

УДК 619:616.8-07

С.П.Капитулец, кандидат биологических наук
 Н.Н.Полещук, доктор медицинских наук
 Н.Н.Капитулец, кандидат биологических наук
 П.А.Красочко*, доктор ветеринарных наук, профессор
 С.Л.Кальнов**, кандидат биологических наук
 О.А.Верховский**, доктор биологических наук

АНТИПРИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА БЕРЕСТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СКРЕПИ

ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии» МЗ Республики Беларусь, г.Минск, Республика Беларусь

* РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского НАН Беларуси», г.Минск, Республика Беларусь

** НПО «НАРВАК», г.Москва, Российская Федерация

Статья посвящена изучению эффективности экстракта из коры березы при экспериментальной прионной инфекции у сирийских хомячков, зараженных интрацеребрально скрепи-содержащим гомогенатом мозга, штамм 263K. Нами впервые установлено, что экстракт из коры березы в дозе 100 мкг/г значительно снижает начало развития клинических симптомов скрепи и продлевает продолжительность жизни инфицированных животных. Эти эффекты коррелировали с задержкой появления отклонений в поведении хомячков, патоморфологическими изменениями и накоплением PrP^{Sc} в ЦНС. Полученные данные свидетельствуют, что препарат снижает инфекционность возбудителя через прямое взаимодействие с PrP^{Sc} и, по-видимому, может использоваться для инактивации PrP^{Sc}-контаминированных продуктов и в стратегиях предотвращения заболеваемости

This article is devoted to study effectiveness of dry birch bark extract against experimental prion disease in syrian hamsters, that were injected intracerebrally with 263K scrapie-infected brain homogenate. For the first time it is established, that dry birch bark extract in a doze of 100 mkg/g showed a significant delay in the onset of clinical signs of disease and prolonged survival time. These effects were paralleled by a delay in the appearance of abnormalities in the behaviour, neuropathological changes, and PrP^{Sc} accumulation. Our data suggest that this well characterized preparation reduce prion infectivity through a direct interaction with PrP^{Sc} and are potentially useful for inactivation of scrapie-contaminated products and prevention strategies

Прионные инфекции (синоним трансмиссивные губкообразные энцефалопатии – ТГЭ) являются группой нейродегенеративных заболеваний человека и животных, для которых до настоящего времени не разработаны специфические средства профилактики и лечения. Патогенетический механизм, лежащий в основе этих болезней, как полагают, состоит в конформационном превращении клеточного прионного белка (PrP^C) в ассоциированную с инфекцией специфическую изоформу приона (PrP^{Sc}). Последний в процессе мисфолдинга (неправильного сворачивания белка) приобретает аномальные физико-химические свойства, такие как нерастворимость и протеазоустойчивость [15], и накапливается в мозгу в форме аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл [8]. Показано, что PrP^{Sc} ответственен за дегенерацию нейронов и активацию глии [19] и является критическим для передачи (трансмиссии) заболевания путем преобразования (конверсии) клеточной изоформы PrP^C в патологическую [12, 16]. Соответственно, PrP^{Sc} представляет собой первичную мишень для терапевтических стратегий.

К настоящему времени показана антиприонная активность у ряда веществ в отношении PrP^{Sc} на модельных системах *in vitro* и *in vivo*. Так, продемонстрирована профилактическая эффективность разветвленных полиаминов и красителя Конго красного [10, 17]. Перспективные результаты получены при изучении полиенового антибиотика, обладающего противогрибковой активностью, амфотерицина В и его производных [6]. Установлено, что иммуномодуляторы (преднизолон, арахисовое масло и полианионы) заметно снижали чувствительность мышей к прионной инфекции [7]. Тетрациклины и противораковый антибиотик йоддезоксидоксорибуцин также существенно задерживали развитие скрепи *in vivo* [9, 20]. Наибольшие перспективы связываются с созданием так называемых блокаторов β -спиралей антисмысловыми пептидами [18]. К сожалению, пригодность большинства этих веществ для терапии прионных болезней ограничена, прежде всего из-за их неспособности проникать гематоэнцефалический барьер и/или высокой токсичности.

