

УДК 578.76

# Способы оценки изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера и барьера ликвор-кровь при экспериментальном клещевом энцефалите

Курагина В.М.<sup>1</sup>, Мотузова О.В.<sup>1</sup>, Золотов Н.Н.<sup>2</sup>, Карганова Г.Г.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П.Чумакова» Российской академии наук. 108819, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Изучение взаимодействия нейротропных вирусов со структурами гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) является наиболее интересной и малоизученной темой. Показано, что вирусы значительно различаются по характеру этого взаимодействия и используют различные механизмы для преодоления ГЭБ на пути в центральную нервную систему (ЦНС). Вирусы напрямую или опосредованно оказывают влияние на проницаемость ГЭБ. Изменение проницаемости гематоликторного барьера (ГЛБ) при вирусной инфекции не изучалось. Целью данной работы было определить информативность методов оценки изменения проницаемости ГЭБ и ГЛБ. Методы. Используя интраперитонеальное (и/п) и интраспинальное (и/с) введение флуоресцеина натрия животным, зараженным двумя штаммами вируса клещевого энцефалита, оценивали изменение проницаемости ГЭБ и ГЛБ по соотношению флуоресценции гомогената головного или спинного мозга и флуоресценции сыворотки крови. Результаты. В данной работе при вирусной инфекции было выявлено как увеличение проницаемости ГЭБ, так и снижение проникновения краски в ЦНС из крови при и/п введении красителя и в кровь при его и/с введении, что объясняется характерным для клещевого энцефалита нарушением гемодинамики и тяжелыми поражениями ЦНС. Вывод. Использование красителей при сочетании различных способов введения, помимо информации об изменении проницаемости ГЭБ и ГЛБ, дает комплексную оценку нарушения мозгового кровообращения при вирусной инфекции.*

**Ключевые слова:** гематоэнцефалический барьер, клещевой энцефалит, гематоликторный барьер.

**Для цитирования:** Курагина В.М., Мотузова О.В., Золотов Н.Н., Карганова Г.Г. Способы оценки изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера и барьера ликвор-кровь при экспериментальном клещевом энцефалите. Патогенез. 2018; 16(2): 30–36

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.02.30-36

**Для корреспонденции:** Карганова Галина Григорьевна, e-mail: karganova@bk.ru.

**Финансирование:** Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований, проект № 15-04-04500.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 24.01.2018

## Methods for evaluating changes in permeability of the blood-brain barrier and liquor-blood barrier in experimental tick-borne encephalitis

Kuragina V.M.<sup>1</sup>, Motuzova O.V.<sup>1</sup>, Zolotov N.N.<sup>2</sup>, Karganova G.G.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> M.P.Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and- Biological Products of the Russian Academy of Sciences, Settlement of the Institute of Poliomyelitis, Home Ownership 8, Bldg. 1, Settlement Moskovsky, Moscow 108819, Russian Federation

<sup>2</sup> V.V.Zakusov Institute of Pharmacology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>3</sup> I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation

*Studying the interaction of neurotropic viruses with BBB structures is the most interesting and understudied subject. Viruses greatly differ in the nature of this interaction and use various mechanisms to overcome the BBB on the path to the central nervous system (CNS). Viruses affect permeability of the BBB directly or indirectly. Changes in permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCB) have not been studied in viral infection. The aim of this study was to assess the informative value of methods for determination of changes in BBB and BCB permeability. Methods. Using intraperitoneal (i/p) and intraspinal (i/sp) sodium fluorescein injections changes in BBB and BCB permeability were measured by the ratio of cerebral or spinal cord homogenate fluorescence to serum fluorescence in mice infected with two strains of tick-borne encephalitis virus. Results. This study found both increased BBB permeability and decreased dye penetration from blood into the CNS following the i/p dye injection.*

tion and into the blood following the i/sp dye injection in viral infection. This can be explained by the circulatory collapse and fatal injuries of the CNS typical for tick-borne encephalitis. **Conclusion.** Using different methods of dye injection provides a comprehensive assessment of cerebral circulatory disorders in viral infection in addition to information about changes in BBB and BCB permeability.

