

Ю.В. Мудрикова, С.А. Тустугашева

## ПРИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В статье рассмотрены механизмы действия патогенного прионного белка, который является инфекционным агентом. Авторы рассматривают различные варианты передачи патогенной формы приона через использование сырья животного происхождения в пищевых и медицинских целях. Обоснована необходимость разработки высокочувствительного воспроизводимого метода обнаружения патогенных прионных белков в различных образцах животного сырья.

Прионный белок, патогенность, губчатая энцефалопатия.

### Введение

Одним из выдающихся научных достижений XX века в области биологии и медицины стало открытие в 1982 году американским молекулярным биологом, профессором Стенли Прюзинером, нового типа инфекционных агентов – прионов, однако прионные болезни, например скрэйпи овец, были известны уже в середине XVIII века. Прионные болезни – это губчатые энцефалопатии млекопитающих, такие как бычья губчатая энцефалопатия или коровье бешенство, скрэйпи овец и некоторые нейродегенеративные заболевания человека – болезни Крейтцфельда – Якоба и Герстмана – Штраусслера – Шейнкера, семейная фатальная бессонница и куру. Эти заболевания характеризуются тяжелым прогрессирующим течением и неизбежным смертельным исходом [18].

Максимум заболеваемости животных «коровьим бешенством» – до 37 тысяч голов – пришелся на 1992 год в Англии. Пришлось уничтожить весь крупный рогатый скот, так как эпидемия разрасталась невероятными темпами. Общее количество погибших животных составило около 200 000, примерно 67 млн долларов было затрачено на ликвидацию этой эпидемии. Кроме того, в этот же период, помимо коров, губчатая энцефалопатия была зарегистрирована у пяти видов антилоп Лондонского зоопарка, домашних кошек, других животных и коров за пределами Британии [18].

Весной 1996 года регистрация нового варианта ранее известной, но чрезвычайно редкой болезни Крейтцфельда – Якоба и связываемая с этим «болезнь коровьего бешенства» буквально потрясли экономические и политические круги Англии [14]. Болезнь дебютировала в молодом возрасте, что нетипично для данного заболевания, известного с 1920-х годов, причем в процессе морфологического исследования мозга умерших больных были выявлены изменения, сходные с таковыми при губчатой энцефалопатии коров.

Затем в Англии и Франции стали умирать от «коровьего бешенства» люди. Исследования ученых показали, что болезнь неизлечима. По статистике, зараженное мясо периодически употребляли в пищу более миллиарда человек, тогда были составлены прогнозы, что в 2003 году по истечении скрытого периода болезнь будет проявляться ежегодно у нескольких миллионов человек.

Болезнь Крейтцфельда – Якоба (CJD) – очень редкое заболевание: оно встречается с частотой 1 случай на 1 миллион населения в год [12, 18]. Если верить статистике, то в России с населением примерно 150 миллионов CJD ежегодно поражает около 150 человек. На самом деле за последние 25 лет было зарегистрировано всего 20 случаев этой болезни. Это вовсе не значит, что у нас по части CJD все благополучно – просто случаи заболевания не выявляются и не регистрируются. В то время как, например, во Франции создана специальная сеть по надзору, которая отслеживает каждый случай заражения CJD. Неврологи центра отправляют «подозрительных» пациентов на обязательное обследование к лучшим специалистам страны.

Цель данной работы заключается в проведении аналитического обзора по тематике проблемы. В первую очередь это рассмотрение механизма инициирования инфекционным агентом, также рассмотрение методов контроля качества сырья животного происхождения, используемых в настоящее время.

### Объекты и методы исследований

Патогенные прионы PrP<sup>Sc</sup> выделяют в отдельный новый класс инфекционных агентов, представляющих собой аномальную изоформу нормального прионного белка PrP. Нормальный прионный белок – это гликопротеид, локализованный на клеточной поверхности и имеющий гликозилфосфатидилинозитольный «якорь» [16]. Физиологическая роль нормального клеточного белка остается невыясненной. Он синтезируется во многих органах и тканях человека и животных, однако наибольшее его количество выявляют в центральной нервной системе, где он локализован, как рецептор, на внешней клеточной мембране. Полагают, что белок PrP необходим для обеспечения работы синапсов. Имеются сообщения об его энзиматической активности, аналогичной ферменту супероксиддисмутазе, защищающей клетки от действия свободных радикалов. У мышей, лишенных гена прионного белка, нарушаются электрофизиология клеточной проводимости, циркадные (околосуточные) ритмы и сон, утрачиваются нейроны Пуркиньи [17]. Полагают, что летальная семейная бессонница у человека обусловлена нарушением нормальной функции прионного белка.

