

УДК 57.017.23+112.7:352.465:151.643

## ЛОКАЛІЗАЦІЯ КЛІТИННОГО ПРІОНА І АКТИВНІСТЬ $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ТА $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз У СЕЛЕЗІНЦІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

М. В. Кушкевич, В. В. Влізло  
m\_kushkevych@ukr.net

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38; м. Львів, 79034, Україна

Проведено імуногістохімічний аналіз тканин селезінки щурів різного віку. На основі його результатів встановлено локалізацію клітинного пріона ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ). На фоні вікових змін селезінки тканинна локалізація  $\text{PrP}^{\text{C}}$  є незмінною, зокрема, досліджуваний протеїн виявлено на поверхні лейкоцитів червоної пульпи уздовж трабекул і поблизу капсули. У лімфоїдних фолікулах клітинний пріон не виявлено. Методом імуногістохімії та дот-блотинг аналізу встановлено зміну кількості клітинного пріона, залежно від віку щурів. Зокрема, вміст  $\text{PrP}^{\text{C}}$  є найменшим у селезінці одномісячних щурів. У тварин, віком шість місяців, кількість пріона зростає, а у тридцятимісячних — зменшується. Враховуючи те, що клітинний пріон є розміщений на зовнішній поверхні клітинної мембрани і залучений у регуляцію  $\text{Ca}^{2+}$ -транспорту, то кількісні зміни активності

$\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз пов'язані з  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Такий взаємозв'язок встановлений на основі даних кореляційного аналізу. Встановлено, що активність цих ензимів знижується з віком щурів. Методом кореляційного аналізу подібна залежність встановлена між кількістю  $\text{PrP}^{\text{C}}$  та активністю  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФ-ази, оскільки цей ензим у своєму складі містить субодиницю, яка як і клітинний пріон є сіалоглікопротеїдом. Вікові зміни активності досліджуваних іонних транспортерів впливають на вміст іонів. Зокрема, вміст іонів натрію та кальцію зростає, тоді як калію — достовірно не змінюється.

**Ключові слова:** СЕЛЕЗІНКА, КЛІТИННИЙ ПРІОН,  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ТА  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази, ІОНИ НАТРІЮ, КАЛІЮ ТА КАЛЬЦІЮ

## CELLULAR PRION LOCALIZATION AND ACTIVITY OF $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - AND $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases IN THE SPLEEN OF DIFFERENT AGES RATS

M. V. Kushkevych, V. V. Vlizlo  
m\_kushkevych@ukr.net

Institute of Animal Biology of NAAS, V. Stus str. 38; Lviv 79034, Ukraine

An immunohistochemical analysis of spleen tissue of different ages rats are performed. Based on its results the localization of cellular prion ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) is established. The localization of  $\text{PrP}^{\text{C}}$  is unchanged against to the age-related changes of spleen tissue, including the investigated protein was found on the surface of red pulp white blood cells along the spleen trabeculars and near the capsule. The cellular prion in lymphoid follicles is not found. The number change of cellular prion, depending on the rats age, are showed by the immunohistochemical and dot-blotting analysis methods. In particular, the  $\text{PrP}^{\text{C}}$  content is the lowest in one-month rats spleen. The

prion number increases in six months aged animals, and thirty-months — decreases. According to the cellular prion is located on the cell membrane outer surface, and it is involved in the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport regulation, since quantitative changes in activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ases are associated with  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . This relationship is established based on the correlation analysis. The activity decrease of these enzymes with rats age is established. Similar depending between the  $\text{PrP}^{\text{C}}$  number and  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity is established by the method of correlation analysis, since the enzyme contains in its composition a subunit, that as the cellular prion is sialichlikoproteid. The age-

*related changes in the activity of the studied ions transporters affect on the ions content. In particular, the content of sodium and calcium ions increases, however potassium ions are significantly unchanged.*

**Keywords:** SPLEEN, CELLULAR PRION,  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - AND  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ , SODIUM IONS, POTASSIUM AND CALCIUM

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ПРИОНА И АКТИВНОСТЬ $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - И $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ В СЕЛЕЗЕНКЕ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

*М. В. Кушкевич, В. В. Влизло*  
m\_kushkevych@ukr.net

Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38; г. Львов, 79034, Украина

