

Для цитирования: Юров, К.П. Особенности репродукции вируса болезни Борна в клетках головного мозга и лабораторная диагностика инфекции / К.П. Юров, С.В. Алексеенкова // Российский ветеринарный журнал. — 2019. — № 2. — С. 21–24. DOI: 10.32416/article_5cd16d07159988.78868190
 For citation: Yurov K.P., Alexeyenkova S.V., Features of Borna disease virus reproduction in brain cells and laboratory diagnosis of infection, Russian veterinary journal (Rossijskij veterinarnyj zhurnal), 2019, No. 2, pp. 21–24. DOI: 10.32416/article_5cd16d07159988.78868190

УДК 619: 616.98: 578

Особенности репродукции вируса болезни Борна в клетках головного мозга и лабораторная диагностика инфекции

К.П. Юров, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией вирусологии (konstyurov@yandex.ru),
С.В. Алексеенкова, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусологии (116176@mail.ru).

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» Российской академии наук (109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1)

Вирус болезни Борна (ВББ) представляет собой несегментированный РНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству *Bornaviridae*. Возбудитель вызывает у животных различных видов прогрессирующий менингоэнцефалит. Несмотря на многочисленные исследования, некоторые этапы репродукции борнавируса остаются мало изученными, в частности, рецептор-опосредованное проникновение, ретроградный транспорт в ядро, сборка и высвобождение вириона и др. В настоящем сообщении представлены результаты исследования, целью которого являлось проследить с помощью иммуноферментного и иммуногистохимического метода распределение основного белка ВББ — фосфопротеина Р (р24) в клетках головного мозга естественно-восприимчивых животных, сопоставить полученные данные с результатами исследований ряда авторов, выполненных преимущественно на экспериментальных моделях. При микроскопии гистологических срезов тканей головного мозга лошадей и овец, обработанных специфической сывороткой против р24 ВББ, в световом или люминесцентном микроскопе наблюдали специфическую окраску в виде: мелких гранул; диффузной флуоресценции цитоплазмы; более крупных гранул, что, очевидно, обусловлено агрегацией эндосом для их транспортировки по аксону; образования в виде бусин, демонстрирующие транспорт вирусного материала по аксону. *In vitro* получены результаты, свидетельствующие о возможности транспортировки РНЧ по короткому пути посредством цитоплазматических мостиков. Представленные результаты позволят лучше понять нейропатогенез болезни Борна и усовершенствовать диагностику болезни.

Ключевые слова: болезнь Борна, моногегавирус, лошади, реакция иммунофлуоресценции, нейрон, аксон, аксональный транспорт, сигнальные эндосомы, фосфопротеин Р (р24).

Features of Borna disease virus reproduction in brain cells and laboratory diagnosis of infection

K.P. Yurov, D.Sc, Ph.D in Veterinary, professor, Head of Laboratory of Virology (konstyurov@yandex.ru),
S.V. Alexeyenkova, Ph.D in Biology, leading researcher of Laboratory of Virology (116176@mail.ru).

Federal Research Center - All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences (24-1, Ryazanskyi prospect str., Moscow, 109428)

The Borna Disease Virus (BDV) is a non-segmented RNA-containing virus belonging to the *Bornaviridae* family. The pathogen causes progressive meningoencephalitis in animals of various types. Despite numerous studies, some stages of reproduction of Bornavirus remain poorly understood, in particular, receptor-mediated penetration, retrograde transport into the nucleus, assembly and release of the virion, etc. The present report presents the results of demonstrating studies that were aimed at following the immunoenzyme method, the distribution of the main protein BDV — phosphoprotein P (p24) in the brain cells of naturally susceptible animals, compare nnye data with the results of a number of authors, made mainly in experimental models. Microscopic examination of histological sections of the brain tissue of horses and sheep treated with specific serum against p24 BDV in a light or luminescent microscope observed a specific color in the form of: small granules; diffuse fluorescence of the cytoplasm; larger granules, apparently due to aggregation of endosomes, for axon transportation; formations in the form of beads, demonstrating the transport of viral material along the axon. *In vitro* results were obtained indicating that it is possible to transport RNPs via a short path through cytoplasmic bridges. The presented results will allow a better understanding of the neuropathogenesis of Born's disease and improve the diagnosis of the disease.

Keywords: Borna disease, monogegavirus, horses, immunofluorescence, neuron, axon, axonal transport, signal endosomes, phosphoprotein P (p24)

Сокращения: ВББ — вирус болезни Борна, п.о. — пара оснований, РНК — рибонуклеиновая кислота, РНЧ — рибонуклеочастица, ФИТЦ — флуоресцеин-5-изотиоцианат, ЦНС — центральная нервная система

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России по государственному заданию № 0578-2014-0023. Авторы не имеют конфликта интересов.

