



УДК 616-003.811:619:636.2

ВМІСТ ФІЗІОЛОГІЧНОГО ПРІОНУ В МОЗКУ ТА СЕЛЕЗИНЦІ Й АНТИ-PrP^c АНТИТІЛ У СИРОВАТЦІ КРОВІ МИШЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД СКЛАДУ РАЦІОНУ

М. Р. Козак¹, Ю. Я. Кім², В. В. Влізло¹, В. В. Стадник¹, Р. С. Стойка²

¹Інститут біології тварин УААН, вул. Стуса, 38, Львів 79034, Україна

²Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова 14–16, Львів 79005, Україна

e-mail: mariya_kozak@yahoo.com

Показано, що довготривале згодовування мишам мозку великої рогатої худоби та м'ясо-кісткового борошна призводить до зростання вмісту фізіологічного пріону в органах пріонреплікуючої системи, а також до утворення антитіл анти-PrP^c. Дискутується питання про можливий вплив високого вмісту тваринних білків раціону на розвиток трансмісивних спонгіформних енцефалопатій.

Ключові слова: пріон, миші, раціон, мозок, селезінка, антитіла.

Трансмісивні спонгіформні енцефалопатії (ТСЕ) – це захворювання ссавців, які характеризуються ураженням центральної нервової системи. До ТСЕ відносять губчастоподібну енцефалопатію великої рогатої худоби (ВРХ) [1], трансмісивну енцефалопатію норок [2], скреїпі овець [3], хронічну виснажливу хворобу (ХВХ) оленів та лосів [4], спонгіформну енцефалопатію котятих [5], а також хворобу Крейцфельдта-Якоба, синдром Гертсмана–Штройслера–Шейкнера, фатальну родинну інсомнію та хворобу куру у людини [6].

Причиною розвитку ТСЕ тварин і людини є патологічний пріон (PrP^{sc}), який, на відміну від фізіологічного пріона PrP^c, є гідрофобним і має суттєво змінену третинну структуру. Якщо у структурі PrP^c переважають α -спіральні ділянки, то характерною ознакою PrP^{sc} є велика кількість β -складчастих структур [8, 9]. Слід відзначити, що фізіологічний пріон має три ізоформи: де-, моно- та диглікозильовану, молекулярна маса яких становить 29, 25 та 19 кДа відповідно [10].

Існує автоімунна теорія розвитку ТСЕ. За цією теорією, причиною розвитку ТСЕ є постійна автоімунна атака, що веде до пошкодження тканин мозку [11, 12]. На користь цієї теорії свідчить наявність автоантитіл до антигенів мозку у крові та спинномозковій рідині тварин, хворих на ТСЕ, та людей із хворобою Крейцфельдта–Якоба [13]. Механізми індукції автоімунних процесів при ТСЕ залишаються маловивченими. Вважають, що поява автоантитіл до білків мозку є наслідком молекулярної мімікрії певних чужорідних антигенів, які потрапляють в організм через споживання твариною інфікованих кормів [12]. Не виключено, що довготривале споживання

деяких харчових антигенів також призводить до аутоімунних порушень, які за певних умов можуть спричиняти виникнення ТСЕ у тварин.

Метою даної роботи було з'ясувати можливість продукції анти-PrP^C антитіл у мишей за умов тривалого згодовування їм мозку ВРХ та м'ясо-кісткового борошна, а також дослідження вмісту фізіологічного пріону у мозку і селезінці мишей залежно від складу їхнього раціону.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на п'ятьох групах білих нелінійних мишей (одна контрольна і 4 дослідні), кожна з яких складалася із 8 тварин. Денний раціон однієї тварини контрольної групи (1) складав: 8 г фруктів, 2 г хліба, 3 г пшеничної крупи, 2 г сіна, 1 г коренеплодів (морква і буряк), 0,5 г насіння соняшника, вода без обмежень. Першій дослідній групі (2), крім основного раціону, щоденно згодовували мозок ВРХ (50 мг тканини мозку на одну тварину), другій (3) – 25 мг мозку та 25 мг м'ясо-кісткового борошна (Куп'янський ветсанзавод, Україна), третій (4) – 50 мг м'ясо-кісткового борошна, четвертій (5) – 50 мг борошна сої. Дослід тривав 1 рік.