Большинство экспериментальных данных свидетельствует о том, что формирование патогенного

белка PrP<sup>Sc</sup> происходит из-за конформационного перехода нормального клеточного белка в изоформу с уменьшением  $\alpha$ -спиралей молекулы с 42 до 21 % (рис. 1) [2, 5, 6]. Содержание  $\beta$ -складчатых структур в этой аномальной форме патогенного приона увеличивается с 3 до 54 % [12]. В бесклеточной системе продемонстрировано появление устойчивости к протеолизу изоформы прионового белка [11, 13], однако *in vitro* никому еще не удалось получить инфекционную форму PrP<sup>Sc</sup> из нормального клеточного или рекомбинантного белка. Предполагается, что конформационный переход нормального белка в патогенную форму обеспечивают неизвестные до сих пор кофакторы, или помощники, аналогичные молекулярным шаперонам [8]. Полагают, что вновь образованная патогенная форма молекулы посредством неизвестного механизма, используя молекулы – посредники клетки хозяина, преобразует все большее количество нативных клеточных молекул PrP в аномальную форму, что аналогично цепной реакции расщепления атомного ядра. Накопление практически нерастворимой формы белка в клетках нейронов вызывает их вакуолизацию с последующей однозначной гибелью клеток.

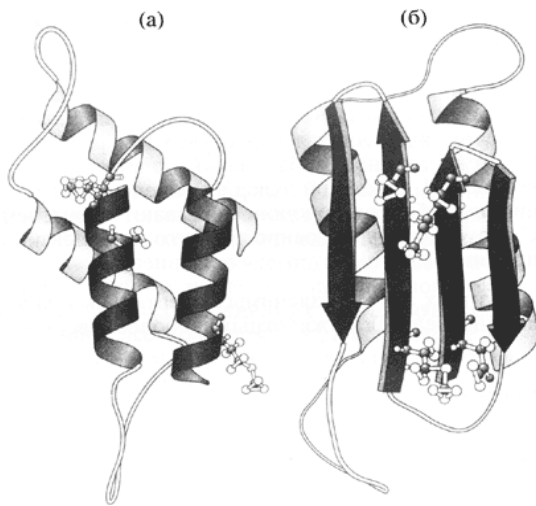


Рис. 1. Предполагаемое изменение укладки полипептидной цепи при превращении нормального прионного белка (а) в патогенную форму (б). Завитками показаны  $\alpha$ -спирали, а стрелами – компоненты складчатого листка

Первоначально прионы были открыты как инфекционные агенты нового типа. Сейчас уже нет сомнений в том, что они представляют собой феномен общебиологического значения и, скорее всего, являются носителями биологической информации нового типа, информации, хранимой в конформации белка [4].

Прионные заболевания могут быть наследственными (примерно 15 % случаев), приобретенными (< 1 % случаев) и спорадическими (85 % случаев), но независимо от этиологии заболевания оно может быть передано инфекционным путем. Заражение прионами человека и животных обычно происходит при употреблении в пищу мяса и особенно мозга больного или ятрогенным путем, то есть через недостаточно стерилизованные нейрохирургические инструменты (табл. 1).

Таблица 1

Ятрогенные случаи болезни Крейтцфельда–Якоба

Источник заражения	Число случаев
Гормон роста (соматотропин)	94
Гонадотропный гормон	4
Твердая мозговая оболочка	69
Роговица	3
Нейрохирургический инструментарий	4
Электроды для стереоэлектрэнцефалографии	2

Все случаи ятрогенного заражения людей (а это, как правило, люди молодого возраста) основаны на передаче здоровым тканевых материалов (пересадка твердой мозговой оболочки, роговицы, использование тканевых экстрактов при гормонотерапии) или собственно инфекционного агента (сохранившегося в результате недостаточной стерилизации инструментария) от людей, находившихся в инкубационном периоде болезни Крейтцфельда – Якоба [1, 7].

