

УДК 57.017.23+112.7:352.465:151.643

М. В. КУШКЕВИЧ, аспірант

Інститут біології тварин НААН

вул. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна, e-mail: m_kushkevych@ukr.net

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ВИЯВЛЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНОГО ПРІОНА І АКТИВНІСТЬ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФ-ази У РІЗНИХ ТКАНИНАХ ЩУРІВ

Проведено імуногістохімічний аналіз тканин щурів, віком шість місяців. Виявлено фізіологічний пріон у лімфоїдних клітинах звивистих каналців нефронів, сполучній тканині печінки та стегового м'яза, а також у сперматогенних клітинах та інтерстиціальній тканині сім'яників. Визначено активність $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФ-ази, вміст іонів натрію та калію у пріон-реплікувальних органах щурів. Встановлено пряму середню кореляцію між кількістю фізіологічного пріона та активністю $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФ-ази у тканинах нирок, печінки, сім'яників та стегового м'яза.

Ключові слова: фізіологічний пріон, пріон-реплікувальні органи, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФ-аза, іони, натрій, калій.

Пріони — це білки нервових клітин, які відрізняється від відомих збудників (бактерій, вірусів) відсутністю клітинної організації та нуклеїнових кислот, що забезпечують їхню репродукцію. Найбільш важливим є те, що вони спричиняють ураження мозку людини і тварин з летальним наслідком. Ці захворювання є інфекційними, хоча можуть бути спадковими та спорадичними [2, 20].

Для реплікації патологічного пріона необхідний фізіологічний пріон. Він є поверхневим мембранним протеїдом, який виконує важливі функції, серед яких участь клітинній адгезії, трансмембранній взаємодії, транспорті деяких іонів, антиоксидантному захисті та ін. [17, 22].

За умов конверсії у патологічну форму фізіологічний пріон не здатний виконувати клітинну функцію, у результаті чого виникає порушення різних ланок метаболізму.

Показано, що за умов видалення гену пріон-протеїна ($Prnp_{0/0}$), миші ставали нечутливими до патологічного пріона і у них хвороба не виникала [14]. Отже, патологічний пріон спричиняє виникнення хвороби лише

за наявності фізіологічного. Очевидно, що поширення інфекції залежить від рівня продукції останнього в тканинах організму. Тобто визначення тканинної локалізації та кількості білка є важливим у вивченні патогенезу інфекції.

Важливим мембранним ферментом тканин є $\text{Na}^+\text{-K}^+$ АТФ-аза, який підтримує градієнти іонів натрію та калію, використовуючи енергію АТФ. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ АТФ-аза складається з двох субодиниць. Альфа-субодиниця є ліпопротеїдом, перетинає мембрану кілька разів, утворюючи петлі. Активний центр ферменту локалізований всередині клітини і є доступним для АТФ. Центри зв'язування іонів Na^+ і K^+ розташовані між петлями [1].

Бета-субодиниця, як і фізіологічний пріон, є сіалоглікопротеїдом, що є вмонтований у мембрану на зовнішній поверхні клітини. Вважають, що ця субодиниця виконує регуляторні функції та визначає антигенні властивості [5].

Припускають залежність між активністю ферменту та вмістом фізіологічного пріона, оскільки обидва білки виконують подібні функції та мають подібну локалізацію в організмі.

Відомо, що пріони експресуються у клітинах центральної нервової системи та лімфоретикулярної тканини. Проте відсутні дані про їх локалізацію та вміст в інших тканинах організму.

Метою роботи було дослідити локалізацію та кількість фізіологічного пріона у різних тканинах щурів, використовуючи метод імуногістохімічного аналізу, а також визначити активність $\text{Na}^+\text{-K}^+$ АТФ-ази та вміст іонів натрію і калію.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проводили на самцях лабораторних щурів *Rattus norvegicus var. alba*, лінії *Wistar*, яких утримували у стандартних умовах віварію. Тварин, віком шість місяців, декапітували під ефірним наркозом, відбирали нирки, печінку, сім'яники та стегновий м'яз.

