

4. Constantinidou A., Martin A., Sharma B., Johnston S.R. Positron emission tomography/computed tomography in the management of recurrent/metastatic breast cancer: a large retrospective study from the Royal Marsden Hospital // *Ann. Oncol.*, 2011, vol. 22, pp. 307–314.

5. Engstrom M.J., Opdahl S., Hagen A.I. et al. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients // *Breast Cancer Res Treat.*, 2013, vol. 140 (3), pp. 463–473.

6. Feriay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J. et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012 // *Eur. J. Cancer.* 2013, vol. 49, pp. 1374–1403.

7. Gampenrieder S.P., Rinnerthaler G., Greil R. Neoadjuvant chemotherapy and targeted therapy in breast cancer: past, present, and future // *J. Oncol.*, 2013, vol. 2013, Art. ID 732047.

8. National Cancer Institute. *SEER Star Fact Sheets: Breast*, (Inter net). Available at <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> [cited on Sep 9, 2013].

УДК 616.612

## ПРИОННЫЕ ИНФЕКЦИИ, НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИХ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ

Окулова И.И., Жданова О.Б.

*ГБОУ ВПО Кировская государственная медицинская академия Минздрава России, Киров, Россия (610027, г. Киров, ул. К. Маркса, 112), e-mail: oliabio@yandex.ru*

Прион представлен белком, называемым PrP (сокращенно от прионных белков), который может сложиться в несколько различных структурных путей, один из которых передается в другие прионные белки. Именно эта форма репликации приводит к болезням, похожим на вирусную инфекцию. Термин «прион» ввел в 1982 году С.Б. Прузинер, прион (от англ. *proteinaceous infectious particle* – белковоподобная инфекционная частица) состоит из молекул инфекционного прионного белка, это мутированная форма низкомолекулярного белка. Этот инфекционный агент вызывает у животных инфекционную губчатую энцефалопатию (BSE), также известную как «коровье бешенство», скрепи у овец, у человека – болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), новый вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (нвБКЯ), синдром Gerstmann-Sträussler-Scheinker, фатальную семейную бессонницу и болезнь куру.

В статье представлены собственные исследования при изучении головного мозга норки, отмечены дистрофические изменения, астроцитоз и дегенерация нейронов. Таким образом, при патологоанатомическом и гистологическом исследовании головного мозга у норки нами был поставлен диагноз губчатой энцефалопатии.

Ключевые слова: норка, мозжечок, кора полушарий, губчатая энцефалопатия, прионы.

## PRION INFECTIONS, SOME ASPECTS OF INVESTIGATION AND PREVENTION

Okulova I.I., Zhdanova O.B.

*Kirov State Medical Academy, Kirov, Russia (610027, Kirov, K. Marx Street, 112), e-mail: oliabio@yandex.ru*

Prion is composed of protein material called PrP (short for prion protein) that can fold in multiple, structurally distinct ways, at least one of which is transmissible to other prion proteins leading to disease that is similar to viral infection. The word prion, coined in 1982 by B. Prusiner, is short for «proteinaceous infectious particle» derived from the words protein and infection, in reference to a prion's ability to self-propagate and transmit its conformation to other prions. This infectious agent causes mammalian transmissible spongiform encephalopathies, including bovine spongiform encephalopathy (BSE), also known as «mad cow disease» and scrapie in sheep. In humans, PrP causes Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD), a new variant of Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, Fatal Familial Insomnia and kuru. We studied the cerebral cortex in burrows with encephalopathy. Degenerative-dystrophic changes, astrocytosis and neuronal degeneration were found out. After the autopsy and histologic study the diagnosis of spongiform encephalopathy was made.

Key words: mink, cerebellum, neocortex, encephalopathy, prions.

Трансмиссивные губчатые энцефалопатии (ТГЭ) – особая группа медленных конформационных инфекционных болезней человека и животных. Заболевания характеризуются длительным инкубационным периодом (месяцы и годы), постепенным прогрессированием своеобразных необратимых поражений ЦНС, приводящих к неизбежному летальному исходу [1, 7].

