

АЛЕКСАНДРОВ

Андрей Георгиевич

ВЛИЯНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ НА ТЕЧЕНИЕ ОСТРОГО  
ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЁГКИХ, ВЫЗВАННОГО ВИРУСОМ ГРИППА А(Н1N1)pdm09

1.5.10. – вирусология

3.3.6. – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научные руководители:**

доктор биологических наук  
Жилинская Ирина Николаевна

доктор медицинских наук, профессор  
Саватеева-Любимова Татьяна Николаевна

**Официальные оппоненты:**

**Малышев Владимир Васильевич** – заслуженный работник высшей школы Российской Федерации, профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, доктор медицинских наук (1.5.10.), доцент

**Оковитый Сергей Владимирович** – заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургской Государственной химико-фармацевтической академии Минздрава России, доктор медицинских наук (3.3.6.), профессор

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «17» мая 2022 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 21.1.017.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197376, ул. Профессора Попова, 15/17)

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на официальном сайте ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г

Учёный секретарь диссертационного совета

Кандидат биологических наук

**Амосова И.В.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) ежегодно регистрируют от 3-х до 5-ти миллионов случаев тяжёлого течения гриппозной инфекции. При этом, несмотря на комплексную терапию, количество летальных исходов доходит до 0,65 миллионов случаев [ВОЗ, 2019]. Наиболее тяжёлая форма течения гриппозной инфекции наблюдается при инфицировании вирусом гриппа типа А [Киселёв О.И., 2016; Caini S., 2018]. Из всех подтипов вируса гриппа А ключевыми для человеческой популяции являются подтипы H1N1 и H3N2 [Flu News Europe, 2019]. В случаях тяжёлого течения заболевания у пациентов развивается острое повреждение лёгких/острый респираторный дистресс синдром (ОПЛ/ОРДС), в основе которого лежит системная воспалительная реакция [Samra T., 2011; Clowes G.H.A., 2011; Bernard G.R., 1994; Ferguson N.D., 2012]. По данным ВОЗ в период пандемии гриппа А(H1N1)pdm09 в 2009 году количество больных с таким грозным осложнением гриппа составило от 10 до 30% от всех заболевших. При этом, несмотря на проводимую интенсивную терапию, в том числе, противовоспалительную, смертность среди данного контингента доходила до 30 % [Чучалин А.Г., 2014; Hendrickson C.M., 2013; Torfer L., 2014]. По современным представлениям в патогенезе СРВ, наряду с Толл-подобными рецепторами и рецепторами цитокинов, отдельную роль играют интермедиаты углеводного обмена, в частности гликолиза [Cohen-Or I., 2011; Bengmark S., 2007; Wu L., 2011; Rhee S.Y., 2018]. Последние образуют аддукты с белками тканей и крови, называемые конечными продуктами гликирования (КПГ). Примерами КПГ являются такие вещества, как метилглиоксальлизин димер, 6-карбоксиэтиллизин, 6-карбоксиметиллизин и пентозидин [Ahmed N., 2003; Cerami A., 2008; Degenhardt T.P., 1998; Wells-Knecht K.J., 1995; Bullock P.T.B., 2014]. Взаимодействуя с соответствующими рецепторами (рецепторами КПГ, рКПГ), они запускают каскад внутриклеточных реакций, ведущий к экспрессии провоспалительных цитокинов и трансформации моноцитов в макрофаги с последующей активацией миелопероксидазы, приводящей к образованию активных форм кислорода (АФК). Образованные АФК, непосредственно оказывая повреждающее действие на альвеолоциты и другие клетки лёгочной паренхимы, способствуют воспроизведению новых КПГ [Guo W.A., 2012; Bansal S., 2011; Zhang M., 2006].

Вышеизложенное определяет актуальность изучения роли КПГ в патогенезе ОПЛ, обусловленного гриппозной инфекцией, с целью разработки подходов к поиску средств, направленных на ограничение их накопления.

### **Степень разработанности темы исследования**

Особенностью течения ОПЛ/ОРДС вирусного генеза является недостаточная эффективность этио- и патогенетической терапии, включающей в себя противовирусные препараты, глюкокортикостероиды, НПВС (аспирин), иммуномодуляторы (препараты интерферона [Quispe-Laime A.M., 2010; ВОЗ, 2019], что обусловило необходимость разработки новых подходов к фармакологической коррекции данной патологии. Была сформулирована концепция, заключающаяся в поиске средств, регулирующих течение системной воспалительной реакции путем влияния на различные молекулярные механизмы индукции воспаления. Так, в качестве возможных мишеней действия лекарственных средств рассматривались Toll-подобные рецепторы, аденозиновые А (2А) рецепторы, белок RIG-1 и инфламмосома (в качестве комплекса белков) [Киселёв О.И., 2016; Weiss R., 2015; Herold S., 2015; Sivak K.V., 2016]. В настоящее время убедительно показана и значимая роль лигандов рКПГ в развитии системного воспаления, как в клинике, так и в эксперименте [van Zoelen M.A., 2008; Liliensiek B., 2004]. Установлено, что чрезмерное накопление КПГ приводит к развитию оксидативного стресса, характеризующегося генерацией АФК и инактивацией ферментов, участвующих в антиоксидантной защите (каталаза и глутатион-пероксидаза), а также NF-κB-опосредованным усилением экспрессии генов, кодирующих провоспалительные цитокины (в частности IL-1β, IL-6, TNF-α) [Балаболкин М., 2002; Nowotny K., 2015; Chawla D., 2019]. В доступной литературе работы по изучению возможности ограничения процесса воспаления блокаторами накопления КПГ представлены крайне редко [Dudhgaonkar S.P., 2006; Kołodziej-Sobocińska M., 2012; Matsui T., 2016].

### **Цель исследования**

На основе изучения роли конечных продуктов гликирования в патогенезе вирус-индуцированного острого повреждения легких обосновать возможность использования средств, ограничивающих их накопление, в экспериментальной терапии данного осложнения гриппозной инфекции.

### **Задачи исследования**

1. Провести экспериментальное моделирование острого повреждения лёгких в условиях заражения мышей вирусами гриппа A/California/07/2009MA (mouse-adapted) (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2) и охарактеризовать его развитие по показателям летальности, степени насыщения гемоглобина крови кислородом, выраженности повреждения легочной паренхимы и процесса воспаления. Оценить роль конечных продуктов гликирования в формировании острого повреждения лёгких вирусного генеза.

2. Изучить влияние предшественника конечных продуктов гликирования метилглиоксаля на течение острого повреждения лёгких у мышей при гриппозной инфекции.
3. Изучить влияние блокатора процесса накопления конечных продуктов гликирования аминогуанидина бикарбоната на течение острого повреждения лёгких у мышей при гриппозной инфекции.
4. Провести экспериментальное моделирование сахарного диабета у мышей до заражения вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 и охарактеризовать особенности течения острого повреждения лёгких при наличии сопутствующей патологии.
5. Оценить возможность коррекции вирус-ассоциированного острого повреждения лёгких, отягощённого сопутствующим аллоксан-индуцированным сахарным диабетом, путём применения аминогуанидина бикарбоната.

#### **Научная новизна исследования**

Впервые проведена оценка роли накопления КПП в легких на течение ОПЛ, обусловленного заражением мышей вирусами гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA.

Впервые установлена значимая корреляционная зависимость между уровнем КПП и специфическими биомаркерами ОПЛ/ОРДС (степень насыщения гемоглобина крови кислородом и повреждения легочной паренхимы, уровень провоспалительных цитокинов в легких), что выявило роль первых в патогенезе вирус-индуцированного ОПЛ.

Впервые установлено, что предшественник накопления КПП метилглиоксаль (МГ) вызывает у мышей, зараженных вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09, утяжеление течения ОПЛ по показателям выживаемости, динамики величины сатурации гемоглобина кислородом, площади кровоизлияний и степени повреждения лёгких.

Впервые установлено, что экспериментальная терапия блокатором накопления КПП аминогуанидина бикарбонатом оказывает протективное действие в отношении ряда показателей, характеризующих степень тяжести ОПЛ, у животных, зараженных вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09, в том числе, при сопутствующем сахарном диабете (СД).

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость работы заключается в раскрытии роли КПП в патогенезе ОПЛ при экспериментальной тяжелой гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09; A/Aichi/2/68MA (H3N2). Выявленная зависимость между уровнем накопления КПП и степенью тяжести течения болезни позволила обосновать необходимые подходы к фармакологической коррекции вирус-индуцированного ОПЛ.

Научно обоснована эффективность коррекции течения ОПЛ при гриппозной инфекции с помощью блокатора накопления КПП аминоксидина бикарбоната, в том числе, при наличии сопутствующей патологии в виде СД. Позитивное воздействие последнего реализуется на уровне образования ковалентных связей с промежуточными продуктами реакции Амадори с формированием устойчивого комплекса, что предотвращает их взаимодействие с аминоксидной группой белков и глико-липидов.

