

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

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

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Інституті біології тварин НААН.

Науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор,
академік НААН, заслужений діяч науки і техніки
України
ВЛІЗЛО Василь Васильович, Інститут біології
тварин НААН, директор.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, членкор НАН
України
СТОЙКА Ростислав Стефанович, Інститут біології
клітини НАН України, завідувач відділу регуляції
проліферації клітин і апоптозу;

доктор біологічних наук, професор
РИБАЛЬЧЕНКО Володимир Корнійович,
Київський національний університет імені Тараса
Шевченка МОН України, завідувач Науково-
дослідного сектору «Мембранології і цитології»
Навчально-наукового центру «Інститут біології».

Захист відбудеться "31" грудня 2017 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01 в Інституті біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

Автореферат розісланий

" 29 " грудня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. І. Віщур

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Трансмисивні спонгіоформні (губчастоподібні) енцефалопатії (ТСЕ) – це зоонози, спричинені збудниками протеїнової природи – пріонами (PrP), які реєструються у тварин і людини. Під час їх розвитку відбуваються губчастоподібні зміни тканин органів центральної нервової системи (Вербицький П. І., 2005; Prusiner S. B., 1993; Hegde R. S. et al., 1999).

У патогенезі пріонних інфекцій важливу роль відіграє не лише патологічний або інфекційний пріон (PrP^{Sc}), а й клітинний (PrP^C), який може бути субстратом для перетворення у PrP^{Sc} (Влізло В.В., 2002). Патологічний пріон спричиняє виникнення хвороби лише за наявності клітинного пріона, що підтверджують результати експериментів на мишах, у яких за видалення пріон-протеїну інфекція не розвивається (Bueler H. et al., 1993).

Клітинний пріон 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 (Westergard L. et al., 2007; Linden R. et al., 2008). Зважаючи на ці дані, можна припустити, що пріон-індуковані нейродегенерації виникають унаслідок порушення різних ланок метаболізму не лише через наявність PrP^{Sc} (через токсичність його амілоїдних комплексів), а й через втрату PrP^C його функції у результаті конверсії в патологічну форму.

На основі результатів багатьох досліджень клітинних моделей пріонних інфекцій встановлено зв'язок між пріонною патологією та порушенням Ca²⁺-обміну (Demuro A. et al., 2005; Fuhrmann M. et al., 2006; Ferreira E. et al., 2008; Sorgato M.C. et al., 2009). Підтримання гомеостазу Ca²⁺ має важливе значення для фізіологічного функціонування нейронів, які є найбільше чутливими до зміни концентрації внутрішньоклітинного Ca²⁺. Проте, незважаючи на дослідження фізіологічної ролі PrP^C у метаболізмі клітини, участь пріона у регуляції транспортування Ca²⁺ є мало вивченою. Зокрема, є відомості про регуляцію клітинним пріоном проникності Ca²⁺-каналів (Whatley S. A. et al., 1995; Peggion C. et al., 2011), але не встановлена роль цього протеїну у функціонуванні Ca²⁺-АТФ-аз на різних етапах онтогенезу.

Нейродегенерації супроводжуються утворенням PrP^{Sc} із його клітинного попередника не лише у клітинах нервової системи, а й також у периферичних пріон-реплікувальних органах. Очевидно, що поширення інфекції залежить від рівня продукції PrP^C у тканинах організму. Є відомості про його наявність у різних органах (Влізло В. В. зі співавт., 2008; Peralta O. A. et al., 2009), проте вміст і тканинна локалізація залежно від віку, а також зв'язок із функціонуванням іонних транспортерів не встановлені.

Зв'язок із 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 спонгіоформних 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 зміни локалізації, вмісту PrP^C й активності АТФ-аз у тканинах щурів різного віку.

Мета і завдання досліджень. 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 Ca²⁺-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 Ca²⁺-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 Ca²⁺-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, котрі відображають онтогенетичну динаміку вмісту PrP^C, активності АТФ-аз, вмісту іонів Na⁺, K⁺ і загального 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 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.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 188 сторінках комп'ютерного тексту, з яких 137 займає основний текст, і сформована зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаної літератури, який налічує 224 найменування, із них 201 латиницею, та додатків. Робота містить 18 таблиць і 75 рисунків, які займають 69 стрінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Проаналізовано сучасні дані щодо біохімічних особливостей будови і функціонування клітинного пріона, локалізації у деяких тканинах нервової системи. Описано роль PrP^C у регуляції гомеостазу Ca²⁺, особливу увагу звернено на результати, що підтверджують участь PrP^C у роботі Ca²⁺-каналів. Подано відомості про метаболізм кальцію у головному мозку тварин за умови пріонної нейродегенерації.

Матеріали та методи досліджень. Експериментальні дослідження проведені на лабораторних тваринах і відповідають вимогам норм біоетичної експертизи згідно Наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р., Конвенції ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях від 18.03.1986 р. і Директиви ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р. (протокол № 55 від 17.05.2016 р. Комісії з біоетики Інституту біології тварин НААН). Дослідження проводили на самцях лабораторних щурів *Rattus norvegicus var. alba*, лінії *Wistar*, яких утримували у стандартних умовах віварію. Було сформовано три групи тварин різного віку по дев'ять особин у кожній: молоді щури (віком 1 місяць, маса 38±2 г); фізіологічно зрілі (віком 6 місяців, маса 223±9 г); старі (віком 30 місяців, маса 435±6 г). Для досліджень відбирали довгастий мозок, мозочок, порожню кишку, селезінку, нирки, печінку та стегновий м'яз.

Визначення загального вмісту PrP^C проводили за допомогою Дот-блот аналізу, а молекулярних форм PrP^C – Вестерн-блот аналізу. Під час виконання досліджень використовували моноклональні первинні антитіла (Antibody mAB6H4; Prionics, Швейцарія) і поліклональні вторинні козячі антимишачі антитіла, кон'юговані з лужною фосфатазою (Sigma, Німеччина). Фіксування тканини, її промивання, зневоднення та формування парафінових блоків для імуногістохімічного аналізу проводили за допомогою стандартної методики (Влізло В.В. зі співавт., 2012). Використовували набір реактивів для імуногістохімії фірми Dako (Данія).

Визначення активності АТФ-аз проводили у мікросомальній фракції тканин (Остапченко Л.І., 2006; Sweadner K.J., 1988; Jorgensen P.L., 1988). Мірою активності була концентрація неорганічного фосфору (P_i), яку визначали спектрофотометрично (λ=660 нм) методом W. Rathbun (1969). Дослідження кінетичних властивостей ензиматичної реакції проводили у середовищі інкубування, яке модифікували за фізико-хімічними характеристиками або складом певних компонентів (час інкубування, вміст протеїну, концентрація АТФ, Na⁺, K⁺, Ca²⁺; Келети Т., 1990).

Вміст Na⁺ та K⁺ визначали, використовуючи комерційні набори фірми Фелісіт-Діагностика (Україна; Тица Н., 1997), а загального кальцію – за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра С-115М (Влізло В.В. зі співавт., 2012).

Обчислювали коефіцієнт кореляції та визначали частки впливу віку і тканинної локалізації за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу. Будували моделі онтогенетичних змін досліджуваних показників. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel, Origin і Statistica. Для оцінки вірогідної різниці між статистичними характеристиками сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця за P<0,05–0,001.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вміст клітинного пріона та його ізоформ в органах щурів різного віку. PrP^C – це сіалоглікопротеїд, який сформований з поліпептидного ланцюга, що містить 253–256 амінокислотних залишків, розташованих у вигляді трьох α -спіралей і короткої ділянки у формі β -структури, що становить 42 та 3 %, відповідно (Влізло В.В. зі співавт., 2002; Westergard L. et al., 2007; Linden R. et al., 2008). На основі результатів Дот-блот аналізу визначено загальний вміст PrP^C у порожній кишці, селезінці та довгастому мозку 1-місячних тварин, який становив, відповідно, 48,5, 32,6, 29,3 та 40,8 ум. од. (ум. од. визначали як пікселі/двоім кв.). Вміст PrP^C підвищився у 2, 2 та 3,3 разу у 6-місячних тварин, порівняно з 1-місячними, тоді як у 30-місячних – знижувався на 36, 39 та 48 %, відповідно, порівняно зі 6-місячними. У мозочку, печінці та стегновому м'язі вміст PrP^C вірогідно не змінювався (рис. 1). У нирках 6-місячних тварин вміст PrP^C знижувався на 44 %, порівняно з 1-місячними, а у 30-місячних – вірогідно не змінювався.