**Key words:** blood-brain barrier; tick-borne encephalitis; blood-cerebrospinal fluid barrier.

**For citation:** Kuragina V.M., Motuzova O.V., Zolotov N.N., Karganova G.G. [Methods for evaluating changes in permeability of the blood-brain barrier and liquor-blood barrier in experimental tick-borne encephalitis]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(2): 30–36 (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.02.30-36

**For correspondence:** Karganova Galina, e-mail: karganova@bk.ru

**Funding.** The study was funded by the Russian Foundation for Basic Research, project No. 15-04-04500.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest

**Received:** 24.01.2018

## Введение

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является структурой, которая изолирует и поддерживает гомеостаз ЦНС с помощью регулирования проницаемости стенок микрососудов головного мозга. Такая избирательная проницаемость обусловлена наличием так называемых плотных контактов между эндотелиальными клетками, выстилающими стенки микрососудов головного мозга [1, 2]. При патологических состояниях нервной системы, черепно-мозговых травмах, вирусной инфекции, отравлении токсическими веществами проницаемость ГЭБ может изменяться [3]. Описаны следующие пути проникновения вирусных частиц в ЦНС: трансцеллюлярный путь через эндотелиальные клетки [4]; репродукция вируса в клетках эндотелия сосудов головного мозга и выход вирионов с поверхности эндотелиальных клеток, обращенной к тканям головного мозга [5]; деструкция плотных контактов [5]; апоптоз эндотелиальных клеток; трансмиграция зараженных лейкоцитов («Троянский конь») [6]; увеличение проницаемости ГЭБ как ответ на воспалительный процесс, происходящий в инфицированных клетках (например, действие провоспалительных цитокинов) [7].

Род *Flavivirus* объединяет вирусы, циркуляция которых в природе связана с членистоногими переносчиками. Вирионы флавивирусов имеют липидную оболочку, геном представлен одноцепочечной РНК. Род делится на группы вирусов: переносимые комарами; переносимые клещами; не имеющие переносчиков; вирусы насекомых. Среди вирусов этого рода есть возбудители таких серьезных заболеваний, как желтая лихорадка, клещевой энцефалит, лихорадка Денге и т.д.

Для переносимого комарами вируса Денге показано, что увеличение проницаемости является необходимым условием для преодоления ГЭБ на пути в центральную нервную систему (ЦНС) [8]. Для вируса японского энцефалита описано проникновение в ЦНС путем трансцитоза [4].

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) — нейротропный флавivirus, переносчиком которого являются клещи. ВКЭ вызывает тяжелое заболевание человека, распространен на территории России и в большинстве Европейских стран, стран СНГ, а также в северных районах Китая и Японии [9–11]. ВКЭ обладает высокой нейротропностью и нейровирулентностью. Нейровирулентность в эксперименте оценивается как способность вируса размножаться в клетках ЦНС и вызывать заболевание и гибель лабораторных животных при интрацеребральном

введении. Нейротропность оценивается как способность вируса проникать в ЦНС и вызывать заболевание и гибель животных при интраперитонеальном (и/п) или субкутанном введении. Хотя штаммы ВКЭ могут значительно различаться по этим показателям, большинство из них обладают высокой нейротропностью и нейровирулентностью. Пути проникновения ВКЭ в ЦНС остаются до конца не изученными. Есть данные, указывающие на то, что ВКЭ проникает в ЦНС до увеличения проницаемости ГЭБ [12].

Наряду с ГЭБ существует гематоликворный барьер (ГЛБ) — барьер между кровью и цереброспинальной жидкостью, также имеющий большое значение в поддержании гомеостаза ЦНС. В мягких оболочках мозга обмен веществом между спинномозговой жидкостью и кровью происходит в обоих направлениях, в то время как в твердой оболочке мозга осуществляется только отток вещества из спинномозговой жидкости в кровь [13].

Изменение проницаемости ГЭБ и ГЛБ может иметь большое значение в патогенезе вирусных инфекций. На примере вируса леса Семлики и вируса Банзи было показано, что увеличение проницаемости ГЭБ положительно коррелирует с прогрессированием и тяжестью заболевания [14].

Существует несколько методик оценки изменения проницаемости ГЭБ: по степени проникновения красителей или меченых эритроцитов в ЦНС при их периферическом введении [12, 15]; по появлению белков, специфичных для ЦНС, в периферической крови [16]. Второй способ применяют в медицинской практике для выявления различных патологий ЦНС у человека. Появление в периферической крови нейроспецифических белков может быть связано как с разрушением клеток эндотелия и разрушением плотных контактов эндотелиальных клеток, так и с нарушением гематоликворного барьера.

Однако методы оценки и значение изменения проницаемости ГЛБ при вирусных инфекциях не описаны.