Долгое время попытки найти в тканях головного мозга человека и животных, умерших от трансмиссивных губчатых энцефалопатий, бактерии либо частицы, которые напоминали бы вирусы или вирусоподобных возбудителей, в целом были безуспешными. В тонких срезах инфицированных тканей головного мозга были обнаружены особые тубуловезикулы, однако не последовало доказательства, что данные структуры связаны с инфекционностью.

Кроме нормального и безвредного PrP<sup>Sc</sup> существует еще одна – патологическая форма того же белка под названием PrP<sup>Sc</sup>. Она неправильно сложена – вместо альфа-спиралей у нее много бета-конформаций, которые слипаются друг с другом, образуя нерастворимые агрегаты. Агрегаты губительны для клетки и заставляют нормальный и безвредный PrP<sup>Sc</sup> сложиться неправильным образом. В результате в клетке нарастает количество неправильно сложенных белков, которые слипаются в смертоносные агрегаты и убивают ее. PrP<sup>Sc</sup> нейротоксичен, накопление этого белка и его фрагментов в нейронах ведет к апоптозу и гибели клеток [10, 14].

Первое доказательство того, что губчатые энцефалопатии связаны с аномальными белками, было морфологическим: в экстрактах различных тканей животных, больных губчатой энцефалопатией, были выявлены скрепи-ассоциированные фибриллы (SAF), которые отсутствовали в нормальных тканях, данные белки присутствуют в амилоидных бляшках,

обнаруженных в головном мозге людей и животных, умерших от трансмиссивных губчатых энцефалопатий [5].

В 1982 г. С.Б. Прузинер предложил для подобных возбудителей термин «прион» – это мутированная (инфекционная) форма низкомолекулярного белка, названного «прионный протеин» (PrP), «прион» (от англ. proteinaceous infectious particle – белковоподобная инфекционная частица) состоит из молекул инфекционного прионного белка [10, 16, 18]. Прионную гипотезу признали большинство ученых, и в 1997 г. Прузинер был награжден Нобелевской премией.

Нормальная спиралевидная форма прионного протеина PrP<sup>c</sup> обнаружена в организме всех млекопитающих, в том числе и человека. PrP<sup>c</sup> участвует в передаче нервных импульсов в синаптических образованиях, играя определяющую роль в регуляции суточных (циркадианных) циклов активности и покоя в клетках, органах и тканях [11; 18]. Резко возросший интерес к группе прионных болезней и роли в их возникновении пищевого фактора во многом обусловлен начавшейся в 1986 г. эпизоотией губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота в Великобритании, на пике которой в 1992 г. регистрировалось около 1000 случаев заболеваний коров в неделю, а также с выявлением болезни Крейтцфельдга-Якоба (БКЯ), нового варианта БКЯ (нвБКЯ), синдрома Герстмана-Штреусслера-Шейнкера, куру и летальной семейной бессонницы [5, 11, 12–15]. У животных выделяют скрепи овец, губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота (ГЭ КРС), хроническую изнуряющую болезнь (ХИБ) оленей, лосей и других парнокопытных [3, 4].

Теоретически и практически важный вопрос о наличии видового барьера и о возможности межвидового переноса прионных инфекций обсуждается в литературе. Указывается, что на межвидовой перенос инфекции влияют два фактора: 1) эффект вида донора, связанный с различиями в последовательностях гена PrP у двух видов – донор-реципиент; 2) штаммовые особенности приона, влияющие на возможность преодоления межвидового барьера.

Клинические и морфологические проявления всех губчатых энцефалопатий сходны. Данные заболевания имеют очень продолжительный бессимптомный период (по меньшей мере год), длятся несколько месяцев и более; видимые проявления болезни (хотя и неинфекционного характера) ограничиваются ЦНС. Наиболее заметным морфологическим проявлением всех трансмиссивных губчатых энцефалопатий служит выраженная губчатая дегенерация коры головного мозга. Заболевания характеризуются длительным инкубационным периодом: от нескольких месяцев до десятков лет. После проявления клинических неврологических симптомов (деменции, развития парезов и др.) летальный исход, как правило, наступает через несколько месяцев.