Препарати IgG виділяли із загальної фракції імуноглобулінів триразовим переосадженням білків сироватки крові сульфатом амонію і афінною хроматографією на колонці, наповненій протеїн G-агарозою (Sigma, США) [14]. Концентрацію білка в отриманих препаратах визначали при 280 нм за допомогою спектрофотометра фірми NanoDrop Technologies (США). Чистоту препаратів перевіряли електрофорезом у 12% поліакриламідному гелі за присутності 0,1% додецилсульфату натрію [15].

Дот-блотинг-аналіз. Після розморожування тканину лізували в десятикратному об'ємі буфера (10%-й N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилmaleїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері рН 7,4, 0,001% суміші інгібіторів протеїназ) („Sigma”, Німеччина). Потім зразки центрифугували при 5200 g протягом 5 хв при 4°C. У готових лізатах вимірювали концентрацію білка, використовуючи Лоурі („Simco”, Україна). Для вирівнювання об'ємів та концентрації загального білка зразки розводили буфером у складі: 25 мМ трис-НСІ, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl (рН 7,4). Розведені зразки наносили на нітроцелюлозну мембрану („Millipore”, США). Для виявлення фонового свічення на мембрану наносили буфер для лізування та спеціальний буфер для розведення зразків. Після нанесення контрольних і дослідних зразків мембрану інкубували з моноклональними анти-PrP^C антитілами 6Н4 („Prionics”, Швейцарія) – 1:2000 у ЗФРТ (забуферений фізіологічний розчин з 0,1% твін-20) протягом 90 хв, і поліклональними козячими антимішиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою („Sigma”, США) – 1:1000 у ЗФРТ протягом 30 хв. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази – CDP-Star („Tropix”, Велика Британія). Детекцію комплексів проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm („Amersham”, США) та набору для проявлення плівок („Kodak”, Німеччина).

Імуноблотинг-аналіз глікоформ PrP^C. Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі буфера (10%-й N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилmaleїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері рН 7,4, 0,001% суміш інгібіторів протеїназ) („Sigma”, Німеччина). Тоді зразки центрифугували (5200 g протягом 5 хв при 4°C). У лізатах вимірювали концентрацію білка

за методом Лоурі. До надосадової рідини додавали рівний об'єм буфера Леммли („Sigma”, Німеччина), зразки прогрівали при 95°C протягом 5 хв, після чого проводили електрофорез у градієнті концентрації (5–18%) поліакриламідного гелю та здійснювали електроперенос білків на мембрану PVDF („Millipore”). Для контролю електропереносу білків та визначення їх відносної молекулярної маси використовували набір білкових маркерів SeaBlue Plus2 („Invitrogen”, США). Після електропереносу мембрану блокували протягом 60 хв шляхом її інкубування в 5%-му знежиреному молоці, приготованому на ЗФРТ та інкубували з моноклональними анти-PrP^C антитілами 6Н4 („Prionics”) – 1:2000 у ЗФРТ протягом 90 хв, і поліклональними козячими антимишиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою („Sigma”, США) – 1:5000 у ЗФРТ протягом 30 хв. Детекцію імунних комплексів здійснювали, використовуючи комерційний розчин субстрату для лужної фосфатази – CDP-Star („Tropix”). Детекцію комплексів проводили на рентгенівській плівці ECL HyperFilm („Amersham”), використовуючи набір для проявки плівок фірми „Kodak”.