Целью настоящей работы явилось изучение антиприонной активности экстракта из коры березы на течение скрепи у сирийских хомячков *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Золотистых сирийских хомячков 3 недельного возраста, весом 25-30 г, заражали 10% суспензией, полученной из мозга хомячков с экспериментальным скрепи, штамм 263 К, интрацеребрально, в объеме 0,03 мл на животное (инфекционный титр 4,8 ЛД₅₀/мл), как описано ранее [1]. Хомячкам контрольной группы (10 животных) вводили по 0,03 мл суспензии мозга здоровых хомячков (разведение 10⁻²). Коммерческий препарат «Бересты экстракт сухой (БЭС)» ТУ 9369-004-58059245-03 («Березовый мир», РФ) разводили жидким крахмалом *ex tempore* и суспензию вводили перорально в дозе 100 мкг/г спустя 2-3 часа после кормления. В серии экспериментов изучали токсичность и безвредность БЭС при применении в дозе 50, 100 и 300 мкг/г. Всего в опытах использовали 50 животных. Срок наблюдения 3,5 месяца.

Из зараженных животных были сформированы 3 опытные группы по 10 хомячков в каждой: I-я группа – контроль инфекции; II-й группе вводили БЭС по профилактической схеме: ежедневно 5 дней до заражения и ежедневно по 5 дней через каждые 30 дней после заражения; III-й группе БЭС вводили по лечебной схеме: ежедневно до развития терминальной стадии болезни.

Прижизненные исследования включали контроль за поведением, внешним видом и весом животных. Взвешивание хомячков осуществляли с использованием электронных весов ВЭ-15И (РФ), утром, до кормления, с периодичностью 3-4 дня. У опытных животных регистрировали сроки начала неврологической симптоматики (нарушение двигательных функций и координации, тремор, слабость в конечностях, парезы) и кахексию.

У контрольных (неинфицированных) животных и опытных животных I, II и III групп через 1, 2 и 3 мес после заражения (по 1 животному из каждой группы) под глубоким эфирным наркозом стерильно забирали головной мозг. Образцы нервной ткани из различных отделов мозга (кора полушарий, мозжечок, продолговатый мозг) заключали в парафин и готовили гистологические препараты по общепринятой методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином как описано [4]. Анализ проводили в световом микроскопе «Biostar» (США) при увеличении в 200-600 раз.

Иммунологическое обнаружение PrP^{Sc} в ЦНС проводили иммунным блоттингом с использованием коммерческой тест-системы «Prionics-Check Western» (Prionics AG, Switzerland).

Статическую обработку результатов проводили путем вычисления среднеарифметических величин, их доверительных интервалов и оценки достоверности различий по критерию Стьюдента. Разницу считали статистически достоверной при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В предварительной серии экспериментов было изучено влияние БЭС на рост и развитие сирийских хомячков при различных сроках и дозах введения препарата. Установлено, что БЭС в

концентрациях 50, 100 и 300 мкг/г был безвреден и нетоксичен для хомячков при ежедневном применении в течение 3,5 мес. Животные, получавшие БЭС, по внешнему виду (состояние шерстяного покрова) и поведению (рефлексы, реакция на внешние раздражители) не отличались от хомячков не получавших препарат. В то же время средний показатель прироста их биомассы был существенно выше. Так, ежедневное применение БЭС в дозе 100 мкг/г обеспечило ускоренное развития животных и достоверное увеличение их массы тела, по сравнению с контрольными хомячками (рис. 1).

