

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА ИМ. А.А. СМОРОДИНЦЕВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук Жилинская И.Н.
доктор медицинских наук, профессор Саватеева-Любимова Т.Н.

Санкт-Петербург

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе острого повреждения легких	14
1.1 Острое повреждение легких и острый респираторный дистресс-синдром. История вопроса, клиническая картина, морфология и патогенез	14
1.2 КППГ и их роль в индукции воспаления	23
1.3 Особенности развития ОПЛ/ОРДС при гриппозной инфекции	31
1.4 Способы моделирования ОПЛ/ОРДС в эксперименте	34
1.5 Лечение ОПЛ/ОРДС и поиск новых средств патогенетической терапии.	38
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	59
3.1 Экспериментальное моделирование ОПЛ в условиях инфицирования штаммами вируса гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2).....	59
3.2 Оценка влияния модуляторов рКППГ на течение ОПЛ, вызванного вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09	75
3.2.1 Влияние предшественника КППГ МГ на течение ОПЛ у мышей, зараженных вирусом A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09	75
3.2.2 Влияние блокатора накопления КППГ аминугуанидина бикарбоната на течение ОПЛ у мышей, зараженных вирусом A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09	86
3.3. Влияние аминугуанидина на течение ОПЛ, вызванного вирусом A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09, у мышей со сформированным СД	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИСД – аллоксан-индуцированный сахарный диабет

КПГ – конечные продукты гликирования

МГ – метилглиоксаль

ОПЛ – острое повреждение легких

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдромом

ЛПС - липополисахарид

п/к – подкожно

рКПГ – рецепторы конечных продуктов гликирования

СД – сахарный диабет

FI – единица измерения интенсивности флуоресценции

IL – интерлейкин

LD₅₀ – доза, вызывающая 50 % летальность

TNF- α – фактор некроза опухоли-альфа

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения 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 [1].

Классификация вируса гриппа включает в себя по меньшей мере 4 подтипа: А, В, С и D. Наиболее тяжёлая форма течения гриппозной инфекции наблюдается при инфицировании вирусом гриппа типа А [2; 3]. Из всех подтипов вируса гриппа А ключевыми для человеческой популяции являются подтипы H1N1 и H2N3. По данным эпидемиологического сезона 2018/2019 в Европе среди всех лабораторно подтверждённых случаев (16472 случая) гриппозной инфекции в 99% случаях регистрировали вирус гриппа типа А и 1% – типа В. При этом среди всех субтипированных образцов вируса гриппа А (11890 случаев) в 55% регистрировали грипп А(H1N1) и 45% – А(H3N2) [4].

В случаях тяжёлого течения заболевания требуется перевод больных в отделение реанимации и интенсивной терапии, так как у пациентов развивается острое повреждение лёгких/острый респираторный дистресс синдром (ОПЛ/ОРДС), в основе которого лежит системная воспалительная реакция [5; 6; 7; 8]. По данным ВОЗ в период пандемии гриппа А(H1N1)pdm09 в 2009 количество больных с таким грозным осложнением составляло от 10 до 30% от всех заболевших. При этом, несмотря на проводимую интенсивную терапию, в том числе, противовоспалительную, смертность среди данного контингента доходила до 40 % [9; 10; 11].

По современным представлениям в патогенезе системного воспаления, наряду с Толл-подобными рецепторами и рецепторами цитокинов, отдельную роль играют интермедиаты углеводного обмена, в частности, гликолиза [12; 13; 14; 15]. Последние образуют аддукты с белками тканей и крови, называемые конечными продуктами гликирования (КПГ). Примерами таких продуктов

являются метилглиоксальлизин димер, 6-карбокسيэтиллизин, 6-карбоксиметиллизин и пентозидин [16; 17; 18; 19; 20]. Взаимодействуя с соответствующими рецепторами (рецепторами КПП), 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. Последние, непосредственно оказывая повреждающее действие на альвеолоциты и другие клетки лёгочной паренхимы, в свою очередь способствуют воспроизведению новых КПП [21; 22; 23].

Принимая во внимание вышеизложенное, актуальным является изучение роли КПП в патогенезе ОПЛ при гриппозной инфекции с целью разработки подходов к поиску средств, направленных на ограничение их накопления.

Степень разработанности темы исследования

Частота развития поражения легких, сопровождающегося прогрессирующей острой дыхательной недостаточностью, во время пандемии гриппа А(Н1N1)pdm09 в 2009 году привлекла к себе пристальное внимание отечественных и зарубежных ученых. Особенностью течения патологии была недостаточная эффективность этио- и патогенетической терапии, включающей в себя противовирусные препараты, глюкокортикостероиды, нестероидные противовоспалительные средства, препараты интерферона, а также искусственную вентиляцию легких [24; 25]. При этом отсутствовала общая позиция по целесообразности использования некоторых препаратов из-за риска отягощения течения патологии. В частности, применение глюкокортикостероидов ограничивало развитие воспалительной реакции, но лежало в основе риска присоединения бактериальной инфекции [26].

Вышеизложенное обусловило необходимость поиска новых подходов к терапии вирус-индуцированного ОПЛ. Была сформулирована концепция, заключающаяся в поиске средств, регулирующих течение синдрома системной

воспалительной реакции путем влияния на различные молекулярные механизмы данной патологии. 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) [2; 27; 28; 29].

В настоящее время убедительно показана и значимая роль лигандов рецепторов конечных продуктов гликирования (рКПГ) в развитии системного воспаления, как в клинике, так и в эксперименте [30; 31]. Было показано, что чрезмерное накопление КПГ приводит к развитию оксидативного стресса, характеризующегося генерацией активных форм кислорода и инактивацией ферментов, участвующих в антиоксидантной защите (каталаза и глутатион-пероксидаза), а также опосредованного ядерным фактором «каппа –би» (NF-κB) усиления экспрессии генов, кодирующих провоспалительные цитокины (в частности IL-1β, IL-6, TNF-α) [32; 33; 34]. Наибольшее количество публикаций такого рода связано с раскрытием роли КПГ в патогенезе осложнений сахарного диабета (СД).

Вышеизложенное подразумевает актуальность разработки подходов к профилактике и терапии неконтролируемого накопления КПГ на основе использования блокаторов данного процесса. В то же время в специальной литературе возможность ограничения процесса воспаления подобными лигандами представлена крайне скупо. Так, было показано, что блокатор КПГ аминогуанидин значительно снижал выраженность отека лапы у мышей в модели каррагинан-индуцированного локального воспаления; количества перитонеальных макрофагов и продукции ими оксида азота и перекиси водорода в модели паразитарной инфекции, вызванной трихинеллой спиральной *Trichinella spiralis*, а сульфорафан ограничивал рост уровня ряда цитокинов и подавлял активность NADPH-оксидазы в модели КПГ-индуцированного аортита [35; 36; 37].

Последнее открывает перспективность использования блокаторов накопления КПП с целью ограничения воспалительного процесса и при вирус-ассоциированном ОПЛ/ОРДС. До настоящего времени данные о подобных исследованиях в специальной литературе отсутствуют, что определяет необходимость проведения настоящей работы.

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 легких в условиях заражения мышей вирусами гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA 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 легких 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 аминуганидина 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.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются конечные продукты гликирования.

Предметом исследования является изучение роли конечных продуктов гликирования в формировании вирус-ассоциированного острого повреждения легких и оценка возможности экспериментальной коррекции их накопления.

Хронологические рамки

Выбор хронологических рамок, начиная с 1969 года, был обусловлен появлением первых научно подтверждённых данных о формировании конечных продуктов гликирования в организме человека.

Гипотеза исследования

Гипотеза исследования заключается в предположении о том, что применение блокаторов конечных продуктов гликирования позволит ограничить развитие острого повреждения легких/острого респираторного дистресс-синдрома, индуцированного вирусом гриппа.

Эмпирическая база исследования

В основу диссертационного исследования положен принцип изучения и обобщения фактического материала, представленного в клинических рекомендациях, отечественных и зарубежных экспериментальных работах, обзорах литературы, монографиях и руководствах

Научная новизна исследования

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

Впервые установлена значимая корреляционная зависимость между уровнем конечных продуктов гликирования и специфическими биомаркерами острого повреждения легких/острого респираторного дистресс-синдрома (степень насыщения гемоглобина крови кислородом и повреждения легочной паренхимы, уровень провоспалительных цитокинов в легких), что выявило роль первых в патогенезе вирус-индуцированного острого повреждения легких.

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

Впервые установлено, что экспериментальная лечебно-профилактическая терапия блокатором накопления конечных продуктов гликирования аминоксидина бикарбонатом оказывает протективное действие в отношении ряда показателей, характеризующих степень тяжести острого повреждения легких, у животных, зараженных вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09, в том числе, при сопутствующем сахарном диабете.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в раскрытии роли КПГ в патогенезе острого повреждения легких при экспериментальной тяжелой гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09; A/Aichi/2/68MA (H3N2). Выявленная зависимость между уровнем

накопления конечных продуктов гликирования и степень тяжести течения болезни позволила обосновать необходимые подходы к фармакологической коррекции вирус-индуцированного острого повреждения легких. Научно обоснована эффективность коррекции течения острого повреждения легких при гриппозной инфекции с помощью блокатора накопления конечных продуктов гликирования аминогуанидина бикарбоната, в том числе, при наличии сопутствующей патологии в виде сахарного диабета. Позитивное воздействие последнего реализуется на уровне образования ковалентных связей с промежуточными продуктами реакции Амадори с формированием устойчивого комплекса, что предотвращает их взаимодействие с аминокислотными группами белков и глико-липопротеинов.

Практическая значимость работы заключается в экспериментальном обосновании разработки подходов к поиску средств, ограничивающих чрезмерное накопление конечных продуктов гликирования, с целью изучения их эффективности в составе комплексной экспериментальной терапии острого повреждения легких/острого респираторного дистресс-синдрома вирусного генеза.

Методология и методы исследования.

Методология исследования состояла в моделировании вирус-индуцированного острого повреждения легких, 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- α , IL-6, IL-1 β и конечных продуктов гликирования в лёгких, маркерным гематологическим показателям воспаления, патоморфологическим и гистологическим изменениям в легочной паренхиме, а также содержанию конечных продуктов гликирования в легочной паренхиме.

На основании данных показателей оценивали эффективность экспериментальной терапии блокатором конечных продуктов гликирования

аминогуанидином бикарбонатом в отношении острого повреждения легких вирусного генеза.

Моделирование сахарного диабета осуществляли с помощью β -клеточного цитотоксина аллоксана моногидрата. Выбор модели был основан на данных о накоплении конечных продуктов гликирования при введении аллоксана моногидрата в экспериментах на крысах [38; 39].

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 аминогуанидина 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

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

Апробация результатов диссертационной работы

Апробация основных результатов проведена в ходе докладов 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 Донозоология-2020 (Санкт-Петербург, 2020), Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIV Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2021).

Публикации

Основное содержание диссертационной работы представлено в 11 публикациях, включая 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 7 тезисах, представленных на Всероссийских и Международных конференциях.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно планировал эксперименты и выполнял основные клинико-лабораторные и инструментальные исследования. Диссертант провёл статистическую обработку данных, описал и обобщил полученные результаты.

Структура и объём диссертации.

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

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».

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе острого повреждения легких

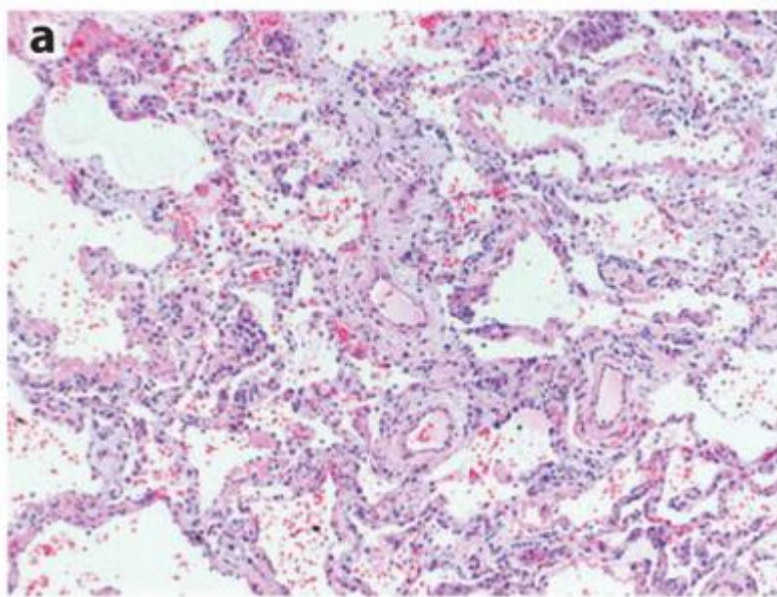
1.1 Острое повреждение легких и острый респираторный дистресс-синдром. История вопроса, клиническая картина, морфология и патогенез.

Острое повреждение легких и острый респираторный дистресс синдром (ОПЛ/ОРДС) - тяжелое воспалительное поражение легочной ткани, проявляющееся внезапной гипоксемией и диффузной легочной инфильтрацией на фоне отсутствия сердечной недостаточности. Клиническая картина характеризуется быстрым последовательным развитием (в течение 12-48 часов) тяжелой одышкой, тахипноэ, подключением вспомогательных мышц в процесс дыхания, наличием цианоза и дыхательной недостаточности [9; 40; 41].

Причиной возникновения ОПЛ и ОРДС, как наиболее тяжелой формы ОПЛ, могут быть самые различные факторы - от тяжелой механической травмы до инфекционных заболеваний. Так, например, ОПЛ/ОРДС является одним из наиболее часто встречающихся осложнений при тяжелой гриппозной инфекции [9]. Впервые ОПЛ, развившееся либо при ранении грудной клетки, либо шока, получило название «wetlung» («мокрое лёгкое») [42]. Впоследствии, в работе, опубликованной в 1967 году Ashbaugh D. и сотрудниками, подобные патологические изменения, наблюдавшиеся при множественных травмах, остром панкреатите, аспирации и вирусной пневмонии, были описаны авторами как респираторный дистресс синдром взрослых [43]. В 70-ых годах XX века данное состояние, развивавшееся у пациентов с сепсисом, гиповолемией на фоне повреждения почек или почечной недостаточности, часто обозначали как «шоковое лёгкое» [44; 45] или «септическое лёгкое» [6]. В 1994 году на согласительной Евро-Американской конференции понятие респираторный дистресс синдром взрослых дифференцировали как ОПЛ и ОРДС [7]. При этом различия между ОПЛ и ОРДС заключались лишь в степени тяжести клинической

картины и вероятности летального исхода у больных [46; 47; 48]. В июне 2011 года на Берлинской конференции была принята классификация тяжести течения ОРДС, заключающаяся в разграничении на лёгкую, среднюю и тяжёлую степени в зависимости от отношения парциального давления кислорода в артериальной крови к фракции вдыхаемого воздуха [49]. Существует несколько классификаций, разграничивающих клиническое течение ОРДС на стадии, в основном включающие в себя 3 этапа: острое лёгочное повреждение, прогрессирующая дыхательная недостаточность и финальная (терминальная) фаза [47; 50; 51; 52]. На настоящий момент, согласно МКБ 10, под ОРДС и ОПЛ подразумевается респираторный дистресс синдром взрослых (индекс J80).

Морфологические изменения в легких при ОПЛ/ОРДС, в том числе при гриппозной инфекции, происходят поэтапно [53, 54, 55, 56, 57]. При макроскопическом исследовании больных, погибших в ранние сроки заболевания, легкие были увеличены в размерах, плотные, темно-красного цвета. У больных, умерших в более поздние сроки, помимо вышеописанной картины, наблюдались множественные очаговые кровоизлияния под плеврой. При гистологическом исследовании, в случае гибели в первые сутки заболевания, наблюдалось полнокровие всех сосудов, адгезия тромбоцитов к эндотелию, краевое стояние эритроцитов. В просвете бронхов имели место комплексы слущенных клеток эпителия респираторного тракта и эритроциты, утрата ресничек цилиндрическим эпителием, расширение сосудов бронхов и их полнокровие; в альвеолах - скопление эритроцитов и лейкоцитов, как гранулоцитов, так и агранулоцитов. В посткапиллярных венулах наблюдалось скопление нейтрофилов, в просвете альвеол - слущенных альвеолоцитов и отечной жидкости. Специфическими признаками ОПЛ/ОРДС служили: фиброзное утолщение альвеолярных стенок, наличие ателектазов, появление гиалиновых мембран, интерстициальные и внутриальвеолярные отеки. В легочных артериях и крупных венах отмечались сладжи (скопление форменных элементов крови) и набухание эндотелия; в периваскулярной области соединительной ткани – формирование отёка.



Характерная гистологическая картина лёгких при ОРДС. Цитируется по Matthay M.A. et al. [58]

В дальнейшем, при гибели в более поздние сроки, количество кровоизлияний возрастало, имели место: лейкоцитарная инфильтрация, десквамация альвеолоцитов в просвет альвеол, выпадение фибрина и формирование гиалиновых мембран, обширные очаги дистелектазов и ателектазов, связанные с потерей сурфактанта, выраженный отек легочных и бронхиальных артерий, признаки интерстициального фиброза и увеличение количества альвеолярных макрофагов. При гистологическом исследовании легких на всех сроках гибели в сосудах микроциркуляторного русла наблюдались микроагрегаты тромбоцитов.

В литературе рассматриваются два механизма развития ОПЛ/ОРДС – как следствие «прямого» и «непрямого» повреждения легких [59, 60]. В первом случае происходит непосредственная диффузная деструкция и гибель альвеолоцитов. Продукты тканевого повреждения индуцируют развитие локального воспаления, в зоне которого накапливаются активированные полиморфноядерные лейкоциты, моноциты, тканевые макрофаги и фибробласты, продуцирующие комплекс провоспалительных цитокинов и хемокинов: фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерлейкина-1 (IL-1), интерлейкина-6 (IL-6) и других медиаторов воспаления [61; 62, 63]. Их дальнейшее поступление в

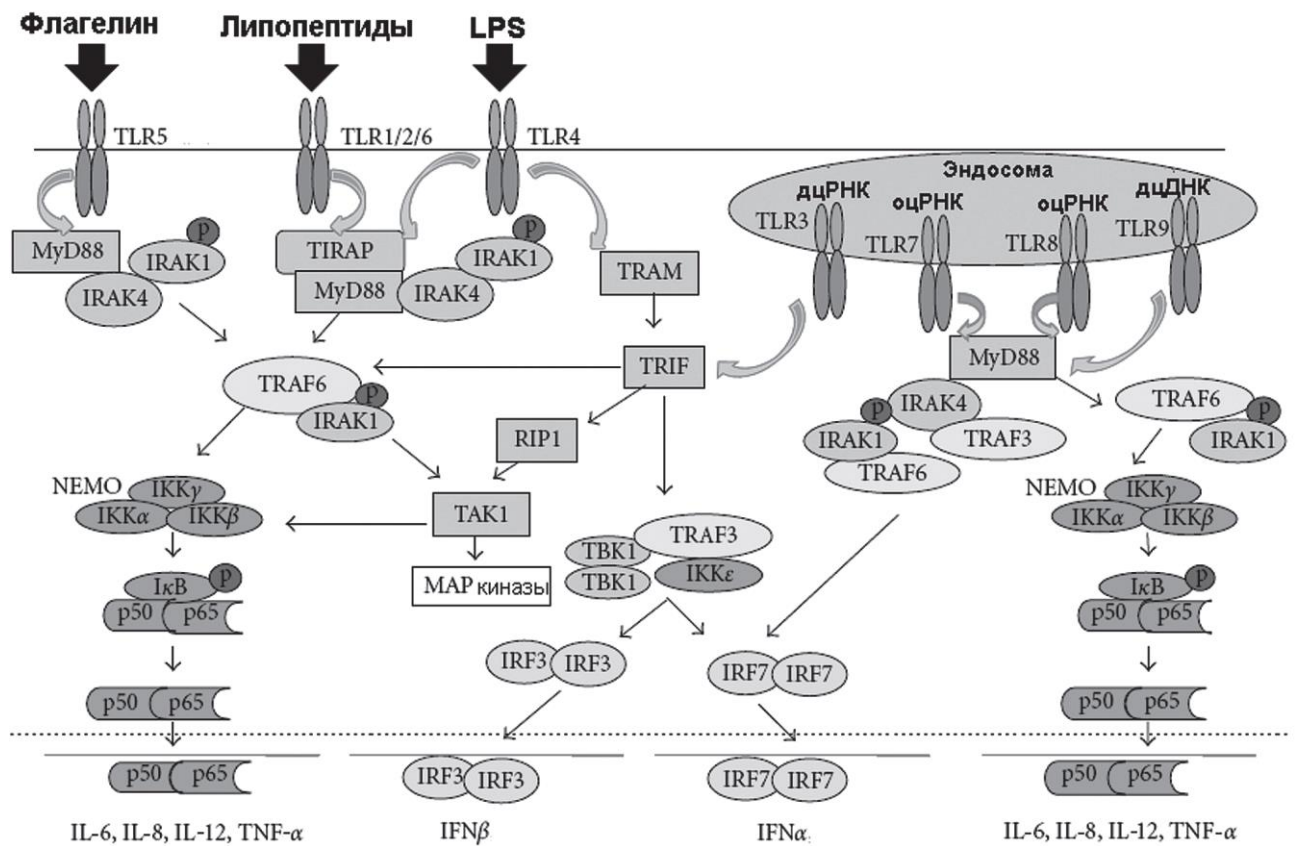
кровоток из очага альтерации приводит к развитию синдрома системной воспалительной реакции [64]. Гибель клеток эндотелия альвеоло-капиллярной мембраны, за счет адгезии нейтрофилов с пневмоцитами, приводит к повышению проницаемости мембраны, что обуславливает проникновение экссудата в легочный интерстиций и альвеолы и накопление отечной жидкости, насыщенной протеином и фибрином. Одновременно происходит потеря сурфактанта, отложение фибрина в альвеолах, формирование гиалиновых мембран [65; 66; 67; 68]. Нарушение процессов коагуляции приводит к образованию тромбов в легких, что усугубляет диффузное альвеолярное повреждение вследствие развивающейся ишемии [69; 70]. Во втором – пусковым механизмом является изначальное наличие системного воспалительного процесса, сопровождающегося неконтролируемым нарастанием уровня провоспалительных медиаторов [71; 72; 73]. Затем, развитие ОПЛ/ОРДС происходит тем же путем, что и в случае прямого повреждения [46; 74; 75; 76; 77].

К факторам, вызывающим первичное повреждение, относят аспирационные пневмонии (заброс желудочного содержимого в дыхательные пути, ингаляция токсических веществ, утопление), неаспирационные пневмонии (респираторные инфекции бактериальной или вирусной этиологии) и ушиб лёгкого. К вызывающим вторичное повреждение - сепсис, шок, тяжёлые травмы, массивные гемотрансфузии, острый панкреатит, искусственное кровообращение, острые отравления, диссеминированное внутрисосудистое свёртывание крови, ожоги, черепно-мозговую травму [78].

Основным патогенетическим звеном ОПЛ/ОРДС является системное воспаление. В основе его запуска лежит реакция на воздействие таких поражающих факторов как структурные дефекты клетки; связывание молекул, несущих информацию о повреждении клеток, или присутствии патогенов (патоген-ассоциированные молекулы), с соответствующими рецепторами; взаимодействие специфических иммунных компонентов с клеткой. Подобная реакция или «клеточный стресс» приводит к активации соответствующих рецепторов продукции и выбросу провоспалительных цитокинов и синтезу

«стресс-молекул» (внутриклеточные белки, рецепторы и медиаторы) [64]. Далее, по принципу «порочного круга/circulus vitiosus» происходит дальнейшая продукция характерных для клеточного стресса белков (в частности, белков теплового шока, цитокинов, структурных белков рецепторов, распознающих молекулы, несущие информацию о повреждении или патогене, и развитие оксидативного стресса [79; 80; 81].

В случае инфекционного поражения, инициирующим фактором развития клеточного стресса является распознавание именно патоген-ассоциированных молекул «паттерн-распознающими рецепторами» врожденного иммунитета. К данным рецепторам, в первую очередь, относятся Toll-подобные рецепторы, широко представленные на клетках иммунной системы, а также фибробластах, эндотелии, эпителии [82; 83; 84; 85]. Гиперактивация этих рецепторов приводит к развитию воспалительного сигнального каскада [86; 87; 88, 89], обуславливающему активацию интерлейкин-1-ассоциированного киназного комплекса [90]. В свою очередь киназы, входящие в данный комплекс, фосфорилируют TNF α -ассоциированный фактор 6, что приводит к индукции активности различных транскрипционных факторов (NF- κ B, интерферон регуляторным факторам), регулирующих гены, участвующие в кодировании цитокинов и хемокинов (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 и IL-12), белков острой фазы, молекул адгезии [91; 92; 93; 94; 95]. При этом NF- κ B является центральным звеном иммунных реакций, так как он также кодирует регуляторы апоптоза и клеточной пролиферации [96]. Генерация воспалительных факторов, в свою очередь, «подстёгивает» данный патологический процесс, как в клетке-продуценте, так и клетках, находящихся рядом [97; 98; 99].



Каскад сигнальных путей, наблюдаемых при активации Toll-подобных рецепторов. Цитируется по Абатуров А.Е. и соавт. [88]

Немаловажным признаком развития системного воспаления является наличие лейкоцитоза ($>12 \times 10^9/\text{л}$), или, наоборот, лейкопении ($>4 \times 10^9/\text{л}$). Патогенетический механизм индукции лейкоцитоза связан со способностью эндотелиальных клеток, макрофагов и фибробластов, накапливающихся в зоне воспаления, продуцировать следующие цитокины: гранулоцитарный и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующие факторы, интерлейкины 3 и 5, стимулирующие накопление лейкоцитов, в том числе, гранулоцитов и моноцитов. В основе этого процесса лежит увеличение активности транскрипционных факторов NF-κB, белков c-fos, c-jun и c-myc [100] и последующее повышение продукции функционального гомолога интерлейкина 8 – хемоаттрактанта кератиноцитов и макрофагального воспалительного белка-2, отвечающих за рекрутмент лейкоцитов [101; 102; 103], а также их рост и дифференцировку [104; 105; 106]. Развитие же лейкопении обусловлено влиянием

инфекционных факторов на уровень миелопоеза, интенсивным распадом лейкоцитов в периферической крови и миграцией лейкоцитов в область воспаления с последующим разрушением [107].

Несмотря на общую направленность изменений цитокинового профиля при ОПЛ/ОРДС, как при прямом, так и непрямом механизмах поражения, существуют различия в степени их выраженности. Так, в экспериментах на мышах, которым вводили липополисахарид (ЛПС) кишечной палочки *E.coli*, O55:B5 в дозе 10 мг/особь эндотрахеально и 125 мг/особь внутрибрюшинно, были выявлены количественные различия в содержании провоспалительных цитокинов в бронхо-альвеолярном лаваже [108]. Таким образом, при прямом воздействии ЛПС на легочную ткань выраженность воспалительной реакции была значительно выше, чем при системном введении.

Уровень провоспалительных цитокинов. Адаптировано по Menezes S.L.S.et al. [108].

Интерлейкины, нг/мл	Эндотрахеально	Внутрибрюшинно
IL-6	2,95±0,05	1,33±0,14
IL-10	1,39±0,16	0,50±0,14

Свое влияние на выраженность индукции провоспалительных цитокинов при ОПЛ/ОРДС оказывает и этиологический фактор. Так, уровень интерлейкина 6 (IL-6) в плазме крови при сепсисе (от 150-1400 пг/мл) и пневмонии (75-938 пг/мл) был выше, чем при аспирации (115-689 пг/мл), травме (114-603 пг/мл) и других этиологических факторах (109-744 пг/мл). А у пациентов с сепсисом медианные значения уровня IL-6, IL-8 и IL-10 были в два раза выше, чем у больных пневмонией. Выраженность индукции провоспалительных цитокинов коррелировала, при этом, с уровнем выживаемости в дальнейшем [109]. Аналогичные данные были получены и при изучении взаимосвязи между уровнем цитокинов в бронхо-альвеолярном лаваже и исходом патологии [110].

Уровень провоспалительных цитокинов в бронхоальвеолярном лаваже. Адаптировано по Meduri G. U. et al. [110].

Цитокины	Группы	День наблюдения	
		<2 День	3-10 День
TNF- α , пг/мл	Выжившие	1773 \pm 74	890 \pm 174
	Невыжившие	5,022 \pm 287	5055 \pm 506
IL-1 β , пг/мл	Выжившие	5225 \pm 372	2009 \pm 876
	Невыжившие	17854 \pm 1405	16570 \pm 2904
IL-6, пг/мл	Выжившие	4174 \pm 192	1374 \pm 382
	Невыжившие	11099 \pm 547	11074 \pm 964
IL-8, пг/мл	Выжившие	1772 \pm 40	1040 \pm 79
	Невыжившие	4437 \pm 197	3938 \pm 348

Таким образом, у пациентов с позитивным исходом патологии содержание провоспалительных цитокинов находилось на значительно более низком уровне, чем у погибших впоследствии, а также наблюдалось кратное снижение их концентрации в первом случае.

Клиническое исследование, проведённое на 200 пациентах с тяжёлой травмой головного мозга [111], показало, что у больных, с развившимся впоследствии ОРДС, уровень ряда провоспалительных цитокинов в плазме крови был значительно выше в сравнении с пациентами, у которых ОРДС не развивался. Медианный, 25-ый и 75-ый процентиля для интерлейкина -10 были равны – 14,5 (8,1; 34,8) и 10,0 (6,1; 18,6); IL-8 – 158,1 (45,0; 284,0) и 57,4 (26,0; 135,1); IL-6 – 568,2 (224,4; 2287,0) и 241,2 (92,7; 638,8) у пациентов с ОРДС и без ОРДС, соответственно. Подобные данные были получены и при изучении взаимосвязи между концентрацией цитокинов IL-6 и IL-8 и степенью тяжести течения ОРДС по шкале оценки острых физиологических расстройств и хронических функциональных изменений (APACHEII) [112]. Было показано, что у пациентов с ОРДС уже в первые сутки заболевания наблюдался рост IL-6 и IL-8, доходивший

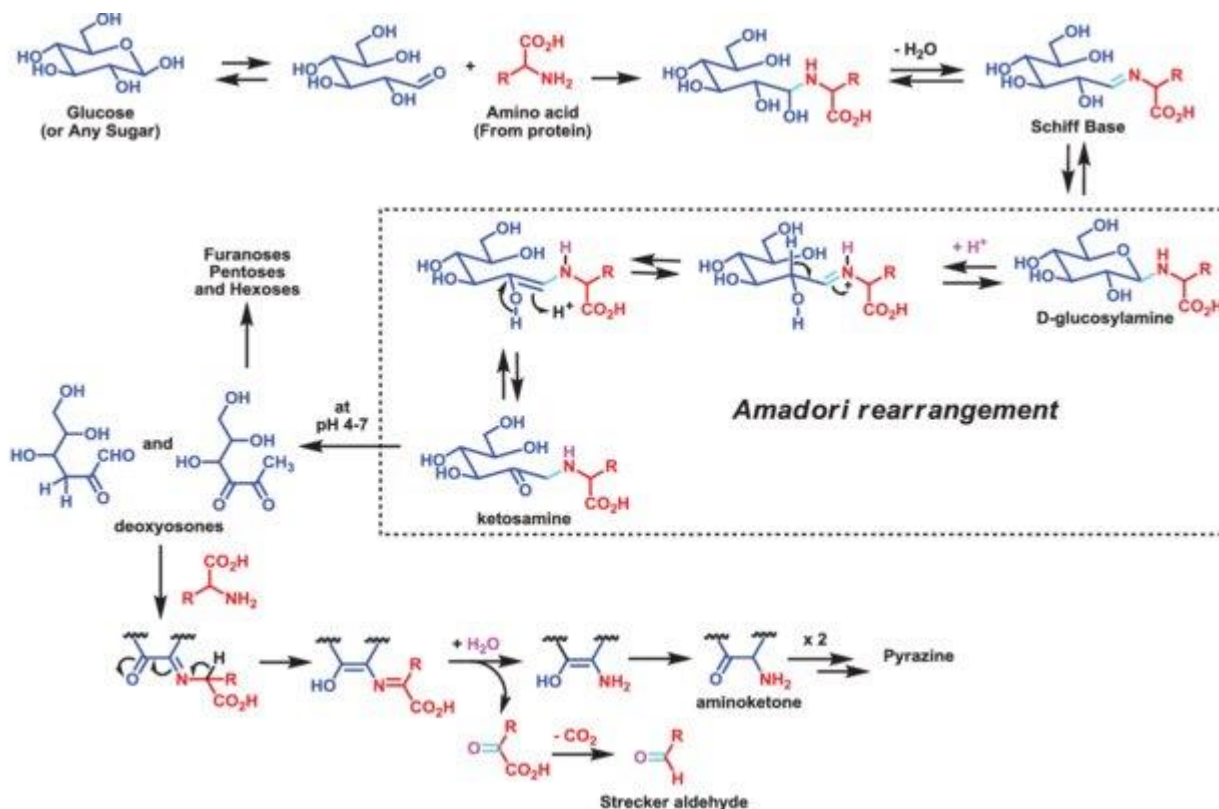
до 76,5 (31-1893) и 129 (30-675) пг/мл в сыворотке крови (данные представлены в медиане, 25-ый и 75-ый процентилях), по сравнению со здоровыми добровольцами, у которых уровень ИЛ-6 и ИЛ-8 составлял 38 (31-189) и 51,5 (39-266) пг/мл, соответственно. Проведенный корреляционный анализ выявил значимую зависимость между степенью цитокинемии и тяжести клинической картины по данной шкале на уровне $r=0,41$. Таким образом, была отмечена взаимосвязь не только между уровнем содержания провоспалительных цитокинов и наличием ОРДС, но и степенью тяжести течения последнего [112].