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

Фіксування тканин, промивання, зневоднення та формування парафінових блоків проводили за стандартною методикою.

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

Зрізи промивали у TBST, рН 7,6 (0,05 М Тріс, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, H₂O). У подальшому їх інкубували з моноклональними первинними антитілами (*Antibody mAB6H4; Prionics*, Швейцарія). 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 на мікроскопі *Axioskop 40 (Carl Zeiss*, Німеччина). Контрольними вважали зрізи тканин, зафарбовані лише гематоксиліном.

Визначення кількості фізіологічного пріона проводили методом оцифрування фотографій тканин, використовуючи програму ВідеоТест 5.0 [23].

Для визначення активності Na⁺-K⁺ АТФ-ази тканини гомогенізували упродовж 1–2 хв на гомогенізаторі *Omni GLH-220* у середовищі сахарози. У результаті повторного центрифугування отримували мембранну фракцію тканин [7, 13], в якій визначали досліджуваний показник.

Активність ферменту визначали в інкубаційному середовищі. Розраховували за різницею між активностями загальної та оуабаїнечутливої АТФ-ази, яку визначали у середовищі з 1 мМ оуабаїну. Мітохондріальну АТФ-азу блокували 1 мМ NaN₃. Мірою активності була концентрація неорганічного фосфату, яку виражали у мкмоль Ф_н у перерахунку на 1 мг білка на 1 хв (мкмоль Ф_н/(мг білка×хв)) [21]. Визначення білка проводили методом Лоурі [18].

Вміст іонів натрію та калію визначали з використанням комерційних наборів фірми Фелісіт-Діагностика (Україна) [8].

Для оцінки вірогідної різниці між статистичними характеристиками альтернативних сукупностей даних, обраховували коефіцієнт Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця за показника достовірності P<0,05–0,001 [3].

Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel та Origin [4].

Результати досліджень та їх обговорення

У патогенезі пріонних інфекцій важливим є вивчення поширення збудника в організмі та його проникнення у центральну нервову систему внаслідок дуже тривалого інкубаційного періоду [9].

Відомо, що спочатку збудник потрапляє до кишечника, де нагромаджується у лімфоретикулярній тканині, а тоді поширюється в інші органи організму (лімфатичні вузли, селезінку, мигдалики) [15].

Оскільки фізіологічний пріон є субстратом для утворення патологічного, то дослідження його локалізації у тканинах і органах, є важливим у поясненні механізму патогенезу пріонопатій. Тому нами було вивчено локалізацію фізіологічного пріона у тканині нирок, печінки, сім'яників та скелетних м'язів лабораторних тварин.

За результатами гістологічних досліджень було встановлено, що кіркова речовина містила тільця та звивисті канальці нефронів (рис. 1а), у клітинах яких виявлено незначні кількості фізіологічного пріона за великого збільшення мікроскопа (рис. 1б). Можливо, він локалізується на поверхні лімфоцитів. Тільця нефронів містили судинні клубочки, на поверхні яких були помітні вузькі щілини — порожнини капсули Боумена-Шумлянського. Мозкова речовина була утворена прямими проксимальними та дистальними, а також висхідними та нисхідними канальцями нефронів [6, 16], які не містили локусів досліджуваного білка.

Отримані результати корелюють з даними літератури [19]. Так, в інфікованих хом'яках, а також, у хворих людей було показано наявність патологічного пріона у збірних трубках нирок і сечі. Тобто, можна припустити, що наявність фізіологічного пріона у нирках тварин пов'язано з чутливістю до інфекції.

