взаємодії PrP^C з певними компонентами депокерованих (SOCE) Ca^{2+}-каналів, за подібним до вищезгаданих механізмом, яка відбувається у нейронах нормальних тварин [30, 108] (див. рис. 1.2).

Подібні результати щодо пріонної регуляції Ca^{2+}-каналів отримали *M. Sorgato* та *A. Bertoli* (2009) [21]. Вони представлені на рис. 1.3. Ймовірно, пріонної регуляції зазнають також Ca^{2+}-АТФ-аза (SERCA) та Ca^{2+}-канали, чутливі до інозитолтрифосфату (IP_3R) або ріанодину (RyR), як описано вище. Чорна зірочка на рис. 1.3 вказує на активацію процесів, які зазвичай відбуваються, коли Ca^{2+} надходить у клітину через потенціалкеровані Ca^{2+}-канали (VGCC) або рецепторкеровані з рецепторами глутамату (GluR). Це відкриває Ca^{2+}-активовані K^+-канали (CaKC) в постсинаптичній мембрані й обумовлює злиття синаптичних везикул у пресинаптичній мембрані.

Червона зірочка на рис. 1.3 вказує на активацію депокерованих Ca^{2+}-каналів (SOCE) та вивільнення Ca^{2+} із депо ЕПС. Крім того, виявлена експресія Ca^{2+}-кальмодулін-залежної кінази II (CaMKII) і фосфатази кальциневрину (CAN) у дослідах на моделях пріонних захворювань [21]. Навпаки, нема інформації щодо функціонування Na^+–Ca^{2+}-обмінника (NCX) та Ca^{2+}-АТФ-ази плазматичної мембрани (PMCA).

У культурі PrP^{Sc}-інфікованих нейронів, а також в ураженому мозку тварин виявлено електрофізіологічні порушення та дисфункцію синапсів [109].

Оскільки ці процеси пов'язані з іонами кальцію, то їх розлади можна інтерпретувати як наслідки порушення гомеостазу Ca^{2+}, що, в свою чергу, є причиною когнітивних патологій під час пріонних захворювань [90, 110–115].

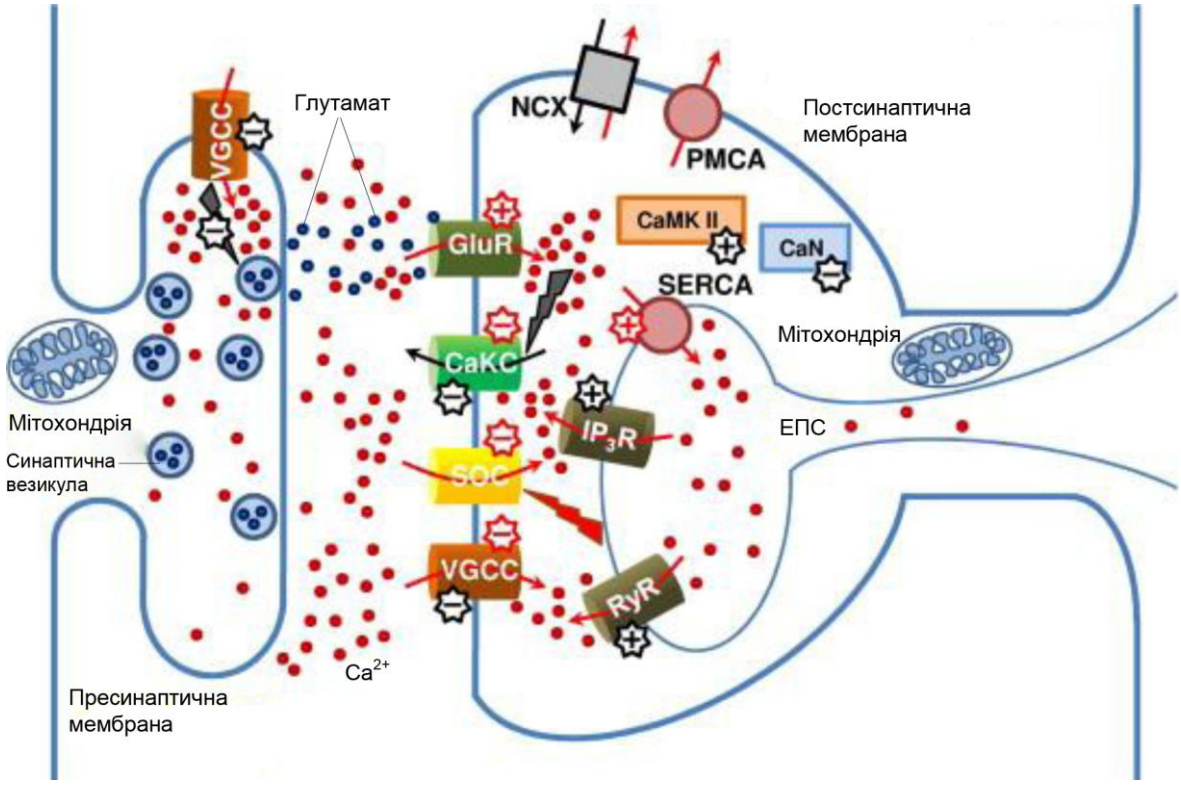


Рис. 1.3. Узагальнююча схема пріонної регуляції Ca^{2+}-каналів (зірочками вказано Ca^{2+}-канали, які інгібуються (-) або активуються (+) PrP^{C} (чорне забарвлення) чи за його відсутності (червоне)) [21]

Реєстрація біопотенціалів мозку PrP-нокаутованих мишей підтвердила функціональну роль клітинного пріона у синаптичній передачі інформації. Зокрема, досліджували CA_1-ділянки гіпокампу, в яких виявлено більшість пріон-індукованих синаптичних порушень. Переважна більшість досліджень вказує на позитивну кореляцію між рівнем експресії клітинного пріона та загальною силою глутаматергічної передачі в нейронах гіпокампу [101]. Поряд зі зменшенням гіперполяризації, яку спостерігають у гіпокампіальних CA_1-нейронах і клітинах Пуркіньє PrP-нокаутованих мишей, відбувається зниження Ca^{2+}-залежної K^{+}-провідності [116, 117]. Зменшення гіперполяризації

також виявили у пірамідальних нейронах після пре- та постнатальної делеції гена клітинного пріона. Тобто за наявності останнього гіперполяризація нейронів зростає, як і активність Ca^{2+}-залежних K^{+}-каналів.