Взаимосвязь между уровнем продукции провоспалительных белков и выраженностью воспалительных процессов была продемонстрирована в условиях ЛПС-индуцированного ОПЛ [113]. ЛПС (*E.coli* 0111:B4) вводили внутривентриально в дозе 50 мг/кг мышам линии BALB/c. При развитии ОПЛ наблюдался кратный рост в БАЛ таких цитокинов, как TNF- α – с 70 ± 20 до 280 ± 60 пг/мл, ИЛ-1 β – с 15 ± 2 до 60 ± 20 пг/мл, ИЛ-6 – с 15 ± 4 до 65 ± 15 пг/мл у животных, получавших плацебо и ЛПС, соответственно. Оценка концентрации белков, характерных для воспаления, показала схожую картину. В легких наблюдался рост отношения циклооксигеназа-2/ β -актин со 100 ± 5 до 180 ± 20 , индуцибельной синтазы оксида азота/ β -актин – со 100 ± 2 до 120 ± 10 и NF- κ B/ β -актин – с 100 ± 5 до 400 ± 50 . Аналогичная картина наблюдалась и при изучении концентрации других белков воспаления: падение отношения циклооксигеназа-2/ β -актин доходило до 140 ± 10 , индуцибельной синтазы оксида азота / β -актин – до 95 ± 5 и NF- κ B/ β -актин – до 110 ± 10 .

Таким образом, показатели цитокинового профиля, уровня сигнальных внутриклеточных белков и ряда других протеинов, играют роль важных маркеров выраженности системной воспалительной реакции. Наряду с этим, существенное значение, как в индукции воспаления, так и в определении степени тяжести данного процесса, сегодня придается лигандам рКПГ.

1.2 КППГ и их роль в индукции воспаления

КППГ называют различные по структуре молекулы, которые образуются в результате неферментативного гликирования белков, липидов и нуклеиновых кислот [114]. Сам процесс является ковалентной реакцией, в результате которой образуется сахар-протеиновый комплекс [115; 116].



Реакция Майяра. Цитируется по Traore K. et al [116].

Впервые информация о процессе гликирования была опубликована в 1969 г, когда Rahbar S. с сотрудниками, изучая гемолизат пациентов с СД методом электрофореза, выявили наличие неразрушенной формы гемоглобина A_{1c} в геле, в то время как в гемолизате здоровых добровольцев данный участок отсутствовал. Исследователи связали полученные данные с увеличением стабильности молекулы, однако механизм устойчивости белка оставался неизученным. Было выдвинуто предложение, что в стабилизации гемоглобина A_{1c}, участвуют аминсахара [117]. Позднее, Srivastava S. K. и сотрудники присвоили необычной форме гемоглобина название пиридоксильированный гемоглобин, так как он не связывался с пиридоксаль-5-фосфатом [118]. Аналогично было показано

отсутствие влияния пиридоксаль-5-фосфата на стабильность молекулы гемоглобина у пациентов со серповидноклеточной анемией [119]. В 1977 году Koenig R.J. и сотрудники, сравнив фракцию гемоглобина A_{1c} , полученную от здоровых добровольцев, с аналогичной фракцией у пациентов с СД, показали 2-х кратное превышение его уровня у последних. Дальнейший анализ гемоглобина A_{1c} методом протонно-магнитного резонанса позволил выявить наличие ковалентной связи между аминокислотой валином и такими углеводами, как глюкоза и манноза в гемоглобине. Формирование ковалентной связи подтвердилось при проведении химической реакции глюкозы с валилгистидином, в которой был выявлен механизм формирования КПГ через образование оснований Шиффа с последующей перегруппировкой Амадори [120]. Исследователями была выдвинута гипотеза о том, что в живых организмах процесс формирования гликированного гемоглобина связан с присоединением фосфорилированных углеводов к молекуле гемоглобина А [121]. В 1981 году Abraham E.C. назвал данную форму гемоглобина гликозилированной и показал, что гликирование гемоглобина происходит в результате реакции молекулы гемоглобина с фруктозой-1,6-фосфатом, глюкозой-6-фосфатом и глюкозой [122]. Повреждающее действие данного процесса в дальнейшем было выявлено и по отношению к альбумину, коллагену, фибронектину, миелину, компоненту С3, тубулину, активатору пламиногена и фибриногену [123; 124; 125; 126].

Существует несколько путей образования КПГ [32; 114; 127; 128; 129]: полиоловый – с образованием фруктозы из молекулы глюкозы с дальнейшим метаболизмом фруктозы до α -оксоальдегидов (предшественников КПГ) и присоединением к объекту гликирования [130; 131] следующий путь связан с присоединением молекулы глюкозы к участкам белка, содержащим свободные amino- или гуанидиновые группы. В результате данной реакции происходит образование двойной ковалентной связи между азотом молекулы белка и первым углеродом глюкозы. Образованное соединение именуется основанием Шиффа, являющимся нестабильной молекулой. Ее стабилизация происходит через перегруппировку Амадори, в результате которой соединение молекулы белка и

глюкозы проходит через одну ковалентную связь. Далее, остаток глюкозы подвергается дальнейшим модификациям, в частности, окислению, с формированием КПП [132; 133]; третий путь образования КПП связан с деградацией углеводов и продуктов реакций, образование которых изложено выше. Так, при воздействии активных форм кислорода на основания Шиффа и углеводы происходит глубокое окисление молекул углеводов до α -оксоальдегидов. С другой стороны основания Шиффа, при незавершённой перегруппировке Амадори, могут отсоединяться от молекулы белка с образованием 3-дезоксиглюкозона. Последний способен повторно присоединяться к молекуле протеина или подвергаться деградации до МГ, который, в свою очередь, присоединяется к молекуле белка [134].

КПП присутствуют в организме человека в норме и постепенно накапливаются в процессе старения [135; 136; 137]. При наличии ряда патологических состояний индукция КПП приобретает «лавинообразный» характер, а их накопление негативно воздействует на функции и свойства тканей [32; 127; 138; 139; 140; 141; 142, 143; 144; 145; 146; 147]. КПП устойчивы к протеолитическому расщеплению и являются агрессивными, по отношению к здоровым клеткам, молекулами, так как вызывают образование измененных поперечных межмолекулярных связей в различных белках организма [148]. К молекулам КПП относят: дезоксиглюкозон лизин димер, метилглиоксаль лизин димер, глиоксаль лизин димер, N ϵ -карбоксиметиллизин, N ϵ -карбоксиэтиллизин, пентозидин, пираллин, фуроил-фуранилимидазол [16; 17; 18; 19; 20]. Наиболее распространенными предшественниками образования КПП являются: метилглиоксаль (МГ) – предшественник метилглиоксаль лизин димера, 3-дезоксиглюкозон – предшественник дезоксиглюкозон лизин димера и глиоксаль – предшественник глиоксаль лизин димера. Данные молекулы образуются в результате деградации либо глюкозы, либо оснований Шиффа [114; 149] и приводят к увеличению образования необратимых КПП [138].

Чрезмерное накопление КПП в тканях вызывает индукцию воспалительной реакции и активацию процесса накопления активных форм кислорода. Участие КПП в процессе воспаления реализуется через специфические рецепторы (рКПП), расположенные на мембране клеточной стенки. Наиболее хорошо известным рКПП является мультилигандный цельный рецептор, экспрессия которого в моноцитах/макрофагах, Т-клетках, лимфоцитах и клетках эндотелия обуславливает развитие воспалительного процесса [135; 150; 151]. Процесс связывания КПП с рКПП обуславливает индукцию запуска сигнального пути NADPH-оксидаза/АФК/p21RAS/p38, в процессе которого происходит фосфорилирование транскрипционного фактора NF-κB, в свою очередь, инициирующего экспрессию генов, кодирующих воспалительные белки, накопление активных форм кислорода и усиление каспазного пути активации апоптоза [151; 152; 153; 154; 155; 156; 157; 158].

Прямым доказательством важной роли КПП в воспалительном процессе являются факты, демонстрирующие влияние их чрезмерного накопления на уровень провоспалительных цитокинов. Так, у больных СД, получавших диету, богатую КПП, наблюдался рост TNF-α и С-реактивного белка на 86,3 и 35 %, соответственно, по сравнению с базовыми показателями [159]. Инкубирование моноцитов человека в среде с гликированным сывороточным альбумином быка (250 мкг/мл) обусловило увеличение концентрации IL-1β до 93,5 п/ммоль и TNF-α до 33±10 п/ммоль при 16,2±2 п/ммоль и 2±1 п/ммоль в контроле, соответственно [160].

Изучение уровня экспрессии рКПП в эндотелиальных клетках пуповинной вены под действием ЛПС продемонстрировало наличие дозозависимого эффекта. Так, при добавлении ЛПС *E.coli* 055:B5 в культуру клеток в дозах от 0,01-10 мкг/мл с последующей инкубацией в течение 24 часов рост отношения рКПП/β-актин составил от 3,0±1,5 до 5,0±1,0 при контрольных значениях 1,0±0,5. Применение антител к рКПП (10 мкг/мл) снизило отношение фосфорилированной формы IκBα к β-актину с 2,8±0,2 до 1,8±0,1 и ограничило падение отношения дефосфорилированной формы данного белка к β-актину (от 0,4±0,1 до 0,7±0,1).

Таким образом, увеличение продукции рКПГ под действием провоспалительного фактора активизирует белок IкВ α , участвующий в регуляции транскрипционного фактора NF-кВ [161].

Интересные данные, подтверждающие роль рКПГ в индукции роста провоспалительных цитокинов, были получены с использованием ловушек КПГ (форма рКПГ, неприкреплённая к клетке и находящаяся в межклеточном пространстве – растворимый рКПГ) [162]. Известно, что растворённая форма рКПГ не является клеточным рецептором, в отличие рКПГ клеточной стенки и представляет собой наружную часть рецептора, образующуюся в результате протеолиза цельного рецептора. Растворенная форма способна связываться с КПГ, что, однако, не приводит к запуску сигнального пути ввиду отсутствия внутриклеточной части рецептора. Таким образом, растворённый рКПГ, связываясь с собственными лигандами, препятствует их воздействию на клеточный рКПГ. Так, изучение эффективности антител к цельному мультилигандному рКПГ (15 мг/кг в/в) и растворенного рКПГ (100 мкл/кг в/б) в условиях HCl-индуцированного ОПЛ (HCl 0,1M 75 мкл э/т) у мышей линии C57Bl/6 показало ограничение роста уровня провоспалительных цитокинов в бронхоальвеолярном лаваже под их действием.

Уровень провоспалительных цитокинов в бронхоальвеолярном лаваже. Адаптировано по Blondonnet R. et al. [162].

Группы животных	Уровень провоспалительных цитокинов, пг/г		
	TNF- α	IL-6	IL-17
HCl	250 \pm 150	3500 \pm 3500	1000 \pm 300
HCl+антитела к рКПГ	50 \pm 10	200 \pm 100	200 \pm 100
HCl+растворенный рКПГ	75 \pm 50	200 \pm 100	50 \pm 10

Гистологическое исследование показало отсутствие кровоизлияний, увеличения толщины альвеолярной стенки и роста клеточных инфильтратов в лёгких у мышей, получавших терапию, в отличие от контрольных животных [162].

Аналогичные данные были получены при клиническом обследовании, проведённом на 500 пациентах. У больных, с последующим развитием ОРДС, при поступлении уровень растворимого рКПГ в плазме составлял 1900 (1500 и 3000) пг/мл (данные представлены как медиана, 25-ый и 75-ый процентиля), в то время как у пациентов, у которых данная патология не развивалась, уровень рКПГ в плазме составлял 1000 (600 и 1800) пг/мл. Спустя сутки разница в уровне данного показателя увеличивалась и содержание растворимого рКПГ в плазме крови составляло уже 2500 (1500 и 3500) пг/мл и 900 (600 и 1600) пг/мл у пациентов, с последующим развитием ОРДС, и без развития данной патологии, соответственно [163].

Наряду с КПГ значительную роль в индукции воспаления играют их предшественники и, в первую очередь, МГ. Так, при инкубировании эндотелиальных клеток пупочной вены с МГ (420 мкмоль) имело место увеличение экспрессии циклооксигеназы-2 в 2,0 раза (по отношению к контролю) и простагландина E₂ 1100±200 до 2000±300 пг/мг (в пересчёте на общий белок); увеличение фосфорилирования белка JNK в 6,0 раз и белка p38 в 5,7 раз по отношению к контролю. Наряду с этим, авторами работы было выявлено уменьшение количества жизнеспособных клеток в среде со 100 до 80 % в контроле и при добавлении МГ, соответственно [164]. В работе [165] было показано, что инкубация МГ (5 ммоль/л) в эндотелиальных клетках человека приводит к снижению уровня мРНК, кодирующих белок bcl-2, до 30±10 % (по отношению к 100 % в контроле), а совместное применение МГ и TNF-α (10 нг/мл) вызывает 2,5 кратный рост количества погибших клеток в среде по отношению к эндотелиальным клеткам, инкубированных только с TNF-α. В исследовании на 60 пациентах с псориазом была выявлена зависимость между концентрацией МГ и выраженностью показателей тяжести течения заболевания. Так, увеличение

концентрации МГ в сыворотке крови коррелировало с повышением уровня общего пероксида, площадью распространения псориаза и снижением общей антиоксидантной активности ($r=0,610$; $r=0,577$; $r=0,469$, соответственно, при $p \leq 0,05$) [141].

Наиболее широко в литературе представлены данные, характеризующие роль КПП в течении СД и его осложнений [32; 166; 167; 168]. Так, например [142], в клиническом исследовании на 83 пациентах с СД было показано, что в случае атеросклеротического поражения уровень КПП соответствует количеству вовлеченных сосудов - с 4 мЕд/мл при атеросклерозе одного сосуда до 8 мЕд/мл при атеросклерозе трёх сосудов. В основе выраженности атеросклеротических изменений в сосудистой стенке лежит повреждение эндотелиоцитов и продуцирование ими факторов адгезии и хемоаттрактантов, обуславливающих эмиграцию лейкоцитов; активация RAGE/NADPH-оксидаза/АФК/MAPKs сигнального пути, приводящего к увеличению активности транскрипционного фактора NF-κB в макрофагах. Активированные макрофаги являются катализаторами окисления липопротеинов низкой плотности в месте адгезии. В процессе их фагоцитоза макрофаги трансформируются в пенистые клетки, а сам процесс сопровождается выбросом IL-1β, IL-6, TNF-α, что обуславливает дальнейшее развитие локального воспаления, в том числе и в мигрирующих макрофагах, замыкая тем самым «порочный круг» течения атеросклероза [169; 170]. Повреждение белков базальной мембраны сетчатки глаза и нефрона путем неферментативного гликирования лежит также в основе таких осложнений СД как ретинопатия и нефропатия [166]. Так, при накоплении фуросина в коллагене кожи свыше 860 пмоль/мг риск прогрессирования ретинопатии у больных СД доходил до 74,3%, в то время как у пациентов с концентрацией фуросина ниже 860 пмоль/мг не превышал 22,2%. Развитие нефропатии и поражения коронарных сосудов у пациентов с СД 2 типа также коррелирует с увеличением концентрации фуросина, карбоксиметиллизина и пентозидина в коллагене [143, 167]. Изучение взаимоотношений между их уровнями и уровнем липопротеинов низкой

плотности у пациентов с СД 2 типа, страдающих ишемической болезнью сердца (ИБС), выявило позитивную зависимость на уровне $r=0,049$ при значимости $p \leq 0,005$. Одновременно с этим, у больных СД чаще регистрировали тяжёлое трёхсосудистое поражение коронарных сосудов ($r=0,021$, $p \leq 0,005$), чем у пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца без сопутствующего нарушения углеводного обмена [167].

Большую роль играет накопление КППГ и в патогенезе других заболеваний. Так, при исследовании биоптата мозга трёх пациентов, погибших от губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота («коровье бешенство»), иммуногистохимически были выявлены гликированные формы прионных белков в астроцитах. Гликированные прионы, связываясь с рКППГ, подвергаются цитозу в астроцитах, что приводит к проникновению прионного белка в клетку. Последний способствует катализу гомологичного нормального белка, что вызывает дальнейший экспоненциальный рост прионного белка и повреждение клетки [146]. В исследовании *in vitro* и *in vivo* [144] было изучено влияние КППГ на течение рака поджелудочной железы. Показано, что через 24 часа после добавления предшественника КППГ карбоксиметиллизина в культуру раковых клеток поджелудочной железы человека происходит увеличение их пролиферации в 1,2 раза (с $7,9 \pm 0,2 \times 10^5$ до с $9,8 \pm 0,2 \times 10^5$ клеток), повышение активности NF-κB/p65 (с $0,15 \pm 0,02$ до $0,38 \pm 0,05$ OD (оптическая плотность)). На геномодифицированных мышях Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D/+}, склонных к развитию аденокарциномы поджелудочной железы, показано, что карбоксиметиллизин способствует увеличению частоты развития патологии до 72,7% против 9,1% в контрольной группе. Наряду с КППГ существенную роль в патогенезе различных заболеваний играют и их предшественники. Так, у пациентов с гипертонической болезнью наблюдалась прямая зависимость между уровнем МГ и С-реактивного белка ($r=0,45$, $p \leq 0,01$), скоростью распространения пульсовой волны ($r=0,62$, $p \leq 0,01$) и лодыжечно-плечевым индексом ($r=0,50$, $p \leq 0,01$), что свидетельствует не

только о наличии воспаления, но и о снижении эластичных свойств стенки сосудов [171].

1.3 Особенности развития ОПЛ/ОРДС при гриппозной инфекции

Несмотря на общую клиническую картину течения ОПЛ/ОРДС, обусловленного воздействием различных факторов, тяжелое поражение легочной ткани при гриппозной инфекции имеет некоторые особенности: во-первых, инфекционный агент обладает непосредственным повреждающим действием на клетки респираторного тракта; во-вторых – происходит стремительное, «лавинообразное» распространение активных вирионов и «захват» ими соседних клеток и в третьих – продолжительное присутствие вирусных частиц в клетках респираторного тракта и сосудистом русле. Развитие ОПЛ/ОРДС, в случае заражения, идет по «прямому» пути повреждения легких [59, 60, 172, 173] вследствие мощного цитопатогенного действия вируса на восприимчивую клетку, в которой он выполняет следующие этапы своего жизненного цикла: адсорбция на поверхности клетки; проникновение вируса в клетку и декапсидация генома; экспрессия генов; транскрипция и трансляция; репликация вирусного генома; сборка вирусных частиц и выход из клетки [174].

Областью первичной альтерации для вируса гриппа являются эпителиоциты слизистой оболочки респираторного тракта [175; 176]. Вирус адсорбируется на клетках путём прикрепления к α -2,3- и α -2,6-сиаловым кислотам гликопротеина клеточной стенки с помощью своего прикрепительного белка – гемагглютинина [176; 177]. Далее вирус проникает в цитоплазму клетки по механизму клатрин-опосредованного эндоцитоза. Сформированная эндосома с вирионом внутри продвигается в пределах клетки вдоль микроканальцев с помощью белков-транспортеров (динеин и кинезин) [178; 179]. Внутри эндосомы, с помощью белка M_2 вируса гриппа, создаётся канал, снижающий рН в эндосоме, что приводит как к разрушению оболочки вируса гриппа (белка $M1$), так и конформационным изменениям со стороны молекулы гемагглютинина. Конформационные изменения

в молекуле гемагглютинина при снижении уровня рН заключаются в перемещении части белка (пептида слияния) с основания к верхнему концу. В результате пептид слияния проникает в мембрану эндосомы и формирует поры [180; 181; 182]. Через образованные поры происходит высвобождение вирусного рибонуклеопротеина и его транспорт в ядро с помощью транспортных белков α/β -калиоферин [183; 184]. На данной стадии трансформация вируса происходит за счет молекулярных процессов: транскрипции, трансляции и репликации геномной нуклеиновой кислоты. На первой стадии синтезируется мРНК на геномной матрице; на второй – синтез белка на матрице РНК и на третьей – синтез нуклеиновых кислот с целью наработки геномных последовательностей для инкапсидации в вирион [174]. После этого вирионы отпочковываются от цитоплазматической мембраны и покидают клетку по механизму экзоцитоза, чаще всего, путем вирус-опосредованного лизиса клетки [185; 186]. Далее высвобожденные вирионы присоединяются к следующим эпителиоцитам, что в итоге приводит к цепной репродукции вирусных частиц в клетках лёгочной паренхимы вплоть до поражения эндотелия лёгочных сосудов, в особенности капилляров лёгких [187; 188]. Гибель эпителиальных клеток и, развивающийся вследствие этого некроз эпителия, лежат в основе разрушения естественного защитного барьера, что приводит к вирусемии как следующей фазе патологического процесса. Последняя, наряду с продуктами клеточного распада, комплексом провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления, обуславливает развитие выраженного эндотоксикоза и генерализацию инфекции, дополнительному отягощению заболевания и формированию тяжёлых и летальных случаев вирус-индуцированного ОРДС [61; 62; 63; 189; 190; 191; 192]. Фактором, резко отягощающим течение гриппозной инфекции, является бактериемия [57; 193; 194]. В основе патогенеза последней лежат такие факторы, как нарушение целостности слизистых оболочек под воздействием вирусных и бактериальных ферментов; увеличение адгезии бактерий на поврежденные клетки альвеол с дальнейшим проникновением в интерстиций; индукция интерферонов и

цитокинов и нарушение антибактериальной активности нейтрофилов и макрофагов за счет снижения их количества и падения фагоцитарной активности при воспалении [195; 196].

При вирусных инфекциях происходит модуляция апоптоза, что нарушает выполнение нормальной программы, необходимой для ограничения процесса воспаления [197;198]. При гриппе нарушение процесса апоптоза обусловлено действием NS1-белка вируса, который, прикрепляясь к субъединице p85 α и - β фосфатидилинозитол-3 киназе, запускает соответствующую сигнальную систему, что ведет к подавлению Вах-зависимой активации каспазы-9 [199; 200], индуцирующей продукцию провоспалительных цитокинов [2; 201; 202]. Последние способствуют дальнейшему усилению воспалительных процессов через экспрессию генов, кодирующих ингибиторы апоптоза-1, -2, что, в итоге, приводит к развитию системной воспалительной реакции [203; 204; 205; 206] и массивному нерегулируемому апоптозу лимфоцитов [207; 208]. При этом немаловажную роль играет белок вируса гриппа PB1-F2. Так, при попадании данного белка в митохондрии, происходит увеличение проницаемости их мембран за счет: связывания вирусного белка с одновременно с белками адениннуклетидной транслоказы 3 и потенциал-зависимый анион-селективный канал-1 формированием порового комплекса; связывания вирусного белка с данными белками митохондрий отдельно, что нарушает проницаемость внутренней и внешней мембраны; непосредственного формирования пор вирусным белком [209; 210; 211]. Как следствие таких противоположных процессов наблюдается индукция апоптоза в клетках, ответственных за гуморальный и клеточный иммунитет, с одной стороны, и подавление проапоптотических процессов в клетках, где осуществляется репликация вирионов, с другой стороны.

Таким образом, патогенетические особенности вирус-индуцированной формы ОПЛ/ОРДС не позволяют провести безусловное интерполирование результатов, полученных при моделировании данной патологии другого генеза, на модель вирус-индуцированного поражения. Как следствие, моделирование

ОПЛ/ОРДС, вызванного вирусом гриппа, является необходимым инструментом для разработки способов и средств коррекции настоящего осложнения гриппозной инфекции.

1.4 Способы моделирования ОПЛ/ОРДС в эксперименте

Существующие экспериментальные модели создания ОПЛ/ОРДС основаны на различных способах прямого и непрямого повреждения легких. В первом случае используют повреждающие агенты: липополисахарид, тромбин, ацидин-пепсин, агрессивные химические вещества. Во втором - острую массивную кровопотерю, сочетанную травму и т.п. [53; 212].

Одним из распространённых способов моделирования ОПЛ/ОРДС по прямому пути является эндотрахеальное введение ЛПС или непосредственно бактерий [213; 214; 215], соляной кислоты [216; 217], раствора ацидин-пепсина, состоящего из пепсина и соляной кислоты [218]; олеиновой кислоты [219; 220] или ацетона [221]. Также к этим способам относится применение искусственной вентиляции легких [222; 223] и введение тромбопластина (активатора свёртывания крови) в яремную вену [75].

Для моделирования ОПЛ непрямого механизма, помимо травм и массивной кровопотери, часто используют сепсис-индуцированную модель, которая базируется на внутрибрюшинном введении ЛПС [224; 225]. Известны работы, в которых моделирование ОПЛ осуществляется одновременно несколькими факторами (искусственная вентиляция легких и аспирация *E.coli/S.aureus*) [226].

Наряду с вышеперечисленными экспериментальными моделями в литературе представлены исследования, посвященные моделированию вирус-индуцированного ОПЛ/ОРДС. Так, в работе Traylor Z.P. охарактеризована модель данной патологии, обусловленная воздействием вируса гриппа А штамма A/WSN/33 (H1N1). Животных подвергали лёгкой анестезии и инфицировали интраназально вирусом гриппа в дозе 10.000 PFU (бляшко-образующих единиц), растворённых в 50 мкл фосфатносолевого буфера в 0,1% альбумине бычьей сыворотки. Анализ динамики изменения газового состава крови выявил снижение

уровня отношения парциального давления кислорода в артериальной крови к фракции вдыхаемого воздуха (с 625 ± 50 мм. рт. ст. в фоне до 175 ± 100 мм. рт. ст. на 6-е сутки); рост парциального давления углекислого газа (с 25 ± 0 до 75 ± 10 ко 2-ым суткам и 50 ± 15 мм.рт.ст. на 6-е сутки). Анализ динамики остальных показателей плазмы крови показал развитие ацидоза (падение рН с 7,4 до 6,9 на 2-е сутки и 7,0 на 6-е сутки) и снижение уровня K^+ (с 18 ± 2 до 10 ± 2 ммоль/л на 4-е сутки и 15 ± 2 на 6-е сутки). Наблюдалось развитие полицитемии в цельной крови (рост гематокрита с 44 ± 1 до $55 \pm 3\%$ на 6-е сутки). Гистологическое исследование показало увеличение количества клеточных инфильтратов, оголение базальной мембраны и наличие очагов некроза [227]. В работе Zhang Y и сотрудников был использован вирус гриппа штамма A/swine/Shandong/731/2009 (H1N1). Вирусодержащий материал вводили в дозе $10^{2,5}$ PFU интраназально в объёме 50 мкл фосфатно-солевого буфера. Показателями формирования патологии послужили: увеличение отёка лёгких (отношение массы свежезабранных лёгких к лёгким высушенным было увеличено с $4 \pm 0,1$ до 7 ± 1) и массовых коэффициентов данного органа – с $6 \pm 0,1$ до 19 ± 3 % у здоровых и инфицированных мышей, соответственно. Гистологическое исследование показало характерные для ОПЛ изменения, а именно, наличие отёчных альвеол, кровоизлияний, гиалиновых мембран, слущенного эпителия и увеличение плотности клеточных инфильтратов. Наблюдалось падение уровня лейкоцитов с $8,5 \pm 1,0$ до $2,2 \pm 1,0$ 10^9 /л и лимфоцитов с $4,9 \pm 1,0$ до $1,0 \pm 0,6$ 10^9 /л в цельной крови на 8-е сутки у здоровых и инфицированных мышей, соответственно.

Показатели цитокинового профиля. Адаптировано по Zhang Y et al [228].

Показатели цитокинового профиля	Экспериментальные группы	
	Плацебо	H1N1
TNF- α , пг/мл	20 \pm 10	225 \pm 125
IL-6, пг/мл	10 \pm 10	1700 \pm 300
Интерлейкин 10, пг/мл	30 \pm 10	700 \pm 200
Интерферон гамма, пг/мл	10 \pm 10	500 \pm 100
Моноцитарный хемоаттрактант-1, пг/мл	60 \pm 10	450 \pm 150

Было отмечено падение уровня парциального давления кислорода до 57,50 \pm 3,54 мм.рт.ст. у инфицированных животных при 90,50 \pm 3,54 мм.рт.ст., получивших плацебо. В свою очередь, наблюдался рост уровня парциального давления углекислого газа до 52,50 \pm 4,95 мм.рт.ст. у инфицированных животных при 28,50 \pm 2,83 мм.рт.ст. в контроле. Снижение величины сатурации гемоглобина крови кислородом у инфицированных животных доходило до 78,50 \pm 3,54 мм.рт.ст. против 91,50 \pm 0,71 мм.рт.ст. у здоровых мышей [228]. Аналогичные изменения были получены при инфицировании мышей штаммом вируса гриппа A/Chicken/Hebei/108/2002 (H5N1) [229] и штаммом A/Hong Kong/2108/2003 [H9N2 (HK)] [230]. В первом случае штамм вводили интраназально 1 \times 10² MID₅₀ (средних инфекционных доз) в 50 мкл физиологического раствора; во втором – в дозе 1 \times 10⁴ MID, растворённых в 10 мкл физиологического раствора. В обоих случаях гистологическое исследование показало увеличение количества клеточных инфильтратов, отёчных альвеол, кровоизлияний. Наблюдали диффузную пневмонию и альтерацию альвеолоцитов. Анализ газового состава крови показал снижение уровня парциального давления кислорода до 6,83 \pm 1,46 кПа и 46,00 \pm 4,17 мм.рт.ст. и увеличение уровня парциального давления углекислого газа до 7,31 \pm 0,46 кПа и 65,34 \pm 2,55 мм.рт.ст. у мышей, инфицированных дозами 1 \times 10² MID₅₀ и 1 \times 10⁴ MID₅₀, соответственно.

Известно о моделях ОПЛ, индуцированного вирусом гриппа штамма A/Aichi/2/68 (H3N2). Подопытным животным вводили интраназально вирусосодержащий материала в дозе 2×10^5 PFU. Гистологическое исследование показало альтерацию альвеолоцитов, наличие кровоизлияний и отёчных артериол, а также рост количества клеточных инфильтратов. Отмечено увеличение количества общего белка в бронхоальвеолярным лаважем (3000 ± 1000 и 500 ± 400 мкг/мл у инфицированных и здоровых мышей, соответственно) [231]. В работе Serkedjiewa J. моделирование ОПЛ осуществляли аналогичным штаммом вируса гриппа, но в дозе равной 10 LD_{50} , после предварительного адаптирования вируса гриппа на мышах в дозе 10^7 ЦПД₅₀/мл. Было изучено состояние системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в супернатанте гомогената лёгких. Выявлено увеличение продукции пероксида водорода в альвеолярных макрофагах инфицированных мышей в 3 раза по сравнению с контрольными мышами, рост концентрации малондиальдегида в 2 раза и снижение активности общей антиоксидантной защиты в 2 раза по отношению к контрольным животным [232].