Практическая значимость работы заключается в экспериментальном обосновании разработки подходов к поиску средств, ограничивающих чрезмерное накопление КПП, с целью изучения их эффективности в составе комплексной экспериментальной терапии ОПЛ/ОРДС вирусного генеза.

#### **Методология и методы исследования**

Методология исследования состояла в моделировании вирус-индуцированного ОПЛ, вызванного вирусами гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2), формирование которого оценивали по величине сатурации гемоглобина крови кислородом, уровню провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  в лёгких, маркерным гематологическим показателям воспаления, патоморфологическим и гистологическим изменениям в легочной паренхиме. Моделирование СД осуществляли с помощью  $\beta$ -клеточного цитотоксина аллоксана моногидрата.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Избыточное образование конечных продуктов гликирования является одним из важных звеньев патогенеза острого повреждения легких при тяжелой гриппозной инфекции у мышей.
2. Лечебно-профилактическое применение блокатора образования конечных продуктов гликирования аминоксидина бикарбоната обеспечивает протективный эффект в отношении основных биомаркеров острого повреждения легких при гриппозной инфекции у мышей, в том числе при сопутствующем сахарном диабете.

### **Степень достоверности исследования**

Степень достоверности определяется необходимым количеством экспериментальных животных, использованных в исследовании, адекватными вирусологическими, фармакологическими, физиологическими, иммунологическими, биохимическими и морфологическими методами исследования и корректными методами статистической обработки.

### **Апробация результатов исследования**

Результаты и основные положения работы доложены и обсуждены на научно-практической конференции-биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение» (Санкт-Петербург, 2016); Первой Всероссийской научной конференции «Токсикология и радиобиология XXI века» (Санкт-Петербург, 2017); международной конференции «Trends in influenza research 2017» (Санкт-Петербург, 2017); 18-ом Всероссийском конгрессе (Всероссийская научно-практической конференция с международным участием) «Скорая медицинская помощь-2019», посвященная 120-летию скорой медицинской помощи в России (Санкт-Петербург, 2019); VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов – 2019 (Новосибирск, 2019), Пятнадцатая евразийская научная конференция Донозология-2020 (Санкт-Петербург, 2020), Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIV Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2021).

### **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно планировал эксперимент и выполнял основные клинико-лабораторные и инструментальные исследования. Диссертант провёл статистическую обработку данных, описал и обобщил полученные результаты. Доля участия автора в получении и накоплении результатов, в статистической обработке – 100%, в проведении вирусологических исследований – 80 % гистологических исследований – 80%, биохимических исследований – 80%, иммунологических исследований – 50%.

### **Связь темы диссертации с плановой тематикой научно-исследовательской работы учреждения**

Диссертационная работа выполнена в рамках Государственного задания № 056-00134-16-03 «Роль клеточных сигнальных путей в патогенезе полиорганной недостаточности на фоне тяжелой острой респираторной инфекции».

### **Публикации**

По теме диссертационной работы опубликовано 11 научных работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста, включает 52 рисунка и 21 таблиц. Состоит из введения, четырёх глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов), выводов, списка сокращений, библиографического списка литературы, включающего 334 источников (99 – на русском языке, 235 – на иностранных языках).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Эксперименты выполнены на 690 беспородных мышках самках, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАН (пос. Рапполово, Ленинградская область). Манипуляции с животными были проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (Rus-LASA, 2012). Проведение работы было одобрено на заседании этического комитета ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ (протокол № 100 от 15.12.2015).

**Используемые штаммы вируса гриппа А:** A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2) из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Моделирование вирус-ассоциированного ОПЛ/ОРДС осуществляли путем интраназального введения мышам самкам изучаемых штаммов в дозе 1 ЛД<sub>50</sub>. Вирусную природу ОПЛ подтверждали по наличию вирусной нагрузки в лёгких путём постановки реакции гемагглютинации на 4-е и 7-е сутки после инфицирования.

**Используемые фармакологические зонды:** Предшественник образования КПП МГ (2-оксопропаналь, Sigma-Aldrich, США, M0252-100ML) вводили в дозе 50 мг/кг ежедневно подкожно (п/к) в течение 10 дней до инфицирования [Berlanga J., 2005; Al-shabanah O., 2000]. Блокатор образования КПП аминоксидина бикарбонат (Acros Organic, США, 149060010) вводили в дозе 25 мг/кг/день п/к в течение 7 дней после инфицирования [Farhad A.R., 2011]. Рабочие растворы испытуемых веществ готовили в фосфатно-солевом буфере.

$\beta$ -цитотоксин аллоксана моногидрат (Acros Organic, США, 215370100) вводили в дозе 180 мг/кг однократно п/к за 10 дней до инфицирования [Kikumoto Y., 2010]. Критерием включения животных в эксперимент являлось увеличение уровня глюкозы в цельной крови с 4,5 – 6,4 ммоль/л до 15,5 – 16,5 ммоль/л, т.е., в 2,5 раза [Kalungia A.C., 2018]

#### **Экспериментальные группы**

При моделировании ОПЛ экспериментальные группы составили: 1. Интактные животные; 2. Мыши, инфицированные вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09; 3. Мыши, инфицированные вирусом гриппа A/Aichi/2/68MA (H3N2).

При изучении влияния МГ на течение ОПЛ экспериментальные группы составили: 1. Интактные животные; 2. Мыши, инфицированные вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09; 3. Мыши, получавшие МГ до инфицирования.

При изучении влияния амингуанидина бикарбоната на течение ОПЛ экспериментальные группы составили: 1. Интактные животные; 2. Мыши, инфицированные вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09; 3. Мыши, получавшие амингуанидина бикарбонат после инфицирования.

При изучении влияния амингуанидина бикарбоната на течение ОПЛ на фоне аллоксан-индуцированного СД экспериментальные группы составили: 1. Интактные животные; 2. Мыши, инфицированные вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09; 3. Инфицированные мыши с преморбидной патологией в виде аллоксан-индуцированного СД; 4. Мыши с преморбидной патологией, получавшие амингуанидина бикарбонат после инфицирования.

Изучаемые показатели регистрировали на 4-е и 7-е сутки после введения вирусосодержащего материала на 5-ти мышах на каждый срок. Забор биоматериала проводили после плановой эвтаназии путем помещения животных в CO<sub>2</sub> бокс. На 14-е сутки выжившие животные были подвергнуты плановой эвтаназии. О роли модуляторов рецепторов КПП в патогенезе вирус-ассоциированного ОПЛ/ОРДС судили по уровню летальности, сатурации гемоглобина крови кислородом, степени поражения легочной ткани, изменению лейкоцитарной формулы в крови и содержанию провоспалительных цитокинов в легких. Анализ уровня сатурации гемоглобина крови кислородом проводили по методу Jonxis J.H.P. [Jonxis J.H.P., 1943]. Забор крови для исследования осуществляли из буккального синуса. Оптическую плотность растворов гемоглобина регистрировали на приборе АБхФк-02 НПП-ТМ (Россия). Степень поражения легочной ткани оценивали

согласно методике [Matute-Bello G., 2011], заключающейся в подсчете баллов согласно таблице 1 в 20 полях при увеличении  $\times 400$ , и оценивали по формуле:

$$\text{Степень поражения} = \frac{(20 * A) + (14 * B) + (7 * C) + (7 * D) + (2 * E)}{\text{кол} - \text{во просмотренных полей} * 100}$$

Анализ выраженности воспалительного процесса проводили при гистологической полуколичественной оценке повреждения лёгких, без учёта наличия гиалиновых мембран и белкового дебриса в воздушном пространстве. Расчёт вели по формуле:

$$\text{Степень поражения} = \frac{(20 * A) + (14 * B) + (2 * E)}{\text{кол} - \text{во просмотренных полей} * 100}$$

Таблица 1 - Оценка значимости гистологических показателей поражения легких в баллах

Параметры	Количество баллов на одно поле		
	0	1	2
А. Нейтрофилы в альвеолах	–	1–5	>5
В. Нейтрофилы в интерстиции	–	1–5	>5
С. Гиалиновые мембраны	–	1	>1
Д. Наличие белкового дебриса в воздушном пространстве	–	1	>1
Е. Утолщение альвеолярной перегородки	< $\times 2$	$\times 2$ – $\times 4$	> $\times 4$
Примечание: $x$ – кратность утолщения			

Количество лейкоцитов в крови определяли на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus JuniorVet (Австрия), относительное содержание лимфоцитов и нейтрофилов – в окрашенном по Романовскому – Гимзе мазке крови при микроскопировании. Уровень провоспалительных цитокинов и КПП оценивали в супернатанте гомогената лёгких. Легкие гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (в 1 мл фосфатного буфера с  $\text{pH}=7,4$ ) с последующим центрифугированием при 15000 оборотах в минуту в центрифуге CM-50M (ELMI, Латвия). Содержание провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  определяли методом ИФА с применением наборов фирмы Biolegend (США). Оценку результатов проводили на спектрофотометре для микропланшет EPOCH2TC (США) при длине волны 570 нм. Концентрацию КПП в гомогенатах лёгких оценивали по степени флуорисценции при  $\lambda_{\text{ex}}=360$  нм и  $\lambda_{\text{em}}=440$  нм в флуоресцентном модуле прибора CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

Оценку статистической значимости различий проводили при помощи программы Graphpad Prism 8. Для регистрируемых количественных переменных рассчитывали

параметры описательной статистики, характеризующие данные по каждой группе. Параметры описательной статистики включали: среднее значение параметра в группе (Mean) стандартное отклонение средней (Std.Dev, M), стандартная ошибка (Std.Err,  $\pm m$ ). Отличия между выборками оценивали с помощью непараметрических критериев Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни. Данные в таблицах представлены в виде среднего (M) и его ошибки ( $\pm m$ ).