У PrP-нокаутованих мишей виявлено нейробіологічні патології, які залежать від формування та функціонування синапсів. На зрізах CA_1-ділянки гіпокампу цих мишей встановлено послаблене довготривале потенціювання, залежність рівня Ca^{2+} від γ-аміномасляної кислоти (ГАМК), що впливає на швидкість пресинаптичного інгібування [68, 61, 118–120]. Це допомогло підтвердити, що відсутність PrP^{C} сприяє ушкодженню синапсів і дегенерації нейронів, які спостерігали під час пріонних захворювань. Інші дані показують, що за відсутності PrP^{C} не змінюється нейронна збудливість, синаптична передача та довготривале потенціювання у клітинах гіпокампу [121], а також ГАМК і глутамат-рецептор-опосередковані струми мембран клітин Пуркіньє [106]. Аналіз ділянки CA_1 гіпокампу PrP-нокаутованих і нормальних мишей показав, що посттетанічне та довготривале потенціювання за відсутності PrP^{C} залежить від віку тварин [122, 123]. Одночасно з цим, порушення електричної чутливості синаптичної передачі й довготривалого потенціювання спостерігали у клітинах мозочка PrP-нокаутованих тварин на ранніх стадіях онтогенезу. Це пов'язано із пізнім дозріванням цих клітин, а не безпосередньою участю PrP^{C} у регулюванні синаптичних функцій [124]. Дослідження електрофізіологічних особливостей цієї ділянки мозку виявили значне зниження повільної слідової гіперполяризації пірамідальних клітин PrP-нокаутованих тварин, порівняно з нормальними нейронами [20, 61, 125–126]. Слідова гіперполяризація відбувається завдяки каскаду потенціалів дії, що спричинені деполяризуючими імпульсами за участю Ca^{2+}-активованих K^{+}-каналів [127]. Тобто ці канали мали знижену активність у нейронах PrP-нокаутованих тварин [61]. Таке порушення пояснювали зниженням надходження Ca^{2+} через потенціалкеровані Ca^{2+}-канали N-типу [20] або збільшеною активністю SERCA. У клітинах Пуркін’є мозочка PrP-нокаутованих тварин також виявлено зниження деполяризації, що спричинене цитозольним Ca^{2+} та зміною Ca^{2+}-активованих K^{+}-каналів [117]. Також встановлено зменшення Ca^{2+}-відповіді у PrP^{Sc}-інфікованих нейронах, яке

обумовлене наявністю фібрилогенних нейротоксичних пептидів, що містять 106–126-PrP-амінокислотні залишки (PrP (106-126)) [83, 128]. Це спричинено інгібуванням потенціалкерованих Ca^{2+}-каналів N-типу внаслідок взаємодії з PrP-амінокислотними залишками (106-126) [41, 129–131].

Отже, клітинний пріон залучений у регуляцію транспорту Ca^{2+}. Доведена його здатність впливати на роботу Ca^{2+}-каналів внаслідок прямої чи опосередкованої взаємодії з рецепторами, що у кінцевому результаті забезпечує найрозахисну функцію. Крім того, PrP^C бере участь у функціонуванні синапсів і нейропередачі у процесі екзо-ендоцитотичного циклу синаптичних міхурців.

1.3. Пріонні нейропатології та гомеостаз Ca^{2+}

Відомо, що нейродегенеративні захворювання характеризується різними нейропатологічними ознаками, однією з яких є утворення амілоїдних комплексів (амілоїд β, зокрема $Aβ_{1-42}$- і $Aβ_{1-40}$-фрагменти) [132, 133]. Ці комплекси є агрегатами неправильно упакованих протеїнів [18, 47, 98]. Встановлено також генетичний зв'язок між хворобами Альцгеймера і Крейтцфельдта-Якоба, оскільки підтверджено наявність PrP^C в Aβ-амілоїдах [134]. Варто зазначити, що Met/Val129-поліморфізм PrP-гена розглядають як можливий фактор виникнення ранніх етапів хвороби Альцгеймера [135, 136]. Пептиди $Aβ_{1-42}$ і $Aβ_{1-40}$ утворюються під час амілоїдогенного каскаду, в якому попередник, трансмембранний протеїн амілоїда, послідовно протеолізується ферментами β- і γ-секретазою [48, 137]. Фізіологічна роль мономерних пептидів Aβ повністю не з’ясована. Дослідження показали, що розчинні олігомери Aβ (зокрема, $Aβ_{1–42}$) можуть бути основними медіаторами когнітивних порушень, пов'язаних зі збудливістю синаптичної передачі та пластичності в уразливих ділянках мозку, зокрема гіпокампі [138–140]. Припускають, що нейротоксична дія олігомерів Aβ у синапсах полягає у порушенні рівноваги між довготривалим потенціюванням і довготривалою депресією, що спричинена

підвищенням рівня цитозольного Ca^{2+} через вивільнення із депо [141–143]. Згідно з гіпотезою, ці порушення є наслідком зміни нейронної Ca^{2+}-сигналізації з подальшими розладами, що пришвидшують апоптоз нейронів [144].

Дисфункція синапсів залежить від дії PrP^{Sc}-олігомерів і пов'язана з утворенням іон-проникних каналів мембран клітин. Крім того, припускають, що патологічні пріони (або пріон-подібні агрегати) спричиняють порушення функціонування іонних каналів [97, 145, 146]. Вважають, що мозок модельних PrP^{Sc}-інфікованих тварин може нагромаджувати значну кількість агрегованих PrP^{Sc}, не проявляючи дегенеративних симптомів [43].

Відомо, що деградація синапсів відбувається на початку процесу захворювання і корелює з когнітивними порушеннями [30, 133]. Дані, що підтверджують порушення функціонування синапсів, отримані на моделях тварин з пріонними захворюваннями. Під час дослідження синаптосомних препаратів гіпокампа показано, що порушується гомеостаз кальцію в синапсах на ранніх стадіях дегенерації нейронів, можливо, через дисфункцію мембранних іонних транспортерів [61]. Натомість у синаптосомах кори головного мозку щурів установлено порушення транспортування глюкози і глутамату, як наслідок пероксидного окиснення ліпідів мембран [126]. Крім того, у синаптосомах PS-1-мутантних (трансгенних) мишей встановлено порушення гомеостазу кальцію, яке супроводжується підвищенням деполяризації і зростанням рівня внутрішньоклітинного кальцію [147–149]. Як відомо, пресенілін 1 (PS-1) і пресенілін 2 (PS-2) є інтегральними мембранними протеїнами, які є еволюційно консервативними й експресуються в багатьох типах клітин, проте, у нейронах головного мозку виявлено їх високий вміст.

В експериментах *in vivo* показано, що під час нагромадження амілоїдних протеїнів у гіпокампі та корі головного мозку мишей відбувається порушення функціонування синапсів. Показано, що довгострокове потенціювання синаптичної передачі у гіпокампі значно порушується у старих PrP^{Sc}-інфікованих мишей, порівняно з мишами дикого типу відповідного віку. Є відомості, що синаптична пластичність змінюється у гіпокампі PS-1-мутантів через підвищення рівня кальцію на пресинаптичній мембрані та виділення

глутамату [150]. В іншому дослідженні синаптичної функції гіпокампу було показано, що пізня гіперполяризація CA_3-пірамідальних нейронів була вищою в PS-1-мутантних мишей, порівнянно диким типом [151]. Тобто під час пріонної патології у синапсах порушується гомеостаз кальцію.

Є прямий зв'язок між PrP^C і Aβ, оскільки PrP^C діє як рецептор для олігомерів Aβ [152, 153]. Це дослідження показало, що $Aβ_{1-42}$ олігомери зв'язуються з PrP^C з високою селективністю, внаслідок чого виникає Aβ-індуковане синаптичне інгібування і зниження довготривалого потенціювання. Однак подальші дослідження не підтвердили участі комплексу PrP^C-Aβ у зниженні довготривалого потенціювання і когнітивних порушеннях [137, 154, 155].