Тысячи плановых операций были отменены в Великобритании из-за опасения заразить пациентов «коровым бешенством». Врачи отказывались от любых манипуляций, пока не поступят обещанные правительством одноразовые хирургические инструменты. Особенно рискованными считаются операции, затрагивающие головной и спинной мозг, миндалины, аппендикс, селезенку и лимфатические узлы. На сегодняшний день в Великобритании подобные операции проводят только одноразовыми инструментами. В России таких правил не существует.

К великому сожалению, на сегодняшний день не существует ни одного специального исследования, с помощью которого можно диагностировать эту болезнь в инкубационном периоде. Заподозрить ее позволяет энцефалограмма: на ней резко снижается волновая активность и появляются характерные 2–3-волновые спайки. Возможно также обнаружить характерные аномалии при специальном исследовании мозга с применением ядерного магнитного резонанса (ЯМР) томографии. Но все эти данные позволяют лишь предположить, что в организме затаилась болезнь Крейтцфельда – Якоба (СJD). Стопроцентную же диагностику можно произвести только посмертно.

Что же становится причиной возникновения данного заболевания у коров, а затем и у людей? Однозначного ответа нет до сих пор. Самым убедительным предположением является то, что фермеры используют продукты повторного цикла (переработанных туш коров, овец) в качестве прикорма для своих животных. Последняя эпидемия разразилась как раз в период изменения технологии производства костной муки. Предприниматели вместо жесткой температурной обработки ввели обработку растворителями с целью повышения питательной ценности получаемого прикорма [3]. Другой причиной может быть усиленная механическая переработка туш. В

результате такой компрессии может происходить изменение структуры мясных волокон и молекулярной конфигурации прионов.

5 декабря 2000 г. Совет министров сельского хозяйства Европейского союза (ЕС) запретил использование мяса и костной муки в корме для скота. Запрет начал действовать с 1 января 2001 г. Кроме того, также запрещена продажа мяса животных старше 2,5 лет. Стоимость указанных мер оценивается в 1,7 млрд долларов, 70 % из этой суммы выделяется Комиссия ЕС. По правилам, мозг забитых животных исследуется на мясокомбинате и, если патогенных прионов не обнаружено, фирме-поставщику выдается сертификат, разрешающий экспорт мяса и его переработку.

В связи с этим необходимо проводить полномасштабные исследования на определение возбудителя губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE), т.е. патогенной формы прионов в животном материале, который в дальнейшем поступает на производство.

Производители должны оценить заболеваемость BSE (включая тенденцию, используя по меньшей мере данные последних восьми лет), а также учесть опубликованные экспертные оценки, касающиеся риска BSE, связанного с определенными странами. Например, Европейский союз опубликовал документы по географическому риску BSE (GBR) для ряда стран (доступно на сайте Научного совета по планированию комитета при Правительстве Евросоюза: [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html)). Дополнительные документы по географическому риску BSE доступны на сайте Европейского управления безопасности пищевых продуктов ([http://www.efsa.eu.int/science/tse\\_assessments/gbr\\_assessments/catindex\\_en.html](http://www.efsa.eu.int/science/tse_assessments/gbr_assessments/catindex_en.html)). Департамент сельского хозяйства США опубликовал список разрешенных и несанкционированных стран-источников (опубликован Службой инспекции состояния животных и растений, <http://www.aphis.usda.gov/vs/ncie/country.html#BSE>). Министерство здоровья, труда и благосостояния Японии также опубликовало список разрешенных и несанкционированных стран-источников [15].

Производитель должен учитывать классификацию факторов опасности, связанных с различными типами исходной ткани, которая была установлена и утверждена Всемирной организацией здравоохранения в 2006 году (табл. 2) [19].

Таблица 2

Инфективность различных тканей крупного рогатого скота

Категория А	Категория Б	Категория В
Ткани с высокой инфективностью или PrPSc: мозг сетчатка глаза зрительный нерв твердая мозговая оболочка	Ткани с более низкой инфективностью или PrPSc: печень почки язык кровь сердце желудок (сычуг)	Ткани без обнаруженной инфективности или PrPSc: кожа жировая ткань молоко

По возможности, соответственно местным обычаям и практикам, источники животной ткани должны подвергаться контролю и индивидуальной инспекции ветеринаром, а туша животного должна быть сертифицирована как годная для потребления человеком.

