

УДК 616-003.811:619:636.2

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПАТОЛОГІЧНОГО ПРІОНА ПРИ ГУБЧАСТОПОДІБНІЙ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

В. В. Влізло¹В. В. Стадник¹Х. Я. Майор¹П. І. Вербицький¹Р. С. Стойка²¹ Інститут біології тварин УААН, Львів² Інститут біології клітини НАН України, Львів

E-mail: stadnyk@inenbiol.com.ua

Наведено результати порівняльного дослідження молекулярних характеристик губчастоподібної енцефалопатії та губчастоподібної амілоїдної енцефалопатії великої рогатої худоби. Окрім загальноновизнаних відмінностей, характерних для губчастоподібної амілоїдної енцефалопатії великої рогатої худоби, таких як зміна молекулярної маси ізоформ патологічного пріона (PrP^{Sc}) та утворення амілоїдоподібних фібрил, виявлено ряд нових ознак на клітинному та субклітинному рівнях. До цих ознак слід віднести накопичення PrP^{Sc} у нейронах олівного ядра засувки довгастого мозку та зміну характеру депонування PrP^{Sc} із дифузного на гранулярний. Сукупність вищезазначених ознак, специфічних для губчастоподібної амілоїдної енцефалопатії великої рогатої худоби, спрощує процедуру диференційної діагностики трансмісивних спонгіформних енцефалопатій великої рогатої худоби.

Ключові слова: губчастоподібна амілоїдна енцефалопатія великої рогатої худоби, пріонні інфекції, патологічний пріон, діагностика.

Трансмісивні спонгіформні енцефалопатії (ТСЕ), або пріонні інфекції, — це група нейродегенеративних захворювань, які трапляються в жуйних, норок, оленів, котячих та людей [1, 2]. Спричинює ТСЕ ураження організму патологічним пріоном (PrP^{Sc}), який накопичується переважно в центральній нервовій системі (ЦНС) [1–4], трансформуючись із клітинного пріона (PrP^C). PrP^C експресується в багатьох органах та тканинах організму. Найвищий його рівень спостерігається у клітинах ЦНС. Вважають, що фізіологічний пріон бере участь у процесах транспортування міді і є компонентом декількох сигнальних шляхів, зокрема Функкіназного та MAP-кіназного, а також залучений до передавання сигналу при клітинній адгезії [5–8].

На сьогодні відомі штами PrP^{Sc}, які викликають ТСЕ у тварин та людей. Наприклад, існує понад 20 штамів скрейпі овець, 2 — трансмісивної енцефалопатії норок. Уражуючи організм, вони, після різної тривалості інкубаційного періоду, спричинюють розвиток специфічних клінічних симптомів. Водночас ці пріони мають різний ступінь стійкості до оброблення протеїназами, характеризуються певним співвідношенням глікоформ

PrP^{Sc}, що локалізуються в ділянці ураження довгастого мозку [9–13].

Дотепер вважали, що існує один штам патологічного пріона, який зумовлює губчастоподібну енцефалопатію великої рогатої худоби (ГЕ ВРХ). Однак на цей час є дані, що велика рогата худоба хворіє на ГЕ ВРХ та губчастоподібну амілоїдну енцефалопатію (ГАЕ ВРХ) [14]. Ці хвороби дуже схожі за клінічним перебігом і симптоматикою, але відрізняються за біохімічними характеристиками та локалізацією патологічного пріона. Так, у разі ГЕ ВРХ накопичення PrP^{Sc} відбувається переважно у довгастому мозку, гіпоталамусі й таламусі, а при ГАЕ ВРХ — у нюховій бульбі, нюховому кортексі та гіпокампі [14]. Для ГАЕ ВРХ описано декілька мутацій у гені *PrP*, тоді як для ГЕ ВРХ ще не детектовано жодної мутації у відповідному гені [15]. Також для ГАЕ ВРХ є характерним утворення амілоїдоподібних фібрил, що зближує це захворювання із хворобою Крейцфельдта–Якоба (КЯХ) у людини [14,16,17].