*Целью данной работы* было определить информативность методов оценки изменения проницаемости ГЭБ и ГЛБ. Для этого в процессе экспериментальной инфекции, вызванной двумя штаммами ВКЭ, мышам вводили краситель — флуоресцеин натрия. При периферическом введении красителя оценивали степень изменения проницаемости ГЭБ по появлению красителя в головном мозге животных. При интраспинальном введении красителя в ствол спинного мозга оценивали изменение проницаемости ГЛБ по появлению красителя в периферической крови.

## Материалы и методы

### Животные

В работе были использованы лабораторные мыши линии BALB/c, полученные из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» филиал «Столбовая», массой тела 14–16 г и возрастом 40–42 дня. Мышей содержали в соответствии с международными принципами биоэтики, включая рекомендации CIOMS 1985 года и доклад Рабочей группы FELASA 1996–1997 г. Все работы, связанные с животными, соответствовали этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных и поддержаны этическим комитетом ФГБНУ «ИПВЭ имени М.П.Чумакова РАН» (Заключение № 20 от 01 сентября 2016 г.).

### Вирусы клещевого энцефалита

В работе использованы штамм ЭК-328 (GenBank: DQ486861) сибирского подтипа и штамм Абсеттаров (GenBank: AF091005) европейского подтипа [17, 18]. Оба штамма обладают высокой нейровирулентностью и нейронинвазивностью. Работу с инфекционным материалом ВКЭ выполняли в лаборатории, аттестованной для работы с патогенами второй группы опасности для человека и имеющей лицензию на этот вид работ.

### Оценка изменения проницаемости ГЭБ

Заражение мышей проводили интраперитонеально (и/п) вирусом в дозе 6 lg БОЕ (бляшкообразующие единицы) в объеме 0,3 мл. В качестве контроля использовали животных, которым вводили физиологический раствор (ФГУП «ПИПВЭ имени М.П.Чумакова», РФ) в том же объеме. Флуоресцеин натрия (Harleco, США) растворяли в физиологическом растворе до концентрации 10 мг/0,1 мл. На 6–8-е сутки после заражения всем животным и/п вводили по 0,1 мл раствора флуоресцеина натрия. Через 30 минут после введения красителя животным внутримышечно вводили наркоз (Золетил, VirbacSanteAnimal, Франция). Далее проводили перфузию головного мозга физиологическим раствором в объеме 4 мл, предварительно отобрав пробы периферической крови. После перфузии извлекали головной мозг и хранили при температуре -70°C до выполнения дальнейших действий. Подготовку проб головного мозга и сывороток крови проводили по ранее описанной методике [12]. Из проб головного мозга готовили 10% гомогенат в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH 7,4. Гомогенаты центрифугировали при 14000 x g 10 мин при температуре 4°C. Супернатант разводили 15% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) в соотношении 1 : 10. Сыворотку крови разводили 1 : 10 ФСБ pH 7,4 и затем 15% ТХУ в соотношении 1 : 10. Все пробы инкубировали в течение 16–17 часов и температуре 4°C. Пробы повторно центрифугировали при 14000 x g 10 минут при температуре 4°C. Надосадочную жидкость разводили 1 : 1 боратным буфером pH 10. Флуоресценцию в каждой пробе измеряли с помощью люминесцентного спектрометра (Perkin-ElmerLS-5B) при длине волны возбуждения 480 нм и 538 нм — флуоресценции. Изменение проницаемости ГЭБ оценивали по отношению интенсивности флуоресценции в пробах головного мозга к флуоресценции в пробах сыворотки периферической крови и сравнивали с аналогичным показателем в контрольной группе животных.

### Оценка изменения проницаемости ГЛБ

Мышей и/п заражали дозами 3 lg БОЕ и 6 lg БОЕ в объеме 0,3 мл. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор в том же объеме. На 6-е сутки после заражения животным внутримышечно вводили наркоз (Золетил). Затем каждому животному интраспинально [19, 20] вводили по 5 мкл раствора флуоресцеина натрия в концентрации 2 мг/0,1 мл, через 13–15 минут у животных отбирали пробы периферической крови и после перфузии извлекали участок спинного мозга, в который проводили инъекцию (1 см с каждой стороны от места введения). Пробы спинного мозга до выполнения дальнейших действий хранили при температуре -70°C. 10% гомогенат спинного мозга готовили в ФСБ pH 7,4. Гомогенаты центрифугировали при 14000 x g 10 мин при температуре 4°C. Супернатант гомогената головного мозга разводили 15% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) в соотношении 1 : 10. Сыворотку крови разводили 15% ТХУ в соотношении 1 : 10. Все пробы инкубировали в течение 16–17 часов при температуре 4°C. Пробы повторно центрифугировали при 14000 x g 10 минут при температуре 4°C. Надосадочную жидкость разводили 1 : 1 боратным буфером pH 10. Флуоресценцию в каждой пробе измеряли, как описано выше. Изменение проницаемости ГЛБ оценивали по отношению флуоресценции в пробах сыворотки периферической крови к флуоресценции в пробах гомогената спинного мозга и сравнивали с аналогичным показателем в контрольной группе животных.

### Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных был использован U-критерий Манна–Уитни (пакет стандартных программ Microsoft Excel). Данные по выборкам приведены в виде среднего (*M*), медианы (*Me*) и разброса (*min — max*).

## Результаты

### Экспериментальная инфекция

При заражении обоими штаммами ВКЭ первые признаки заболевания появляются на 3–7-е сутки после заражения — у животных снижается двигательная активность, появляется взъерошенность, начинается снижение массы тела. На 6–8-е сутки у больных животных наблюдали парезы и параличи конечностей, снижение массы тела более 1,5 г. На терминальной стадии заболевания у животных отсутствовала двигательная активность, имелись признаки тяжелой интоксикации. Средняя продолжительность жизни животных (СПЖ), зараженных вирусом клещевого энцефалита, представлена в табл. 1.

Как видно из табл. 1, СПЖ животных, зараженных более высокой дозой вируса, значительно меньше. Штаммы вируса по показателю СПЖ не различаются.

### Оценка изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера

В контрольной группе животных, которым вводили физиологический раствор, среднее значение отношения флуоресценции гомогената головного мозга к флуоресценции в сыворотке крови составило 0,056 (*Me* = 0,054) (табл. 2).

К 6 суткам после заражения в группе животных, зараженных штаммом ЭК-328, заболели 14 из 17 зараженных животных. Значение отношения флуоресценции гомогената

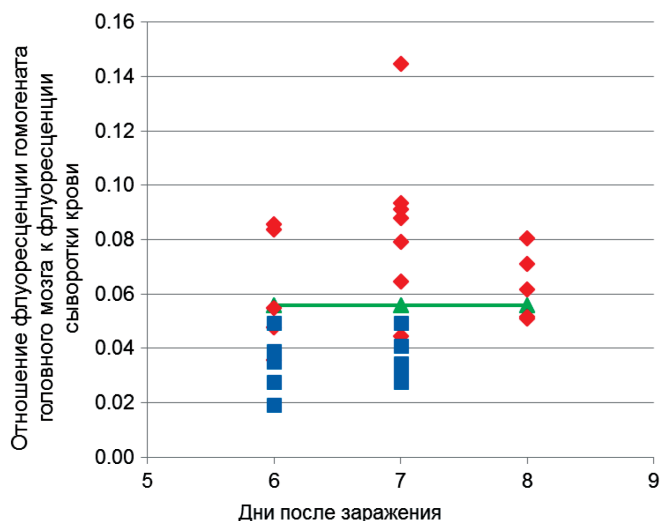


ната головного мозга к флуоресценции в сыворотке крови у больных животных составило 0,071 ( $Me = 0,063$ ), что статистически не отличается от данных, полученных в контрольной группе. Следует отметить, что у 3 животных, не заболевших в течение эксперимента, наблюдали достоверное увеличение проницаемости ГЭБ относительно контрольной группы (табл. 2).

В группе мышей, зараженных штаммом Абсеттаров, 7 из 10 животных находились на терминальной стадии заболевания. Среднее значение отношения флуоресценции гомогената головного мозга к флуоресценции сыворотки крови заболевших мышей составило 0,033 ( $Me = 0,032$ ), что достоверно ниже аналогичного показателя контрольной группы и заболевших животных, зараженных штаммом ЭК-328. У 3 животных, зараженных штаммом Абсеттаров и не имевших клинических проявлений заболевания, обнаружено достоверное снижение показателя флуоресценции относительно контрольной группы (табл. 2).

На рисунке наглядно видно, что штаммы различаются по значениям отношения флуоресценции гомогената головного мозга к флуоресценции сыворотки крови. Большой разброс данных, полученных от мышей, зараженных штаммом ЭК-328, не позволяет статистически подтвердить отличия между этой группой животных и контролем.

Таким образом, при заражении животных штаммом Абсеттаров и у заболевших животных, и у животных без клинических проявлений заболевания наблюдается статистически значимое снижение показателя отношения флуоресценции гомогената головного мозга к флуоресценции сыворотки крови. При заражении мышей штаммом ЭК-328 мы наблюдали увеличение проницаемости ГЭБ у животных без признаков заболевания, в то время как в группе заболевших животных не было статистически значимых отличий от контрольной группы.