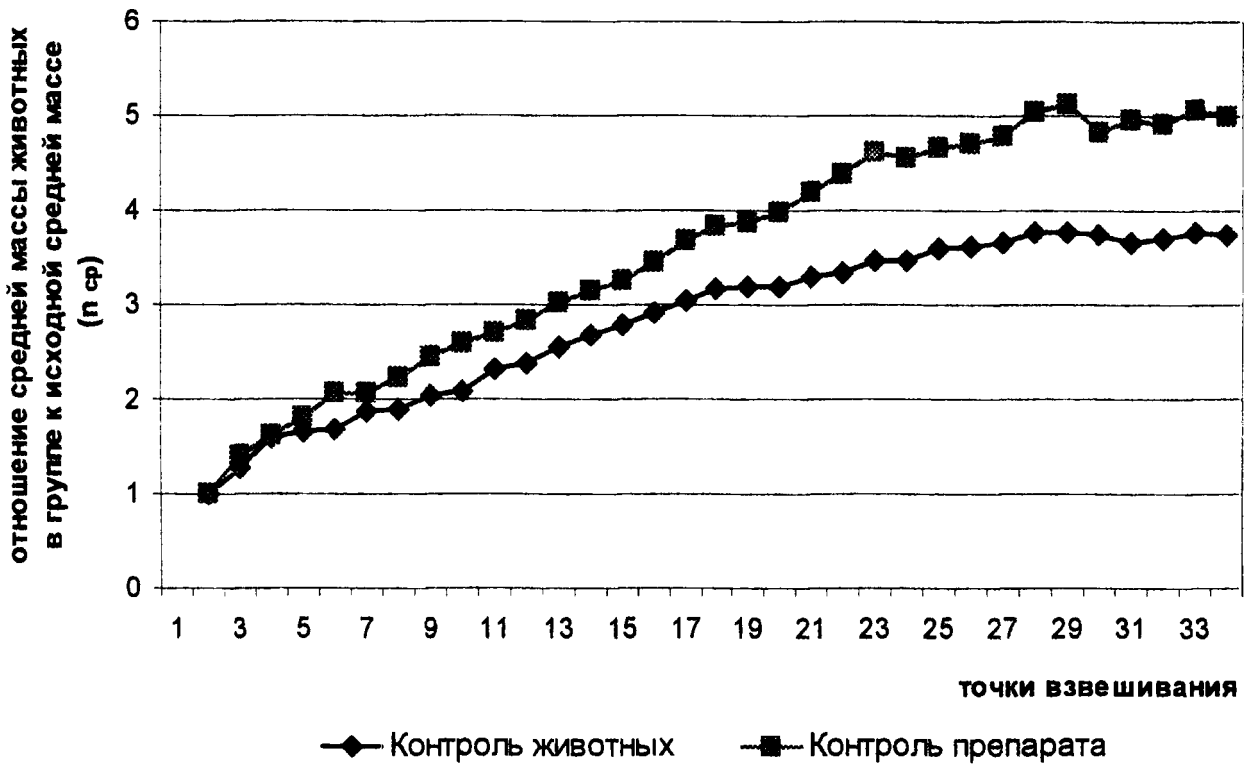


Рисунок 1. Влияние БЭС (100 мкг/г) на рост сирийских хомячков

В дальнейшем БЭС в дозе 100 мкг/г был использован для изучения антиприонной активности при экспериментальном скрепи (рис. 2). Патогенетическая картина развития скрепи *in vivo* на модели сирийских хомячков подробно описана нами ранее [1]. Заболевание характеризовалось строгой стадийностью и закономерностью развития патологического процесса. Начальная стадия болезни (1,8-2,2 месяца после заражения) у животных начиналась взъерошенностью шерстяного покрова, потерей ею блеска и постепенным загрязнением в области анального отверстия. Первым специфическим признаком инфекции было прогрессирующее снижение массы тела при видимом благополучии и отсутствии каких-либо неврологических отклонений и нарушений: в этот период пищевые и поведенческие рефлексы у животных были в норме.