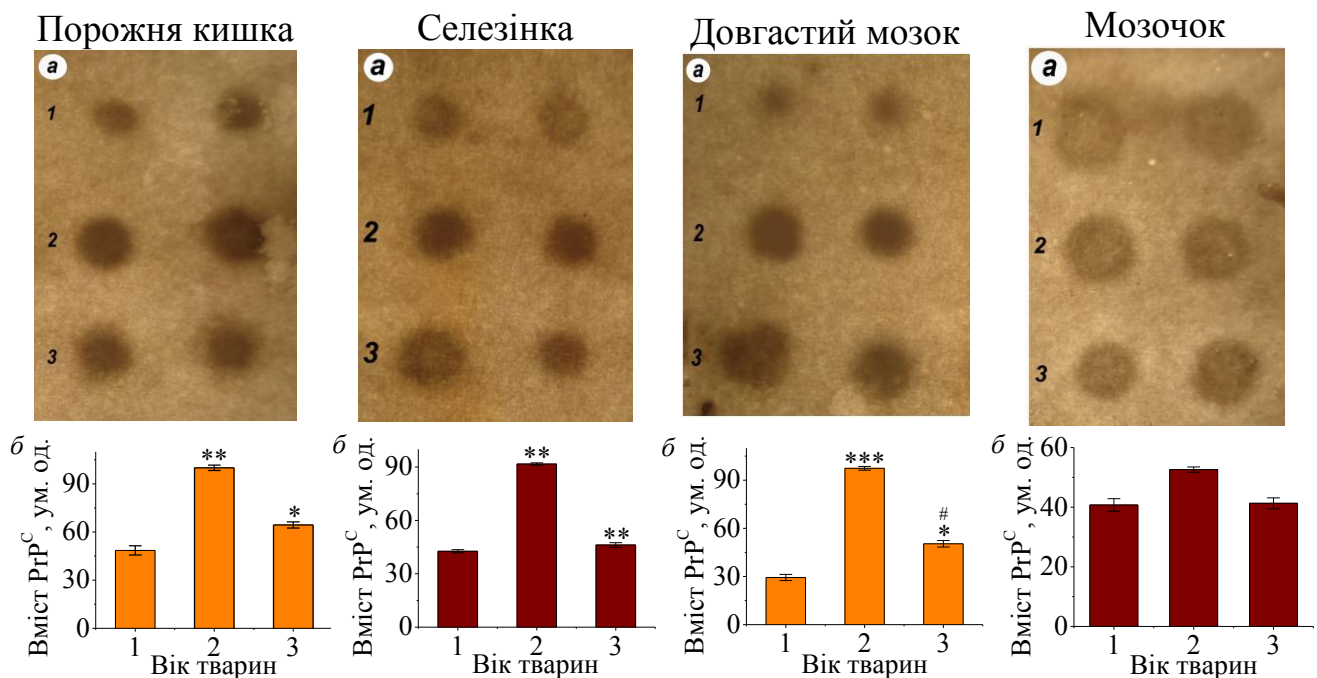


Рис. 1. Вміст PrP^C у тканинах щурів різного віку: а – Дот-блот, б – гістограма; 1 – 1 місяць, 2 – 6 місяців, 3 – 30 місяців (M ± m; * (#) – P < 0,05; ** (##) – P < 0,01; *** (###) – P < 0,001, * – друга вікова група порівняно з першою, третя – з другою, # – третя порівняно з першою)

За допомогою методу Вестерн-блот аналізу визначено вміст ізоформ PrP^C у досліджуваних тканинах у віковій динаміці. PrP^C встановлено у трьох глікоформах, серед яких переважала диглікозильована (35–38 кДа). Деглікозильована (19–21 кДа) форма була представлена у найменшій кількості, а частково (моно-) глікозильована (23–27 кДа) форма займала проміжне положення.

У порожній кишці та селезінці 6-місячних тварин вміст ди-, моно- та деглікозильованої форм підвищився на 66 і 18, 56 і 68 та 39 і 33 %, відповідно, порівняно з 1-місячними, натомість у 30-місячних тварин – зменшувався, відповідно, на 44 і 28, 16 і 50 та 14 і 52 %, порівняно зі шестимісячними (рис. 2).

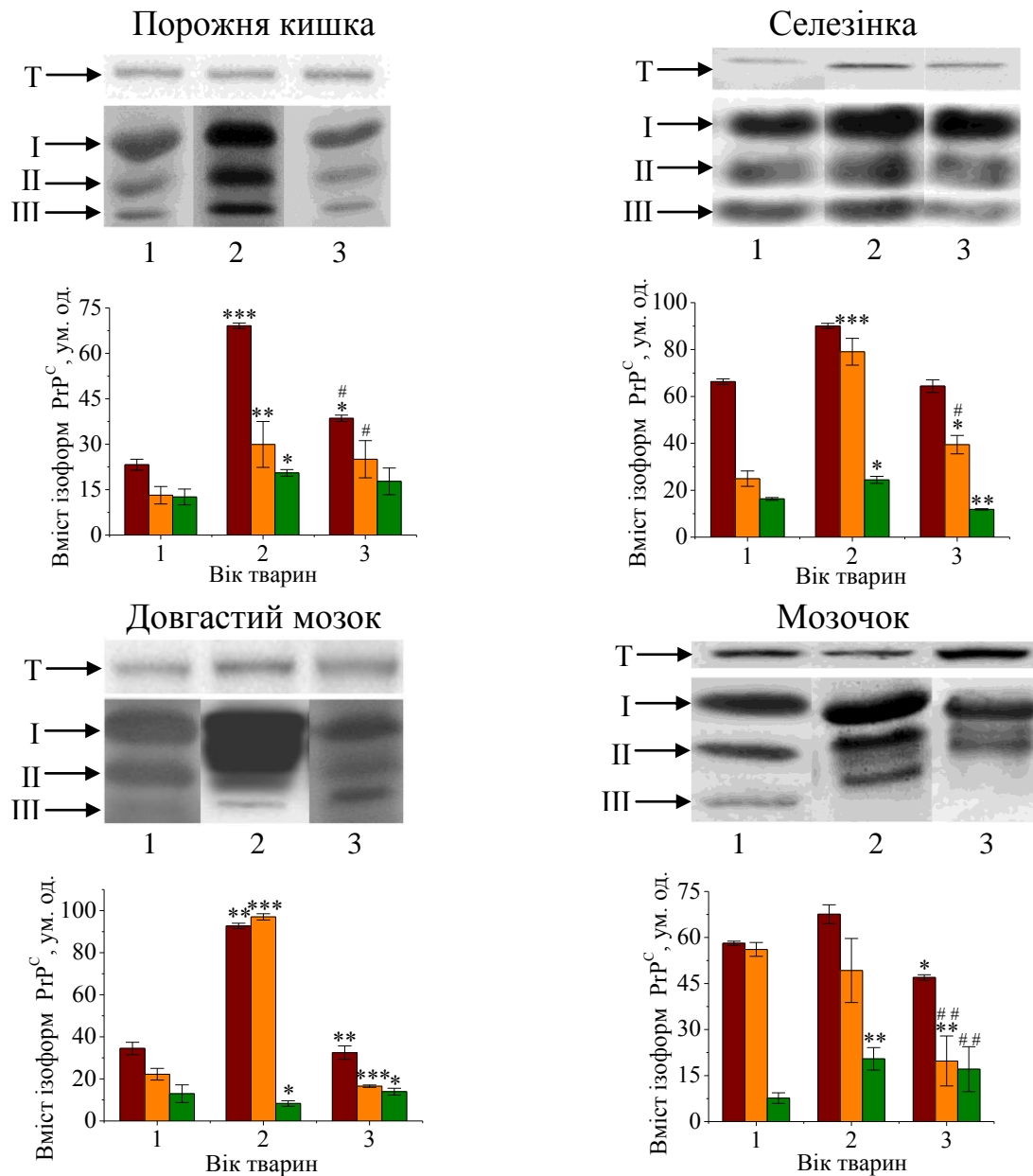


Рис. 2. Вміст ізоформ PrP^C у тканинах щурів різного віку: 1 – 1 місяць, 2 – 6 місяців, 3 – 30 місяців; Т – α -тубулін, I (■) – ди-, II (■) – моно-, III (■) – деглікозильована ізоформи PrP^C (M \pm m; * (#) – P < 0,05; ** (##) – P < 0,01; *** (###) – P < 0,001, * – друга вікова група порівняно з першою, третя – з другою, # – третя порівняно з першою)

У довгастому мозку щурів визначено найвищий вміст молекулярних форм PrP^C, порівняно з іншими тканинами. У цій тканині тварин віком 6 місяців вміст диглікозильованої форми PrP^C збільшився на 63 %, моноглікозильованої – на 77 % та деглікозильованої – на 36 %, порівняно з тваринами віком 1 місяць. Вміст досліджуваних ізоформ у старих щурів знижувався, порівняно зі зрілими, а порівняно з молодими – не змінювався. Варто зазначити, що у старих тварин вміст деглікозильованої форми збільшився на 40 %, порівняно зі зрілими (рис. 2).

Подібну вікову динаміку глікоформ PrP^C встановлено у мозочку тварин. Проте коливання значень були незначними. Варто зазначити, що вміст деглікозильованої форми зростав у мозочку 6-місячних тварин на 63 % і суттєво не змінювався – у

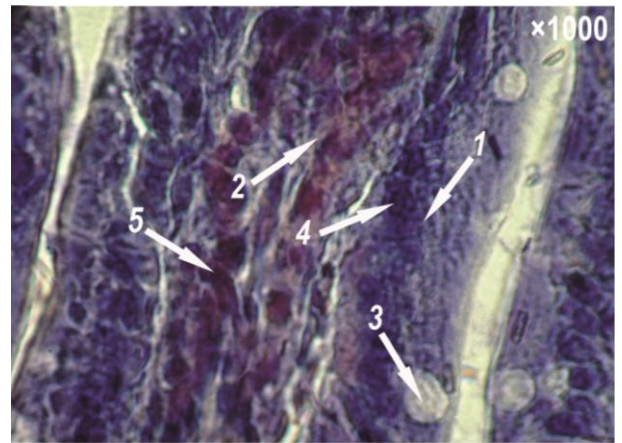
30-місячних, порівняно зі 6-місячними, а порівняно з 1-місячними – збільшувався на 55 % (рис. 2).

У печінці та нирках щурів уміст глікоформ PrP^C становив 15–40 % від вмісту у довгастому мозку, а у м'язі стегна – лише 7–15 %, однак вікова динаміка суттєво не відрізнялася.