Використання Ca^{2+}-чутливих зондів “Aequorins” допомогло дослідити роль амілоїдних протеїнів (агрегатів PrP^{Sc}) у порушенні гомеостазу Ca^{2+} у цитоплазмі, просвіті ЕПС і матриксі мітохондрій [69]. Зокрема, під час зараження культури клітин нейронів очищеним PrP^{Sc} відбувається значне збільшення рівня цитозольного Ca^{2+} через вивільнення цих іонів з депо ендоплазматичної сітки (ЕПС) і надходження ззовні через Ca^{2+}-канали [156]. У результаті збільшується концентрація кальцію в матриксі мітохондрій і завдяки циклофіліну D (CypD) відбувається відкриття мітохондріальної пори (mPTP).

Це спричиняє ушкодження ультраструктури мітохондрій та призводить до зміни окисно-відновного балансу з подальшим виділенням активних форм оксигену, у результаті чого порушується синтез АТФ [69, 157] і відбувається ініціювання апоптозу [19, 158–159]. У цьому разі кальцій вивільняється із депо мітохондрій. Нарешті, дефіцит енергії і виділення проапоптичних протеїнів з ушкоджених мітохондрій призводить до загибелі нейронів через гіперактивацію кальційзалежної фосфатази кальциневрину [91, 160, 161]. Тобто, порушення кальцієвого обміну внаслідок зміни співвідношення концентрації Ca^{2+} у різних компартаментах клітини призводить до патологічних змін [23, 84]. Крім того, встановлено, що виникнення пріонних інфекцій та експресія схильних до неправильної конформації PrP^C-мутантів корелюють зі зниженням кількості Ca^{2+} в ЕПС і експресією антистресових протеїнів [156].

Проте до кінця не з'ясовано причину виникнення протеїнової відповіді. Очевидно, вона зумовлена порушенням Ca^{2+}-регуляції в ЕПС або нагромадженням неправильно упакованих протеїнів.

Варто відзначити, що активації глутаматергічних NMDA-рецепторів у патогенезі нейродегенерацій різного генезу надається особливе значення. За нормальних умов активація NMDA-рецепторів пов'язана з функціонуванням структур ЦНС і відіграє важливу роль у таких процесах, як навчання і пам'ять. Разом з іонами натрію, калію і хлору, кальцій бере участь у підтриманні трансмембранного електричного потенціалу, що забезпечує фізіологічні реакції гальмування і збудження. Іони кальцію є вторинним месенджером збуджуючих нейромедіаторів, зокрема глутамату і катехоламінів. Впливаючи на протеїнкіназну систему, іони кальцію сприяють підвищенню концентрації цАМФ. Останній активує катаболітичні процеси, гліколіз і окиснення ліпідів. Крім того, внутрішньоклітинні іони кальцію опосередковано, через регуляцію синтезу мембранних протеїнів, впливають на ріст дендритів і синаптогенез, що визначає функціональну активність нейронів відповідно до змін умов зовнішнього середовища [22, 24, 25].

Однак за патологічних станів надлишкова тривала активація NMDA-рецепторів призводить до загибелі нейронів. Зокрема, для пріонних патологій характерна надмірна активація глутаматних рецепторів, що супроводжується надходженням в нейронах значної кількості іонів кальцію і натрію і призводить до деполяризації мембрани й активації потенціал-керованих кальцієвих каналів, що, в свою чергу, супроводжується ще більшим надходженням іонів кальцію в клітини [18, 23].

Результати досліджень патогенезу нейродегенерацій підтверджують деструкцію нейронів не лише у сірій речовині, ушкодження виявлено і у білій речовині [162–164], зокрема в олігодендроцитах, мієлінізованих клітинах ЦНС. Крім того, нейродегенеративні зміни супроводжуються порушенням гомеостазу кальцію, що призводить до деструкції олігодендроцитів унаслідок збільшення їх вразливості через вивільнення значної кількості глутамату [165].

Результати досліджень олігодендроцитів PS-1-мутантних мишей

підтверджують порушення гомеостазу кальцію, що сприяє ушкодженню білої речовини під час нейропатології. Такі олігодендроцити є більше чутливими до впливу глутамату та амілоїдних пептидів, порівняно з олігодендроцитами мишей дикого типу. В олігодендроцитах, які експресують мутантний PS-1, встановлено порушення регулювання гомеостазу кальцію, що призводить до їх загибелі. У результаті виникає когнітивна дисфункція, як і за пріонних патологій [165].

Є багато відомостей, що підтверджують взаємозв'язок запальних процесів із нагромадженням амілоїдних протеїнів і, як наслідок, дегенерацію нейронів [166]. Проте, невідомо, чи ці запальні процеси відбуваються у відповідь на нейрональну дегенерацію, чи вони активуються на початкових етапах захворювання. За наявності аномальних протеїнів мікрогліоцити активуються і виділяють запальні цитокіни, такі як фактор некрозу пухлин-α (ФНП-α) та інтерлейкін-1-β (IL-1-β) [167]. Активування мікроглії пов'язане зі збільшенням рівня Ca^{2+} [168]. Крім того, відомо, що мікрогліоцити експресують PS-1, а у мікрогліоцитах PS-1-мутантних мишей відбувається порушення гомеостазу кальцію і посилюється виділення запальних цитокінів, як відповідь на бактеріальний ліпополісахарид (ЛПС). Зокрема, зростає рівень експресії ФНП-α та інтерлейкінів (IL-1-α, IL-1-β, IL-1 та IL-6) у гіпокампі та корі головного мозку PS-1-мутантних мишей, порівнянно з мишами дикого типу. У культуральних мікрогліоцитах PS-1-мутантних мишей зростає чутливість до ЛПС, про що свідчить значне вивільнення оксиду нітрогену і активація мітоген-активованої протеїнкінази [169]. Крім того, у мікрогліоцитах відбувається вивільнення кальцію, що призводить до їх гіперактивації за умов запалення та сприяє розвитку нейродегенеративних процесів [170].

Кальцій відіграє важливу роль у регулюванні кількох функцій астроцитів, у тому числі виділення факторів росту, таких як брадикінін [171] і медіаторів, зокрема, глутамату і АТФ [172, 173, 174]. Крім того, внаслідок зміни рівня міжклітинного кальцію також передаються сигнали нейронів, які модулюють активність і зумовлюють виживання астроцитів [175]. На культурі клітин астроцитів виявлено, що за впливу амілоїдних протеїнів змінюється рівень

кальцію, що є наслідком збільшення амплітуди і швидкості виділення цього елемента.

Загалом, пріонні захворювання розпочинаються із формування PrP^{Sc}, даючи початок довгому пресимптоматичному періоду, в якому PrP^{Sc} нагромаджується в мозку. Це спричиняє стрес ЕПС і активацію системи UPR (від англ. unfolded protein response), яка знешкоджує неправильно упаковані протеїни.

Наслідком нагромадження пріонних комплексів є запалення мозку (у вигляді астроцитозу й активації мікроглії) й аутофагія. Обидва ці прояви спочатку є захисними механізмами, але пізніше сприяють загибелі нейронів мозку та вакуолізації (губкоподібній дегенерації). Першим ушкодженням, що призводить до помітних клінічних наслідків, є дисфункція синапсів. Вона супроводжується втратою дендритів і, як наслідок, нейронів. Кінцеві незворотні стадії захворювання характеризуються летальністю, що є наслідком порушення різних взаємопов’язаних метаболічних шляхів [85].

