

ВПЛИВ ГЕПАРИНУ НА РІВЕНЬ ФІЗІОЛОГІЧНОГО ПРІОНА У ТКАНИНАХ ТА ОРГАНАХ ЩУРІВ

Х. Я. Майор

Інститут біології тварин УААН

*Встановлено інгібуючу дію гепарину на рівень фізіологічного пріона у тканинах та органах периферичної пріон-реплікуючої системи. Застосування гепарину в концентрації 300 мг/кг*день призводить до зниження рівня як ди- так і моноглікозильованої форми фізіологічного пріона у досліджуваних органах та тканинах, а саме селезінці, скелетних м'язах та тонкому кишечнику. Тоді як гепарин у дозах 1 та 50 мг/кг*день спричинює лише тенденцію до зниження вмісту фізіологічного пріона в досліджуваних тканинах і органах. Показано, що високі концентрації гепарину володіють найефективнішою протипріонною активністю, проте мають негативний вплив на систему гемостазу, що веде до підвищення ризику розвитку геморагічних станів, що, в свою чергу, накладає деякі обмеження на ефективність застосування високих концентрацій гепарину для зниження рівня фізіологічного пріона.*

Ключові слова: ФІЗІОЛОГІЧНИЙ ПРІОН, ГЕПАРИН

Фізіологічний пріон (PrP^c) — це висококонсервативний білок клітин ЦНС та багатьох інших тканин і органів, зокрема легень, серця, нирок, шлунково-кишкового тракту, м'язів, лімфоїдних клітин тощо [1]. Доведено, що фізіологічний пріон є необхідним чинником у процесі розвитку ряду фатальних нейродегенеративних захворювань людини та тварин, які відносяться до групи пріонних інфекцій або трансмісивних спонгіоформних енцефалопатій (ТСЕ), а саме: хвороба Крейцфельдта-Якоба, Синдром Герстманна-Штройслера-Шейнкера, фатальне родинне безсоння, куру, скреїпі овець і кіз, трансмісивна енцефалопатія норок, хронічна виснажлива хвороба оленів, спонгіоформна енцефалопатія котятих, губчастоподібна енцефалопатія великої рогатої худоби та ін [2]. Усі перелічені види ТСЕ характеризуються 100% летальністю і мають інфекційну природу. На сьогодні пріонні інфекції важко діагностуються та не піддаються лікуванню.

Головними рисами ТСЕ є нейрональна вакуолізація (спонгіоз), відмирання нейронів, реактивний астроцитоз та мікрогліоз. Усі ці патологічні зміни у мозку хворих тварин чи людини пов'язані із накопиченням у нейронах атипової, резистентної до дії протеїназо ізоформи фізіологічного пріона, названої PrP^{sc}. Згідно сучасних уявлень, єдиним попередником ізоформи PrP^{sc} є фізіологічний пріон, який за нез'ясованими механізмами трансформується у протеїназо-резистентну конформацію.

На молекулярному рівні профілактика ТСЕ може бути спрямована на зниження PrP^c, знищення PrP^{sc} або блокування процесу трансформації фізіологічної форми пріона у патологічну. Ліквідація PrP^{sc} є найбільш логічним заходом, проте на сьогодні ефективні препарати відсутні. Натомість, зменшення фізіологічного пріона дозволять усунути субстрат для утворення PrP^{sc}.

Встановлено, що антипріонною активністю володіє ряд сполук, зокрема полієнові антибіотики [3], конго червоний [4], тетрапіроли [5], полікатионні сполуки [6] та ін. Усі ці речовини володіють інгібуючою дією на процес акумуляції патологічної ізоформи пріона, проте пошук препаратів напрямленої дії із найменшим негативним ефектом при застосуванні *in vivo* досі залишається актуальною проблемою в галузі біології пріонів.

Дослідження останніх років вказують на те, що препарати глікозаміногліканового ряду, а також їх семісинтетичні аналоги можуть бути перспективними засобами для профілактики та лікування пріонних інфекцій [7]. Ці поліаніонні сполуки виявились ефективними при зменшенні рівня PrP^{sc} та пролонгації інкубаційного періоду при пріонних захворюваннях у клітинних та тваринних моделях. Встановлено, що їх терапевтична

ефективність полягає у конкурентному інгібуванні взаємодії між ендogenousними молекулами глікозаміногліканів (ГАГ) та PrP^{sc} чи PrP^{sc}.