Для попарного сравнения выживаемости применяли лог-ранговый тест с учётом поправки Бонферрони. Динамика выживаемости представлена в виде кривых Каплана-Мейера. Корреляционный анализ проведен при помощи теста ранговой корреляции Спирмена [Гланц С., 1998; Гржибовский А.М, 2008]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Моделирование ОПЛ у мышей, зараженных штаммами вируса гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA.

Анализ данных, полученных при заражении мышей самок штаммами вируса гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 (группа 2) и A/Aichi/2/68MA (H3N2) (группа 3) в дозах 1 ЛД<sub>50</sub>, продемонстрировал наличие совокупности таких типовых показателей ОПЛ/ОРДС, как высокий уровень летальности (50% в обеих группах инфицированных животных), падение уровня сатурации гемоглобина крови кислородом (таблица 2), наличие диффузного альвеолярного повреждения легких, характеризующегося повышением числа воспалительных клеточных инфильтратов в альвеолярной стенке и просвете альвеол, формированием ателектазов и увеличением толщины альвеолярных перегородок (морфологический субстрат), присутствием гиалиновых мембран (ключевой признак ОПЛ/ОРДС), наличием в легких очагов кровоизлияний (таблица 3; рисунки 1,2).

Таблица 2 – Величина индекса сатурации гемоглобина крови кислородом в течение эксперимента (Mean $\pm$ SE, %)

Экспериментальные группы	Дни эксперимента		
	Фон (n=5)	4-е сутки (n=5)	7-е сутки (n=5)
Группа № 1	93,25 $\pm$ 0,85	90,75 $\pm$ 2,02	90,75 $\pm$ 1,65
Группа № 2	92,75 $\pm$ 1,03	62,75 $\pm$ 2,25*	43,25 $\pm$ 3,28*
Группа № 3	90,50 $\pm$ 1,32	64,25 $\pm$ 2,29*	39,00 $\pm$ 1,22*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к группе № 1 (интактные)

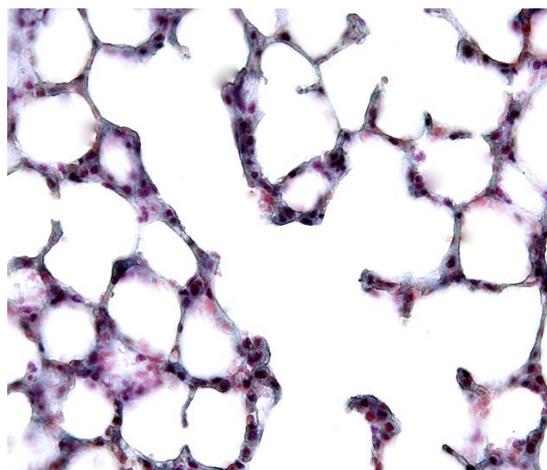
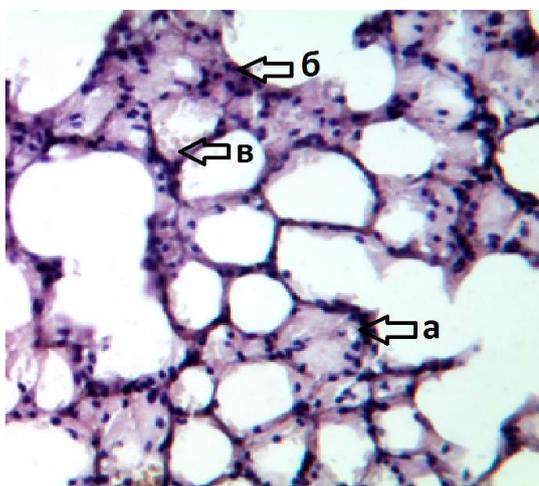
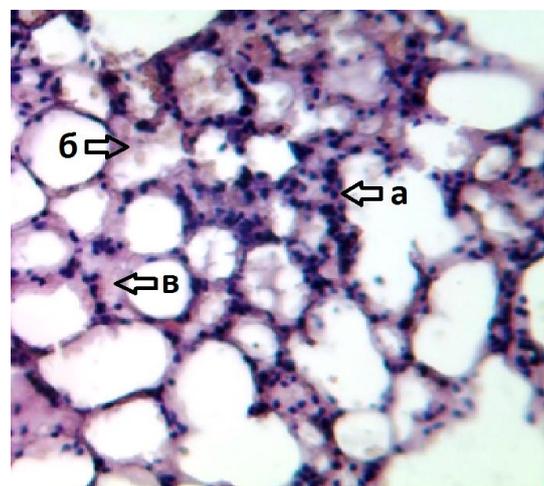


Рисунок 1 – Легкие intactного животного. Растянутые в разной степени альвеолярные ходы, патологические изменения отсутствуют. Окраска гематоксилин-эозином, ув.400.



А: Легкие животного, инфицированного вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 на 7-е сутки. Увеличение степени выраженности альвеолярного отёка (а), образование ателектазов (б), наличие эритроцитов в альвеолярном пространстве (в).



Б: Легкие животного, инфицированного вирусом гриппа A/Aichi/2/68MA (H3N2) на 7-е сутки. Наличие ателектазов (а), присутствие эритроцитов в просвете альвеол (б), увеличение степени выраженности альвеолярного отёка (в). Умеренная мононуклеарная инфильтрация интерстициальной ткани (в).

Рисунок 2 – Легкие животных, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 (А) и A/Aichi/2/68MA (Б) на 7-е сутки. Окраска гематоксилин-эозином, ув.400.

Таблица 3 – Относительная площадь кровоизлияний в паренхиме лёгких (Mean±SE, %) и полуколичественная оценка повреждения лёгких (Mean±SE, баллы)

Изучаемые показатели	Контроль (гр.№ 1) (n=15)	Опытные группы и сроки исследования			
		4-е сутки		7-е сутки	
		Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)	Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)
Площадь кровоизлияний, %	0,00±0,00	33,25±5,89*	39,50±11,98*	81,25±11,97*	75,00±10,21*
Суммарная оценка, баллы	0,01±0,00	0,38±0,01*	0,40±0,02*	0,69±0,01*	0,68±0,01*
Воспалительная составляющая, баллы	0,01±0,00	0,28±0,01*	0,28±0,02*	0,53±0,01*	0,53±0,02*

Примечание: \* – p<0,05 по отношению к группе № 1 (интактные)

О процессе воспаления свидетельствовали характерные изменения лейкоцитарной формулы крови (рост относительного уровня сегментоядерных (с/я) нейтрофилов с 26,25±1,18% до 35,50±0,96%; уровня лейкоцитов с 8,58±0,14×10<sup>9</sup>/л до 10,25±0,68×10<sup>9</sup>/л с последующим падением до 5,39±0,55×10<sup>9</sup>/л; снижение лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса с 2,54±0,17 до 1,40±0,08) и повышение уровня провоспалительных цитокинов в легких (таблица 4).

Вирусная нагрузка в лёгких на 4-е сутки составляла 3,75±0,32 и 3,63±0,31 lg ЭИД/мл у мышей, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/2009MA и вирусом гриппа A/Aichi/2/68MA, соответственно. К 7-ым суткам наблюдалась тенденция к элиминации вируса из лёгких, на что указывало снижение вирусных титров до 2,75±0,14 и 2,00±0,20 lg ЭИД/мл у мышей, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2), соответственно.

Таблица 4 – Показатели уровня провоспалительных цитокинов в легких (Mean±SE, пг/г).

Изучаемые показатели	Контроль (гр.№ 1) (n=15)	Опытные группы и сроки исследования			
		4-е сутки		7-е сутки	
		Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)	Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)
TNF-α	11,80±2,39	38,04±4,74*	36,20±4,87*	40,39±7,26*	44,40±5,81*
IL-6	117,84±27,20	400,72±33,92*	383,84±32,93*	781,75±175,37*	824,40±102,54*
IL-1β	131,00±26,47	302,90±60,19*	317,20±41,47*	483,31±93,98*	500,60±130,43*

Примечание: \* – p<0,05 по отношению к группе № 1 (интактные животные)

Наблюдаемые изменения сопровождались ростом уровня КПП в лёгких в обеих группах инфицированных животных (рисунок 3).

