

*Капитулец С. П.*

*Белорусский государственный медицинский университет,  
г. Минск*

*Капитулец Н. Н.*

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,  
г. Минск, Беларусь*

*Адамович Т. Г.*

*Белорусский государственный медицинский университет,  
г. Минск*

## **СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ ПРОТЕАЗОУСТОЙЧИВОГО КОМПОНЕНТА ПРИОННОГО БЕЛКА PrP<sup>27-30</sup> ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ ИНФЕКЦИОННОЙ И НЕИНФЕКЦИОННОЙ ПРИРОДЫ**

Нейродегенеративные заболевания (синоним — «конформационные» болезни) являются группой расстройств, сгруппированных вместе на основании общей четкой патогенетической картины, заключающейся в церебральных заболеваниях или других повреждениях, приводящих к церебральной дисфункции (когнитивные нарушения, деменции, неврологическая симптоматика и др.), неизбежно заканчивающихся фатальным исходом. Они ассоциированы с системным или локальным отложением в тканях мозга соответствующих нозоформе амилоидных белковых агрегатов. Все известные амилоидозы вызваны нарушением процессов формирования пространственной структуры определенных специфических белков, кодируемых геномом клетки (сейчас их известно 16). Конформационно-измененные белки, состоящие из растворимых в норме клеточных белков, объединяясь, образуют в итоге нерастворимые нейрофибриллярные клубки и амилоидные бляшки во вне- и внутри нервных клеток [1]. Как правило, это вызывает дезинтеграцию и коллапс транспортной системы нейронов [2], приводя сначала к нарушению биохимической передачи сигналов между клетками, а затем к дегенерации и гибели самих клеток [3].

В большинстве случаев расстройства, отнесенные к «инфекционным» амилоидозам [4], по крайней мере теоретически, могут начаться в любом возрасте, кроме, по-видимому, раннего детства. Практически большинство из этих расстройств, как правило, начинаются во взрослом или позднем возрасте. Обычно заболевания имеют постепенное начало и медленно, но неуклонно развиваются в течение нескольких лет. Клинические признаки обычно сопровождаются повреждением мозга, быстро прогрессирующей деменцией в течение месяцев или 1–3 лет с обширной неврологической симптоматикой, обусловленной специфическими патологоанатомическими изменениями, которые предположительно могут вызываться генетическими, спорадическими и инфекционными факторами [5].

Патологическая форма прион-протеина PrP<sup>d</sup> (англ. disease — болезнь) является единственным известным до настоящего времени компонентом инфекционного агента, который вызывает у человека ряд так называемых церебральных «инфекци-

онных» амилоидозов: болезнь Крейтцфельдта–Якоба, «новый вариант» БКЯ, фатальную семейную бессонницу, синдром Герстмана–Штраусслера–Шейнкера и амиотрофический лейкоспонгиоз. Доказано, что PrP<sup>d</sup> образуется при посттрансляционной модификации (конверсии) нормальной клеточной формы прионного белка PrP<sup>C</sup> (англ. cell — клетка), в норме кодируемого геномом человека, и характеризуется повышенной устойчивостью к «жестким» физико-химическим обработкам, инактивирующим все известные патогены, аномальной протеазоустойчивостью, термостабильностью, склонностью к полимеризации, инфекционностью и трансмиссильностью с образованием в головном мозге внутри- и внеклеточных амилоидных агрегатов. Появление в биологических тканях даже низких концентраций прион-протеина является центральным событием в патогенезе прионных болезней, их детекция позволяет диагностировать заболевание на ранних сроках инфекции [5]. Получены убедительные доказательства, что при большинстве «инфекционных» амилоидозов прион-протеин накапливается в лимфоретикулярной системе задолго до того, как может быть обнаружен в ЦНС. Имеется значительное количество данных о том, что Т- и В-лимфоциты, фолликулярные и плазмцитоподобные дендритные клетки, натуральные (естественные) киллеры и некоторые другие клетки иммунной системы играют определяющую роль в колонизации лимфоидных органов прионами [6].