*Проведено иммуногистохимический анализ тканей селезенки крыс разного возраста. На основе его результатов установлено локализацию клеточного приона ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ). На фоне возрастных изменений селезенки тканевая локализация  $\text{PrP}^{\text{C}}$  является неизменной, в частности, исследуемый протеин обнаружены на поверхности лейкоцитов красной пульпы селезенки вдоль трабекул и вблизи капсулы. В лимфоидных фолликулах клеточный прион не обнаружено. Методом иммуногистохимии и дот-блотинг анализа установлено изменение количества клеточного приона в зависимости от возраста крыс. В частности, содержание  $\text{PrP}^{\text{C}}$  является наименьшим в селезенке одномесячных крыс. У животных в возрасте шести месяцев, количество приона возрастает, а в тридцатимесячных — уменьшается. Учитывая, что клеточный прион является размещенный на внешней поверхности клеточной мембраны и вовлечен в регуляцию  $\text{Ca}^{2+}$ -транспорта, то количественные изменения активности  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  связаны с  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Такая взаимосвязь установлена на основе данных корреляционного анализа. Установлено, что активность этих энзимов снижается с возрастом крыс. Методом корреляционного анализа подобная зависимость установлена между количеством  $\text{PrP}^{\text{C}}$  и активностью  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , поскольку этот энзим в своем составе содержит субъединицу, которая как и клеточный прион является сиалогликопротеидом. Возрастные изменения активности исследуемых ионных транспортеров влияют на содержание ионов. В частности, содержание ионов натрия и*

*кальция возрастает, тогда как калия — достоверно не меняется.*

**Ключевые слова:** СЕЛЕЗЕНКА, КЛЕТОЧНЫЙ ПРИОН,  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - И  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ -азы, ИОНЫ НАТРИЯ, КАЛИЯ И КАЛЬЦИЯ

Пріонні інфекції або трансмісивні спонгіоформні енцефалопатії (ТСЕ) — це летальні захворювання центральної нервової системи людини і тварин, збудником яких є інфекційний пріон [1]. Відомо, що ТСЕ можуть виникати не лише внаслідок інфікування пріоном, але й спорадично з невідомих причин в осіб зрілого віку [2].

Попередником інфекційного пріона ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) є його клітинний аналог — фізіологічний (клітинний) пріон ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ).  $\text{PrP}^{\text{C}}$  є мембранним протеїном. Він бере участь у клітинній адгезії та розпізнаванні, регуляції транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  та інших іонів через мембрану, антиоксидантному та антиапоптичному захисті та інших важливих процесах [3–5].

Під час інкубаційного періоду чи клінічного розвитку хвороби реплікація пріонів відбувається не тільки в нервовій системі, але й у клітинах імунної системи, яка не реагує на їхню наявність. Така реакція організму відбувається завдяки тому, що обидві форми пріона (клітинна й інфекційна) є подібними і кодуються одним і тим же геном господаря. Тому на першому етапі інфікування немає

звичайних біологічних реакцій з боку макроорганізму на потрапляння інфекції [6].

Відомо, що з допомогою клітин імунної системи пріони розносяться по організму і, проникаючи через гематоенцефалічний бар'єр, уражають нейрони і гліальні клітини [1].

Є відомості про реплікацію PrP<sup>Sc</sup> у селезінці після його надходження в макроорганізм. Проведені дослідження на мишах показали, що патологічні зміни селезінки спричиняють продовження інкубаційного періоду, а видалення тимуса не впливає на розвиток інфекції [7]. Периферичне інфікування мишей призводить до нагромадження збудника у селезінці ще до появи його у мозку. За цих умов селезінка не виконує захисної функції, а, навпаки, є органом реплікації пріона.

Клітинний пріон як попередник інфекційного встановлено у клітинах селезінки [8], проте відсутні дані про його тканинну локалізацію та кількісні зміни, пов'язані з віком. Також відомо, що PrP<sup>C</sup> бере участь у регуляції Ca<sup>2+</sup>-гомеостазу, впливаючи на активність Ca<sup>2+</sup>-каналів [4], проте немає даних про його вплив на АТФ-ази у віковій динаміці. Також β-субодиниця Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФ-ази, як і клітинний пріон, є сіалоглікопротеїдом, що розміщений на зовнішній поверхні клітини [9], тому припускаємо взаємозв'язок між активністю ензиму та кількістю PrP<sup>C</sup>.