В другой модели применяли адаптированный для мышей (18 пассажей) гонконгский вирус гриппа А (H3N2) в дозе 60 PFU в объёме 50 мкл. На 7-ые сутки после инфицирования в бронхоальвеолярном лаваже имело место увеличение концентрации общего белка со 100 ± 20 в фоне до 2500 ± 400 мг/л; активности лактатдегидрогеназы с 30 ± 20 до 160 ± 40 Ед/л; рост общего количества клеток с 100 ± 13 в фоне до $772 \pm 224 \times 10^3$ клеток/мл; повышение показателя отношения массы свежезабранного лёгкого к высушенному с $3,5 \pm 0,2$ Ед в фоне до $6,5 \pm 0,4$ Ед [233].

Таким образом, в изложенных выше вирус-индуцированных моделях ОПЛ, были получены данные, характеризующие различные симптомы и звенья патогенеза, аналогичные таковым у человека.

1.5 Лечение ОПЛ/ОРДС и поиск новых средств патогенетической терапии.

На настоящий момент стандарт лечения нозологии J80, как наиболее приближённой к ОПЛ/ОРДС патологии, отсутствует [234]. Существуют общие клинические рекомендации проведения лечения пациентов с ОРДС и клинические рекомендации для лечения пациентов с гриппозной инфекцией, осложненной данной патологией [9; 50; 235], направленные на ликвидацию этиологического фактора, коррекцию газообмена и ограничение остальных патофизиологических изменений. При гриппозной инфекции средствами этиотропной терапии являются противовирусные препараты различного механизма действия и препараты интерферона, а присоединение бактериальной инфекции требует дополнительного применения антибиотиков. К средствам патогенетической терапии относят, в первую очередь, препараты противовоспалительного действия и корректоры эндотоксикоза [50; 236; 237; 238].

Поиск новых перспективных препаратов направлен, в основном, на изучение возможности ограничения воспалительного процесса и проходит в таких фармакологических группах как иммуномодуляторы и селективные НПВС (IFN α/β , Целекоксиб, Месалазин, Эриторан), протекторы митохондриальных мембран (циклоспорин А) и целостности лизосом (Сивеластат, Улинастатин) и других [239].

Так, была показана эффективность целекоксиба – ингибитор циклооксигеназы-2 и месалазина – ингибитор простагландинов у мышей линии BALB/c, зараженных вирусом гриппа A/Vietnam/1194/04 (H5N1), в отношении уровня выживаемости и степени цитокинемии [240]. Было показано, что выживаемость животных составила 50 % при комбинированной терапии (занамивир, целекоксиб и месалазин) и 10% при монотерапии занамивиром. При этом уровень TNF- α составил 150 ± 10 и 190 ± 20 пг/мл, IL-6 – 1500 ± 200 и 2000 ± 100 пг/мл, макрофагального воспалительного белка -1 – 100 ± 10 и 170 ± 20 пг/мл, и

лейкотриенов – 300 ± 50 и 400 ± 40 пг/мл, соответственно. Вирусная нагрузка находилась на сопоставимых уровнях – 75 ± 10 и 70 ± 10 вирусных РНК/100β-актина в пересчёте на актин у мышей, получавших занамивир и комбинированную терапию.

В эксперименте на мышах линии C57Bl/6, зараженных вирусом гриппа А подтипа H5N1 [241], была изучена эффективность антибиотика гелданамицина, впервые описанного как ингибитор тирозинкиназы [242] и впоследствии - как ингибитор активности белка теплового шока 90 [243]. Применение гелданамицина обусловило 95 % выживаемость животных в отличие от инфицированных животных, получавших плацебо, где уровень выживаемости составил 0 %, что коррелировало со снижением повышенного уровня провоспалительных цитокинов в БАЛ у животных из контрольной группы. На 7-е сутки после заражения уровень TNF-α составил - 190 ± 20 и 60 ± 5 пг/г; IL-6 – 55 ± 5 пг/г и 40 ± 5 пг/г у животных из контрольной группы и получавших препарат, соответственно. В основе эффективности гелданамицина лежит как его противовирусная активность, связанная с ингибированием транспорта и снижением времени полураспада вирусных белков PB1 и PA из ядра [244], так и наличие противовоспалительного действия. Последнее обусловлено ингибирующим влиянием гелданамицина на функциональную активность белка теплового шока Hsp 90 за счет предотвращения активации NF-κB, вызываемой провоспалительными цитокинами [245; 246; 247; 248].

В экспериментах на мышах линии BALB/c была изучена эффективность моноклонального антитела VIS410 в дозах, равных 2, 10 и 50 мг/кг в/б, в условиях ОРДС, вызванного вирусом гриппа А подтипа H7N9. Уровень выживаемости для животных, получавших VIS410, и не получавших терапию, соответственно, составил 100% и 0%; выраженность отёка лёгких – $11,0\pm 1,0$; $7,0\pm 0,5$ и $5,0\pm 1,0$ балла. Гистологическая картина лёгких показала отсутствие альвеолярного отёка и изменения толщины альвеолярной перегородки у мышей, получавших VIS410, в отличие от контрольных животных. В основе терапевтического эффекта

моноклонального антитела VIS410 лежит связывание с консервативным эпитопом гемагглютинина, что ведет к изменению конформации вирусного белка и, тем самым, ингибированию высвобождения вируса [249; 250].

Известно, что стимуляция рецепторов ангиотензина II 1-го подтипа вызывает рост экспрессии генов, кодирующих IL-1 β , IL-6 и моноцитарный хемоаттрактант-1 [251; 252] и, тем самым, развитие провоспалительного ответа. В качестве возможного блокатора данного процесса был использован лозартан – селективный антагонист ангиотензина II 1-го подтипа. Так, у мышей линии C57Bl/6, зараженных вирусом гриппа А подтипа H7N9, лозартан (в/б, 15 мг/кг, за 30 минут до инфицирования) вызвал редукцию толщины альвеолярной стенки на 25% – с $7,7 \pm 0,1$ до $7,2 \pm 0,1$ баллов; уменьшение количества инфильтратов в лёгких – с 60 ± 2 до 38 ± 2 клеток и снижение вирусной нагрузки – с $2,9 \pm 0,1$ до $2,3 \pm 0,1 \log_{10}$ TCID₅₀/г [253]. Схожая коррекция течения ОПЛ в результате применения лозартана наблюдалась и при индукции данной патологии соляной кислотой в эксперименте на мышах [254].

В исследовании, проведенном на мышах линии C57Bl/6, была оценена возможность коррекции ОРДС, вызванного вирусом гриппа А подтипа H1N1, ингибитором ДНК-метилтрансферазы децитабином (5-аза-2'-дезоксцитидин). Моделирование ОРДС осуществляли путём инокуляции вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1) в дозе 600 ЭИД₅₀. Децитабин вводили в дозе 1 мг/кг, начиная с 3-их суток после инфицирования. По окончании исследования у животных, получавших препарат, наблюдали трехкратное снижение общего количества клеток – с $9,0 \pm 1,0$ до $3,0 \pm 0,2 \cdot 10^5$ клеток/мл, рост количества регуляторных Т-лимфоцитов в бронхоальвеолярном лаваже (CD₄+CD₂₅) – с $0,5 \pm 0,1$ до $0,61 \pm 0,5$ % от общего количества клеток, шестикратное снижение нейтрофилов – с $5,8 \pm 0,5$ до $1,5 \pm 0,1 \cdot 10^5$ клеток/мл и уменьшение количества отёчных альвеол, клеточных инфильтратов и толщины альвеолярной стенки в сравнении с контрольными животными. Данный эффект обусловлен способностью децитабина влиять на

количество и активность регуляторных Т-клеток путём увеличения экспрессии белка Foxp3, участвующего в дифференциации данных лимфоцитов [255].

В эксперименте на мышах линии C57Bl/6 была изучена возможность коррекции блеомицин-индуцированного повреждения лёгких путём применения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в виде клеточной суспензии. Создание модели ОПЛ осуществляли путём однократного введения блеомицина в дозе 4 Ед/кг э/т. Стволовые клетки вводили в/в спустя 6 часов после введения блеомицина. Плотность повреждений составила 25 ± 4 и 15 ± 3 балла; уровня IL-1 β в сыворотке крови - 250 ± 10 пг/мл и 75 ± 25 пг/мл у животных, не получавших лечения, и получавших стволовые клетки, соответственно. Наряду с этим, у мышей, получавших стволовые клетки, был отмечен 7-8-ми кратный рост уровня Г-КСФ (800 ± 100 пг/мл) и ГМ-КСФ (3100 ± 100 пг/мл). Известно, что стволовые клетки способны мигрировать в область повреждения и дифференцироваться до локальных органоспецифичных клеток, восстанавливая структурную целостность и функции повреждённой ткани [256].

Таким образом, поиск эффективных подходов к лечению ОПЛ/ОРДС ведется с использованием соединений, воздействующих на различные звенья патогенеза данного заболевания. В то же время имеющаяся информация о роли КПП в развитии воспаления предполагает возможность использования блокаторов их накопления в экспериментальной терапии ОПЛ/ОРДС, в том числе, вирусного генеза [257; 258]. Однако в доступной литературе присутствуют лишь малочисленные сведения об использовании соединений подобного рода в экспериментальной терапии ОПЛ/ОРДС, вызванных, например, действием ЛПС или радиационном поражением [259; 260] и отсутствуют сведения о применении блокаторов КПП в условиях вирус-индуцированных ОПЛ/ОРДС.

Среди блокаторов КПП различного происхождения можно выделить следующие: экстракт цианобактерий рода Лингбия (*Lyngbya sp.*), α -липоевая кислота, аторвастатин, экседрин-4, аминогуанидин, пентоксифиллин, алагебриум и его производные, экстракт *Aegle marmelos*, пиоглитазон, метформин и другие.

В экспериментах *in vivo* на нематодах *C. elegans* была изучена способность спиртового экстракта цианобактерий рода Лингбия (*Lyngbya sp.*) подавлять процесс гликирования при избыточной концентрации глюкозы. Было показано снижение концентрации КПП в 3 раза и пятикратное – глюкозы в сравнении с контролем. В отдельном эксперименте анализ экспрессии генов после культивирования нематод с синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*) показал снижение активности гена *def-16*, связанного с вовлечением врождённого иммунитета в воспалительный ответ [261; 262]. Терапевтический эффект спиртового экстракта может быть обусловлен цитотоксическим эффектом пахайоколида А, содержащегося в цианобактериях рода Лингбия [263].

В экспериментах на эндотелиальных клетках аорты быка была показана роль α -липоевой кислоты в поддержании концентрации глутатиона, аскорбиновой кислоты и активности транскрипционного фактора NF- κ B при воздействии КПП [264]. На эндотелиальных клетках вены пуповины человека была продемонстрирована способность аторвастатина предотвращать патологические изменения, индуцированные действием высокой концентрации глюкозы и КПП. А именно, под воздействием препарата снижалось количество погибших клеток, наблюдалось восстановление содержания глутатиона и уменьшение концентрации малондиальдегида, а также экспрессии генов, кодирующих рКПП [265]. Аналогичные данные были получены в экспериментах на культуре клеток костного мозга человека с использованием агониста рецептора глюкагоноподобного пептида экседрина-4 [266].

Изучение эффективности аминоксидина в плане подавления образования КПП было проведено на кардиомиоцитах H9c2 после воздействия высокой концентрации глюкозы [267] у крыс в процессе естественного старения [268] и в условиях стрептозотозин-индуцированного СД [269]. Так аминоксидин обуславливал двукратное снижение уровня КПП в кардиомиоцитах; в тканях сердца ($12,0 \pm 5$ и $9,5 \pm 4$ AU), аорты (40 ± 1 и 18 ± 1 AU) и почек (124 ± 26 и 93 ± 18 AU); в капиллярах сетчатки глаза (220 ± 13 AU вместо 440 ± 20 AU). В основе

терапевтического эффекта аминогуанидина лежит его способность связываться с реактивными карбонильными соединениями, предотвращая формирование КПП [270]. Аналогично аминогуанидину реализуется и способность блокатора аденозиновых рецепторов пентоксифиллина подавлять чрезмерное образование КПП, что обусловлено наличием в его молекуле схожих с аминогуанидином реактивных групп [271; 272].

Известно о таких блокаторах накопления КПП, как алагебриум и соединения ALT-462 и ALT-486. В основе механизма их действия лежит или способность улавливать α -дикарбонилы или разрушать углеродную связь, что приводит к снижению продукции рКПП и ингибированию сшивания коллагена молекулами КПП. Так, в условиях стрептозотоцин-индуцированного СД было показано двукратное снижение количества нерастворимого коллагена в активированном пепсине у животных, получавших ALT-462 и -486 [273]. Аналогичные данные были получены и при применении соединения алагебриума [274]. При воздействии КПП в изолированном коллагене сухожилия хвоста крыс происходило ингибирование образования сшивок (от 30 до 80%, для концентраций 0,1 и 30 ммоль/л, соответственно), а в условиях экспериментального СД – снижение количества сшивок между иммуноглобулином G и эритроцитами (от $0,1 \pm 0,1$ до $0,02 \pm 0,02$ вместо $0,28 \pm 0,05$ оптическая плотность при λ 410 у крыс, получавших алагебриум 946 в дозах 0,01 мг/кг, 10 мг/кг, и не получавших терапию, соответственно) [275].

В эксперименте на крысах была изучена антигликирующая активность спиртового экстракта айвы бенгальской, содержащего квертицин, способный улавливать МГ и глиоксаль [276]. В условиях стрептозотоцин-индуцированного СД было выявлено снижение концентрации циркулирующего гликированного гемоглобина ($8,20 \pm 0,18$ вместо $11,92 \pm 0,59$ %) и КПП ($0,66 \pm 0,05$ вместо $1,18 \pm 0,19$ мг/мл) у крыс, получавших растительный экстракт, по сравнению с контрольными особями [277]. Интересно, что и в действии классических гипогликемических препаратов немаловажную роль играет их способность подавлять процесс

гликирования. Так, метформин предотвращал гликирование гемоглобина и альбумина [278; 279], что коррелировало со снижением концентрации КППГ до 30 % и N(6)-карбоксиметиллизина до 40 % в гемоглобин-глюкозолактонном тесте и в тесте с глюкозой и сывороточным альбумином быка. Пиоглитазон вызвал двукратное снижение количества карбоксилированного белка и β -амилоида и повышение концентрации немодифицированного альбумина с 33,2 % до 57,5 % в гликированном сывороточном альбумине быка. В клетках почек эмбриона человека (НЕК-293), инкубированных с гликированным альбумином, пиоглитазон способствовал восстановлению общей антиоксидантной активности и нормализации процесса перекисного окисления липидов, что сопровождалось снижением уровня NF- κ B (до 8 раз), IL-6 и TNF- α (до 2 раз) [280]. Вышеизложенное дает возможность предполагать, что в терапевтическом действии препаратов, предназначенных для лечения СД, не последнюю роль играет и их влияние на процесс образования КППГ.

Таким образом, существует достаточное количество веществ, обладающих или способностью блокировать образование КППГ, или ограничивать патологические процессы, связанные с их влиянием. В то же время, в литературе, посвященной экспериментальному поиску новых подходов к ограничению ССРВ при ОПЛ/ОРДС вирусного генеза, отсутствуют сведения о применении блокаторов рКППГ, хотя направленная их модуляция способствует снижению выраженности патологического процесса другого этиогенеза. Последнее определяет необходимость и актуальность изучения влияния модуляторов рКППГ на течение тяжелой гриппозной инфекции, осложненной ОПЛ, что может лежать в основе разработки новых патогенетических подходов к лечению данной патологии.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Экспериментальные животные

Эксперименты были проведены на 690 беспородных мышах самках, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАН (пос. Рапполово, Ленинградская область). Животные содержались в отдельном помещении вивария ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России по 10 в клетке (клетки 2L, площадь пола 530 см²). Контроль параметров окружающей среды осуществлялся ежедневно на всём протяжении исследования и включал в себя измерение температуры и влажности. Фотопериод составлял: 12 часов ночь – 12 часов день при искусственном освещении лампами дневного света.

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), положением и руководством «Лабораторные животные» (РАМН, Москва, 2003) и санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г [281; 282; 283; 284].

Проведение работы было одобрено на заседании этического комитета ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ с последующим оформлением протокола № 100 заседания этического комитета при ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ от 15.12.2015

2.1.2 Штаммы вируса гриппа

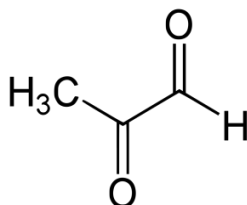
В эксперименте были использованы штаммы вируса гриппа А: A/California/07/2009MA (mouse-adapted) (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (mouse-adapted) (H3N2), полученные из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии

вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

2.1.3 Модуляторы рКПГ

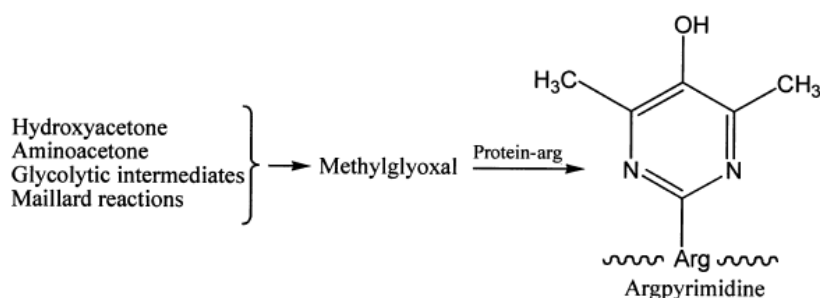
2.1.3.1 Предшественник накопления КПГ

В качестве основного предшественника КПГ был выбран метилглиоксаль (МГ, 2-оксопропаналь), Sigma-Aldrich, США, M0252-100ML.



Являясь предшественником КПГ, МГ образует прочные ковалентные связи со свободными аминогруппами белков, гликопротеинов и других соединений. Схема реакции представлена на рисунке [285].

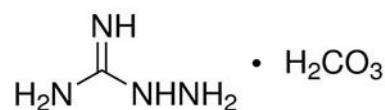
Метилглиоксаль применяли подкожно в дозе 50 мг/кг в течение 10 дней до инфицирования. Применение данного предшественника КПГ в экспериментах на крысах в схожем режиме дозирования показало значимое накопление КПГ в почках и проявлению их негативного действия [286]. В другом эксперименте применение метилглиоксаля в дозах 50- 65 мг/кг в/б в течение 7 недель способствовало накоплению КПГ в сосудах, коже и периферических нервных волокнах[287].



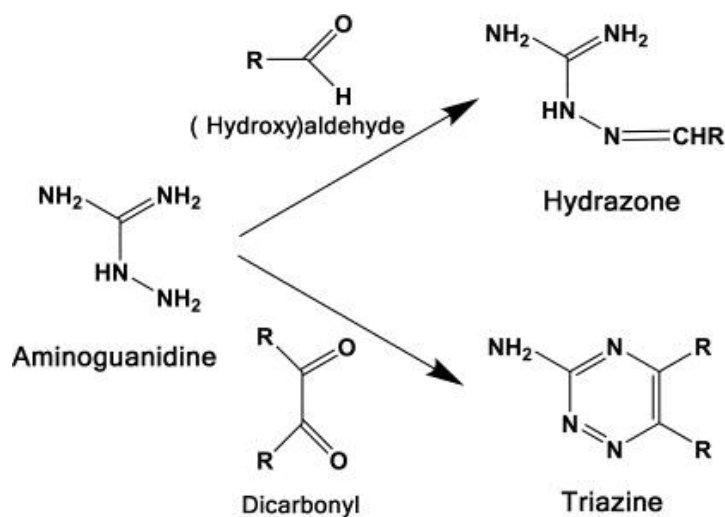
Формирование КПГ при взаимодействии метилглиоксаля с аминогруппой белков. Цитируется по Талукард Д. и соавт. [285].

2.1.3.2 Блокатор накопления КПП

Аминогуанидина бикарбонат (AcrosOrganic, США, 149060010).



Является одним из блокаторов образования КПП. Стабилизирует промежуточные продукты реакции перегруппировки Амадори, предотвращая дальнейшее их взаимодействие с аминогруппами белков, липо- и гликопротеинов. Механизм взаимодействия аминогуанидина с агрессивными карбонильными продуктами представлен на рисунке [288].



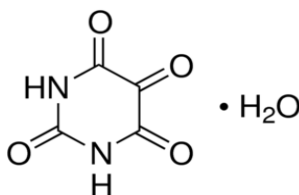
Механизм связывания предшественников образования КПП аминогуанидином. Цитируется по Nagai R. et al. [288].

Аминогуанидин вводили в/б в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней после инфицирования. Ранее в экспериментах на крысах была показана способность аминогуанидина, примененного по той же схеме, предотвращать гликирование белков при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете. [289].

Рабочие растворы испытуемых веществ готовили в фосфатно-солевом буфере.

2.1.4 Индуктор преморбидной патологии (СД)

β -цитотоксин – аллоксана моногидрат (AcrosOrganic, США, 215370100).



Выбор модели СД был основан на данных о накоплении КППГ при введении аллоксана моногидрата в экспериментах на крысах [38; 39].

2.2 Методы

2.2.1 Подготовка вирусосодержащего материала к предварительному титрованию

Архивный вирусосодержащий материал размораживали и растворяли в культуральной среде (α -МЕМ, Биолот, Россия) с предварительно добавленным антибиотиком (Ципрофлоксацин, 2 мг/мл, Синтез ОАО, Россия, серия 580316). Соотношение вирусосодержащего материала и культуральной среды с антибиотиком составляло 1/10. Проводили поверхностную стерилизацию заранее подготовленных куриных эмбрионов путём обжига. Далее проделывали отверстие в воздушной камере яйца и вводили 0,2 мл растворённого образца вируса гриппа в аллантоисную жидкость с помощью шприца. После проведённой процедуры яйцо запаивали с помощью парафина. Спустя 48 часов после инкубации при 36°C в термостате яйца переносили в холодильник (+8°C) на 2 часа. После поверхностной стерилизации путём обжига проводили вскрытие эмбрионов со стороны воздушного мешка с последующим забором аллантоисной жидкости. Забранную аллантоисную жидкость центрифугировали 5 минут при 3000 оборотах в минуту и отбирали супернатант. Часть супернатаната (0,5 мл) проверяли на наличие гемагглютинирующей способности [290]. При получении удовлетворительных результатов 1 мл оставляли для дальнейшего определения LD₅₀ биоматериала; остальную часть сохраняли при температуре -80°C.

2.2.2 Оценка гемагглютинирующей способности испытуемого материала

Испытуемый материал с вирусом гриппа размораживали. В полистироловый планшет на 96-лунок с U-образным дном разливали физиологический раствор в объёме 200 мкл со второй лунки по 12-ю. Затем в первую лунку вносили 400 мкл вирусосодержащей аллантаической жидкости. С помощью мультиканальной микропипетки проводили титрование вируса гриппа путём перемещения 200 мкл жидкости из предыдущей лунки в последующую, начиная с первой лунки. Оставшиеся 200 мкл жидкости от последней лунки отбрасывали. Затем в каждую лунку вносили 200 мкл 1% взвеси эритроцитов. Спустя 40 минут, что соответствует полному оседанию эритроцитов при нормальных условиях, проводили оценку гемагглютинационной способности. За фиксируемый в результатах титр вируса принимали разведение материала, приводящее к следующим изменениям: образование тонкой плёнки склеившихся эритроцитов, покрывающей дно пробирки (зонтик); наличие тонкой плёнки с просветами, наличие плёнки с фестончатыми кружевными краями из склеившихся эритроцитов. Наличие хлопьевидных осадков эритроцитов, окружённых зоной агглютинированных эритроцитов, или наличие резко очерченного осадка эритроцитов на дне лунки не фиксировали [291].

2.2.3 Определение LD₅₀ вируса гриппа

Вирусосодержащий материал размораживали и разводили в физиологическом растворе до соотношений 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} . Беспородных мышей самок массой 18-20 г распределяли на 4 группы по 5 особей в каждую группу, присваивая названия группы в соответствии с разведением вирусного аллантаиса в физиологическом растворе. Животным под эфирным наркозом интраназально вводили 50 мкл инокулята в соответствующей концентрации. В течение двух недель регистрировали летальность у подопытных животных с подтверждением геморрагических или фиброзных проявлений в лёгких. Выживших животных подвергали эвтаназии путём помещения в CO₂-камеру с последующим вскрытием и морфологическим описанием лёгких.

Далее проводили определение дозы вируса гриппа, вызывающей 50% летальный эффект, методом Рида-Менча по следующей формуле 1 [292].

$$LgLD_{50}=L_{50} = L\alpha + (Lb - L\alpha) \frac{50-\alpha}{b-\alpha}, \quad [1]$$

где α — процент погибших мышей, полученный при титровании, ближайший к 50% снизу, b — процент погибших мышей, полученный при титровании, ближайший к 50% сверху, $L\alpha$ и Lb — соответствующие дозы. $LgLD_{50}$ — десятичный логарифм от дозы, вызывающей 50% летальный эффект.

2.2.4 Путь заражения животных

Заражение животных вирусами гриппа A/California/7/09MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2) осуществляли путём интраназальной инокуляции вирусосодержащего материала в дозе 1 ЛД₅₀ [227; 293]. Лёгкие подопытных животных забирали и замораживали для дальнейшего исследования в целях подтверждения вирусологической природы развития ОПЛ.

2.2.5 Исследование вирусной нагрузки в легких

Перед исследованием лёгкие размораживали и гомогенизировали с помощью прибора TissueLyserII (QIAGEN, Германия). Затем из полученного материала готовили серию десятикратных разведений (от 10^{-1} до 10^{-7}) на основе среды α -MEM и помещали в микропланшет с клетками MDCK. Далее микропланшет с исследуемым материалом помещали в CO₂-инкубатор на 48 часов (37°C, 5% CO₂). По истечении срока оценивали цитопатогенное действие на клеточный монослой визуально с помощью светового микроскопа и гемагглютинирующую способность супернатанта клеточной среды согласно п. 2.2.2.

2.2.6 Оценка интегральных показателей жизнедеятельности зараженных животных.

Оценку проводили по следующим показателям: летальность, масса и температура тела, внешний вид, двигательная активность, мышечный тонус, характер дыхания. Взвешивание проводили на весах ВК-1500 (Масса-К, Россия). Термометрию осуществляли с помощью термометра-м1т-211-3 (Белый, Россия). Перед измерением ректальной температуры наконечник смазывали вазелином.

2.2.7 Оценка уровня сатурации гемоглобина крови кислородом по методу Джонкинса.

Данный метод позволяет определять спектрометрически уровень сатурации гемоглобина крови кислородом [294]. Забор крови для анализа проводили из буккального синуса. Определение проводили в течение первого часа после забора крови. Полученную цельную кровь встряхивали и 20 мкл тестируемого материала помещали в 2 мл буфера (боратный буфер рН=6.68 0.01 М, 0.1% тритон – х 100), перемешивали и через одну минуту определяли абсорбцию на 640 нм в пяти повторах. Полученные значения являлись $A1$ для текущего образца. Затем к данному раствору добавляли 2 мг сухого дитионита натрия, перемешивали и спустя минуту измеряли абсорбцию в 5 повторах. Полученные значения являлись $A2$ для текущего образца. Затем гемолизат сливали, промывали кювету водой очищенной и повторяли процедуру со следующим образцом. Далее проводили расчёт сатурации гемоглобина крови кислородом по формуле 2:

$$SvO2 = \frac{(\overline{A2} - \overline{A1}) * 100}{\overline{A2} - \left(\frac{\overline{A2}}{6.1}\right)} \quad [2]$$

Где $\overline{A1}$ - среднее арифметическое из значений $A1$, а $\overline{A2}$ - среднее арифметическое из значений $A2$, $SvO2$ – уровень сатурации крови кислородом образца.

2.2.8 Иммуноферментный анализ содержания провоспалительных цитокинов в лёгких

Уровень провоспалительных цитокинов оценивали в супернатанте гомогената лёгких. Легкие гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (в 1 мл фосфатного буфера с рН=7,4) с последующим центрифугированием при 15000 оборотах в минуту в центрифуге CM-50M (ELMI, Латвия). Содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α определяли методом ИФА с применением наборов фирмы Biolegend (США). Оценку результатов проводили на спектрофотометре для микропланшет EPOCH2TC (США) при длине волны 570 нм.

2.2.9 Оценка морфологического состава крови

Приготовление мазков для последующей микроскопии осуществляли по методике Кассирского И.О. [295] На предметное стекло (БиоВитрум, Россия), ближе к короткой стороне, наносили 8 мкл цельной крови с помощью микропипетки (Лабораторное оборудование и приборы, Россия). Цельную кровь распределяли по предметному стеклу с помощью сухого чистого шлифовального стекла одним движением, держа его под углом 45°. Полученный мазок просушивали. Качество полученного мазка проверяли по наличию характерной однородной метёлки. Приготовленные из цельной крови мазки помещали в фиксатор Май-Грюнвальда (НПФ АБРИС+, Россия) (3 минуты) и окрашивали по Романовскому-Гимзе (НПФ АБРИС+, Россия) (30 минут). Описывали лейкоциты и проводили их подсчёт.

Для исследования на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior Vet (Австрия) цельную кровь предварительно разводили физиологическим раствором 1:5, перемешивали с помощью Мульти-вортекса V-32 (BioSan, Латвия) и разведённый образец помещали в гематологический анализатор. Оценивали следующие параметры: общий уровень лейкоцитов, относительный уровень содержания лимфоцитов, базофилов, моноцитов, эозинофилов, гранулоцитов, общий уровень эритроцитов, тромбоцитов и показатель содержания гемоглобина. Лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ЛГИ) рассчитывали по формуле 3:

$$\text{ЛГИ} = \frac{\% \text{ЛИМ}}{\% \text{ГРА}} \quad [3]$$

Где % ЛИМ – относительное содержание лимфоцитов, % ГРА – относительное содержание гранулоцитов.

2.2.10 Патоморфологическое и гистологическое исследование легких

Патоморфологическое исследование проводили по методике Манских В.Н. [296]. При вскрытии оценивали наличие очагов кровоизлияния в легких с оценкой степени поражения: 0% – отсутствие очагов кровоизлияния; 5% – единичные точечные кровоизлияния, 10% – очаг кровоизлияния в периферийной части одного лёгкого, 20% – очаги кровоизлияния в периферийной части обоих лёгких, 25% – очаг кровоизлияния, захватывающий четверть лёгких, 50% – кровоизлияние на протяжении одного лёгкого или половины долей обоих лёгких, 100% – очаги кровоизлияния, захватывающие все доли обоих легких.

Легкие для гистологического исследования помещали в 10% формалин в фосфатно-солевом буфере (рН=7,4). Спустя неделю лёгкие переносили в гистологические кассеты и промывали проточной водой в течение 30 минут. Далее лёгкие проводили через батарею спиртов (1 час в 70% спирте и затем 4 раза по часу в 100% спирте), добиваясь обезвоживания биоматериала. Затем гистологические кассеты погружали в парафин на ночь и затем на 6 часов в новый парафин. После суток легкие извлекали из гистологических кассет и при помощи диспенсера парафина с нагревательной платформой со специальными металлическими подложками формировали гистологические блоки. Затем оставляли на 3 часа до полного остывания парафина и блоки отделяли от металлических форм [297]. Из сформированных блоков подготавливали срезы при помощи санного микротомы МС-1 (Орион Медик, Россия), ванночки «САЙДБАНЯ-30/60» с подогревом и подсветкой (водяная баня) (КБ Техном, Россия) и предметных стёкол (BioVitrum, Россия). Срезы окрашивали либо гематоксилин-эозином, либо по Пикро-Маллори.