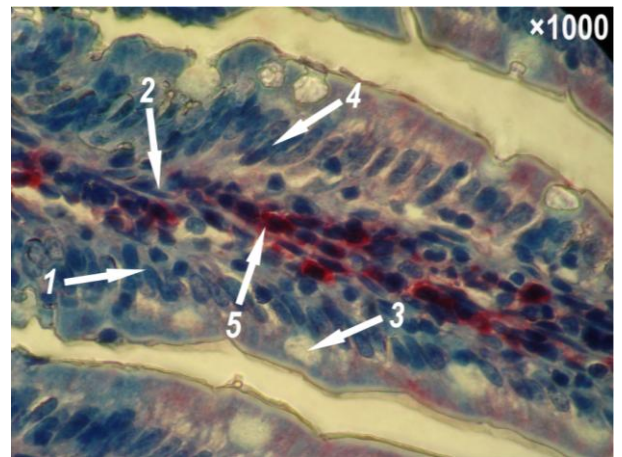
Потрібно зауважити, що загалом кількісні зміни PrP^C зумовлені зміною вмісту глікозилізованих форм. Очевидно, збільшення вмісту диглікозилізованої форми у зрілих тварин спричинене підвищенням інтенсивності процесу глікозилування, тоді як у старих тварин ці процеси пригальмовуються.

Локалізація клітинного пріона у тканинах щурів різного віку. Інфікування людини і тварин патологічним пріоном може наставати після поїдання уражених м'ясних продуктів чи корму (Lasmizas C.I. et al., 1996; Wells G.A. et al., 1998). Тому одним із поставлених завдань було з'ясувати локалізацію PrP^C як попередника PrP^{Sc} у кишечнику тварин.

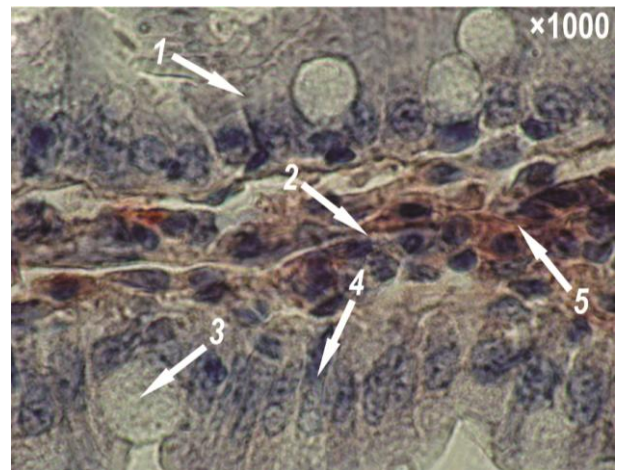
У порожній кишці 1-місячних щурів PrP^C локалізований у плазматичних клітинах і лімфоцитах у власній пластинці ворсинки (рис. 3, I), тоді як у тварин віком 6 місяців – не лише у власній пластинці ворсинки, а й у криптах, а також у підслизовій оболонці кишки (рис. 3, II). Крім того, незначний вміст PrP^C виявлений в облямівці (мікроросинках) епітеліоцитів (рис. 3, II). Як відомо, на поверхні мікроросинок розташований глікокалікс, який утворений ліпо- і глікопротеїдами (Луцик О.Д. зі співавт., 2003). Очевидно, що PrP^C, будучи сіалоглікопротеїдом, може бути наявним у цих структурах. Беручи до уваги те, що на латеральній плазмолемі цих клітин локалізуються Na⁺-K⁺- та Ca²⁺-АФТ-ази, їхня активність може сприяти перенесенню метаболітів від апікальної плазмолемі у міжклітинний простір, а далі – крізь базальну мембрану – у власну пластинку і капіляри (Афанасьєв Ю.И. с соавт., 2012;



I

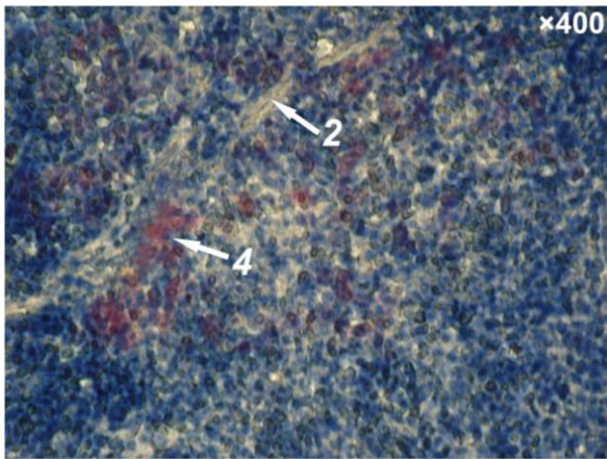


II

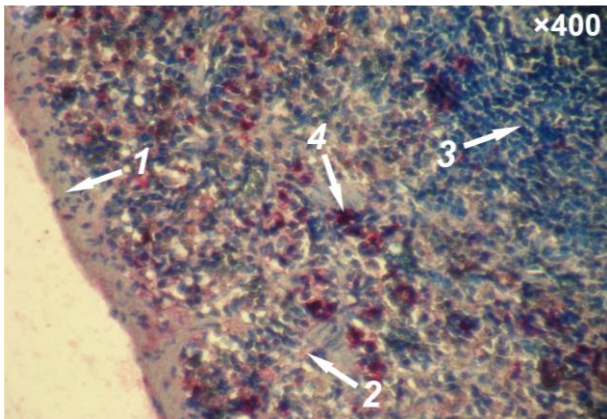


III

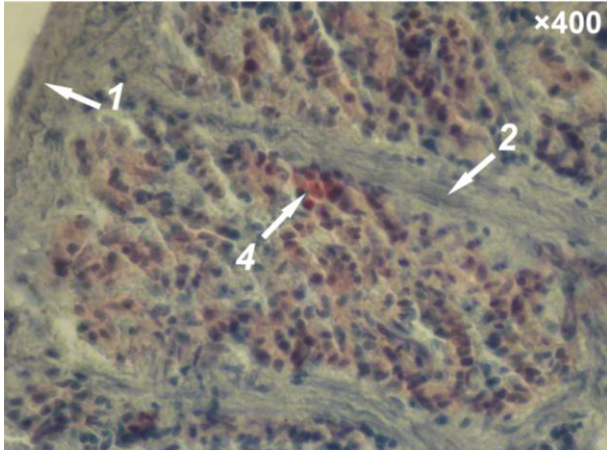
Рис. 3. Імуногістохімічний аналіз порожньої кишки щурів у віці 1 (I), 6 (II) і 30 (III) місяців: 1 – слизова оболонка (ворсинка); 2 – власна пластинка; 3 – келихоподібні клітини; 4 – епітеліоцити; 5 – PrP^C (світлова мікроскопія, гематоксилін)



I



II



III

Рис. 4. Імуногістохімічний аналіз селезінки щурів у віці 1 (I), 6 (II) і 30 (III) місяців: 1 – капсула; 2 – трабекули; 3 – лімфоїдний фолікул; 4 – PrP^C (світлова мікроскопія, гематоксилін)

(рис. 4, I). PrP^C виявлено у паренхімі поблизу капсули і трабекул (рис. 4, I).

У селезінці щурів віком 6 місяців спостерігали чіткий розподіл пульпи на білу (лімфоїдна тканина) і червону (ретикулярна тканина; рис. 4, II). У лімфоїдних фолікулах PrP^C не виявили, проте добре помітні його локуси у червоній пульпі та уздовж трабекул у лімфатичних піхвах (рис. 4, II).

Kuehnel W., 2003), то, можливо, у ці процеси залучений і PrP^C.

У порожній кишці щурів віком 30 місяців спостерігали вікові зміни структури. Зокрема, ворсинки мали гребенеподібну форму, на їх поверхні помітні незрілі (необлямовані) епітеліоцити (рис. 3, III). Локалізація PrP^C також змінювалася. Досліджуваний протеїн виявлено у лімфоцитах, які розташовані у власній пластинці ворсинок. Проте у криптах його вміст був незначним, а в облямівці ендокриноцитів PrP^C не виявлено (рис. 3, III).

У порожній кишці лімфоцити утворюють поодинокі (солітарні) лімфатичні фолікули. PrP^C виявлено у лімфоцитах усередині фолікулів, а також у М-клітинах. Під час оральної інфекції патологічний пріон проникає у слизову оболонку тонкого кишечника за участі епітеліальних клітин, зв'язуючись із апікальним ламініном (Григорьев В.Б., 2004). Також PrP^{Sc} може взаємодіяти із PrP^C лімфоцитів фолікулів (Пейерових бляшок). Ці клітини утримують PrP^{Sc} і розносять його з кров'ю до лімфатичних вузлів, селезінки та інших органів (Вербицький П.І., 2005).

Проведені досліді на мишах показали, що патологічні зміни у селезінці спричиняють продовження інкубаційного періоду, а видалення тимуся не впливає на розвиток інфекції (Kingsbury D.T. et al., 1981).

Під час мікроскопічного дослідження селезінки щурів 1-місячного віку встановлено, що у цей період розвитку є сформовані трабекули. Паренхіма (пульпа) представлена кров'яними острівцями, які утворені з еритроцитів і лімфоцитів, формується поділ на червону та білу пульпу

У селезінці щурів віком 30 місяців трабекули вирізнялися великою товщиною та розгалуженістю, лімфоїдні фолікули втрачали чіткий поділ на ділянки, їх кількість зменшувалася порівняно зі щурами віком 6 місяців (рис. 4, III). За цих умов уміст клітинного пріона зменшувався. Проте незмінною залишалася тканинна локалізація PrP^C, зокрема, його виявляли уздовж трабекул і поблизу капсули у клітинах червоної пульпи селезінки, але не у фолікулах (рис. 4, III).

Локуси PrP^C виявлено також у печінці, зокрема, у гепатоцитах 1-місячних і 30-місячних тварин, а у 6-місячних – ще й у клітинах ретикулоендотеліальної системи.