Вестерн-блот-аналіз. Рівну кількість білка (40 мкг) PrP^C (Prionics, Швейцарія) відбирали для електрофорезу у 12% поліакриламідному гелі з додаванням 0,1% дodeцилсульфату натрію. За допомогою електроблотингу білок переносили з гелю на нітроцелюлозну мембрану, яку обробляли при 20°C протягом 1 год 5%-м розчином сухого знежиреного молока, що містив 0,05% Твін 20. Мембрану інкубували з первинними антитілами (IgG) при 4°C протягом ночі, після чого блоти промивали двічі по 5 хв ЗФРТ та інкубували при 4°C протягом 1 год з міченими пероксидазою хрому вторинними антитілами. Після цього мембрану промивали ЗФРТ двічі по 5 хв. Місця зв'язування кон'югованих із пероксидазою хрому антитіл із досліджуваними білками виявляли за допомогою хемілюмінесценції на рентгенівській плівці (Fujifilm, Японія).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

За допомогою вестерн-блот-аналізу виявлено антитіла анти-PrP^C у сироватці крові мишей, яким додатково до основного раціону протягом року згодували мозок ВРХ та м'ясо-кісткове борошно (рис. 1). Дані продукти містять чужорідні антигени, які подібні за структурою до аутоантигенів (молекулярна мімікрія антигена), і це може призвести до утворення в організмі тварин клітин пам'яті, здатних синтезувати аутоантитіла.

У зв'язку із виявленням згаданих вище антитіл виникла необхідність у дослідженні вмісту фізіологічного пріону у мозку та селезінці мишей залежно від складу раціону, на якому перебували ці тварини. Так, за допомогою дот-блотинг-аналізу у мозку мишей виявлено вищий рівень вмісту пріонового білка, ніж у селезінці. Зростання PrP^C у мозку мишей встановлено лише у двох дослідних групах, першій з яких до раціону додавали мозок ВРХ, а другій – мозок ВРХ та м'ясо-кісткове борошно (1:1). У селезінці вміст фізіологічного пріону зростав у всіх досліджуваних груп (рис. 2).

За допомогою імуноблотинг-аналізу лізатів селезінки та мозку виявлено підвищений вміст фізіологічного пріону у досліджуваних мишей. Так, найбільше PrP^C зростав у селезінці мишей, яким додатково до раціону згодували мозок у поєднанні з м'ясо-кістковим борошном (рис. 3). Крім цього, виявлено присутність різних глікозилізованих форм цього білка у В- та Т-лімфоцитах селезінки (рис. 3). Встановлено, що у В-лімфоцитах депонується глікоформа фізіологічного пріона з моле-

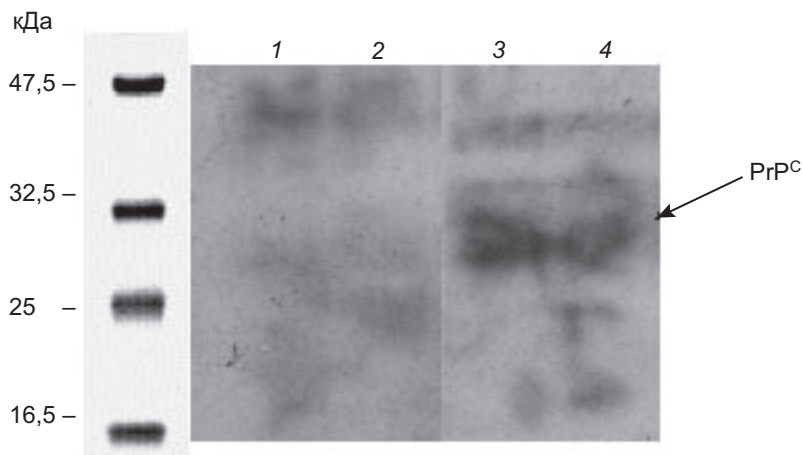


Рис. 1. Детекція антитіл анти-PrP^c у сироватці крові мишей за допомогою вестерн-блот-аналізу: 1, 2 – антитіла контрольної групи мишей; 3, 4 – антитіла мишей, яким додатково до раціону згодували мозок та м'ясо-кісткове борошно (1:1)