#### Материал и методы

Исследуемый материал фиксируют в 10%-ном солевом растворе формалина, который готовят по следующей прописи: 8,5 г поваренной соли растворяют в 900 мл дистиллированной воды, затем добавляют 100 мл формалина, содержащего 40% формальдегида. Объем солевого раствора формалина должен в 10 раз превышать объем фиксируемого головного

мозга. Фиксацию головного мозга проводят в течение 14 суток со сменой фиксатора через неделю. Для гистологического исследования вырезают поперечные кусочки толщиной 0,3–0,5 см из следующих отделов головного мозга: на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота – из продолговатого мозга (области задвижки и задних ножек мозжечка), среднего мозга (область ростральных холмов). Вырезанные кусочки головного мозга дополнительно фиксируют в течение суток в аналогичном солевом растворе формалина, уплотняют в целлоидине или парафине, после чего готовят гистологические срезы, которые окрашивают гематоксилин-эозином [8].

#### Результаты и их обсуждение

В конце 90-х – начале 2000 годов во многих зверохозяйствах Кировской и Костромской области практикующие ветеринарные врачи наблюдали заражение норок губчатой энцефалопатией, которое произошло при скармливании бараньих голов в сыром виде. Болели взрослые звери и молодняк прошлого года рождения, среди щенков до года заболеваний не было отмечено. Заболевшие звери погибали. Исходя из вышесказанного необходимо уточнить спектр патогенности прионных болезней животных, в том числе и для человека. В связи с чем провели клиническое, патологоанатомическое и гистологическое изучение инфекционного процесса, вызванного у норок заражением от животных, больных скрепи (природный хозяин – овца) [9–18].

При клиническом осмотре больных животных были выявлены признаки, наиболее характерные для энцефалопатии, – это возбуждение или апатия. Во время возбуждения норки бегали по клетке, часто совершали круговые движения, кусая себя за хвост. Самки становились безразличными к своим щенкам, пытались пролезть через ячею сетки наружу. Норки при этом заболеванием забывали приобретенные ими привычки, испражнялись во всех углах домика, кал и корм разбрасывали по всей клетке. У некоторых норок хвост был приподнят вверх, как у белки. Период возбуждения сменялся сонливостью, норки подолгу лежали в домике, пробуждаясь лишь на короткое время. Перед смертью животные находились в состоянии возбуждения, звери хватали зубами проволоку сетки и так, вцепившись в сетку, погибали. У некоторых животных перед смертью наблюдались эпилептические припадки, круговые движения. Случаев выздоровления не выявлено. При вскрытии павших норок изменений во внутренних органах не наблюдали, у норок обнаруживали отечность головного мозга, это отмечено также в исследованиях Данилова Е.П. (1984) и Слугина В.С. (2004).

Лабораторные методы прижизненной диагностики ИЭН до сих пор не разработаны, поэтому диагноз ставили на основании учета эпизоотических данных, характерных клинических признаков и патологоанатомических изменений, окончательный диагноз – посмертный. С целью диагностики губчатой энцефалопатии от павших норок брали на гистологическое исследование фрагменты больших полушарий головного мозга, мозжечка, которые фиксировали по общепринятым методикам в 10% водном растворе нейтрального формалина. Проводка осуществлялась, начиная с обезвоживания в 70% спирте, заканчивая

в термостате при температуре 70°C, по восходящей концентрации в 96% спирте с экспозицией 30 минут в каждом из трех спиртовых растворов с последующей заливкой в парафин. Изготовление парафиновых гистологических срезов толщиной 5–7 мкм проводили по общепринятым стандартным методикам (на санном микротоме МС-2). Срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином [3]. Фотографии сделаны с использованием системы Vision Bio (Ерп 2014 г.) при увеличении 100х/1,25, 40х/0,65 с автоматической обработкой сигнала и выведением на дисплей.