Для гистологической окраски стекла с нанесёнными срезами материал выдерживали в следующих реактивах: ксилол – 5 мин, ксилол – 5 мин, изопропиловый спирт 100% – 2 мин, изопропиловый спирт 100% – 2 мин, изопропиловый спирт 90% – 1 мин, изопропиловый спирт 70% – 1 мин, изопропиловый спирт 50% – 1 мин, вода очищенная – 1 мин, гематоксилин – 10 мин, 1% карбонат натрия в воде – 1 мин, вода очищенная – 1 мин, эозин – 1 мин, вода очищенная – 1 мин, изопропиловый спирт 50% – 15 сек, изопропиловый спирт 70% – 15 сек, изопропиловый спирт 90% – 15 сек, изопропиловый спирт 100% – 1 мин, ксилол – 5 мин [298]. На окрашенный срез наносили каплю Витрогеля (BioVitrum, Россия, серия 1267). Сверху прикладывали покровное стекло, контролируя равномерность распределения Витрогеля при помощи препаровальной иглы. Приготовленные стёкла выдерживали в течение 24 часов при комнатной температуре и исследовали под световым микроскопом Leica DM1000 (Leica, Германия). При исследовании оценивали степень и локализацию очагов цитодеструкции, а также выраженность, локализацию и клеточный состав воспалительного инфильтрата [299].

Степень поражения легочной ткани оценивали согласно методике, предложенной American Thoracic Society [300] и заключающейся в подсчете баллов согласно таблице 1 в 20 полях при увеличении $\times 400$. Степень поражения оценивали по формуле:

$$\text{Степень поражения} = \frac{(20 * A) + (14 * B) + (7 * C) + (7 * D) + (2 * E)}{\text{кол. - во просмотренных полей} * 100} \quad [4]$$

при этом учитывали параметры (A, B, C, D, E), указанные в таблице 1.

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	<x2	x2–x4	>x4
Примечание: x – кратность утолщения			

Оценку воспалительного процесса проводили, опираясь на данные, полученные при гистологической полуколичественной оценке повреждения лёгких, без учёта наличия гиалиновых мембран и наличия белкового дебриса в воздушном пространстве. Расчёт вели по формуле 5:

$$\text{Степень поражения} = \frac{(20 * A) + (14 * B) + (2 * E)}{\text{кол – во просмотренных полей} * 100} \quad [5]$$

Параметры А, В, Е указаны в таблице выше.

2.2.11 Оценка уровня содержания КПП в легких

Содержание КПП в гомогенате легких определяли путём оценки уровня их флуоресценции в супернатанте гомогената лёгких. Метод основан на способности КПП флуоресцировать за счет сформированных π -связей как с аминок группой, так и внутри собственной структуры при определенных длинах волн [301; 302].

Легкие подопытных животных гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (в 1 мл фосфатного буфера с рН=7,4). Затем центрифугировали при 15000 оборотах в минуту в центрифуге СМ-50М (ELMI, Латвия). Полученный

супернатант помещали в кювету флуоресцентного модуля прибора CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия). Уровень флуоресценции оценивали при $\lambda_{ex}=370$ нм и $\lambda_{em}=440$ нм. Данные длины волн являются характерными для флуорисцирующих КПП, в том числе и в биологических материалах. Помимо этого показана корреляционная зависимость между уровнем КПП, оцененного методом иммуноферментного анализа, и величиной флуоресценции при вышеуказанных длинах волн [301].

Спектр флуоресценции при $\lambda_{ex}=370$ нм представлен на рисунке 1.

График корреляционной зависимости представлен на рисунке 2.

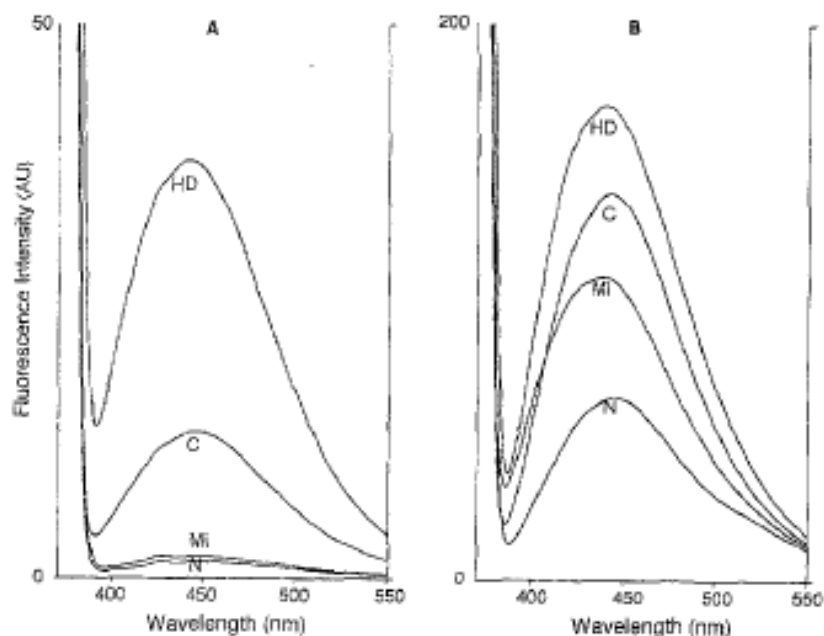


Fig 1. Fluorescence emission spectra of LMW peptide fractions after excitation at 370 nm. AGE-peptide in serum (A) and urine (B) from diabetics.

Спектр флуоресценции КПП при $\lambda_{ex}=370$ нм в биологических жидкостях. Цитируется по Yanagisawa K. et al. [301].

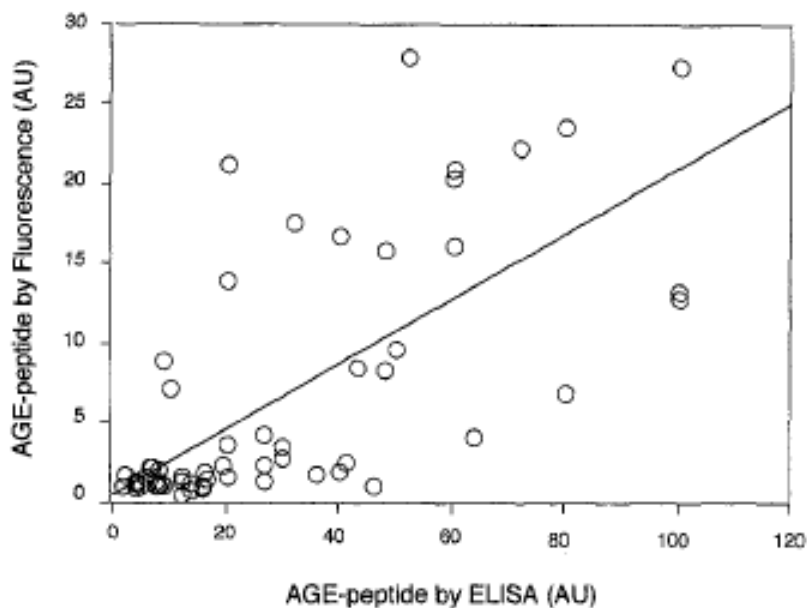


Fig 7. Correlation between AGE-ELISA and fluorescence intensity of AGE-peptide in serum and urine ($r = .688$, $P < .0001$).

График корреляционной зависимости между уровнем КПП, определённого иммуноферментным методом, и величиной флуоресценции. Цитируется по Yanagisawa K. et al. [301].

2.2.12 Моделирование аллоксан-индуцированного СД (АИСД)

Метод основан на применении β -цитотоксина – аллоксана моногидрата (AcrosOrganic, США, 215370100), вызывающего избирательный некроз β -островков Лангерганса [303, 304].

Подопытным мышам самкам массой 18-20 г вводили однократно подкожно (п/к) аллоксана моногидрат, растворённый в фосфатно-солевом буфере, в дозе 180 мг/кг в объёме 0,1 мл/10 г массы тела. Предварительно, за 4 часа до введения рабочего раствора, животных лишали корма. По истечению 10-ти дней проводили забор крови натошак из буккального синуса для определения уровня глюкозы в крови с помощью глюкометра и одноразовых тест-полосок (Accu-ChekActive, Германия) [305]. Критерием включения животных в эксперимент являлось увеличение уровня глюкозы в цельной крови с 4,5 – 6,4 до 15,5 – 16,5 ммоль/л, т.е., в 2,5 раза [306].

2.2.13 Методы статистического анализа

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 Мантела-Кокса. Корреляционный анализ проведен при помощи теста ранговой корреляции Спирмена [307; 308].

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Экспериментальное моделирование ОПЛ в условиях инфицирования штаммами вируса гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2)

Эксперименты выполнены на 135 аутбредных мышах самках.

В первой серии экспериментов было проведено определение LD₅₀ штаммов вируса гриппа по методике Рида-Менча на 40 беспородных мышах самках (n=20 в каждой группе). Расчетная величина 1 ЛД₅₀ составила 3,4 lg ЭИД₅₀ и 3,2 lg ЭИД₅₀ для штаммов A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA, соответственно.

Во второй серии экспериментов моделирование вирус-индуцированного ОПЛ было осуществлено на беспородных мышах самках (n=95). Животные были разделены на 3 группы: группа № 1 – интактные животные (контроль) (n=15); группа № 2 – мыши, инфицированные штаммом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 (n=40); группа № 3 – мыши, инфицированные штаммом гриппа A/Aichi/2/68MA (H3N2) (n=40). Вирусосодержащий материал вводили интраназально в дозе, равной расчетной 1 ЛД₅₀ для групп №№ 2 и 3, соответственно. Животные из групп №№ 2 и 3 были разделены на две равные подгруппы (n=20 в каждой подгруппе).

В первых подгруппах была изучена клиническая картина течения патологии и динамика летальности в течение 14-ти суток после введения вирусосодержащего материала. В течение первых 3-х суток после инфицирования поведение и состояние опытных животных не отличались от таковых у интактных особей. Начиная с 4-х суток, клиническая картина у животных из обеих опытных групп носила общую направленность и характеризовалась взъерошенностью шерстного покрова, угнетением двигательной активности, мышечной ригидностью, развитием диспноэ и тахипноэ, подключением вспомогательных мышц в процесс дыхания. Температура тела у опытных животных была повышена, в среднем, на

1°C (4-е сутки наблюдения) и снижена, в среднем, на 3°C (7-е сутки наблюдения) по отношению к фоновым данным. У выживших животных (14-е сутки наблюдения) температура тела не отличалась от фоновых показателей в группе (рисунок 1).

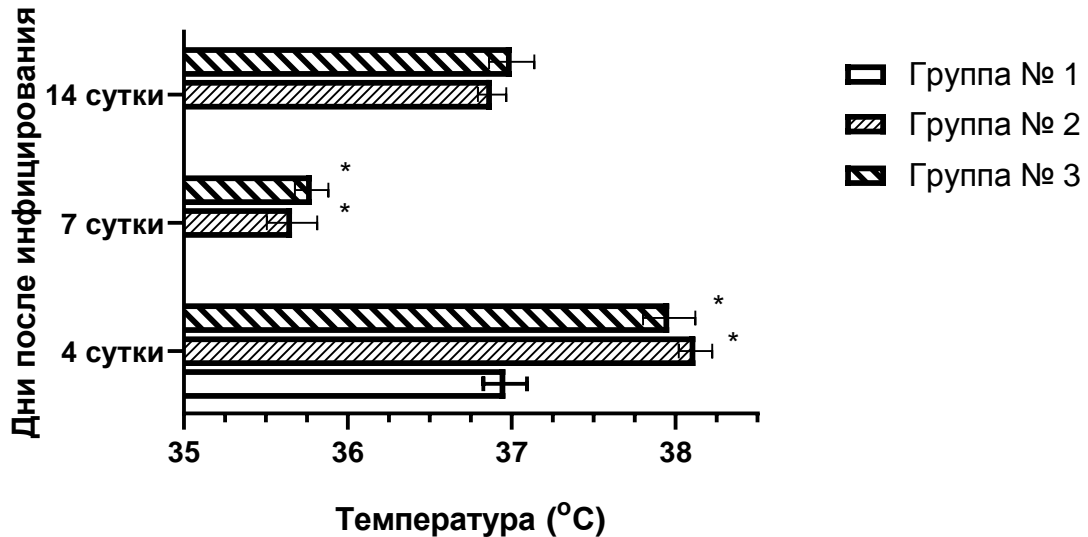


Рисунок 1 – Величина температуры тела в течение эксперимента (Mean±SE, °C).

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 ($p > 0,05$).

Падение массы тела носило прогрессивный характер (с $23,38 \pm 0,54$ г до $18,02 \pm 0,79$ г и с $22,84 \pm 0,41$ г до $17,51 \pm 0,59$ г, группы №№ 2 и 3, соответственно) в течение первых 11-13 суток (рисунок 2). Наступлению летального исхода предшествовало присоединение тяжелого прерывистого дыхания и тремора. Гибель животных, инфицированных штаммом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09, происходила в период с 7-х по 11-е сутки наблюдения; инфицированных штаммом гриппа A/Aichi/2/68MA – с 8-х по 13-е сутки. Значимых различий в течении клинической картины заболевания у животных из обеих опытных групп не выявлено. Уровень летальности в обеих группах составил 50% (рисунок 3). Начиная с 12-13-х суток, у выживших животных (по 10

животных в группах №№ 2 и 3) отмечалась тенденция к редуцированию клинических симптомов и восстановлению позитивной динамики набора массы тела.



Рисунок 2–Величина массы тела в течение эксперимента (Mean±SE, %).

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 ($p > 0,05$)

На 4-е и 7-е сутки после инфицирования животные из вторых подгрупп, клиническая картина у которых включала наличие тяжелого прерывистого дыхания и тремора, подвергались плановой эвтаназии ($n=5$ на каждый срок) с целью забора биологического материала для последующего определения уровня КПП в легких, сатурации гемоглобина крови кислородом, гематологического, иммунологического, патоморфологического, гистологического исследования, а также изучения вирусной нагрузки. На 14-е сутки выжившие животные из обеих опытных групп были подвергнуты плановой эвтаназии. Контрольных животных подвергали плановой эвтаназии (по 5 особей) на 4-е, 7-е и 14-е сутки. У

интактных животных уровень сатурации гемоглобина крови кислородом определяли прижизненно, забирая кровь из буккального синуса.

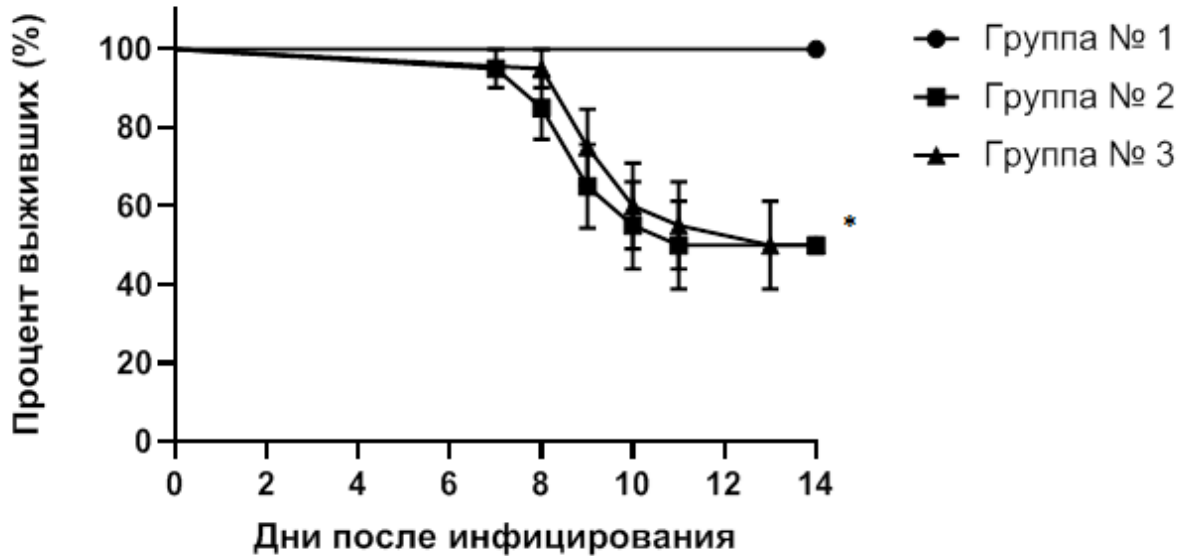


Рисунок 3—График кривых выживаемости Каплана-Мейера (Mean±SE, %).

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 ($p > 0,05$).

Изучение уровня КППГ в легких продемонстрировало прогрессивное возрастание содержания данных продуктов у инфицированных животных в обеих опытных группах: в 2 и 2,7 раз (по отношению к контрольным данным) на 4-е и 7-е сутки эксперимента, соответственно (рисунок 4). Значимых межгрупповых (группы №№ 2 и 3) различий выявлено не было.

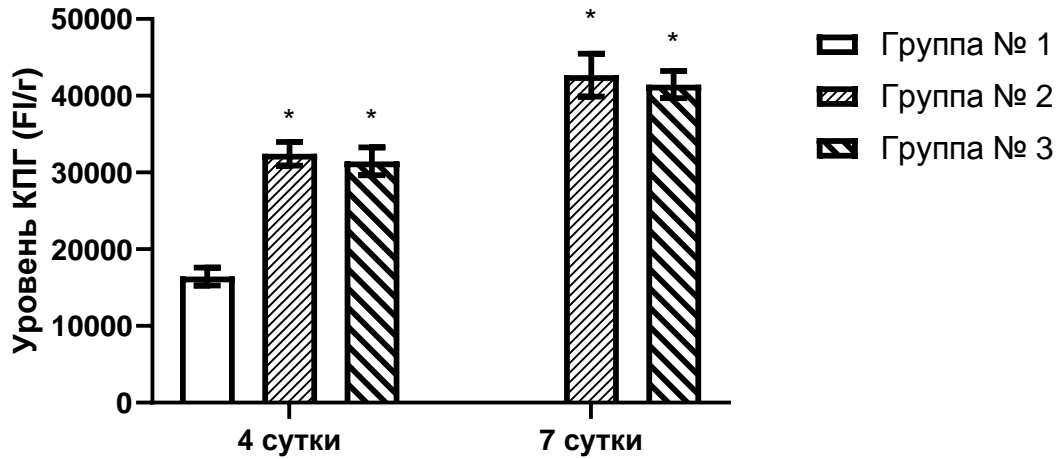


Рисунок 4 – Уровень КПГ в ткани лёгких, оцененный по величине флуоресценции (Mean±SE, Ед/г).

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 ($p > 0,05$)

Динамика снижения величины индекса сатурации, отражающего насыщенность крови кислородом, носила аналогичный изменению уровня КПГ, характер. А именно, уровень индекса на 4-е и 7-е сутки был снижен, в среднем, на 30 % и более чем на 50 % по отношению к контрольным данным, соответственно (таблица 2).

Анализ, проведенный на 14-е сутки после инфицирования, показал, что у опытных животных, зараженных вирусами A/California/07/2009MA и A/Aichi/2/68MA, величина индекса сатурации была равна $71,00 \pm 2,48$ и $75,75 \pm 3,57$ % ($p \leq 0,05$ в обоих случаях по отношению к данным в контроле, равнявшимся $92,00 \pm 1,08$ %).

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

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

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 ($p > 0,05$).

Анализ гематологических маркеров развития ОПЛ (таблица 3), показал, что на 4-е сутки эксперимента значимые различия по сравнению с контролем были выявлены в отношении уровня лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и ЛГИ.

В дальнейшем, на 7-е сутки регистрации, картина крови характеризовалась развитием выраженной лейкопении и дальнейшим ростом гранулоцитарного ряда лейкоцитов (сегменто- и палочкоядерные нейтрофилы и эозинофилы), а также повышением абсолютного количества тромбоцитов. В связи с тем, что существенных различий в уровнях изучаемых показателей у контрольных животных на разных сроках не было, в иллюстративном материале представлены данные обобщенного контроля. Анализ гематологических маркеров, проведенный на 14-е сутки после инфицирования, не выявил значимых различий в исследуемых показателях.

Таблица 3 –Показатели морфологического состава крови (Mean±SE).

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)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,58±0,14	9,93±0,34	10,25±0,68	5,67±0,25*	5,39±0,55*
Лимфоциты, %	67,33± 0,91	59,68± 1,20*	59,20± 1,54*	54,78± 2,34*	53,63± 1,49*
Моноциты, %	3,50±0,29	3,25±0,25	3,00±0,00	4,25±0,48	2,75±0,25
Базофилы, %	0,50±0,29	0,75±0,25	1,00±0,41	1,00±0,41	1,00±0,58
Эозинофилы, %	1,00±0,41	2,75±0,48	2,75±0,85	3,25±0,48*	4,00±0,41*
П/я нейтрофилы, %	0,50±0,29	2,50±1,04	2,00±0,91	3,25±0,48*	3,00±0,41*
С/я нейтрофилы, %	26,25± 1,18	31,75± 0,75*	32,25± 0,48*	34,75± 1,03*	35,50± 0,96*
ЛГИ	2,54±0,17	1,75±0,07*	1,74±0,11*	1,45±0,07*	1,40±0,08*
Эритроциты, %	8,84±0,10	10,46±0,78	9,25±0,46	9,44±0,88	10,68±0,72
Гемоглобин, г/л	132,75± 0,81	150,25± 6,49	132,50± 4,11	134,00± 11,53	147,00± 5,58
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	519,00± 27,16	758,00± 79,53	653,50± 102,72	735,25± 58,64*	845,00± 105,08*
Примечание: П/я – палочкоядерные; С/я – сегментоядерные. * –p<0,05 по отношению к группе № 1.					
Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – мыши, инфицированные A/California/07/2009МА; группа № 3 – мыши, инфицированные A/Aichi/2/68МА. Значимых межгрупповых различий (группы №№ 2 и 3) не выявлено (p > 0,05)					

Изучение содержания ряда провоспалительных цитокинов в легких продемонстрировало наличие значимого увеличения уровня концентрации TNF- α , IL-6 и IL-1 β на обоих сроках наблюдения (таблица 4). При этом рост IL-6 и IL-1 β , в отличие от TNF- α , носил ярко выраженный прогрессирующий характер.

Анализ цитокинового профиля, проведенный на 14-е сутки после инфицирования, не выявил значимых межгрупповых различий, однако уровень изучаемых цитокинов был достоверно выше у всех опытных животных по сравнению с интактными мышами. Так, концентрация TNF- α была равна $19,00 \pm 1,14$ и $17,80 \pm 1,77$ пг/г; IL-6 – $294,80 \pm 9,92$ и $283,20 \pm 6,82$ пг/г и IL-1 β – $208,16 \pm 19,05$ и $228,40 \pm 21,92$ пг/г у мышей, инфицированных A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA, соответственно.

Таблица 4 – Показатели уровня провоспалительных цитокинов в легких (Mean \pm 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	$11,80 \pm 2,39$	$38,04 \pm 4,74^*$	$36,20 \pm 4,87^*$	$40,39 \pm 7,26^*$	$44,40 \pm 5,81^*$
IL-6	$117,84 \pm$	$400,72 \pm$	$383,84 \pm$	$781,75 \pm$	$824,40 \pm$
	27,20	33,92*	32,93*	175,37*	102,54*
IL-1 β	$131,00 \pm$	$302,90 \pm$	$317,20 \pm$	$483,31 \pm$	$500,60 \pm$
	26,47	60,19*	41,47*	93,98*	130,43*

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 ($p > 0,05$)

Подтверждением вышеописанных лабораторных показателей, характеризующих процесс формирования ОПЛ/ОРДС, явились результаты патоморфологического и гистологического исследования.

Патоморфологическое исследование на 4-е и 7-е сутки показало, как наличие, так и увеличение в динамике площади кровоизлияний в лёгочной паренхиме у инфицированных животных из обеих опытных групп (таблица 5). Кровоизлияний в лёгких интактных животных не наблюдалось ($0,00 \pm 0,00\%$).

При проведении разреза в области кровоизлияний и последующем надавливании было отмечено выделение кровавого экссудата.

Наблюдаемое развитие ОПЛ было ассоциировано с пневмонией, на что указывала характерная локализация повреждения лёгочной паренхимы и резкий рост площади повреждения лёгких к 7-ым суткам, сопровождавшийся повреждением эпителиоцитов респираторного тракта [309].

Таблица 5 – Относительная площадь кровоизлияний в паренхиме лёгких (Mean \pm SE, %)

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 \pm 0,00	33,25 \pm 5,89*	39,50 \pm 11,98*	81,25 \pm 11,97*	75,00 \pm 10,21*

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 ($p > 0,05$).

На 14-е сутки эксперимента лёгкие приобрели серый оттенок, наблюдалось замещение повреждённой лёгочной паренхимы фиброзной тканью, структура

стала плотной и менее эластичной. При разрезе области замещения лёгочной паренхимы и дальнейшем надавливании, отмечали выделение мутного экссудата.

Суммарная полуколичественная оценка повреждения лёгких при гистологическом исследовании не выявила значимых различий между группами инфицированных животных на обоих сроках регистрации. Повреждения лёгких у интактных животных отсутствовали ($0,01 \pm 0,00$ баллов).

Суммарная полуколичественная оценка показателей, характеризующих наличие воспаления в легочной ткани (содержание нейтрофилов и толщина альвеолярных стенок), также не выявила значимых межгрупповых различий на обоих сроках регистрации. В лёгких интактных животных признаки воспаления отсутствовали ($0,01 \pm 0,00$ баллов). Данные приведены в таблице 6.

Таблица 6–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)
Суммарная оценка, баллы	$0,01 \pm 0,00$	$0,38 \pm 0,01^*$	$0,40 \pm 0,02^*$	$0,69 \pm 0,01^*$	$0,68 \pm 0,01^*$
Воспалительная составляющая, баллы	$0,01 \pm 0,00$	$0,28 \pm 0,01^*$	$0,28 \pm 0,02^*$	$0,53 \pm 0,01^*$	$0,53 \pm 0,02^*$
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 ($p > 0,05$).					

Гистологическое исследование лёгких на 4-е сутки после инфицирования выявило повреждение альвеолоцитов и эпителия бронхов, сопровождавшееся десквамацией клеток, оголением базальной мембраны и инициацией процесса

образования гиалиновых мембран. В просвете альвеол наблюдали скопления альвеолярных макрофагов. Было отмечено полнокровие сосудов микроциркуляторного русла и наличие очагов альвеолярного отёка, локальных кровоизлияний в альвеолы и мелких очагов ателектазов.

При микроскопировании лёгких на 7-е сутки после эксперимента были выявлены гиалиновые мембраны и увеличенные в толщину межальвеолярные перегородки. Имели место кровоизлияния в альвеолах, ателектазы, клеточные инфильтраты в периваскулярных пространствах, тромбы в сосудах микроциркуляторного русла. Наблюдалось формирование геморрагической пневмонии в лёгких. Одновременно с проявлениями, характерными для воспалительного процесса, отмечались признаки очаговой пролиферации соединительнотканых клеток с тенденцией к замещению лёгочной паренхимы фиброзной тканью.

На 14-е сутки после инфицирования, наблюдалась тенденция к восстановлению лёгочной паренхимы в обеих группах инфицированных животных. Отмечено замещение повреждённых участков лёгких соединительной тканью.

Результаты гистологического исследования представлены на рисунках 5-7.

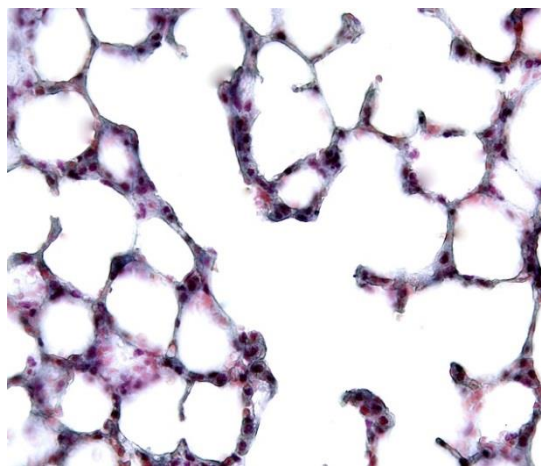
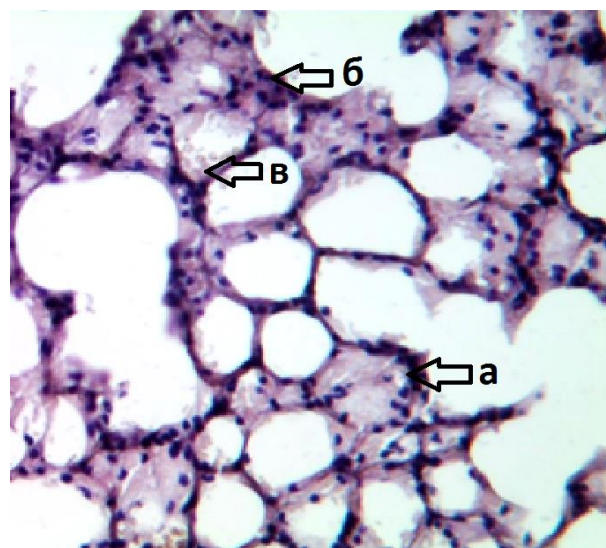
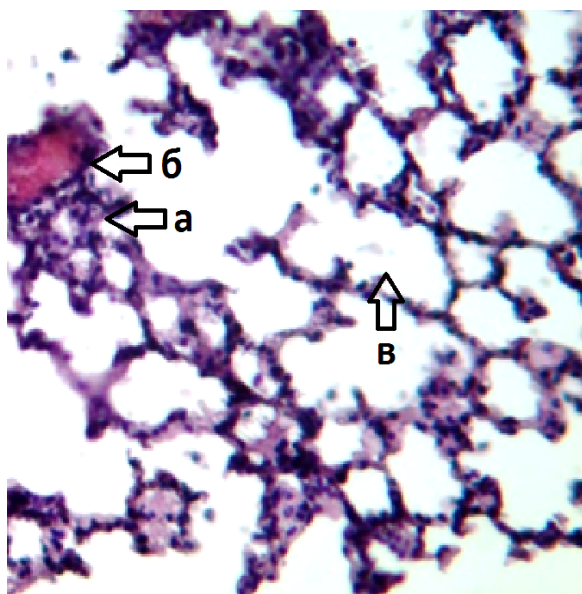


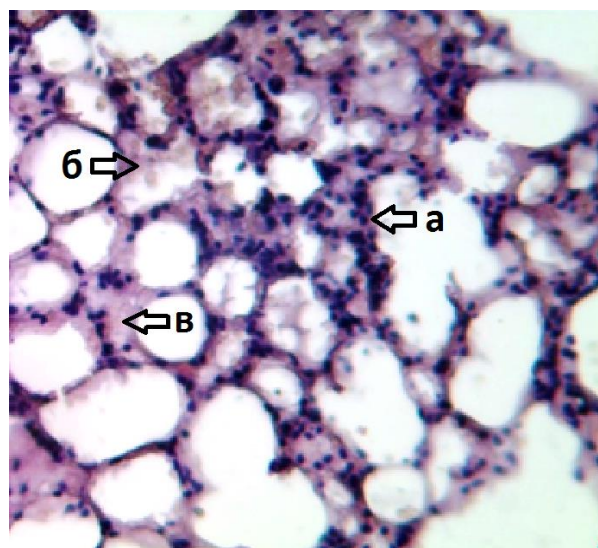
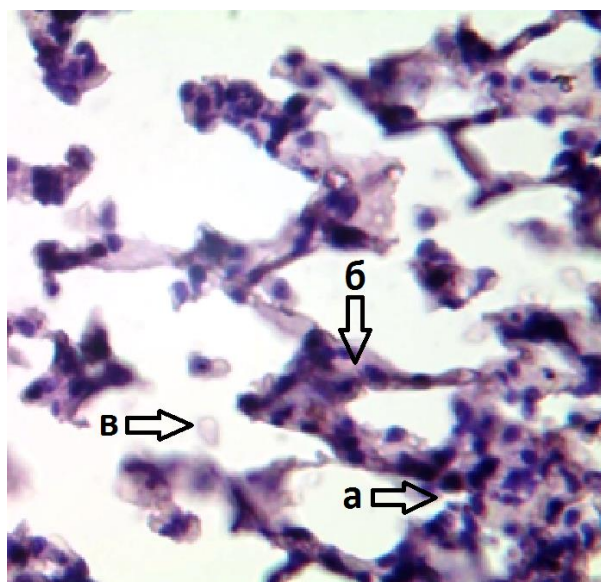
Рисунок 5 – Легкие интактного животного. Растянутые в разной степени альвеолярные ходы, патологические изменения отсутствуют. Окраска гематоксилин-эозином, ув.400.