Введение

Вирус болезни Борна представляет собой несегментированный РНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству *Bornaviridae* [1]. Геном состоит из ~8900 п.о., это самый маленький из мононегавирусов, кодирующий только шесть белков (de la Torre, 1994): нуклеопротеин (N), вирусную полимеразу (L) и ее кофактор — фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и неструктурный малый белок (X). Оболочечный вирион содержит РНЧ, состоящую из вирусной геномной РНК, инкапсулированной в белки N, L, P и M. Оболочка состоит из мембраны, в которой обнаружены две изоформы вирусного белка G (84 и 43 кДа) [10].

In vivo ВББ преимущественно поражает нейроны ЦНС, но *in vitro* может инфицировать клетки разных типов [8]. Он имеет особенность, уникальную для большинства мононегавирусов — репликацию в инфицированных клетках без проявления цитопатического эффекта. Несмотря на многочисленные исследования, некоторые этапы цикла репликации борнавируса остаются неизвестными. После взаимодействия с еще неизвестным рецептором ВББ проникает в клетку путем клатрин-зависимого эндоцитоза с образованием пузырька, который сливается с ранней эндосомой. Затем подкисление поздней эндосомы обеспечивает слияние между вирусной и эндосомальной мембранами и высвобождение РНЧ [7]. После репликации генома и синтеза белка точные условия сборки вириона до сих пор остаются неизвестными. В частности, неизвестно, следуют ли РНЧ по anterograde и retrograde транспортному маршруту в оболочке или без нее [6]. Транспорт на большие расстояния по аксональному маршруту является необходимостью цикла репликации, поскольку сайты входа и выхода часто удалены от клеточной сомы.

Аксональный транспорт является ключевым механизмом для нейроинвазивных патогенов [15]. Действительно, большие расстояния, отделяющие сому клетки от нервных окончаний, подразумевают, что нейротропные вирусы должны использовать специализированные молекулярные двигатели для векторного перемещения вдоль аксонов, то есть они не могут полагаться исключительно на пассивную диффузию. Для патогенов описаны две основные стратегии ретроградного транспорта по аксонам [13].

Первый из них заключается в прямом наборе молекулярных моторов, таких как цитоплазматический динеин или связанный с ним комплекс динактин, как показано на примере вируса простого герпеса типа 1. После слияния мембран белки матрикса и тегумент вируса простого герпеса типа 1 высвобождаются в цитоплазму. Несколько вирусных белков затем рекрутируют динеин, динактин и адаптерные белки, обеспечивая быстрый ретроградный транспорт вдоль микротрубочек [9].

Другой стратегией для передачи патогенов через аксоны является использование везикулярного транспорта. Мембранные органеллы, такие как эндоцитарные и экзоцитарные везикулы, постоянно перемещаются вдоль аксонов, и некоторые патогены могут получить доступ к этим органеллам для распространения в ЦНС [12]. Например, это относится к аденовирусу собак типа 2, который проникает в клетку с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза и затем проникает в аксональные эндосомы [13]. Эти эндоцитарные структуры, также называемые «сигнальными эндосомами», обычно ответственны за транспорт нейротрофинов, таких как фактор роста нервов или нейротрофический фактор мозга, а также их соответствующие рецепторы p75NTR и TrkB [4, 5]. Важной характеристикой этих везикул является то, что pH их содержимого близок к нейтральному [3]. Это позволяет переносить содержимое на большие расстояния в защитной среде, избегая зависящих от pH конформационных изменений. Нейтральные аксональные эндосомы могут, следовательно, представлять собой идеальный транспортный путь для нейротропных вирусов, чтобы достичь клеточной сомы без дестабилизации вирусной частицы, предотвращая слияние мембран и преждевременное высвобождение вирусного генома [14].

Несмотря на многочисленные исследования, некоторые этапы цикла репликации борнавируса остаются мало изученными, в частности, рецептор-опосредованное проникновение, ретроградный транспорт в ядро, сборка и высвобождение вириона [11].

Цель исследования

Проследить с помощью иммуноферментного и иммуногистохимического метода распределение основного белка ВББ — фосфопротеина P (p24) в клетках головного мозга естественно-восприимчивых животных, сопоставить данные с результатами опытов по репликации борнавируса, выполненных преимущественно на экспериментальных моделях.