Незважаючи на вищезазначені відмінності, диференційна діагностика цих хвороб є доволі складною, оскільки в деяких випадках (автоліз, ушкодження мозкової тканини)

окремі частини мозку, необхідні для типування ГАЕ ВРХ як різновиду GE ВРХ, важко піддаються виділенню.

Визначення штамів пріона в кожному конкретному випадку захворювання є вкрай актуальним не лише для великої рогатої худоби. Такий моніторинг дає змогу виявити нові штами PrP^{Sc}, які можуть бути потенційно небезпечні для людини.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Забір та оброблення тканин. Дослідження проводили на довгастому мозку великої рогатої худоби, віком 5–8 років. Як негативний контроль використовували довгастий мозок здорових тварин. Позитивним контролем слугувала тканина довгастого мозку тварин, хворих на GE ВРХ, що їй було надано Інститутом контролю за ветеринарними хворобами (Moedling, Австрія). Дослідний зразок від тварини, яка хворіла на ГАЕ ВРХ, одержали з Європейської референс-лабораторії з діагностики ТСЕ (Weybridge, Велика Британія). Діагностику GE ВРХ здійснювали за допомогою люмінесцентно-імуного аналізу (Prionics LIA[®]). Позитивний результат підтверджувався референс-методом Prionics ChekWestern[®]. Після підтвердження діагнозу тканину мозку зберігали до наступних досліджень при –80 °С.

Імуноблот-аналіз амілоїдоподібних фібрил PrP^{Sc} [18]. Після розморожування тканину лізували у спеціальному буфері (10% -й N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенолметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилмалеїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері, рН 7,4). Центрифугували лізат при 20 000 g та 10 °С 30 хв. Супернатант переносили в нові пробірки та центрифугували при 177 000 g і 10 °С 135 хв. Осад розчиняли у KI-HSB-розчині (1,5% -й Na-тіосульфат, 1% -й N-лаурилсаркозин, 15% -й йодид калію в 10 мМ трис-HCl, рН 7,4). Далі зразки обробляли протеїназою K у кінцевій концентрації 1 мкг/мл, 60 хв при 37 °С. Зразок нашаровували на 20% -ну сахарозу та центрифугували протягом 60 хв при 189 000 g та 10 °С. Осад ресуспендували у 40 мкл буфера Леммлі [19] (Sigma, Німеччина), після чого проводили електрофорез у 12% -му ПААГ (Invitrogen, США) та електротрансфер білків на PVDF-мембрану (Millipor, США). Для контролю трансферу та визначення відносних молекулярних мас досліджуваних білків використовували набір білкових маркерів SeaBlue Plus2 (Invitrogen, США). Після електротрансферу мембрану блокували інкубуванням

у 5% -му знежиреному молоці на ЗФРТ (0,01% -й Твін-20 на забуференому фізіологічному розчині) протягом 60 хв. Далі мембрану інкубували з моноклональними анти-PrP^{Sc} антитілами 6H4 (Prionics, Швеція) — 1:2 000 у ЗФРТ упродовж 90 хв, поліклональними козячими антимишиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, США), — 1:5 000 у ЗФРТ протягом 30 хв. Детекцію імуних комплексів здійснювали, використовуючи комерційний розчин субстрату для лужної фосфатази — CDP-Star (Tropix, Велика Британія). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, США) та набору для проявлення плівок (Kodak, Німеччина).

Імуноблот-аналіз глікоформ PrP^{Sc} [20]. Після розморожування тканину лізували в десятикратному об'ємі спеціального буфера (10% -й N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенолметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилмалеїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері, рН 7,4). Далі зразки центрифугували при 5 200 g і 4 °С протягом 5 хв. До очищених лізатів додавали однаковий об'єм 2% -го саркозилу в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР), після чого лізати інкубували 10 хв при 37 °С. Бензоназу (Sigma, Poole, Велика Британія) та MgCl₂ додавали в кінцевій концентрації 50 Од/мл та 1 ммоль/л відповідно, після чого зразки інкубували 30 хв при 37 °С. До лізатів додавали розчин натрієвої солі фосфорновольфрамової кислоти (Sigma, Німеччина) у 170 ммоль/л MgCl₂, до кінцевої концентрації 0,3%, після чого проводили преципітацію упродовж 30 хв при 37 °С. Зразки центрифугували при 20 800 g і 37 °С 30 хв. Осад ресуспендували в 0,1% -му розчині саркозилу в ЗФР та розщеплювали протеїназою K у концентрації 50 г/мл протягом 30 хв. Розщеплення зупиняли, додаючи 1 ммоль/л PefaBloc SC (Roche, Lewes, Велика Британія). Далі зразки розчиняли в буфері Леммлі [19] і проводили електрофорез з наступним імуноблот-аналізом та ECL-детекцією, як було описано вище.