А: Легкие животного, инфицированного вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 на 4-е сутки. Слабо выраженный отек альвеолярных перегородок с умеренно выраженной мононуклеарной воспалительной инфильтрацией (а), полнокровием капилляров (б), с накоплением в просвете альвеол белкового дебриса (в).

Б: 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).

Рисунок 6 – Легкие животных, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 на 4-е (А) и 7-е (Б) сутки. Окраска гематоксилин-эозином, ув.400.



А: Легкие животного, инфицированного вирусом гриппа А/Аichi/2/68МА на 4-е сутки. Присутствие клеточных инфильтратов в альвеолярных стенках (а), слабо выраженного отека альвеолярных перегородок (б) и суженного просвета альвеол (в).

Б: Легкие животного, инфицированного вирусом гриппа А/Аichi/2/68МА 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 7 – Легкие животного, инфицированного вирусом гриппа А/Аichi/2/68МА на 4-е (А) и 7-е (Б) сутки. Окраска гематоксилин-эозином, ув.400.

Вирусная природа ОПЛ была подтверждена путём постановки реакции гемагглютинации. На 4-е сутки после инфицирования вирусная нагрузка в легких животных из групп №№ 2 и 3 составляла $3,75 \pm 0,32$ и $3,63 \pm 0,31$ Ig ЭИД₅₀, соответственно. К 7-м суткам наблюдения был отмечен ожидаемый клиренс вируса в обеих опытных группах [310]. Значимых различий в уровне вирусной нагрузки в легких у животных, получивших различные штаммы, не выявлено (таблица 7).

Таблица 7 – Уровень вирусной нагрузки в паренхиме лёгких опытных животных в динамике (Mean±SE,lg ЭИД₅₀)

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)
Титр вируса, lg ЭИД ₅₀	0,00±0,00	3,75±0,32	3,63±0,31	2,75±0,14	2,00±0,20

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 ($p > 0,05$).

Таким образом, полученные в настоящем эксперименте результаты показали наличие совокупности всех признаков, характеризующих модель ОПЛ вирусной этиологии, ассоциированного с пневмонией. А именно: характерная клиническая картина (снижение или повышение температуры, нарушение функции дыхания вплоть до дыхательной недостаточности); снижение уровня сатурации гемоглобина крови кислородом, что является типовым симптомом патологии; диффузное альвеолярное повреждение легких (морфологический субстрат ОПЛ) и присутствие гиалиновых мембран, являющихся ключевым признаком ОПЛ/ОРДС [311; 312]. О наличии процесса воспаления, являющегося одним из основных патогенетических факторов данного заболевания, свидетельствовали характерные изменения лейкоцитарной формулы крови и повышенный уровень провоспалительных цитокинов в легких [172].

Проведённый корреляционный анализ выявил обратную зависимость между изменением концентрации КПГ в лёгких и степенью падения насыщения гемоглобина крови кислородом у мышей из обеих опытных групп: $r^2 = -0,8651$ при $p = 0,0023$ у животных, инфицированных вирусом гриппа штамма

A/California/07/2009MA, и $r^2=-0,8815$ при $p=0,0015$ у животных, инфицированных A/Aichi/2/68MA.

Оценка взаимосвязи между динамикой изменения уровня КПП и выраженностью повреждения лёгких показала наличие прямой зависимости между данными показателями 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).

Анализ взаимосвязи между динамикой изменения уровня цитокинов и КПП показал наличие прямой зависимости между данными показателями у инфицированных животных. IL-1 β – $r^2=0,8303$ 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- α – $r^2=0,6585$ 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, вызванного вирусами гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA. Ввиду вышеизложенного для дальнейших исследований использовали штамм вируса гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 (H1N1), как родственный человеческому штамму A/California/07/2009 и представляющий наибольшую эпидемиологическую актуальность [4].

Заключение по разделу.

Таким образом, при инфицировании опытных животных вирусами A/California/07/2009MA и A/Aichi/2/68MA в дозе 1 ЛД₅₀ наблюдается прогрессивное снижение уровня сатурации гемоглобина крови кислородом (до 50%), рост площади кровоизлияний в лёгких (до 80%), значимое увеличение повреждения легочной паренхимы, включая воспалительный компонент; развитие системного воспалительного ответа (снижение величины лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса в крови до 40 % и повышение уровня провоспалительных цитокинов в легких –TNF- α в 4 раза, IL-6 в раз и IL-1 β в 5

раз), а также трёхкратным ростом уровня КППГ. Формирование ОПЛ у зараженных мышей происходит вне зависимости от конкретного штамма вируса гриппа А.

Наблюдаемое прогрессивное накопление КППГ в лёгких находилось в корреляционной зависимости с такими типовыми показателями течения вирус-ассоциированного ОПЛ, как уровень сатурации гемоглобина кислородом, $r^2 = 0,8651$ и $r = -0,8815$ и степенью повреждения лёгочной паренхимы, $r^2 = 0,7012$ и $r^2 = 0,7317$, величиной уровня таких провоспалительных цитокинов, как TNF- α , $r^2 = 0,6585$ и $r^2 = 0,8389$; IL-6, $r^2 = 0,7939$ и $r^2 = 0,8909$; IL-1 β , $r^2 = 0,8303$ и $r^2 = 0,9301$ у мышей, инфицированных A/California/07/2009MA и A/Aichi/2/68MA, соответственно

Полученные результаты явились основанием для формулирования выводов 1 и 2.

3.2 Оценка влияния модуляторов рКПГ на течение ОПЛ, вызванного вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09

Перед началом эксперимента было проведено определение ЛД₅₀ штамма вируса гриппа по методике Рида-Менча на 20 беспородных мышках самках. Расчетная величина 1 ЛД₅₀ составила 3,4 lg ЭИД₅₀.

3.2.1 Влияние предшественника КПГ МГ на течение ОПЛ у мышей, зараженных вирусом A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09

Эксперименты выполнены на 115 аутбредных мышках самках.

Животные были разделены на три группы: группа № 1 – интактные мыши (контроль № 1), N=15, группа № 2 – мыши, инфицированные штаммом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09, и получавшие ежедневно подкожно (п/к) в течение 10 дней до инфицирования фосфатно-солевой буфер в качестве плацебо (контроль № 2), N=40; группа № 3 – мыши, инфицированные штаммом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09, и получавшие метилглиоксаль (МГ) в дозе 50 мг/кг ежедневно п/к в течение 10 дней до инфицирования (опытная группа), N=60. Животных инфицировали вирусом в расчетной дозе 1 ЛД₅₀.

Животные во 2-ой и 3-ей группе были разделены на две равные подгруппы, аналогично изложенному в пункте 3.1. Забор биоматериала проводили по той же схеме.

Изучение уровня КПГ в легких показало, что у животных из обеих опытных групп наблюдалось значимое увеличение их содержания, носившее прогрессирующий характер в течение эксперимента. При этом у животных, получавших МГ, значения уровня содержания КПГ в легких превышали таковые у особей, которым вводили плацебо, на обоих сроках исследования. Значимые различия между группами №№ 2 и 3, были выявлены на 4-е сутки эксперимента (Рисунок 8).

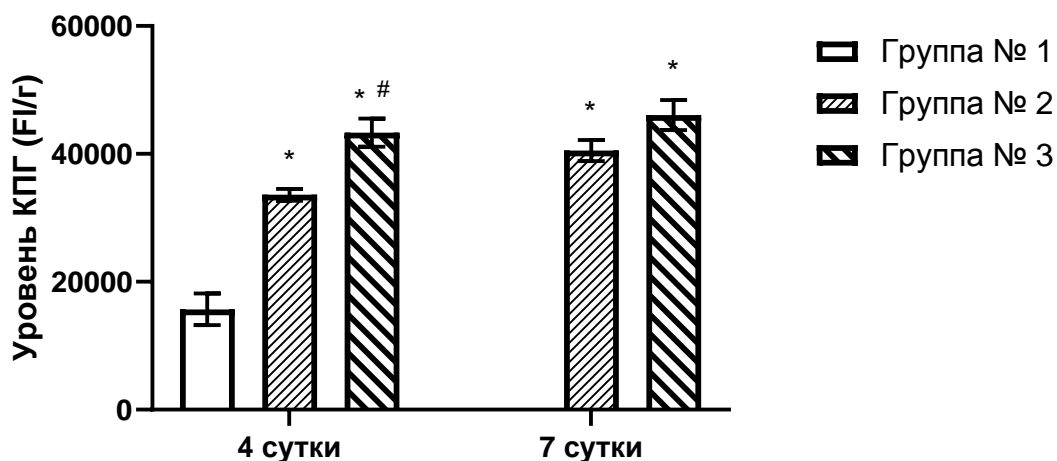


Рисунок 8 – Уровень КПГ в ткани лёгких, оцененный по величине флуоресценции (Mean±SE, Ед/г).

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

Применение предшественника КПГ привело к значимому отягощению выраженности ОПЛ по показателям летальности, степени насыщенности крови кислородом и тяжести поражения легочной ткани, а также выраженности воспалительной реакции (по содержанию провоспалительных цитокинов в легких).

Так, общая летальность (рисунок 9) в группе животных, получавших МГ, превысила таковую в 2 раза по сравнению с животными из группы № 2 (70 и 35 %, соответственно, $p < 0,05$).

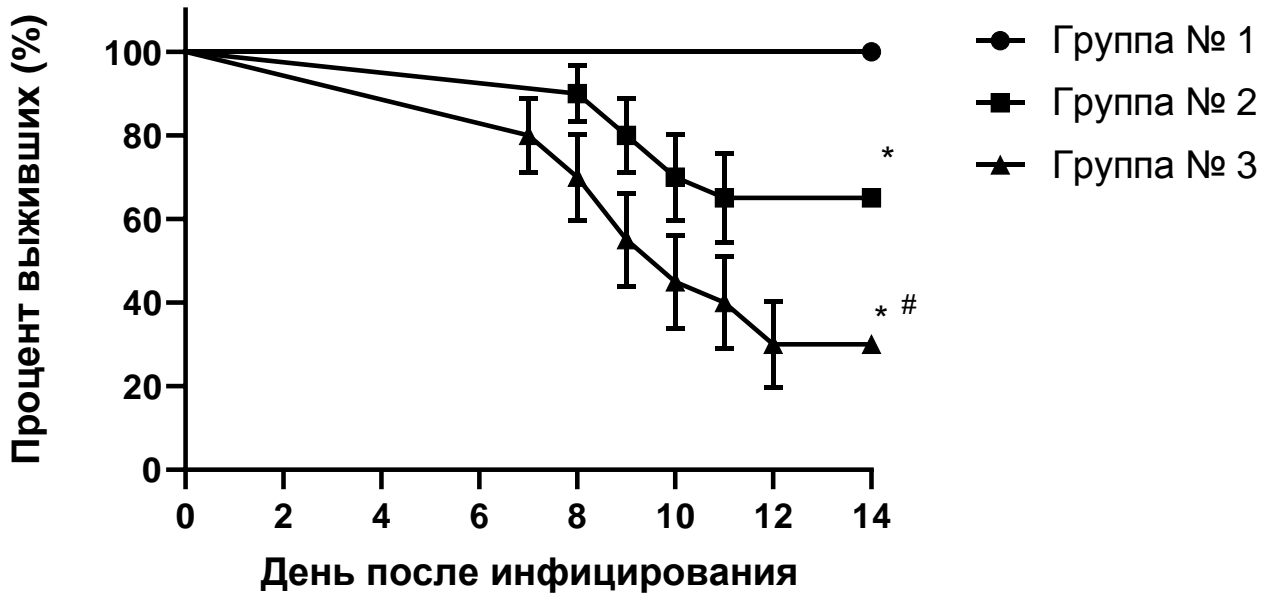


Рисунок 9 – График кривых выживаемости Каплана-Мейера (Mean±SE,%).

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 МГ.

Как и в предыдущих экспериментах (раздел 3.1) у опытных животных наблюдалось прогрессирующее снижение величины индекса сатурации крови кислородом (рисунок 10). Величина индекса на 4-е сутки составляла $57,40 \pm 2,77$ % (снижение на 37 %) и $52,00 \pm 5,45$ % (снижение на 43 %) в группах №№ 2 и 3, соответственно, по отношению к интактным животным ($91,60 \pm 1,81$ %). Значимые различия ($p < 0,05$) в величине изучаемого показателя у животных, получавших плацебо, и МГ, были выявлены на 7-е сутки – $51,00 \pm 1,79$ % (снижение на 44 %) и $39,40 \pm 1,44$ % (снижение на 57 %) для групп № 2 и 3, соответственно.

По окончании исследования (14-е сутки) у инфицированных мышей, получавших предварительно МГ и плацебо, уровень величины сатурации гемоглобина крови кислородом составлял $72,60 \pm 2,34$ и $74,00 \pm 0,71$ %, соответственно ($p < 0,05$ по отношению к показателю у интактных животных, равнявшемуся $90,60 \pm 1,03$ %).

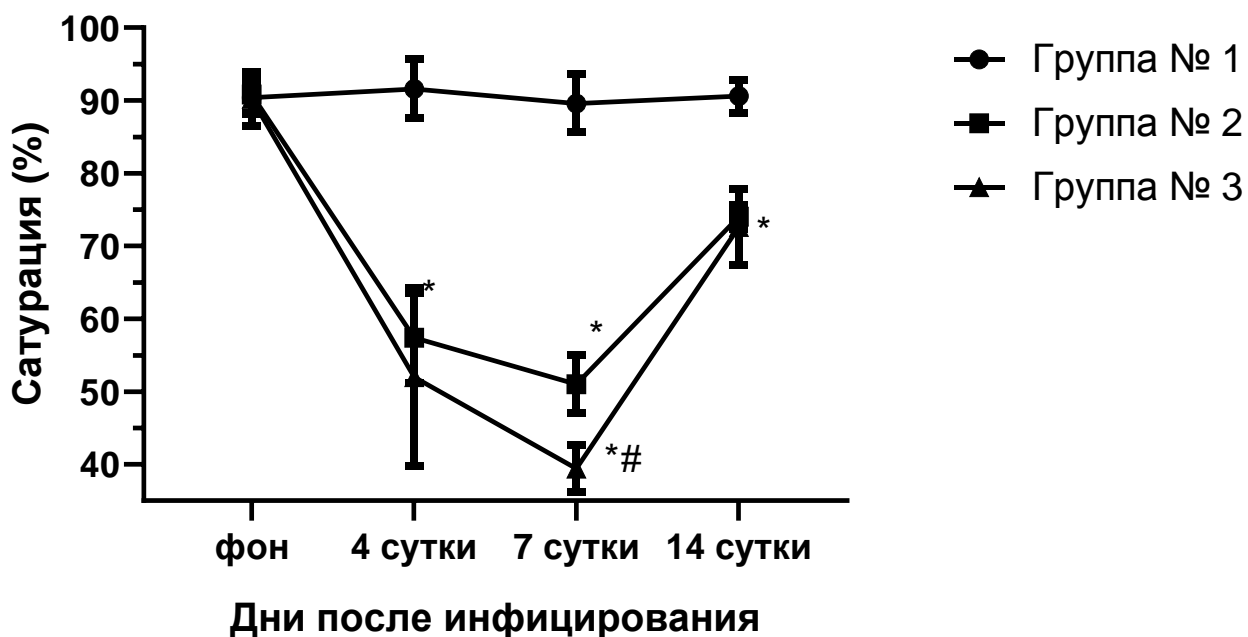


Рисунок 10 – Величина уровня сатурации гемоглобина крови кислородом в течение эксперимента (Mean±SE,%).

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 МГ.

Морфологическое и гистологическое исследование легких также продемонстрировало потенцирующее действие МГ на процесс формирования ОПЛ. Так, площадь кровоизлияний в легочной паренхиме на 4-е сутки эксперимента, у животных, получавших МГ ($76,75 \pm 8,04\%$), более чем в 2 раза превышала таковую у животных из группы № 2 ($35,00 \pm 5,27\%$). При регистрации на 7-е сутки значимых межгрупповых различий не было, так как к этому сроку наблюдения площадь кровоизлияний захватывала максимально возможный объем органа. Данные приведены в таблице 8. Кровоизлияний в лёгких интактных животных не наблюдалось ($0,00 \pm 0,00\%$).

Таблица 8–Величина площади кровоизлияний в паренхиме лёгких (Mean±SE, %)

Изучаемые показатели	Интактные (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	35,00± 5,27*	76,75± 8,04*#	75,00± 5,00*	87,50± 5,00*
Примечание: * – $p \leq 0,05$ 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					

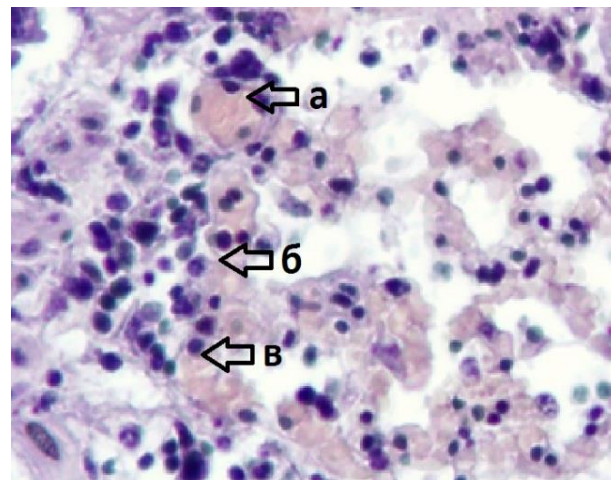
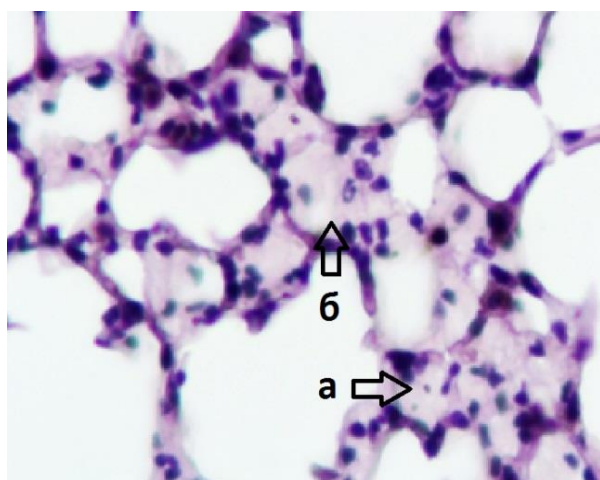
Аналогичные данные были получены и при гистологическом исследовании. Суммарная полуколичественная оценка степени повреждения легких показала наличие значимых различий между группами №№ 2 и 3 на обоих сроках регистрации. В основе выявленных различий лежали показатели воспалительного процесса (содержание нейтрофилов и толщина альвеолярных стенок). Поражений в лёгких интактных животных не наблюдали (0,05±0,00 баллов при полуколичественной оценке поражения лёгких и 0,03±0,00 баллов при полуколичественной оценке воспалительной составляющей). Данные представлены в таблице 9.

Прогрессирование процесса поражения легочной паренхимы в динамике заключалось в увеличении толщины альвеолярных стенок, количества гиалиновых мембран, отеков в альвеолах и бронхах, ателектазов и клеточных инфильтратов в альвеолах и альвеолярной стенке, появлении признаков циркуляторных нарушений, очагов геморрагической пневмонии и фибротизации. Данные представлены на рисунках 11 и 12.

Таблица 9 –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.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)
Суммарная оценка, баллы	0,05± 0,00	0,43± 0,01*	0,57± 0,02*#	0,66± 0,02*	0,75± 0,01*#
Воспалительная составляющая, баллы	0,03± 0,00	0,32± 0,01*	0,42± 0,01*#	0,51± 0,02*	0,59± 0,01*#

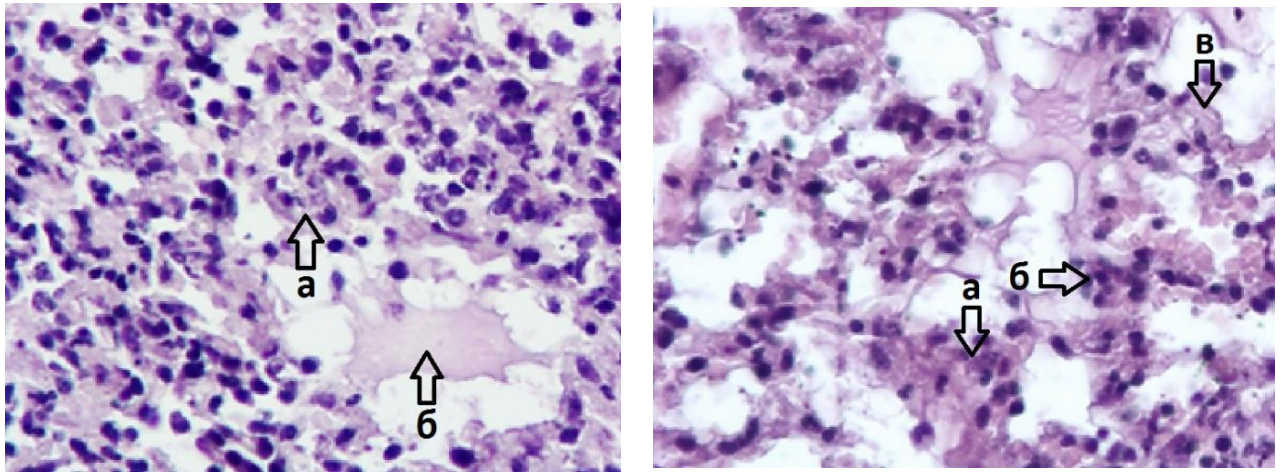
Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к группе № 1, # - $p < 0,05$ по отношению к группе № 2. Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 –мыши, получавшие плацебо; группа № 3 – мыши, получавшие МГ.



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

Б: Легкие инфицированного животного, получавшего плацебо, на 7-е сутки. Полнокровие капилляров (а), наличие клеточных инфильтратов (б) и ателектазов (в).

Рисунок 11– Легкие животных, получавших плацебо, на 4-е (А) и 7-е (Б) сутки. Окраска гематоксилин-эозином, ув.400.



А: 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).

Б: Легкие животного, получавших МГ, на 7-е сутки. Формирование ателектазов (а), присутствие клеточных инфильтратов (б) и гиалиновых мембран (в).

Рисунок 12– Легкие животных, получавших МГ, на 4-е (А) и 7-е (Б) сутки. Окраска гематоксилин-эозином, ув.400.

У выживших животных, подвергнутых плановой эвтаназии на 14-е сутки эксперимента, имела место выраженная тенденция к замещению легочной паренхимы фиброзной тканью. Легкие приобрели серый оттенок, а их структура стала плотной и менее эластичной.

В обеих опытных группах содержание провоспалительных цитокинов в легких было повышено на всех сроках регистрации по сравнению с интактными животными. В то же время, уровни TNF- α , IL-6 и IL-1 β у животных, получавших МГ, значительно превышали соответствующие показатели у инфицированных животных, получавших плацебо (в 1,6; 1,3 и 1,3 раза, соответственно) на 4-е сутки эксперимента и (в 1,4, 1,2 и 1,3 раза, соответственно) на 7-е сутки эксперимента (таблица 10).

Анализ, проведенный на 14-е сутки, показал, что у животных из обеих опытных групп имело место, как повышенное содержание провоспалительных цитокинов, так и наличие межгрупповых различий. Так, уровень TNF- α был равен $22,40 \pm 1,40$ и $19,20 \pm 3,10$ пг/г; IL-6 – $383,20 \pm 17,81$ и $348,99 \pm 27,37$ пг/г и IL-1 β – $237,76 \pm 23,93$ и $382,23 \pm 49,16$ пг/г у инфицированных мышей, получавших плацебо и МГ, соответственно.

Таблица 10 – Показатели уровня провоспалительных цитокинов в легких (Mean \pm 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- α	$12,20 \pm 1,69$	$37,00 \pm 1,79^*$	$58,05 \pm 7,49^{* \#}$	$38,78 \pm 2,98^*$	$53,81 \pm 5,05^*$
IL-6	$108,00 \pm 4,43$	$378,00 \pm 15,55^*$	$491,02 \pm 23,33^{* \#}$	$784,00 \pm 51,26^*$	$946,04 \pm 37,80^{* \#}$
IL-1 β	$109,20 \pm 6,00$	$359,40 \pm 8,71^*$	$463,45 \pm 54,88^{* \#}$	$565,00 \pm 35,55^*$	$713,73 \pm 30,65^{* \#}$

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.

Характер клинической картины заболевания, динамика изменения массы тела и температуры у животных из обеих опытных групп соответствовали таковым, описанным в разделе 3.1 (рисунки 13 и 14). Значимых различий между группами №№ 2 и 3 выявлено не было.

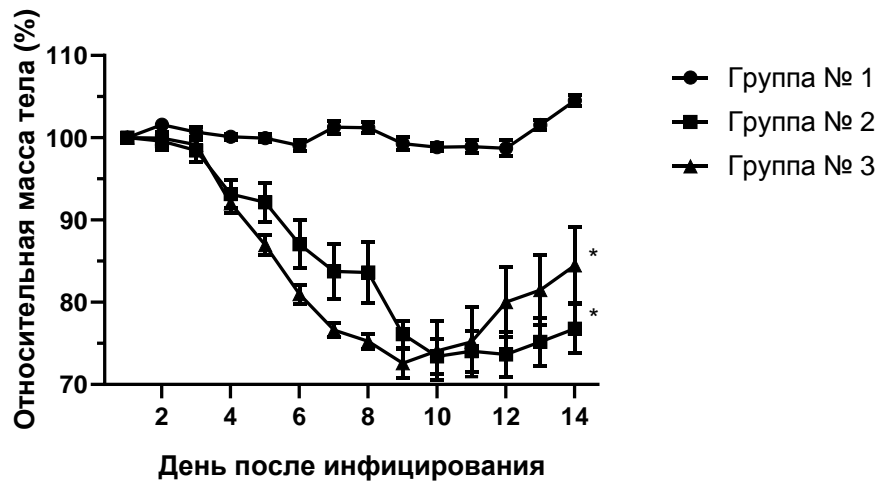


Рисунок 13–Величина массы тела в течение эксперимента (Mean±SE, %).

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

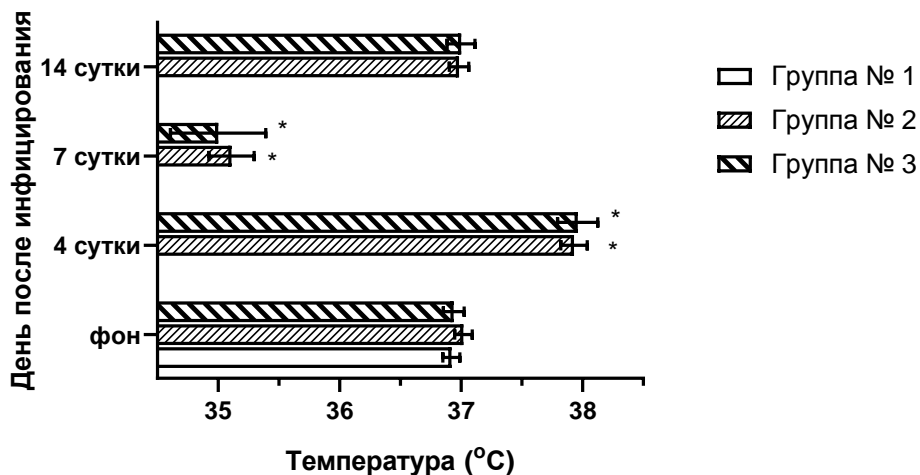


Рисунок 14– Величина температуры тела в течение эксперимента (Mean±SE, °C).

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.

Сравнительное исследование гематологических показателей и степени вирусной нагрузки в гомогенатах легких также не выявило существенных различий между группами №№ 2 и 3 (таблицы 11 и 12).

Таблица 11 –Показатели морфологического состава крови (Mean±SE)

Изучаемые показатели	Интактные гр.№ 1 (n=15)	Экспериментальные группы и сроки исследования			
		4 сутки		7 сутки	
		Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)	Гр.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,05±0,43	9,29±0,68	8,95±0,94	6,16±0,87	5,12±0,81*
Лимфоциты, %	79,00± 2,35	57,25± 4,07*	55,00± 4,08*	61,25± 4,19*	60,75± 3,33*
Моноциты, %	2,25±0,25	3,00±0,41	3,25±0,25	2,50±0,65	3,00±1,08
Базофилы, %	0,50±0,29	0,25±0,25	–	0,25±0,25	0,25±0,25
Эозинофилы, %	1,75±0,75	5,50±1,44	5,25±0,85	4,25±1,60	3,25±1,11
П/я нейтрофилы, %	0,25±0,25	2,75±0,85	3,50±1,19	3,75±1,38*	2,50±0,96
С/я нейтрофилы, %	16,25± 1,65	31,25± 1,93*	33,00± 3,56*	28,00± 3,44*	30,25± 3,30*
ЛГИ	5,03±0,73	1,74±0,25*	1,58±0,24*	2,08±0,35*	1,91±0,26*
Эритроциты, 10 ¹² /л	8,98±0,38	9,95±1,15	8,46±0,53	9,49±0,88	9,39±0,33
Гемоглобин, г/л	128,75± 6,07	139,25± 13,19	130,25± 6,13	134,75± 11,30	137,75± 4,73
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	693,75± 55,73	983,75± 122,80	902,75± 137,94	1013,50± 138,67	1136,50± 91,95*

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

Таблица 12 –Показатели вирусной нагрузки в гомогенатах лёгких (Mean±SE, lg ЭИД₅₀)

Изучаемые показатели	Контроль (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)
Титр вируса, lg ЭИД ₅₀	0,00±0,00	3,75±0,14	3,38±0,24	1,13±0,43	0,88±0,31
Примечание: Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – мыши, получавшие плацебо; группа № 3 – мыши, получавшие МГ					

Заключение по разделу.

Таким образом, применение предшественника конечных продуктов гликирования МГ усугубляет течение ОПЛ, повышая уровень летальности на 35%, снижая уровень сатурации на 10%, усугубляя выраженность системной воспалительной реакции (повышение уровня провоспалительных цитокинов в лёгких –TNF-α в 1,6 раза, IL-6 в 1,3 раза и IL-1β в 1,3 раза) и структурных нарушений в легочной ткани (двукратный прирост площади кровотока в лёгких на 4-е сутки и 30% прирост выраженности повреждения лёгких, в том числе и воспалительной составляющей) при вирус-индуцированном ОПЛ, а также способствует накоплению конечных продуктов гликирования (на 25%).

Полученные результаты явились основанием для формулирования вывода 3.

3.2.2 Влияние блокатора накопления КПП аминоксидина бикарбоната на течение ОПЛ у мышей, зараженных вирусом A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09

Эксперименты выполнены на 95 аутобредных мышках самках. Животные были разделены на три группы: группа № 1 – интактные мыши, N=15; группа № 2 – инфицированные мыши, получавшие плацебо (фосфатно-солевой буфер), N=40; группа № 3 – инфицированные мыши, получавшие аминоксидина бикарбонат, N=40. Аминоксидина бикарбонат в дозе 25 мг/кг вводили ежедневно п/к в течение 7 дней после инфицирования. Животных инфицировали вирусом в расчетной дозе 1 ЛД₅₀, определенной до начала эксперимента. Животные во 2-ой и 3-ей группе были разделены на две равные подгруппы, аналогично изложенному в пункте 3.1. Забор биоматериала проводили по той же схеме.

Результаты, полученные при изучении уровня КПП, продемонстрировали, что аминоксидин способствовал значимому снижению их содержания в легких на обоих сроках регистрации по сравнению с животными, получавшими плацебо (рисунок 15).