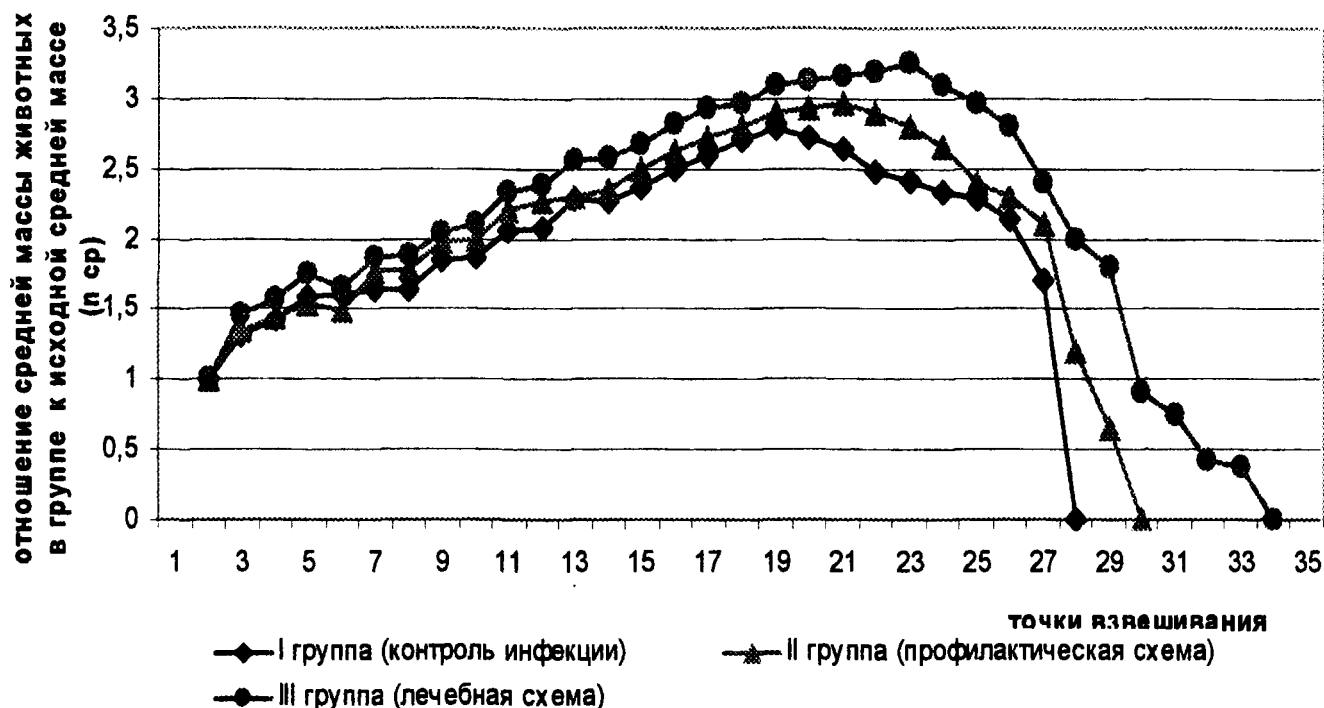


Рисунок 2. Динамика изменения массы тела сирийских хомячков с экспериментальным скрепи при применении БЭС (100 мкг/г) по профилактической и лечебной схемам

В стадии развития неврологической симптомов болезни у хомячков отмечали возбужденность и агрессивность. Рефлексы на внешние раздражители повышены. Развивалась «вертячка» с прогрессированием тремора головы (кручение и подергивание). В дальнейшем - изменение походки, потеря координации, слабость в конечностях, у 30% хомячков – парезы. Животные отказывались от пищи: нарушался глотательный рефлекс, вследствие чего наступало резкое похудение (кахексия). В терминальной стадии развивались необратимые клинические изменения: прогрессирующая вялость, сонливость, апатичность, потеря ответа на внешние раздражители, неподвижность, паралич конечностей и дыхательных мышц, гибель.

Применение БЭС по профилактической (II группа) и лечебной (III группа) схемам обеспечило удлинение инкубационного периода болезни и увеличение продолжительности жизни скрепи-зараженных хомячков (табл. 1).

Таблица 1.

Течение скрепи у сирийских хомячков, получавших БЭС (100 мкг/г) по профилактической и лечебной схемам

Экспериментальные группы	Количество животных	Схема введения БЭС, 100 мкг/г	Развитие скрепи (дни)		
			инкубационный период	развитие неврологической симптоматики	продолжительность жизни
I	10	-	58,6±2,89	24,4±2,46	83,0±2,67
II	10	профилактическая	63,8±3,43	25,4±3,71	88,4±3,57
III	10	лечебная	72,0±2,0	25,6±2,87	97,6±2,45
Контроль животных	10	-	-	-	-
Контроль препарата	10	лечебная	-	-	-

Видно, что продолжительность инкубационного периода составила: в I группе (контроль инфекции) - $58,6 \pm 2,89$ дн., II группе - $63,8 \pm 3,43$ дн., III группе - $72,0 \pm 2,0$ дн. Развитие болезни по длительности и интенсивности проявления клиники не различалось у хомячков контрольной и опытных групп. Отличия касались только сроков развития клинической симптоматики. Удлинение показателя продолжительности жизни скрепи-зараженных хомячков напрямую зависело от длительности инкубационного периода заболевания. При этом летальность среди инфицированных хомячков к концу срока наблюдения составила 100%. Как правило, развитию неврологической симптоматики предшествовали: снижение веса до 30-40% и более от максимального. Среди контрольных (неинфицированных) животных гибели не отмечено.

