

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИОН-ПРОТЕЇНУ ТА ЙОГО ІЗОФОРМ У ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Вербицький П.І., Петрух І.М., Влізло В.В., Остапів Д.Д.

Інституту біології тварин УААН, м. Львів

Установлено пріон-протеїн і його ізоформи у лейкоцитах крові великої рогатої худоби, що може бути передумовою для розроблення прижиттєвих методів діагностики ТСЕ й ідентифікації штамів інфекційного пріону.

На сьогоднішній день прижиттєва діагностика губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби (ГЕ ВРХ) відсутня. Протягом останнього десятиліття розробленню методів виявлення пріонів і діагностики трансмісивних спонгіоформних енцефалопатій (ТСЕ) людей і тварин приділяється велика увага. Однак, остаточно встановити діагноз можна тільки у померлих, виявляючи нагромадження патологічного або інфекційного пріону (PrP^{sc}) в мозку [1].

Відомо [2], що захворювання виникає при наявності в організмі тварини фізіологічного пріона (PrP^c), який є основою для реплікації PrP^{sc}. Установлено [3], що PrP^c синтезується у різних органах і тканинах організму, а також виявляється на поверхні лімфоцитів і моноцитів крові. Імунна система хворого організму не реагує на присутність PrP^{sc}, оскільки не продукується інтерферон, не проявляється цитотоксичний вплив, включаючи інфікування клітин *in vitro*, не змінюються якісно та кількісно Т- та В-лімфоцити [4]. Проте за допомогою клітин імунної системи пріони поширюються по організму [5].

Особлива роль у перенесенні та частковій реплікації пріону належить В-лімфоцитам [6]. Так, при імунодепресії, яку викликали кортикостероїдами та амфотерицином В, чутливість організму до патологічного пріону знижувалась. У трансгенних мишей, які мали генетичний дефект на продукцію В-лімфоцитів, спостерігалось зниження розвитку хвороби після внутрішньочеревного введення збудника. Водночас при інтрацеребральному інфікуванні тварин не виявлено різниці у швидкості поширення інфекції в дослідній і контрольній групах [7, 8].

Зважаючи на те, що у поширенні та частковій реплікації пріону в організмі приймають участь лімфоцити крові, метою нашої роботи було встановити PrP^c і дослідити профіль його глікоформ у лейкоцитах крові великої рогатої худоби.

Матеріали та методи. Матеріалом для досліджень були лейкоцити, виділені з крові великої рогатої худоби. Для отримання концентрату лейкоцитів у пробірку з 1 см³ 3 % NaЕДТА вносили 4 см³ венозної крові та обережно перемішували. У зв'язку з різною питомою вагою еритроцитів і лейкоцитів додавання трилону Б (NaЕДТА) забезпечує розділення крові на дві фракції – еритроцити та плазму, яка містить велику кількість лейкоцитів. Пробірки інкубували 30–40 хв. у термостаті за температури 37 °С. Відсмоктували плазму та центрифугували за умови 1000 об./хв. 10 хв. Осад лейкоцитів декантували шляхом розбавлення в 0,5 см³ TBST (Tris-Buffered-Saline with Tween) і розділяли їх на дві частини. Одну частину лейкоцитів досліджували за методикою Prionics-Check Western, іншу – методом проведення імуноелектрофорезу в 5 % ПААГ.

При проведенні досліджень за методикою Prionics-Check, приготовані відповідно до даної методики проби, вносили в лунки 12 % ПААГ і виконували вертикальний електрофорез. Принцип даного методу ґрунтується на здатності протеїнази К перетравлювати фізіологічну форму пріон-протеїну та виявляти патологічну, стійку до дії протеїнази К. Після проведення електрофорезу, методом блоту, білки переносили з гелю на PVDF-мембрану (Immobilon-P, Millipore). Насичували мембрану специфічними моноклональними антитілами 6Н4 (Prionics, Swiss) та антимишиним імуноглобуліном IgG-Biot (DakoCytomation), що дало можливість виявити пріон. Детекцію імунних комплексів (пріон+моноклональні антитіла) здійснювали, вико-

ристовуючи CDP-Star (Tropix, GB). Отриманий результат фіксували на рентгенівській плівці ECL HyperFilm (Amersham, USA). Типізацію ізоформ фізіологічного пріону проводили за молекулярною масою та відносною електрофоретичною рухливістю. Відсоток окремих ізоформ у загальному вмісті пріона визначали на аналізаторі фореграм (АФ-1), прямим скануванням рентгенівських плівок. Виключення етапу обробки проб протеїназою К дало можливість виявити у досліджуваному матеріалі фізіологічний пріон.