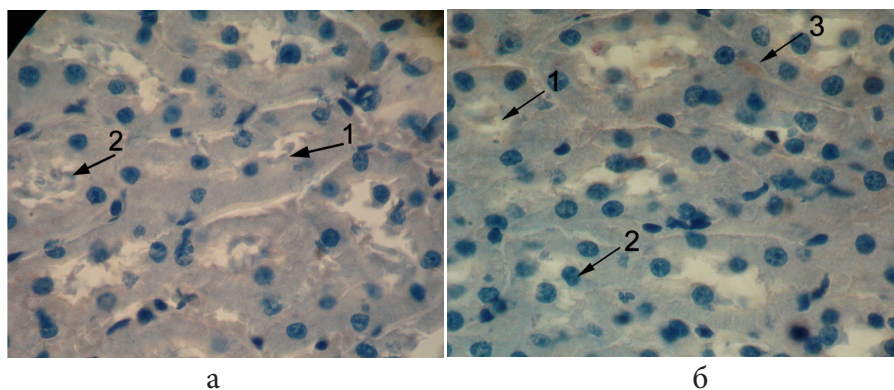


Рис. 1. Нирка щурів: а — контроль; б — імуногістохімія; 1 — кіркова речовина; 2 — звивисті канальці нефронів; 3 — фізіологічний пріон (Гематоксилін, $\times 1000$)

Під час імуногістохімічного аналізу зразків печінки встановлено нормальну структуру тканини. На гістопрепаратах були помітні печінкові часточки, що утворені радіальними рядами гепатоцитів – печінковими балками. Гепатоцити округлої форми містили ядро (рис. 2а). Кровоносні судини (вени та артерії) та жовчні протоки нормального наповнення утворювали тріади. Фізіологічний пріон виявили у лімфоїдних клітинах сполучної тканини (рис. 2б). Наявність фізіологічного пріона у тканині печінки мишей також було встановлено методом вестерн-блот аналізу [10].

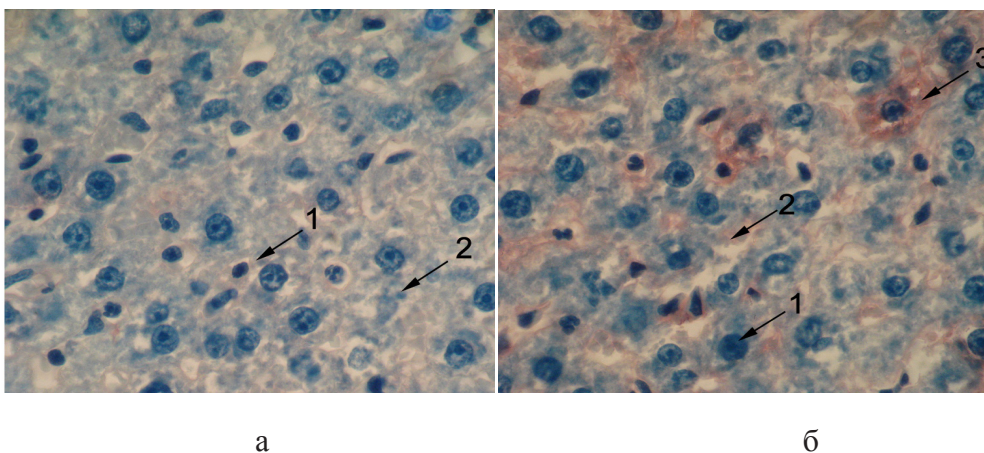


Рис. 2. Печінка щурів: а — контроль; б — імуногістохімія; 1 — гепатоцити; 2 — сполучна тканина; 3 — фізіологічний пріон (Гематоксилін, $\times 1000$)

Проведені нами імуногістохімічні дослідження сім'яників щурів, показали нормальну структуру сім'яних трубочок, які були округлої форми та містили фолікулярні клітини (Сертоллі) та кілька рядів сперматогенних клітин – сперматогоній, сперматоцидів, сперматидів та сперматозоїдів, які розташовувалися у центрі (рис. 3а). Вони містили у своєму складі фізіологічний пріон (рис. 3б). В інтерстиціальній тканині були також помітні пріонвмісні клітини. Наявність досліджуваного білка у тканині сім'яників, можливо, пов'язане зі спадковими формами пріонних захворювань [20].