Была проведена оценка риска для лактозы и других производных молочной сыворотки, полученных с использованием сычужного фермента теленка, и сделано заключение, что риск BSE незначителен, если сычужный фермент теленка выработан в соответствии с процессом, описанным в отчете оценки риска Комитета по запатентованным лекарственным препаратам (CPMP) [9]. С учетом национального законодательства производные молока, выработанные согласно условиям, приведенным ниже, считаются представляющими приемлемый риск BSE:

- молоко получено от здоровых животных при тех же условиях, что и молоко, получаемое для потребления человеком;

- никакие другие материалы, полученные от жвачных, за исключением сычужного фермента теленка, не использовались в приготовлении таких производных (например, перевары казеина панкреатическими ферментами).

Доказательство, что инфективность не присутствует в молоке, включает пространственно-временные эпидемиологические наблюдения, не обнаруживающие материнскую передачу, клинические наблюдения более чем ста телят, вскормленных инфицированными коровами и не развивших BSE, и опытные наблюдения, что молоко от инфицированных коров не передавало заболевание при внутрицеребральном или пероральном введении мышам. Также PrPSc не был обнаружен в молоке от скота, инкубирующего BSE после опытной пероральной проверки иммунитета.

Сейчас по стандартам ЕС животные материалы, которые используются в медицине, пищевой промышленности, ветеринарии, должны проверяться на присутствие патогенной формы прионного белка.

В связи с тем что Россия и Евросоюз проводят переговоры о вступлении России в ВТО (Всемирная торговая организация), происходит гармонизация нормативной базы относительно эксплуатации продуктов переработки крупного рогатого скота. Уже есть проекты ГОСТов, например «Медицинские изделия, использующие ткани и их производные животного происхождения»; этот ГОСТ аналогичен Директиве комиссии 2003/32/ЕС от 23 апреля 2003 г., вводящей дополнительные условия к требованиям, установленным в Директиве Совета 93/42/ЕЕС в отношении лекарственных препаратов, изготовленных с использованием тканей животного происхождения. Следующий шаг – гармонизация регламента № 999/2001, он устанавливает правила по контролю трансмиссивных губчатых энцефалопатий (BSE) у животных. В соответствии со ст. 1 этого регламента он распространяется на использование продуктов животного происхождения в пищу и перерабатывающую промышленность.

Таким образом, наравне с контролем заболеваемости на первое место по значению выходят чувст-

вительные и быстрые методы диагностики BSE у животных, позволяющие осуществлять мониторинг эпизоотической ситуации среди популяции людей, крупного рогатого скота и парнокопытных дикой природы. В некоторых странах обязательным мероприятием, утвержденным Европейским союзом в январе 2001 г., является поголовное тестирование на BSE забиваемых животных старше 30 месяцев, а также отделение мяса, поступающего в продажу, от костей и ряд других мер, препятствующих проникновению прионных агентов в пищевые цепи людей и животных. Очевидно, что только развитие быстрых методов диагностики указанных возбудителей может отвечать поставленным задачам.

За последние 20 лет был разработан ряд методик для диагностики BSE, и все они, за редким исключением, рассчитаны на постмортальное исследование мозга.

Основными методами диагностики данной патологии остаются различные варианты иммунологического анализа, а именно: иммуногистохимическое (ИГХ) выявление аномальной формы приона на срезах тканей мозга, вестерн-блоттинг и иммуноферментный анализ (ИФА) [12]. Во всех методиках в качестве объекта исследования используются ткани мозга животных [10].

Наибольшее распространение, в том числе и в России, получила система TeSeE™ (набор реагентов для очистки и определение методом ИФА *in vitro* патогенной формы прионного белка). Данная система в рамках Европейского союза утверждена в качестве экспресс-теста на губчатые энцефалопатии и скрепи крупного рогатого скота, овец и коз, она создана в со-

ответствии с Приложением III к Правилам (ЕС) № 999/2001 (BioRad). Однако реализация данной методики очень продолжительна по времени и велика по цене. В процессе переработки животного сырья возможна перекрестная контаминация, то есть заражение патогенной формой прионного белка при непосредственном контакте с неинфицированным материалом.