Применение блокатора накопления КПП привело к ограничению летальности инфицированных животных, повышению степени насыщенности гемоглобина крови кислородом, снижению выраженности воспалительной реакции (по показателям содержания маркерных гематологических показателей и провоспалительных цитокинов в легких) и степени тяжести поражения легочной ткани по сравнению с особями, получавшими плацебо (группа № 2).

Так, общая выживаемость в течение всего периода наблюдения животных, получавших плацебо, составила 40 %; животных, получавших аминоксидин – 70 % (рисунок 16).

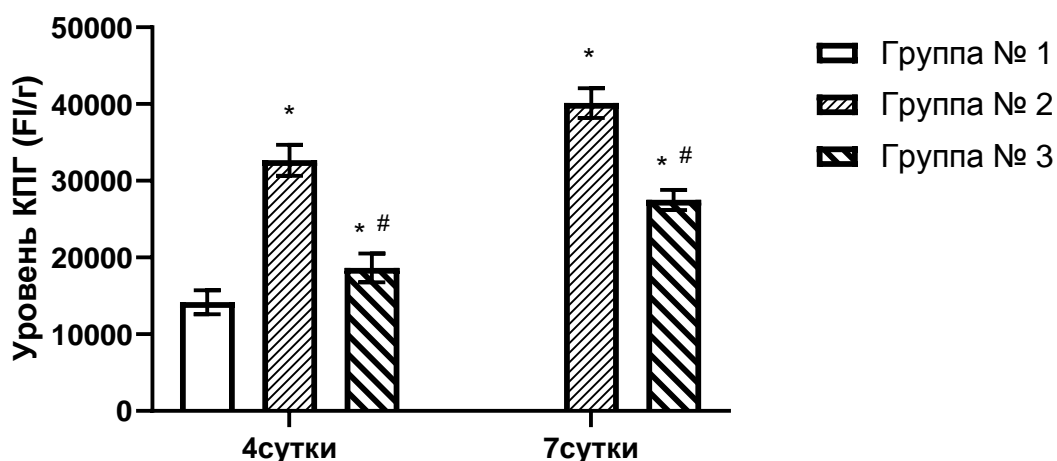


Рисунок 15 – Уровень КПГ в ткани лёгких, оцененный по величине флуоресценции (Mean±SE, Ед/г).

Примечание: * – $p < 0,05$ с группой № 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.

Изучение уровня сатурации гемоглобина крови кислородом (рисунок 17) показало, что на 4-е сутки после инфицирования значимых различий в степени снижения величины данного показателя у животных из обеих опытных групп не было. Однако на 7-е сутки (окончание введения аминогуанидина) различия в величине сатурации гемоглобина крови кислородом носили значимый характер и составляли $44,50 \pm 2,90\%$ и $60,00 \pm 1,29\%$ для групп № 2 и 3, соответственно.

У интактных животных данная величина была равна $90,25 \pm 1,10\%$.

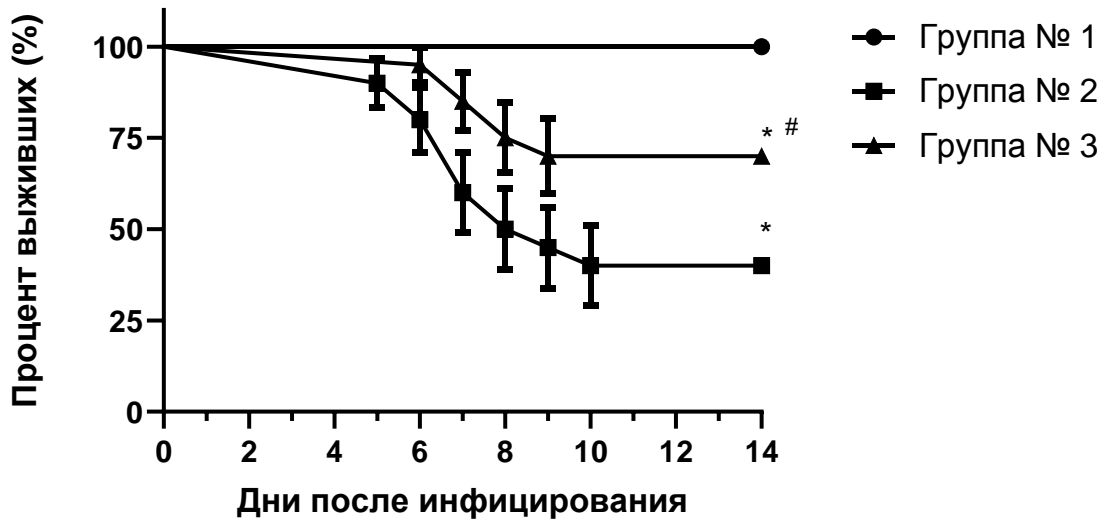


Рисунок 16 – График кривых выживаемости Каплана-Мейера (Mean±SE, %)

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 аминогуанидин.

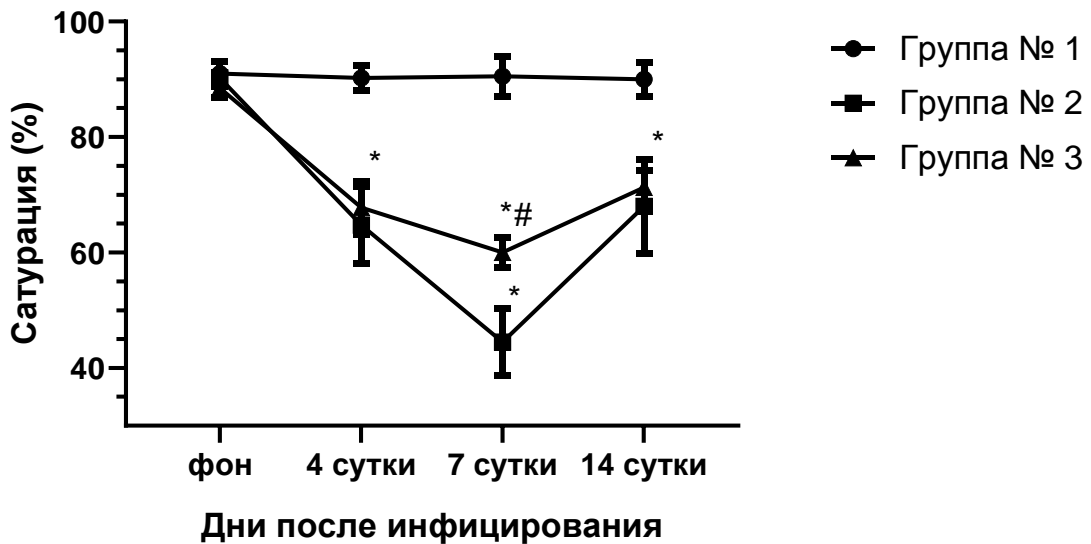


Рисунок 17 – Величина уровня сатурации гемоглобина крови кислородом в течение эксперимента (Mean±SE,%).

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 аминогуанидин.

Сравнительное исследование ряда маркерных гематологических показателей выявило наличие значимых различий между животными, получавшими аминогуанидин и плацебо, также на 7-е сутки эксперимента. Так, процентное содержание лимфоцитов и палочкоядерных нейтрофилов у животных, получавших аминогуанидин, практически не отличалось от таковых у интактных особей, в отличие от животных, получавших плацебо. Показатели относительного содержания сегментоядерных нейтрофилов, величины ЛГИ и абсолютного содержания тромбоцитов, хотя и превышали таковые значения у интактных животных, были существенно ниже показателей у животных, получавших плацебо (рисунки 18-22).

Остальные данные гематологического исследования представлены в таблице 13.

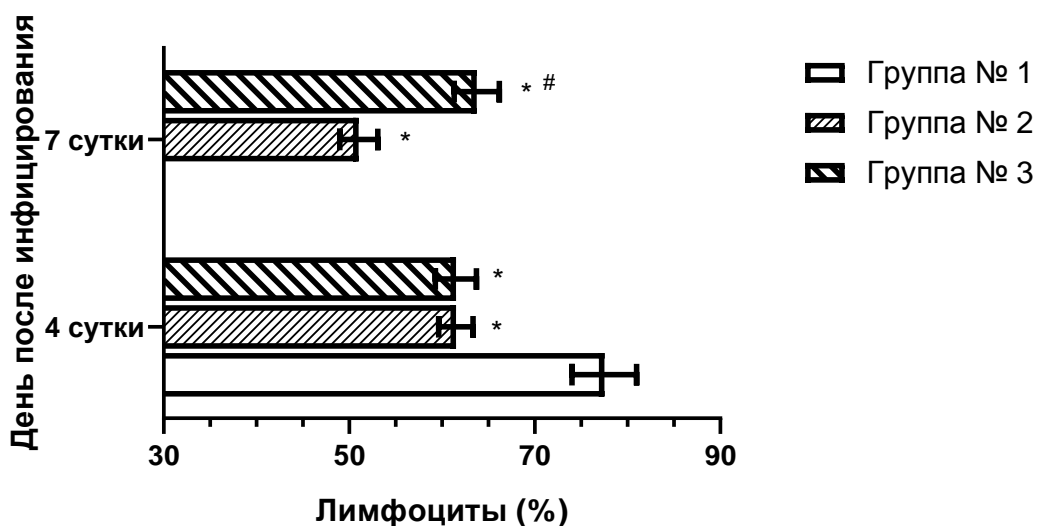


Рисунок 18 – Уровень относительного содержания лимфоцитов ($\text{Mean} \pm \text{SE}$, %).

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 аминогуанидин.

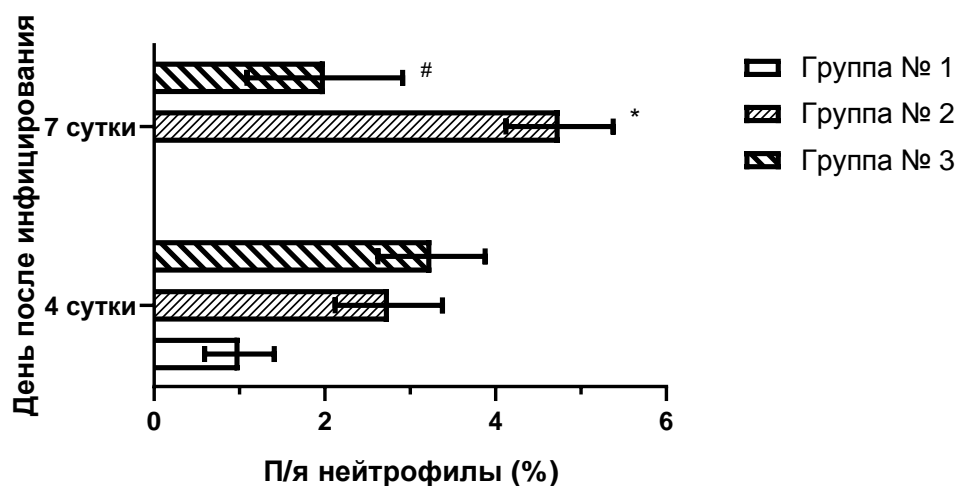


Рисунок 19 –Уровень относительного содержания палочкоядерных нейтрофилов (Mean±SE, %).

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 аминогуанидин.

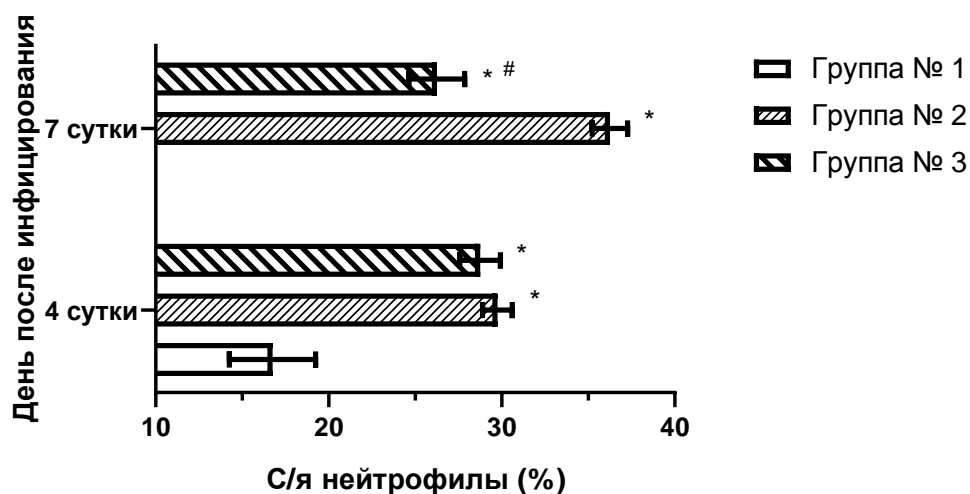


Рисунок 20 –Уровень относительного содержания сегментоядерных нейтрофилов (Mean±SE, %).

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 аминогуанидин.

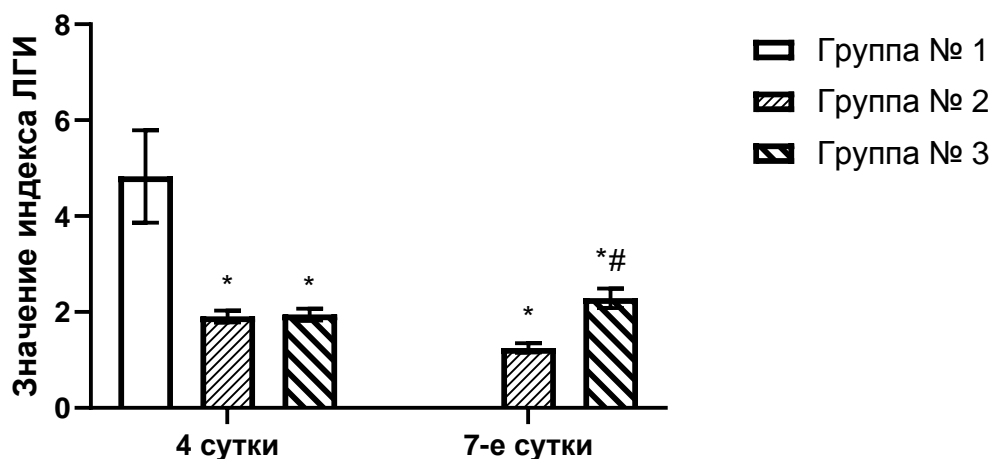


Рисунок 21 – Величина ЛГИ (Mean±SE).

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 аминогуанидин.

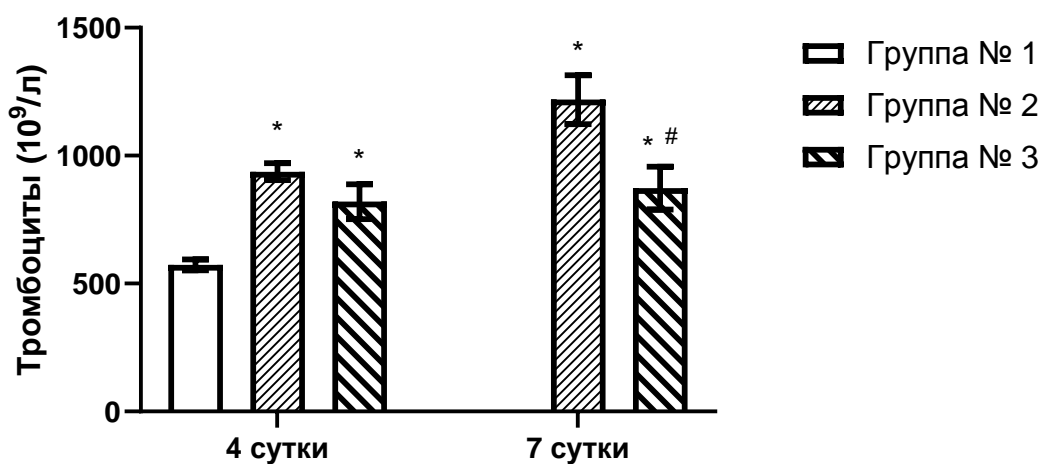


Рисунок 22 – Уровень абсолютного содержания тромбоцитов (Mean±SE, $10^9/\text{л}$).

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.

Таблица 13 – Показатели морфологического состава крови (Mean±SE)

Изучаемые 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)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,58±0,22	6,48±0,69*	7,00±0,55*	4,86±0,47*	4,61±0,29*
Моноциты, %	2,25±0,48	2,50±0,50	3,50±0,87	4,00±1,08	4,25±0,25*
Базофилы, %	0,50±0,29	1,25±0,48	1,00±0,41	1,75±0,25*	1,25±0,48
Эозинофилы, %	2,00±0,41	2,25±0,95	1,50±0,29	2,25±0,25	2,50±0,96
Эритроциты, 10 ¹² /л	7,84± 0,44	8,03± 0,68	8,81± 0,60	10,71± 0,58*	9,35± 0,55
Гемоглобин, г/л	111,25± 3,71	121,25± 10,62	123,00± 8,13	148,75± 4,17*	138,00± 5,76*

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

Сравнительное изучение содержания ряда провоспалительных цитокинов (таблица 14) показало, что концентрация TNF-α, IL-6 и IL-1β в легких была на значимо более низком уровне у животных, получавших аминогуанидин, по сравнению с особями из группы «плацебо», на обоих сроках исследования.

По окончании исследования (14 сутки наблюдения) значимые межгрупповые различия были отмечены в содержании IL-6 (376,40±16,65 и 211,40±30,15 пг/г, p=0,0079) и IL-1β (362,40±20,28 и 275,00±12,83 пг/г, p=0,0159) у животных, получавших плацебо и аминогуанидин, соответственно. Уровень TNF-α, при этом, составлял 22,40±2,38 (группа № 2) и 17,40±2,14 пг/г (группа № 3).

Таблица 14 – Показатели уровня провоспалительных цитокинов в легких (Mean±SE, пг/г).

Изучаемые 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- α	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 β	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

Сравнительное патоморфологическое исследование показало, что у животных, получавших плацебо, относительная площадь кровоизлияний в легких прогрессивно увеличивалась в ходе эксперимента, в отличие от особей, получавших аминогуанидин. В последнем случае необходимо отметить практически полное отсутствие увеличения данного показателя в динамике (таблица 15). Кровоизлияний в лёгких интактных животных не наблюдалось (0,00±0,00%).

Таблица 15 – Относительная площадь кровоизлияний в лёгких опытных животных

Изучаемые показатели	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*#

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

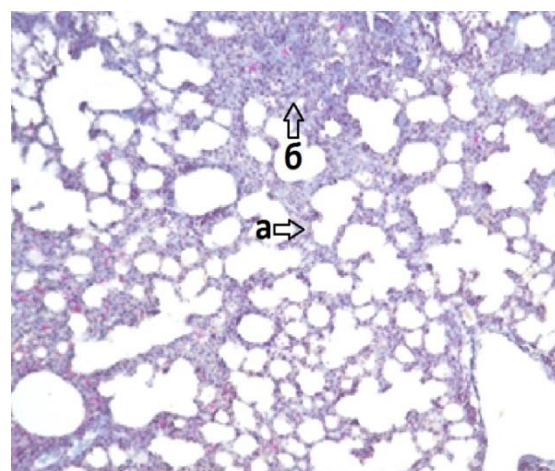
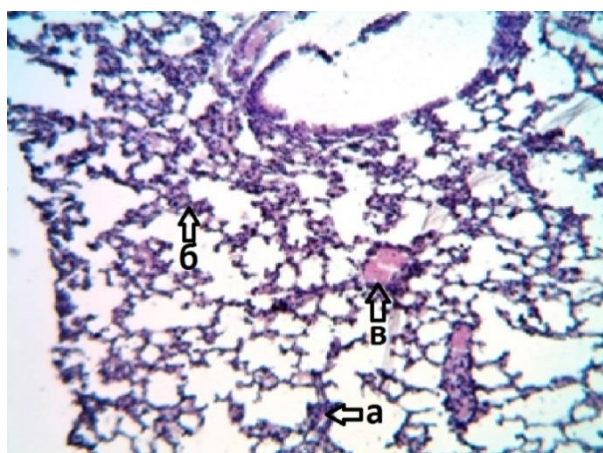
Суммарная полуколичественная оценка поражения лёгких и воспалительных проявлений (таблица 16) показала наличие значимых различий между группами №№ 2 и 3 на обоих сроках регистрации. В основном суть различий определялась степенью выраженности воспалительного компонента, что продемонстрировали результаты микроскопии.

Таблица 16– 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.№ 2 (n=5)	Гр.№ 3 (n=5)
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*#

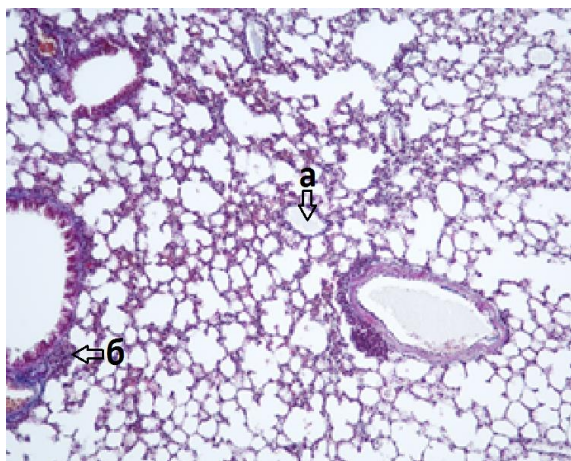
Примечание: * -p<0,05 по отношению к группе №1, # -p<0,05 по отношению к группе № 2. Группа № 1 – интактные мыши; группа № 2 – мыши, получавшие плацебо; группа № 3 – мыши, получавшие аминогуанидин

На 4-е сутки различия в количестве клеточных инфильтратов, как в альвеолах, так и в альвеолярной стенке, у животных из обеих опытных групп носили невыраженный характер (рисунки 23 и 24). Тем не менее, у животных, получавших плацебо, их было больше, чем у особей, получавших аминогуанидин. На 7-е сутки различия между опытными группами были уже существенными. Так, у животных из группы, получавшей аминогуанидин, проявления воспалительного процесса (количество клеточных инфильтратов в альвеолах и в их стенках, толщина альвеолярной стенки и выраженность отёка) были гораздо менее выраженными, чем у животных, получавших плацебо.



А: Лёгкие животных, получавших плацебо (4-е сутки). Увеличение клеточных инфильтратов (а), утолщение альвеолярных перегородок (б), наличие множества ателектазов (в).
 Б: Лёгкие животных, получавшего плацебо (7-е сутки). Увеличение толщины альвеолярных стенок (а), наличие множества ателектазов (б), «опеченение» лёгочной паренхимы (в).

Рисунок 23– Лёгкие животных, получавших плацебо на 4-е (А) и 7-е (Б) сутки после инфицирования. Окраска гематоксилин-эозином, ув.100



А: Лёгкие животных, получавших аминогуанидин (4-е сутки). Слабовыраженный альвеолярный отёк (а), увеличение количества клеточных инфильтратов (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 24 – Лёгкие животных, получавших аминогуанидин на 4-е (А) и 7-е (Б) сутки после инфицирования. Окраска гематоксилин-эозином, ув.100

Аналогичные различия касались и очагов кровоизлияний. В отличие от группы, получавшей аминогуанидин, где количество кровоизлияний было ограниченным и носило локальный характер, у животных из группы сравнения (плацебо) зачастую наблюдались обширные кровоизлияния, вплоть до формирования геморрагической пневмонии («печеночного» лёгкого).

Также, к окончанию эксперимента (14-е сутки) у инфицированных животных, получавших плацебо, в отличие от животных, получавших аминогуанидин, чаще наблюдались зоны замещения повреждения ткани паренхимы лёгких на фиброзную.

Сравнительная оценка динамики изменения массы и температуры тела не выявила значимых межгрупповых различий. Данные представлены на рисунках 25 и 26.

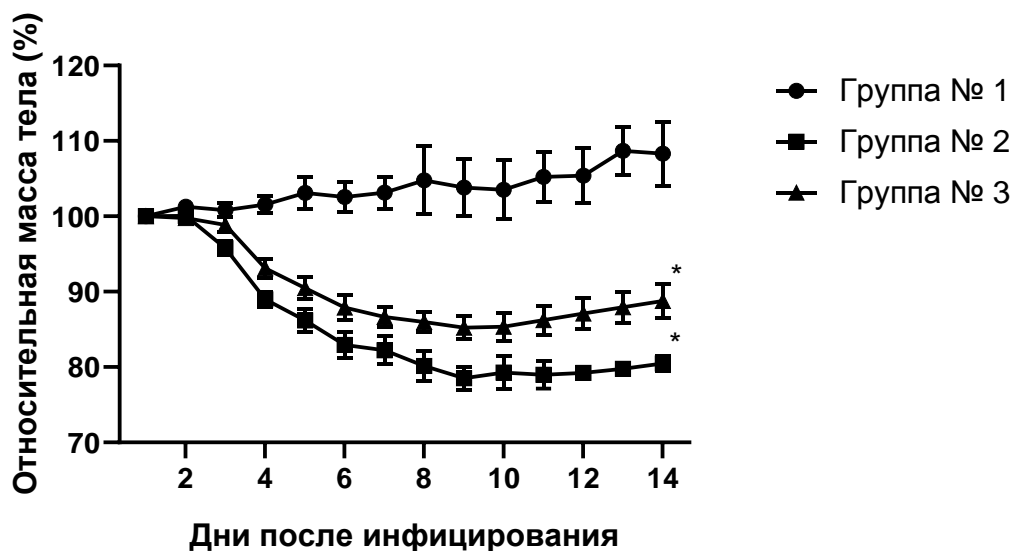


Рисунок 25 – Величина массы тела в течение эксперимента (Mean±SE, %).

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 аминогуанидин.

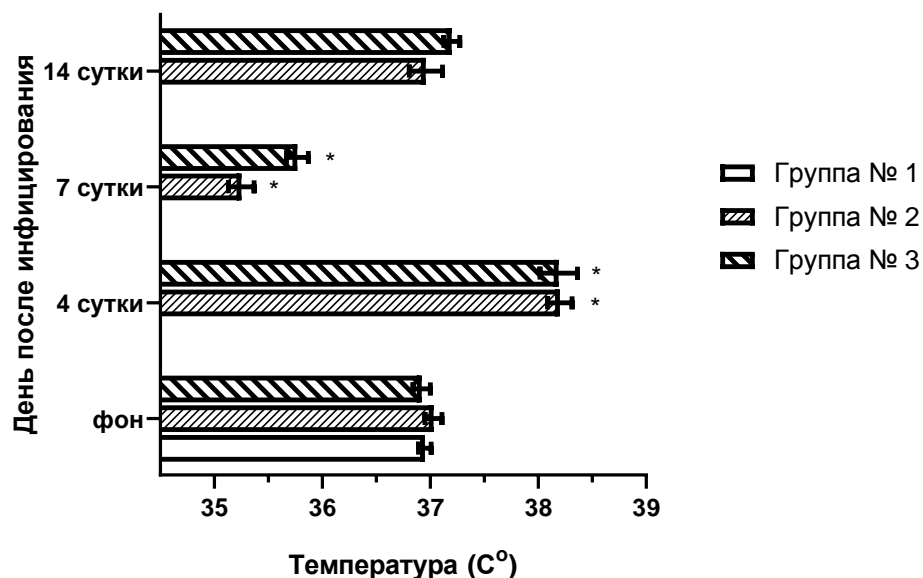


Рисунок 26 - Величина температуры тела в течение эксперимента (Mean±SE, °C).

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.

Заключение по разделу.

Полученные результаты показали, что блокатор накопления КПП аминоксидина бикарбонат способствует коррекции степени тяжести ОПЛ, снижая уровень летальности в 2 раза, повышая величину сатурации гемоглобина кислородом на 15%, ограничивая площадь кровоизлияния в легких и степень альтерации лёгочной паренхимы (на 35% и 20%, соответственно).

Полученные результаты явились основанием для формулирования вывода 4.

Таким образом, было выявлено отягощение течения ОПЛ вирусного генеза под влиянием соединения, способствующего накоплению КПП (раздел 3.2.1.), а ингибитор накопления данных агрессивных продуктов аминоксидин продемонстрировал высокую эффективность в отношении коррекции степени повреждения легких и воспалительного процесса (раздел 3.2.2).

Полученные данные послужили основанием для дальнейшего изучения терапевтической активности аминоксидина уже в условиях преморбидного фона в виде экспериментального СД. Выбор модели преморбидной патологии был обусловлен данными клинических и экспериментальных исследований, посвященных роли КПП в течении СД и формировании осложнений болезни, а также тем, что наличие СД является отягощающим фактором при гриппозной инфекции.

3.3. Влияние аминоксидина на течение ОПЛ, вызванного вирусом A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09, у мышей со сформированным СД

Перед началом эксперимента было проведено определение LD₅₀ штамма вируса гриппа по методике Рида-Менча на 20 беспородных мышках самках. Расчетная величина 1 ЛД₅₀ составила 3,5 lg ЭИД₅₀.

В предварительном эксперименте 130 мышам самкам был введен диабетоген аллоксана моногидрат в дозе 180 мг/кг п/к однократно с целью отбора в опытные группы необходимого количества животных (120 особей) для дальнейшего исследования. Моделирование АИСД осуществляли согласно разделу 2.2.12.

Критерием включения животных в эксперимент являлось увеличение уровня глюкозы в цельной крови более чем в 2,5 раза (с 6,14±0,16 до 22,08±0,49 ммоль/л).

Дальнейшие эксперименты были выполнены на 175 аутбредных мышках самках.

Животные были разделены на 4 группы: группа № 1 – интактные животные, N=15; группа № 2 – позитивный контроль № 1 (инфицированные мыши без преморбидной патологии, получавшие плацебо), N=40; группа № 3 – позитивный контроль № 2 (инфицированные мыши с АИСД, получавшие плацебо), N=60; группа № 4 – инфицированные мыши с АИСД, получавшие аминоксидин, N=60.

Аминоксидина бикарбонат в дозе 25 мг/кг вводили ежедневно п/к в течение 7 дней после инфицирования. Животных инфицировали вирусом гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 в расчетной дозе ЛД₅₀, определенной до начала эксперимента. Животные во 2-ой, 3-ей и 4-ой группах были разделены на равные подгруппы, аналогично изложенному в пункте 3.1. Забор биоматериала проводили по той же схеме.

Изучение уровня КПП в легких показало, что наличие СД у животных обусловило значимый рост данных продуктов в сравнении с мышками, не имевшими преморбидной патологии. Данные представлены на рисунке 27.

Применение аминогуанидина в данных условиях эксперимента способствовало ограничению роста КПП в лёгких у мышей с преморбидной патологией на обоих сроках регистрации, по сравнению с животными с экспериментальным СД, получавшими плацебо.

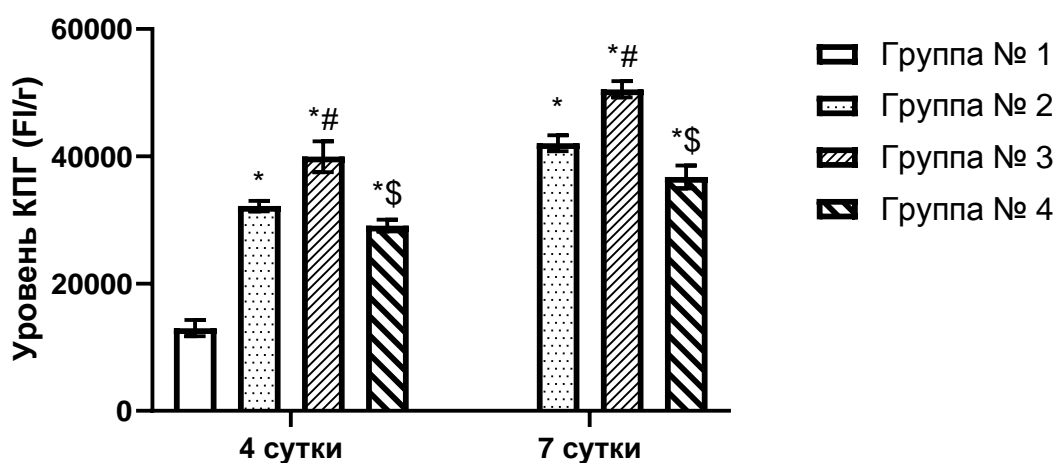


Рисунок 27 – Уровень КПП в ткани лёгких, оцененный по величине флуоресценции (Mean±SE, Ед/г)

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 АИДС, получавшие плацебо; группа №4 – инфицированные мыши с АИДС, получавшие аминогуанидин.