Корреляционный анализ выявил наличие прямой зависимости между показателями уровня КПП и степенью повреждения лёгких у животных из обеих опытных групп ( $r^2=0,7012$  при  $p=0,0284$  для мышей, инфицированных A/California/07/2009MA и  $r^2=0,7317$  при  $p=0,0200$  для мышей, инфицированных A/Aichi/2/68MA). Аналогичная зависимость была выявлена между уровнем цитокинов и КПП в легких: IL-1 $\beta$  –  $r^2=0,8303$  при  $p=0,0047$  и  $r^2=0,9301$  при  $p=0,0003$ , IL-6 –  $r^2=0,7939$  при  $p=0,0088$  и  $r^2=0,8909$  при  $p=0,0011$  и TNF- $\alpha$  –  $r^2=0,6585$  при  $p=0,0437$  и  $r^2=0,8389$  при  $p=0,0037$  у мышей, инфицированных A/California/07/2009MA и A/Aichi/2/68MA, соответственно.

Сравнительный анализ всех вышеуказанных показателей не выявил каких-либо значимых различий в течении ОПЛ при инфицировании мышей различными штаммами вируса гриппа.

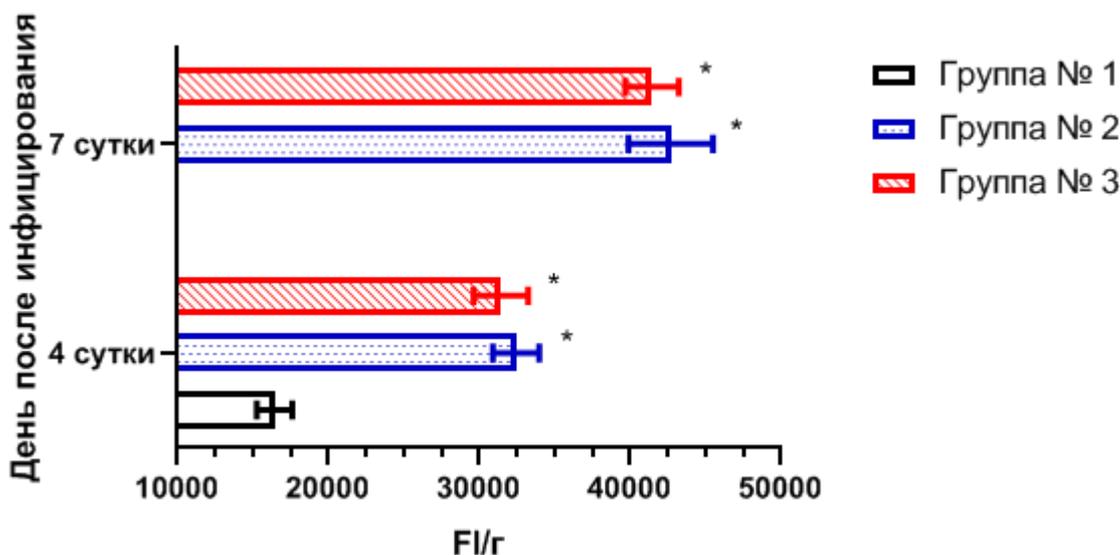


Рисунок 3 – Уровень КПП в ткани лёгких, оцененный по величине флуоресценции (Mean $\pm$ SE, Ед/г).

Примечание: \* –  $p<0,05$  по отношению к группе № 1. Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – мыши, инфицированные A/California/07/2009MA; группа № 3 – мыши, инфицированные A/Aichi/2/68MA. Значимых межгрупповых различий (группы №№ 2 и 3) не выявлено ( $p>0,05$ )

### **Влияние модуляторов рКПП на течение ОПЛ, вызванного вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09**

Основной предшественник КПП МГ (группа № 3) обусловил повышение летальности опытных животных (группа № 2) (с 35% до 70 %,  $p=0,0243$ ), снижение величины сатурации гемоглобина кислородом (с  $51,00\pm 1,79\%$  до  $39,40\pm 1,44\%$  на 7-е сутки) (рисунок 4) и рост

уровня провоспалительных цитокинов в лёгких: TNF- $\alpha$  (с  $37,00 \pm 1,79$  пг/г до  $58,05 \pm 7,49$  пг/г на 4-е сутки; с  $38,78 \pm 2,98$  пг/г до  $53,81 \pm 5,05$  пг/г на 7-е сутки), IL-6 (с  $378,00 \pm 15,55$  пг/г до  $491,02 \pm 23,33$  пг/г на 4-е сутки; с  $784,00 \pm 51,26$  пг/г до  $946,04 \pm 37,80$  пг/г на 7-е сутки) и IL-1 $\beta$  на (с  $359,40 \pm 8,71$  пг/г до  $463,45 \pm 54,88$  пг/г на 4-е сутки; с  $565,00 \pm 35,55$  пг/г до  $713,73 \pm 30,65$  пг/г на 7-е сутки) по отношению к животным из группы, получавшей плацебо (таблица 5). Со стороны клинического анализа крови значимых различий выявлено не было.

Наряду с этим имело место усугубление степени выраженности морфологических изменений лёгочной паренхимы (рост площади повреждения лёгочной паренхимы с  $35,00 \pm 5,27\%$  до  $76,75 \pm 8,04\%$  на 4-е сутки; усугубление выраженности повреждения лёгких с  $0,43 \pm 0,01$  баллов до  $0,57 \pm 0,02$  баллов на 4-е сутки, и с  $0,66 \pm 0,02$  баллов до  $0,75 \pm 0,01$  баллов на 7-е сутки, в том числе за счет воспалительного компонента - с  $0,32 \pm 0,01$  баллов до  $0,42 \pm 0,01$  баллов на 4-е сутки и с  $0,51 \pm 0,02$  баллов до  $0,59 \pm 0,01$  баллов на 7-е сутки). Гистологическая картина поражения легких представлена на рисунке 5.

Наблюдаемые изменения сопровождались ростом уровня КППГ в лёгких в обеих группах инфицированных животных (рисунок 6).

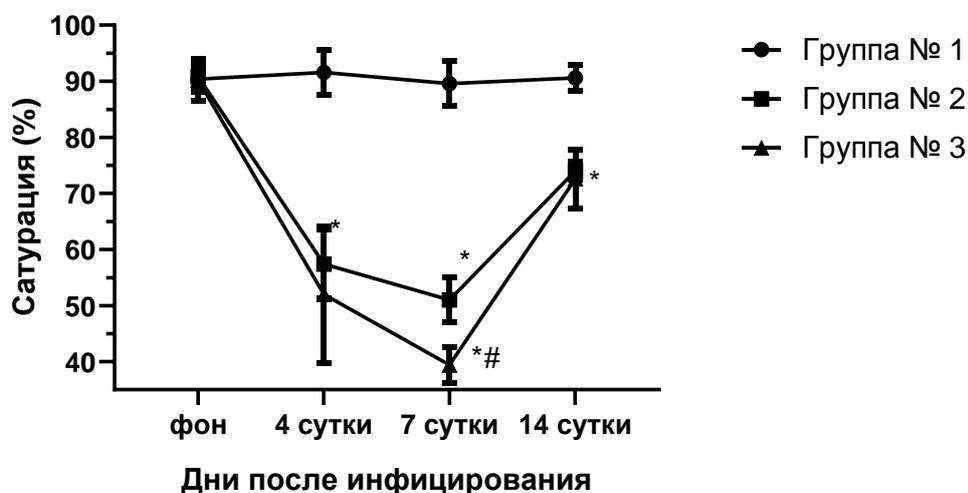


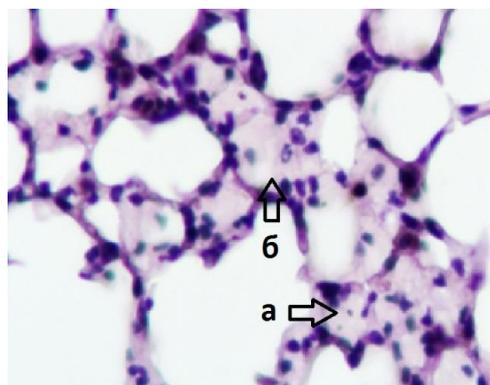
Рисунок 4 – Величина уровня сатурации гемоглобина крови кислородом в течение эксперимента (Mean $\pm$ SE,%).

Примечание: \* – $p < 0,05$  по отношению к группе № 1; # – $p < 0,05$  по отношению к группе № 2. Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – инфицированные мыши, получавшие плацебо; группа № 3 – инфицированные мыши, получавшие МГ.

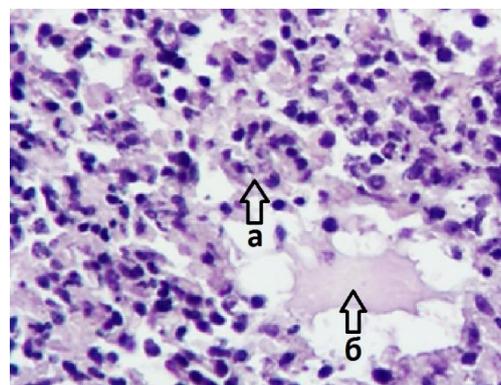
Таблица 5 – Показатели уровня провоспалительных цитокинов в легких (Mean±SE, пг/г).