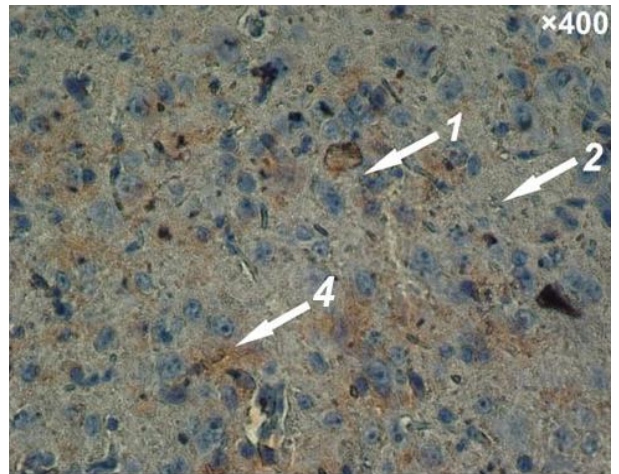
У нирках PrP^C міститься у корковій та мозковій речовинах, тобто у звивистих та прямих каналцях нефронів, а також у судинних клубочках.

Локуси PrP^C виявлено й у тканині стегнового м'яза.

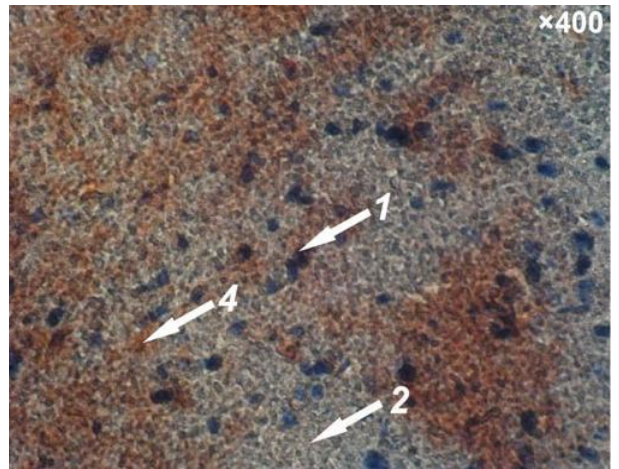
Відомо, що після орального інфікування PrP^{Sc} надходить по нервових гангліях з периферичної нервової системи до спинного мозку і далі до довгастого та інших відділів мозку.

У довгастому мозку 1-місячних щурів PrP^C локалізується в сірій речовині поблизу тіл нейронів округлої форми та мікрогліюцитах (рис. 5, I), у тварин віком 6 місяців – у ядрі оливи, а також у тілах нейронів висхідного тракту (рис. 5, II), який іде у напрямку від спинного мозку до мозочку. На великому збільшенні помітно, що PrP^C наявний уздовж нервових відростків і відсутній у тілах нейронів (рис. 5, II). У довгастому мозку старих тварин PrP^C мав подібну локалізацію, як у зрілих (рис. 5, III), проте його кількість була значно меншою.

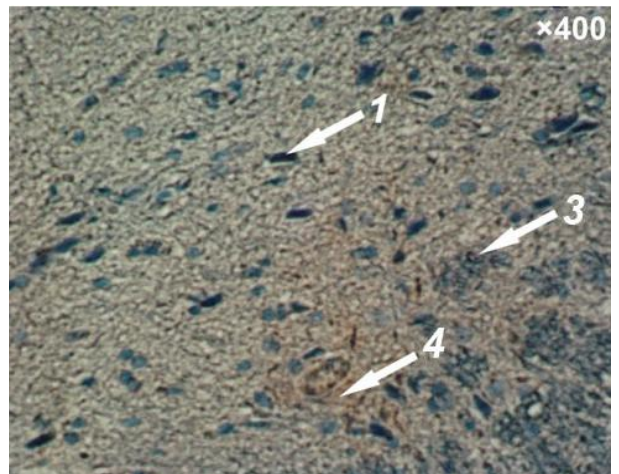
На гістопріонах мозочка 1-місячних щурів помітно, що молекулярний шар містив велику кількість нейронів і гліальних клітин, у яких помітні у великих, розташованих щільно одна



I



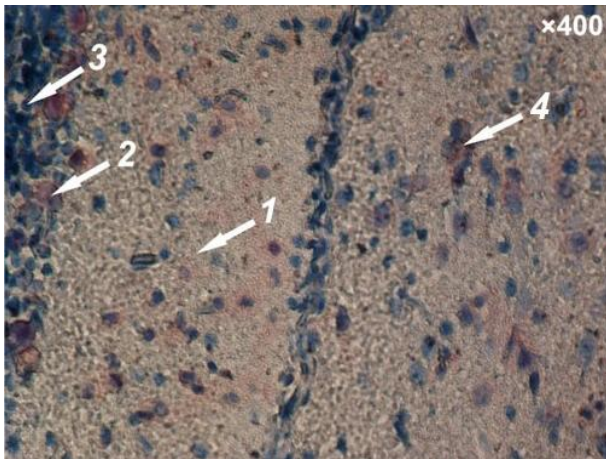
II



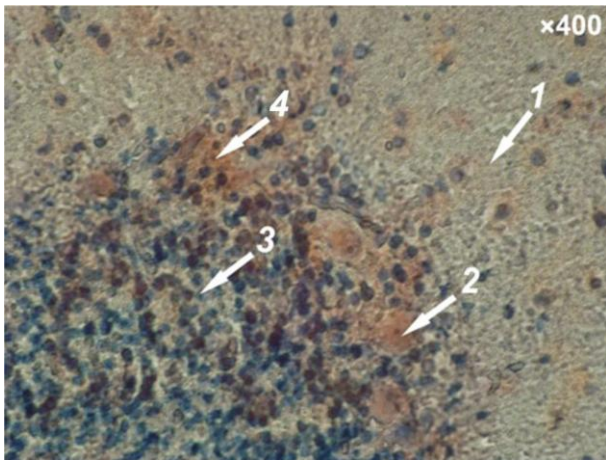
III

Рис. 5. Імуногістохімічний аналіз довгастого мозку щурів у віці 1 (I), 6 (II) і 30 (III) місяців: 1 – ядро нейрона; 2 – нервові волокна; 3 – тіло нейронів висхідного тракту; 4 – PrP^C (світлова мікроскопія, гематоксилін)

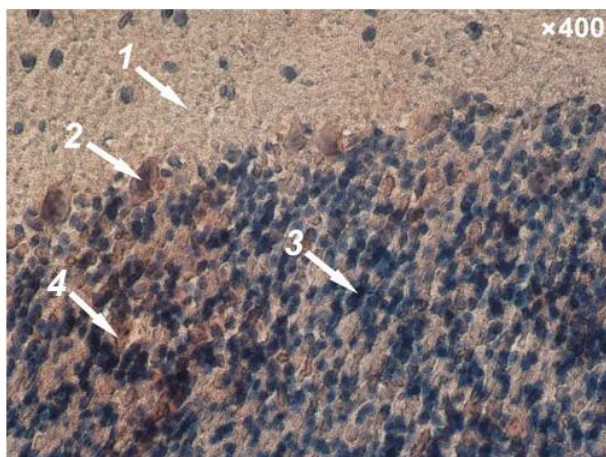
Вони добре виявлено локуси PrP^C. Вони добре біля одної, гангліонарних клітинах (Пуркінє) та нейронах зернистого шару (рис. 6, I). У мозочку 6-місячних щурів



I



II



III

Рис. 6. Імуногістохімічний аналіз мозочку щурів у віці 1 (I), 6 (II) і 30 (III) місяців: 1 – молекулярний шар; 2 – шар нейронів Пуркін'є; 3 – зернистий шар; 4 – біла речовина; 5 – PrP^C (світлова мікроскопія, гематоксилін)

мембрану клітини, а також у регуляцію Ca²⁺-каналів, підтримуючи Ca²⁺-гомеостаз (Кушкевич М.В., Влізло В.В., 2013; Peggion C. et al., 2011). Крім цього, β-субодиниця Na⁺-K⁺-АТФ-ази, як і PrP^C, є сіалоглікопротеїдом (40 кДа) і

зменшувалася кількість перикаріонів у молекулярному шарі, у 30-місячних – клітин Пуркін'є і нейронів зернистого шару, внаслідок чого він сплющувався, але локалізація PrP^C не змінювалася (рис. 6, II, III).

У результаті оцифрування фотографій тканин однакового збільшення визначено вміст PrP^C. У порожній кишці, селезінці, довгастому мозку та мозочку молодих тварин вміст PrP^C становив, відповідно, 187,9±9,44; 425,65±7,87; 359,5±8,95 та 397,3±10,6 ум. од. У цих тканинах зрілих тварин вміст PrP^C зростав на 33–58 %, порівняно з молодими, тоді як у старих – знижувався на 43–67 %, порівняно зі зрілими. У печінці та стегновому м'язі вміст PrP^C становив 176,8±5,90 і 122,6±7,54 ум. од. та поступово зменшувався з віком: у 6-місячних тварин на 51 і 34 %, порівняно з 1-місячними, а у 30-місячних – на 67 і 33 %, порівняно зі 6-місячними. У нирках вміст PrP^C вірогідно не змінювався.

Клітинний пріон у периферичних пріон-реплікувальних органах впливає на поширення збудника по організму та на розвиток пріонної інфекції. Особливу роль у цьому процесі відіграють лімфоїдні клітини.

У нервовій тканині вміст PrP^C є найбільшим, тому нейрони та клітини глії відіграють найважливішу роль під час розвитку пріонопатій. Водночас, проникаючи у мозочок, патологічний пріон уражає клітини Пуркін'є, що пояснює порушення координації рухів за цих патологій.

