

СЕКЦИЯ 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЭПИЗООТОЛОГИИ, ДИАГНОСТИКИ, ТЕРАПИИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ У ЖИВОТНЫХ

ПРИОННЫЕ β -АМИЛОИДЫ: НАНОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЗГА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ИНФИЦИРОВАННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕМ СКРЕПИ ЖИВОТНЫХ

¹АСТАШОНОК А.Н., ²КРАСОЧКО П.А., ¹ПОЛЕЩУК Н.Н.

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
г. Минск, Республика Беларусь

²УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

*Воспроизведена на лабораторных животных (золотистые сирийские хомяки) трансмиссивная губкообразная энцефалопатия, вызываемая возбудителем болезни Скрепи (штамм 263К, титр – $7,8 \log LD_{50}/0,03 \text{мл}$). Охарактеризована динамика развития заболевания и описаны отличительные особенности ее течения. Из образцов ткани мозга выделены β -амилоиды в виде β -амилоидных полиморфных структур («прионные палочки», глобулы, «спиралеподобные фибриллы»). С использованием атомно-силовой микроскопии проведен наноструктурный анализ, позволивший охарактеризовать параметры наногейометрии «прионных палочек» и амилоидных фибрилл. Показано наличие полиморфизма в рельефе поверхности высокомолекулярных прионных структур с преобладанием более сглаженных участков, что свидетельствует о гетерогенности в укладке белковых доменов (кластеров) в составе конформационно-измененных структур прионного белка. **Ключевые слова:** β -амилоиды, идентификация, мышевидные грызуны, атомно-силовая микроскопия, прионы.*

PRION β -AMYLOIDS: NANOSCOPIC ANALYSIS OF PATHOLOGICAL PROTEINS, ISOLATED FROM THE ANIMALS BRAIN, EXPERIMENTALLY INFECTED WITH SCRAPI AGENT

¹ASTASHONOK A.N., ²KRASOCHKO P.A., ¹POLESHCHUK N.N.

¹The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

²Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Belarus

*Neurodegenerative disorder, caused by scrapie agent with accumulation of prion infectivity titers ($7,8 \log LD_{50}/0.03 \text{ml}$), in laboratory model (Syrian or golden hamsters), were reproduced. The disease dynamics was characterized and the distinctive features of their clinical course were described. The β -amyloids in the form of PrP_d polymorphic nanosized structures («prion rods», globules, amyloid-like fibrils) from the brain tissues were isolated. Using atomic force microscopy (AFM) the nanostructural analysis was carried out, which made it possible to characterize the nanogeometry parameters of «prion rods» and amyloid fibrils. The presence of polymorphism in the surface relief of high molecular weight fibrillar prion structures with a predominance of smoother areas was shown. The obtained results indicates the heterogeneity in the packing of protein domains in the composition of high molecular weight prion structures. **Keywords:** β -amyloids, identification, mice model, atomic-force microscopy, prions.*

Введение. Изучение этиопатогенеза трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (ТГЭ), характеризующихся медленным прогрессирующим развитием, тяжелым поражением мозга и неизменным летальным исходом, проводится на протяжении длительного периода времени. Среди прионных заболеваний животных основной нозоформой, прототипной для ТГЭ является скрепи. Известно, что при скрепи, как и при других формах ТГЭ, морфологические признаки поражения ЦНС, появляются в конце инкубационного периода и в периоде клинических проявлений [1]. Эти поражения сводятся к триаде признаков: гипертрофия и пролиферация астроцитов, спонгиозное состояние ткани мозга и выпадение нейронов [1]. При этом степень выраженности изменений и их локализация варьируют в зависимости от типа модели (природной или экспериментальной), а также от штамма агента. Однако остается не ясным какова конформация и имеются ли различия в наноструктурной организации различных агрегированных форм прионов.

Цель работы. Получить прионную модель на лабораторных животных с использованием возбудителей скрепи, выделить из ткани ЦНС прионные β -амилоиды и дать их наноструктурную характеристику.

Материалы и методы исследований. В работе использовали стандартный штамм возбудителя скрепи (263К) (инфекционный титр – $7,8 \log_{10} \text{Д}_{50}/0,03 \text{ мл}$, депонент № РКПБ-II-2020-410-П).