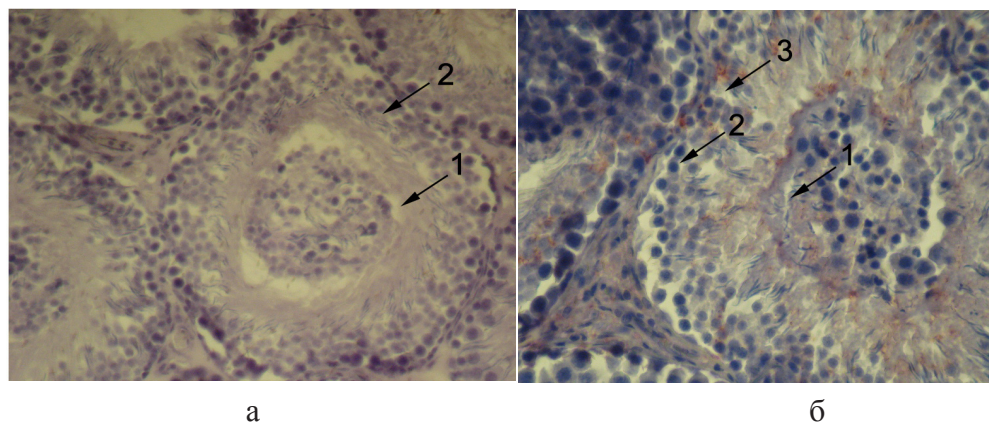


Рис. 3. Сім'яники шурів: а — контроль; б — імуногістохімія; 1 — сім'яні трубочки; 2 — сперматогенні клітини; 3 — фізіологічний пріон (Гематоксилін, $\times 400$)

Імуногістохімічний аналіз тканини стегнового м'яза лабораторних тварин показав посмугованість м'язових волокон із овальними ядрами (рис. 4а). Між волокнами розташовувалися клітини сполучної тканини, що містили незначні кількості фізіологічного пріона (рис. 4б), порівняно з іншими тканинами. Тобто, припускаємо, що за наявності інфекції нагромадження патологічного пріона буде незначним. Це підтверджують дані, що вказують на відсутність патологічного пріона у м'язах корів, заражених цим збудником [11, 12].

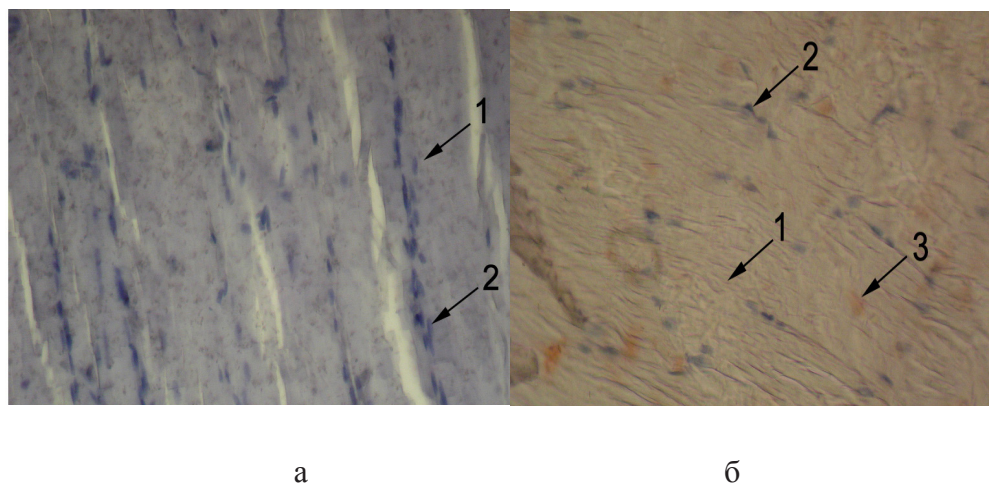


Рис. 4. Стегновий м'яз шурів: а – контроль; б – імуногістохімія; 1 – м'язові волокна; 2 – ядра міоцитів; 3 – фізіологічний пріон (Гематоксилін, $\times 400$)