Імуногістохімічна детекція PrP^{Sc} [18]. Залиті в парафін зрізи тканин укладали на предметні скельця, депарафінізували в о-ксилолі та спиртах зі спадною концентрацією від 100 до 50%. Знешкоджували PrP^{Sc} інкубацією зрізів у формаліні протягом 15 хв. Далі зрізи обробляли 0,004% -м розчином протеїнази K у забуференому фізіологічному розчині 15 хв, 37 °С. Потім зразки інкубували з моноклональними анти-PrP^{Sc} антитілами L42 [21] — 1:200, 90 хв при 37 °С;

біотинільованими поліклональними козячими антимишиними антитілами — 1:100, протягом 30 хв при 37 °С. Наступним етапом була інкубація з АВС-комплексом (Vector, Австрія) — протягом 30 хв та хромогенним субстратом (ДАКО Cytomation, Данія). Після цього зразки фарбували гематоксиліном та аналізували за допомогою світлового мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для всіх штамів патологічного пріона PrP^{Sc} характерним є наявність трьох глікоформ (ди-, моно- та деглікозильованої), молекулярні маси яких можуть коливатися в межах від 30 до 15 kDa залежно від типу захворювання. Електрофоретична рухливість глікоформ PrP^{Sc} штамоспецифічна. Характерною ознакою при ідентифікації штаму патологічного пріона є також співвідношення між трьома глікоформами — PrP^{Sc}, ди-, моно- та деглікозильованою, яке залежно від типу хвороби може варіювати від 70:20:10 до 20:20:60.

Під час екстракції PrP^{Sc} фосфотунгстиковою кислотою з наступним імуноблот-аналізом було виявлено, що співвідношення глікоформ у позитивному контролі та досліді практично не змінюється, лише відзначається деяке зростання рівня деглікозильованої форми PrP^{Sc} у дослідному зразку, що свідчить про присутність у ньому штаму патологічного пріона, відмінного від того, який спричинює GE ВРХ (рис. 1). Сам по собі цей результат не дає змоги встановити кінцевий діагноз, але свідчить про необхідність проведення додаткових досліджень.

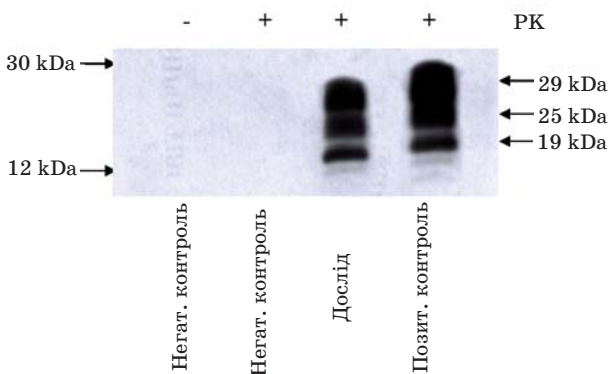


Рис. 1. Імуноблот-аналіз глікоформ патологічного пріона у довгастому мозку:
РК — протеїназа К;
негативний контроль — здорові тварини;
позитивний контроль — тварини, хворі на GE ВРХ;
дослід — дослідна тварина

Дослідження експресії ізоформ патологічного пріона показали, що, порівняно з GE ВРХ, де три основні форми PrP^{Sc} мали молекулярну масу 29, 25 та 19 kDa відповідно, у дослідній тварини спостерігається збільшення електрофоретичної рухливості ди-, моно- та деглікозильованої форм PrP^{Sc}, яка відповідала молекулярній масі 27 kDa для диглікозильованої, 23 kDa для моноглікозильованої та 17 kDa для деглікозильованої форм (рис. 1). Такий розподіл глікоформ за молекулярною масою є характерним для ГАЕ ВРХ [4].