При микроскопическом исследовании коры мозга и мозжечка нами были обнаружены изменения, характерные для губчатой энцефалопатии, это пролиферация глии, склероз отдельных нервных клеток, периваскулярный и перинуклеарный отек, вакуолизация и астроцитоз цитоплазмы нейронов. Головной мозг на гистологическом срезе напоминал «губку», что является характерным для энцефалопатии (Рис. 1а; 1б). Характерными считают Геллер В.И. и др. (2003) дистрофические и некробиотические поражения, которые проявляются в виде (спонгиозности) серого вещества, образующиеся вследствие вакуолизации нейронов и межклеточного вещества.

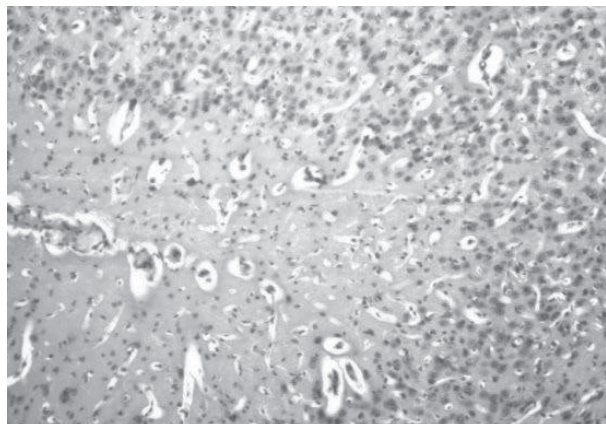


Рис. 1 а) Перинуклеарный отек нервных клеток, дегенеративный склероз. При увелич. объектива 40х/0,65

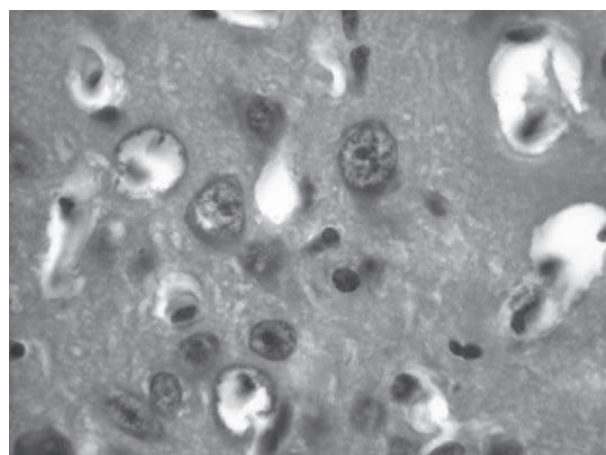


Рис. 1 б) Перинуклеарный отек нервных клеток, дегенеративный склероз. При увелич. объектива 100х/1,25

Таким образом, прижизненный диагноз заболевания норки губчатой энцефалопатией был подтвержден патологоанатомически и гистологически. Однако учитывая, по некоторым литературным данным [2], что губкообразной энцефалопатией болеют и люди, необходимо совершенствовать меры борьбы с данным заболеванием. При организации мер борьбы с ИЭН необходимо помнить, что, хотя случаев заражения людей от больных норок, а также от других животных не наблюдалось, как и ранее не доказана возможность заражения человека от продуктов животноводства (КРС, овцы), поэтому следует соблюдать меры личной профилактики при работе с больными животными, патологическим материалом, контаминированными кормами и инвентарем для обслуживания животных [15]. Необходимо проводить активную просветительную работу среди медицинских и ветеринарных работников. При этом следует учитывать длительность заболевания и определенные трудности в его дифференциальной диагностике.