При проведенні досліджень на виявлення фізіологічного пріону за методом імуноелектрофорезу досліджувані проби готували відповідно до методики Prionics-Check Western. До 5 % ДСН–ПААГ додавали специфічні моноклональні антитіла 6H4 (Prionics, Swiss) і формували лунки, в які вносили приготовані проби. Горизонтальний електрофорез проводили протягом 20 хв. Через 10 хв від початку електрофорезу на поверхню гелю шляхом аплікації наносили антимишиний імуноглобулін IgG-Biot (DakoCytomation). У результаті утворення зон преципітації (пріон+моноклональні антитіла) виявили пріон-протеїн. Після закінчення електрофорезу, непреципітовані білки вимивали сольовим розчином (NaCl 12,5%). Утворені конгломерати пріон-протеїну та моноклональних антитіл завдяки великим розмірам з гелю не вимиваються сольовим розчином і виявляються при зафарбовуванні Кумасі R-250.

Результати досліджень. У результаті проведення імуноелектрофорезу на пластині 5 % ДСН–ПААГ встановлено білки, які під час приготування проб не піддавалися дії протеїнази К (рис. 1).

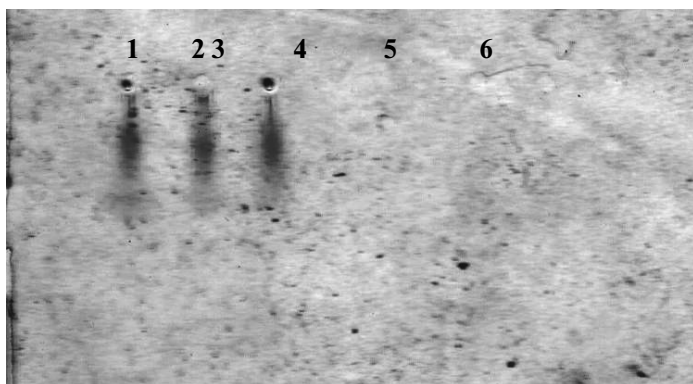


Рис. 1. Виявлення пріон-протеїну за допомогою імуноелектрофорезу в лейкоцитах крові великої рогатої худоби

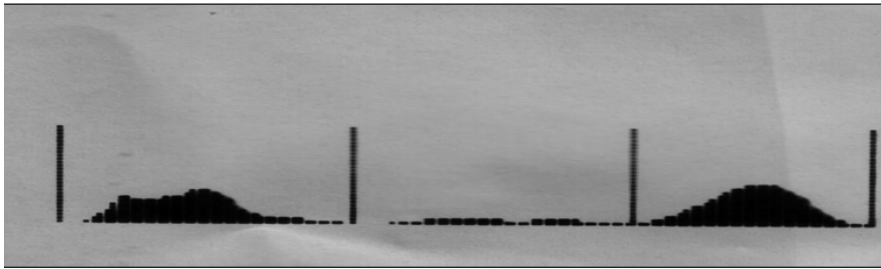
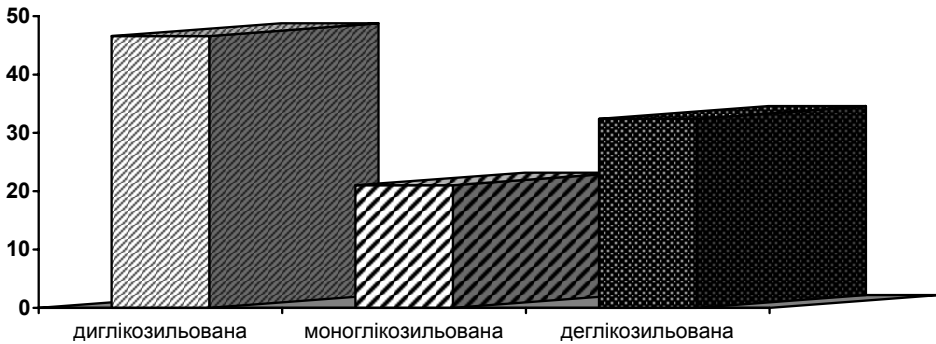
Примітка: 1, 2, 3 – зразки без дії протеїнази К; 4, 5, 6 – зразки за дії протеїнази К.