Відомо, що характерною ознакою ГАЕ ВРХ є утворення та накопичення амілоїдоподібних фібрил патологічного пріона, що не властиво для GE ВРХ [15]. Тому для перевірки припущення про присутність у досліджуваному зразку штаму PrP^{Sc}, здатного спричинити ГАЕ ВРХ, нами проведено дослідження вмісту амілоїдоподібних фібрил у довгастому мозку дослідної тварини. Для цього було застосовано метод ультрацентрифугування у градієнті сахарози з наступною імуноблот-детекцією.

У результаті проведених досліджень встановлено, що в дослідному зразку виявлено високу концентрацію амілоїдоподібних фібрил, тоді як у мозку тварин, хворих на GE ВРХ, були тільки сліди фібрилярного PrP^{Sc} (рис. 2). Отже, можна зробити висновок, що дослідна тварина хворіла на ГАЕ ВРХ, нетипову форму GE ВРХ. Особливістю штаму PrP^{Sc}, який зумовлює ГАЕ ВРХ, є підвищена

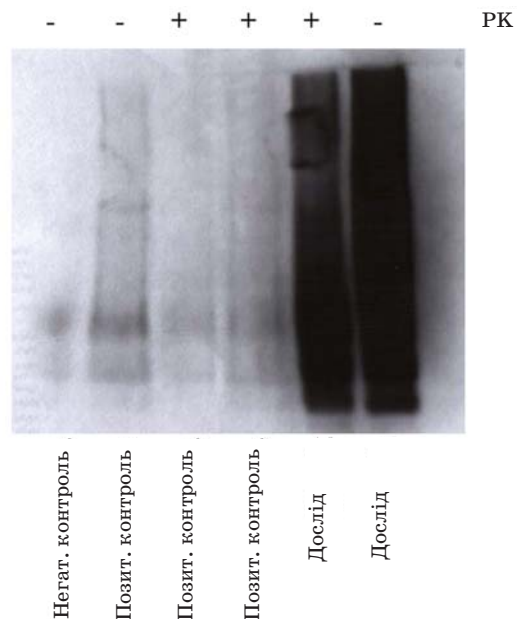


Рис. 2. Імуноблот-аналіз амілоїдоподібних фібрил PrP^{Sc} у довгастому мозку (позначення аналогічно рис. 1).

електрофоретична рухливість основних ізоформ патологічного пріона та утворення амілоїдоподібних фібрил у довгастому мозку.

Для більш детального вивчення молекулярних ознак даного клінічного випадку ТСЕ було проведено імуногістохімічний аналіз довгастого мозку дослідної тварини. Встановлено, що акумуляція патологічного пріона спостерігається тільки в зоні засувки довгастого мозку, каудальніше і краніальніше від цієї зони PrP^{sc} був відсутній. Така обмежена локалізація PrP^{sc} є характерною практично для всіх пріонних хвороб жуйних [18], тому вона не може слугувати критерієм для диференційної діагностики ТСЕ та детекції окремих штамів патологічного пріона.

Докладніший імуногістохімічний аналіз зональної локалізації PrP^{sc} дослідного зразка дав змогу детектувати його високий рівень в оливному ядрі, водночас у мозку тварин, хворих на ГЕ ВРХ, PrP^{sc} виявляється тільки в дорзальному ядрі блукаючого нерва та солітарному тракті (рис. 3, А, Б), що є характерною діагностичною ознакою ГЕ ВРХ.