Изучаемые показатели	Интактные (гр.№ 1) (n=15)	Опытные группы и сроки исследования			
		4 сутки		7 сутки	
		Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)	Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)
TNF- $\alpha$	12,20±1,69	37,00±1,79*	58,05±7,49*#	38,78±2,98*	53,81±5,05*
IL-6	108,00±4,43	378,00±15,55*	491,02±23,33*#	784,00±51,26*	946,04±37,80*#
IL-1 $\beta$	109,20±6,00	359,40±8,71*	463,45±54,88*#	565,00±35,55*	713,73±30,65*#

Примечание: \* – p<0,05 по отношению к группе № 1, # – p<0,05 по отношению к группе № 2. Группа № 1 – интактные мыши, группа № 2 – мыши, получавшие плацебо; группа № 3 – мыши, получавшие МГ



А: Легкие инфицированного животного, получавшего плацебо, на 4-е сутки. Формирование ателектазов (а), увеличение степени выраженности альвеолярного отёка (б)



Б: Легкие животных, получавших МГ, на 4-е сутки. Наличие клеточных инфильтратов на фоне альтерации легочной паренхимы и формирования «печёночного» лёгкого (а), увеличение степени выраженности альвеолярного отёка (б).

Рисунок 5 – Легкие животных, получавших плацебо (А) и МГ (Б) на 4-е сутки. Окраска гематоксилин-эозином, ув.400.

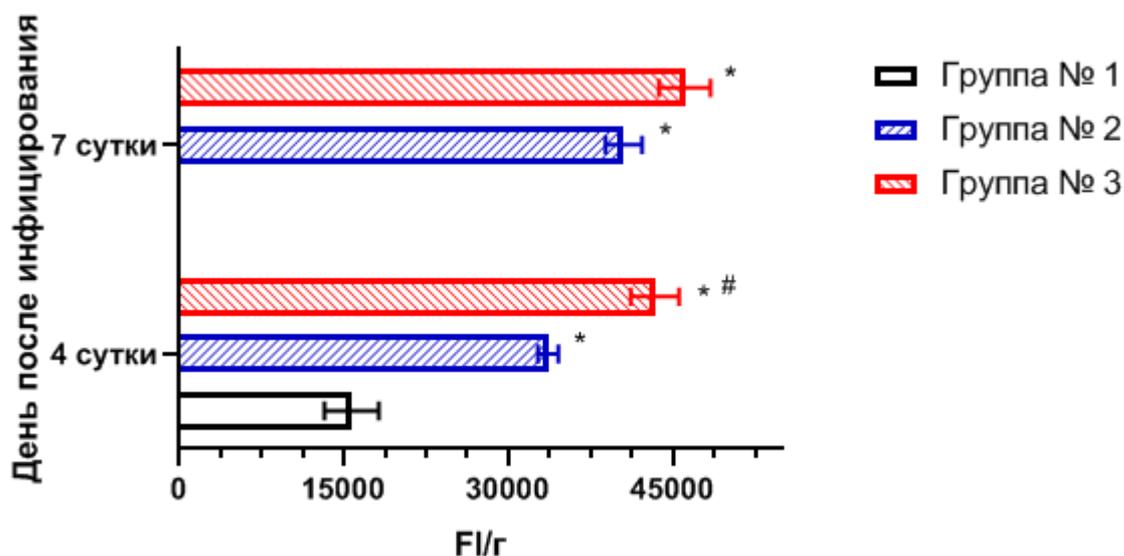


Рисунок 6 – Уровень КПГ в ткани лёгких, оцененный по величине флуоресценции (Mean±SE, Ед/г).

Примечание: \*– $p < 0,05$  по отношению к группе № 1; # – $p < 0,05$  по отношению к группе № 2. Группа № 1 – интактные мышцы; группа № 2 –мыши, получавшие плацебо; группа № 3 –мыши, получавшие МГ.

#### Оценка влияния блокатора накопления КПГ аминоксидина бикарбоната на течение вирус-ассоциированного ОПЛ

Блокатор накопления КПГ обусловил рост выживаемости опытных животных с 40% до 70% ( $p = 0,0469$ ), ограничение падения величины сатурации гемоглобина кислородом с  $44,50 \pm 2,90\%$  до  $60,00 \pm 1,29\%$  на 7-е сутки (Рисунок 7) и степени выраженности морфологических изменений в лёгких, что подтверждалось снижением площади кровоизлияний с  $87,50 \pm 7,22\%$  до  $51,40 \pm 7,51\%$  к 7-ым суткам и повреждения лёгких с  $0,39 \pm 0,02$  баллов до  $0,35 \pm 0,01$  баллов к 4-ым суткам и с  $0,67 \pm 0,01$  баллов до  $0,56 \pm 0,01$  баллов к 7-ым суткам (Таблица 6). Гистологическая картина представлена на рисунке 8.

Наряду с этим, имело место позитивное воздействие на показатели системной воспалительной реакции, заключавшееся в коррекции повышенного уровня провоспалительных цитокинов в лёгких: TNF- $\alpha$  (с  $34,60 \pm 2,50$  пг/г до  $23,40 \pm 3,47$  пг/г на 4-е сутки; с  $47,20 \pm 4,36$  пг/г до  $35,00 \pm 2,35$  пг/г на 7-е сутки), IL-6 (с  $286,80 \pm 17,63$  пг/г до  $140,80 \pm 8,61$  пг/г на 4-е сутки; с  $712,00 \pm 37,94$  пг/г до  $566,80 \pm 40,77$  пг/г на 7-е сутки) и IL-1 $\beta$  на (с  $302,80 \pm 13,53$  пг/г до  $171,60 \pm 16,00$  пг/г на 4-е сутки) (Таблица 7); ограничении выраженности воспалительного компонента в повреждении лёгочной паренхимы (с  $0,29 \pm 0,02$  баллов до  $0,23 \pm 0,01$  баллов к 4-ым суткам; с  $0,51 \pm 0,01$  балла до  $0,43 \pm 0,01$  баллов к 7-ым суткам); повышении уровня лимфоцитов в крови с  $51,03 \pm 2,05\%$  до  $63,75 \pm 2,43\%$ , снижении относительного уровня палочкоядерных (п/я) нейтрофилов с  $4,75 \pm 0,63\%$  до  $2,00 \pm 0,91\%$ , с/я

нейтрофилов с  $36,25 \pm 1,03\%$  до  $26,25 \pm 1,60\%$  и абсолютного содержания тромбоцитов с  $1219,00 \pm 97,70 \times 10^9/\text{л}$  до  $872,75 \pm 83,89 \times 10^9/\text{л}$ .

Выявленная терапевтическая эффективность аминуганидина бикарбоната сопровождалась снижением роста КПП на треть в течение всего эксперимента (Рисунок 9)

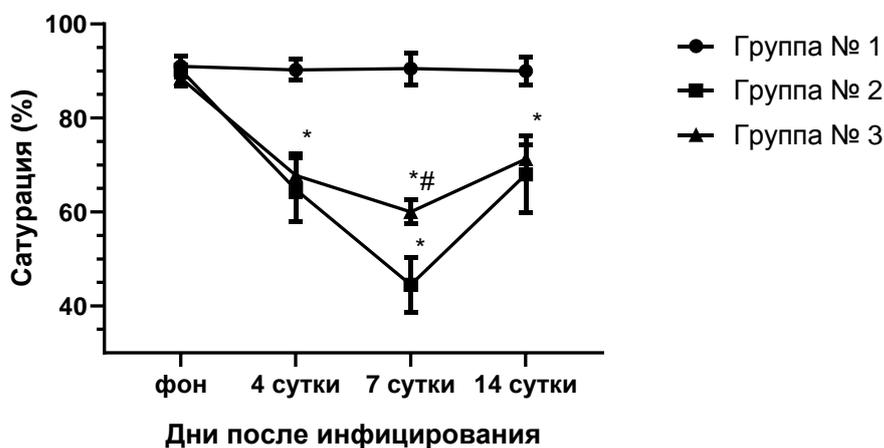


Рисунок 7 – Величина уровня сатурации гемоглобина крови кислородом в течение эксперимента (Mean±SE, %).

