

Białko prionowe w tkance mięśniowej ludzi i zwierząt

MIROSLAW P. POLAK, MAGDALENA LARSKA, JERZY ROLA, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Polak M. P., Laska M., Rola J., Żmudziński J. F.

Prion protein in muscle tissue of human and animal origin

Summary

Until recently muscle tissue of animals affected with transmissible spongiform encephalopathies was regarded as a safe product in respect to human consumption. Lack of ruminant muscle tissue in the category of Specified Risk Material confirms this assumption. However results presented in this review question the above hypothesis.

Many researchers have managed to detect a pathological form of prion protein not only in muscles of laboratory animals (mice, hamsters) but also in the muscles of farm animals (sheep). Moreover it was found there during the incubation phase of infection. This was possible due to the use of sensitive diagnostic methods enabling the detection of minute amounts of prion protein. However those results were found only in sheep scrapie cases. So far this protein has not been detected in the muscles of calves and cows affected with BSE, as well as those animals which were experimentally "infected" with muscle tissue from BSE cases.

Keywords: prion protein, muscle tissue, PrP^{Sc}, BSE, TSE

Pasażowalne gąbczaste encefalopatie (TSEs), określane także jako choroby prionowe, należą do schorzeń neurodegeneracyjnych ludzi i zwierząt. Charakteryzują się długim okresem inkubacji, brakiem reakcji zapalnej oraz brakiem odpowiedzi immunologicznej ze strony gospodarza i zawsze kończą się zejściem śmiertelnym. Według teorii prionowej Stanleya Prusiner, patologiczne białko prionowe (PrP^{Sc}) stanowi kluczowy składnik czynnika zakaźnego (8).

Patogeneza chorób prionowych, badana od wielu lat, nie została do końca wyjaśniona. W procesie tym wyróżnia się: etap „namnażania” się białka prionowego w miejscu zakażenia, etap neuroinwazji (migracja do ośrodkowego układu nerwowego, OUN) oraz etap zmian degeneracyjnych w tkance nerwowej (neurodegeneracja) (1). Predylekcja PrP^{Sc} do neuronów, (które charakteryzują się najwyższą ekspresją normalnego białka prionowego – PrP^C, będącego prekursorem formy patologicznej) sprawia, że przynajmniej w przypadku gąbczastej encefalopatii bydła (BSE) ponad 90% zakaźności wykrywa się w mózgowiu oraz rdzeniu przedłużonym. W związku z obecnością PrP^{Sc} w różnych narządach, wprowadzono termin „Materiału Szczególnego Ryzyka” (SRM), definiujący narządy, które należy usuwać w trakcie rozbioru tuszy zwierząt, aby zminimalizować ryzyko zakażenia konsumenta. W miarę uzyskiwania nowych danych z badań nad lokalizacją białka prionowego, poszerzano listę SRM. Tkanka mięśniowa nie jest aktualnie zaliczona do kategorii SRM, m.in. na podstawie badań doświadczalnych przeprowadzonych w Agencji Laboratoriów We-

terynaryjnych (VLA) w Weybridge, Wielka Brytania, gdzie cieleta, którym podano drogą doustną tkankę mięśniową od krów chorych na BSE, pomimo 5-letniej obserwacji, nie uległy zakażeniu.

Jednakże wyniki badań ostatnich lat wskazują na obecność patologicznego białka prionowego w tkance mięśniowej ludzi i zwierząt. Stwierdzenie tej obecności możliwe było m.in. dzięki zastosowaniu czulszych metod badawczych, jak również myszek transgenicznych, u których podwyższona ekspresja białka prionowego homologicznego gatunku pozwala na wykrycie stosunkowo niewielkich ilości białka PrP^{Sc}.

W 1996 r., Groschup i wsp. (6) opisali obecność białka prionowego u zakażonych myszek w próbkach materiału z nerwów obwodowych układu nerwowego pobranych od owiec z naturalnych przypadków trzęsawki. Wyniki te wskazały potencjalne niebezpieczeństwo spożywania baraniny, w związku z obecnością w tkance mięśniowej połączeń nerwowych, w których wykryto obecność tego białka.