Fig. 1. Detection of anti-PrP^c antibodies in blood serum of mice by Western-blot analysis: 1, 2 – antibodies of control group of mice; 3, 4 – antibodies of mice fed with cattle brain and meat-bone flour (1:1)

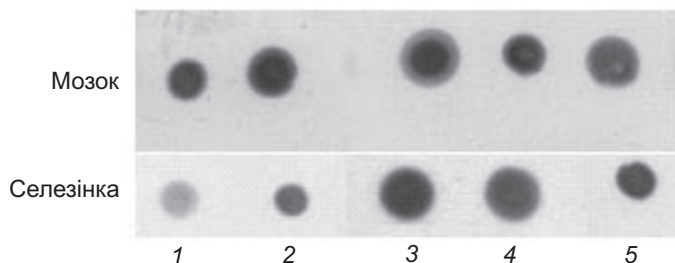


Рис. 2. Аналіз вмісту PrP^c у мозку і селезінці мишей (дот-блотинг): 1 – контрольна група; 2 – миші, яким додатково згодували мозок ВРХ; 3 – миші, яким додатково згодували мозок ВРХ та м'ясо-кісткове борошно (1:1); 4 – миші, яким додатково згодували м'ясо-кісткове борошно; 5 – миші, яким додатково згодували борошно сої

Fig. 2. Level of PrP^c in mice brain and spleen (Dot-blotting analysis): 1 – control group; 2 – mice fed with cattle brain; 3 – mice fed with cattle brain and meat-bone flour (1:1); 4 – mice fed with meat-bone flour; 5 – mice fed with flour of soy bean

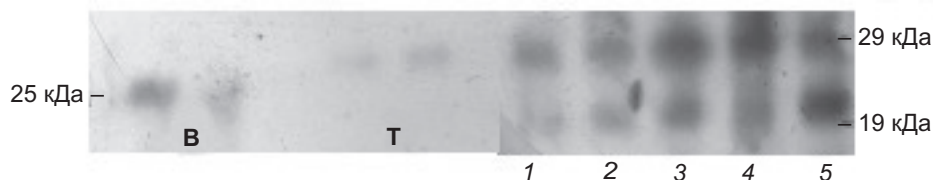


Рис. 3. Виявлення PrP^c у В- і Т-лімфоцитах мишей та селезінці мишей: 1 – контрольна група; 2 – миші, яким додатково до раціону згодували мозок ВРХ; 3 – миші, яким додатково до раціону згодували мозок ВРХ та м'ясо-кісткове борошно; 4 – миші, яким додатково до раціону згодували м'ясо-кісткове борошно; 5 – миші, яким додатково до раціону згодували борошно сої

Fig. 3. Level of PrP^c in B- and T-lymphocytes and spleen: 1 – control group; 2 – mice fed with cattle brain; 3 – mice fed with cattle brain and meat-bone flour; 4 – mice fed with meat-bone flour; 5 – mice fed with flour of soy bean

кулярною масою 25 кДа, а у Т-лімфоцитах відповідно – 29 кДа. Наведені тут результати корелюють із даними, отриманими за допомогою дот-блотинг-аналізу (рис. 3).

Висновок. Згодовування протягом року мишам мозку ВРХ і м'ясо-кісткового борошна спричиняє зростання вмісту фізіологічного приону у мозку та селезінці, а також появу у сироватці крові антитіл анти-PrP^c, що, у свою чергу, може призвести до розвитку ТСЕ.

Роботу частково було виконано за підтримки Західноукраїнського біомедичного дослідницького центру – West-Ukrainian Biomedical Research Center (WUBMRC), наданої В. В. Стаднику.