Гепаран сульфат та гепарин знижують інтенсивність накопичення PrP^{sc} у інфікованих культурах клітин [8]. Інші ГАГ, а саме кератан сульфат та хондроїтин сульфат, є менш ефективними, ніж гепаран сульфат чи декстран сульфат. Введення гепарину піддослідним тваринам викликає зниження рівня фізіологічного пріона у великих півкулях головного, довгастого та спинного мозку [9]. Метою нашої роботи було дослідити протипріонну активність гепарину у головних органах та тканинах периферичної частини пріон-реплікуючої системи.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були лабораторні щурі *Rattus norvegicus* var. *Alba*, лінії Vistar. Досліди проводили на зразках тканин та органів, відібраних після смерті тварин.

Для досліджень відбирали статевозрілих самців щурів вагою 250–350 г. Піддослідні тварини були поділені на 4 групи. Внутрішньом'язеві ін'єкції гепарину здійснювали в дозах 1, 50 і 300 мг/кг/день. Контрольній групі вводили еквівалентні дози фізіологічного розчину.

Концентрації препарату та тривалість експерименту підбирали згідно довідкових даних про оптимальні терапевтичні дози. Скомпенсований комбікорм та вода були доступні тваринам *ad libitum* до та після експериментальних процедур.

Ін'єкції здійснювали один раз на 24 год. впродовж 7-ми діб. На сьому добу тварин декапітували під легким ефірним наркозом. Для досліджень відбирали селезінку, тонкий кишечник, м'яз стегна та кров. Експерименти з тваринами проводили згідно з правилами Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин [10].

Точкова гібридизація рівня фізіологічного пріона. Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі спеціального буферу (10 % N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилmaleїмід 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 4 °С. У готових лізатах вимірювали концентрацію білка методом Лоурі (фірма Сімко, Україна). Для вирівнювання об'ємів та концентрацій загального білка, зразки розводили спеціальним буфером (25 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, pH = 7,4). Далі розведені зразки наносили на нітроцелюлозну мембрану (Millipor). Для виявлення фонового свічення на мембрану наносили буфер для лізування та спеціальний буфер для розведення зразків. Після нанесення контрольних та дослідних зразків мембрану інкубували з моноклональними анти-PrP антитілами 6Н4 (Prionics, Swiss) – 1:2000 у забуференому фізіологічному розчині з Твін-20 (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).

Імуноблот-аналіз [11] Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі спеціального буферу (10 % N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилmaleїмід 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 4 °С. У готових лізатах вимірювали концентрацію білка методом Лоурі. Далі до над осадової рідини додавали однаковий об'єм буферу Леммлі [12] (Sigma, Germany), зразки прогрівали протягом 5 хв. при 95 °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 (0,01 % Твін-20 на забуференому фізіологічному розчині) 60 хв. Далі мембрану інкубували з моноклональними анти-PrP антитілами 6Н4 (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).

Дослідження показників системи гемостазу. Дані дослідження проводилися з використанням загальновідомих методик клінічної лабораторної діагностики порушень функціонування системи коагуляції, а саме: протромбіновий час за Quick A.J. (1974), тромбіновий час за Сірмаї (1957), час рекальцифікації за Bergerhof (1954), кількість фібриногену в крові за Р. А. Рутберг та ін. [13]. Результати досліджень піддавали статистичному аналізу [14]. Обробку проводили за допомогою програми Statgraphics Plus 5.1 з використанням t-тесту Ст'юдента та обрахунком коефіцієнту кореляції. Зміни вважали достовірними при $p < 0,05-0,001$.

Результати й обговорення

Аналіз результатів, отриманих за допомогою методу точкової гібридизації, показав, що гепарин в дозі 300 мг/кг*день веде до вірогідного зниження загального рівня PrP^C у селезінці ($p < 0,05$), скелетних м'язх ($p < 0,001$) та тонкому кишечнику ($p < 0,001$). Застосування гепарину в дозах 1 та 50 мг/кг*день спричинює лише тенденцію до зниження вмісту фізіологічного пріона в досліджуваних тканинах і органах (рис.1).