Dowodów na obecność PrP^{Sc} w samej tkance mięśniowej dostarczyły wyniki prac grupy Stanleya Prusiner (4). Badania na myszkach transgenicznych potwierdziły, że białko to namnaża się i odkłada w mięśniach szkieletowych, w ilościach o wiele wyższych niż przypuszczano (mimo że jego stężenie było ok. 500 razy niższe niż w mózgowiu). Lokalizacja w badanych mięśniach była zróżnicowana z najwyższą zawartością w mięśniach kończyn tylnych, przy jednoczesnym braku PrP^{Sc} w mięśniach szkieletowych głowy, szyi, grzbietu i kończyn przednich (z wyjątkiem jednej

myszki). Autorzy nie dali jednoznacznej odpowiedzi na takie zróżnicowanie w występowaniu białka PrP^{Sc}. Wyszuli przypuszczenie, że związane jest to z różnicami biochemicznymi w poszczególnych grupach mięśni w różnych rejonach ciała, co determinuje odmienną wrażliwość na różnorodne czynniki zakaźne. Ponadto zwrócili uwagę na możliwość różnej zawartości białka X w poszczególnych partiach mięśni (białko to niektórzy badacze uznają za niezbędne w procesie „namnażania” się PrP^{Sc}). Odkrycia te wskazały, że mięśnie, nawet po usunięciu tkanki nerwowej i limfaticznej, zawierając białko prionowe, stanowią ryzyko zakażenia dla człowieka. Autorzy zwrócili uwagę na konieczność zastosowania czulszych metod diagnostycznych oraz wykonania badań na odpowiednich modelach zwierzęcych, aby nie istniała bariera gatunkowa, ograniczająca skuteczność zakażenia.

Z kolei wyniki badań Bartza i wsp. (3) wskazały na niebezpieczeństwo transmisji chorób prionowych drogą *per os*, poprzez uszkodzony nabłonek języka. Zakażając chomiki tą drogą, materiałem z przypadków gąbczastej encefalopatii nerek (TME) wykazano, że dochodziło do namnażania się czynnika TME w tkance mięśniowej języka oraz w okolicznych węzłach chłonnych, natomiast okres inkubacji choroby dla tego gatunku zwierząt był najkrótszy spośród wszystkich dróg pozamózgowego zakażenia. Ponadto okazało się, że transmisja tego czynnika poprzez uszkodzony nabłonek języka jest 100 000 razy bardziej skuteczna niż klasyczne zakażenie drogą *per os*. Dotychczas nie opisano przypadków wykrycia białka PrP^{Sc} w mięśniach języka od bydła chorego na BSE, podobnie jak po doświadczalnym zakażeniu myszek homogenatem języka od zwierząt chorych (na BSE). Jednakże próba biologiczna na myszkach nie jest zbyt czuła i istnieje ryzyko uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych (11). W związku z uzyskanymi wynikami, autorzy sugerują włączenie ozorów bydłowych do Materiału Szczególnego Ryzyka (SRM), aby zminimalizować ryzyko ekspozycji człowieka na czynnik wywołujący BSE.

Użycie czulej metody badawczej do wykrywania obecności PrP^{Sc} u chomików zakażanych drogą *per os* materiałem z przypadków trzęsawki owiec przez Thomziga i wsp. w 2003 r. (9), pozwoliło na potwierdzenie wyników Prusiner i wsp. Wykryto obecność białka PrP^{Sc} nie tylko w mięśniach szkieletowych kończyn tylnych chomika, ale także w przednich, jak również w mięśniach głowy, grzbietu oraz języka. Zawartość tego białka była nieznacznie wyższa w mięśniach języka niż w pozostałych grupach badanych mięśni. Z kolei w mięśniu sercowym wykryto najniższą ilość tego białka. Jednakże autorzy zalecili ostrożne podejście do prezentowanych wyników, gdyż zawartość PrP^{Sc} w tkankach chomika po zakażeniu doświadczalnym jest wyższa niż z naturalnych przypadków trzęsawki owiec, BSE bydła czy też choroby Creutzfeldta-Jakoba (CJD) ludzi.