Активність ензимів АТФ-аз та вміст Na⁺, K⁺ і загального кальцію в органах щурів різного віку. PrP^C бере участь у метаболічних процесах, зокрема, він залучений у транспортування іонів крізь

розташована у мембрані на зовнішній поверхні клітини. β -Субодиниця виконує регуляторні функції та визначає антигенні властивості (Болдырев А.А., 2001; Лопина О.Д., 2001). Зважаючи на ці дані, припускають залежність між вмістом PrP^C та активністю АТФ-аз (Sorgato M.C. et al., 2009; Peggion C. et al., 2011).

Досліджено активність $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФ-ази, Ca^{2+} -АТФ-ази ендоплазматичної сітки (ЕПС) та Ca^{2+} -АТФ-ази плазматичної мембрани (ПМ) у пріон-реплікувальних тканинах щурів різного віку. Встановлено зниження активності досліджуваних ензимів зі зростанням віку щурів. Зокрема, активність $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФ-ази зменшилася у порожній кишці, селезінці, довгастому мозку та мозочку 30-місячних тварин, відповідно, на 84, 81, 70 і 73 %, Ca^{2+} -АТФ-ази ЕПС – на 69–89 %, а Ca^{2+} -АТФ-ази ПМ – на 26–89 %, порівняно зі 6-місячними. У старих тварин уміст Na^+ і K^+ у досліджуваних тканинах вірогідно не змінювався, а загального кальцію збільшився на 57–78 %, порівняно зі зрілими (рис. 7).

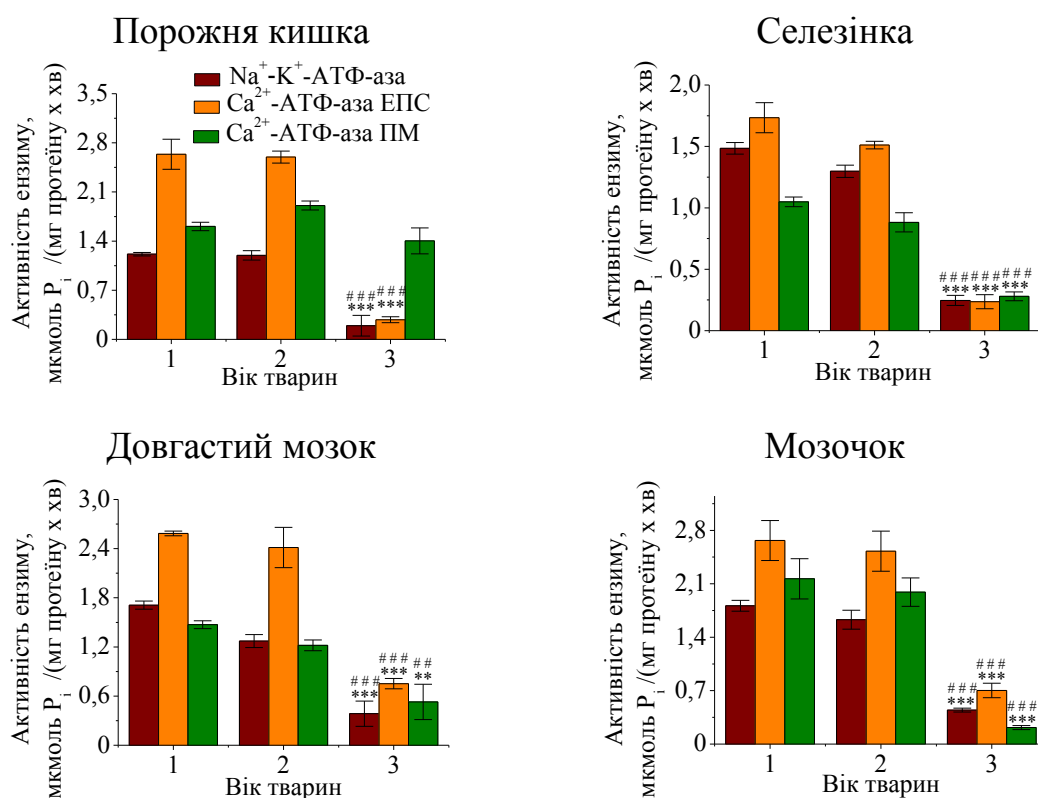


Рис. 7. Активність ензимів у тканинах щурів різного віку: 1 – 1 місяць; 2 – 6 місяців; 3 – 30 місяців ($M \pm m$; * (#) – $P < 0,05$; ** (##) – $P < 0,01$; *** (###) – $P < 0,001$, * – друга вікова група порівняно з першою, # – третя порівняно з другою, # – третя порівняно з першою)

З метою з'ясування причин зниження активності ензимів виконано кінетичний аналіз гідролізу АТФ та обчислено кінетичні параметри цього процесу і вивчено динаміку нагромадження продукту реакції – неорганічного фосфору. Для цього зразки тканин щурів різного віку інкубували у стандартному середовищі упродовж різних часових періодів. Крім цього, кінетика гідролізу АТФ узгоджується з реакцією нульового порядку в діапазоні 0–5 хв. Рівень вивільненого P_i трьома АТФ-азами у досліджуваних тканинах 30-місячних тварин різко знижувався – у 2–9 разів,

порівняно зі 6-місячними тваринами. На основі лінеаризації вмісту P_i у $\{P/t; P\}$ координатах обчислено початкову (миттєву) швидкість реакції (V_0), максимальну кількість утвореного продукту реакції (P_{\max}) і час реакції (τ). Як бачимо з таблиці, у довгастому мозку старих тварин P_{\max} та V_0 вірогідно знижувалися – на 70 і 80 %, 72 і 70 % та 77 і 80 %, порівняно зі зрілими, відповідно для $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-ази, Ca^{2+} -АТФ-ази ЕПС та Ca^{2+} -АТФ-ази ПМ. Проте τ зростає із віком шурів. Тобто гідроліз АТФ у 30-місячних тварин відбувається менш інтенсивно і триває довше, а P_i виділяється у меншій кількості, порівняно з 1- та 6-місячними.

Таблиця

Кінетичні параметри гідролізу АТФ у тканині довгастого мозку

Кінетичний параметр	Ензим	Вік тварин, міс		
		1	6	30
V_0 (мкмоль P_i / хв × мг ⁻¹ протеїну)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-аза	0,656	0,501	0,098***###
	Ca^{2+} -АТФ-аза ЕПС	1,140	0,692*	0,206***###
	Ca^{2+} -АТФ-аза ПМ	1,436	0,755*	0,152***###
P_{\max} (мкмоль P_i / мг протеїну)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-аза	1,217	0,858*	0,257***###
	Ca^{2+} -АТФ-аза ЕПС	3,111	3,362	0,932***###
	Ca^{2+} -АТФ-аза ПМ	1,556	2,891*	0,663***###
τ (хв)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-аза	1,856	1,712	2,621*
	Ca^{2+} -АТФ-аза ЕПС	2,729	4,857*	4,527#
	Ca^{2+} -АТФ-аза ПМ	1,084	2,831**	4,774*###
V_{\max} (мкмоль P_i / хв × мг ⁻¹ протеїну)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-аза	3,860	2,446*	0,818***###
	Ca^{2+} -АТФ-аза ЕПС	6,116	3,723*	0,913***###
	Ca^{2+} -АТФ-аза ПМ	2,087	5,277**	0,573***###
K_m (ммоль/л)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-аза	3,973	2,953	3,367
	Ca^{2+} -АТФ-аза ЕПС	4,329	2,095**	1,181*###
	Ca^{2+} -АТФ-аза ПМ	1,232	3,965***	0,430***###

Примітки: 1) V_0 – початкова (миттєва) швидкість реакції; 2) P_{\max} – максимальна (платова) кількість продукту реакції; 3) τ – час реакції (період напівнасичення); 4) V_{\max} – максимальна швидкість ензиматичної реакції; 5) K_m – константа Міхаеліса (* (#) – $P < 0,05$; ** (##) – $P < 0,01$; *** (###) – $P < 0,001$, * – друга вікова група порівняно з першою, третя – з другою, # – третя порівняно з першою)

У результаті кінетичного аналізу гідролізу АТФ, залежно від його вмісту в середовищі інкубування, було встановлено, що з підвищенням концентрації субстрату (АТФ) від 0,25 до 2,5–3,0 ммоль/л відбувалося зростання ензиматичної АТФ-азної активності до її максимальних значень, після чого активність підтримувалася на незмінному рівні. Проте у досліджуваних тканинах старих тварин активність була незначною і крива значень на графіку виходила на плато за 1,0–2,0 ммоль/л АТФ. Унаслідок лінеаризації цих даних у координатах Лайнуївера – Берка визначено максимальну швидкість (V_{\max}) і константу Міхаеліса ($K_m^{\text{АТФ}}$). Так, у довгастому мозку 30-місячних тварин обидва показники стрімко знижувались у 2–9 разів, порівняно зі 6-місячними, тоді як порівняно з 1-місячними – у 3–7 разів, за винятком K_m для $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-ази, де вірогідних змін не встановлено (див. табл). Подібну закономірність спостерігали в інших досліджуваних тканинах. Зниження

значення V_{\max} зумовлене зменшенням кількості транспортувальних одиниць (зменшення їх експресії у мембрані) або зменшенням кількості обортів ензимів. Зниження значення K_m у тканинах старих тварин вказує на суттєве зростання спорідненості ензимів до АТФ.