В мире прионные заболевания отмечаются повсеместно. Ежегодно в США, Великобритании, Японии, Франции, Израиле и некоторых других странах, где эпидемиологический надзор за прионными инфекциями проводится в рамках национальных программ, диагностируется до тысячи новых случаев заболеваний (с частотой 1–5 случаев на 1 миллион населения). Напротив, выявляемость больных прионными инфекциями в республике пока находится на весьма низком уровне. Речь идет лишь о случайных находках. Не исключено, что такие больные существуют и до сих пор проходят под другими диагнозами: болезнь Альцгеймера, дисциркуляторная энцефалопатия II–III степени, мультисистемная атрофия, высокая форма бокового амиотрофического склероза, множественный склероз и др. Прижизненная диагностика прионных болезней до настоящего времени не разработана, постановка клинического диагноза заболевания чрезвычайно сложна, а его верификация проводится только на аутопсийном материале с помощью лабораторных методов верификации (гистохимия, иммунный блоттинг, электронная микроскопия и др.) посмертно. Серологических методов для диагностики заболевания не существует, поскольку при развитии прионной инфекции в организме не происходит воспалительных реакций и антиприонные антитела к PrP<sup>Sc</sup> не вырабатываются.

**Целью** работы было повысить точность обнаружения аномальной протеазоустойчивой формы прионного белка PrP<sup>27-30</sup> (коррелят инфекционности) и разработать способ дифференциации дегенеративных поражений мозга неустановленной этиологии.

**Материалы и методы.** В работе применили метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), чувствительность которого значительно превышает таковую всех рутинных лабораторных тестов. Получение микроконструированных пленок на по-

верхности кремния осуществляли сотрудники Института новых технологий НАН Беларуси (к.х.н. Жавнерко Г. К., Парибок И. В.). АСМ-анализ проводили с помощью микроскопа Nanoscope IIIa (Veeco, США), оборудованного «D-сканером» в контактном режиме. Были использованы контактные 100- и 200-мкм кантилеверы «Nanoprobe» из  $\text{Si}_3\text{N}_4$  с константой упругости 0,12 и 0,36 N/m [7].

В качестве клинического материала использовали лимфоциты периферической крови (ЛПК), спинномозговую жидкость (СМЖ) и аутопсии мозга (АМ) от пациентов, находящихся на стационарном лечении и умерших в РНПЦ психического здоровья, представленные д.м.н., проф. Т. В. Докукиной, д.м.н., проф. М. К. Недзьведем и к.м.н. М. В. Махровым, с клиническими диагнозами раздела F0 согласно Международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ-10): болезнь Альцгеймера (18), болезнь Крейтцфельдта-Якоба (3), амиотрофический лейкоспонгиоз (2), сосудистая деменция (12), органический амнестический синдром (5), органическое шизофреноподобное расстройство (3), шизофрения параноидная (2); диссоциативная амнезия (3); смешанное тревожное и депрессивное расстройство (2), конверсионное расстройство моторики (3), аутизм (4). В качестве положительного контроля использовали ЛПК и АМ от 4 сирийских золотистых хомяков с экспериментальной инфекцией скрепи, штамм 263 К. Отрицательным контролем служили ЛПК от 3 здоровых доноров, ЛПК и АМ — от 4 интактных животных. Всего исследовано 163 образца.

Иммунологическое взаимодействие PrP27-30 с коммерческими анти-PrP моноклональными антителами (МАТ): 3F4 (Sigma), 6H4 (Prionix), 8G8, 12F10 (Cayman Chemical Company), 8H4 (Abcam Inc.) в рабочих разведениях 1 : 3000–1 : 5000, имеющих высокую специфичность к PrP<sup>d</sup> человека, а также МАТ 6A5, 7F7, 2C8 и 9C12 (пр-во Института вирусологии РАМН, РФ) и их различных комбинациях, осуществляли при 37 °С в течение 15–60 мин. Детекцию образованных иммунокомплексов типа «антиген-антитело» проводили методом АСМ, что позволяло доказать наличие патологического прионного белка в анализируемых аутопсийных и клинических образцах.