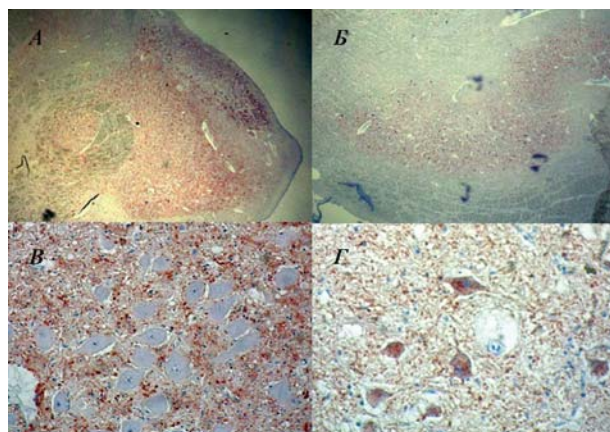


Рис. 3. Імуногістохімічний аналіз локалізації патологічного пріона в зоні засувки довгастого мозку:

- А — позитивний контроль — тварина, хвора на ГЕ ВРХ, показано зону дорзального ядра блукаючого нерва та солітарний тракт. $\times 25$;
- Б — дослідна тварина, зона оливного ядра. $\times 40$;
- В — позитивний контроль, зона дорзального ядра блукаючого нерва. $\times 200$;
- Г — дослідна тварина, зона оливного ядра. $\times 400$

Існують відмінності в субклітинній локалізації PrP^{sc}. Так, при ГЕ ВРХ він детектується переважно в нейрофілі (позаклітинному середовищі), тимчасом як у дослідному зразку спостерігається транслокація PrP^{sc} у середину нейронів оливного ядра (рис. 3, В, Г). Окрім цього, змінюється характер депонування патологічного пріона з дифузного на гранулярний (рис. 4). Це свідчить про

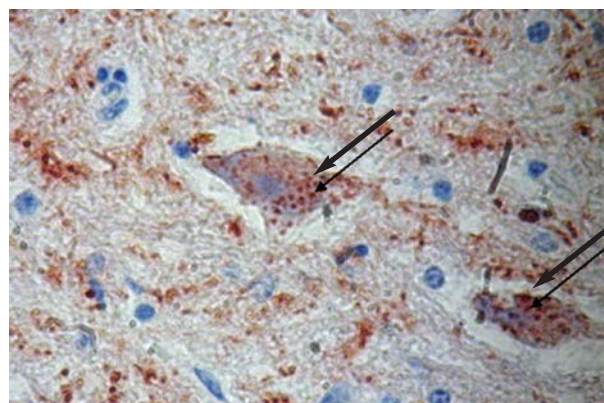


Рис. 4. Імуногістохімічний аналіз характеру депонування PrP^{sc} у нейронах оливного ядра довгастого мозку дослідної тварини. $\times 1000$ (стрілками позначено типові гранули PrP^{sc}, характерні для амілоїдоподібних фібрил)

утворення амілоїдоподібних структур усередині клітини та є ще одним підтвердженням того, що даний випадок слід віднести до ГАЕ ВРХ.

Спираючись на вищенаведені результати, ми пропонуємо для диференційної діагностики штамів патологічного пріона використовувати наведені в таблиці молекулярні ознаки, що є характерними для ГЕ ВРХ та ГАЕ ВРХ.

Окрім загальновідомих ознак ГАЕ ВРХ, таких як зміна співвідношення глікоформ патологічного пріона, підвищення електрофоретичної рухливості трьох основних глікоформ PrP^{sc} та утворення амілоїдоподібних фібрил, нами було виявлено ряд нових ознак, зокрема акумуляцію патологічного пріона в оливному ядрі довгастого мозку, інтранейрональний тип накопичення PrP^{sc} в оливному ядрі та переважну гранулярність агрегатів патологічного пріона. Сукупність цих ознак дозволяє визначити штам патологічного пріона та диференціювати ГЕ ВРХ від ГАЕ ВРХ.

Таким чином, підтверджено існування нетипової форми ГЕ ВРХ — губчастоподібної амілоїдної енцефалопатії великої рогатої худоби (ГАЕ ВРХ). Встановлено ряд молекулярних та морфологічних ознак, за якими можна проводити діагностику ГАЕ ВРХ. На основі даних ознак запропоновано спрощену процедуру діагностики ГАЕ ВРХ.