Метою роботи було вивчити локалізацію та вміст клітинного пріона, а також активність Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> та Ca<sup>2+</sup>-АТФ-аз і вміст відповідних іонів у селезінці щурів різного віку, що сприятиме більш повному розумінню механізмів розвитку трансмісивних спонгіоформних енцефалопатій.

### Матеріали і методи

Маніпуляції з тваринами проводили з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та 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. Тварин, віком один, шість та тридцять місяців, декапітували під ефірним наркозом і відбирали селезінку для досліджень.

Для імуногістохімічних досліджень проводили фіксування тканини, її промивання, зневоднення та формування парафінових блоків за допомогою стандартної методики [10].

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

Зрізи промивали у TBST, рН 7,6 (0,05 М Tris, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, H<sub>2</sub>O). 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 на мікроскопі *Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина)*. Контрольними вважали зрізи тканин, зафарбовані лише гематоксиліном.

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

Проводили дот-блотинг аналіз. Для цього тканину спочатку гомогенізували, а потім лізували у буфері (10 % N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-

етилmaleїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері, рН 7,4, з додаванням 0,001 % суміші інгібіторів протеїназ (*Sigma*, Німеччина) та центрифугували. У зразках об'ємом 0,4 мл визначали вміст протеїна методом Лоурі [12]. Зразки з однаковою концентрацією протеїна наносили на полівінілдіфторидну (PVDF) мембрану (*Millipor*, США), яку 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) [10].

Для визначення активності Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-та Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази зразки тканини гомогенізували упродовж 1–2 хв на гомогенізаторі *Omni GLH-220* у середовищі сахарози. У результаті повторного центрифугування отримували мембранну фракцію тканин [9, 13], в якій визначали досліджувані показники.

Активність Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФ-ази визначали в інкубаційному середовищі такого складу: NaCl — 125 мМ, KCl — 25 мМ, MgCl<sub>2</sub> — 5 мМ, Na<sub>2</sub>АТФ — 5 мМ, EGTA — 1 мМ, hepes — 20 мМ, сапонін 0,2 % (рН 7,4). Активність розраховували за різницею між активностями загальної та оуабаїнечутливої АТФ-ази, яку визначали у середовищі з 1 мМ оуабаїну (*Sigma*, Німеччина). Активність Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази визначали в інкубаційному середовищі такого складу: NaCl — 50 мМ, KCl — 100 мМ, MgCl<sub>2</sub> — 5 мМ, Na<sub>2</sub>АТФ — 5 мМ, hepes — 20 мМ, сапонін 0,2 %, оуабаїн — 1 мМ (рН 7,4). Активність Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази плазматичної мембрани (ПМ) розраховували за різницею між активностями, які визначали у середовищі 1 мкМ тапсигаргіну (*Sigma*, Німеччина) за

наявності та відсутності Ca<sup>2+</sup>, тоді як Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азу ендоплазматичної сітки (ЕПС) — за різницею між активностями, які визначали у середовищі з іонами Кальцію за відсутності та наявності тапсигаргіну. Мітохондріальну АТФ-азу блокували 1 мМ NaN<sub>3</sub>. Інкубували упродовж 10 хв. Мірою активності була концентрація неорганічного фосфату, яку визначали спектрофотометрично (λ=660 нм) і виражали у мкмоль Ф<sub>н</sub> у перерахунку на 1 мг протеїна за 1 хв (мкмоль Ф<sub>н</sub>/(мг протеїна×хв)) [14].

Вміст іонів натрію та калію визначали у тканині з використанням комерційних наборів фірми Фелісіт-Діагностика (Україна) [15], а кальцію — за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра С-115М [10].

Для оцінки вірогідної різниці між статистичними характеристиками альтернативних сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця за показника вірогідності p<0,05–0,001 [16].

Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel та Origin.

## Результати й обговорення

Під час дослідження селезінки щурів встановлено, що вона була плоско-втягнутої форми, ніжної та м'якої консистенції. У ній є парієтальна і вісцеральна поверхні та заокруглені дорсальний і вентральний кінці [17]. На отриманих гістозрізах тканини селезінки тварин різного віку помітно, що вона покрита сполучнотканинною капсулою (рис. 1–3), товщина якої неоднакова у різних ділянках. Під час мікроскопічного дослідження органа щурів одномісячного віку встановлено, що у цей період розвитку вже є сформовані трабекули (рис. 1 а, в). Паренхіма (пульпа) селезінки представлена кров'яними острівцями, які складаються з еритроцитів та лімфоцитів, проте формується поділ на червону і білу пульпу. Це, можливо, пов'язано із

диференціюванням артеріального русла органа, тобто з появою центральних артерій.