Патогистологические изменения в ЦНС у зараженных хомячков зависели от стадии заболевания и сопровождались прогрессирующей дегенерацией нейронов, активацией и деструкцией глиальных клеток. Накопление PrP^{Sc} в нервной ткани коррелировало с клинической картиной заболевания (табл.2).

Таблица 2.

Выявление патогенетических маркеров инфекции в ЦНС у хомячков, инфицированных скрепи, шт 263 К, получавших БЭС по профилактической и лечебной схемам, гистологическим методом и методом иммунного блоттинга

Экспериментальные группы	Срок после инфицирования			Аутопсийный материал
	1 мес	2 мес	3 мес	
I	-/+*	+/+	+/+	+/+
II	-/-	-/+	+/+	+/+
III	-/-	-/-	+/+	+/+
Контроль животных	-/-	-/-	-/-	-/-

***Примечание:**

числитель – гистологические исследования

знаменатель – метод иммунного блоттинга

– (+) – отрицательный (положительный) результат анализа

Из данных таблицы 2 видно, что гистологические исследования позволяют идентифицировать морфологические изменения, связанные собственно с «губкообразностью» (дегенеративными повреждениями ткани мозга) спустя 2-3 мес после заражения т.е. на конечных стадиях заболевания. При этом выявляемые патоморфологические изменения, у хомячков I, II и III групп сильно различались по интенсивности и анатомической локализации: мозжечок и продолговатый мозг поражались раньше и в большей степени, чем кора больших полушарий. Вакуолизация нейронов, развитие спонгиозных изменений, дегградация клеток глии и реактивация астроцитов, равно как и накопление PrP^{Sc} у скрепи-зараженных хомячков, получавшим БЭС в качестве лечебного препарата, было значительно растянуто во времени. Антиприонная активность БЭС была наиболее выражена для хомячков III группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прионные болезни (у животных - скрепи овец и коз, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭ КРС), у людей – болезнь Крейцфельда-Якоба (БКЯ), «новый вариант» БКЯ и ряд других) характеризуются накоплением в центральной нервной системе измененной формы прионного белка, известного как PrP^{Sc}. В отличии от нормального клеточного белка PrP^C, PrP^{Sc} имеет высокое содержание β-складчатых структур, является протеазоустойчивой формой прионного белка и полимеризуется в нерастворимые агрегаты и амилоидные фибриллы. Сущест-

вуют убедительные доказательства, что PrP^{Sc} ответственен за нейropатологические изменения в ЦНС и трансмиссию инфекционного процесса при ТГЭ.

Стратегия разработки средств профилактики и лечения этих достаточно редких, но всегда фатальных для человека и животных, нейродегенеративных заболеваний должна быть ориентирована на ключевые стадии патогенеза. При этом PrP^{Sc} представляется основной мишенью терапевтических воздействий.

Среди патогенетических стадий инфекционного процесса, в априори обеспечивающих защиту организма от PrP^{Sc}, можно выделить такие как: а) предотвращение первичного инфицирования чувствительных клеток-мишеней; б) ингибирование диссеминации PrP^{Sc} в организме, в) блокаду инфицирования нейронов (на уровне рецепторов); г) нарушение внутриклеточных процессов транспорта и взаимодействия с аппаратом трансляции (на уровне терминации синтеза пептидных цепей); д) препятствие комплементарного взаимодействия с новообразованными PrP^C и их конверсии (трансформации) в PrP^{Sc}; е) деградацию амилоида внутриклеточными протеазами и каталитически активными белками; ж) блокаду нейротоксического действия фрагментов прионов; з) ингибирование процессов генерации свободных радикалов, сопровождающих инфекцию амилоидоз и др. Каждая из этих стадий-мишеней имеет свои конкретные молекулярные механизмы, поэтому целенаправленное создание лекарственных препаратов полностью зависит от точности понимания этих процессов на молекулярном уровне.

В соответствии с настоящим уровнем знаний представляют значительный интерес данные по испытаниям традиционных веществ с известными фармакокинетическими свойствами, выбор которых эмпиричен или частично обоснован. Применение экстракта из верхнего слоя коры березы для терапевтического воздействия на PrP^{Sc} в наших исследованиях был обусловлен следующими обстоятельствами.