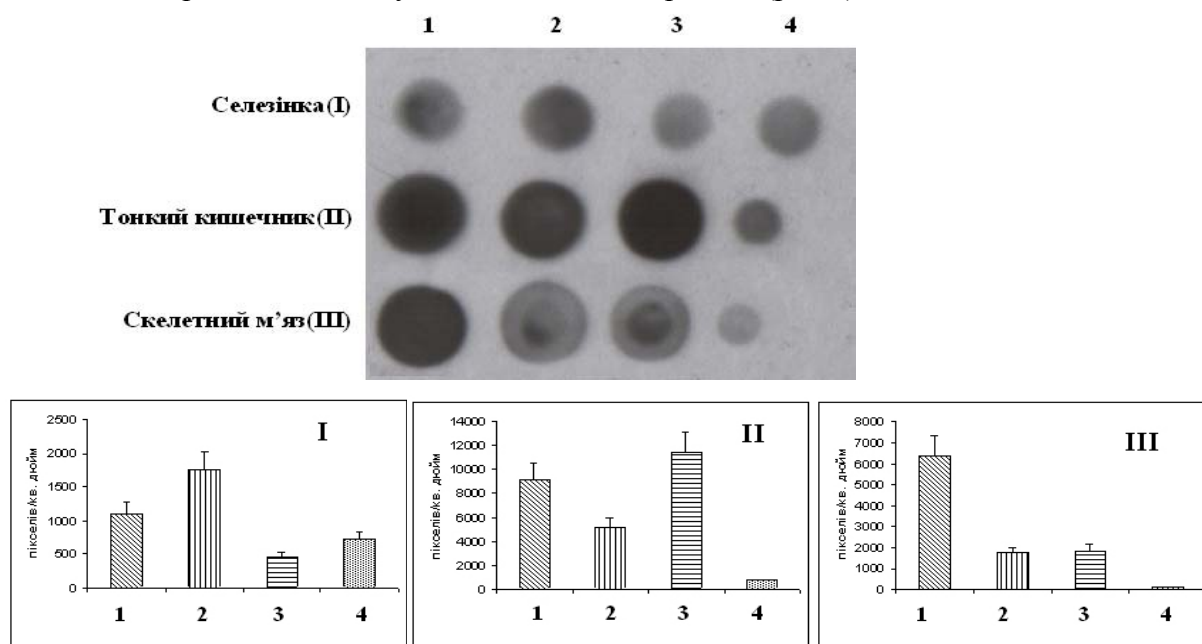
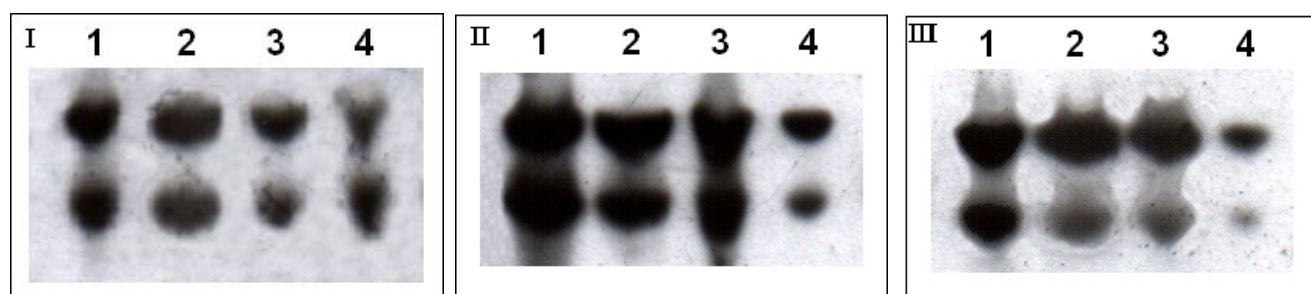


Рис.1. Результати точкової гібридизації загального рівня фізіологічного пріона при введенні гепарину лабораторним тваринам.

1 — контроль; 2 — 1 мг/кг*день гепарину; 3 — 50 мг/кг*день гепарину; 4 — 300 мг/кг*день гепарину.

Застосування методу імуноблот-аналізу для дослідження ізоформ фізіологічного пріона дозволило підтвердити попередні результати, отримані за допомогою методу точкової гібридизації (рис. 2). Було показано, що гепарин знижує рівень обидвох фракції фізіологічного пріона, при цьому зниження вмісту моноглікозильованої ізоформи є більш чітко вираженим, порівняно із диглікозильованою. У досліджуваних органах спостерігалось зниження рівня ізоформ фізіологічного пріона, порівняно з контролем, залежно від дози застосованого препарату. Таким чином, найефективнішою була доза 300 мг/кг*день гепарину.