**Результаты и обсуждение.** В соответствии с предложенной методологией была отработана технология формирования микроструктурированных пленок на поверхности кремния, которая включает несколько этапов:

1) этап гидрофилизации поверхности кремния путем нагревания в смеси  $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{NH}_4\text{OH}$  с последующей тщательной промывкой и сушкой в токе азота (см. раздел «Материалы и методы»);

2) этап модификации кремневой калибровочной решетки TGZ3 для АСМ (высота «ступенек» —  $540 \pm 2$  нм, шаг — 3 мкм) с использованием 1 % раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА). БСА адсорбируют на поверхность микроштампа, помещая на его поверхность каплю раствора, в течение 15 минут при комнатной температуре с последующим отмыванием и высушиванием в токе азота;

3) этап микроконтактной печати — отпечатывание полос БСА на твердую поверхность гидрофильного кремния наложением на кремний модифицированного БСА штампа в течение 40–60 сек. Полученный образец высушивают при комнатной температуре и сохраняют до использования.

Сформированная микроструктурированная пленка, представленная регулярно чередующимися полосами БСА на поверхности кремния, служит в качестве блока-тора неспецифической адсорбции любых иных белков на этих участках подложки и представляет собой реперные полосы-сравнения необходимые для проведения последующего АСМ-анализа. Контроль иммобилизации БСА на поверхность гидрофильного кремния осуществляют методом АСМ (рис. 1).

Как показано на рис. 1, при АСМ-анализе активированной кремневой подложки полосы БСА, служащие поверхностью сравнения, четко отличаются от немодифицированных участков. Перепад высот полос БСА при микроконтактной печати составлял в зависимости от серии приготовленных образцов от 1,6 нм до 3,9 нм (в среднем 3,1 нм). Полосы БСА блокировали неспецифическую адсорбцию на модифицированной поверхности кремния. Их наличие обеспечивало дальнейшую эффективную иммобилизацию белков из анализируемого образца в промежутки между полосами БСА.

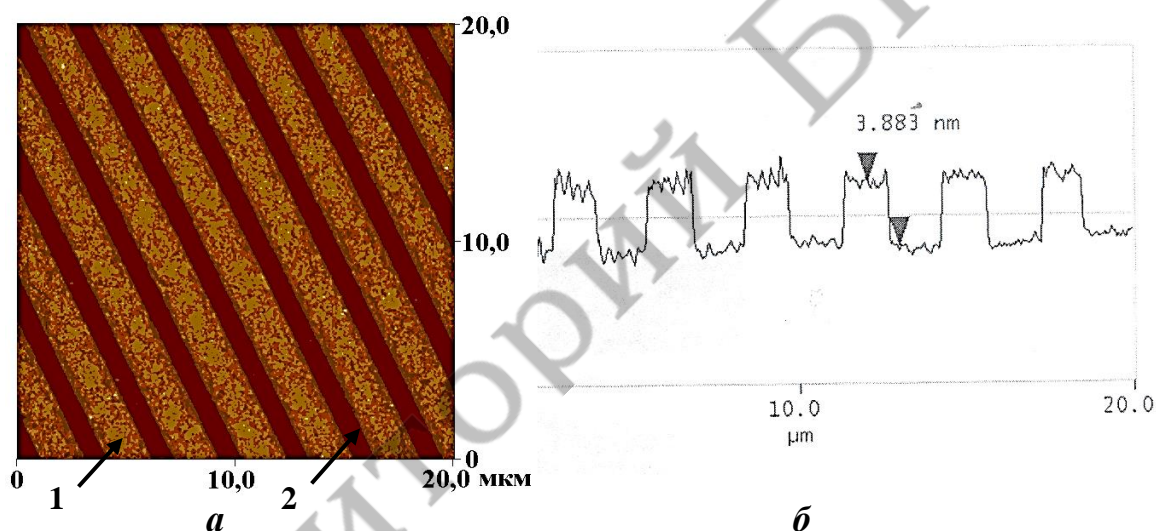


Рис. 1. Образец кремневой подложки с микроконтактной печатью:

1 — полосы бычьего сывороточного альбумина; 2 — активированная поверхность кремния;  
а — АСМ в контактном режиме; б — графический микропрофиль поверхности

Нами разработан алгоритм выявления протеазоустойчивого компонента PrP<sup>27-30</sup> прионного белка методом АСМ на локально активированной поверхности кремния и оценки результатов проводимых анализов [8].