Материалы и методы

Исследование проводили по теме НИР 0578-2014-0023. Финансовая поддержка работы обеспечена Министерством науки и высшего образования России. Работу выполняли в лаборатории вирусологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Гистологические препараты были приготовлены из головного мозга лошадей и овец с признаками энцефаломиелита после их эвтаназии. Ткани фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, обезжиривали в спиртах, заливали в парафиновые блоки, из которых готовили срезы толщиной 5...7 микрон. Парафин удаляли в трех сменах ксилола, по 2 мин в каждой смене и трех сменах этилового спирта в концентрации 96 %, 96 % и 70 %. соответственно, по 2 мин в каждой смене. Срезы промывали охлажденным фосфатно-солевым буферным раствором (137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 10 мМ Na₂HPO₄; 2 мМ K₂HPO₄; pH 7,2). Для постановки реакции иммунофлуоресценции и иммуногистохимического метода использовали непрямой вариант. Применяли моноспецифическую поливалентную сыворотку кролика против фосфопротеина P вируса болезни Борна (p24) [2]. В качестве антивидового конъю-

югата использовали аффинно очищенные антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с ФИТЦ или пероксидазой хрена. Инкубацию проводили во влажной камере при температуре 37 °С в течение 45 мин. После каждого этапа срезы промывали фосфатно-солевым буферным раствором 3...4 раза. Для постановки реакции флуоресценции готовили препараты для исследования под люминесцентным микроскопом с нефлуоресцирующим иммерсионным маслом. Для иммуногистохимического метода использовали субстратный раствор на основе хромогена — 3, 3'-диаминобензидина. Реакцию учитывали с помощью светового микроскопа.

Результаты и обсуждение

Объектом нашего исследования служили пробы головного мозга больных лошадей и овец, полученные в период вспышки или спорадических случаев заболевания от животных с неврологическим синдромом. При микроскопии обработанных специфической сывороткой против р24 ВББ гистологических срезов тканей головного мозга лошадей и овец в световом или люминесцентном микроскопе наблюдали весьма сходную специфическую окраску или флуоресценцию клеток головного мозга, что подтверждало единую природу заболевания. На рисунках 1...4 представлены элементы структуры клеток головного мозга лошадей и овец, выявленные посредством специфической окраски гистосрезов методом иммунофлуоресценции или иммуногистохимическим методом:

- мелкие гранулы, «алмазный блеск»;
- диффузная флуоресценция цитоплазмы и крупные гранулы, которые концентрируются в цитоплазме нейрона. Очевидно, что в этом случае мы наблюдаем агрегацию эндосом, связанную с их транспортировкой по аксонам нейрона. Специфически окрашенные гранулы в виде бусин, демонстрирующие транспорт вирусного материала по аксону;
- антиген р24 ВББ (обнаруженный иммуногистохимическим методом);
- межклеточный транспорт вируса через цитоплазматические мостики.

Известна работа, характеризующая флуоресцирующие включения ВББ у птиц, свидетельствующие о наличии вирусного антигена р24, которые авторы описывают как «алмазный блеск», «изумрудная зернистость» [11]. Подобные включения мы наблюдали в клетках и межклеточном пространстве головного мозга овец и лошадей, но в меньшем количестве, что может быть обусловлено характером течения инфекционного процесса. Известно, что ВББ *in vivo* преимущественно поражает нейроны ЦНС, но *in vitro* может инфицировать клетки разных типов [8]. Он имеет особенность, уникальную среди мононегавирусов, репликацию в ядре инфицированных клеток без проявления цитопатического эффекта.

В наших опытах специфическое окрашивание клеточных элементов головного мозга отмечали при естественной борनावирусной инфекции в аксонах нейронов больной лошади (рис. 2). В связи с этим возникает вопрос: зафиксированный момент представляет собой anterograde или retrograde транспорт РНК вируса болезни Борна? Специфическое окрашивание мелких

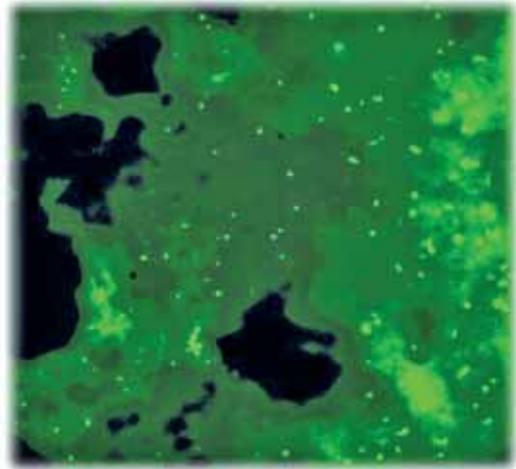


Рис. 1. Флуоресцирующие включения ВББ, которые описываются как «алмазный блеск», «изумрудная зернистость» — свидетельство наличия вирусспецифического антигена р24 (метод окраски — непрямая иммунофлуоресценция)
Fig. 1. Fluorescent inclusions BDV, which are described as «diamond brilliance», «emerald granularity» — evidence of virus-specific antigen p24 (method of staining — indirect immunofluorescence)