Проведений імуногістохімічний аналіз тканини селезінки дозволив встановити локалізацію та вміст клітинного пріона. Зокрема, він виявлений у паренхімі селезінки на поверхні лейкоцитів, які

розташовані поблизу капсули і трабекул (рис. 1 б, г). Кількість PrP<sup>C</sup> була незначною ( $425,65 \pm 7,87$  ум. од.), порівняно з тваринами іншого віку, що встановлено методом оцифрування мікрофотографій тканини за однакового збільшення.

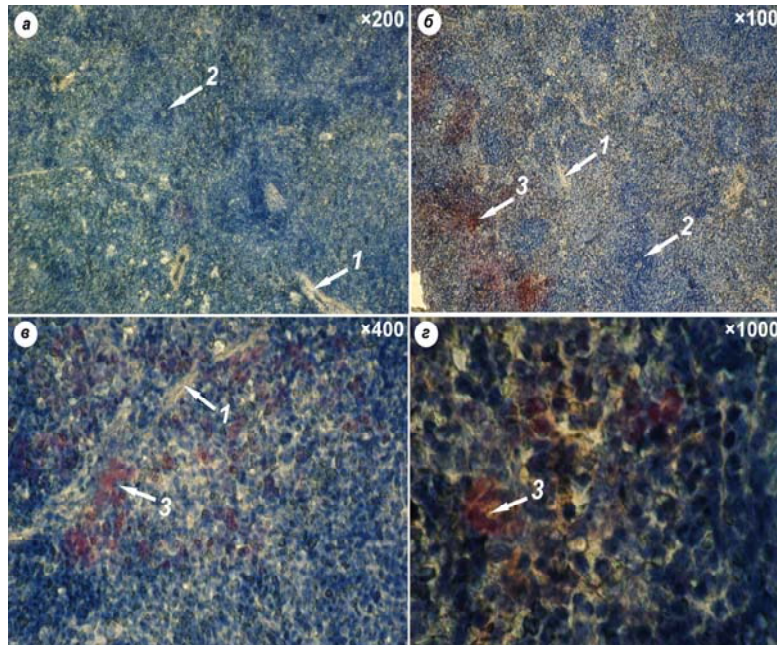


Рис. 1. Імуногістохімічний аналіз (б-г) селезінки щурів у віці один місяць: а — контроль; 1 — трабекули; 2 — формування лімфоїдних фолікулів; 3 — клітинний пріон (зафарбовано гематоксилином)

У селезінці щурів віком шість місяців спостерігали чіткий розподіл пульпи на білу та червону (рис. 2 а, б). Навкруги центральних артерій помітні лімфоїдні фолікули, в структурі яких відмічено чітке розмежування ділянок на периартеріальну, центр розмноження, або гермінативний центр, мантийну і маргінальну (рис. 2 а, б). Проте не виявили пріона у фолікулах селезінки. Натомість добре помітні його локуси у червоній пульпі, що містить макрофаги, лейкоцити, поодинокі мегакаріюцити та еритроцити [17] (рис. 2 в) та уздовж трабекул у лімфатичних піхвах, які містять кровonosні та лімфатичні судини (рис. 2 г) [17]. У Т- і

В-лімфоцитах виявлено клітинний пріон. У разі інфікування ці клітини можуть розносити інфекційний пріон з кров'ю по всьому організмі. Варто зазначити, що у тварин цього віку кількість PrP<sup>C</sup> була найбільшою ( $687,94 \pm 5,96$  ум. од.). Аналізуючи гістозрізи селезінки щурів віком тридцять місяців, встановлено, що на цьому етапі розвитку у структурі селезінки є певні особливості, зокрема трабекули відрізняються порівняно великою товщиною та розгалуженістю (рис. 3 а, б). Вони складаються із щільної волокнистої сполучної та клітин гладкої м'язової тканин (рис. 3 б).