Оскільки АТФ-транспортні системи здійснюють транспортування іонів натрію і калію, то певний інтерес становив їхній вплив на активність $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-ази залежно від різних концентрацій у середовищі інкубування. Загальна концентрація цих іонів становила 150 ммоль/л. Оптимальне співвідношення вмісту іонів становило 120 ммоль/л Na^+ та 30 ммоль/л K^+ у тканинах тварин віком 1 і 6 місяців, за винятком довгастого мозку і стегнового м'язу 6-місячних щурів, де оптимум становив 130 ммоль/л Na^+ та 20 ммоль/л K^+ . Натомість у всіх досліджуваних тканинах старих тварин активність $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-ази була максимальною за 140 ммоль/л Na^+ і 10 ммоль/л K^+ . Тобто з віком зростає спорідненість ензиму до Na^+ , що узгоджується з підвищенням рівня цих іонів у тканинах загалом.

Дослідивши вплив різних концентрацій Ca^{2+} на активність Ca^{2+} -АТФ-аз, встановили, що максимальних значень вони набували за 5 ммоль/л Ca^{2+} у пріон-реплікувальних тканинах 1-місячних та 6-місячних тварин, і за 6–7 ммоль/л у 30-місячних тварин. Тобто досліджувані ензими зберігали активність за високих концентрацій іонів кальцію у середовищі.

Залежність між віковими змінами вмісту PrP^C , активності АТФ-аз і вмісту іонів натрію, калію та загального кальцію. За результатами імуногістохімічного, Дот-блот і Вестерн-блот аналізів у досліджуваних тканинах між вмістом PrP^C встановлено переважно пряму сильну кореляцію ($r=0,714-0,999$). У порожній кишці між вмістом PrP^C й активністю Ca^{2+} -АТФ-ази ПМ кореляція сильна ($r=0,729-0,780$), тоді як між вмістом PrP^C й активністю двох інших досліджуваних ензимів – слабка ($r=0,250$). Проте у селезінці між вмістом PrP^C за даними імуногістохімії й активністю трьох ензимів кореляція була пряма середня ($r=0,579-0,633$), між PrP^C за результатами Дот- і Вестерн-блот аналізу й активністю ензимів – пряма помірна ($r=0,318-0,437$). У довгастому мозку між вмістом PrP^C за даними імуногістохімії та активністю $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-ази залежність була помірною ($r=0,426$), Ca^{2+} -АТФ-ази ЕПС – середньою ($r=0,647$), а Ca^{2+} -АТФ-ази ПМ – сильною ($r=0,947$). У мозочку кореляція була середньою ($r=0,627-0,672$), помірною ($r=0,351-0,405$) та сильною ($r=0,825-0,857$) між активністю ензимів і вмістом PrP^C , за даними імуногістохімії, Дот- блот і Вестерн-блот аналізів, відповідно. В інших тканинах встановили залежність різної сили зв'язку. Натомість пряму сильну залежність відзначили між активностями трьох ензимів між собою. Між активністю $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-ази та вмістом Na^+ була обернена сильна кореляція ($r=-0,739-(-0,984)$), тоді як K^+ – пряма сильна ($r=0,760-0,999$). Між активністю обох Ca^{2+} -АТФ-аз і вмістом Ca^{2+} встановлено обернену сильну залежність.

Проведено кореляційний аналіз для вмісту PrP^C , активності ензимів і вмісту Na^+ , K^+ та загального кальцію між різними тканинами. Для вмісту PrP^C , за даними імуногістохімії та Дот-блоту, показано залежність різної сили. Для вмісту PrP^C , за результатами Вестерн-блоту, пряму сильну кореляцію отримано між даними

більшості досліджуваних тканин, за винятком порожньої кишки та печінки ($r=0,573$) і мозочка ($r=0,618$), де залежність була середньою. У різних досліджуваних тканинах між значеннями активності $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATФ-ази}$ встановлено пряму сильну кореляцію ($r=0,751-0,999$), як і $\text{Ca}^{2+}-\text{ATФ-ази}$ ЕПС ($r=0,738-0,999$) та $\text{Ca}^{2+}-\text{ATФ-ази}$ ПМ ($r=0,743-0,998$). Для вмісту іонів натрію і кальцію між даними всіх досліджуваних тканин встановлена пряма сильна залежність ($r=0,741-0,999$ і $r=0,896-0,999$), однак для K^+ між даними печінки та довгастого мозку і порожньої кишки та мозочка вона була середньою ($r=0,579-0,606$), між даними селезінки та нирок і м'яза, а також довгастого мозку і мозочка – помірною ($r=0,328-0,444$).

Наявність кореляційного зв'язку між вмістом PrP^{C} й активністю ензимів вказує на подібну онтогенетичну динаміку цих параметрів у організмі загалом. Імовірно, залежність зумовлена тим, що ці протеїни беруть участь у подібних процесах та мають схожу локалізацію в організмі.

Двофакторний дисперсійний аналіз онтогенетичних змін вмісту PrP^{C} , активності АТФ-аз, вмісту Na^+ , K^+ і кальцію. За результатами дисперсійного аналізу, підтверджено вірогідну залежність змін досліджуваних біохімічних показників від факторів віку і тканинної локалізації. Як видно з рис. 8, частка впливу фактора віку на вміст PrP^{C} , за результатами імуногістохімічного, Дот-блот і Вестерн-блот аналізів, становила 18, 22 і 15 %, тоді як частка впливу фактора тканинної локалізації – 65, 53 і 74 %, відповідно.

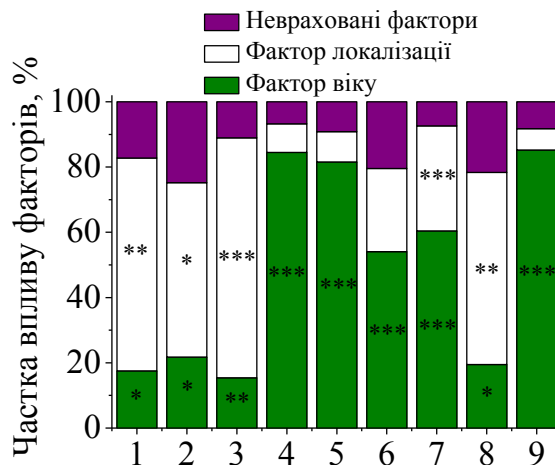


Рис. 8. Дисперсійний аналіз впливу факторів віку і тканинної локалізації на вміст PrP^{C} за результатами аналізів: 1 – імуногістохімічного; 2 – Дот-блот; 3 – Вестерн-блот; активності: 4 – $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATФ-ази}$; 5 – $\text{Ca}^{2+}-\text{ATФ-ази}$ ЕПС; 6 – $\text{Ca}^{2+}-\text{ATФ-ази}$ ПМ; вміст: 7 – Na^+ ; 8 – K^+ ; 9 – Ca (* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$)

Натомість фактор віку суттєво впливав на активність Na^+-K^+ - та $\text{Ca}^{2+}-\text{ATФ-аз}$, показник якого був у межах від 54 до 84 %. Фактор тканинної локалізації не мав вірогідного впливу на досліджувані показники (9–25 %). Суттєвий вплив мав вік на вміст Na^+ (60 %) та кальцію (85 %), а K^+ – значно менший, проте вірогідний (19 %). Вміст Na^+ і K^+ залежав від локалізації (частки впливу становили 32 і 59 %, відповідно), проте вплив цього фактора на вміст кальцію не спостерігали. Вплив неврахованих факторів був незначним (7–25 %).

Моделі вікових змін вмісту PrP^C, активності АТФ-аз, вмісту Na⁺ і K⁺ та загального кальцію в органах тварин. У тканинах щурів віком 6 місяців уміст PrP^C зростає, а у тварин, віком 30 місяців – знижується (рис. 9). Такі зміни впливають на активність АТФ-аз і розподіл іонів, оскільки з віком активність ензимів також знижується. Подібну онтогенетичну динаміку встановлено у різних досліджуваних тканинах. Моделі дають підстави прогнозувати значення досліджуваних параметрів у певний віковий період тварин, а також можуть бути інформативними під час вивчення розвитку патологічного процесу та прогнозування патології за пріонних захворювань.

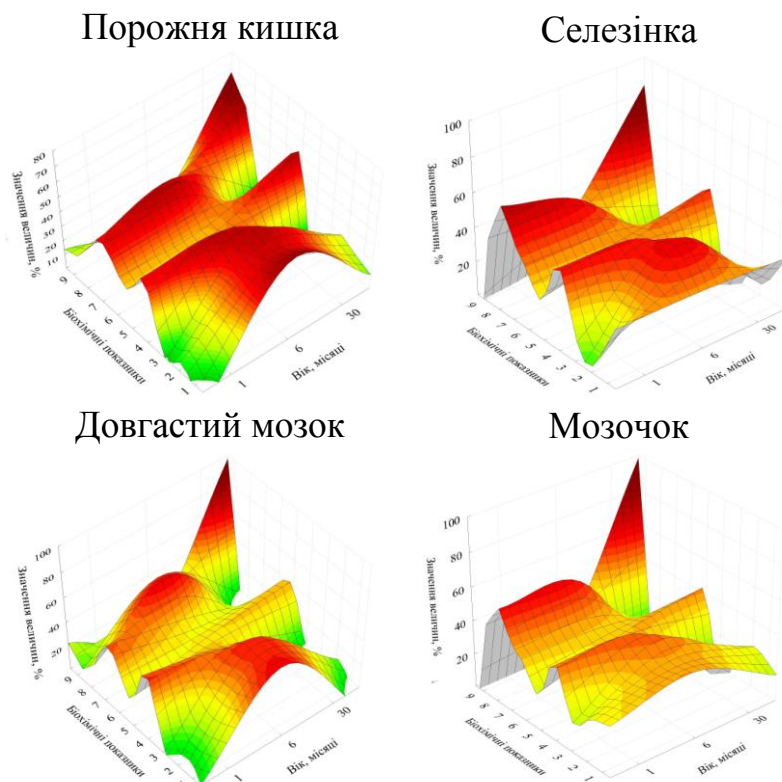


Рис. 9. Моделі вікових змін показників: вміст PrP^C за даними 1 – Вестерн-блот; 2 – Дот-блот; 3 – імуногістохімічного аналізу; 4 – активність Na⁺-K⁺-АТФ-ази; 5 – вміст Na⁺; 6 – вміст K⁺; 7 – активність Ca²⁺-АТФ-ази ЕПС; 8 – активність Ca²⁺-АТФ-ази ПМ; 9 – вміст Ca²⁺

ВИСНОВКИ

Досліджено локалізацію, загальний вміст і рівень молекулярних ізоформ PrP^C у довгастому мозку, мозочку, периферичних пріон-реплікувальних (селезінка, порожня кишка) та інших (печінка, нирки, м'язи) органах лабораторних щурів різного віку. Визначено активність та кінетичні показники Na⁺-K⁺-, Ca²⁺-АТФ-аз, а також вміст Na⁺, K⁺ і загального кальцію у тканинах цих органів. Встановлено кореляційну залежність між віковими змінами вмісту PrP^C й активності іонних транспортерів, визначено частки впливу віку і тканинної локалізації на вміст PrP^C та Na⁺-K⁺- і Ca²⁺-АТФ-аз, а також побудовано моделі, які відображають вікові зміни досліджуваних параметрів у пріон-реплікувальних та інших тканинах.