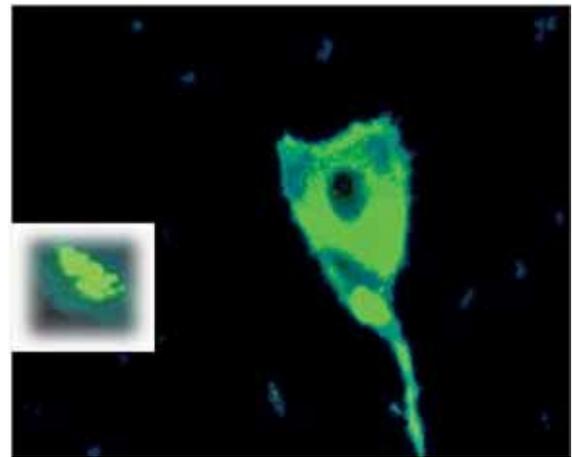


Рис. 2. Специфическая флуоресценция в цитоплазме и аксоне головного мозга лошади, агрегация гранул в участке клетки у основания аксона
Fig. 2. Specific fluorescence in cytoplasm and the axon of the horse's brain, aggregation of granules in the area of the cell base of the axon

частиц можно видеть в аксоне в виде бусин, которые в свою очередь имеют гранулированную структуру. Положительная реакция иммунофлуоресценции объясняется наличием в гранулах вирусспецифического белка р24, который является одним из компонентов РНЧ ВББ и в данном случае служит маркером, который позволяет (посредством реакции иммунофлуоресценции и гистоиммунологического теста) проследить топографию РНЧ ВББ. Конгломерат таких же гранул наблюдается в цитоплазме нейрона, на участке, находящемся в основании аксона. На том же снимке видно, что ядро нейрона остается темным, что указывает на отсутствие белка р24. Принимая во внимание полученные нами результаты и сопоставив их с данными некоторых авторов, можно считать, что на снимке зафиксирован retrograde транспорт вируса болезни Борна.

В опытах *in vitro* показано, что транспорт вирусного материала, помимо длительного аксонального пути,

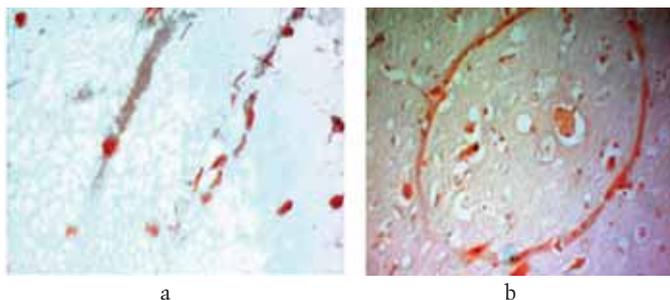


Рис. 3. Результаты иммуногистохимического теста в срезах головного мозга лошади (фото a, b)
Fig. 3. Results of immunohistochemical test in sections of the brain of a horse (photo a, b)

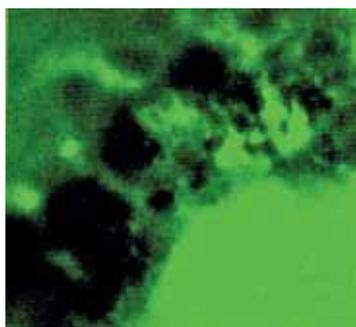


Рис. 4. Культура клеток Vero, межклеточный транспорт вирусного материала посредством «цитоплазматических мостиков»
Fig. 4. Vero cell culture, intercellular transport of viral material through «cytoplasmic bridges»

возможен существенно более коротким маршрутом — через «цитоплазматические мостики». На рисунке 4 видно проникновение эндосом в соседнюю клетку посредством такого мостика. В цитоплазме исходной клетки сохраняются темные вакуоли.