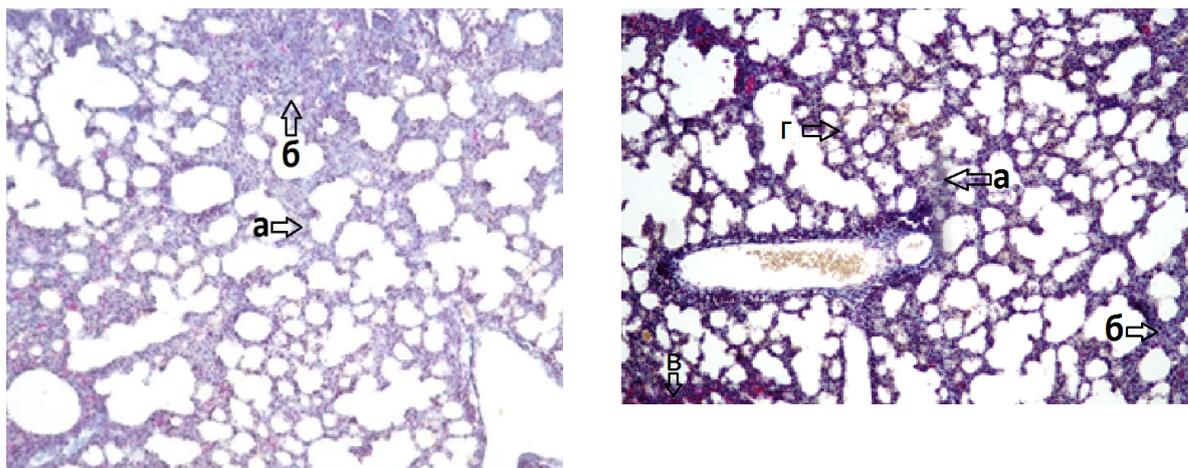
Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к группе № 1; # -  $p < 0,05$  по отношению к группе № 2.

Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – инфицированные мыши, получавшие плацебо; группа № 3 – инфицированные мыши, получавшие аминуганидин

Таблица 6 – Относительная площадь кровоизлияний в паренхиме лёгких (Mean±SE, %) и полуколичественная оценка повреждения лёгких (Mean±SE, баллы)

Изучаемые показатели	Контроль (гр.№ 1) (n=15)	Опытные группы и сроки исследования			
		4-е сутки		7-е сутки	
		Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)	Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)
Площадь кровоизлияний, %	0,00±0,00	56,25±6,25*	47,75±8,47*	87,50±7,22*	51,40±7,51*#
Суммарная оценка, баллы	0,06±0,00	0,39±0,02*	0,35±0,01*#	0,67±0,01*	0,56±0,01*#
Воспалительная составляющая, баллы	0,02±0,00	0,29±0,02*	0,23±0,01*#	0,51±0,01*	0,43±0,01*#

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к группе №1, # –  $p < 0,05$  по отношению к группе № 2.  
Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – мыши, получавшие плацебо; группа № 3 – мыши, получавшие аминуганидин



А: Лёгкие животных, получавшего плацебо (7-е сутки). Увеличение толщины альвеолярных стенок (а), наличие множества ателектазов (б), «опеченение» лёгочной паренхимы (б).

Б: Лёгкие животных, получавших аминогуанидин (7-е сутки). Альвеолярный отёк (а), увеличение толщины альвеолярной стенки (б), присутствие ателектазов (в) и эритроцитов в просвете альвеол (г).

Рисунок 8 – Лёгкие животных, получавших плацебо (А) и аминогуанидин (Б) на 7-е сутки после инфицирования. Окраска гематоксилин-эозином, ув.100

Таблица 7 – Показатели уровня провоспалительных цитокинов в легких (Mean±SE, пг/г).

Исследуемые показатели	Интактные (гр.№ 1) (n=15)	Экспериментальные группы и сроки исследования			
		4-е сутки		7-е сутки	
		Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)	Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)
TNF- $\alpha$	20,60±1,96	34,60±2,50*	23,40±3,47#	47,20±4,36*	35,00±2,35*#
IL-6	107,80±6,08	286,80±17,63*	140,80±8,61*#	712,00±37,94*	566,80±40,77*#
IL-1 $\beta$	149,20±27,58	302,80±13,53*	171,60±16,00#	504,60±27,34*	407,60±43,91*

Примечание: \* – p<0,05 по отношению к группе №1, # – p<0,05 по отношению к группе №2.  
Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – мыши, получавшие плацебо; группа № 3 – мыши, получавшие аминогуанидин

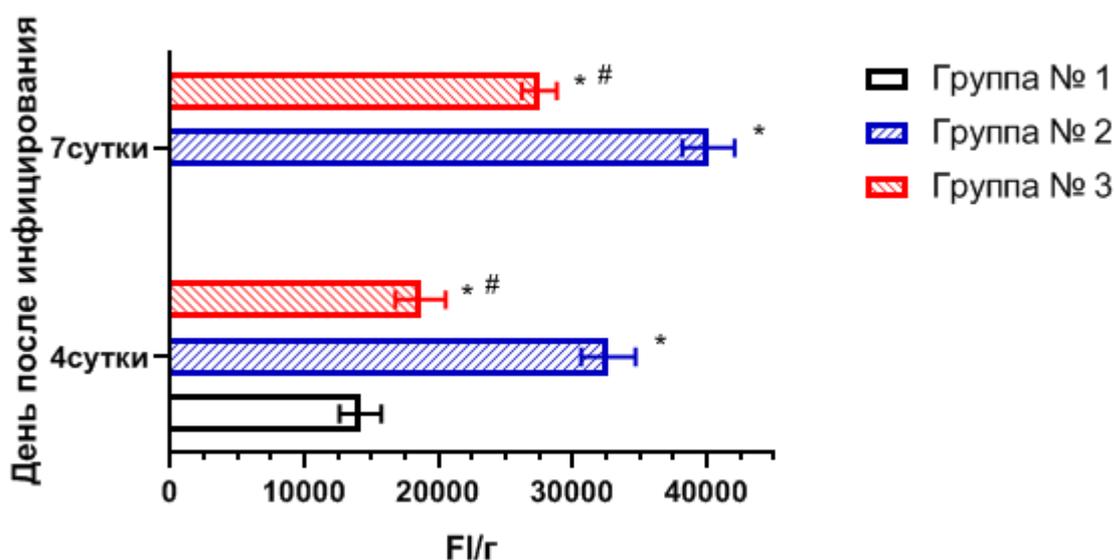


Рисунок 9 – Уровень КПГ в ткани лёгких, оценённый по величине флуоресценции (Mean±SE, Ед/г).

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к группе № 1; # -  $p < 0,05$  по отношению к группе № 2.

Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – инфицированные мыши, получавшие плацебо; группа № 3 – инфицированные мыши, получавшие аминогуанидин

### Оценка влияния преморбидного фона в виде экспериментального СД на течение вирус-индуцированного ОПЛ и возможность коррекции данного состояния путём применения аминогуанидина бикарбоната

Наличие преморбидного фона в виде АИДС привело к отягощению течения вирус-ассоциированного ОПЛ – снижение выживаемости с 50% до 20% ( $p=0,0479$ ), снижение степени насыщения гемоглобина крови кислородом с  $48,80 \pm 0,95\%$  до  $40,80 \pm 0,80\%$  (Рисунок 10) и усугубление степени поражения лёгочной паренхимы с  $0,38 \pm 0,01$  баллов до  $0,50 \pm 0,01$  баллов на 4-е сутки и с  $0,61 \pm 0,01$  балла до  $0,67 \pm 0,01$  балла на 7-е сутки в сравнении с группой позитивного контроля (Таблица 8).

Наблюдаемые изменения сопровождались нарастанием выраженности воспалительной реакции, что подтверждалось увеличением концентрации провоспалительных цитокинов в легких (Рисунок 11): TNF- $\alpha$  – с  $33,80 \pm 2,60$  пг/г до  $49,40 \pm 2,04$  пг/г на 4-е сутки и с  $46,00 \pm 2,21$  пг/г до  $61,40 \pm 2,77$  пг/г на 7-е сутки; IL-6 – с  $294,80 \pm 35,03$  пг/г до  $448,40 \pm 14,15$  пг/г на 4-е сутки и с  $806,80 \pm 51,60$  пг/г до  $885,80 \pm 29,34$  пг/г на 7-е сутки и IL-1 $\beta$  – с  $306,40 \pm 24,47$  пг/г до  $450,80 \pm 25,49$  пг/г на 4-е сутки; с  $501,80 \pm 32,60$  пг/г до  $708,00 \pm 30,58$  пг/г на 7-е сутки), а также характерным изменением ряда маркерных гематологических показателей (падение относительного уровня лимфоцитов с  $64,25 \pm 0,25\%$  до  $48,50 \pm 0,96\%$  на 4-е сутки, рост относительного уровня с/я нейтрофилов с  $30,25 \pm 1,49\%$  до  $38,25 \pm 1,11\%$  на 4-е сутки и с

36,00±0,41% до 40,75±0,95% на 7-е сутки, абсолютного содержания тромбоцитов с  $821,80 \pm 75,36 \times 10^9/\text{л}$  до  $1027,00 \pm 36,07 \times 10^9/\text{л}$  на 4-е сутки). Имел место рост выраженности воспалительного компонента повреждения лёгких с 0,28±0,01 баллов до 0,37±0,01 баллов на 4-е сутки. Уровень КПП в легких, при этом, значимо превышал таковой у мышей, не имевших преморбидной патологии, в течение всего эксперимента (Рисунок 12). Последнее объясняется цитоксическим действием аллоксана на  $\beta$ -островки Лангерганса, секретирующие инсулин, в результате чего усиливается неферментативный путь утилизации глюкозы – основной путь образования КПП. Таким образом, экспериментально была подтверждена отягощающая роль СД, как преморбидной патологии при гриппозной инфекции.