Значения отношения флуоресценции гомогената головного мозга к флуоресценции сыворотки крови мышей, зараженных двумя штаммами ВКЭ. Красными ромбами отмечены данные, полученные от животных, зараженных штаммом ЭК-328; синими квадратами отмечены данные, полученные от животных, зараженных штаммом Абсеттаров. Зеленой линией отмечены усредненные данные контрольной группы (0,056).

#### Оценка изменения проницаемости ГЛБ

В контрольной группе животных, которым вводили физиологический раствор, отношение флуоресценции сыворотки крови к флуоресценции гомогената спинного мозга составило в среднем 0,178 ( $Me = 0,162$ ).

При заражении мышей штаммом Абсеттаров в дозе 6 lg БОЕ на 6-е сутки все животные в группе были тяжело больными. Среднее отношение флуоресценции сыворот-

Таблица 1

Средняя продолжительность жизни мышей, зараженных двумя штаммами вируса клещевого энцефалита, при интраперитонеальном введении ( $Me$ ;  $min - max$ )

Штамм ВКЭ	Доза вируса	Количество мышей	СПЖ, сутки
ЭК-328	3 lg БОЕ	5	14; 10 – 17
	6 lg БОЕ	6	9; 8 – 9 *
Абсеттаров	3 lg БОЕ	4	11
	6 lg БОЕ	4	9; 7 – 9 *

Примечание. \* – статистически значимые различия с более низкой дозой вируса ( $p \leq 0,05$ ).

Таблица 2

Оценка изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера при инфекции, вызванной двумя штаммами вируса клещевого энцефалита

Группа животных	Отношение флуоресценции гомогената головного мозга к флуоресценции сыворотки крови, $M [Me; min - max]$		
	Больные животные	Животные без клинических проявлений	Контроль
Штамм ЭК-328	0,071 [ $Me = 0,063$ ; 0,036 – 0,145] ( $n = 14$ )	0,079* [ $Me = 0,080$ ; 0,071 – 0,086] ( $n = 3$ )	0,056 [ $Me = 0,054$ ; 0,046 – 0,069] ( $n = 14$ )
Штамм Абсеттаров	0,033* [ $Me = 0,032$ ; 0,019 – 0,049] ( $n = 7$ )	0,041* [ $Me = 0,039$ ; 0,035 – 0,049] ( $n = 3$ )	

Примечание. \* – статистически значимые различия с контрольной группой ( $p \leq 0,05$ ).

ки крови к флуоресценции гомогената спинного мозга составило 0,091 ( $Me = 0,082$ ), что достоверно ниже, чем в контрольной группе (табл. 3). При заражении мышей более низкой дозой (3 lg БОЕ) на 6-е сутки ни у одного животного в группе не было признаков заболевания клещевым энцефалитом. Среднее значение показателя флуоресценции составило 0,110 ( $Me = 0,077$ ), что достоверно ниже, чем в контрольной группе. Были выявлены статистически значимые различия показателя флуоресценции в группе животных, зараженных высокой дозой штамма Абсеттаров от аналогичного показателя в группе мышей, зараженных низкой дозой этого штамма (табл. 3).

При заражении высокой дозой (6 lg БОЕ) штамма ЭК-328 клиническая картина была схожей. Все животные в группе заболели и имели тяжелые клинические симптомы — парезы, параличи конечностей, снижение массы тела. Отношение флуоресценции сыворотки крови к флуоресценции гомогената спинного мозга составило в среднем 0,139 ( $Me = 0,122$ ) (значимые различия с контрольной группой отсутствовали). При заражении низкой дозой животные в группе не имели признаков заболевания. Среднее отношение флуоресценции сыворотки крови к флуоресценции гомогената спинного мозга составило 0,108 ( $Me = 0,068$ ) (различия с контрольной группой статистически значимы) (табл. 3).

Статистически значимых различий между группами животных, зараженных разными штаммами, выявлено не было.

Таким образом, при оценке изменения проницаемости ГЛБ нами было выявлено статистически значимое, по сравнению с контролем, снижение показателя отношения флуоресценции сыворотки крови к флуоресценции гомогената спинного мозга в группе животных, зараженных штаммом Абсеттаров, и в группе животных, зараженных низкой дозой штамма ЭК-328.