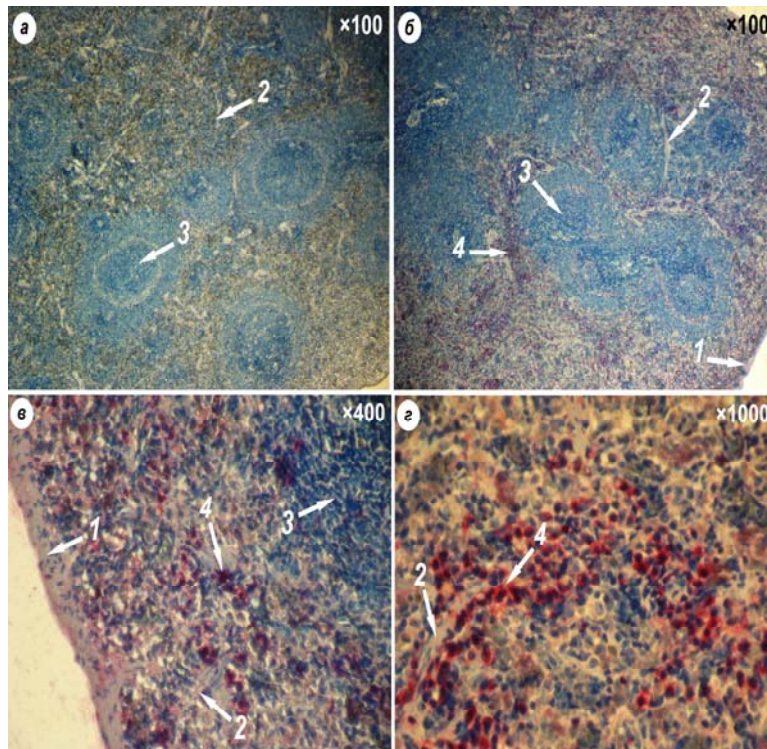


Рис. 2. Імуногістохімічний аналіз (б-г) селезінки щурів у віці шість місяців: а — контроль; 1 — капсула; 2 — трабекули; 3 — лімфоїдний фолікул; 4 — клітинний пріон (зафарбовано гематоксилином)

Лімфоїдні фолікули втрачають чіткий поділ на ділянки, їх кількість зменшується (рис. 3 в). За цих умов кількість клітинного пріона також дещо зменшується ( $510,81 \pm 4,98$  ум. од.), порівняно зі щурами, віком шість місяців. Проте, незмінною залишається його тканнна локалізація, зокрема локуси

встановлено уздовж трабекул та поблизу капсули у складі клітин червоної пульпи селезінки, тоді як у фолікулах PrP<sup>C</sup> не виявлено (рис. 3 б-г).

Отже, локуси клітинного пріона виявлено у червоній пульпі селезінки поблизу капсули та трабекул, тоді як у фолікулах вони відсутні.

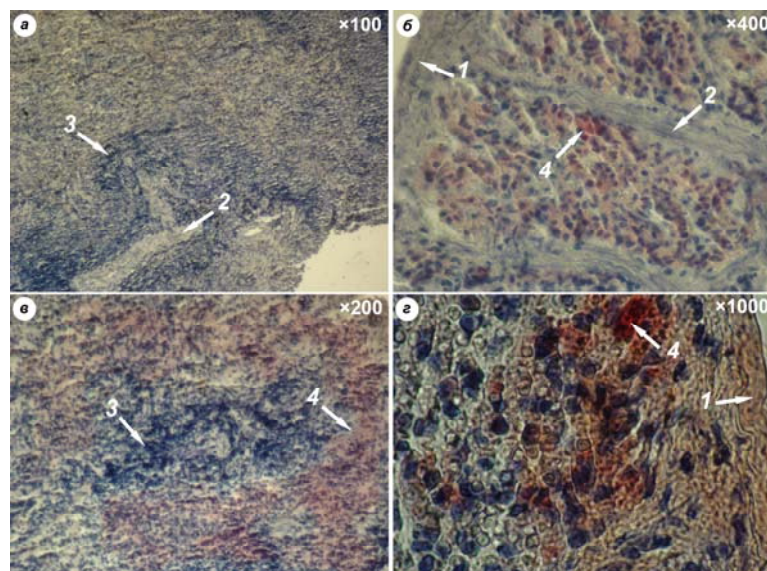


Рис. 3. Імуногістохімічний аналіз (б-г) селезінки щурів у віці тридцять місяців: а — контроль; 1 — капсула; 2 — трабекули; 3 — лімфоїдний фолікул; 4 — клітинний пріон (зафарбовано гематоксилином)