Отже, виявлення пріону в лейкоцитах крові шляхом проведення імуноелектрофорезу може бути передумовою для розроблення експрес-тесту при діагностиці ТСЕ.

Під час дослідження фізіологічного пріону в лейкоцитах крові корів за методикою Prionics-Check Western, нами виявлено три його ізоформи: ди-, моно- та деглікозильовану. В результаті аналізу відносної кількості ізоформ PrP^c у загальній концентрації пріона лейкоцитів крові великої рогатої худоби встановили, що переважаючою є диглікозильована форма PrP^c (46,6 %), у меншій кількості представлена деглікозильована (32,4 %), а найменшою є моноглікозильована (21,0 %) фракція (рис. 2).

Співвідношення глікоформ відображає структурно-функціональний стан органів, що зумовлюють посттрансляційну модифікацію фізіологічного пріону. Існують різні штами пріонів, які розрізняються своєю конформацією й особливістю кількості та співвідношення ізоформ. Тому, визначення глікоформ пріону та встановлення їх змін у перспективі може застосовуватися як один з показників для визначення штамів пріонних інфекцій.

A



В 1

2

3

Рис. 2. Діаграма (А) та десинтограма (В) вмісту ізоформ фізіологічного пріона у лейкоцитах крові корів, виявленого методом вестерн-блот

Примітка: 1— де-, 2— моно-, 3 — диглікозильована ізоформи PrP^{Sc}

Висновки. 1. Апробовані методики вестерн-блот аналізу й імуноелектрофорезу дають змогу встановити пріон-протеїн у лейкоцитах крові, що може бути передумовою для розробки прижиттєвого методу діагностики пріонних інфекцій.

2. Виявлено три ізоформи фізіологічного пріону у лейкоцитах крові корів — диглікозильовану (46,6 %), деглікозильовану (32,4 %) та моноглікозильовану (21 %), що може бути важливим показником ідентифікації штамів пріону.

Перспектива подальших досліджень. Дослідження пріону у лейкоцитах і лімфоцитах крові, а також встановлення його глікоформ у перспективі можуть розроблятися як методи прижиттєвої діагностики ТСЕ й ідентифікації штамів PrP^{Sc}.

Список літератури

1. Ідентифікація патологічного пріону при губчастоподібній енцефалопатії великої рогатої худоби [Текст] / В.В. Влізло [та ін.] // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 2. — С. 75–80.
2. Selective neuronal vulnerability during experimental scrapie infection – insights from an ultrastructural investigation [Text] / E. Bouzamondo [et al.] // Brain Res. — 2000. — Vol. 874. — P. 210–215.
3. Фізіологічний пріон та його роль у патогенезі трансмісивних спогіоформних енцефалопатій [Текст] / В.В. Влізло [та ін.] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. — Х., 2008. — Вип. 91. — С. 105–108.
4. Kolb, E. Neuere biochemische und pathobiochemische Erkenntnisse über Prionproteine und über BSE [Text] / E. Kolb // Der Praktische Tierarzt. — 2002. — Bd. 5. — S. 460–467.
5. Carp, R.I. Interaction of scrapie agent and cells of the lymphoreticular system [Text] / R.I. Carp, S.M. Callahan, B.A. Patrick, P.D. Mehta // Arch. Virol. — 1994. — Vol. 736. — P. 255–268.
6. Brandner, S. A crucial role for B-cells in neuroinvasive scrapie [Text] / S. Brandner; M. A. Klein, A.A. Aguzzi // Nature. — 1997. — Vol. 390. — P. 687–690.
7. Reynaud, C.A. Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ [Text] / C.A. Reynaud, C.R. Mackay, R.G. Muller, J.C. Weill // The sheep ileal peyer's patches cell. — 1999. — Vol. 64, № 5. — P. 995–998.
8. Reymolds, J.D. Evidence of extensive lymphocyte death in sheep peyer's patches. A comparison of lymphocyte production and export [Text] / J.D. Reymolds // J. Immunol. — 1996. — Vol. 136. — P. 2005–2009.