Отже, пріонні нейропатології супроводжуються порушенням гомеостазу Ca^{2+} внаслідок зміни функціонування Ca^{2+}-каналів. Внаслідок цього змінюються процеси довготривалого потенціювання та спостерігається дисфункція синапсів, що в результаті призводить до ушкодження нейронів і гліальних клітин та їхньої загибелі. Негативного впливу під час нейродегенерації зазнають також клітини мікроглії й астроцити, які нагромаджують амілоїдні протеїни. Цей процес пов'язаний із пероксидним окисненням ліпідів та призводить до збільшення вивільнення глутамату. Крім того, амілоїдні протеїни індукують продукцію запальних цитокінів в астроцитах та є потужним активатором мікроглії, стимулюючи виділення таких речовин, як оксид нітрогену і фактор некрозу пухлин.

Таким чином, у літературі є відомості про біохімічні особливості будови клітинного пріона, локалізацію у деяких тканинах нервової системи, описана його роль у підтриманні гомеостазу кальцію, зокрема регуляторний вплив на функціонування Ca^{2+}-каналів. Наявні результати окремих досліджень метаболізму кальцію у головному мозку тварин за умови пріонної

нейродегенерації, проте повністю відсутня інформація про вплив PrP^C на АТФ-ази, можливі кількісні зміни вмісту PrP^C у віковому аспекті та локалізацію у периферійних пріон-реплікувальних органах. Усе це зумовило постановку основних проблем, які необхідно вирішити в цій роботі:

- виявити онтогенетичні зміни загального вмісту PrP^C і його молекулярних глікоформ;
- з’ясувати тканинну локалізацію клітинного пріона в організмі щурів різного віку, зокрема, у довгастому мозку, мозочку, тонкому відділі кишечника, печінці, нирках, селезінці та м'язі;
- визначити активність та кінетичні показники іонних транспортерів у пріон-реплікувальних тканинах лабораторних щурів різного віку;
- встановити кореляційний зв’язок між онтогенетичними змінами вмісту клітинного пріона й активності АТФ-аз;
- провести дисперсійний аналіз, визначити частки впливу віку та тканинної локалізації на вміст клітинного пріона, активність ензимів, вміст іонів натрію, калію і загального кальцію.

РОЗДІЛ 2. ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

2.1. Вибір напрямів досліджень

Маніпуляції з тваринами проводили з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Ухвали першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Київ, 2006).

Дослідження проводили на самцях лабораторних щурів *Rattus norvegicus var. alba*, лінії *Wistar*, яких утримували у стандартних умовах віварію. Було сформовано три групи тварин віком 1, 6 та 30 місяців по дев'ять особин у кожній. Тварин декапітували під хлороформним наркозом, після чого відбирали тканини порожню кишку, селезінку, печінку, нирки, м'яз стегна, довгастий мозок і мозочок. Дослідження клітинного пріона проводили методом дот блот, вестерн блот та імуногістохімічного аналізів. У зразках тканин визначали активність іонних транспортерів, зокрема Na^+–K^+-АТФ-ази, Ca^{2+}-АТФ-ази ЕПС і Ca^{2+}-АТФ-ази ПМ, а також кінетичні параметри здійснюваного ними гідролізу АТФ. Проводили кореляційний аналіз між вмістом клітинного пріона й активністю досліджуваних ензимів та дисперсійний двофакторний аналіз. Будували моделі онтогенетичних змін визначених у роботі біохімічних показників. Схема досліджень представлена на рис. 2.1.

Рис. 2.1. Схема лабораторних досліджень

2.2. Визначення вмісту клітинного пріона

2.2.1. Приготування протеїнових екстрактів тканин. Відібрані зразки тканин спочатку гомогенізували на холоді, а потім лізували у спеціальному буфері (10% N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилмалеїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері, pH 7,4 з додаванням 0,001% суміші інгібіторів протеїназ (Sigma, Німеччина)) та центрифугували 2 хв за 12000 об./хв та +4^{0}С. До надосадової рідини додавали буфер Леммлі (Sigma, Німеччина), прогрівали протягом 5 хв за 95^{0}С [176]. У зразках об'ємом 0,4 мл визначали вміст протеїну методом Лоурі [177].

2.2.2. Дот блот аналіз загального вмісту PrP^C. Зразки з однаковою концентрацією протеїну наносили на полівінілдифторидну (PVDF) мембрану (Millipor, США), що перевіряли зафарбовуванням Понсо червоним. Мембрани інкубували з моноклональними первинними антитілами (Antibody mAB6H4; Prionics, Швейцарія) за +4°С упродовж 12 год, поліклональними вторинними козячими антимишиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, Німеччина) за +22°С упродовж 60 хв. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням субстрату для лужної фосфатази — CDP Star (Tropix, Великобританія). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки Retina XBM (Лізоформ медікал, Україна) та набору для проявки плівок (Kodak, Японія) [176]. Визначення вмісту клітинного пріона здійснювали за допомогою програми GelPro Ver. 1.5.

2.2.3. Вестерн блот аналіз молекулярних форм PrP^C. Проводили електрофорез у градієнтному (5–18%) поліакриламідному гелі (ПААГ) та електроблотинг протеїнів на PVDF-мембрану (Millipore, США). У кожну лунку ПААГ вносили зразки із однаковою концентрацією протеїну. Для контролю блотингу та визначення відносних молекулярних мас досліджуваних протеїнів використовували набір маркерів SeaBluePlus2 (Invitrogen, США). Після

електроблотингу мембрану витримували в 5% розчині знежиреного молока у ЗФРТ упродовж 60 хв. У подальшому мембрану інкубували з моноклональними первинними антитілами (Antibody mAB6H4; Prionics, Швейцарія) за +4°С упродовж 12 год, поліклональними вторинними козячими антимишачими антитілами, кон´югованими з лужною фосфатазою (Sigma, Німеччина) за +22°С упродовж 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) [176].

Вміст клітинного пріона визначали за допомогою програми GelPro Ver. 1.5 відносно вмісту α-тубуліну. Через значний вміст досліджуваного протеїну у довгастому мозку, селезінці, мозочку, зразки тканин розводили.

2.3. Імуногістохімічний аналіз тканин

Фіксування тканини, її промивання, зневоднення та формування парафінових блоків проводили за допомогою стандартної методики [178].

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

Зрізи промивали у ЗФРТ, pH 7,6 (0,05 М Tpic, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, H_2O). У подальшому їх інкубували з моноклональними первинними антитілами (Antibody mAB6H4; Prionics, Швейцарія) за +4°С упродовж 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 у

середовище (Aqueous permanent mounting medium; Dako, Данія). Гістологічні дослідження проводили за допомогою мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина). Контрольними вважали зрізи тканин, зафарбовані лише гематоксиліном.

Кількість клітинного пріона на гістопрепаратах визначали методом оцифрування фотографій тканин за однакового збільшення, використовуючи програму ВідеоТест 5.0 [179].

2.4. Дослідження активності та кінетичних параметрів АТФ-аз

2.4.1. Визначення активності Na^+–K^+-АТФ-ази. Зразки тканин гомогенізували упродовж 1–2 хв. на гомогенізаторі Omni GLH-220 у середовищі сахарози. У результаті центрифугування отримували мембранну фракцію тканин [180–182].

Активність Na^+–K^+-АТФ-ази визначали в інкубаційному середовищі (об'єм 1 мл) такого складу (мМ): 125 NaCl, 25 KCl, 5 $MgC1_2$, 5 АТФ, 1 ЕГТА, 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТФ-ази), 20 Hepes, 0,2% сапонін (пермеабілізатор мембран клітин), Tris-буфер (pH 7,4). Вміст протеїну у зразках визначали методом Лоурі [177]. Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням у реакційне середовище суспензії мембранного препарату (0,1 мл), а зупиняли додаванням 1 мл охолодженого розчину такого складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7% формальдегід, 14% етанол, 5% ТХО. Інкубували упродовж 10 хв.