Колектив авторів висловлює щирі вдячність Dr. Joachim Weikel, Dr. Hermann Schildorfer та Dr. Zoltan Bago (Institute for Veterinary Disease Control, Moedling, Австрія) за всебічну допомогу у виконанні роботи. Робота здійснювалася за фінансової підтримки ROTARY-Club (Moedling, Австрія).

Молекулярні ознаки, які можна використовувати для диференційної діагностики
ГЕ ВРХ та ГАЕ ВРХ

Ознака	ГЕ ВРХ	ГАЕ ВРХ
Співвідношення глікоформ PrP ^{Sc} *	Переважає диглікозильована форма, моно- і деглікозильована форми — у мінімальній кількості	Зростання частки деглікозильованої форми
Електрофоретична рухливість глікоформ PrP ^{Sc} *	Стандартна (29, 25 та 19 kDa)	Підвищена (27, 23 та 17 kDa)
Кількість ізоформ PrP ^{Sc} *	Три основні (29, 25 та 19 kDa)	Три основні (27, 23 та 17 kDa)
Наявність амілоїдоподібних фібрил у довгастому мозку	Відсутні або слідові кількості	Велика кількість
Акумуляція PrP ^{Sc} у довгастому мозку	Переважно у дорзальному ядрі блукаючого нерва та в солітарному тракті	Значна концентрація PrP ^{Sc} в оливному ядрі
Локалізація PrP ^{Sc} у тканині довгастого мозку	Нейрофілярна (позаклітинна) локалізація	Інтранейрональна (внутрішньоклітинна) локалізація
Тип депонування PrP ^{Sc}	Переважно дифузний	Гранулярний

* На підставі характеристик, наведених у [4].

ЛІТЕРАТУРА

1. Prusiner S. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie // *Science*. — 1982. — N 216. — P.136–144.
2. Prusiner S. Prions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — N 95. — P.13363–13383.
3. Castilla J., Saa P., Hetz C. et al. In vitro generation of infectious scrapie prions // *Cell*. — 2005. — N 121. — P.195–206.
4. Kocisko D., Come J., Priola S. et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein // *Nature*. — 1994. — N 370. — P.419–420.
5. Gaeta A., Hider R. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy // *Br. J. Pharmacol.* — 2005. — N 146. — P. 1041–1059.
6. Martinsa V., Lindenb R., Pradoc M. et al. Cellular prion protein: on the road for functions // *FEBS Letters*. — 2002. — N 512. — P. 25–28.
7. Milhavel O., McMahon H., Rachidi W. et al. Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 2000. — V.97, N 25. — P. 13937–13942.
8. Shyng S., Lehmann S., Moulder K. et al. Sulfated Glycans Stimulate Endocytosis of the Cellular Isoform of the Prion Protein, PrP^C, in Cultured Cells // *J. of Biol. Chem.* — 1995. — V.270. — N 50. — P. 30221–30229.
9. Bessen R., Marsh R. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent // *J. Virol.* — 1992. — N 66. — P. 2096–2101.
10. Bessen R., Marsh R. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy // *Ibid.* — 1994. — N 68. — P. 7859–7868.
11. Collinge J., Sidle K., Meads J. et al. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD // *Nature*. — 1996. — N 383. — P.685–690.
12. Hill A., Sidle K., Joiner S. et al. Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy // *Neurosci. Lett.* — 1998. — N 255. — P.159–162.
13. Parchi P., Castellani R., Capellari S. et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease // *Ann. Neurol.* — 1996. — N 39. — P.767–778.
14. Casalone C., Zanusso G., Acutis P. et al. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2004. — N 101. — P.3065–3070.
15. Capobianco R., Casalone C., Suardi S. et al. Conversion of the BASE Prion Strain into the BSE Strain: The Origin of BSE? // *PLoS Pathog.* — 2007. — V.3, N 3. — P. 0001–0008.
16. Biacabe A., Laplanche J., Ryder S. et al. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases // *EMBO J.* — 2004. — N 5. — P.10–14.
17. Watts J., Balachandran A., Westaway D. The expanding universe of prion diseases // *PLoS Pathog.* — 2006. — V. 2, N 3. — P. 0152–0163.

