УДК 616–003.811:619:636.2

ЕКСПРЕСІЯ ФІЗІОЛОГІЧНОГО ПРІОНУ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ССАВЦІВ ЗА ДІЇ ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ

В. В. Стадник

Інститут біології тварин УААН, Львів

Встановлено інгібучу дію глікозаміногліканів на білковий рівень експресії фізіологічного пріона у головному мозку лабораторних тварин. Також показано, що досліджувані сполуки впливають на спектр ізоформ фізіологічного пріона, при чому, даний вплив залежить від типу діючої сполуки.

Ключові слова: ПЕНТОСАН ПОЛІСУЛЬФАТ, ГЕПАРИН, ФІЗІОЛОГІЧНИЙ ПРІОН.

Трансмісивні спонгіформні енцефалопатії (ТСЕ) — це група фатальних нейродегенеративних захворювань людини і тварин, інфекційним агентом яких є патологічний пріон (PrP^{SC}) [1–6]. Він являє собою конформаційно змінену молекулу фізіологічного пріона (PrP^{C}) [1, 7]. Наразі не існує речовин, які б зупиняли розвиток ТСЕ. Відомі лише сполуки, що здатні загальмовувати накопичення PrP^{SC}, серед яких провідне місце посідають глікозаміноглікани (ГАГ) [3, 4]. Застосування цих сполук не зупиняє хворобу, а лише гальмує її. Все більше приділяється уваги пошуку ліків проти ТСЕ. Зараз зосереджуються зусилля на створенні трансгенних тварин, у яких відсутній ген фізіологічного пріона (ген *Prnp*) і, відповідно, не експресується PrP^{C} [8]. Оскільки для реплікації PrP^{SC} є необхідний в якості матриці PrP^{C}, то відсутність останнього робить неможливим розвиток інфекції [9, 10]. За подібною стратегією вже створено трансгенну велику рогату худобу, яка є стійкою до ТСЕ [11]. Однак, повна відсутність фізіологічного пріона викликає атаксію, порушення циркадних ритмів, випадання клітин Пуркін'є та зменшення резистентності нейронів до оксидативного стресу [12]. Тому ми вважаємо, що більш ефективним буде підхід, який полягатиме у зменшенні кількості фізіологічного пріону у тварин, що дозволить знизити ризик розвитку ТСЕ та уникнути негативних наслідків відсутності PrP^{C}.

Виходячи з цих позицій, нами було вирішено вивчити вплив ГАГ, а саме гепарину та пентосан полісульфату (SP–54) на експресію фізіологічного пріона *in vivo*. Вибір цих речовин був зумовлений тим фактом, що деякі ГАГ здатні взаємодіяти з PrP^{C} *in vitro* [13] та подовжувати інкубаційний період розвитку ТСЕ шляхом взаємодії з PrP^{SC} [14], але досі нічого не відомо про вплив даної групи сполук на фізіологічний пріон у живих організмів.

Матеріали і методи

Дослідження проводилися на органах та тканинах клінічно здорових самців щурів виду *Rattus norvegicus var. alba*, лінії *Vistar*. Протягом семи днів дослідним тваринам вводили гепарин у дозах 1; 5 та 300 мг/кг/день і пентосан полісульфат SP–54 парентерально у концентраціях 0,1; 0,5 та 1 мг/кг/день. Після чого тварин декапітували та препарували. Відпрепаровані органи і тканини до проведення досліджень зберігалися при — 20 0С.

Дот-блот аналіз. Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі спеціального буферу (10 % N–лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N–етилмалеїмід в 0,01 М Na–фосфатному буфері, 0,001 % коктейль інгібіторів протеїназ (Sigma, Germany), pH 7,4). Далі зразки центрифугували при 5200 g протягом 5 хв. при 40С. У готових лізатах вимірювали концентрацію білка методом Лоурі (Сімко, Україна). Для вирівнювання об'ємів та концентрацій загального білка, зразки розводилися спеціальним буфером (25 мМ Тріс–HCl, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, pH=7.4). Розведені зразки наносилися

на нітроцелюлозну мембрану (Millipor). Для виявлення фонового свічення на мембрану наносилися буфер для лізування та спеціальний буфер для розведення зразків. Після нанесення контрольних та дослідних зразків мембрана інкубувалася з моноклональними анти–PrPC антитілами 6H4 (Prionics, Swiss) — 1:2000 у ЗФРТ (забуференому фізіологічному розчині з 0,1 % Твін–20) 90 хв., поліклональними козячими анти–мишиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, USA) — 1:5000 у ЗФРТ 30 хв. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази — CDP–Star (Tropix, GB). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, USA) та набору для проявки плівок (Kodak).