Для инфицирования возбудителем скрепи 263К использовали золотистых сирийских хомяков ($n=6$, возраст – 2-3 месяца). Животных заражали интрацеребральным способом путем введения $0,03 \text{ мл}$ суспензии мозговой ткани штамма (шаг разведения 10^{-2}). Контрольным животным вводили физиологический раствор. Клинические проявления заболевания определяли по выявлению специфических маркеров скрепи: постоянный тремор головы или туловища, нарушения рефлекса переворачивания и вычесывания шерсти, кахексия, агрессивность. Животных наблюдали в течение 110-115 дней с момента инфицирования до развития терминальной стадии заболевания. Работа с лабораторными животными проводилась в строгом соответствии с Санитарными нормами и правилами [2]. Для получения β -амилоидов использовали метод *Frank O. Bastian, 2005* [3]. Полученные образцы разделяли на отдельные аликвоты и хранили при -20°C до использования. Электронно-микроскопический (ЭМ) анализ выделенных патологических белковых структур проводили на микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при увеличениях $\times 100\,000$ – $200\,000$.

Для атомно-силовой микроскопии (АСМ) использовали тейпинговые микрозонды NSC15/AI BS (константа жесткости – 3 Н/м , резонансная частота – 60 кГц , радиус – $<10 \text{ нм}$). Топографические изображения различных патологических белковых структур получали на микроскопе Nanoscope IIIa MultiMode (Bruker, США), оборудованном J-сканером.

Результаты исследований. Проведенные исследования показали, что первым признаком заболевания являлось появление повышенной возбудимости животных и изменение их внешнего вида. При скрепи у хомяков спустя 85-94 дней (3 месяца с момента инфицирования) чаще всего отмечались изменения в состоянии шерстного покрова и в появлении произвольных движений тела (тремор головы или туловища). На терминальной стадии инфекции (110-115 дней) наблюдалось тотальное отсутствие рефлекса переворачивания, что приводило к утрате двигательной активности на фоне развития кахексии. Характерные клинические признаки заболевания проявились у всех инфицированных животных, что, вероятно, с высокой вирулентностью штамма и накоплением высоких титров инфекционного белка в ЦНС.

Наноскопический анализ различных β -амилоидов PrP_{Sc}, выделенных при скрепи. Наиболее многочисленным типом белковых наноразмерных элементов были при ЭМ «прионные палочки» и глобулы. При АСМ палочки представляли собой стержнеподобные структуры длиной (l) – 100 - 200 нм , шириной (d) – $\sim 20 \text{ нм}$ и высотой – 4 - 5 нм . Примечательно, что эти структуры характеризовались неоднородными участками рельефа (R_a – $0,87 \pm 0,05 \text{ нм}$, R_q – $1,12 \pm 0,09 \text{ нм}$, коэффициент асимметрии – $0,84$) с различной перепадом высот между пиками и впадинами – $1,12$ - $8,74 \text{ нм}$. Эти данные указывали о различной степени упорядоченности белковых кластеров в их составе. Вторым типом белковых структур были глобулы. Они характеризовались разрозненными или сцепленными в виде цепочек сферами диаметром 10 - 25 нм . Кроме того, выявлены более композиционно сложные структуры – β -амилоидные фибриллы. Высота этих структур при анализе микропрофилей сечения, проведенных в различных участках поверхности, соответствовала значениям $10 \pm 1,7 \text{ нм}$. Параметр ширины при этом не превышал среднего диапазона 25 - 27 нм .

Одной из наиболее характерных черт прионных инфекций является точность биологического механизма, с которой происходит размножение возбудителей на фоне развития характерных клинических проявлений заболевания. Кинетика репродукции медленно возрастает достигая максимальных значений в терминальной стадии заболевания (до титров 10^6 - 10^7) [4]. Выделенные из мозговой ткани прионные белковые структуры в большинстве случаев при ЭМ анализе имеют глобулярно-палочковидную структуру [4]. Причем имеются широкие вариации в тропности прионов к различным клеточным элементам ЦНС, что служит основанием для отнесения их к различным штаммам. Зависит ли вирулентность (PrP_d), т.е. прионных белков, входящих в состав палочек и глобул от их пространственной ориентации, изучено не в полной мере. Мы использовали АСМ в режиме тейпинга для установления наноархитектоники разнородных инфекционных структур, накапливающихся в ткани ЦНС при экспериментальной скрепи.