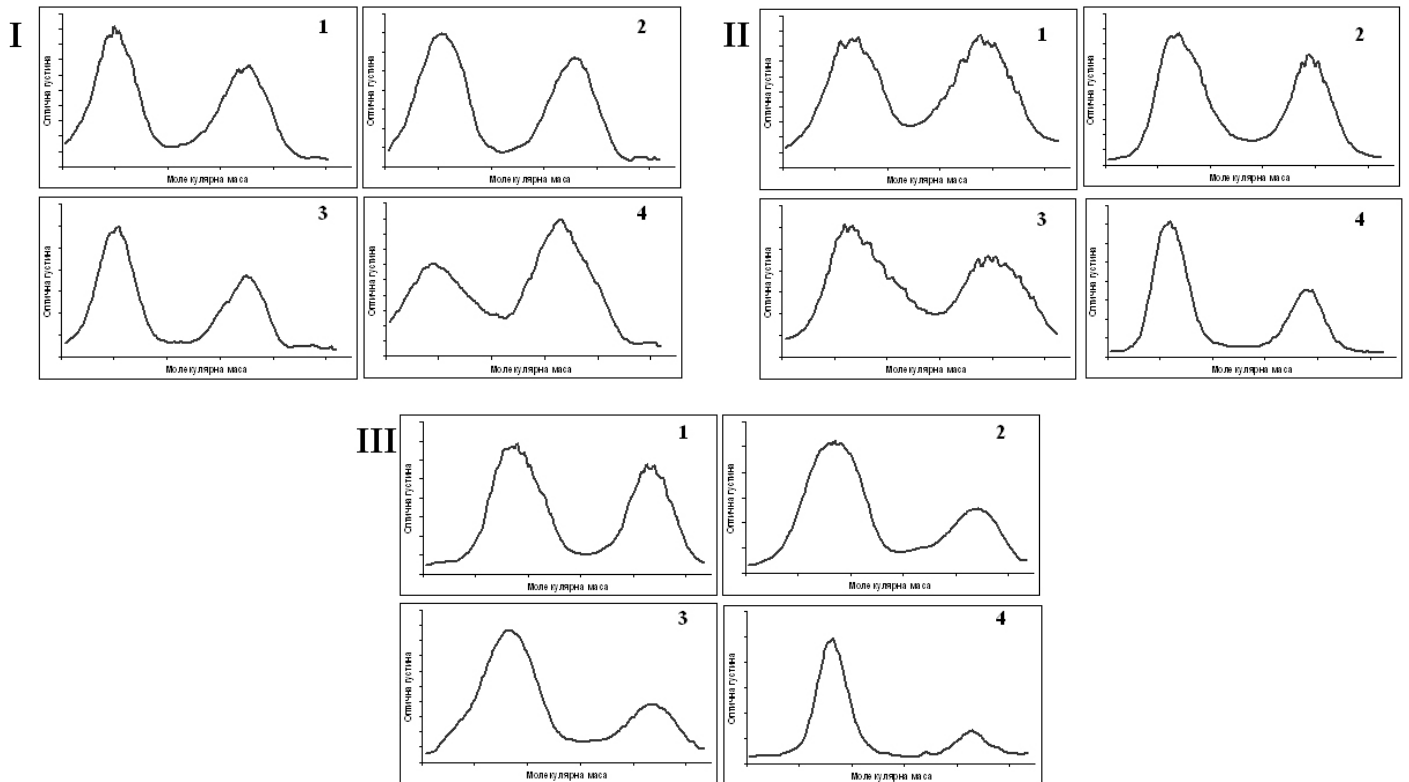


Рис. 2. Імуноблот-аналіз ізоформ фізіологічного пріона у селезінці (I), кишечнику (II) та скелетному м'язі (III) за дії гепарину

1 — контроль; 2 — 1 мг/кг*день гепарину; 3 — 50 мг/кг*день гепарину; 4 — 300 мг/кг*день гепарину.