Тобто поширення інфекції по периферичних органах залежить від активності клітин та вмісту в них фізіологічного пріона. Особливу роль у цьому процесі, вірогідно, відіграють В-лімфоцити. Так, у трансгенних мишей, яким інгібували продукцію В-лімфоцитів, було встановлено зниження розвитку хвороби після внутрішньочеревинного введення збудника [14]. Отже, клітинний пріон-протеїн, розташований у лімфоїдних клітинах, бере важливу участь у розвитку пріонної інфекції в організмі.

Найбільший вміст фізіологічного пріона серед досліджуваних тканин був виявлений у печінці та сім'яниках ($383,21 \pm 4,63$ та $330,75 \pm 3,51$ умовних одиниць). У нирках та м'язі стегна вміст фізіологічного пріона становив $325,19 \pm 4,43$ та $297,61 \pm 5,84$ умовних одиниць відповідно.

Найбільша активність $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФ-ази в органах пріон-реплікувальної системи лабораторних тварин була встановлена у печінці ($1,19 \pm 0,02$ мкмоль $\Phi_{\text{H}} / (\text{мг білка} \times \text{хв})$), а найменша – у сім'яниках ($0,59 \pm 0,02$ мкмоль $\Phi_{\text{H}} / (\text{мг білка} \times \text{хв})$), що у два рази менше, порівняно з тканиною печінки (рис. 5а).

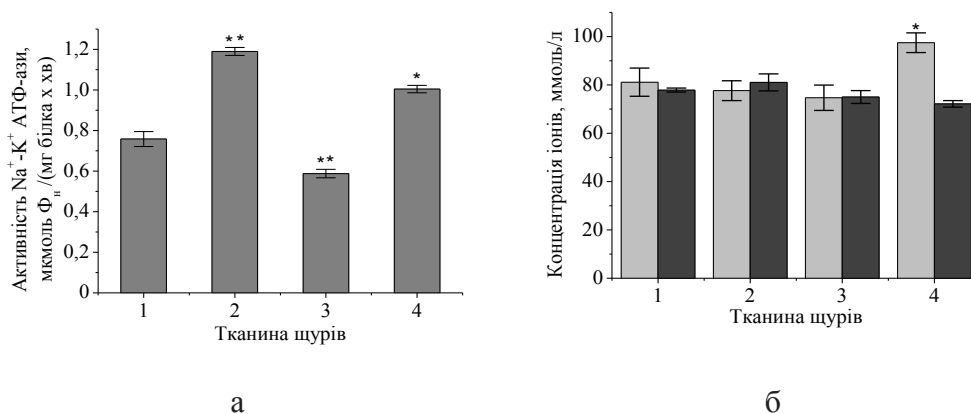


Рис. 5. Активність $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФ-ази (а) та вміст іонів (б) натрію (-■-) та калію (-■-) у тканинах щурів: 1 — нирки; 2 — печінка; 3 — сім'яники; 4 — м'яз стегна ($M \pm m$, $n = 3$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, порівняно з тканиною нирок)

Під час визначення вмісту Na^+ та K^+ , встановлено неоднаковий їх розподіл у тканинах щурів (рис. 5б). Найвищий вміст іонів натрію виявили у м'язі стегна — $74,71 \pm 5,25$ ммоль/л, а калію — у печінці — $81,04 \pm 3,52$ ммоль/л.