Известно, что БЭС представляет собой сумму природных тритерпеновых соединений, таких как бетулин (бетулинол), бетулиновая кислота, лупеол и др., основным из которых является тритерпеновый спирт бетулин, с содержанием его в экстракте не менее 70%. [5]. Эти лупановые тритерпеноиды, как и их производные, уже давно представляют особый интерес для химиотерапии и химиопрофилактики инфекционных заболеваний человека (грипп, герпес, гепатит С, СПИД и др.) [2, 3]. Они обладают широкой биологической активностью (адаптогенной, антимутагенной, антиоксидантной, антигипоксантажной, гепатопротекторной, желчегонной, гиполипидемической, иммуномодуляторной, противовоспалительной, противовирусной, противомикробной, противоопухолевой и др.) и рядом уникальных биологических свойств, которые, вероятно, прямо или косвенно могут воздействовать на PrP^{Sc}. Так, например, показан защитный эффект бетулина и бетулиновой кислоты против развития апоптоза *in vitro* [14]. Установлено, что бетулиновая кислота является селективным ингибитором меланомы человека и ряда других раковых клеток нейроэктодермального происхождения [13]. У ряда производных этих веществ обнаружена высокая вирулицидная и вирусингибирующая активность *in vitro* в области наномолярных концентраций [2, 3]. Показано влияние тритерпеноидов на активность сериновых, цистеиновых и аспарагиновых протеиназ [5, 13, 14].

Нами установлено, что в дозах 50-300 мкг/г БЭС был нетоксичен и безвреден для лабораторных животных при ежедневном применении в течение более 3-х месяцев. Впервые в работе показано, что использование БЭС для терапевтических целей достоверно удлиняло инкубационный период и увеличивало продолжительность жизни сирийских хомячков, зараженных скрепи. Не выявлено эффективности БЭС на стадии развития неврологической симптоматики. Не оказывал БЭС и лечебного эффекта в терминальной фазе болезни.

В качестве гипотетического механизма действия БЭС при скрепи можно предположить, что один и/или несколько компонентов его составляющих могут прямо взаимодействовать с PrP^{Sc} и делать его восприимчивым (чувствительным) к протеолитической деградации (расщеплению) протеазами. Этот эффект нами был отмечен в инкубационном периоде болезни при обеих схемах применения БЭС и коррелировал с данными гистологических исследований и иммунного блот-

тинга. Снижение протеазоустойчивости PrP^{Sc} при диссеминации сопровождалось и уменьшением инфекционности возбудителя, что выражалось в отсутствии детектируемых иммунным блоттингом концентраций PrP^{Sc} у хомячков II и III группы в сроки развития неврологической симптоматики у хомячков I группы (контроль инфекции). Фактически применение БЭС по лечебной схеме вызывало задержку появления клинических признаков и удлиняло продолжительность жизни у реципиентных животных более 14 дней, что в пересчете на жизнь человека составляет задержку около 1,0-1,5 года.

Более того, установлено, что эффективность БЭС зависела от инфицирующей дозы возбудителя, используемой для заражения. Так, было отмечено, что если БЭС применяли по лечебной схеме хомячкам, зараженным высоко разведенным скрепи-содержащим гомогенатов мозга (10^{-6}), у одной трети хомячков болезнь не развивалась в течение всего срока наблюдения (данные не показаны).

В дополнение к прямому действию на прионные белки БЭС может проявлять нейрозащитные эффекты через не прямые (опосредованные) механизмы как биологически активный и общеукрепляющий препарат, оказывающий помимо прочего противовоспалительное, гипополидемическое и антисклеротическое действие.

Следует подчеркнуть, что используемый в наших исследованиях интрацеребральный способ заражения хомячков следует считать «не естественным» и маловероятным при инфицировании живых организмов в природных условиях. Ятрогенное заражение организмов может иметь место только при хирургических манипуляциях на головном мозге вследствие применения контаминированных возбудителем медицинских инструментов и оборудования. Но при этом концентрация поступающего инфекционного агента находится на уровне нано - фемтограмм (10^{-12} - 10^{-15} г). Применяемая же в работе инфицирующая доза PrP^{Sc} являлась заведомо завышенной. Эти два обстоятельства значительно ограничили терапевтический эффект препарата. Снижение в последующих экспериментах дозы возбудителя в 10^3 - 10^5 раз до уровней концентраций PrP^{Sc} в крови и лимфе зараженных, но клинически еще здоровых животных, очевидно, обнаружит у БЭС значительно более выраженный терапевтический эффект.