1. За допомогою Дот-блот аналізу встановлено вікові зміни загального вмісту PrP^C у тканинах організму. Зокрема, у довгастому мозку, мозочку, порожній кишці, селезінці, печінці, нирках, м'язі 1-місячних тварин його кількість становить 29,38±1,93, 40,75±2,1, 48,54±2,87, 42,64±0,9, 38,62±1,31, 42,96±2,4 та 15,92±1,14 ум. од., відповідно; у 6-місячних у довгастому мозку найбільше зростає (на 70 %), а у печінці – не змінюється, порівняно з 1-місячними; у 30-місячних – у довгастому мозку найбільше зменшується (на 48 %), у мозочку – не змінюється, порівняно зі 6-місячними.

2. Профіль ізоформ PrP^C у головному мозку й інших органах лабораторних тварин змінюється в онтогенезі. У різних досліджуваних тканинах вміст ди-, моно- та деглікозильованої форм зростає у 6-місячних тварин, відповідно, на 17–68, 14–77 та 21–63 %, порівняно з 1-місячними, і знижується – у 30-місячних, відповідно, на 30–65, 16–83 і 14–52 %, порівняно зі 6-місячними.

3. Рівень глікозильованих форм PrP^C коливається у різні вікові періоди: найбільшою мірою вміст диглікозильованої форми змінюється у довгастому мозку, печінці та порожній кишці, моноглікозильованої – у довгастому мозку, селезінці та печінці. Діапазон зміни вмісту деглікозильованої форми є найбільшим у мозочку, селезінці та нирках, проте у довгастому мозку 30-місячних щурів її рівень підвищується на 40 %, порівняно зі 6-місячними. У стегновому м'язі вміст трьох досліджуваних ізоформ PrP^C коливається найменше.

4. Імуногістохімічними дослідженнями виявлено локалізацію PrP^C у різних тканинах щурів: у ядрі оливи та висхідному тракті довгастого мозку; у нейронах молекулярного, зернистого шарів і у клітинах Пуркінє кори мозочка; у лімфоцитах власної пластинки ворсинки, криптах і підслизовій оболонці, в облямівці (мікрворсинках) епітеліоцитів, у лімфоцитах та М-клітинах Пейєрових пляшок порожньої кишки; у червоній пульпі селезінки поблизу капсули і трабекул; у гепатоцитах і клітинах ретикулоендотеліальної системи печінки; у судинних клубочках, прямих і звивистих каналцях нефронів нирок; у м'язових волокнах м'язів стегна. Локалізація PrP^C у тканинах щурів різного віку не змінюється.

5. Встановлено, що активність Na⁺-K⁺- і Ca²⁺-АТФ-аз знижується у пріон-реплікувальних тканинах 30-місячних тварин, порівняно зі 6-місячними. У порожній кишці, селезінці та мозочку активність Na⁺-K⁺-АТФ-ази знижується найбільше (на 84, 81 та 73 %, відповідно), тоді як Ca²⁺-АТФ-ази ЕПС – у кишці, нирках і селезінці (на 89, 85 та 84 %, відповідно), а Ca²⁺-АТФ-ази ПМ – у мозочку, нирках і селезінці (на 89, 86 та 68 %, відповідно). Найменше зниження активності Na⁺-K⁺- і Ca²⁺-АТФ-ази ЕПС встановлено у стегновому м'язі (на 43 та 62 %, відповідно), а Ca²⁺-АТФ-ази ПМ – у порожній кишці (на 26 %).

6. За результатами кінетичного аналізу встановлено, що у 30-місячних тварин гідроліз АТФ досліджуваними ензимами відбувається менш інтенсивно і триває довше, а продукт реакції (неорганічний фосфор) нагромаджується у меншій кількості, порівняно зі 6-місячними тваринами. На це вказує зниження початкової та максимальної швидкості реакції у різних тканинах, відповідно, на 34–89 % і 34–96 %, зменшення кількості продукту реакції на 46–91 % та збільшення часу реакції на 12–48 %. Зі зростанням віку тварин збільшується спорідненість ензимів до субстрату (АТФ), на що вказує зменшення значення K_m на 28–91 %.

7. Вміст Na⁺ та K⁺ не змінюється у тканинах щурів 30-місячного віку, порівняно зі 6-місячними; водночас рівень загального кальцію вірогідно зростає: найбільше у порожній кишці (на 78 %), а найменше – у м'язі стегна (на 44 %).

8. Між вмістом PrP^C, активністю АТФ-аз, вмістом Na⁺ та K⁺ і загального кальцію у досліджуваних тканинах встановлені корелятивні зв'язки різної сили: між вмістом PrP^C і активністю Na⁺-K⁺-АТФ-ази r=0,202–0,999; між вмістом PrP^C і активністю Ca²⁺-АТФ-ази ЕПС r=0,202–0,994; між вмістом PrP^C і активністю

Ca^{2+} -АТФ-ази ПМ $r=0,253-0,997$. У результаті порівняння досліджуваних показників у різних тканинах встановлено сильну залежність.

9. За результатами двофакторного дисперсійного аналізу підтверджено вірогідну залежність змін вмісту PrP^{C} від тканинної локалізації, тоді як вплив віку є меншим. Активність іонних транспортерів і вміст Na^+ , K^+ та загального кальцію залежать від віку, а фактор локалізації суттєво впливає лише на вміст K^+ .

10. Побудовано просторові моделі, які відображають онтогенетичні зміни вмісту PrP^{C} , активності Na^+-K^+ - і Ca^{2+} -АТФ-аз та вмісту Na^+ , K^+ і загального кальцію у порожній кишці, селезінці, печінці, нирках, стегновому м'язі, довгастому мозку та мозочку щурів. Отримані результати можуть бути використані для прогнозування патогенетичного розвитку пріонних інфекцій.

ПУБЛІКАЦІЇ

1. **Кушкевич М.В.** Імуногістохімічне виявлення фізіологічного пріона і активність Na^+-K^+ -АТФ-ази у різних тканинах щурів / **М.В. Кушкевич** // Вісник Одеського національного університету. Біологія. – 2012. – Т. 17, В. 1–2 (26–27). – С. 13–23.

2. **Кушкевич М.В.** Локалізація фізіологічного пріона й активність Na^+-K^+ АТФ-ази у тканинах пріон-реплікувальної системи щурів / **М.В. Кушкевич**, В.В. Влізло, Ю.В. Мартин // Біологічні Студії. – 2011. – Т. 5, № 3. – С. 67–76. (Дисертант взяла участь в імуногістохімічному дослідженні тканин, визначила активність ензиму, спільно зі співавторами проаналізувала та узагальнила результати, написала статтю).

3. **Кушкевич М.В.** Фізіологічний пріон і активність Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} -АТФаз плазматичної мембрани клітин довгастого мозку щурів різного віку / **М.В. Кушкевич**, В.В. Влізло, Ю.В. Мартин // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 2. – С. 52–58. (Дисертант взяла участь у проведенні імуногістохімічного аналізу тканини, визначила активність ензимів, спільно зі співавторами проаналізувала й узагальнила дані, написала статтю).

4. **Кушкевич М.В.** Фізіологічна роль пріонів у регуляції транспорту Ca^{2+} і нейродегенеративні захворювання / **М.В. Кушкевич**, В.В. Влізло // Біологічні Студії. – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 177–196. (Дисертант проаналізувала й узагальнила літературні джерела, брала участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті).

5. **Кушкевич М.В.** Локалізація клітинного пріона і активність Na^+-K^+ - та Ca^{2+} -АТФ-аз у селезінці щурів різного віку / **М.В. Кушкевич**, В.В. Влізло // Біологія тварин. – 2013. – Т. 15, № 2. – С. 81–89. (Здобувач провела експериментальні дослідження, проаналізувала та узагальнила отримані дані, спільно зі співавтором написала статтю).

6. **Kushkevych M.V.** Localization and level of the cellular prion in the jejunum of the rats Wistar line of different age groups / **M.V. Kushkevych**, V.V. Vlizlo // Biological systems. – 2013. – Vol. 3. – P. 325–329. (Дисертант провела експериментальні дослідження, проаналізувала результати, спільно зі співавтором взяла участь у написанні статті).