LEVEL OF PHYSIOLOGICAL FORM OF PRION IN BRAIN AND SPLEEN AND ANTI-PRP^c – ANTIBODIES IN BLOOD SERUM OF MICE IS DEPENDENT OF THEIR RATION

M. R. Kozak¹, Yu. Ya. Kit², V. V. Vlizlo¹, V. V. Stadnyk¹, R. S. Stoika²

¹Institute of Animal Biology UAAN, 38, Stus St., Lviv 79034, Ukraine

²Institute of Cell Biology NANU, 14–16, Dragomanov St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: mariya_kozak@yahoo.com

It was found that long term feeding of mice with ration supplemented with cattle brain and meat-bone meal (1:1) resulted in producing cellular form of prion in organs of prion-replicated system (brain and spleen) and anti-PrP^c antibodies in blood serum. The effect of ration on potential development of transmissible spongiform encephalopathies is discussed.

Key words: prion, mice, ration, brain, spleen, antibodies.

СОДЕРЖИМОЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПРИОНА В МОЗГЕ И СЕЛЕЗЕНКЕ, А ТАКЖЕ АНТИ-PRP^c АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЫШЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА РАЦИОНА

М. Р. Казак¹, Ю. Я. Кит², В. В. Влизло¹, В. В. Стадник¹, Р. С. Стойка²

¹Институт биологии животных УААН, ул. Стуса, 38, Львов 79034, Украина

²Институт биологии клетки НАН Украины

ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

e-mail: mariya_kozak@yahoo.com

Обнаружено, что долговременное скармливание мышам мозга крупного рогатого скота и мясо-костной муки приводит к увеличению содержания физиологического приона в органах прионреплицирующей системы, а также к образованию антител анти-PrP^c. Обсужден вопрос о возможном влиянии высокого содержания животных белков рациона на развитие трансмиссивных спонгиформных энцефалопатий.

Ключевые слова: прион, мышцы, рацион, мозг, селезенка, антитела.

1. Wilesmith J. W., Wells G. A. H., Ryan J. B. M. *et al.* A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy. **Vet. Rec.**, 1997; 141: 239–243.
2. Marsh R. F., Bessen R. A. Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy. **Dev. Biol. Stand.**, 1993; 80: 111–118.
3. Ryder S., Dexter G., Bellworthy S., Tongue S. Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. **Res. Vet. Sci.**, 2004; 76: 211–217.
4. Williams E. S., Miller M. W. Chronic wasting disease in North American deer and elk. **Rev. Sci. Tech.**, 2002; 21: 305–316.
5. Wyatt J. M., Pearson G.R., Smerdon T. *et al.* Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. **Vet. Rec.**, 1991; 129: 233–236.
6. Bruce M. E., Will R. G., Ironside J. W. *et al.* Transmissions to mice indicate that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. **Nature**, 1997; 389: 498–501.
7. Collinge J., Sidle K., Meads J. *et al.* Molecular analysis of prion strain variation and the etiology of „new variant” CJD. **Nature**, 1996; 383: 685–690.
8. Fraser J. R. What is the basis of transmissible spongiform encephalopathy induced neurodegeneration and can it be repaired? **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, 2002; 28: 1–11.
9. Prusiner S. B. Prions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1998; 95: 13363–13383.
10. Влізло В. В., Стадник В. В., Майор Х. Я. *та ін.* Вміст фізіологічної форми пріону за дії пентосанполіфосфату (Sp-54) у тканинах щура. **Укр. біохім. журнал**, 2008; 80(1): 733–39.
11. Zhu B. T. Human and animal spongiform encephalopathies are the result of chronic autoimmune attack in the CNS: a novel medical theory supported by overwhelming experimental evidence. **Histol. Histopathol**, 2005; 20: 575–592.
12. Ebringer A., Rashid T., Jawad N. *et al.* From rabies to transmissible spongiform encephalopathies: an immune-mediated microbial trigger involving molecular mimicry could be the answer. **Med. Hypotheses**, 2007; 68(1): 113–24.
13. Andrievskaia O., McRae H., Elmgren C. *et al.* Generation of antibodies against bovine recombinant prion protein in various strains of mice. **Clin. Vaccine Immunol.**, 2006; 1: 98–105.
14. **Иммунологические методы** / Пер. с нем. Под ред. Г. Фримеля. Москва: Медицина, 1987. 390 с.
15. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 15: 680–685.