Його кількість зростає з віком щурів, проте подальше старіння організму супроводжується зменшенням кількості PrP<sup>C</sup>. Кількість клітинного пріона у селезінці щурів різного віку визначали методом дот-блотинг аналізу. Як і в попередніх дослідженнях, його кількість зростала у тканині зрілих тварин (6 міс.) — у 3,5 раза, порівняно з молодими (1 міс.). У тканині старих тварин (30 міс.) вміст PrP<sup>C</sup> зменшився на 61 %, порівняно зі зрілими (рис. 4).

Подібні результати отримали Mar Cuadrado-Tejedor зі спів. [18], проаналізувавши ділянку кори та гіпокампу головного мозку щурів методом вестерн-блотинг аналізу. В обох ділянках кількість PrP<sup>C</sup> збільшувалася у дорослих тварин (38 тижнів), порівняно з молодими (6 тижнів), а у старих тварин (56 тижнів) —

зменшувалася. Крім того, з віком збільшувалася кількість неглікозильованої форми протеїна.

Оскільки клітинний пріон бере участь у різних процесах метаболізму, зокрема залучений в транспорт іонів через мембрану, а також у регуляцію Ca<sup>2+</sup>-каналів, підтримуючи Ca<sup>2+</sup>-гомеостаз [4, 5], то припускають залежність між кількістю PrP<sup>C</sup> та активністю ензимів-транспортерів, зокрема АТФ-аз. Тому на наступному етапі досліджували активність Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-та Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази плазматичної мембрани (ПМ) та Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази ендоплазматичної сітки (ЕПС) і вміст відповідних іонів (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) у селезінці щурів різного віку. Встановлено зниження активності досліджуваних ензимів зі зростанням віку тварин.

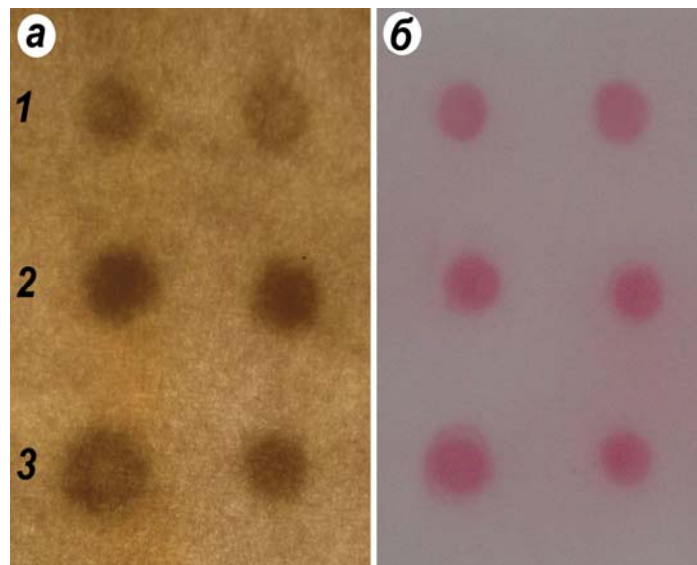


Рис. 4. Вміст PrP<sup>C</sup> у селезінці щурів різного віку: 1 — один; 2 — шість; 3 — тридцять місяців (а — дот-блотинг, б — вміст загального протеїна у зразках був однаковим (зафарбований понсо червоним))

Зокрема, активність Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФ-ази зменшувалася, відповідно, на 48 та 60 % у селезінці тварин, віком шість та тридцять місяців, порівняно з тваринами, віком один місяць. Також активність Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази ПМ у досліджуваній тканині

шести та тридцятимісячних щурів була, відповідно, на 12 та 53 % нижчою, порівняно з одномісячними. Щодо Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази ЕПС, то її активність зменшилася у 1,5 та 4 рази, відповідно, у зрілих (6 міс.) та старих (30 міс.) тварин (рис. 5 а).