Активність Na^+–K^+-АТФ-ази розраховували за різницею між активностями загальної та оуабаїннечутливої, яку визначали у середовищі 1 мМ оуабаїну (селективного інгібітора Na^+–K^+-АТФ-ази) [183] (Sigma, Німеччина).

Мірою активності була концентрація неорганічного фосфату ($Ф_н$), яку визначали спектрофотометрично (λ=660 нм) методом W. Rathbun [184] та виражали у мкмоль $Ф_н$ у перерахунку на 1 мг протеїну за 1 хв (мкмоль $Ф_н$/(мг протеїну×хв)). У контрольні зразки замість препаратів тканин вносили

бідистилят. Для визначення вмісту ендогенного $Ф_н$ замість інкубаційного середовища використовували фізіологічний розчин.

2.4.2. Визначення активності Ca^{2+}-АТФ-аз. Зразки тканин гомогенізували упродовж 1–2 хв на гомогенізаторі Omni GLH-220 у середовищі сахарози. У результаті центрифугування отримували мембранну фракцію тканин [180–182].

Активність Ca^{2+}-АТФ-аз визначали в інкубаційному середовищі (об'єм 1 мл) такого складу (мМ): 50 NaCl, 100 KCl, 5 $MgC1_2$, 5 АТФ, 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТФ-ази), 1 оуабаїн (інгібітор Na^+–K^+-АТФ-ази), 20 Hepes, 0,2% сапонін (пермеабілізатор мембран клітин), Tris-буфер (pH 7,4).

Вміст протеїну у зразках визначали методом Лоурі [177]. Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням у реакційне середовище суспензії мембранного препарату (0,1 мл), а зупиняли додаванням 1 мл охолодженого розчину такого складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7% формальдегід, 14% етанол, 5% ТХО. Інкубували упродовж 10 хв.

Активність Ca^{2+}-АТФ-ази плазматичної мембрани (ПМ) обчислювали за різницею між активностями, які визначали у середовищі 1 мкМ тапсигаргіну (Sigma, Німеччина) за наявності та відсутності Ca^{2+}, тоді як Ca^{2+}-АТФ-азу ендоплазматичної сітки (ЕПС) – за різницею між активностями, які визначали у середовищі з іонами кальцію за відсутності та наявності тапсигаргіну. Мірою активності була концентрація неорганічного фосфату, яку визначали спектрофотометрично (λ=660 нм) методом W. Rathbun і виражали у мкмоль $Ф_н$ у перерахунку на 1 мг протеїну за 1 хв (мкмоль $Ф_н$/(мг протеїну×хв)) [184]. У контрольні зразки замість препаратів тканин вносили бідистилят. Для визначення вмісту ендогенного $Ф_н$ замість інкубаційного середовища використовували фізіологічний розчин.

2.4.3. Визначення кінетичних параметрів ензимів. Кінетичні властивості ензиматичної реакції досліджували у стандартному середовищі інкубації, яке модифікували за фізико-хімічними характеристиками або

складом певних компонентів (час інкубації, вміст протеїну, концентрація АТФ, Na^+, K^+, Ca^{2+}). Вивчення властивостей АТФ-азної ферментативної реакції проводили на основі початкової швидкості V_0 (лінійність нагромадження продукту неорганічного фосфату ($Ф_н$) з часом). Визначали уявні кінетичні параметри, які характеризують реакцію вивільнення $Ф_н$ під час гідролізу АТФ – максимальну миттєву швидкість реакції (V_0), максимальну (платову) кількість реакції (P_{max}) та час реакції (період напівнасичення) (τ). Крім того, визначали константу Міхаеліса ($К_m$АТФ) за умов насичення субстратом (АТФ) та початкову максимальну швидкість реакції гідролізу (V_{max}) методом Лайнуївера–Берка [185]. Отримані концентраційні залежності швидкості ензиматичної реакції від досліджуваних реагентів реакції гідролізу будували в координатах: {1/V від 1/S}, де S – концентрація реагенту, а V – швидкість ензиматичного гідролізу АТФ за певної концентрації. Рівняння лінійної функції, що найкраще апроксимує експериментальні дані, розраховували із використанням методу найменших квадратів.

2.5. Визначення вмісту іонів натрію і калію

Вміст іонів натрію і калію визначали, використовуючи комерційні набори фірми Фелісіт-Діагностика (Україна) [186].

Визначення вмісту Na^+ ґрунтується на взаємодії іонів натрію з іонами уранілацетату, внаслідок чого утворюється нерозчинний уранілацетат натрію. Залишковий уранілацетат взаємодіє з тіогліколятом амонію з утворенням забарвленого комплексу, оптичну густину якого визначали спектрофотометрично (λ=405 нм). Інтенсивність забарвлення реакційної суміші обернено пропорційна концентрації іонів у досліджуваному розчині. Вміст Na^+ визначали за формулою:

$$C = \frac{E_К - E_Д}{E_К - E_{Кал}} \times 150 \text{ ммоль/л,}$$

де С – концентрація Na^+, ммоль/л;

$E_к$ – оптична щільність контрольної проби, од. опт. щільності;

$E_д$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{кал}$ – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності;

150,00 – вміст Натрію у калібрувальному розчині, ммоль/л.

Визначенн вмісту K^+ ґрунтується на здатності взаємодіяти з іонами тетрафенілборату у лужному середовищі з утворенням суспензії тетрафенілборату калію. Оптичну густину останньої визначали спектрофотометрично (λ=578 нм). Вона пропорційна концентрації іонів калію. Вміст K^+ визначали за формулою:

$$C = \frac{E_Д}{E_К} \times 5 \text{ ммоль/л,}$$

де С – концентрація іонів калію, ммоль/л;

$E_д$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_к$ – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності;

5,00 – вміст Калію у калібрувальному розчині, ммоль/л.

У контрольні зразки замість препаратів тканин вносили бідистилят.

2.6. Визначення вмісту загального кальцію

Визначення вмісту загального кальцію проводили за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра С-115М [176].

2.7. Статистичне опрацювання результатів

Для оцінки вірогідної різниці між статистичними характеристиками альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця за показника $P<0,05–0,001$ [187].

Для виявлення залежності між вмістом клітинного пріона, активністю АТФ-аз, вмістом Na^+, K^+ і кальцію проводили кореляційний аналіз, використовуючи коефіцієнт кореляції Пірсона (r).

Для встановлення впливу віку (часу) та тканинної локалізації на значення досліджуваних параметрів проводили двофакторний дисперсійний аналіз, визначали частки впливу цих факторів на тлі дії чинників, які не враховані в експериментах.

Проводили побудову площин, які відображають кількісні онтогенетичні зміни досліджуваних показників (максимальні та мінімальні точки), використовуючи експериментальні дані та програму Statistica. Статистичне опрацювання результатів проводили за допомогою програм Excel та Origin.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вміст клітинного пріона в органах щурів різного віку

3.1.1. Загальний вміст клітинного пріона у тканинах щурів, визначений методом дот блот аналізу. Пріонні інфекції або ТСЕ – це летальні захворювання центральної нервової системи людини і тварин, збудником яких є інфекційний пріон (PrP^{Sc}) [1–5]. Відомо, що ТСЕ можуть виникати не лише внаслідок інфікування пріоном, але й спорадично з невідомих причин в осіб зрілого віку [2]. Тому одним із поставлених завдань було визначення вікової динаміки клітинного пріона у тканинах організму.