Dotychczas prezentowane wyniki dotyczyły badań wyłącznie na modelach zwierzęcych. Dopiero w 2003 r., Glatzel i wsp. (5) wykryli obecność białka prionowego w tkance mięśniowej ludzi chorych na sporadyczną postać CJD (sCJD). Zastosowana wysoce czuła metoda detekcji (zagęszczenie PrP^{Sc} poprzez różnicową precypitację z dodatkiem kwasu krzemowo-wolframowego) trzykrotnie zwiększyła czułość metody western blot. Pozwoliło to na wykrycie odpornej na proteolizę formy białka PrP w 8 spośród 32 badanych próbek mięśni szkieletowych. PrP^{Sc} wykryto w mięśniach: piersiowych, udowo-łędźwiowych oraz międzyżebrowych. Zawartość białka prionowego w tych tkankach określono na poziomie 10 000 razy niższym niż w przypadku próbek OUN od chorych na sCJD. Uzyskane wyniki wskazały na możliwość jatrogennej transmisji sCJD.

Hamirowi i wsp. (7) nie udało się wykryć białka PrP^{Sc} w tkance mięśniowej bydła, owiec, jeleni i szopów po eksperymentalnym zakażeniu, pomimo wykrycia jego obecności w mózgowiu. W pracy tej po raz pierwszy analizowano próbki pochodzące od zwierząt nielaboratoryjnych, co bardziej odpowiada warunkom naturalnym. Autorzy pracy, cytując Thomziga i wsp. odnoszą się do wcześniejszych wyników, gdzie po zakażeniu myszek i cieląt tkanką mięśniową od krów chorych na BSE, także uzyskano wyniki negatywne. Ponadto zwrócono uwagę na fakt wyższego poziomu białka PrP^{Sc} po zakażeniu eksperymentalnym u zwierząt laboratoryjnych w stosunku do zwierząt gospodarskich. Kolejnym argumentem użytym przez autorów tej pracy, tłumaczącym ujemne wyniki badań, było użycie we wcześniej cytowanych pracach laboratoryjnych szczepów TSEs (sugeruje się możliwość zwiększonej zdolności tych szczepów do namnażania się w tkance mięśniowej gospodarza, w efekcie wielokrotnego pasażowania na różnych modelach zwierząt laboratoryjnych). Także użycie w powyższych badaniach metody immunohistochemicznej (IHC) do wykrywania PrP^{Sc} może tłumaczyć niższą czułość diagnostyczną w stosunku do metody western blot, używanej powszechnie we wcześniej cytowanych pracach. Jednakże doświadczenie własne autorów tej pracy wskazuje, że metoda IHC jest równie czuła, a nieraz nawet czulsza niż metoda western blot. Hamir i wsp. sugerują konieczność podjęcia podobnych badań na szerszą skalę (w badaniach użyto 20 zwierząt), aby potwierdzić lub wykluczyć obecność PrP^{Sc} w tkance mięśniowej.

Jednakże kolejne badania dwóch grup, Thomziga i wsp. (10) oraz Andreoletti i wsp. (2), potwierdziły obecność PrP^{Sc} z przypadków trzęsawki owiec mięśniowej zakażanych zwierząt w fazie bezobjawowej zakażenia. O ile pierwsza grupa autorów uzyskała takie wyniki na modelu laboratoryjnym (chomik), o tyle grupa Andreoletti wykryła patologiczne białko prionowe u owiec. W obydwu pracach zwierzęta zakażano drogą *per os*, naśladując naturalny sposób za-

każenia. Białko PrP^{Sc} wykrywano w bardzo późnym okresie fazy utajonej choroby, bezpośrednio przed wystąpieniem objawów klinicznych.

Podsumowując należy zauważyć, że podnoszone wcześniej kwestie wyższej skuteczności zakażenia zwierząt laboratoryjnych w stosunku do zwierząt gospodarskich (gospodarz naturalny) w przypadku badań Andreoletti i wsp. nie potwierdziły się. Autorom tym udało się wykryć białko prionowe w tkance mięśniowej owiec w końcowym stadium inkubacji choroby. Chociaż stężenie tego białka w mięśniach owiec było 5000 razy niższe niż w mózgowiu, to jednak istnieje ryzyko transmisji choroby po spożyciu mięsa baraniego (we wcześniej cytowanej pracy Prusiner i wsp. stężenie PrP^{Sc} w mięśniach myszek transgenicznych było 500 razy niższe niż w mózgowiu, co wskazuje na wyższą czułość tego modelu laboratoryjnego w stosunku do gospodarza naturalnego). Z drugiej jednak strony, nie udało się dotychczas wykryć białka PrP^{Sc} u cieląt i krów „zakażanych” tkanką mięśniową zwierząt chorych na BSE. Różnice w patogenezie trzęsawki owiec oraz BSE bydła (zwłaszcza predylekcja owczego białka prionowego do układu limfatycznego) oraz brak potwierdzonej transmisji czynnika wywołującego trzęsawkę owiec na człowieka (jak ma to miejsce w przypadku BSE) wskazują, że wyniki uzyskane w pracach nad trzęsawką owiec należy interpretować z ostrożnością w odniesieniu do BSE u bydła.