Заключение. Характеристика поверхностной наноархитектоники и пространственной ориентации в сравнении с описанными ранее патологическими амилоидами с β -складчатой укладкой белков при БКЯ позволит систематизировать штаммоспецифические свойства возбудителей, а также понять причину различных клинико-патологических фенотипов прионных заболеваний, определяющих степень выраженности и тяжесть течения заболевания.

Литература. 1. Патоморфология головного мозга при прионных болезнях: монография / В. Кармышева [и др.] – Москва: «Медицина», 2003. – 208 с. 2. Ветеринарно-санитарные правила по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках : рег. номер 8/25504: принят 21.05.2010 : вступ. в силу 14.06.2010 / Минск, 2010. – 40 с. 3. Safe method for isolation of prion protein and diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease / F. O Bastian [et al.] // J. Virol. Methods. – 2005. – Vol. 130. – P. 133–139. 4. Асташонок, А.Н. Инфекционные β -амилоиды: характеристика патологических белковых наноструктур, выделенных из ткани головного мозга в эксперименте *in vivo* / А.Н. Асташонок, Н.Н. Полещук // Новости медико-биологических наук. – 2021. – Т. 21, № 4. – С. 173–179. 5. Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: вирусные заболевания : монография / А. А. Шевченко [и др.] ; Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – 484 с.

ПРЕИМУЩЕСТВА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ЭНЗООТИЧЕСКОГО ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

БАБАХИНА Н.В., КАШПАР Л.Н., КОНОТОП Д.С.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

*Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота - хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы, которая протекает бессимптомно или проявляется лимфоцитозом и злокачественными новообразованиями в кроветворных и других органах и тканях. Болезнь широко распространено во многих странах мира. Методы прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота имеют решающее значение как для выяснения степени его распространенности, так и для проведения противолейкозных мероприятий. В статье отражена суть современных методов диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота, проведен анализ их эффективности по своевременному выявлению инфицированных животных. **Ключевые слова:** полимеразно-цепная реакция, иммуноферментный анализ, реакция иммунодиффузии, сыворотка крови, энзоотический лейкоз крупного рогатого скота.*

ADVANTAGES OF MOLECULAR GENETIC METHOD FOR DIAGNOSTICS OF ENZOOTIC LEUKEMIA IN CATTLE

BABAKHINA N.V., KASHPAR L.N., KONOTOP D.S.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*Leukemia in cattle is a chronic infectious disease of a tumor nature, which is asymptomatic or manifests itself as lymphocytosis and malignant neoplasms in the hematopoietic and other organs and tissues. The disease is widespread in many countries of the world. Methods for the intravital diagnosis of cattle leukemia are crucial both to determine its prevalence and to conduct anti-leukemia measures. The article reflects the essence of modern methods for the diagnosis of enzootic leukemia in cattle, an analysis of their effectiveness in the timely detection of infected animals. **Keywords:** polymerase chain reaction, ELISE, immunodiffusion reaction, blood serum, bovine enzootic leukemia.*

Введение. Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота - хроническая вирусная инфекционная болезнь, протекающая чаще бессимптомно, с развитием необратимого инфекционного процесса, проявляющегося персистентным лимфоцитозом, злокачественным разрастанием кроветворных и лимфоидных клеток с нарушением их способности к морфологической дифференцировке и физиологическому созреванию, с последующей диффузной инфильтрацией органов этими клетками или образованием опухолей.

ЭЛ КРС регистрируется во многих странах мира. Например, в США, Канаде и Японии инфицированность стад достигает до 80%. Вместе с тем 12 стран Европы успешно проводившие противолейкозные мероприятия признаны свободными от ЭЛ КРС. Высокий уровень инфицированности животных вирусом ЭЛ КРС установлен в отдельных регионах России и других странах СНГ. В отдельных