На основі результатів дот блот аналізу встановлено, що у порожній кишці вміст PrP^{C} зростав у шестимісячних тварин на 51 %, порівняно з одномісячними, тоді як у тридцятимісячних – знижувався на 36 %, порівняно зі шестимісячними, але зростав на 25 %, порівняно з одномісячними (рис. 3.1).

Подібну закономірність спостерігали у селезінці. Вміст PrP^{C} підвищився у 2 рази у тканині зрілих тварин, порівняно з молодими, а в старих – навпаки, знизився на 50 %, порівняно зі зрілими та вірогідно не змінювався порівняно з молодими (рис. 3.2).

У печінці зрілих щурів уміст пріон-протеїну підвищився на 5 %, порівняно з молодими, тоді як у старих – знизився на 36 %, порівняно зі зрілими та на 32,5 %, порівняно з молодими (див. рис. 3.2).

У нирках загальний вміст PrP^{C} поступово знижувався (на 44 та 14 %, а також на 40 %) з віком лабораторних тварин (див. рис. 3.2).

У стегновому м'язі вміст PrP^{C} незначно підвищився (на 7 %) у зрілих тварин, порівняно з молодими, та знизився у старих – на 30%, порівняно зі зрілими і на 24,5 % порівняно з молодими (рис. 3.3).

Вміст PrP^{C} у довгастому мозку зрілих щурів суттєво підвищився – у 3,3 ($P<0,001$) разу, порівняно з молодими. У тканині старих тварин вміст

досліджуваного протеїну знизився у 2 рази, порівняно зі зрілими, проте був на 41,7 % вищим порівняно з молодими (рис. 3.3).

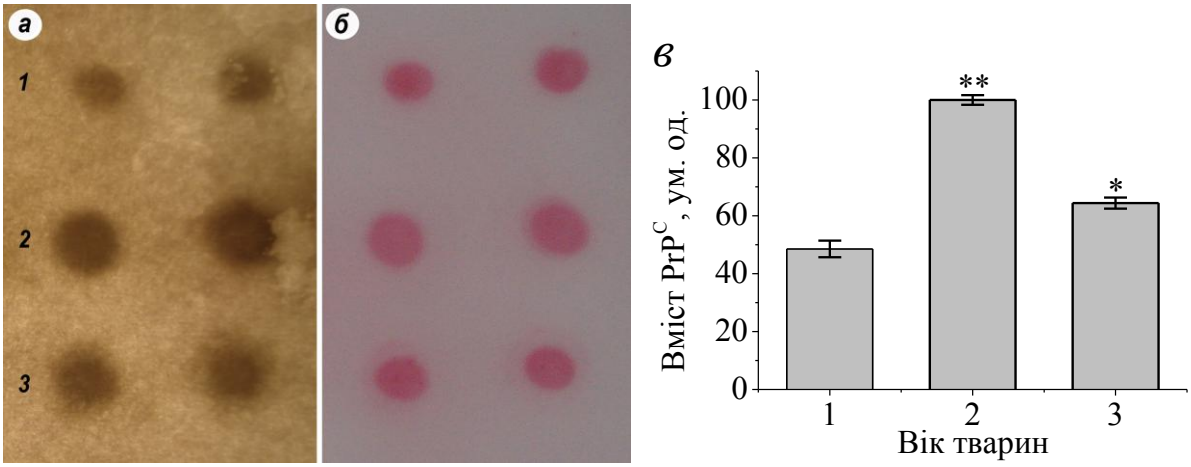


Рис. 3.1. Вміст PrP^C у порожній кишці щурів різного віку: *а* – дот блот, *б* – вміст загального протеїну (зафарбовано понсо червоним), *в* – гістограма; 1 – один, 2 – шість, 3 – тридцять місяців;

Примітки: (тут і надалі у цьому підрозділі M ± m; n=3; * (#) – P < 0,05; ** (##) – P < 0,01; *** (###) – P < 0,001, * – друга вікова група порівняно з першою, третя – з другою, # – третя порівняно з першою)

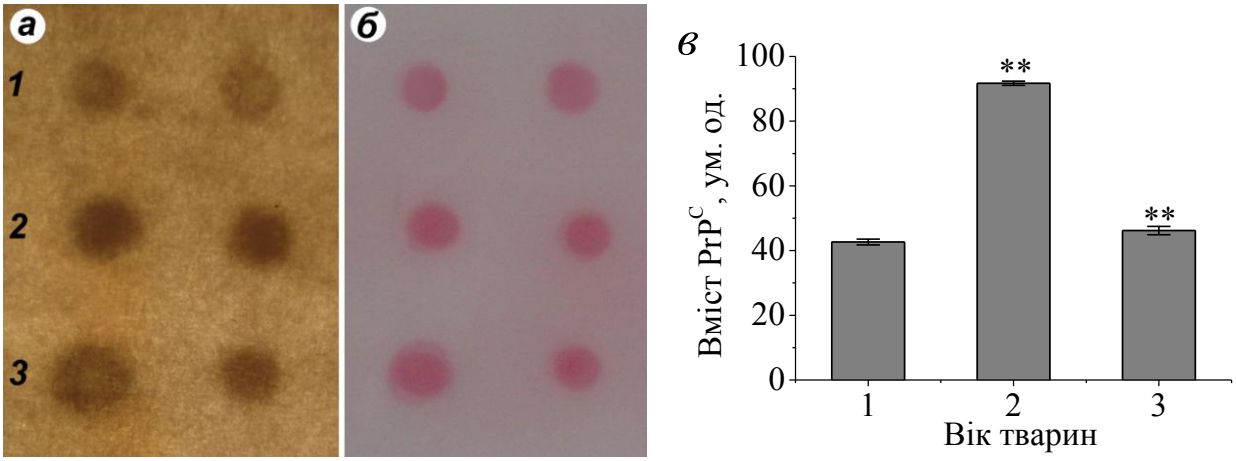
Щодо мозочка, то у цій тканині рівень PrP^C вірогідно не змінювався зі збільшенням віку щурів (рис. 3.3).

Загальний вміст PrP^C у досліджуваних пріон-реплікувальних органах одномісячних тварин зменшувався у такій послідовності: порожня кишка (48,54 %), нирки (42,96 %), селезінка (42,64 %), мозочок (40,75 %), печінка (38,62 %), довгастий мозок (29,38 %), стегновий м'яз (15,92 %; рис. 3.4 *а*).