7. **Kushkevych M.V.** Qualitative analysis of cellular prion in the cerebellum of the rats Wistar line of different age groups / **M.V. Kushkevych**, V.V. Vlizlo // The Animal Biology. – 2014. – Vol. 16, N 4. – P. 86–92. (Дисертант провела експериментальні дослідження, проаналізувала й узагальнила отримані дані, спільно зі співавтором написала та підготувала статтю до друку).

8. **Kushkevych M.** Relationship between the cellular prion level and ATPases activities in the liver and kidneys of different age *Wistar line* rats / **M. Kushkevych**, N. Kuzmina, V. Vlizlo // *The Animal Biology*. – 2016. – Vol. 18, N 1. – P. 69–76. (Дисертант визначила вміст пріона й ензиматичну активність, спільно зі співавторами проаналізувала результати, взяла участь у написанні статті).

9. Спосіб виявлення тканинної локалізації клітинного пріон: Пат. 108110 Україна: МПК 2016.01 G01N 33/53 / В.В. Влізло, **М.В. Кушкевич**. – заявл. 07.08.2015; опублік. 11.07.2016, Бюл. № 13. – 3 с.

10. **Kushkevych M.V.** Cellular prion and Ca^{2+} -ATP-ases activity in kidney of different age rats / **M.V. Kushkevych**, V.V. Vlizlo // Abstracts of reports of the Conference for Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics, September 21–25th: Kyiv, 2015. – P. 32. (Дисертант провела експериментальні дослідження, спільно зі співавтором проаналізувала результати, взяла участь у написанні тез).

11. **Kushkevych M.V.** Localization and level of cellular prion and activity of Ca^{2+} -ATP-ases in the rats' liver depending on age / **M.V. Kushkevych**, V.V. Vlizlo // Abstracts of reports of the International Conference, October 2–3th: Lviv, 2015. – *The Animal Biology*. – Vol. 17, N 3. – P. 178. (Дисертант провела експериментальні дослідження, спільно зі співавтором проаналізувала результати і написала тези).

12. **Kushkevych M.V.** Cellular prion level in the rats' medulla oblongata and cerebellum depending on age / **M.V. Kushkevych**, V. V. Vlizlo // Abstracts of reports of the XIV All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists “Young Scientists in Solution of Actual Problems of Biology, Animal Husbandry and Veterinary Medicine”, December 3–4th: Lviv, 2015. – *The Animal Biology*. – Vol. 17, N 4. – P. 179. (Дисертант провела дослідження, взяла участь в аналізі результатів, написала тези).

13. **Kushkevych M.V.** Cellular prion level in the rats' jejunum and spleen depending on age / **M.V. Kushkevych** // Abstracts of reports of the International Congress of Medical Sciences. May 12–15th: Sofia, Bulgaria, 2016. – P. 89.

14. **Kushkevych M.V.** The level of cellular prion isoforms and ATPases activities in the medulla oblongata of different age *Wistar line* rats / **M.V. Kushkevych** // Abstracts of reports of the Conference for Young Scientists Palladin Institute of Biochemistry, May 26–27th: Kyiv, 2016. – P. 24.

15. **Kushkevych M.V.** Cellular prion level and ATP-ases activities in the jejunum of different age *Wistar line* rats / **M.V. Kushkevych**, V.V. Vlizlo // Abstracts of reports of the International Conference, September 29–30th: Lviv, 2016. – *The Animal Biology*. – Vol. 18, N 3. – P. 159 (Дисертант провела експериментальні дослідження, взяла участь в аналізі результатів, написала тези).

АНОТАЦІЯ

Кушкевич М.В. Онтогенетичні зміни локалізації і вмісту клітинного пріона та його зв'язок з активністю АТФ-аз. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2016.

У дисертації вивчено онтогенетичні зміни локалізації та вмісту клітинного пріона і встановлено кореляцію з активністю Na^+ - K^+ - та Ca^{2+} -АТФ-аз у пріон-реплікувальних (довгастих мозок, мозочок, селезінка, порожня кишка) та інших

(печінка, нирки, м'яз) тканинах щурів, що можна використати для дослідження функцій PrP^C в організмі та патогенетичних процесів розвитку пріонних захворювань.

Виявлено локалізацію PrP^C у довгастому мозку, мозочку, периферичних пріон-реплікувальних та інших органах щурів. Загальний вміст і рівень його молекулярних ізоформ (ди-, моно- та деглікозилюваної) зростав у тварин віком 6 місяців, порівняно з 1-місячними, та знижувався у 30-місячних, порівняно зі 6-місячними. Зі збільшенням віку тварин встановлено зниження активності та зміни кінетичних показників Na⁺-K⁺-, Ca²⁺-АТФ-аз, що вказує на зниження інтенсивності гідролізу АТФ і зростання спорідненості ензимів до субстрату (АТФ). Вміст іонів натрію і калію суттєво не змінювався, а загального кальцію – навпаки, значно зростав. Фактори віку і тканинної локалізації виявляли різний вплив на онтогенетичну динаміку PrP^C та Na⁺-K⁺- і Ca²⁺-АТФ-аз. З метою прогнозування патології побудовано моделі вікових змін досліджених у роботі показників.

Ключові слова: щури, пріон-реплікувальні тканини, клітинний пріон, імуногістохімічний аналіз, Дот-блот, Вестерн-блот, Na⁺-K⁺- та Ca²⁺-АТФ-ази, кінетичні параметри, вікові зміни.

АННОТАЦІЯ

Кушкевич М.В. Онтогенетические изменения локализации и содержания клеточного приона и его связь с активностью АТФ-аз. — Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2016.

В диссертации изучены онтогенетические изменения локализации и содержания клеточного приона, а также установлено корреляцию с активностью Na⁺-K⁺- и Ca²⁺-АТФ-аз в пріон-реплікуючих (продолговатый мозг, мозжечек, селезенка, тонкий кишечник) и других (печень, почки, мышца) тканях крыс. Эти результаты могут быть использованы при исследованиях функций PrP^C в организме и прогнозирования патогенетических процессов развития пріонных заболеваний.

Виявлено локалізацію PrP^C в продолговатом мозге, мозжечке, периферических пріон-реплікуючих и других органах крыс. Общее содержание и уровень его молекулярных изоформ (ди-, моно- и дегликозилированной) возрастали в животных в возрасте 6 месяцев, по сравнению с 1-месячными, и снижались у 30-месячных, по сравнению с 6-месячными. С возрастом в животных отмечали уменьшение активности и изменения кинетических показателей Na⁺-K⁺-, Ca²⁺-АТФ-аз, что указывает на снижение интенсивности гидролиза АТФ и рост родства энзимов к субстрату (АТФ). Содержание ионов натрия и калия существенно не изменялось, а общего кальция – значительно возрастало. Факторы возраста и тканевой локализации по-разному влияли на онтогенетическую динамику PrP^C, Na⁺-K⁺- и Ca²⁺-АТФ-аз. С целью прогнозирования патологии построены модели возрастных изменений исследованных в работе показателей.

Ключевые слова: крысы, прион-реплицирующие ткани, клеточный прион, иммуногистохимический анализ, Дот-блот, Вестерн-блот, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - и Ca^{2+} -АТФ-азы, кинетические параметры, возрастные изменения.

SUMMARY

Kushkevych M.V. Ontogenetic changes of localization, level of cellular prion and its relationship with ATPases activities. — Manuscript.

The dissertation for awarding the Doctor of Philosophy (PhD) degree in biology, specialty 03.00.04 – biochemistry. – Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv, 2016.

The ontogenetic changes of localization and level of cellular prion was studied and a correlation with the activities of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - and Ca^{2+} -ATPases in prion replication (medulla oblongata, cerebellum, spleen, jejunum) and other (liver, kidneys, muscle) rats' tissues was calculated. These data are valuable for the study of PrP^{C} functions in the body and pathogenetic processes of prion diseases.

The PrP^{C} localization in the medulla oblongata, cerebellum and peripheral prion replication and other organs of rats was determined. In particular, the PrP^{C} was found in oil core and ascending tract of the medulla oblongata; in neurons of the molecular, granular and Purkinje cells layers of the cerebellar cortex; in lymphocytes in the lamina propria of villis, in crypts and submucosa membrane, in microvilli of epithelial cells, in lymphocyte cells and M-cells of Peyyer plaques of the jejunum; in the red pulp near of capsule and trabeculae of the spleen; in hepatocytes and reticuloendothelial cells of liver; in vascular glomeruli, direct and convoluted tubule of nephrons of the kidneys; in the muscle fibers of femoral muscle.

The total level of PrP^{C} and molecular isoforms (including di-, mono- and nonglycosylated) increased in 6 months animals compared to 1 month rats, and decreased in 30 months animals compared to 6 months.

The diglycosylated form level most changed in the medulla oblongata, liver and jejunum, the monoglycosylated form level most changed in the medulla oblongata, spleen and liver. The range of the nonglycosylated form level was the largest in the cerebellum, spleen and kidneys, but in the medulla oblongata of 30 month rats, its level increased by 40 % compared to 6 months. The studied three isoforms levels of PrP^{C} varied the least in femoral muscle.

The decrease in activity and changes of the kinetic parameters of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -, Ca^{2+} -ATPases was showed in the experiments with increasing of animals' age. It indicates the reduction of ATP hydrolysis intensity and the increase of enzymes affinity to substrate (ATP). The levels of sodium and potassium ions were not significantly changed but the total calcium level was increased. The factors of ages and tissue localization had different effects on ontogenetic dynamics of PrP^{C} , $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - and Ca^{2+} -ATPases. To predict of the pathology, the models of age related changes of the studied indicators were created.

Keywords: rats, prion replication tissues, cellular prion, immunohistochemical analysis, Dot blot, Western blot, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - and Ca^{2+} -ATPases, kinetic parameters, age related changes.