### Обсуждение

ВКЭ вызывает серьезные поражения ЦНС у мышей, которые развиваются начиная с 4-го дня после заражения [21]. Гистологические описания данного феномена при-

водятся в большом количестве источников. Так, для клещевого энцефалита характерны: воспаление оболочек головного мозга, наличие инфильтрата клеточными элементами, в тканях головного мозга присутствует большое количество полнокровных сосудов, воспалительная реакция вокруг сосудов, дегенерация моторных клеток спинного мозга, отек головного мозга [21]. Следует отметить, что выявленные поражения ЦНС у мышей схожи с таковыми, описанными для материалов, полученных от людей, умерших от клещевого энцефалита.

При оценке проницаемости ГЭБ с помощью измерения количества флуоресцеина натрия в ЦНС после периферического введения мы обнаружили как увеличение содержания красителя в головном мозге, что свидетельствует об увеличении проницаемости ГЭБ, так и снижение содержания красителя в ЦНС по сравнению с контролем. Снижение содержания красителя в головном мозге можно объяснить нарушением гемодинамики и наличием отека головного мозга у больных животных при вирусной инфекции.

Увеличение проницаемости ГЭБ и поражения ЦНС мы наблюдали еще до появления клинических признаков заболевания. Штаммы вируса, близкие по вирулентности, могут значительно отличаться по характеру поражения ЦНС. У животных, зараженных штаммом ЭК-328, снижение флуоресценции в головном мозге значительно менее выражено, чем у животных, зараженных штаммом Абсеттаров.

О нарушении гемодинамики в ЦНС инфицированных животных свидетельствуют и данные, полученные при изучении ГЛБ. При развитии патологических изменений в ЦНС в процессе вирусной инфекции, по-видимому, нарушается отток ликвора в кровь. Для штамма Абсеттаров эти нарушения выражены значительно сильнее.

Полученные данные показывают, что при развитии вирусной инфекции происходят два процесса: увеличение проницаемости ГЭБ и нарушение гемодинамики вследствие развития отека головного мозга, разрушений стенок сосудов и других патологических изменений тканей головного и спинного мозга.

Таблица 3

Оценка изменения проницаемости гематоликворного барьера при инфекции, вызванной двумя штаммами вируса клещевого энцефалита

Группа животных	Отношение флуоресценции сыворотки крови к флуоресценции гомогената спинного мозга, $M [Me; min - max]$		
	Больные животные	Животные без клинических проявлений	Контроль
Штамм ЭК-328 (доза 3 lg БОЕ)	Отсутствовали	0,108* [ $Me = 0,068; 0,065 - 0,193$ ] ( $n = 6$ )	0,178 [ $Me = 0,162; 0,1 - 0,305$ ] ( $n = 7$ )
Штамм ЭК-328 (доза 6 lg БОЕ)	0,139 [ $Me = 0,122; 0,072 - 0,264$ ] ( $n = 6$ )	Отсутствовали	
Штамм Абсеттаров (доза 3 lg БОЕ)	Отсутствовали	0,110* [ $Me = 0,077; 0,053 - 0,189$ ] ( $n = 8$ )	
Штамм Абсеттаров (доза 6 lg БОЕ)	0,091* [ $Me = 0,082; 0,051 - 0,116$ ] ( $n = 7$ )	Отсутствовали	

Примечание. \* — статистически значимые различия с контрольной группой ( $p \leq 0,05$ ).

## Выводы

Использование красителей при сочетании различных способов введения помимо информации об изменении проницаемости ГЭБ и ГЛБ позволяет дать более широкую оценку нарушению мозгового кровообращения при вирусной инфекции. Это является важным моментом при проведении сравнительных экспериментов и оценки эффективности противовирусных препаратов.