Проведення кореляційного аналізу даних, які характеризують вміст фізіологічного пріона та активність Na^+-K^+ АТФ-ази у тканинах щурів, дозволило виявити позитивну залежність (коефіцієнт кореляції становив 0,45) (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст фізіологічного пріона та активність Na^+-K^+ АТФ-ази у пріон-реплікувальних органах щурів

Орган	Вміст фізіологічного пріона, умовні одиниці	Активність Na^+-K^+ АТФ-ази, мкмоль Φ_{H} / (мг білка \times хв)	Коефіцієнт кореляції
Нирки	325,19 \pm 4,43	0,76 \pm 0,04	0,45
Печінка	383, 21 \pm 4,63	1,19 \pm 0,02	
Сім'яники	330,75 \pm 3,51	0,59 \pm 0,02	
Стегновий м'яз	297,61 \pm 5,84	1,00 \pm 0,02	

Можна стверджувати про взаємозв'язок між кількістю фізіологічного пріона та активністю Na^+-K^+ АТФ-ази у досліджуваних тканинах.

Висновки

1. Методом імуногістохімічного аналізу вперше виявлено фізіологічний пріон у клітинах нирок, печінки, сім'яників та м'язів стегна лабораторних тварин.
2. Встановлено, що у нирках фізіологічний пріон локалізований у лімфоцитах звивистих канальців нефронів та поблизу судинних клубочків. У печінці та стегновому м'язі він виявлений у клітинах сполучної тканини. У сім'яниках встановлено фізіологічний пріон у сперматогенних клітинах, зокрема сперматоцитах, сперматидих і сперматозоїдах.
3. Визначено активність Na^+-K^+ АТФ-ази у пріон-реплікувальних органах щурів. Найбільшу активність ферменту встановлено у печінці, порівняно з іншими тканинами.
4. Визначено вміст іонів натрію та калію у тканинах пріон-реплікувальної системи лабораторних тварин. Найбільший вміст іонів натрію встановлено у стегновому м'язі, тоді як калію — у печінці щурів.

5. У досліджуваних органах шурів кількість фізіологічного пріона позитивно корелює з активністю $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФ-ази.

Список використаної літератури

1. *Болдырев А. А.* $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФ-аза как олигомерный ансамбль / А. А. Болдырев // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 8. — С. 1013–1025.
2. *Вербицький П. І.* Губчастоподібна енцефалопатія великої рогатої худоби та інші пріонні інфекції / П. І. Вербицький. — К.: Ветінформ, 2005. — 240 с.
3. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
4. *Лапач С. І.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. І. Лапач, А. В. Губенко, П. П. Бабич. — Киев: Морион, 2000. — 319 с.
5. *Лопина О. Д.* Взаимодействие каталитической субъединицы Na/K -АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами / О. Д. Лопина // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 10. — С. 1389–1400.
6. *Новак В. П.* Цитологія, гістологія, ембріологія: Навч. посібник / В. П. Новак, А. П. Мельниченко. — Біла Церква: Видавництво Білоцерківського державного аграрного університету, 2005. — 256 с.
7. *Остапченко Л. І.* Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій / Л. І. Остапченко, І. В. Михайлик. — К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2006. — 215 с.
8. *Тица Н.* Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Н. Тица. — Москва: Лабинформ, 1997. — С. 225–226.
9. *Шкундина И. С.* Прионы / И. С. Шкундина, М. Д. Тер-Аванесян // Успехи биологической химии. — 2006. — № 46. — С. 385–423.
10. *A cell line infectible by prion strains from different species / M. Courageot, N. Daude, R. Nonno, S. Paquet, M. Di Bari, A. Le Dur, et al.* // J Gen Virol. — 2008. — P. 341–348.
11. *Distribution of PrPSc in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan / N. Iwata, Y. Sato, Y. Higuchi, K. Nohtomi, N. Nagata, H. Hasegawa, et al.* // Jpn J Infect Dis. — 2006. — Vol. 59. — P. 100–107.