Применение аминогуанидина в данных условиях эксперимента продемонстрировало его значимую эффективность в отношении выраженности типовых показателей патологии. Блокатор образования КПП обусловил повышение выживаемости опытных животных с 20 % до 65 %, ограничил степень снижения уровня гипоксемии с 40,80±0,80% до 59,00±2,09% на 7-е сутки (Рисунок 10) и выраженности повреждения лёгочной паренхимы с 0,50±0,01 баллов до 0,42±0,01 баллов на 4-е сутки и с 0,67±0,01 баллов до 0,58±0,01 баллов на 7-е сутки по отношению к позитивному контролю. Наряду с вышеописанным, аминогуанидин способствовал коррекции воспалительной реакции, ограничивая уровень содержания провоспалительных цитокинов в легких (Рисунок 11): TNF- $\alpha$  – с 49,40±2,04 пг/г до 29,60±2,64 пг/г на 4-е сутки и с 61,40±2,77 пг/г до 38,20±2,87 пг/г на 7-е сутки; IL-6 – с 448,40±14,15 пг/г до 291,20±21,64 пг/г на 4-е сутки и с 885,80±29,34 пг/г до 472,40±54,43 пг/г на 7-е сутки; IL-1 $\beta$  – с 450,80±25,49 пг/г до 316,80±23,17 пг/г на 4-е сутки и с 708,00±30,58 пг/г до 554,00±43,69 пг/г на 7-е сутки, и позитивно влияя на специфические изменения ряда маркерных гематологических показателей (восстановление сниженного уровня лимфоцитов с 48,50±0,96% до 57,50±3,33% на 4-е сутки и с 48,00±1,63% до 60,50±3,12% на 7-е сутки, снижение процентного содержания с/я нейтрофилов с 40,75±0,95% до 27,50±2,72% на 7-е сутки и абсолютного количества тромбоцитов с  $1027,00 \pm 36,07 \times 10^9/\text{л}$  до  $821,00 \pm 43,40 \times 10^9/\text{л}$ ). Имело место ограничение воспалительных проявлений повреждения лёгких с 0,37±0,01 баллов до 0,32±0,01 баллов на 4-е сутки и с 0,51±0,02 баллов до 0,45±0,01 баллов на 7-е сутки. Вышеуказанные позитивные изменения в течении ОПЛ наблюдались на фоне ограничения роста уровня КПП в лёгких на 25% (Рисунок 12).

Таблица 8 – Полуколичественная оценка повреждения лёгких (Mean±SE, баллы)

Изучаемые показатели	Интактные (гр. № 1) (n=15)	Опытные группы и сроки исследования					
		4 сутки			7 сутки		
		Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)	Гр.№ 4 (n=5)	Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)	Гр.№ 4 (n=5)
Суммарная оценка, баллы	0,03± 0,00	0,38± 0,01*	0,50± 0,01*#	0,41± 0,01*#	0,61± 0,01*	0,67± 0,02*#	0,58± 0,01*\$
Воспалительная составляющая, баллы	0,02± 0,00	0,28± 0,01*	0,37± 0,01*#	0,31± 0,00*#	0,46± 0,01*	0,51± 0,02*	0,45± 0,01*\$

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным (группа №1); # –  $p < 0,05$  по отношению к позитивному контролю № 1 (группа №2); \$ –  $p < 0,05$  по отношению к позитивному контролю № 2 (группа №3).

Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – инфицированные мыши без преморбидной патологии, получавшие плацебо; группа № 3 – инфицированные мыши с АИДС, получавшие плацебо; группа № 4 – инфицированные мыши с АИДС, получавшие аминогуанидин.

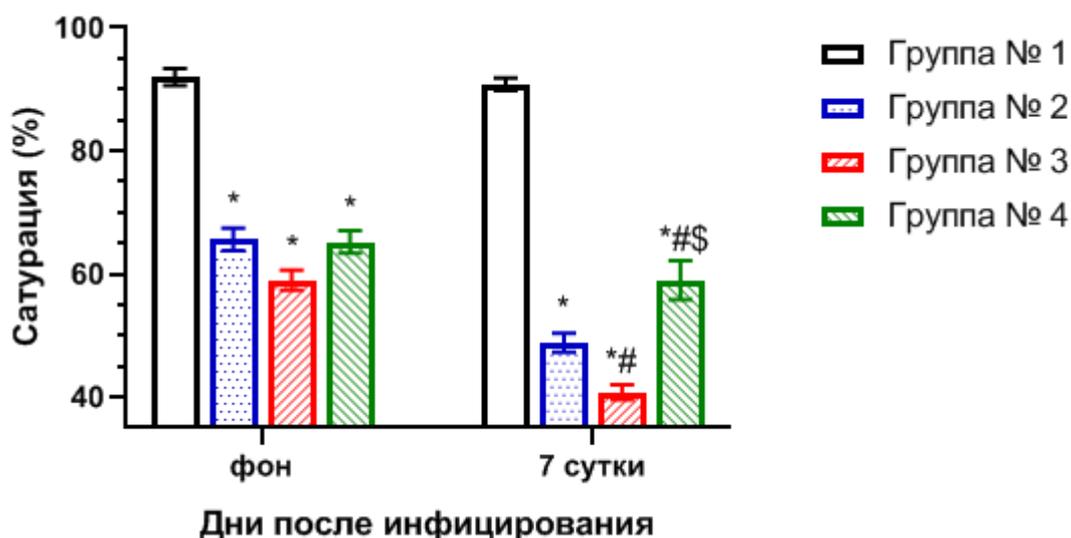


Рисунок 10– Величина уровня сатурации гемоглобина крови кислородом (Mean±SE, %).

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным (группа №1); # -  $p < 0,05$  по отношению к группе №2; \$ –  $p < 0,05$  по отношению к группе №3.

Группа №1 – интактные мыши; группа №2 – инфицированные мыши без преморбидной патологии, получавшие плацебо; группа №3 – инфицированные мыши с АИДС, получавшие плацебо; группа №4 – инфицированные мыши с АИДС, получавшие аминогуанидин.

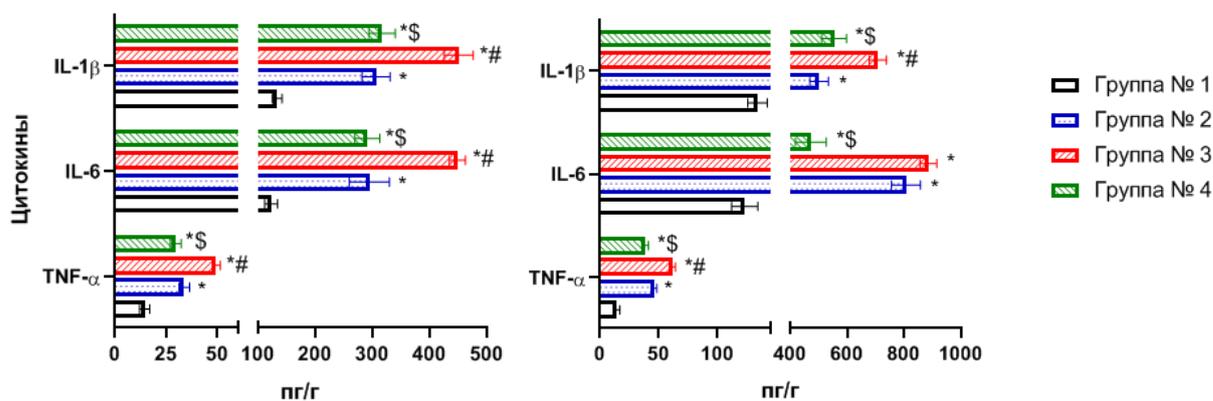


Рисунок 11 – Показатели уровня провоспалительных цитокинов в легких на 4-е (слева) и 7-е (справа) сутки после инфицирования (Mean±SE, пг/г)

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным (группа №1); # -  $p < 0,05$  по отношению к группе №2; \$ –  $p < 0,05$  по отношению к группе №3.