## Список литературы

1. Ballabh P., Braun A., Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 2004; 16(1): 1-13. DOI: 10.1016/j.nbd.2003.12.016
2. Serlin Y., Shelef I., Knyazer B., Friedman A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015; (38): 2-6. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.01.002
3. Hawkins B.T., Davis T.P. The blood-brain barrier / neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 2005; (57): 173-185. DOI: 10.1124/pr.57.2.4
4. Liou M.L., Hsu C.Y. Japanese encephalitis virus is transported across the cerebral blood vessels by endocytosis in mouse brain. *Cell Tissue Res.* 1998; 293: 389-394.
5. Verma S., Lo Y., Chapagain M., Lum S., Kumar M., Gurjav U., Luo H., Nakatsukal A., Nerurkar V.R. *Virology.* 2009; 385(2): 425-433. DOI:10.1016/j.virol.2008.11.047
6. Roe K., Kumar M., Lum S., Orillo B., Nerurkar V.R., Verma S. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J. Gen. Virol.* 2012; 93 (Pt 6): 1193-1203. DOI 10.1099/vir.0.040899-0
7. Mayhan W.G. Cellular mechanisms by which tumor necrosis factor-alpha produces disruption of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2002; (927): 144-152.
8. Chaturvedi U.C., Dhawan R., Khanna M., Mathur A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. *J. Gen. Virol.* 1991; 72 (Pt 4): 859-866. DOI:10.1099/0022-1317-72-4-859
9. Чунихин С.П., Леонова Г.Н. *Экология и географическое распространение арбовирусов.* М.: Медицина; 1985. 125 с.
10. Takashima I., Morita K., Chiba M., Hashimoto N. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(8): 1843-1947.
11. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick — borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt 1): 179-185. DOI: 10.1099/0022-1317-80-1-179
12. Ruzek D., Salat J., Singh S., Kopecky J. Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells. *PLoS One.* 2011; 6(5): e20472. DOI: 10.1371/journal.pone.0020472
13. Имунная система мозга и спинномозговой жидкости. 2013; 14 (4): 241-253.
14. Olsen A.L., Morrey J.D., Smee D.F., Sidwell R.W. Correlation between breakdown of the blood-brain barrier and disease outcome of viral encephalitis in mice. *Antiviral Res.* 2007; 75(2): 104-112. DOI: 10.1016/j.antiviral.2006.11.013
15. Mathur A., Khanna N., Chaturvedi U.C. Breakdown of blood-brain barrier by virus-induced cytokine during Japanese encephalitis virus infection. *Int. J. Exp. Pathol.* 1992; 73(5): 603-611.
16. Галиева Г.Ю., Попонникова Т.В., Доблер Г., Хуферт Ф. Клинико-прогностические аспекты исследования нейронспецифической енолазы и белка NS-100 при клещевых нейроинфекциях. *Медицина в Казбассе* 2008; (5): 39-43.
17. Kozlovskaya L.I., Shevtsova A.S., Romanova L.I., Rogova Y.V., Dzhivaniyan T.I., Lyapustin V.N., Pivanova G.P., Gmyl A.P., Palyulin V.A., Karganova G.G. Gag-binding variants of Tick-Borne Encephalitis virus. *Virology.* 2010; 398 (2): 262-272. DOI: 10.1016/j.virol.2009.12.012
18. Romanova L.I., Gmyl A.P., Dzhivaniyan T.I., Bakhmutov D.V., Lukashov A.N., Gmyl L.V., Romyantsev A.A., Burenkova L.A., Lashkevich V.A., Karganova G.G. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology.* 2007; 362 (1): 75-84. DOI: 10.1016/j.virol.2006.12.013

19. Abe S., Ota Y., Koike S., Kurata T., Horie H., Nomura T., Hashizume S., Nomoto A. Neurovirulence test for oral live poliovaccines using poliovirus-sensitive transgenic mice. *Virology.* 1995; 206(2): 1075-1083. DOI: 10.1006/viro.1995.1030

20. Dragunsky E., Nomura T., Karpinski K., Furesz J., Wood D.J., Pervikov Y., Abe S., Kurata T., Vanlooocke O., Karganova G., Taffs R., Heath A., Ivshina A., Levenbook I. Transgenic mice as an alternative to monkeys for neurovirulence testing of live oral poliovirus vaccine: validation by a WHO collaborative study. *Bull. World Health Organ.* 2003; 81(4): 251-260.

21. Авакян А.А., Левкович Е.Н., Буснюк М.М. Изучение морфологии нервных клеток, пораженных вирусами клещевого энцефалита и сходных с ним заболеваний. *Вопросы вирусологии.* 1960; (2): 208-216.