Согласно разработанной технологии иммобилизацию PrP<sup>d</sup> из образца осуществляют в промежутки между полосами БСА с последующим ферментативным перевариванием всех протеазочувствительных белков, представленных на кремниевой подложке (рис. 2). При этом протеолитическая обработка PrP<sup>d</sup> удаляет только N-концевую область белка с образованием протеазоустойчивого компонента 27–30 кДа, а поверхность кремния остается практически ровной, без четко наблюдаемых перепадов высот (не более  $\leq 2$  нм).

После нанесения на кремневые подложки специфических анти-PrP МАТ и инкубации в условиях влажной камеры в течение 30 мин при 37 °С в положительных образцах, содержащих PrP<sup>27-30</sup>, на АСМ-изображениях отмечается

повышение уровня высот полос образовавшихся иммунокомплексов «PrP27-30+анти-PrP МАТ» над полосами деградированного БСА на 8,6–38,7 нм (среднем  $11 \pm 5$  нм). Перепады высот иммунокомплексов на подложках варьируют вследствие особенностей анализируемых образцов, из которых ведущими являются биохимические свойства прионных белков, их концентрация в образце и пространственная локализация на подложке. Иммунизации PrP 27-30 и анти-PrP МАТ на полосы БСА не отмечено. В отрицательных случаях поверхности кремневых подложек всегда остаются гладкими.

Предложенный подход был использован для проведения скрининговых исследований по дифференциации «инфекционных амилоидозов» (прионные болезни) среди пациентов с прогрессирующей дегенеративной патологией головного мозга и другой неврологической симптоматикой. В аутопсийном материале и лимфоцитах периферической крови (ЛПК) 57 пациентов с деменциями различного генеза, согласно МКБ-10, выявлен положительный результат у 3 пациентов из 3 обследованных с клиническим диагнозом болезнь Крейтцфельдта–Якоба (F02), 2 из 2 пациентов с амиотрофическим лейкоспонгиозом, 4 из 18 с диагнозом болезнь Альцгеймера (F00), 2 из 5 с диагнозом органический амнестический синдром (F04) и 1 из 3 с конверсионным расстройством моторики (F44.4). В остальных случаях (см. раздел «Материалы и методы») у обследованных пациентов с диагнозами сосудистая деменция (F01) и другими психическими расстройствами вследствие повреждения или дисфункции головного мозга (F06, F2, F41) получены отрицательные результаты.