Слід відзначити, що гепарин є сильним природнім антикоагулянтом прямої дії, який разом із фібринолізином входить до складу фізіологічної системи проти згортання крові. При внутрішньом'язовому введенні гепарину ефект настає через 15-30 хвилин і продовжується до 6 годин. Дія препарату контролюється шляхом визначення часу згортання крові. Після ін'єкцій гепарину зазвичай спостерігається значне сповільнення рекальцифікації плазми, подовження тромбінового часу, тощо. Нами було перевірено вплив досліджуваних доз гепарину на систему коагуляції. Встановлено, що даний препарат не впливає на показники тромбоцитограми, але викликає зростання рівня антитромбіну III, часу згортання крові, часу утворення згустка, активованого часу рекальцифікації, активованого часткового тромбопластинового часу, рівня продуктів деградації фібрину тощо. Водночас відзначено вірогідне ($p < 0,001$) зниження рівня фактора XIII та зменшення фібринолітичної активності при введенні гепарину у концентрації 300 мг/кг*день (табл. 2).

Таблиця 2

Показники системи коагуляції за введення гепарину

Показник	Контроль	1 мг/кг/день гепарину	50 мг/кг/день гепарину	300 мг/кг/день гепарину
Тромбоцити, $\cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$	250±38	245±29	258±31	229±34
<i>Тромбоцитограма</i>				
юних, %	0,28±0,03	0,25±0,04	0,27±0,08	0,30±0,05
зрілих, %	92,34±0,54	89,78±2,55	94,47±1,89	96,33±2,47
старих, %	3,8±0,44	4,5±0,54	3,47±0,31	3,21±0,19
дегенеративних, %	0,03±0,008	0,07±0,004	0,06±0,005	0,03±0,007
форм подразнення, %	1,4±0,25	1,2±0,21	1,34±0,11	1,28±0,30

Адгезивність тромбоцитів, %	38,29±4,50	36,58±3,55	37,85±2,33	37,99±3,45
Агрегація тромбоцитів, с	32±15	31±12	34±8	33±11
<i>Ретракція згустка крові</i>				
якісний метод, хв.	44±15	45±18	51±21	64±18**
кількісний метод, %	74±18	71±15	68±12	52±12**
Фібриноген, г/л	3,25±0,48	3,15±0,33	3,34±0,29	3,24±0,54
Час згортання, с	438±57	485±68	514±25	652±44*
Протромбіновий індекс, %	94,58±5,36	90,31±4,23	85,21±4,84	67,18±3,78
Тромбіновий час, с	32±3	34±2	40±3**	49±4*
Активованій час рекальцифікації крові, с	60±7	63±5	68±2	75±2*
Активованій частковий тромбопластиновий час, с	36±3	40±2	48±4	57±3*
Фактор XIII, %	104±16	100±9	110±15	97±19*
Антитромбін III, %	108±7	112±5	120±4	145±2*
Фібринолітична активність, с	625±47	618±74	602±12	584±18**
Продукти деградації фібрину и фібриногена, мкг/мл	3,54±0,68	3,64±0,51	3,99±0,42	4,85±0,35**
<i>Паракоагуляційні тести</i>				
етаноловий	негативний	— —	— —	— —
о-фенантроліновий	негативний	— —	— —	— —
протамінсульфатний	негативний	— —	— —	— —

Примітки: 1) * — $p < 0,05$; 2) ** — $p < 0,01$

Ці зміни у системі зсідання крові є типовими при введенні антикоагулянтів групи гепаринодів та характеризуються підвищеним ризиком розвитку геморагічних станів, що, в свою чергу, накладає деякі обмеження на ефективність застосування високих концентрацій гепарину для зниження рівня фізіологічного пріона.

Висновки

1. Внутрішньом'язове введення щурам гепарину спричиняє зменшення рівня фізіологічного пріона.
2. Гепарин володіє значним інгібуючим впливом на моно- та диглікозильовану ізоформи фізіологічного пріона у периферичних пріон-реплікуючих органах.
3. Високі дози гепарину (300 мг/кг/день) зумовлюють виникнення побічних ефектів у системі гемостазу, що підвищує ризик виникнення геморагічних станів.