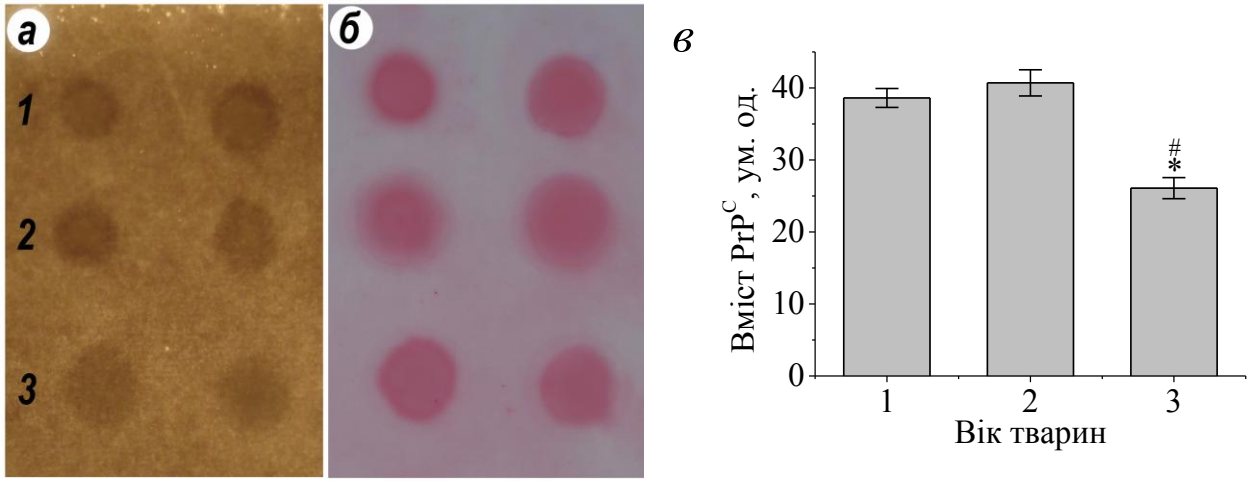
У шестимісячних щурів рівень PrP^C знижувався у такій послідовності: порожня кишка (100 %), довгастий мозок (97,41 %), селезінка (91,72 %), мозочок (52,63 %), печінка (40,71 %), нирки (29,84 %), стегновий м'яз (17,14 %; рис. 3.4 *б*).

У тридцятимісячних тварин ця послідовність була такою: порожня кишка (64,37 %), довгастий мозок (50,38 %), селезінка (46,19 %), мозочок (41,32 %),

Селезінка



Печінка



Нирки

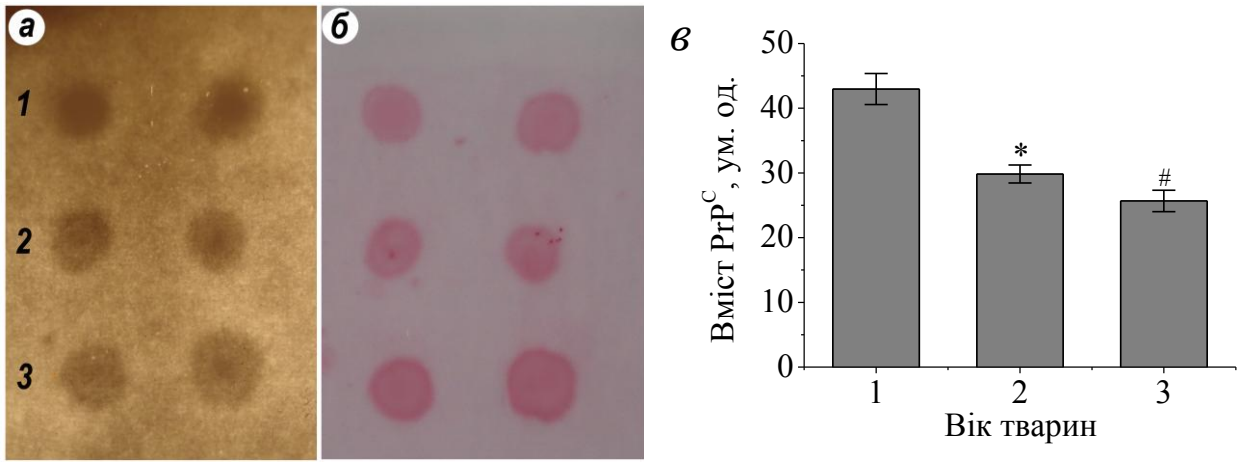
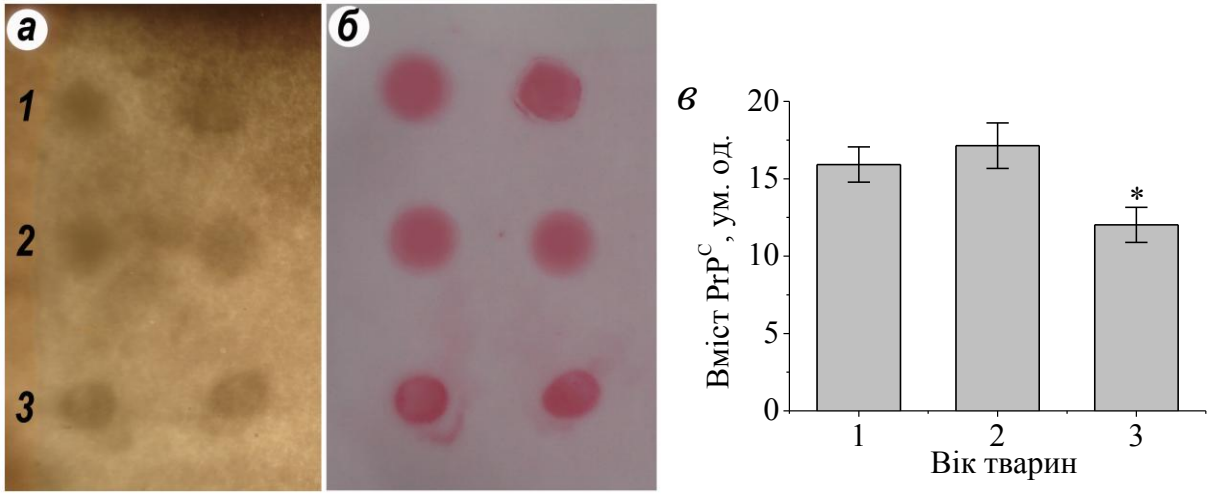
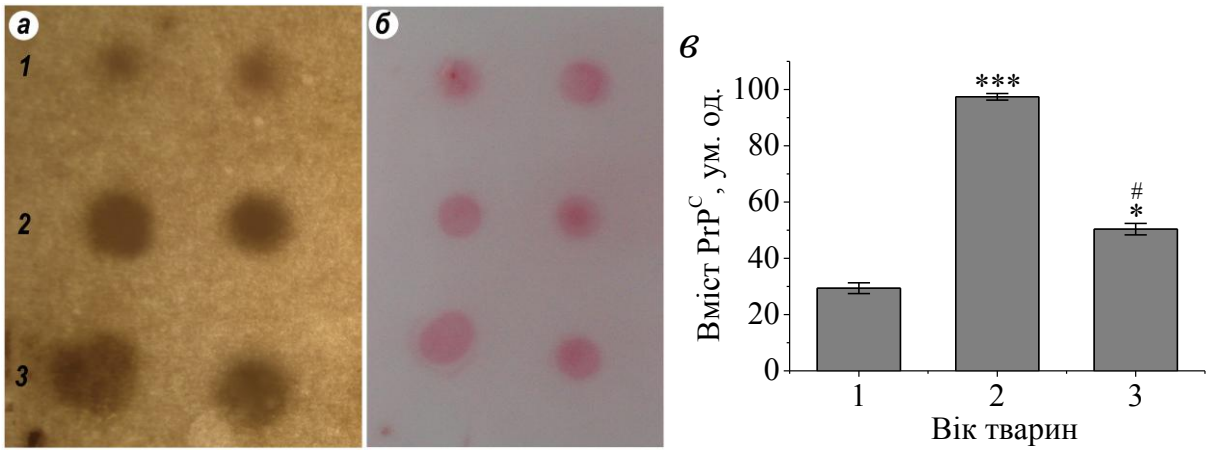