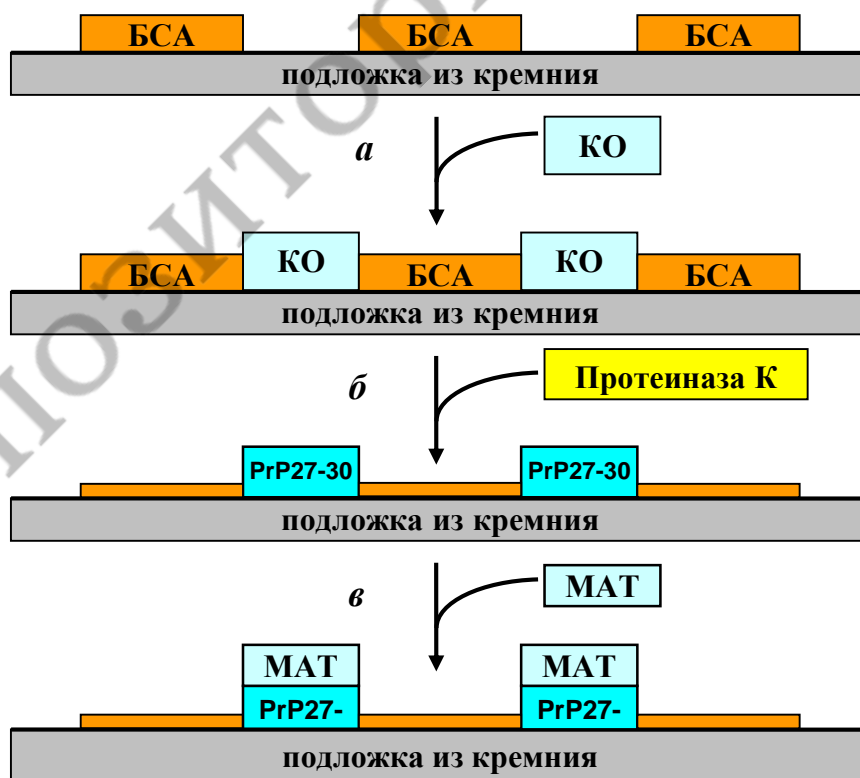


Рис. 2. Алгоритм прижизненного выявления протеазоустойчивого компонента прионного белка PrP27-30:

*a* — иммобилизация анализируемой пробы, содержащей PrP<sup>d</sup>; *b* — ферментативная обработка протеиназой К; *c* — иммунологическое взаимодействие типа «антиген-антитело»; БСА — бычий сывороточный альбумин, КО — клинический образец, содержащий PrP<sup>d</sup>, МАТ — анти-PrP моноклональное антитело

### **Выводы:**

1. По результатам исследования разработан и апробирован новый способ дифференциации дегенеративных поражений мозга неустановленной этиологии на основе детекции протеазоустойчивого компонента прионного белка PrP<sup>27-30</sup> в аутопсийном и клиническом материале методом атомно-силовой микроскопии.

2. Способ позволяет эффективно выявлять PrP<sup>27-30</sup> на микронных участках поверхности кремния во фракциях мембран компонентов венозной крови у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями неясного генеза.

3. Способ перспективен как для совершенствования постмортальной и прижизненной диагностики прионных инфекций у пациентов с органическими, включая симптоматические, психическими расстройствами, обеспечивает дифференциацию клинко-нозологических форм деменций различного генеза согласно критериям МКБ-10, позволяет решить вопрос о госпитализации пациента в соответствующее учреждение здравоохранения, а полученные результаты служат основанием для внесения изменений в тактику ведения и лечения конкретного пациента.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. *Goedert, M.* Tau proteins and neurofibrillary degeneration / M. Goedert, M. G. Spillantini, R. A. Crowther // *Brain. Pathol.* 1991. Vol. 1, N 4. P. 279–286.

2. *Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies* / K. Iqbal [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1739, N 2–3. P. 198–210.

3. *The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death* / W. Chun, G. V. Johnson // *Front. Biosci.* 2007. Vol. 12. P. 733–756.

4. *Gajdusek, D. C.* Transmissible and non-transmissible amyloidosis : Autocatalytic post-translational conversion of host precursor proteins to  $\beta$ -pleated configurations / D. C. Gajdusek // *J. Neuroimmunol.* 1988. Vol. 20. P. 95–110.

5. *Prusiner, S. B.* Human prion diseases and neurodegeneration : prions Berlin / S. B. Prusiner. Heidelberg, 1998. P. 1–17.

6. *Wathne, G. J.* The diverse roles of mononuclear phagocytes in prion disease pathogenesis / G. J. Wathne, N. A. Mabbott // *Prion.* 2012. Vol. 6, N 2. P. 1–10.

7. *Нанотехнологические подходы к визуализации и идентификации амилоидных белковых агрегатов при конформационных болезнях человека* / С. П. Капитулец [и др.] // *Здравоохранение.* 2011. N 10. С. 4–9.

8. *Способ прижизненного обнаружения компонента PrP<sup>27-30</sup> патогенной формы прионного белка при церебральных амилоидозах* : пат. a20121529 Респ. Беларусь, МПК7 G 01 N 33/543, G 01 N 33/577 / С. П. Капитулец, [и др.] ; заявитель РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Заявл. 02.11.2012.