PRION-PROTEIN AND ITS ISOFORMS IN LEUKOCYTES OF CATTLE BLOOD

Verbitskiy P.I., Petruch I.M., Vlizlo V.V., Ostapiv D.D.
Institute of Animal Biology of UAAS, Lviv

It was established prion-protein and its isoforms in leukocytes of cattle blood, which may be a pre-condition of elaboration of spongiform encephalopathy vital methods for diagnostics and infection prion strain identification.

УДК 547.831:615.28

ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ НОВИХ ЧЕТВЕРТИННИХ ПОХІДНИХ СОЛЕЙ ХІНОЛІНІЮ

Волянський А.Ю.

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України,
м. Харків Україна

Означено ступінь та спектр протимікробної дії четвертинних похідних солей хінолінію. Більш виражена активність хінолінієвих сполук щодо грампозитивних бактерій і кандид. Встановлено залежність "активність-структура" у більшості похідних хінолінію нового синтезу.

Арсенал протимікробних засобів, які використовуються сьогодні в медицині і ветеринарії, далеко не повністю задовольняє потребу в них, по цьому проблема пошуку та конструювання більш ефективних профілактичних і лікувальних препаратів, антисептиків та дезінфектантів сьогодні вельми актуальна [1, 2, 6, 7].

Матеріали і методи. Четвертинні похідні солей хінолінію синтезовані і охарактеризовані з фізико-хімічної точки зору на кафедрі органічної хімії Буковинського державного університету ім. Ю.Федьковича. Досліджувані сполуки являють собою мілкокристалеві різнокольорові порошки з високою температурою плавлення. Вивчення протимікробної дії четвертинних похідних хінолінію виконано згідно сучасних вимог Державної фармакопеї України [5]. Методом серійних розведень хімічних сполук в твердих та рідких поживних середовищах вивчено протимікробну активність похідних хінолінію щодо стандартних штамів мікроорганізмів (*Staph. aureus* 209-P, *E.coli* 365, *B.pertus vulgaris* 409, *Ps.aeruginosa* 128, *B.fragilis* 136, *C.diphtheriae* PW-8, *Candida albicans* 688). У випадках використання окрім води других розчинників хімічних сполук паралельно з основним дослідом ставили з ними контролю.

Одержані результати та їх обговорення. Вміщуючі хлор четвертинні солі хінолінію, що включають залишок диметиланліліну, виявили досить виражену активність у відношенні грампозитивних бактерій і грибів (мінімальні інгібуючі ріст мікробів концентрації знаходяться в межах від 0,25 до 31,2 мкг/мл). Вплив їх на ентеробактерії і псевдомонади менш виражено (ріст кишкової палички затримується з'єднаннями в дозах 31,2-250,0 мкг/мл, протеїв і синьогнійної палички - 31,2 - 250,0 мкг/мл); корінебактерії і неспорів анаероби виявили помірну чутливість до хлорвміщуючих четвертинних солей хінолінію (МЗК -від 1,0 до 62,5 мкг/мл). У таблиці 1 підсумовані дані щодо впливу зазначених сполук на випробувані музейні штами мікроорганізмів. При зіставленні структури і протимікробної дії хлорвміщуючих четвертинних солей хінолінію, що містять залишок диметиланліліну, чітко простежується підвищення їх активності у відношенні стафілококів, корінебактерій і кандид з подовженням вуглеводневого ланцюга замісника біля гетероатома азоту, що особливо помітно у сполук під шифром 5-12.

2 - і 4 - стирилхінолінієві солі виявилися досить активними у відношенні щодо стафілококів, корінебактерій і дріждеподібних грибів (МЗК у межах від 0,12 до 31,2 мкг/мл). Більш вираженим впливом на грампозитивні мікроорганізми володіють похідні хінальдинію (сполуки 13-24) і лепідинію (сполуки 30 -57) у порівнянні з замішеними біля атома азоту хінолінового ядра диметиламіністи-