## References

1. Ballabh P., Braun A., Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 2004; 16(1): 1-13. DOI: 10.1016/j.nbd.2003.12.016
2. Serlin Y., Shelef I., Knyazer B., Friedman A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015; (38): 2-6. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.01.002
3. Hawkins B.T., Davis T.P. The blood-brain barrier / neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 2005; (57): 173-185. DOI: 10.1124/pr.57.2.4
4. Liou M.L., Hsu C.Y. Japanese encephalitis virus is transported across the cerebral blood vessels by endocytosis in mouse brain. *Cell Tissue Res.* 1998; 293: 389-394.
5. Verma S., Lo Y., Chapagain M., Lum S., Kumar M., Gurjav U., Luo H., Nakatsukal A., Nerurkar V.R. *Virology.* 2009; 385(2): 425-433. DOI:10.1016/j.virol.2008.11.047
6. Roe K., Kumar M., Lum S., Orillo B., Nerurkar V.R., Verma S. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J. Gen. Virol.* 2012; 93 (Pt 6): 1193-1203. DOI 10.1099/vir.0.040899-0
7. Mayhan W.G. Cellular mechanisms by which tumor necrosis factor-alpha produces disruption of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2002; (927): 144-152.
8. Chaturvedi U.C., Dhawan R., Khanna M., Mathur A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. *J. Gen. Virol.* 1991; 72 (Pt 4): 859-866. DOI:10.1099/0022-1317-72-4-859
9. Chunikhin S.P., Leonova G.N. [Ecology and geographical distribution of arboviruses]. M.: Meditsina; 1985. 125 pp. (In Russian)
10. Takashima I., Morita K., Chiba M., Hashimoto N. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(8): 1843-1947.
11. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick — borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt 1): 179-185. DOI: 10.1099/0022-1317-80-1-179
12. Ruzek D., Salat J., Singh S., Kopecky J. Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells. *PLoS One.* 2011; 6(5): e20472. DOI: 10.1371/journal.pone.0020472
13. Sepiashvili R.I. [Immune system of the brain and cerebrospinal fluid]. *Allergologiya i immunologiya [Allergology and Immunology]*. 2013; 14(4): 241-253. (In Russian)
14. Olsen A.L., Morrey J.D., Smee D.F., Sidwell R.W. Correlation between breakdown of the blood-brain barrier and disease outcome of viral encephalitis in mice. *Antiviral Res.* 2007; 75(2): 104-112. DOI: 10.1016/j.antiviral.2006.11.013
15. Mathur A., Khanna N., Chaturvedi U.C. Breakdown of blood-brain barrier by virus-induced cytokine during Japanese encephalitis virus infection. *Int. J. Exp. Pathol.* 1992; 73(5): 603-611.
16. Galieva G. Yu., Poponnikova T. V., Dobler G., Hufert F. [Clinical and prognostic aspects of the study of neuron-specific enolase and protein NS-100 in tick-borne infections.] *Meditsina v Kuzbasse [Medicine in Kuzbass]*. 2008; (5): 39-43. (In Russian)
17. Kozlovskaya L.I., Shevtsova A.S., Romanova L.I., Rogova Y.V., Dzhivaniyan T.I., Lyapustin V.N., Pivanova G.P., Gmyl A.P., Palyulin V.A., Karganova G.G. Gag-binding variants of Tick-Borne Encephalitis virus. *Virology.* 2010; 398 (2): 262-272. DOI: 10.1016/j.virol.2009.12.012

18. Romanova L.I., Gmyl A.P., Dzhivaniyan T.I., Bakhmutov D.V., Lukashev A.N., Gmyl L.V., Romyantsev A.A., Burenkova L.A., Lashkevich V.A., Karganova G.G. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology*. 2007; 362 (1): 75-84. DOI: 10.1016/j.virol.2006.12.013

19. Abe S., Ota Y., Koike S., Kurata T., Horie H., Nomura T., Hashizume S., Nomoto A. Neurovirulence test for oral live poliovaccines using poliovirus-sensitive transgenic mice. *Virology*. 1995; 206(2): 1075-1083. DOI: 10.1006/viro.1995.1030

20. Dragunsky E., Nomura T., Karpinski K., Furesz J., Wood D.J., Pervikov Y., Abe S., Kurata T., Vanlooche O., Karganova G., Taffs R., Heath A., Ivshina A., Levenbook I. Transgenic mice as an alternative to monkeys for neurovirulence testing of live oral poliovirus vaccine: validation by a WHO collaborative study. *Bull. World Health Organ*. 2003; 81(4): 251-260.

21. Avakyan A.A., Levkovich E.N., Busnyuk M.M. [The study of the morphology of nerve cells affected by tick-borne encephalitis viruses and similar diseases]. *Voprosy virusologii [Questions of Virology]* 1960; (2): 208-216. (In Russian)

#### **Сведения об авторах**

Курагина Вера Михайловна — научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова» Российской академии наук

Мотузова Оксана Вячеславовна — младший научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова» Российской академии наук

Золотов Николай Николаевич — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Карганова Галина Григорьевна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией биологии арбовирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова» Российской академии наук, профессор кафедры организации и технологии производства иммунобиологических препаратов Института трансляционной медицины и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)