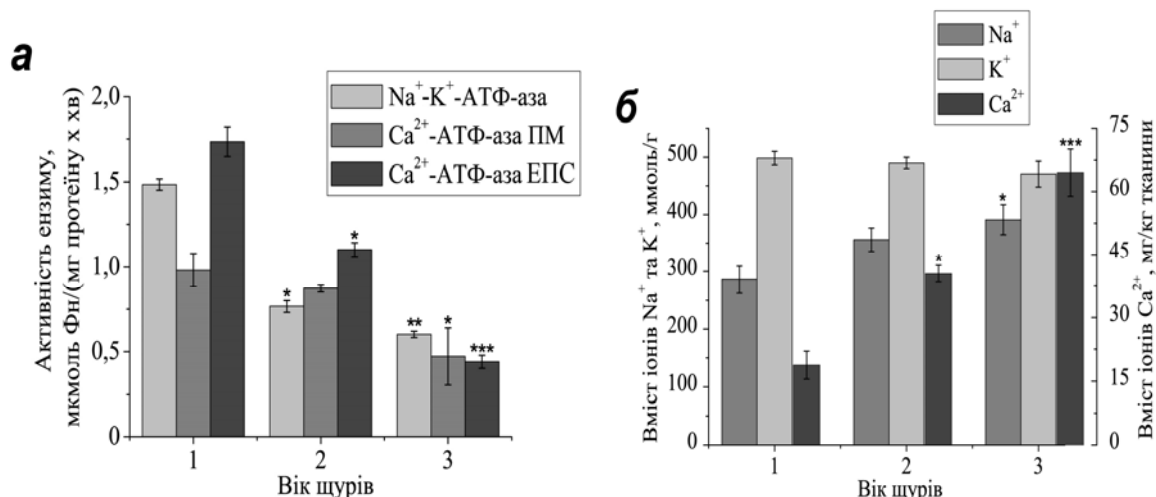


Рис. 5. Активність АТФ-аз (а) і вміст іонів (б) у селезінці щурів різного віку: 1 — один; 2 — шість; 3 — тридцять місяців; (M ± m; \* — P < 0,05; \*\* — P < 0,01; \*\*\* — P < 0,001, порівняно зі щурами, віком один місяць)

Вміст іонів натрію у тканині селезінки шести- і тридцятимісячних тварин збільшився, відповідно, на 24 та 36 %, порівняно з одномісячними, тоді як калію — достовірно не змінився. Натомість вміст Ca<sup>2+</sup> суттєво збільшився (у 2–3 рази) у тканині досліджуваних тварин (рис. 5 б). Провівши кореляційний аналіз, встановлено обернену тісну залежність між активністю Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФ-ази та вмістом іонів натрію (r=-0,987), Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази ПМ та вмістом іонів кальцію (r=-0,95), Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази ЕПС та вмістом іонів кальцію (r=-0,999). Дещо слабша обернена кореляція встановлена між кількістю клітинного пріона й активністю Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФ-ази (r=-0,626) та кількістю клітинного пріона й активністю Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази ЕПС (r=-0,306).

Отже, зі зростанням віку тварин вміст іонів натрію та кальцію зростає, а калію — майже не змінювався за умов зменшення активності Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>- та Ca<sup>2+</sup>-АТФ-аз у селезінці. Це, можливо, обумовлене тим, що з віком погіршується функція трансмембранної субодиноці цих ензимів, яка зв'язує іони та є чутливою до АТФ, який є основним субстратом.

Таким чином, вміст клітинного пріона зростає у тканині селезінки щурів, шестимісячного віку, і спадає — у тридцятимісячних. Такі зміни, очевидно,

впливають на активність АТФ-аз та розподіл іонів. Ймовірно залежність між активністю ензимів та вмістом PrP<sup>C</sup> обумовлена тим, що обидва протеїни виконують подібні функції та мають схожу локалізацію в організмі. Зокрема, бета-субодиноця Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФ-ази, як і клітинний пріон, є сіалоглікопротеїдом, що є вмонтований у мембрану на зовнішній поверхні клітини.

## Висновки

1. Методом імуногістохімічного аналізу встановлена локалізація клітинного пріона у селезінці щурів різного віку. Зокрема, PrP<sup>C</sup> міститься в паренхімі селезінки на поверхні лейкоцитів, які розташовані поблизу капсули і трабекул. У лімфоїдних фолікулах клітинний пріон не виявлений.

2. Вміст клітинного пріона є найменшим у селезінці молодих тварин, після чого відбувається його інтенсивне нагромадження у досліджуваній тканині тварин, віком шість місяців. Зі зростанням віку щурів кількість PrP<sup>C</sup> у селезінці зменшується.