### Результаты и их обсуждение

В связи с этим необходима разработка принципиально нового высокочувствительного метода идентификации патогенной формы прионного белка, позволяющего значительно расширить количество объектов исследования и их характер. И это возможно, если в основе создания тест-системы будет метод полимеразной цепной реакции; увеличение продуктов амплификации до концентрации, необходимой для идентификации патогенной формы прионного белка, позволит расширить наименования образцов, пригодных для исследования. Механизм развития прионных заболеваний (губчатой энцефалопатии) объясняют превращением нормального клеточного белка PrP в патогенный при контакте с изоформой PrP<sup>Sc</sup>. С помощью ПЦР-тест-системы, когда анализируется конкретный образец (или продукт), исключается возможность неточности в результатах за счет перекрестной контаминации в процессе перевозки и хранения рядом с образцом, содержащим патогенную форму прионного белка. Безусловно, разработка подобной ПЦР-тест-системы требует тщательной проработки, в настоящее время проводятся работы по филогенетическому анализу с использованием международной базы данных.

### Список литературы

1. Зуев, В.А. Медленные вирусные инфекции человека и животных / В.А. Зуев. – М., 1988.
2. Bolton, D.C. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion / D.C. Bolton, M.P. McKinley, S.B. Prusiner // *Science*. – 1982. – V. 218. – P. 1309–1311.
3. Bradley, R. Prion Diseases / R. Bradley, J. Collinge, M.S. Palmer // eds. Oxford, 1997; 89–129.
4. Carrell, R.W. Conformational disease / R.W. Carrell, D.A. Lomas // *Lancet*, 1997; 350: 134–138.
5. Caughey, B.W. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy / B.W. Caughey, A. Dong, K.S. Bhat et al. // *Biochemistry*. – 1991. – V. 30. – P. 7672–7680.
6. Caughey, B.W. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive / B.W. Caughey, G.J. Raymond // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – P. 18217–18223.
7. Collinge, J. Prion Diseases / J. Collinge, M. Palmer // eds. Oxford, 1997; 18–55.
8. Edenhofer, F. Prion protein PrP<sup>c</sup> interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family / F. Edenhofer, R. Rieger, M. Famulok et al. // *J. Virol.* – 1996. – V. 70. – № 7. – P. 4724–4728.
9. EMEA/410/01 Rev. 2 – October 2003, Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products adopted by the Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) and by the Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) – Official Journal of the European Union 28.1.2004.
10. Houston, F. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep / F. Houston, J.D. Foster, A. Chong et al. // *Lancet*. – 2000. – V. 356. – P. 999–1000.
11. Kocisko, D.A. Cell-free formation of protease-resistant prion protein / D.A. Kocisko, J.H. Come, S.A. Priola et al. // *Nature*. – 1994. – V. 370. – P. 471–474.
12. Prusiner, S.B. Prions / S.B. Prusiner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – V. 95. – P. 13363–13383.
13. Raymond, G.J. Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans / G.J. Raymond et al. // *Nature*. – 1997. – V. 388. – P. 285–288.
14. Report of a WHO Consultation on Medicinal and other Products in Relation to Human and Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies. Geneva, Switzerland, 24–26 March, 1997.
15. Supplement 1, Japanese Pharmacopoeia XIV, 17. Basic Requirements for Viral safety of Biotechnological/Biological Products listed in Japanese Pharmacopoeia, pp. 1618–1631, 2003.
16. Vilette, D. Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein / D. Vilette, O. Andreoletti, F. Archer et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001.
17. Weissmann, C. PrP effects clarified / C. Weissmann // *Curr. Biol.* – 1996. – V. 6. – P. 1359.

18. Wilesmith, J. An epidemiologist's view of bovine spongiform encephalopathy / J. Wilesmith // Philos Trans. R. Soc. of London, 1994; 343: 357–361.

19. WHO Guidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies 2006 (<http://www.who.int/bloodproducts/cs/TSEPUBLISHEDREPORT.pdf>).

ООО «Биотек»,  
650000, Россия, г. Кемерово, ул. Станционная, 2.  
Тел./факс: (3842) 39-61-84  
e-mail: biotek-kemerovo@rambler.ru

## **SUMMARY**

**Yu.V. Mudrikova, S.A. Tustugasheva**

### **Cattle prion diseases**

The article deals with the mechanisms of the pathogenic prion protein action that is an infection agent. The authors consider different ways of transferring pathogenic forms of prion through the use of animal raw materials for food and medical purposes. The necessity to develop a highly reproducible method of pathogenic prion protein detection in different samples of animal raw materials has been proved.

Prion protein, pathogenicity, spongiform encephalopathy.

ООО «Biotech»  
2, Street Stancionnay, Kemerovo, 650000, Russia  
Phone/Fax: (3842) 39-61-84  
e-mail: biotek-kemerovo@rambler.ru