В совокупности полученные данные имеют важное значение для профилактики приобретенных форм прионных болезней, таких как скрепи, ГЭ КРС, ятрогенного БКЯ, «нового варианта» БКЯ, которые, как полагают, имеют место у животных и человека после контакта с органическим материалом, содержащим низкие уровни PrP^{Sc}. На основании вышеизложенного, мы считаем, что, БЭС, как препарат с хорошо охарактеризованными фармакокинетическими свойствами и имеющий безопасный токсикологический профиль, может быть предложен к дальнейшему исследованию для инактивации прионов в потенциально загрязненных продуктах медицинской назначения и для стратегий предотвращения заражения ТГЭ.

Литература

1. Капитулец С.П., Полещук Н.Н., Капитулец Н.Н. и др. Экспериментальная инфекция скрепи у сирийских хомячков: особенности развития клинического процесса и патогенеза при инфицировании в гипоталамус // В сб. «Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиологии и иммунология). Мат. НИИЭМ по итогам выполнения ГНТП «Инфекции и медицинские биотехнологии» 2001-2005 гг. – Мн. – 2005. – С. 410-424.
2. Носик Н.Н., Дерябин П.Г., Исаева Н.И. и др. Интерферон-индуцированные свойства экстракта из коры березы и его влияние на экспериментальную инфекцию, вызванную вирусом гепатита С // *Вопр. вирусол.* – Т. 50 (№5). – С. :29–32
3. Павлова Н.И., Савинова О.В., Николаева С.Н. и др. Антивирусная активность бетулина, бетулиновой и бетулоновой кислот против некоторых оболочечных и не оболочечных вирусов // *Фитотерапия.* – 2003. – Т. 74 (№5). – С. 489–492.

4. Полещук Н.Н., Рытик П.Г., Гузов С.А. и др. Астроцитарная глия в патогенезе болезни Крейтцфельдта-Якоба // *Арх. патол.* – 1990. – Т.52 (№1) – С. 31-36.
5. Преснова Г.А. Биологически активные вещества коры берёзы // *Поликлиника.* – 2005. – №2. – С.16–18.
6. Adjou K. T., Demaimay R., Lasmezas C. et al. MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhanced efficacy in delaying hamster scrapie // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1995. – V. 39. – P. 2810–2812.
7. Caughey B., Raymond G.J. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells // *J. Virol.* – 1993. – V. 67. – P. 643–650.
8. DeArmond S. J., Prusiner S. B. In «Greenfield's Neuropathology», eds. Graham, D. I. and Lantos, P. L. (Arnold, London). – 1997. – P. 235–280.
9. Forloni G., Iussich S., Awan T. et al. Tetracyclines affect prion infectivity // *PNAS.* – 2002. – V. 99. – P. 10849–10854.
10. Ingrosso L., Ladogana A., Pocchiari M. Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters // *J. Virol.* – 1995. – V. 69. – P. 506–508.
11. Kimberlin R. H., Walker C. A. Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextran sulfate, and some other polyanions. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1986 – V. 30. – P. 409–413.
12. Kocisko D. A., Come J. H., Priola S. A. et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein // *Nature.* – 1994. – V. 370. – P. 471–474.
13. Liu W.K., Ho J.C., Cheung F.W. et al. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. // *Eur J Pharmacol.* – 2004. – V. 13(498). – P. 71–78.
14. Oh S.H., Choi J.E., Lim S.C. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells // *Toxicology.* – 2006. – V. 220. – P. 1–12.
15. Pan K., Baldwin M., Nguyen J et al. Conversion of α -helices β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins // *PNAS.* – 1993. – V. 90. – P. 10962–10966.
16. Saborio G. P., Permanne B., Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding // *Nature.* – 2001. – V.411. – P. 810–813.
17. Supattapone S., Wille H., Uyechi L. et al Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – P. 3453–3461.
18. Soto C., Kacsak R. J., Saborio G. P. et al. Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides // *Lancet.* – 2000. – V. 355. – P. 192–197.
19. Tagliavini F., Forloni G., D'Ursi P et al. Studies on peptide fragments of prion proteins // *Adv. Protein Chem.* – 2001. – V. 57. – P. 171–201.
20. Tagliavini F., McArthur R. A., Canciani B. et al. Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in syrian hamsters // *Science.* – 1997. – V. 276. – P. 1119–1122.