3. Активність Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>- та Ca<sup>2+</sup>-АТФ-аз у селезінці знижується з віком тварин. Водночас відбувається



нагромадження іонів кальцію у цій тканині. Вміст іонів натрію також незначно зростає, а калію — достовірно не змінюється.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні тканинної локалізації та вмісту клітинного пріона в інших органах пріон-реплікувальної системи щурів.

1. Verbitsky P. I. *Gubchastopodibna entsefalopatiya velykoyi rogotoyi khudoby ta inshi prionni infekcii* [Spongiform encephalopathy in cattle and other prion infections]. Kyiv, Vetinform Publ., 2005. 240 p. (In Ukrainian).

2. Prusiner S. B. Genetic and infectious prion diseases. *Arch. Neurol*, 1993, 50, pp. 1129–1153.

3. Vlizlo V. V., Stadnyk V. V., Major Ch. Ya., Verbitsky P. I. Phisiologichniy prion ta yoho rol u funktsionuvanni klityny [Physiological prion and its role in the functioning of the cell]. *Biolojiya tvaryn — The animals biology*, 2008, vol. 10, no. 1–2, pp. 9–23 (In Ukrainian).

4. Peggion C., Bertoli A., Sorgato M. C. Possible role for  $Ca^{2+}$  in the pathophysiology of the prion protein? *BioFactors*, 2011, 37, pp. 241–249.

5. Westergard L., Christensen H., Harris D. The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>): its physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, 1772, pp. 629–644.

6. Hegde R. S., Tremblay P., Groth D. et al. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature*, 1999, 402, pp. 822–826.

7. Kingsbury D. T., Smeltzer D. A., Gibbs C. J., Gajdusek D. C. Evidence for normal cell-mediated immunity in scrapie-infected mice. *Infect. Immun*, 1981, 32, pp. 1176–1180.

8. Major Ch. Ya. Vmist phisiolohichnoho priona v peryferychniy chastyni prion-replikuyuchoi systemy shchuriv za diyi preparativ glikozaminoglikanovogo ryadu [The content of physiological prion in peripheral part of prion-replication system under the action of glucosaminoglycans series drugs. PhD thesis].

Institute of Animal Biology NAAS of Ukraine. Lviv, 2010. 16 p. (In Ukrainian).

9. Ostapchenko L. I., Mikhailik I. V. *Biologichni membrany: metody doslidzhennya struktury ta funktsiy* [Biological membranes: methods for studying the structure and function]. K. publishing center «Kyiv University», 2006. 215 p. (In Ukrainian).

10. Vlizlo V. V., Fedoruk R. S., Ratych I. B. *Laboratorni metody doslidzhen u biologii, tvarynnystv i ta veterynarniy medytsyni: dovidnyk* [Laboratory methods of research in biology, stockbreeding and veterinary medicine: a guide]. Lviv, Spolom Publ., 2012. 764 p. (In Ukrainian).

11. www.videotest.ru.

12. Lowry O. N., Rosenbrough N. I., Forr A. R. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 1951, 193, (1), pp. 265–275.

13. Jorgensen P. L. Purification of  $Na^{+}-K^{+}$  ATPase: enzyme sources, preparative problems, and preparation from mammalian kidney. *Methods in enzymology*, 1988, 156, pp. 29–43.

14. Rathbun W., Betlach V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem*, 1969, 28, pp. 436–447.

15. Tytsa N. *Entsyklopedia klin. lab. testov* [Encyclopedia wedge. lab. tests]. Moscow, Labyinform, 1997. p. 225–226 (In Russian).

16. Lakin G. F. *Biometriya* [Biometrics]. Moscow, HS, 1990. 352 p. (In Russian).

17. Kuznetsov S. L., Mushkambarov N. N., Horyachkyna V. L. *Rukovodstvo-atlas po gistologii, tsytologii i embriologii* [Guide-atlas in histology, cytology and embryology]. Moscow, DyaMorf, 1999 (In Russian)

18. Cuadrado-Tejedor M., Irujo A., Paternain B. et al. Cellular Prion Protein and Sexual Dimorphic. Areas in Rodents. Correlates with Alzheimer Disease. *Neuroscience & Medicine*, 2011, 2, pp. 384–391.

Стаття надійшла до друку  
26.04.2013 р.