Імуноблот-аналіз глікоформ PrPC [15]. Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі спеціального буферу (10 % N–лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N–етилмалеїмід в 0,01 М Na–фосфатному буфері, 0,001 % коктейль інгібіторів протеїназ (Sigma, Germany), pH 7,4). Далі зразки центрифугували при 5200 g протягом 5 хв. при 40С. У готових лізатах вимірювали концентрацію білка методом Лоурі. Далі до надосадової рідини додавався однаковий об'єм буферу Леммлі [16] (Sigma, Germany), зразки прогрівалися протягом 5 хв. при 95 ^{0}С, після чого проводили електрофорез у градієнтному (5–18 %) поліакриламідному гелі та електроблотинг білків на PVDF–мембрану (Millipor, USA). Для контролю блотингу та визначення відносних молекулярних мас досліджуваних білків використовували набір білкових маркерів SeaBlue Plus2 (Invitrogen, USA). Після електроблотингу мембрану блокували, шляхом інкубування в 5 % знежиреному молоці на ЗФРТ 60 хв. Далі мембрану інкубували з моноклональними анти–PrPC антитілами 6H4 (Prionics, Swiss) — 1:2000 у ЗФРТ 90 хв., поліклональними козячими анти–мишиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, USA) — 1:5000 у ЗФРТ 30 хв. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази — CDP–Star (Tropix, GB). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, USA) та набору для проявки плівок (Kodak).

Результати й обговорення

Встановлено, що при застосуванні пентосан полісульфату (SP–54) у різноманітних концентраціях було виявлено зниження загального рівня експресії фізіологічного пріону у всіх досліджуваних органах (рис. 1). При цьому, як видно з рис.1, інгібування експресії PrPC залежить від дози введеного препарату і ця залежність є прямопропорційною.

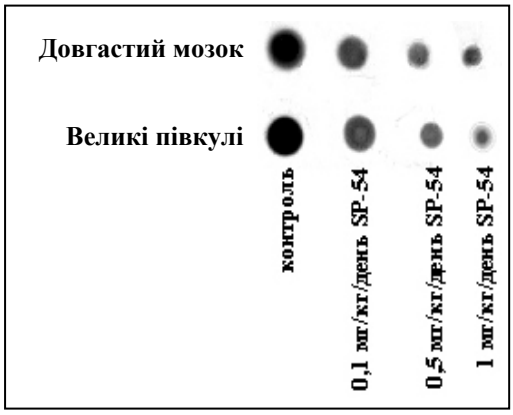

Рис. 1. Дот–блот аналіз загального рівня експресії фізіологічного пріона при застосуванні пентосан полісульфату (SP–54).

На наступному етапі роботи необхідно було підтвердити попередні результати та перевірити, чи змінюється профіль експресії глікоформ фізіологічного пріона під впливом пентосан полісульфату (SP–54). Для цього було проведено імуноблот–наліз лізатів органів пріон–еплікуючої системи щурів за дії даного препарату. Отримані результати підтвердили

попередні дані про зниження рівня фізіологічного пріона за дії дослідного препарату, а також дозволили виявити в деяких органах значні зміни у профілях експресії глікоформ PrP^C за дії пентосан полісульфату (SP–54) (рис.2). Так, у великих півкулях головного мозку за нормальних фізіологічних умов та при застосуванні препарату в концентрації 0,1 г/кг/день детектується лише одна ізоформа PrP^C з молекулярною масою 29 кДа (диглікозильована форма), тоді як при збільшенні дози препарату до 0,5 та 1 мг/кг/день спостерігається виникнення додаткової ізоформи на рівні 19 кДа (деглікозильована форма). Таким чином, при застосуванні пентосан полісульфату (SP–54) можлива інтенсифікація деглікозилювання або порушення процесів глікозилювання фізіологічного пріона у великих півкулях головного мозку. У довгастому мозку відзначається деяке зниження рівня диглікозильованої форми за дії пентосан полісульфату (SP–54). Цікавим є те, що даний препарат викликає накопичення моноглікозильованої форми, яка у контролі практично не експресується (рис.2). В той же час, рівень деглікозильованої ізоформи фізіологічного пріона залишається, практично, незмінним (рис. 2).