Наличие сформированного АИДС обусловило отягощение выраженности ОПЛ, что характеризовалось увеличением летальности, падением уровня насыщения гемоглобина крови кислородом, степенью выраженности воспалительной реакции и тяжести поражения легочной паренхимы в сравнении с инфицированными животными без преморбидной патологии.

Применение блокатора накопления КПП привело к ограничению летальности, коррекции степени гипоксемии, выраженности воспалительного ответа (по показателям содержания маркерных гематологических показателей и

провоспалительных цитокинов в легких) и повреждения лёгочной паренхимы по отношению к животным с АИСД, получавших плацебо.

Так, общая выживаемость в течение всего периода наблюдения у животных без преморбидной патологии составила 50%. У животных с АИСД, получавших плацебо – 20% и, получавших аминоксантидин – 65%. Различия носили значимый характер. Данные представлены на рисунке 30.

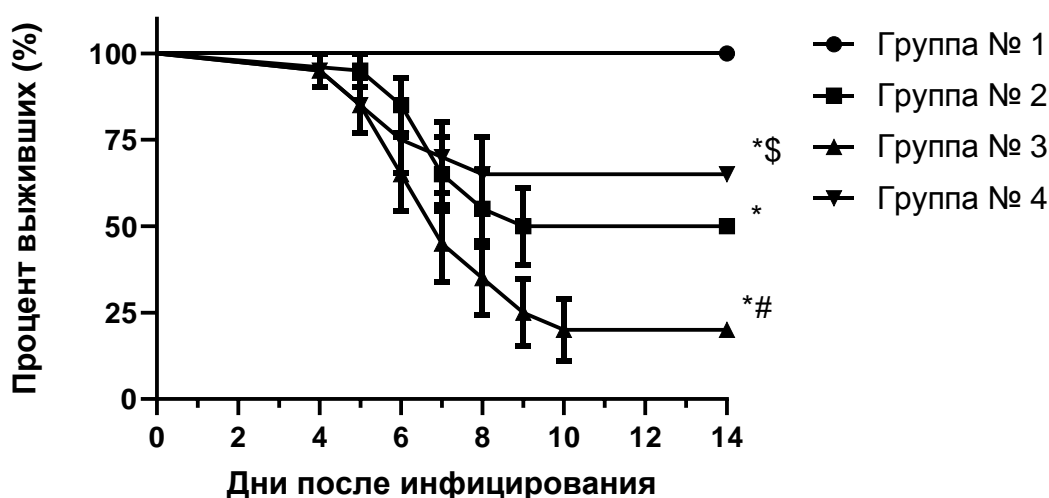


Рисунок 28 – График кривых выживаемости Каплана-Мейера (Mean±SE, %)

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 АИСД, получавшие плацебо; группа №4 – инфицированные мыши с АИСД, получавшие аминоксантидин.

Изучение уровня сатурации гемоглобина крови кислородом (рисунок 29) показало, что у мышей с фоновым АИСД имело место существенное снижение уровня данного показателя по отношению к животным без преморбидной патологии. При этом если на 4-е сутки данные различия имели характер тенденции ($65,60 \pm 1,01$ и $59,00 \pm 0,89$ % для групп №№ 2 и 3, соответственно), то на 7-е сутки наблюдаемая разница носила значимый характер ($48,80 \pm 0,95$ и $40,80 \pm 0,80$ %, $p < 0,05$ для групп №№ 2 и 3, соответственно). У интактных

животных уровень сатурации гемоглобина кислородом колебался в пределах от $88,80 \pm 0,83$ до $92,00 \pm 0,75\%$ в течение эксперимента.

Введение аминоксидина способствовало ограничению падения уровня сатурации гемоглобина кислородом у инфицированных мышей с преморбидной патологией. Так на 4-е сутки у мышей, получавших аминоксидин, степень насыщения гемоглобина кислородом была несколько выше в сравнении с мышами с АИДС, получавших плацебо. Дальнейшее наблюдение (7-е сутки) указало уже на значимые различия в сравнении данного показателя ($40,80 \pm 0,80$ и $59,00 \pm 2,09\%$ у мышей с АИДС, получавших плацебо и аминоксидин, соответственно, $p < 0,05$).

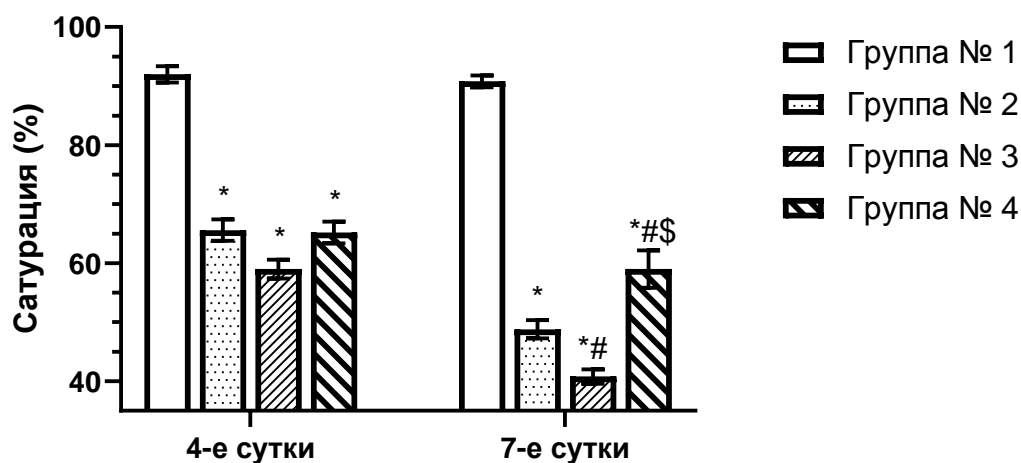


Рисунок 29 – Величина уровня сатурации гемоглобина крови кислородом (Mean \pm SE, %).

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 аминоксидин.

Сравнительное исследование ряда маркерных гематологических показателей продемонстрировало, что у животных с АИДС наблюдались значимые различия по сравнению с группой инфицированных мышей без преморбидной патологии в отношении выраженности лимфопении, нейтрофиллеза, а также величины ЛГИ.

Данные приведены на рисунках 32-36. Характер выраженной тенденции носили и различия в содержании моноцитов. Со стороны красной крови у инфицированных животных в обеих группах имело место выраженное увеличение количества тромбоцитов, превалировавшее у мышей с АИДС, особенно при регистрации на 4-е сутки эксперимента.

У животных, получавших аминогуанидин, по сравнению с животными, получавшими плацебо при преморбидной патологии, были выявлены существенные различия в отношении показателей относительного содержания лимфоцитов (рисунок 30) и сегментоядерных нейтрофилов (рисунок 31), и, соответственно, величины ЛГИ (рисунок 32), а также содержания тромбоцитов (рисунок 33).

На 7-е сутки после инфицирования было отмечено дальнейшее ограничение падения относительного уровня лимфоцитов, индекса ЛГИ, и роста относительного уровня с/я нейтрофилов.

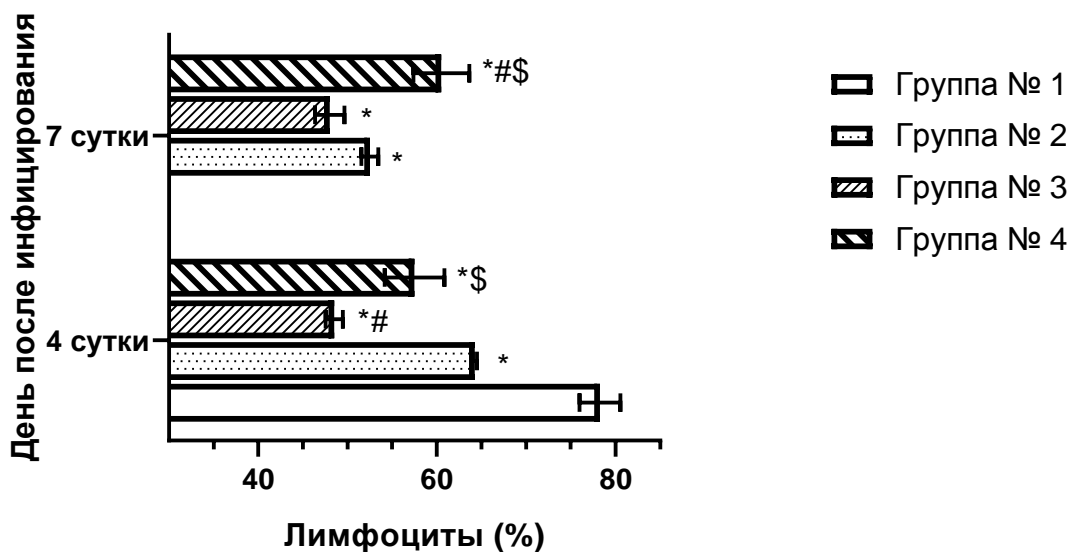


Рисунок 30 – Уровень относительного содержания лимфоцитов (Mean±SE, %).

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.

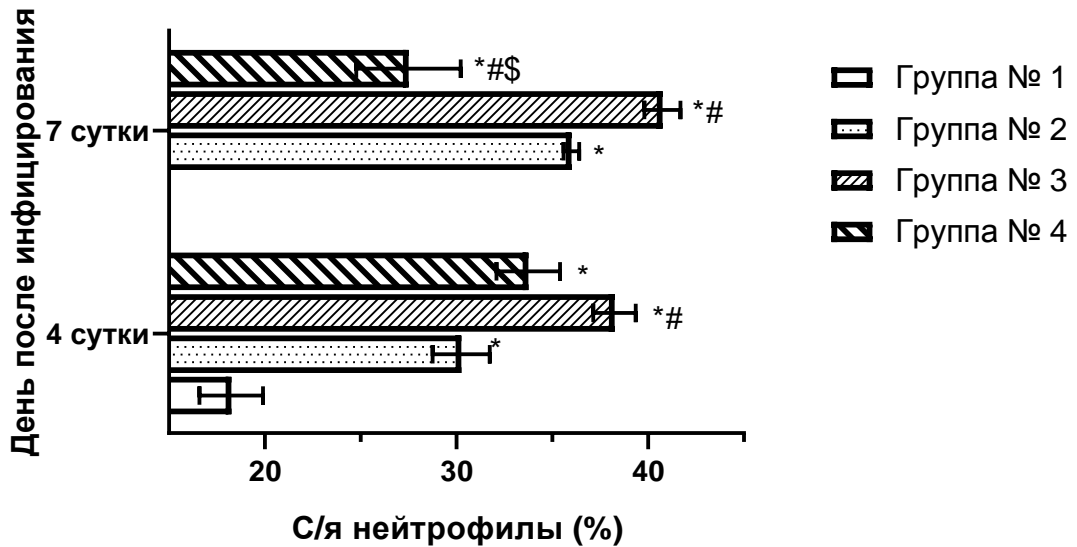


Рисунок 31 – Уровень относительного содержания сегментоядерных нейтрофилов (Mean±SE, %).

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.

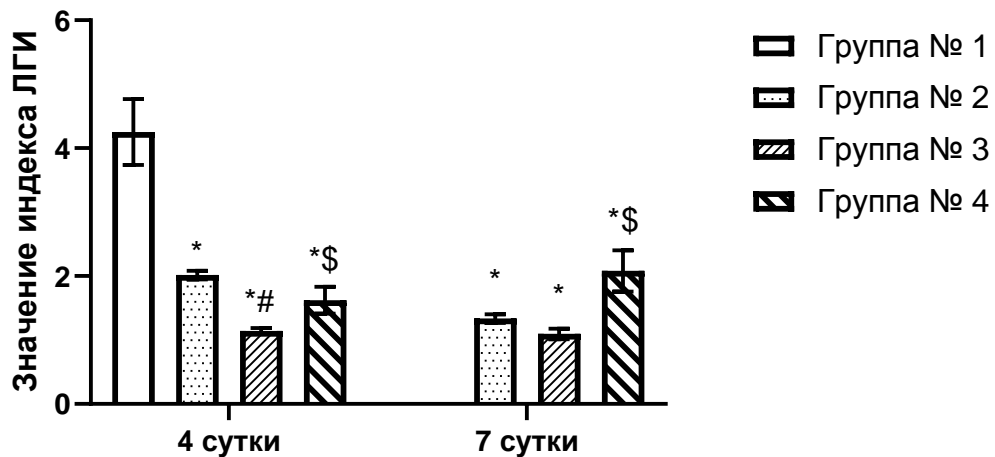


Рисунок 32 – Величина ЛГИ (Mean±SE).

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.

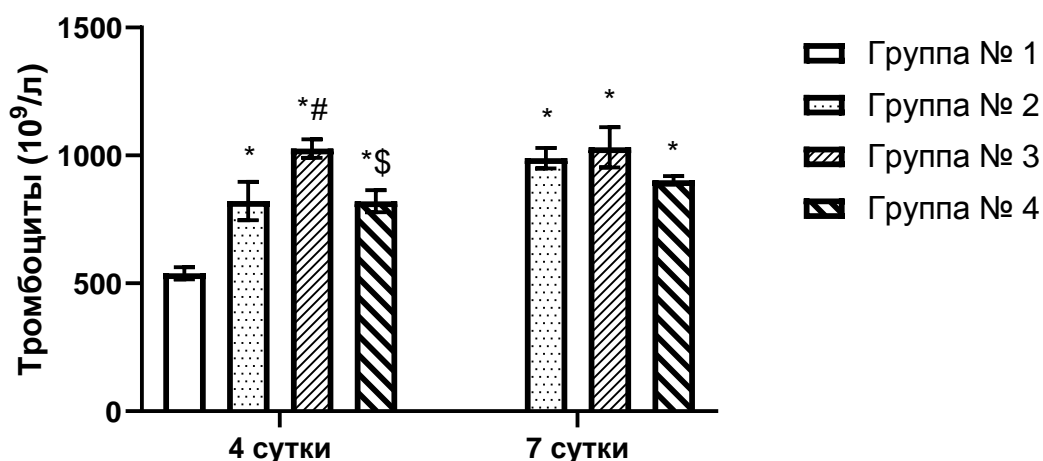


Рисунок 33 – Уровень абсолютного содержания тромбоцитов (Mean±SE, 10⁹/л).

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.

Остальные данные гематологического анализа представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Показатели морфологического состава крови (Mean±SE)

Изучаемые показатели	Гр.№ 1 (n=15)	Экспериментальные 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)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,18± 0,27	6,58± 0,55*	6,11± 0,55*	6,33± 0,22*	4,19± 0,06*	4,24± 0,53*	5,24± 0,32*
Моноциты, %	1,75± 0,25	2,00± 0,41	4,50± 0,29	2,75± 0,25	3,25± 0,63	3,75± 0,63	4,00± 0,41
Базофилы, %	0,25± 0,25	0,25± 0,25	2,50± 0,29*#	1,25± 0,48	1,25± 0,25	2,50± 0,87	1,50± 0,29

Окончание таблицы 17

Эозинофи- лы, %	0,75± 0,25	1,50± 0,50	2,00± 0,71	2,25± 0,63	3,50± 0,29*	1,50± 0,29#	3,50± 0,29*\$
П/я нейтро- филы, %	0,75± 0,25	1,75± 0,63	4,25± 0,63	2,50± 0,87	3,25± 0,85	3,50± 1,04	3,00± 0,41
Эритроци- ты, 10 ¹² /л	8,50± 0,40	9,46± 0,27	8,07± 0,61	9,61± 0,64	10,44± 0,36	9,26± 0,44	9,71± 0,27
Гемогло- бин, г/л	135,00± 7,56	105,09± 34,63	129,25± 7,12	139,00± 10,70	143,00± 6,34	140,50± 5,24	138,50± 8,63
Примечание: П/я - палочкоядерные, С/я - сегментоядерные. * – 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							

У всех инфицированных животных содержание провоспалительных цитокинов в лёгких было значимо выше, чем у интактных животных (рисунки 34, 35). У мышей с АИДС уровни TNF- α , IL-6 и IL-1 β превышали соответствующие показатели у инфицированных животных без преморбидной патологии (в 1,4; 1,5 и 1,5 раза, соответственно) на 4-е сутки эксперимента и (в 1,3; 1,1 и 1,4 раза, соответственно) на 7-е сутки.

У животных, получавших аминогуанидин, концентрация TNF- α , IL-6 и IL-1 β в легких была на значимо более низком уровне, по сравнению с мышами, получавшими плацебо, на обоих сроках исследования. По окончании исследования уровень TNF- α составлял 20,68±2,33, 17,60±2,87 и 17,80±3,06 пг/г; IL-6 – 314,60±20,06, 274,40±21,37 и 214,24±19,96 пг/г; IL-1 β – 277,16±37,56 и

289,40±42,21 и 271,00±8,11 пг/г у инфицированных животных из групп №№ 2, 3, 4, соответственно.

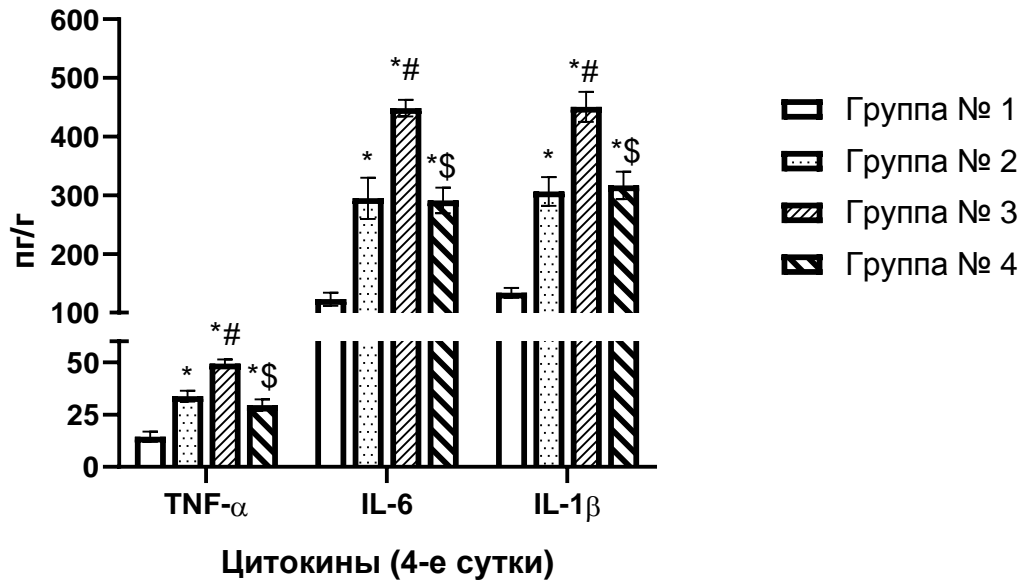


Рисунок 34 – Показатели уровня провоспалительных цитокинов в легких на 4-е сутки после инфицирования (Mean±SE, пг/г)

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 АИДС, получавшие плацебо; группа № 4 – инфицированные мыши с АИДС, получавшие аминогуанидин.

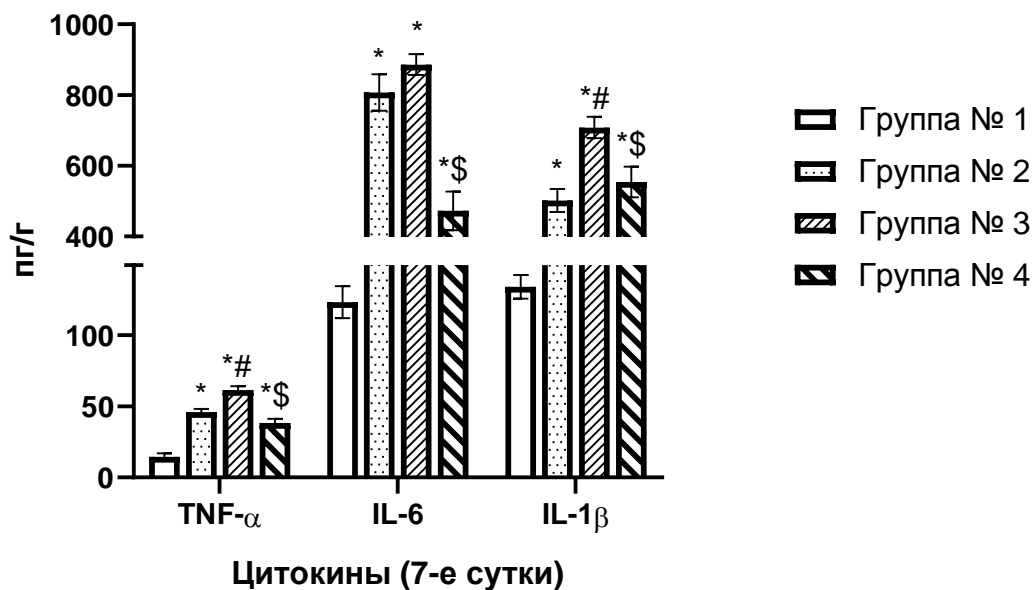


Рисунок 35 – Показатели уровня провоспалительных цитокинов в легких на 7-е сутки после инфицирования (Mean \pm SE, пг/г)

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 АИДС, получавшие плацебо; группа № 4 – инфицированные мыши с АИДС, получавшие аминогуанидин.

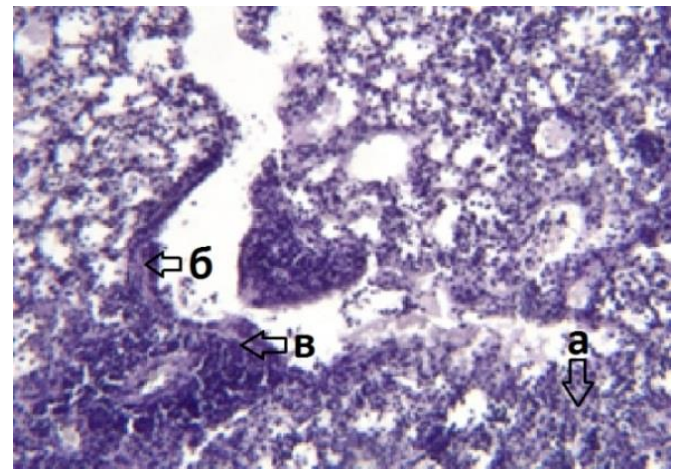
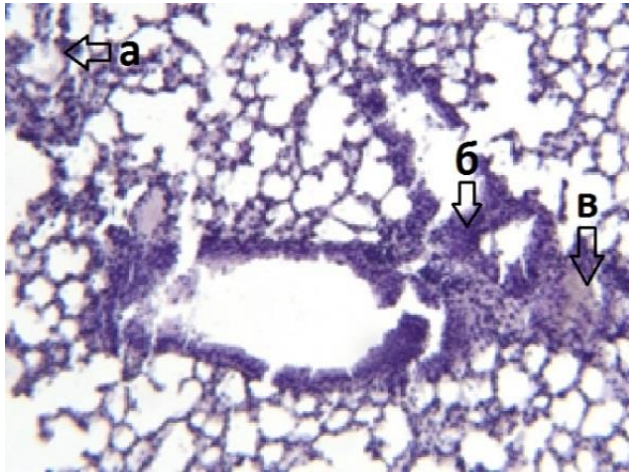
Гистологическое исследование продемонстрировало, что у животных с АИДС выраженность изменений в легочной паренхиме была существенно значительней, чем у животных без фоновой патологии. Так, к 4-ым суткам у инфицированных животных было выявлено развитие альвеолярного отёка, альтерация лёгочной паренхимы и увеличение количества клеточных инфильтратов, при этом у мышей с АИДС выраженность наблюдаемых морфологических изменений была значимо выше по отношению к инфицированным мышам без преморбидной патологии.

К 7-м суткам наблюдения различия между опытными группами носили еще более существенный характер, особенно в отношении изменений, характерных для воспалительного процесса (рост клеточных инфильтратов, количество

отёчных альвеол и увеличение толщины альвеолярной стенки). Результаты гистологического исследования представлены на рисунках 36 и 37.

Изучение влияния аминогуанидина на данные показатели тяжести ОПЛ продемонстрировало, что на 4-е сутки после инфицирования, характерные для течения ОПЛ признаки (наличие альвеолярного отёка, гиалиновых мембран, клеточных инфильтратов и утолщение альвеолярной стенки, белкового дебриса, оголение базальной мембраны реснитчатого эпителия), были несколько менее выражены у мышей, получавших блокатор КППГ, чем у животных получавших плацебо при преморбидной патологии. По истечении 7-ми суток у инфицированных животных отмечали прогрессирование степени тяжести ОПЛ, что заключалось в увеличении площади альвеолярного отёка, присутствии множественных ателектазов и кровоизлияний, что в совокупности с альтерацией лёгочной паренхимы привело к формированию «печеночного» лёгкого. При этом у мышей с АИСД, получавших аминогуанидин, выраженность данных проявлений и частота встречаемости была ниже, чем у инфицированных мышей, получавших плацебо, у которых, в том числе, имели место массивные кровоизлияния. Результаты представлены на рисунке 38.

По окончании эксперимента (14-е сутки наблюдения) у животных из всех опытных групп наблюдалось замещение повреждённой легочной паренхимы на соединительную ткань.



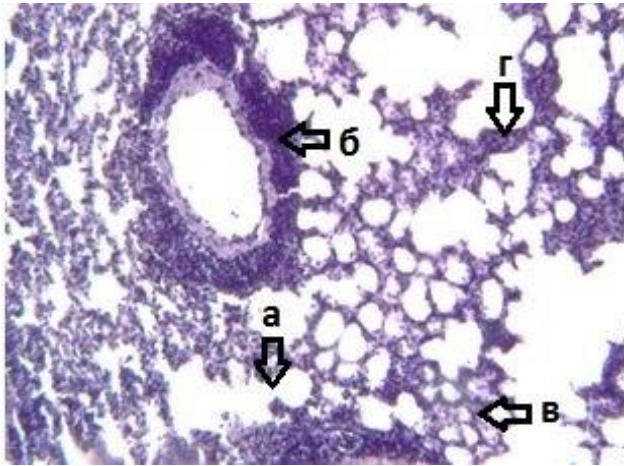
А: Лёгкие инфицированного животного без премобидной патологии, получавшего плацебо.

Отмечено наличие отёчных альвеол (а), клеточных инфильтратов (б) и гиалиновых мембран (в).

Б: Лёгкие инфицированного животного без премобидной патологии, получавшего плацебо.

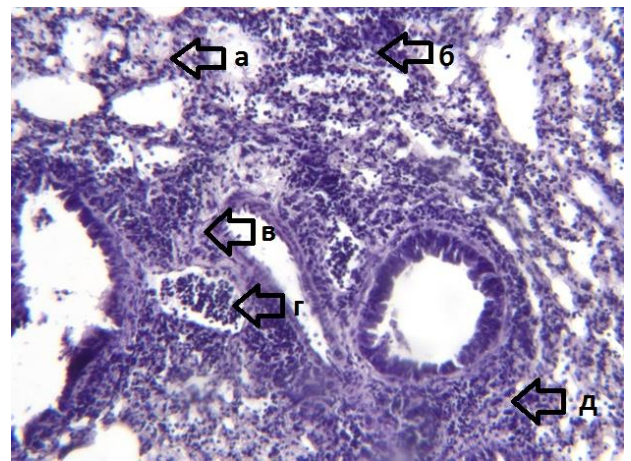
Присутствуют множественные ателектазы (а), гиалиновые мембраны (б), альтерация лёгочной паренхимы вплоть до «опеченения» лёгких (в).

Рисунок 36–Лёгкие инфицированных животных, получавших плацебо, на 4-е (А) и 7-е (Б) сутки после инфицирования. Окраска гематоксилин-эозином, ув.100.



А: Лёгкие инфицированного животного с АИСД, получавшего плацебо.

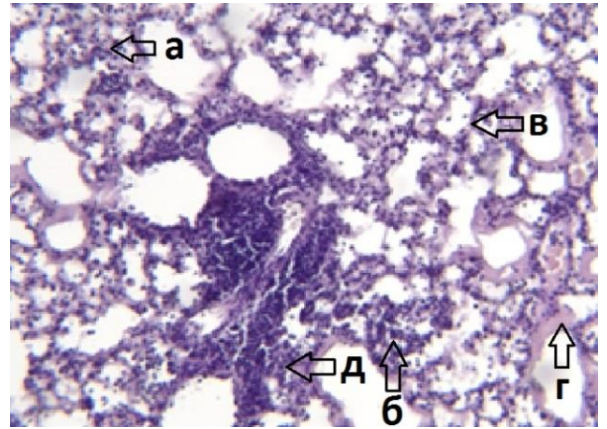
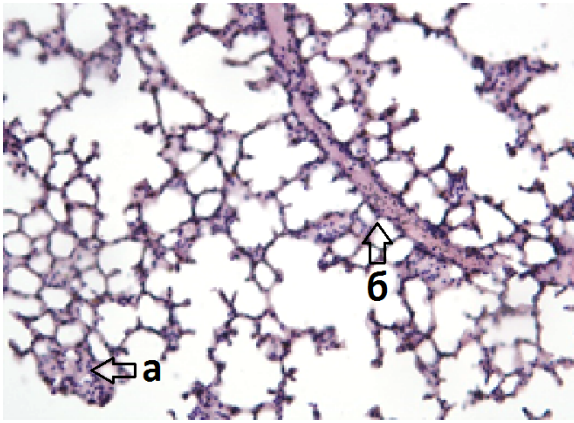
Наличие белкового дебриса в просвете альвеол (а), клеточных инфильтратов (б), развитие альвеолярного отёка (в) и утолщение альвеолярных стенок (г).



Б: Лёгкие инфицированного животного с АИСД, получавшего плацебо .

Наблюдалось развитие альвеолярного отёка (а), увеличение количества клеточных инфильтратов (б), наличие гиалиновых мембран (в); множественные геморрагии(г) и альтерация лёгочной паренхимы вплоть до «опеченения» лёгких (д).

Рисунок 37 – Лёгкие инфицированных животных с АИСД, получавших плацебо, на 4-е (А) и 7-е (Б) сутки после инфицирования. Окраска гематоксилин-эозином, ув.100.



А: Лёгкие инфицированного животного с АИСД, получавших аминогуанидин. Развитие альвеолярного отёка (а), полнокровие капилляров лёгких (б).

Б: Лёгкие инфицированного животного с АИСД, получавших аминогуанидин.

Наблюдался отёк альвеолярной стенки (а), множественные ателектазы (б), лейкоциты в просвете альвеол (в), гиалиновые мембраны (г) и утолщение альвеолярных стенок (а). Отмечено «опеченение» лёгочной паренхимы (д).

Рисунок 38 – Лёгкие инфицированных животных с АИСД, получавших аминогуанидин, на 4-е (А) и 7-е (Б) сутки после инфицирования. Окраска гематоксилин-эозином, ув.100.

Проведённое сравнительное патоморфологическое исследование (рисунок 39) указало на прогрессивный рост относительной площади кровоизлияний в лёгких инфицированных животных. При этом у мышей с АИСД, получавших аминогуанидин, данный показатель был несколько ниже по отношению к животным из других опытных групп. Кровоизлияний в лёгких интактных животных не наблюдалось ($0,00 \pm 0,00\%$).