Профилактика прионных болезней основывается на недопущении в пищу инфицированных мясных продуктов или других продуктов убоя. Именно в этой связи еще в 2000 г. главным государственным санитарным врачом РФ было выпущено постановление № 15 «О мерах по предупреждению распространения болезни Крейтцфельда-Якоба на территории Российской Федерации», предписывающее, в частности, «не допускать закупок мяса и мясных и других продуктов убоя крупного рогатого скота, а также получения их по гуманитарной помощи без предоставления документов, подтверждающих отсутствие в стране-экспортере заболеваний губкообразной энцефалопатии коров». Предписывалось также усилить контроль на местах за продажей мяса и мясных продуктов в розничной торговле [6].

В настоящее время проблема терапии прионных болезней остается нерешенной, и все многочисленные попытки применения в клинической практике антибиотиков, противовирусных препаратов, стероидов или тиамин при БКЯ неизменно заканчивались неудачей [6; 12].

В связи с чем необходимо усилить контроль и разработать ряд мероприятий по профилактике прионных инфекций. Вводятся ограничения на использование лекарственных препаратов, приготовленных из тканей крупного рогатого скота. Прекращено производство гормонов гипофиза животного происхождения. В ряде стран введены ограничения на трансплантацию твердой мозговой оболочки, фрагментов костей КРС. Поскольку передача от человека к человеку предполагает прямую инокуляцию инфекционного материала, при работе с биологическими жидкостями больных необходимо использовать резиновые перчатки. Инструменты рекомендуется дезинфицировать автоклавированием при температуре 132°C в течение 1 ч., а при температуре 121°C – 4,5 ч. или погружением в раствор гидроксида натрия 1% на 1 ч. при комнатной температуре. Прионы устойчивы к кипячению в течение 30–60 мин., высушиванию – до 2 лет, замораживанию – в 3 раза больше, чем известные вирусы, химической обработке спиртами, формальдегидом, кислотами, к УФ-облучению, гамма-излучению, гидролизу ферментами. Наиболее эффективные

воздействия оказываются в дозах, которые денатурируют практически все белки. Иначе говоря, из всего живого прион погибает последним. PrP<sup>Sc</sup> входит в состав наружных клеточных мембран, связан с внешней поверхностью клеток якорем гликолипида и участвует в эндоцитозе и катаболизме клеток. Несмотря на то, что самый высокий уровень концентрации PrP выявлен в нейронах, его могут синтезировать и многие другие клетки организма – легких, почек, поджелудочной железы, а также лейкоциты и тромбоциты.

### Заключение

Таким образом, изучение прионов и связанных с ними заболеваний является новой быстро развивающейся областью биомедицинских исследований. Весьма вероятно, что основы знаний, полученных при изучении прионных болезней, можно будет применить для выяснения причин других, более распространенных нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона. Уже сейчас имеется возможность определить группу риска возникновения врожденных прионных болезней задолго до проявления неврологических нарушений. В связи с этим существует необходимость разработки эффективной терапии. Однако насколько быстро возможность лечения прионных болезней станет реальностью, зависит от успехов молекулярной и клеточной биологии в области изучения химии белка, что дает возможность расшифровки процессов репликации прионов и раскрытия патогенетических механизмов этих болезней.

### Список литературы

1. Геллер В.И. // Кролиководство и звероводство. 2003. № 4. С. 29–30.
2. Слугин В.С. Болезни пушных зверей и их этиологическая связь с патологией других животных и человека. Киров. 2004. С. 149–154.
3. Меркулов Г.А. Курс патолого-гистологической техники. Л.: Медицина, 1969. С. 376.
4. Данилов Е.П. Болезни пушных зверей. Москва. Колос, 1984. С. 63–65.
5. Зувев В.А., Завалишин И.А., Ройхель В.М. Прионные болезни человека и животных: Руководство для врачей. М., 1999.
6. Покровский В.И., Киселев О.И., Черкасский Б.Л. Прионы и прионные болезни. М.: РАМН, 2004.
7. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология /учебник. – 2-е изд., испр. и доп. 2009. 816 с.
8. Болезнь Крейтцфельда-Якоба и родственные трансмиссивные губчатые энцефалопатии // *The New England Journal of Medicine*, 1998, v. 339, № 27, pp. 1994–2004.
9. Методические указания по патогистологической диагностике прионных инфекций животных от 6 мая 1997 г. № 13-7-2/939.
10. Bolton D.C., McKinley M.P., Prusiner S.B. *Science* 1982; 218: 1309–1311.
11. Harris D.A., Falls D.L., Johnson F.A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 7664–7668.