Piśmiennictwo

1. Aguzzi A., Heikenwalder M., Miele G.: Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases. *J. Clin. Invest.* 2004, 114, 153-160.
2. Andreoletti O., Simon S., Lacroux C., Morel N., Tabouret G., Chabert A., Lugan S., Corbiere F., Ferre P., Foucras G., Laude H., Eychemme F., Grassi J., Schelcher F.: PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat. Med.* 2004, 10, 591-593.
3. Bartz J. C., Kincaid A. E., Bessen R. A.: Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *J. Virol.* 2003, 77, 583-591.
4. Bosque P. J., Ryou C., Telling G., Peretz D., Legname G., DeArmond S. J., Prusiner S. B.: Prions in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 3812-3817.
5. Glatzel M., Abela E., Maissen M., Aguzzi A.: Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Eng. J. Med.* 2003, 349, 1812-1820.
6. Groschup M. H., Weiland F., Straub O. C., Pfaff E.: Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. *Neurobiol. Dis.* 1996, 3, 191-195.
7. Hamir A. N., Miller J. M., Cutlip R. C.: Failure to detect prion protein (PrP^{Sc}) by immunohistochemistry in striated muscle tissues of animals experimentally inoculated with agents of transmissible spongiform encephalopathy. *Vet. Path.* 2004, 41, 78-81.
8. Prusiner S. B.: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982, 216, 136-144.
9. Thomzig A., Kratzel C., Lenz G., Kruger D., Beekes M.: Widespread PrP^{Sc} accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep.* 2003, 4, 530-533.
10. Thomzig A., Schulz-Schaeffer W., Kratzel C., Mai J., Beekes M.: Preclinical deposition of pathological prion protein PrP^{Sc} in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J. Clin. Invest.* 2004, 113, 1465-1472.
11. Wells G. A., Hawkins S. A., Green R. B., Austin A. R., Dexter I., Spencer Y. I., Chaplin M. J., Stack M. J., Dawson M.: Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet. Rec.* 1998, 142, 103-106.

Adres autora: dr Mirosław Polak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: ppolak@piwet.pulawy.pl

❖❖❖❖ RECENZJE I BIBLIOGRAFIA ❖❖❖❖

MURRELL K. D. et al.: WHO/FAO/OIE Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis. (Przewodnik dla rozpoznawania, zapobiegania i zwalczania tasiemczyc i wągryc). Wyd. OIE 2005, str. 140, cena 30 euro. ISBN 92-9044-656-8.

Książka jest wspólnym dziełem trzech międzynarodowych organizacji: Światowej Organizacji Zdrowia – WHO, Organizacji Żywności i Rolnictwa – FAO oraz Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt – OIE, której redaktorem jest dr K. D. Murrell. Współautorami jest 18 pracowników nauki z różnych krajów świata, w tym także prof. Z. S. Pawłowski z Akademii Medycznej w Poznaniu, znany w naszym kraju parazytolog.

Tasiemczyce i wągryce należą do najbardziej rozpowszechnionych i nie zawsze rozpoznawanych chorób pasożytniczych, występujących na wszystkich kontynentach. W trosce o zdrowie społeczne wydany został ten wartościowy przewodnik w rozpoznawaniu, zapobieganiu i zwalczaniu tasiemczyc i wągryc, głównie u ludzi. W opracowaniu przewodnika wzięli udział czołowi światowi specjaliści.

Treść książki zawarta jest w 6 rozdziałach o następujących tytułach, które oddają charakter tego opracowania:

- 1) Biologia *Taenia Solium*, *T. saginata* i *T. saginata asiatica*,
- 2) Kliniczna wągryca: rozpoznawanie i leczenie,
- 3) Epidemiologia tasiemczyc i wągryc,
- 4) Wykrywanie i rozpoznawanie,
- 5) Zapobieganie tasiemczycom i wągrycom,
- 6) Sposoby zwalczania tasiemczyc i wągryc.

Książka jest wartościową pozycją.