Заключение

Таким образом, результаты, полученные нами при исследовании срезов головного мозга лошадей и овец — естественно-восприимчивых к болезни Борна животных, совпадают с выводами ряда авторов о существенной роли аксонального транспорта ВБВ в нейропатогенезе инфекции. Эти данные позволяют обосновать эффективный для ВБВ механизм проникновения вирусной частицы в нейрон. В экспериментах *in*

vitro с культурой клеток Vero отмечено, что возможен также способ распространения вируса посредством образования «цитоплазматических мостиков», вследствие чего вирусные частицы избегают преждевременной инактивации в цитоплазме. Представленные результаты позволят лучше понять некоторые вопросы нейропатогенеза болезни Борна и усовершенствовать лабораторную диагностику болезни.

References

1. Yurov K.P., Detection of Bornavirus in horses, *Veterinary*, 2005, No. 3, pp. 8–9. (In Russ).
2. Yurov K.P., Alexeyenkova S.V., Immunological markers of Bornavirus, *Russian Veterinary Journal*, 2017, No. 1, pp. 5–9. (In Russ).
3. Bohnert S., Schiavo G., Tetanus toxin is transported in a novel neuronal compartment characterized by a specialized pH regulation, *Journal of Biological Chemistry*, 2005, Vol. 280, pp. 42336–42344.
4. Bucci C., Alifano P., Cogli L., The role of Rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin receptors, *Membranes*, 2014, Vol. 4, pp. 642–677.
5. Charlier C.M., Debaisieux S., Foret C., Thouard A., Schiavo G., Gonzalez-Dunia D., Malnou C.E., Neuronal retrograde transport of Bornavirus occurs in signalling endosomes, *Journal of General Virology*, 2016, Vol. 97, pp. 3215–3224.
6. Clemente R., de la Torre J.C., Cell-to-cell spread of Bornavirus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein, *Journal of Virology*, 2007, Vol. 81, pp. 5968–5977.
7. Clemente R., de la Torre J.C., Cell entry of Bornavirus follows a clathrin-mediated endocytosis pathway that requires Rab5 and microtubules, *Journal of Virology*, 2009, Vol. 83, pp. 10406–10416.
8. De la Torre J.C., Molecular biology of Bornavirus and persistence, *Frontiers in Bioscience*, 2009, Vol. 7, P. d569–d579.
9. Diefenbach R.J., Miranda-Saksena M., Douglas M.W., Cunningham A.L., Transport and egress of herpes simplex virus in neurons, *Review in Medical Virology*, 2008, Vol. 18, pp. 35–51.
10. Gonzalez-Dunia D., Cubitt B., de la Torre J.C., Mechanism of Bornavirus entry into cells, *Journal of Virology*, 1998, Vol. 72, pp. 783–788.
11. Herzog S., Enderlein D., Heffels-Redmann U., Piepenbring A., Neumann D., Kaleta E.F., Muller H., Lierz M., Herden C., Indirect Immunofluorescence Assay for Intra Vitam Diagnosis of Avian Bornavirus Infection in Psittacine Birds, *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, Vol. 48 (6), pp. 2282–2284.
12. Lalli G., Bohnert S., Deinhardt K., Verastegui C., Schiavo G., The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons, *Trends in Microbiology*, 2003, Vol. 11, pp. 431–437.
13. Salinas S., Bilisland L.G., Henaff D., Weston A. E., Keriell A., Schiavo G., Kremer E. J., CAR-associated vesicular transport of an adenovirus in motor neuron axons, *PLoS Pathogens*, 2009, Vol. 5, pp. e1000442.
14. Salinas S., G. Schiavo, E.J. Kremer, A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins, *Nature Reviews in Microbiology*, 2008, Vol. 8, pp. 645–655.
15. Taylor M.P., Enquist L.W., Axonal spread of neuroinvasive viral infections, *Trends in Microbiology*, 2015, Vol. 23, pp. 283–288.

Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации в 2018 году

Бруцеллез — эндемичность.

Бешенство (природноочаговое/ городское заболевание) — эндемичность.

Заразный узелковый дерматит (ЗУД) — эндемичность, выраженная сезонность, отмечается тенденция к распространению в ранее благополучные регионы.

Африканская чума свиней (АЧС) — страна эндемична с 2007 г., отмечается тенденция к распространению в благополучные регионы.

Оспа овец и коз — спорадические вспышки.

Ящур — эндемичность определенных зон/ регионов, ежегодно выявляются единичные вспышки.

Грипп птиц — эндемичность для определенных зон/ регионов, спорадические вспышки

Материалы предоставлены Информационно-аналитическим центром
Управления ветеринарии РСХН (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)
<https://www.fsvps.ru/fsvps/iac/rf/reports.html>