12. Brown H. *Antiviral Chem. Chemother.* 1990; 1: 75–83.
13. Krull Ira S.; Brian K. Nunnally. *Prions and mad cow disease*. New York, N.Y: Marcel Dekker, 2004. P. 6.
14. McKinley M.P., Bolton D.C., Prusiner S.B. *Cell* 1983; 35: 57–62.
15. Pearson R.C., Gorham J.R. *Virus infection of carnivores* /ed. Appel M.J., Baker J.A. Elsevier Science Publishers B.V./Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1987, 36 361–369.
16. Prusiner S.B. *Science*, 1991; c. 252.
17. Prusiner S.B. «Prions». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (23): 1998.
18. Tobler J., Gaus T., Deboer P. et al. *Nature*. 1996; 380: 639–642.
19. Weissmann C. *Nature*. 1991; 352: 679–683.

### References

1. Geller V.I. // *Krolikovodstvo i zverovodstvo*, 2003, N 4, pp. 29–30.
2. Slugin V.S. *Bolezni pushnykh zveri i ikh etiologicheskaya svyaz s patologiei drugikh zhyvotnykh i cheloveka*. Kirov, 2004. pp.149–154.
3. Merkulov G.A. *Kurs patologo-gistologicheskoi tekhniki*. L.: Meditsina, 1969. pp. 376.
4. Danilov E.P. *Bolezni pushnykh zveri*. Moscow, Kolos, 1984. pp. 63–65.
5. Zuev V.A., Zavalishin I.A., Roikhel' V.M. *Prionnye bolezni cheloveka i zhyvotnykh: Rukovodstvo dlya vrachei*. M., 1999.
6. Pokrovskii V.I., Kiselev O.I., Cherkasskii B.L. *Priony i prionnye bolezni*. Moscow, RAMN, 2004.
7. Pokrovskii V.I., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. *Infektsionnye bolezni i epidemiologiya /uchebnik. – 2-e izd., ispr. i dop.* 2009. 816 p.
8. Болезнь Крейтсфельдта-Якоба и родственные трансмиссивные губчатые энцефалопатии // *The New England Journal of Medicine*, 1998, vol. 339, N 27, pp. 1994–2004.
9. *Metodicheskie ukazaniya po patogistologicheskoi diagnostike prionnykh infektsii zhyvotnykh ot 06 maya 1997 g.* № 13-7-2/939.
10. Bolton D.C., McKinley M.P., Prusiner S.B. *Science*. 1982; 218: 1309–1311.
11. Harris D.A., Falls D.L., Johnson F.A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 7664–7668.
12. Brown H. *Antiviral Chem. Chemother.* 1990; 1: 75–83.
13. Krull Ira S.; Brian K. Nunnally. *Prions and mad cow disease*. New York, N.Y: Marcel Dekker, 2004. P. 6.
14. McKinley M.P., Bolton D.C., Prusiner S.B. *Cell*. 1983; 35: 57–62.
15. Pearson R.C., Gorham J.R. *Virus infection of carnivores* /ed. Appel M.J., Baker J.A. Elsevier Science Publishers B.V./Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1987, 36 361–369.
16. Prusiner S.B. *Science*. 1991; p. 252.
17. Prusiner S.B. «Prions». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (23): 1998.
18. Tobler J., Gaus T., Deboer P. et al. *Nature*. 1996; 380: 639–642.
19. Weissmann C. *Nature*. 1991; 352: 679–683.