Группа №1 – интактные мыши; группа №2 – инфицированные мыши без преморбидной патологии, получавшие плацебо; группа №3 – инфицированные мыши с АИСД, получавшие плацебо; группа №4 – инфицированные мыши с АИСД, получавшие аминоксидин

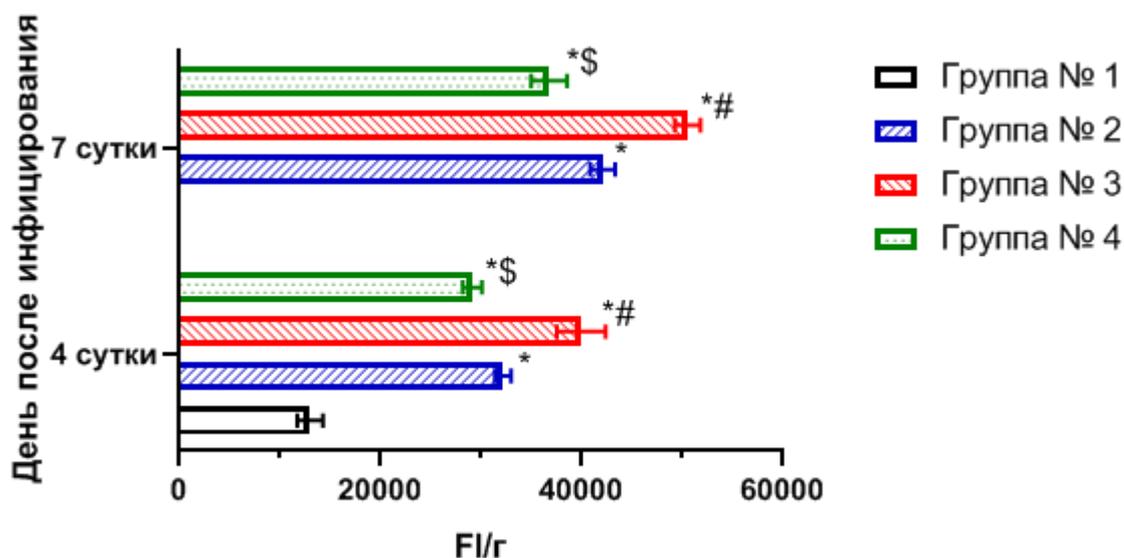


Рисунок 12 –Уровень КПГ в ткани лёгких, оцененный по величине флуоресценции (Mean±SE, Ед/г)

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным (группа №1); # -  $p < 0,05$  по отношению к группе №2; \$ –  $p < 0,05$  по отношению к группе №3.

Группа №1 – интактные мыши; группа №2 – инфицированные мыши без преморбидной патологии, получавшие плацебо; группа №3 – инфицированные мыши с АИСД, получавшие плацебо; группа №4 – инфицированные мыши с АИСД, получавшие аминоксидин

Таким образом, полученные экспериментальные данные о негативном влиянии предшественника накопления КПГ МГ и позитивном воздействии блокатора данного процесса аминоксидина бикарбоната на течение ОПЛ при гриппозной инфекции, в том числе, на фоне СД, позволяют утверждать, что накопление агрессивных продуктов

неферментативного гликолиза в легких является одним из патогенетических звеньев формирования данного осложнения при тяжелом течении гриппа.

Выявленная с помощью модуляторов рКПГ возможность влияния на содержание КПГ и связь этого процесса со степенью тяжести ОПЛ вирусного генеза является обоснованием к дальнейшей экспериментальной разработке подходов к поиску средств, ограничивающих их чрезмерное накопление.

## **ВЫВОДЫ**

1. Заражение мышей самок вирусами гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2) в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> обуславливает рост уровня конечных продуктов гликирования и формирование острого повреждения легких вне зависимости от конкретного штамма вируса гриппа А.

2. Прогрессирующее накопление конечных продуктов гликирования в легких коррелирует со степенью гипоксемии, выраженностью повреждения легочной паренхимы и системной воспалительной реакции.

3. Метилглиоксаль способствует накоплению конечных продуктов гликирования в лёгких и усугубляет тяжесть острого повреждения легких при гриппозной инфекции по типовым регистрируемым показателям.

4. Аминогуанидина бикарбонат ограничивает уровень накопления конечных продуктов гликирования и степень тяжести вирус-ассоциированного острого повреждения легких.

5. Наличие сопутствующего аллоксан-индуцированного сахарного диабета является отягощающим фактором в развитии острого повреждения легких при гриппозной инфекции.

6. Аминогуанидина бикарбонат способствует коррекции степени тяжести вирус-ассоциированного острого повреждения легких, отягощённого сопутствующим сахарным диабетом.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Модель вирус-ассоциированного ОПЛ может быть использована как для изучения эффективности фармакологических средств и их комбинаций при гриппозной инфекции в эксперименте, так и механизмов патогенеза тяжелых осложнений заболевания.
2. Полученные данные об эффективности блокатора накопления КПП в отношении коррекции степени тяжести ОПЛ вирусного генеза являются обоснованием для дальнейшего изучения соединений подобного типа действия в экспериментальной терапии данной патологии.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Александров А.Г. Выбор оптимальной тест-системы для моделирования острого респираторного дистресс синдрома (ОРДС), вызванного вирусами гриппа А/Н1N1/pdm09 и А/Н3N2 (А/Aichi/2/1968) / А.Г. Александров // Медицинский академический журнал, 2016. – Т. 16, Вып. 3, С. 382-384.
2. Александров А.Г. Сравнительная оценка некоторых показателей системной воспалительной реакции в условиях аллоксан-индуцированного диабета и экспериментальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А/Н1N1/pdm09 (тезисы) / А.Г. Александров, Т.Н. Саватеева-Любимова // Известия российской военно-медицинской академии, 2017. – Т.36, №2, прил.1, С.76-77.
3. Александров А.Г. Influence of alloxan-induced diabetes mellitus on influenza infection induced by influenza virus A/H1N1pdm09 / А.Г. Александров, А.А. Штро // Сборник тезисов "Trends in influenza research 2017", 18-20 September, Saint-Petersburg, P.125.
4. Александров А.Г. Влияние метилглиоксаля на токсическое действие мезоксалил-мочевины и 4-амино-N10-метилптероилглутаминовой кислотой / А.Г. Александров // Сборник тезисов "Скорая медицинская помощь-2019" [Материалы 18-го всероссийского конгресса (всероссийской научно-практической конференции с международным участием), посвященного 120-летию скорой медицинской помощи в России 30-31 мая 2019], СПб. С.7-8.
5. Александров А.Г. Влияние метилглиоксаля на течение острого повреждения легких у мышей при экспериментальном инфицировании вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 / А.Г. Александров, Т.Н. Саватеева-Любимова, А.А. Мужикян // Медицинский академический журнал, 2019. – Т.19, №1, С.65-72, doi: 10.17816/MAJ19165-72.
6. Александров А.Г. Влияние пиридоксина на течение вирус-индуцированного острого повреждения лёгких, вызванного вирусами гриппа А(Н1N1)pdm09 у мышей / А.Г.

Александров // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2019: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2019. — С.314-318.

7. Александров А.Г. Влияние конечных продуктов гликирования на отягощение вирус-ассоциированного ОПЛ/ОРДС в условиях экспериментального сахарного диабета и иммуносупрессии / А.Г. Александров, Т.Н. Саватеева-Любимова // Журнал «Современная наука: Актуальные проблемы теории и практики» Серия Естественные и Технические Науки, 2020. – №06, С.7-11, DOI 10.37882/2223–2966.2020.06.01.

8. Александров А.Г. Конечные продукты гликирования, как маркер течения острого повреждения лёгких при гриппозной инфекции / А.Г. Александров // Факторы риска, популяционное (индивидуальное) здоровье в гигиенической донозологической диагностике. Материалы 15-й Евразийской научной конференции «Донозология–2020» – СПб., 2020. – С.84-85.

9. Александров А.Г. Влияние амингуанидина на течение острого повреждения легких, вызванного вирусом гриппа А/Н1N1/pdm09 / А.Г. Александров, Т.Н. Саватеева-Любимова, К.И. Стосман и др. // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. – № 2. – С.33–44, doi: 10.17816/MAJ34094.

10. Александров А.Г. Сравнительная оценка эффективности блокаторов накопления конечных продуктов гликирования различного механизма действия в отношении острого повреждения легких, вызванного вирусом гриппа А/Н1N1pdm09, в экспериментах на мышцах/ А.Г. Александров, Т.Н. Саватеева-Любимова, И.Н. Жилинская // Журнал «Современная наука: Актуальные проблемы теории и практики» Серия Естественные и Технические Науки, 2020 – №11, С.7-11, doi: 10.37882/2223–2966.2020.11.02.

11. Александров А.Г. Сравнительная оценка течения острого повреждения лёгких у мышей, вызванного вирусами гриппа А подтипов Н1N1 И Н3N2/ А.Г. Александров, Т.Н. Саватеева-Любимова, И.Н. Жилинская // Журнал "Проблемы медицинской микологии" - Т.23, № 2, 2021, С. 48

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИСД – аллоксан-индуцированный сахарный диабет

АФК – активные формы кислорода

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

КПГ – конечные продукты гликирования

МГ – метилглиоксаль

ОПЛ – острое повреждение лёгких

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

рКПГ –рецепторы конечных продуктов гликирования

п/я – палочкоядерные

СД – сахарный диабет

с/я – сегментоядерные

IL-1 $\beta$  – интерлейкин-1 $\beta$

IL-6 – интерлейкин-6

МА – mouse-adapted/адаптированный для мышей

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$