Ch. Ya. Mayor

INFLUENCE OF HEPARIN ON THE LEVEL OF CELLULAR PRION IN TISSUES AND ORGANS OF RATS

S u m m a r y

It was developed the inhibiting influence of heparin on the level of cellular prion in tissues and organs of peripheral prion replication system. Appliance of heparin in concentration 300 mg/kg*day leads to decrease of di- and monoglycosylated form of cellular prion level in tested

organs and tissues, in particular — in spleen, skeletal muscles and in thin intestine. Heparin in doses 1 and 50 mg/kg*day causes only tendency to decrease a level of cellular prion in tested tissues and organs. It was shown, that high concentrations of heparin possess most effective antiprion activity but have negative influence on the haemostasis system that leads to the increase of risk of haemorrhagic states development which limits the efficiency of high concentrations of heparin for decrease of cellular prion level.

Institute of Animal Biology UAAS

Х. Я. Майор

ВЛИЯНИЕ ГЕПАРИНА НА УРОВЕНЬ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПРИОНА В ТКАНЯХ И ОРГАНАХ КРЫС

А н н о т а ц и я

Установлено ингибирующее действие гепарина на уровень физиологического приона в тканях и органах периферической прион-реплицирующей системы. Применение гепарина в концентрации 300 мг/кг*день приводит к снижению уровня как ди- так и моногликозилированной формы физиологического приона в исследуемых органах и тканях, а именно селезенке, скелетных мышцах и тонком кишечнике. Тогда как гепарин в дозах 1 и 50 мг/кг*день вызывает лишь тенденцию к снижению содержимого физиологического приона в исследуемых тканях и органах. Показано, что высокие концентрации гепарина владеют самой эффективной протиприонной активностью, однако имеют негативное влияние на систему гемостаза, что ведет к повышению риска развития геморрагических состояний, что, в свою очередь, налагает некоторые ограничения на эффективность применения высоких концентраций гепарина для снижения уровня физиологического приона.

1. *Horiuchi M.* A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep [Text] / M. Horiuchi, N. Yamazaki, T. Ikeda // J. Gen. Virol. — 1995. — Vol. 76. — P. 2583–2587.

2. *Prusiner S. B.* Prion Diseases and the BSE Crisis [Text] / S. B. Prusiner // Science. — 1997. — Vol. 278. no. 5336. — P. 245–251.

3. *Pocchiari M.* Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters [Text] / M. Pocchiari, S. Schmittinger, C. Masullo // J. Gen. Virol. — 1987. — Vol. 68. — P. 219–223.

4. *Caughey B.* Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by Congo red [Text] / B. Caughey, R. E. Race. // J. Neurochem. — 1992. — Vol. 59. — P. 768–771.

5. *Caughey W.S.* Inhibition of proteaseresistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines [Text] / W.S. Caughey, L.D. Raymond, M. Horiuchi et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 12117–12122.

6. *Supattapone S.* Uyechi et al. Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells [Text] / S. Supattapone, H. Wille, L. // J. Virol. — 2001. — Vol. 75. — P. 3453–3461.

7. *Стадник В.В.* Експресія фізіологічного пріону у головному мозку ссавців за дії глікозаміногліканів [Text] / В. В. Стадник // Біологія тварин. — 2007. — Т. 9, № 1–2. — С. 141–145.

8. *Gabizon R.* Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate [Text] / R. Gabizon, Z. Meiner, M. Halimi, // J Cell Physiol 1993. — Vol. 157. — P. 319–25.

9. *Влізло В.В.* Вміст фізіологічної форми пріону за дії пентосанполісульфату (sp-54) у тканинах щура [Text] / В. В. Влізло, В. В. Стадник, Х. Я. Майор, М. В. Кінах, П. І. Вербицький, М. М. Козак // Укр. біохім. журнал. — 2008. — Т. 80, № 1. — С. 33–39.

10. *Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act* // Vet Q. — 1986 Oct. — Vol. 8(4). — P. 346–349.

11. *Carleton A.* Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus [Text] / A. Carleton, P. Tremblay, J.D. Vincent et al. // *Pflugers Arch.* — 2001. — Vol. 442. — P. 223–229.
12. *Colling S.B.* Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca²⁺-activated K⁺ currents [Text] / S.B. Colling, J. Collinge, J.G.R. Jefferys // *Neurosci. Lett.* — 1996. — Vol. 209. — P. 49–52.
13. *Балуда В.П.* Лабораторные методы исследования системы гемостаза [Text] / В. П. Балуда, З. С. Баркаган, Е. Д. Гольдберг // Томск. — 1980. — 314 с.
14. *Гублер Е. В.* Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов [Text] / Е. В. Гублер. — Л. : Медицина, 1978. — 294 с.