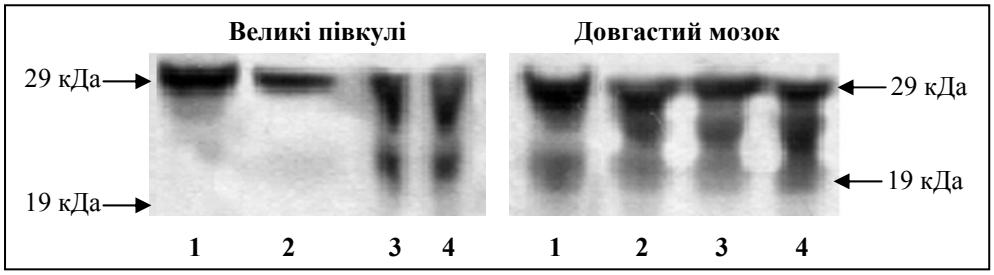

Рис. 2. Імунблот-аналіз експресії глікоформ фізіологічного пріон-протеїну за дії пентосан полісульфату (SP–54) (1– контроль; 2– SP–54 у дозі 0,1 мг/кг/день; 3– SP–54 у дозі 0,5 мг/кг/день; 4– SP–54 у дозі 0,5 мг/кг/день).

Що стосується гепарину, то як видно з рис. 3, цей препарат показав більший інгібуючий вплив на загальний рівень експресії фізіологічного пріона, порівняно з пентосан полісульфатом (SP–54). Але це стосується сумарного впливу всіх доз препарату. Що ж до найбільш ефективних доз досліджуваних препаратів (1 мг/кг/день та 300 мг/кг/день для гепарину та пентосан полісульфату (SP–54), відповідно), то тут більшу ефективність виявлено для пентосан полісульфату (SP–54). Слід також відзначити, що ці дози є терапевтичними та, теоретично, не повинні викликати суттєвих побічних ефектів.

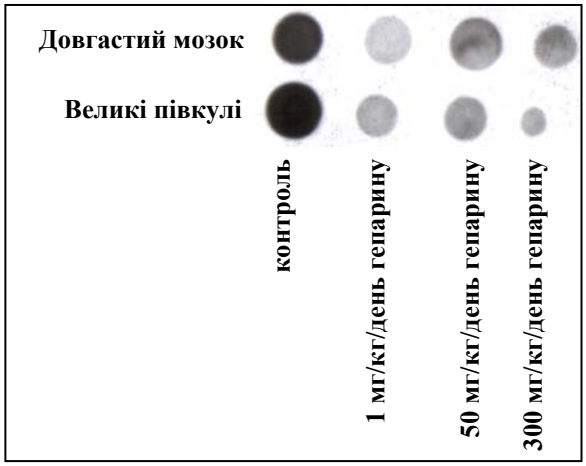

Рис. 3. Дот-блот аналіззагального рівня експресії фізіологічного пріона при застосуванні гепарину.

При дослідженні профілів експресії ізоформ фізіологічного пріону під дією гепарину встановлено, що у великих півкулях не відбувається ніяких змін у профілі ізоформ PrP^C при застосуванні пентосан полісульфату (SP–54). Тоді як у довгастому мозку відзначається майже повна редукція деглікозильованої форми та відсутність експресії моноглікозильованої

форми як у контролі, так і у досліді, що спостерігалося у випадку застосування пентосан полісульфату (SP–54) (рис. 4).

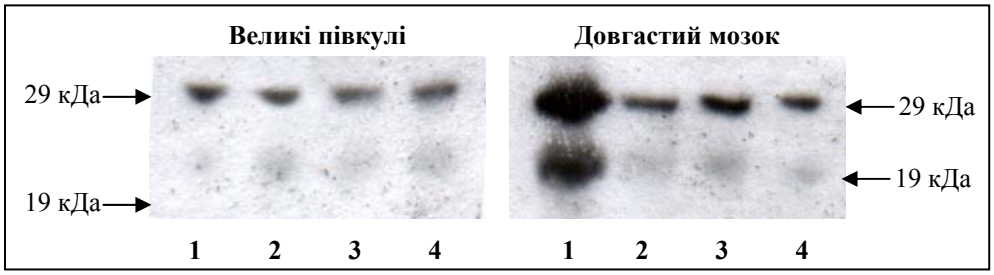

Рис. 4. Імунблот-аналіз експресії глікоформ фізіологічного пріон-протеїну за дії гепарину
(1– контроль; 2– гепарин у дозі 1 мг/кг/день; 3– гепарин у дозі 50 мг/кг/день; 4– гепарин у дозі 300 мг/кг/день).