Рис. 3.2. Вміст PrP^C у тканинах щурів різного віку: *а* – дот блот, *б* – вміст загального протеїну (зафарбовано понсо червоним), *в* – гістограма; 1 – один, 2 – шість, 3 – тридцять місяців

Стегновий м'яз



Довгастий мозок



Мозочок

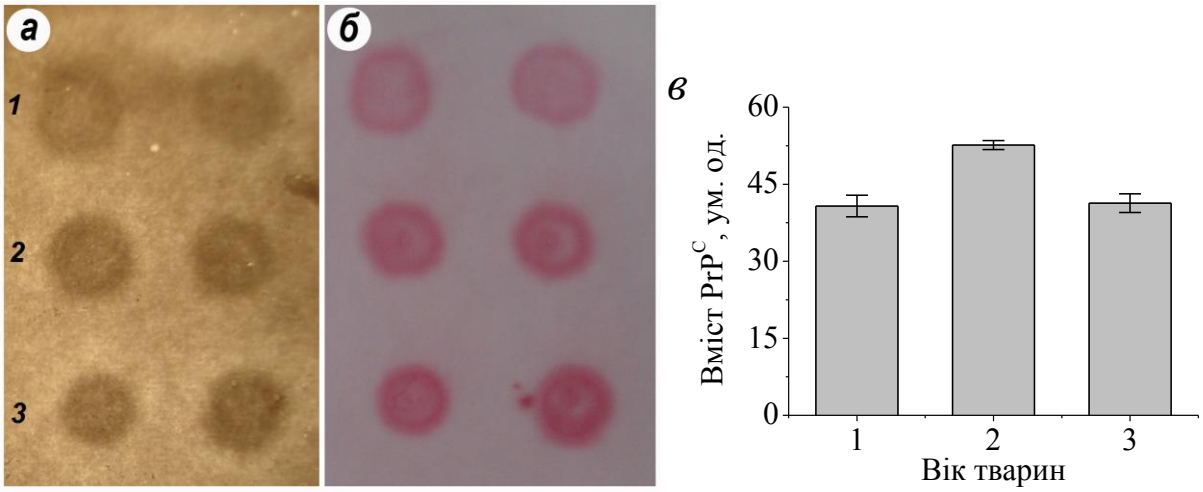


Рис. 3.3. Вміст PrP^C у тканинах щурів різного віку: *а* – дот блот, *б* – вміст загального протеїну (зафарбовано понсо червоним), *в* – гістограма; 1 – один, 2 – шість, 3 – тридцять місяців

печінка (26,08 %), нирки (25,67 %), стегновий м'яз (12,07 %; рис. 3.4 *в*).

Подібні результати отримали Х. Я. Майор та спів. [31, 188], проте найбільший вміст PrP^C відзначався у тканині селезінки (прийнято за 100 %), у тонкому кишечнику він становив 91 % від вмісту у селезінці.

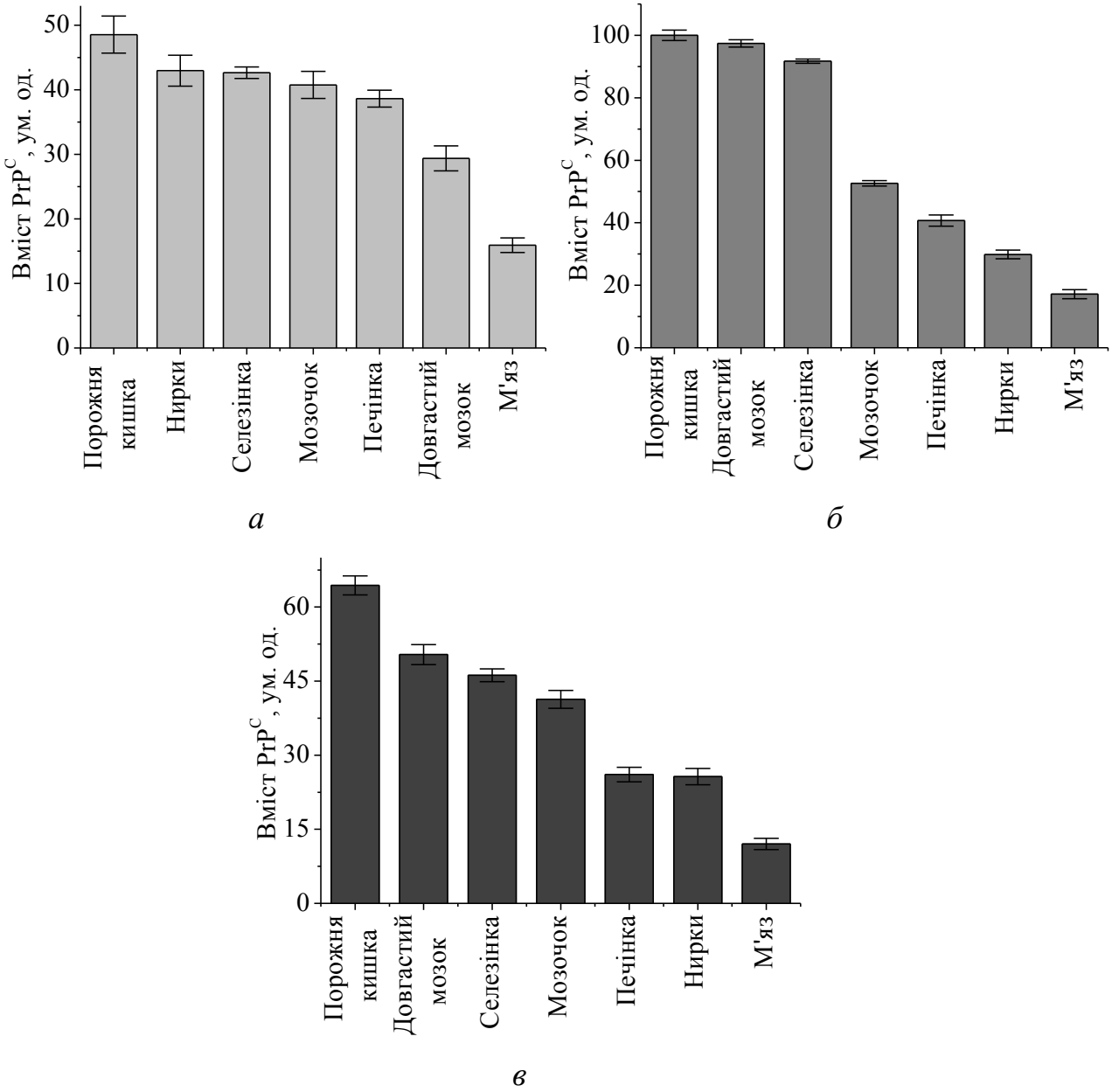


Рис. 3.4. Загальний вміст PrP^C у тканинах щурів різного віку: *а* – один, *б* – шість, *в* – тридцять місяців

Найнижчий рівень PrP^C був зафіксований у скелетних м’язах – ~ на 30 % менше, ніж у селезінці.

Отже, загальний вміст PrP^C є незначним у досліджуваних тканинах