12. *Espinosa JMM*. Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge / JMM Espinosa, JRM Castilla, J. Torres // *J Gen Virol*. — 2007. — Vol. 88. — P. 1379–1383.
13. *Jorgensen P. L*. Purification of Na⁺–K⁺ ATPase: enzyme sources, preparative problems, and preparation from mammalian kidney / P. L. Jorgensen // *Methods in enzymology*. — 1988. — Vol. 156. — P. 29–43.
14. *Kingsbury D. T*. Evidence for normal cell-mediated immunity in scrapie-infected mice / D. T. Kingsbury // *Infect. Immun*. — 1981. — Vol. 32. — P. 1176–1180.
15. *Kovacs G*. Prion Diseases: From Protein to Cell Pathology / G. Kovacs, H. Budka // *The American Journal of Pathology*. — 2008. — Vol. 172, № 3. — P. 555–565.
16. *Kuehnel W*. Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy / W. Kuehnel // New York: Thieme Stuttgart, 2003. — 534 p.
17. *Linden R*. Physiology of the Prion Protein / R. Linden // *Physiol Rev*. — 2008. — Vol. 88. — P. 673–728.
18. *Lowry O. N*. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. N. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. R. Forr et al. // *J. Biol. Chem*. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265–275.
19. *Peralta O*. Quantitative and qualitative analysis of cellular prion protein (PrP^C) expression in bovine somatic tissues / O. Peralta, W. Eyestone // *Prion*. — 2009. — Vol. 3. — P. 161–170.
20. *Prusiner S. B*. Genetic and infectious prion diseases // S. B. Prusiner. — *Arch. Neurol*. — 1993. — Vol. 50. — P. 1129–1153.
21. *Rathbun W*. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / W. Rathbun, V. Betlach // *Anal. Biochem*. — 1969. — Vol. 28. — P. 436–447.
22. *Westergard L*. The cellular prion protein (PrP^C): its physiological function and role in disease / L. Westergard, H. Christensen, D. Harris // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2007. — Vol. 1772. — P. 629–644.
23. *www.videotest.ru*.

Стаття надійшла до редакції 26.12.2011

М. В. Кушкевич,

Институт биологии животных НААН,

ул. Стуса, 38, Львов, 79034, Украина, e-mail: m_kushkevych@ukr.net

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПРИОНА И АКТИВНОСТЬ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФазы В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ КРЫС

Резюме

Проведен иммуногистохимический анализ тканей крыс в возрасте шести месяцев. Обнаружен физиологический прион в лимфоидных клетках извитых канальцев нефронов, соединительной ткани печени и бедренного мышцы, а также в сперматогенных клетках и интерстициальной ткани семенников. Определены активность $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФазы и содержание ионов натрия и калия в прион-реплицирующих органах крыс. Установлена прямая корреляция между количеством физиологического приона и активностью $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФазы в тканях почек, печени, семенников и бедренного мышцы.

Ключевые слова: физиологический прион, прион-реплицирующие органы, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФаза, ионы, натрий, калий.

M. V. Kushkevych

Institute of Animal Biology NAAS,

38, Stus str., Lviv, 79034, Ukraine, e-mail: m_kushkevych@ukr.net

THE IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF PHYSIOLOGICAL PRION AND $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase ACTIVITY IN DIFFERENT RATS TISSUES

Summary

The immunohistochemical analysis of rats tissues aged six months was performed. The physiological prion was founded in the lymphoid cells of the convoluted tubules of nephrons in connective tissue of liver and femoral muscle and in spermatogenous cells and interstitial testicular tissue. The activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and content of sodium and potassium ions in rats prion-replicating organs was determined. The direct correlation between the number of physiological prion and activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase was established in the tissues of kidneys, liver, testis and femoral muscle.

Key words: physiological prion, prion-replicating organs, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, ions, sodium, potassium.