Всі ці зміни у профілях експресії фізіологічного пріону при застосуванні ГАГ мають певний тканино– та органоспецифічний характер і можуть мати вплив на функціонування систем клітинної сигналізації та метаболізму, але, цей вплив буде мати набагато менші негативні наслідки, порівняно з повною відсутністю експресії PrP^C, яка відзначається у тварин, нокаут них за геном *Prnp*.

Висновки

1. Окремі глікозаміноглікани, зокрема, пентосан полісульфат (SP–54) та гепарин володіють інгібуючим впливом на фізіологічний пріон, який експресується у головному мозку щурів.
2. Пентосан полісульфат (SP–54) та гепарин впливають на профіль експресії фізіологічного пріону, при чому цей вплив носить специфічний характер для коржного препарату.

V. V. Stadnyk

THE INFLUENCE GLYCOSAMINOGLYCANS TREATMENT ON EXPRESSION OF PHYSIOLOGICAL PRION PROTEIN IN BRAIN OF MAMMALS

S u m m a r y

The work showed, that some glycosaminoglycans, in particular, pentosan polisulfate (SP–54) and heparin are able to inhibit the general level of expression of physiologycal priona in vivo.

It was also set that given preparations specifically influence on the expression of isoforms type physiological prion, and that this influencing depends on the type of preparation, his dose, and tissue in which the proper changes are detecting.

Institute of Animal Biology UAAS, Lviv

1. *Prusiner S.* Prions. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — №95. — P.13363–13383.
2. A cohort study to examine maternally–associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy. / Wilesmith J. W., Wells G. A. H., Ryan J. B. M. et al. // 1997. — Vet. Rec. — Vol. 141. — P. 239–243.
3. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. / Gavier–Widen D., Biacabe A. G., Laplanche J–L, et al. // EMBO. — 2004. — Vol. 5. — P. 110–115.
4. . Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. / Casalone C., Zanusso G., Acutis P. et al // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101. — P. 3065–3070.
5. *Court L., Dodet B.* «Transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion diseases». — Paris: Elsevier, 1996. — 158 pp.
6. Biology of PrPsc accumulation in two natural scrapie–infected sheep flocks. / Caplazi P., O'Rourke K., Wolf C. et al.// J. Vet. Diagn. Invest. — 2004. — Vol. 16. — P. 489–496.

7. *Jeffrey M., Martin S., Gonza'lez L.* Cell–associated variants of disease–specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy // J. Gen. Virol. — 2003. — Vol. 84. — P. 1033–1046.

8. *Sakaguchi S.* Molecular Biology of Prion Protein and its first homologous protein // The J. of Medical Investigation. — 2007. — Vol. 54. — P. 211–223.

9. *Fraser J. R.* What is the basis of transmissible spongiform encephalopathy induced neurodegeneration and can it be repaired? // Neuropathol. Appl. Neurobiol. — 2002. — Vol. 28. — P. 1–11.

10. *Prusiner S. B.* Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie // Science. — 1982. — Vol. 216. — P. 136–144.

11. Production of cattle lacking prion protein. / Richt J. A., Kasinathan P., Hamir A. N. et al. // Nat. Biotechnol. — 2007. — Vol. 25, N.1. — P. 132–138.

12. Loss of cerebral Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. / Sakaguchi S., Katamine S., Nishida N. et al. // Nature. — 1996. — Vol. 380. — P. 528–531.

13. Characterization and polyanion–binding properties of purified recombinant prion protein. Brimacombe D. B., Bennett A. D., Wusteman F. S. et al. // Biochem. J. — 1999. — Vol. 342. — P. 605–613.

14. Treatment of Transmissible Spongiform Encephalopathy by Intraventricular Drug Infusion in Animal Models. / Dohura K., Ishikawa K., Murakami–Kubo I. et al. // Journal of Virology. — 2004. — Vol. 78, N.10. — P. 4999–5006.

15. Detection and Localization of PrPSc in the Skeletal Muscle of Patients with Variant, Iatrogenic, and Sporadic Forms of Creutzfeldt–Jakob Disease. / Peden A., Ritchie D., Head M. et al. // Amer. J. of Pathology. — 2006. — V. 168, №. 3. — P. 927–935.

16. *Laemmly U., Beguin F., Gujer–Kellenberg G.* A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation // J. Mol. Biol. — 1970. — V. 47, № 1. — P. 69–85.