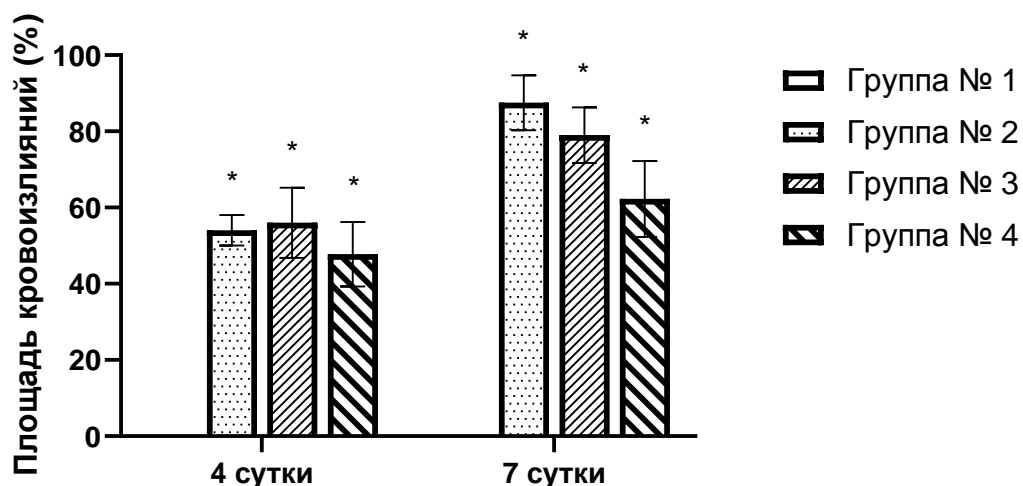


Рисунок 39 – Относительная площадь кровоизлияний в паренхиме лёгких (Mean±SE, %)

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к интактным животным (группа №1).

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.

Суммарная полуколичественная оценка повреждения лёгочной паренхимы показала наличие значимых различий между инфицированными животными без преморбидной патологии и при наличии АИДС на обоих сроках регистрации (рисунки 40, 41). Отмечено, что на 4-е сутки в основе различий между данными группами инфицированных животных лежал вклад воспалительной составляющей повреждения лёгочной паренхимы.

Применение аминогуанидина способствовало ограничению поражения лёгочной паренхимы по сравнению с особями, получавшими плацебо. Так, суммарная полуколичественная оценка показала наличие значимых различий между группами 3 и 4 на обоих сроках регистрации. При этом в основе данного процесса лежала степень выраженности воспалительного компонента, что продемонстрировали результаты микроскопии. Поражений в лёгких интактных животных не наблюдали ($0,03 \pm 0,00$ балла при полуколичественной оценке

поражения лёгких и $0,02 \pm 0,00$ балла при полуколичественной оценке воспалительной составляющей).

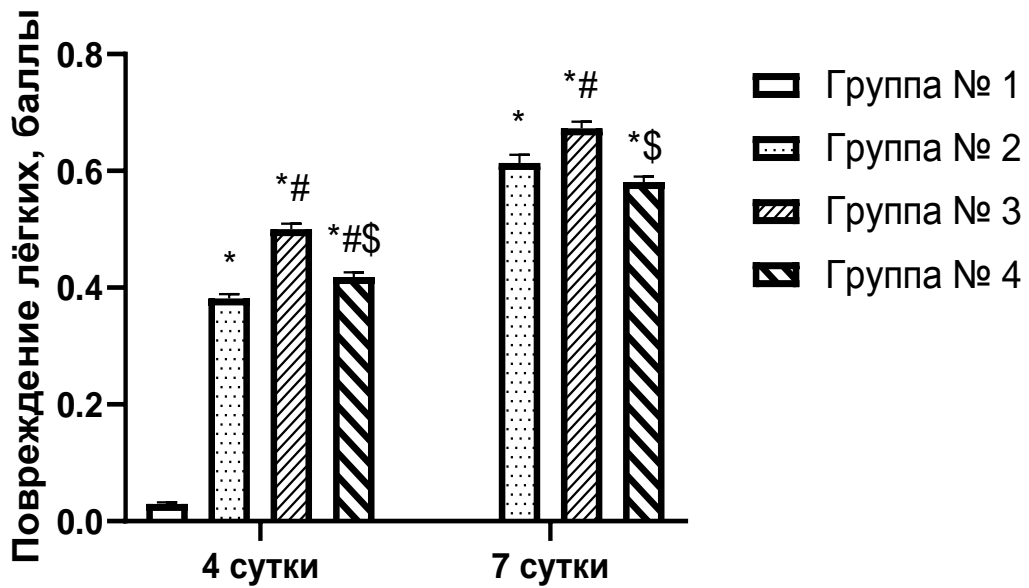


Рисунок 40 – Суммарная полуколичественная оценка повреждения лёгочной паренхимы (Mean±SE, %)

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.

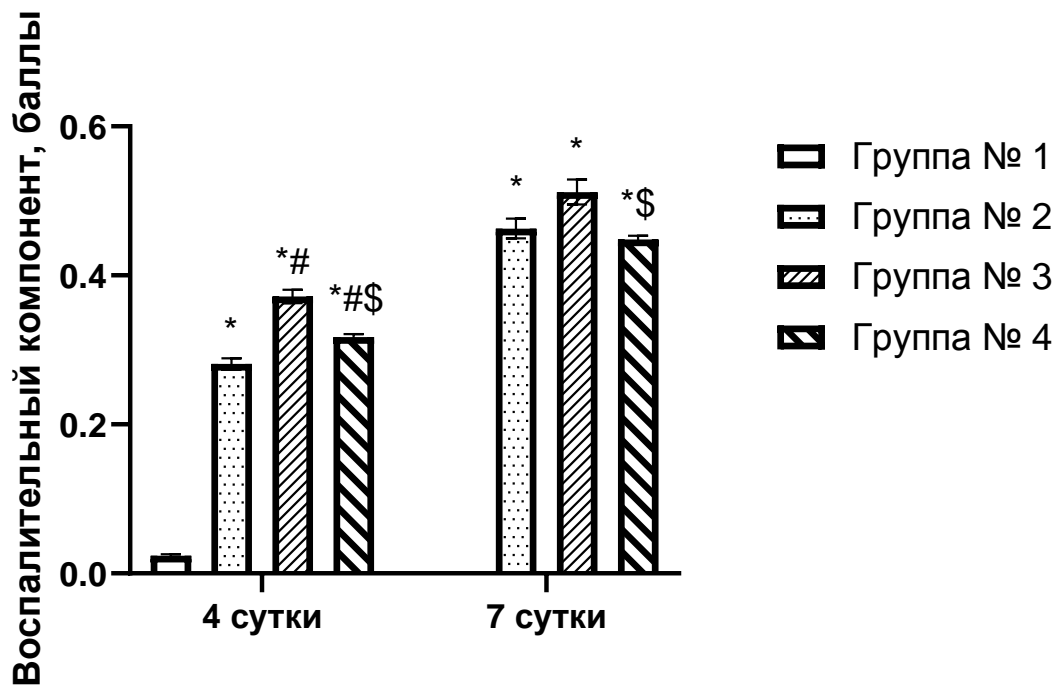


Рисунок 41 – Полуколичественная оценка воспалительного компонента повреждения лёгочной паренхимы (Mean±SE, %)

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.

Оценка динамики клинической картины массы, и температуры тела у инфицированных животных из всех опытных групп не выявила значимых различий. Данные представлены на рисунках 42 и 43.

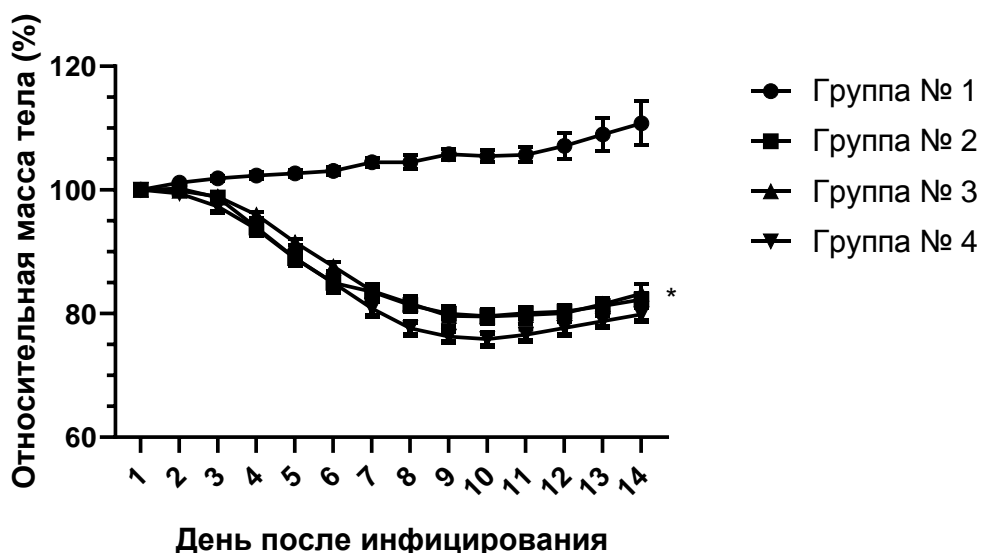


Рисунок 42 – Величина массы тела в течение эксперимента (Mean±SE, %).

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к интактным животным (группа №1).

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.

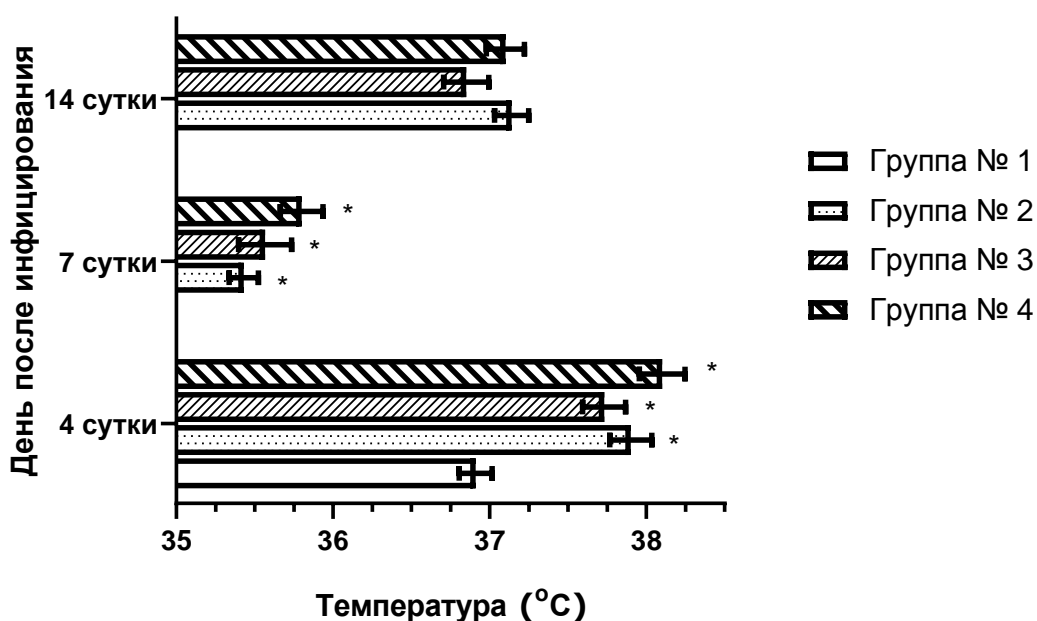


Рисунок 43– Величина температуры тела в течение эксперимента (Mean±SE, °C).

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к интактным животным (группа №1).

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.

Полученные в настоящем разделе исследования данные показали, что, у животных с преморбидной патологией, наряду с утяжелением клинической картины ОПЛ, имело место и значимое увеличение уровня КПП в легких по сравнению с животными без сопутствующего заболевания неинфекционной природы. Применение блокатора образования конечных продуктов гликирования и в условиях фоновой патологии позволило ограничить развитие провоспалительного ответа и снизить степень структурных нарушений в эпителиоцитах респираторного тракта, обусловленных прямым деформирующим действием реактивных карбонильных продуктов на клеточную мембрану.

Заключение по разделу.

Таким образом, наличие сопутствующего аллоксан-индуцированного СД является отягощающим фактором в развитии ОПЛ у зараженных вирусом A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 мышей (повышение уровня летальности в 2 раза, снижение степени сатурации гемоглобина крови на 10%, рост повреждения лёгочной паренхимы на 20%, увеличение концентрации TNF- α в 1,6 раза, IL-6 в 1,4 раза, IL-1 β в 1,4 раза в лёгких и падение величины лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса в крови в 2 раза) на фоне исходно повышенного уровня КПП на 20% по отношению к животным без преморбидной патологии.

В свою очередь, применение блокатора накопления КПП позволило ограничить выраженности течения данной комбинированной патологии, что характеризовалось снижением уровня летальности на 45%, ограничением падения сатурации гемоглобина кислородом на треть и выраженности повреждения лёгочной паренхимы на 15%, снижением содержания провоспалительных цитокинов TNF- α на 55%, IL-6 на 50% и IL-1 β на 30% в лёгких, восстановление величины лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса на 50 %, наряду с ограничением роста уровня КПП в лёгких на 25%.

Полученные результаты явились основанием для формулирования выводов 5 и 6.

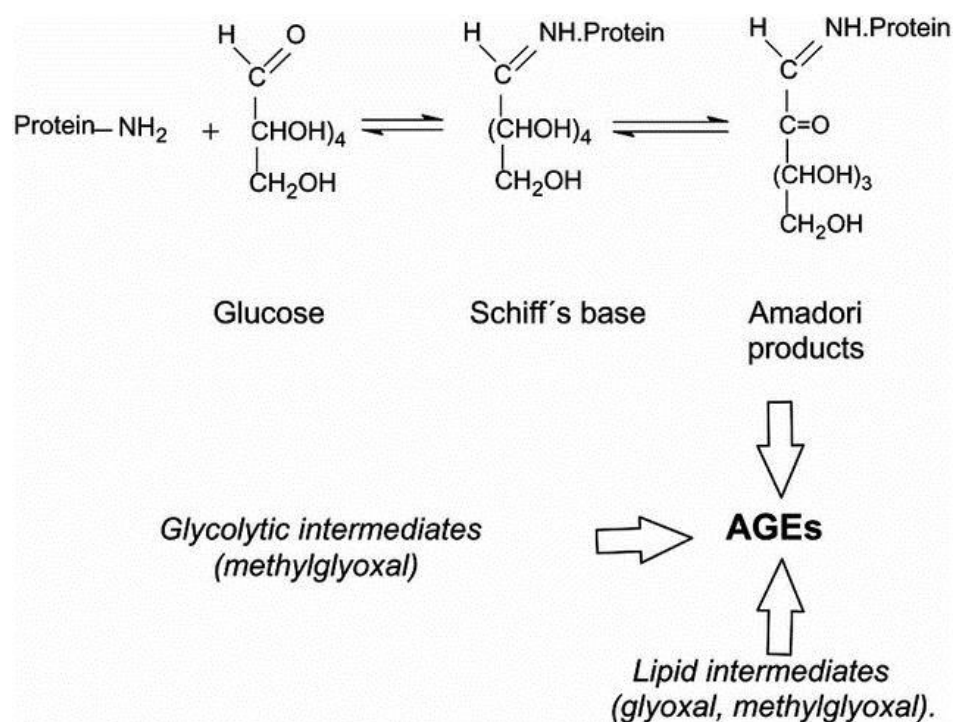
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных, полученных нами при заражении мышей самок штаммами вируса гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2) в дозах ЛД₅₀, продемонстрировал, что у опытных животных происходило прогрессивное накопление КПП в лёгких и развивалось ОПЛ, характеризовавшееся наличием совокупности таких типовых показателей, как падение уровня сатурации гемоглобина крови кислородом, диффузное альвеолярное повреждение легких с повышением числа воспалительных клеточных инфильтратов в альвеолярной стенке и просвете альвеол, формированием ателектазов и увеличением толщины альвеолярных перегородок (морфологический субстрат ОПЛ/ОРДС), присутствием гиалиновых мембран (ключевой признак ОПЛ/ОРДС), наличием в легких очагов кровоизлияний [311; 312]. О процессе воспаления, являющегося одним из основных патогенетических факторов данной патологии, свидетельствовали характерные изменения лейкоцитарной формулы крови и повышенные уровни провоспалительных цитокинов в легких [172].

Проведение корреляционного анализа выявило наличие обратной зависимости между изменением концентрации КПП и степенью падения насыщения гемоглобина крови кислородом ($r^2 = -0,8651$ и $r = -0,8815$); прямой зависимости по отношению к выраженности повреждения лёгких ($r^2 = 0,7012$ и $r^2 = 0,731$) и уровню провоспалительных цитокинов в легких (TNF- α , $r^2 = 0,6585$ и $r^2 = 0,8389$; IL-6, $r^2 = 0,7939$ и $r^2 = 0,8909$; IL-1 β , $r^2 = 0,8303$ и $r^2 = 0,9301$) у мышей, инфицированных A/California/07/2009MA и A/Aichi/2/68MA, соответственно.

Выявленная значимая корреляционная зависимость позволила сформулировать постулат о патогенетическом значении накопления данных агрессивных молекул в развитии ОПЛ вирусного генеза. Подтверждением этого служит то, что первично в основе развития дыхательной недостаточности при ОПЛ/ОРДС вирусного генеза лежит непосредственное повреждение

альвеолоцитов инфекционным агентом, приводящее к снижению транспорта кислорода в кровь [313]. Последнее ведет к нарушению активности кислород-зависимых ферментов, участвующих в утилизации углеводов в клетках, и, тем самым, к преобладанию неферментативного пути обмена глюкозы, являющегося основным путем образования КПП и их предшественников [314; 315]. Предшественники КПП, при взаимодействии с аминокислотами белков, липо- и гликопротеинов клетки, оказывают на них повреждающее действие путём образования ковалентной связи через формирование оснований Шиффа с последующей изомеризацией до продуктов Амадори, что обуславливает развитие нарушений функциональной активности клеток, в данном случае, альвеолоцитов [316]. При этом повреждающее действие КПП имеет место в отношении всего пула последних, в том числе, и не вовлеченных в инфекционный процесс [152; 317].



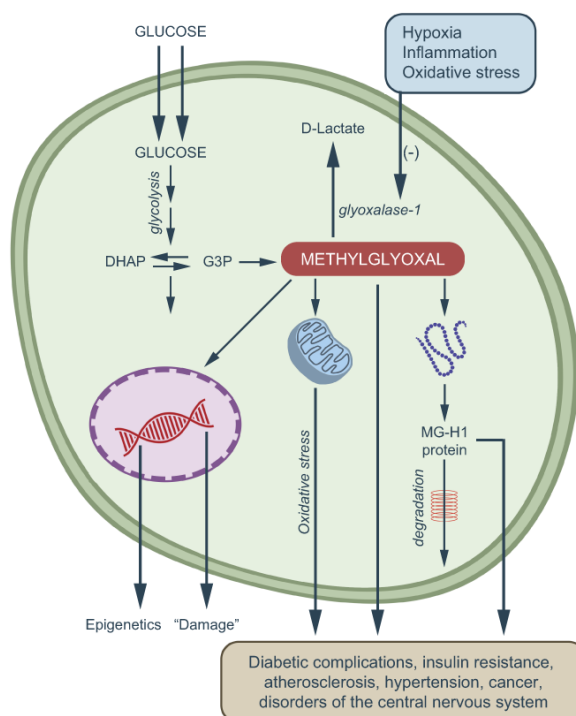
Механизм образования КПП. Цитируется по Rojas A. et al. [318].

Помимо вышеописанного, немалая роль придается модификации структуры гемоглобина под действием КПП. В ее основе лежит схожий механизм образования ковалентных связей, что и при воздействии на альвеолоциты.

Происходящие изменения приводят к нарушению транспортной функции гемоглобина и развитию тканевой гипоксии [319]. Высокая концентрация КПП оказывает повреждающее действие и на клетки эндотелия сосудов. В основе механизма данного эффекта лежит нарушение внутриклеточной ферментативной активности синтазы оксида азота путём ограничения экспрессии генов, кодирующих данный фермент. Последнее обуславливает снижение продукции оксида азота - основного компонента, обеспечивающего вазодилатацию сосудов, что ведет к прогрессирующему сужению их просвета и падению транспорта эритроцитов по кровяному руслу [154; 320]. В результате развивается тканевая гипоксия, что способствует дальнейшему усилению неферментативного пути утилизации глюкозы и образованию КПП по механизму «порочного круга» [314; 320]. Что касается системной воспалительной реакции, то значимая роль КПП в индукции процесса воспаления была убедительно показана как в экспериментальных исследованиях, так и в клинических [139; 161, 162,].

С целью подтверждения провокационной роли КПП в формировании ОПЛ вирусного генеза нами было изучено влияние основного их предшественника МГ на течение патологии у мышей, зараженных вирусом гриппа A/California/07/2009МА в дозе 1 ЛД₅₀. Известно, что МГ, являясь предшественником образования КПП, ковалентно связывается с аминокетильными группами белков, липо- и гликопротеинов [134; 325].

В основе индукции воспаления, вызванного МГ, лежит его прямое повреждающее действие на клетку (Рисунок 47).



Повреждающее действие МГ на клетку. Цитируется по Schalkwijk C. et al. [326].

В основе данного процесса лежит как способность МГ формировать ковалентные связи с аминокислотами белков, липо- и гликопротеинов клетки, так и запускать окислительный стресс в клетках [201].

В условиях наших экспериментов было выявлено негативное влияние МГ на течения ОПЛ по сравнению с позитивным контролем (мыши, зараженные A/California/07/2009MA и получавшие до инфицирования плацебо) по показателям уровня летальности, падения величины сатурации гемоглобина кислородом и степени выраженности морфологических изменений лёгочной паренхимы. Подтверждением усугубления процесса воспаления был рост уровня провоспалительных цитокинов в лёгких: TNF- α в 1,6 раза, IL-6 в 1,3 раза и IL-1 β в 1,3 раза, а также увеличение выраженности воспалительного компонента в легочной паренхиме (повышение количества клеточных инфильтратов и увеличение толщины альвеолярной стенки).

Противоположный эффект в отношении тяжести ОПЛ при инфицировании мышей вирусом гриппа A/California/07/2009MA был получен нами при применении аминогуанидина бикарбоната в режиме лечебно-профилактической терапии. Аминогуанидин обусловил снижение летальности в 2 раза, ограничил падение величины сатурации гемоглобина кислородом на 15% и рост степени выраженности морфологических изменений в лёгких, что подтверждалось ограничением площади кровоизлияний на 35% и снижением повреждения лёгких на 20%. Наряду с этим, имело место позитивное воздействие на показатели воспалительной реакции, заключавшиеся в коррекции повышенного уровня провоспалительных цитокинов в лёгких (TNF- α на 30 %, IL-6 на 50% и IL-1 β на 45%), ограничении выраженности воспалительного компонента повреждения лёгочной паренхимы на 15 %, повышение уровня лимфоцитов на треть, снижение относительного уровня п/я нейтрофилов в 2 раза, с/я нейтрофилов на треть и абсолютного содержания тромбоцитов в 2 раза. Выявленная эффективность аминогуанидина сопровождалась снижением роста КППГ на треть в течение всего эксперимента.

Известно, что в основе механизма действия блокаторов КППГ, лежит предотвращение образования прочной ковалентной связи между предшественниками КППГ и аминок группами белков, гликопротеинов и других соединений. В случае аминогуанидина происходит образование ковалентных связей с промежуточными продуктами КППГ с формированием прочного комплекса [288; 321].

Полученные нами данные об эффективности аминогуанидина в вышеописанной модели ОПЛ послужили основанием для дальнейшего изучения его возможной протективной активности в условиях, отягчающих течение гриппозной инфекции. Хорошо известна роль ряда преморбидных патологий в росте частоты серьезных осложнений гриппа, вплоть до летальных исходов [327; 328]. Одним из наиболее значимых и распространенных заболеваний, при этом, является СД [329]. Клинически выявлено отягощение течения ОПЛ/ОРДС при наличии СД в анамнезе, в том числе и при гриппе [330; 331; 332; 333].

В наших экспериментах заражение мышей вирусом гриппа А на фоне смоделированного СД привело к отягощению течения ОПЛ по типу, наблюдавшемуся при предварительном введении МГ, и характеризовавшемуся увеличением летальности в 2 раза, падением уровня насыщения гемоглобина крови кислородом и тяжести поражения легочной паренхимы в сравнении с инфицированными животными без преморбидной патологии. Наблюдаемые изменения сопровождались ростом выраженности воспалительной реакции, что подтверждалось увеличением концентрации провоспалительных цитокинов (TNF- α в 1,6 раза, IL-6 в 1,4 раза и IL-1 β в 1,4 раза), а также характерным изменением динамики ряда маркерных гематологических показателей (падение относительного уровня лимфоцитов, рост относительного уровня с/я нейтрофилов и абсолютного содержания тромбоцитов). Уровень КППГ в легких, при этом, значимо превышал таковой у мышей, не имевших преморбидной патологии, в течение всего эксперимента. Последнее объясняется цитотоксическим действием аллоксана на β -островки Лангерганса, секретирующие инсулин, в результате чего усиливается неферментативный путь утилизации глюкозы – основной путь образования КППГ [304]. Таким образом, экспериментально была подтверждена отягощающая роль СД, как преморбидной патологии, при гриппозной инфекции. Аналогичное негативное влияние фонового стрептозотоцин-индуцированного СД на степень тяжести ОПЛ, вызванного гипоксией, было продемонстрировано в работе Wang et al. [334]. Авторы показали отягощение воспалительного процесса, что подтверждалось ростом концентрации IL-1 β в 2,5 раза, IL-6 в 2 раза и экспрессии генов, кодирующих TLR4, в 2 раза в сравнении с мышами, подвергнутыми гипоксии, и не имевшими преморбидной патологии. Выраженность воспаления коррелировала с двукратным ростом повреждения лёгких, оценённого полуколичественно при микроскопии.

Анализ публикаций не выявил работ, посвящённых изучению особенностей течения ОПЛ, индуцированного гриппозной инфекцией, на фоне экспериментального СД.

Изучение влияния аминогуанидина на течение вирус-индуцированного ОПЛ у мышей с фоновым СД также, как и в предыдущем случае, продемонстрировало его значимую эффективность в отношении выраженности типовых показателей патологии. Блокатор КПП обусловил снижение летальности опытных животных с 80 % до 35 %, ограничил степень снижения уровня гипоксемии с 44 % до 66 % и выраженности повреждения лёгочной паренхимы по отношению к позитивному контролю. Наряду с вышеописанным, аминогуанидин способствовал коррекции воспалительной реакции, ограничивая уровень содержания провоспалительных цитокинов в легких (TNF- α и IL-6 в 2 раза, IL-1 β на 30%) и позитивно влияя на специфические изменения ряда маркерных гематологических показателей (восстановление сниженного уровня лимфоцитов, снижение процентного содержания с/я нейтрофилов и абсолютного количества тромбоцитов). Вышеуказанные позитивные изменения в течении ОПЛ наблюдались на фоне ограничения роста уровня КПП в лёгких на 25%.

Таким образом, полученные экспериментальные данные о негативном влиянии предшественника накопления КПП МГ и позитивном воздействии блокатора данного процесса аминогуанидина 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.

Наряду с широко представленными в литературе данными о роли КПП и их предшественников в формировании провоспалительного ответа при различных патологиях, сведения о значении их накопления в процессе формирования ОПЛ вирусного генеза отсутствуют.

Выявленная с помощью модуляторов рКПП возможность влияния на накопление КПП и связь этого процесса со степенью тяжести ОПЛ, является обоснованием дальнейшей разработки подходов к поиску средств, ограничивающих их чрезмерное накопление, с целью совершенствования стандартной схемы терапии ОПЛ/ОРДС вирусного генеза.

ВЫВОДЫ

1. Заражение мышей самок вирусами гриппа A/California/07/2009MA (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68MA (H3N2) в дозе 1 ЛД₅₀ 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-%28seasonal%29> (Дата обращения 01.08.19)
2. Пандемии начала XXI века. Грипп птиц и пандемия «свиного» гриппа H1N1 2009 года/ О.И. Киселёв. – СПб.: Фолиант, 2016. – 368 с.
3. Caini S. Clinical characteristics and severity of influenza infections by virus type, subtype, and lineage: A systematic literature review. / S. Caini, M. Kroneman, T. Wieggers [et al] // *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2018. – Vol.12, Iss. 6, P.780-792, doi:10.1111/irv.12575
4. FluNewsEurope [Электронный ресурс]. URL: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_seasonal-influenza-corrected.pdf (Дата обращения 01.08.19)
5. Samra T. Comparative evaluation of acute respiratory distress syndrome in patients with and without H1N1 infection at a tertiary care referral center/ T. Samra, M. Pawar, and A. Yadav// *Indian Journal of Anaesthesia*, 2011.– Vol. 55, Iss. 1, P. 47-51, doi: 10.4103/0019-5049.76602
6. Clowes G.H.A. Septic Lung and Shock Lung in Man/ G.H.A. Clowes, E. Hirsch, L. Williams [et al] // *Annals of Surgery*, 1975. – Vol. 181, Iss. 5, P. 681-692, doi: 10.1097/00000658-197505000-00024
7. Bernard G.R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination / G.R. Bernard, A. Artigas, K.L. Brigham [et al] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1994. – Vol. 149, Iss. 3, P. 818-824, doi: 10.1164/ajrccm.149.3.7509706
8. Ferguson N.D. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material/ N.D. Ferguson, E. Fan, L. Camporota [et al] // *Intensive Care Medicine*, 2012. – Vol. 38, Iss. 10, P. 1573-1582, doi: 10.1007/s00134-012-2682-1

9. Грипп у взрослых: методические рекомендации по диагностике, лечению, специфической и неспецифической профилактике / под ред. ак., проф. А.Г. Чучалина, главного внештатного инфекциониста СЗФО проф. Т.В. Сологуб. – Санкт-Петербург: Издательско-полиграфический комплекс «НП-Принт», 2014. – 192 с.
10. Hendrickson C.M. Viral Pathogens and Acute Lung Injury: Investigations Inspired by the SARS Epidemic and the 2009 H1N1 Influenza Pandemic / C. M. Hendrickson and M. A. Matthay // *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013. – Vol. 34, Iss. 4, P. 475–486, doi: 10.1055/s-0033-1351122
11. Topfer L. InfluenzaA (H1N1) vs non-H1N1 ARDS: analysis of clinical course / L. Topfer, M. Menk, S.Weber-Carstens [et al] // *Journal of critical care*, 2014.– Vol. 29, Iss. 3, P. 340-346, doi: 10.1016/j.jcrc.2013.12.013
12. Cohen-Or I. AGEs Secreted by Bacteria Are Involved in the Inflammatory Response / I. Cohen-Or, C. Katz, & E. Z. Ron // *PLoS ONE*, 2011. – Vol.6, Iss. 3, e17974, doi:10.1371/journal.pone.0017974
13. Bengmark S. Advanced Glycation and Lipoxidation End Products—Amplifiers of Inflammation: The Role of Food / S. Bengmark // *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2007. – Vol. 31, Iss. 5, P. 430–440, doi:10.1177/0148607107031005430
14. Wu L. Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD / L. Wu, L. Ma, L.F.B. Nicholson [et al] // *Respiratory Medicine*, 2011. – Vol.105, Iss.3, P. 329–336, doi:10.1016/j.rmed.2010.11.001
15. Rhee S.Y. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications / S.Y. Rhee, and Y.S. Kim // *Diabetes & Metabolism Journal*, 2018. – Vol.42, Iss.3, P.188-195, doi:10.4093/dmj.2017.0105
16. Ahmed N. Quantitative screening of protein biomarkers of early glycation, advanced glycation, oxidation and nitrosation in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring / N. Ahmed and P.J. Thornalley // *Biochemical Society Transactions*, 2003. – Vol.31, Iss.6, P. 1417–1422, doi:10.1042/bst0311417.

17. Cerami A. Pharmaceutical Intervention of Advanced Glycation Endproducts / A. Cerami and P. Ulrich // *Novartis Foundation Symposium*, 2008. – Vol. 235, P.202–220, doi:10.1002/0470868694.ch16.
18. Degenhardt T.P. Chemical modification of proteins by methylglyoxal / T.P. Degenhardt, S.R. Thorpe, J.W. Baynes // *Cellular and Molecular Biology*, 1998. – Vol.44, Iss.7, P.1139-1145.
19. Wells-Knecht K.J. Characterization of an Imidazolium Salt Formed from Glyoxal and N.alpha.-Hippuryllysine: A Model for Maillard Reaction Crosslinks in Proteins / K.J. Wells-Knecht, E. Brinkmann and J.W. Baynes // *The Journal of Organic Chemistry*, 1995. – Vol.60, Iss.20, P. 6246–6247. doi:10.1021/jo00125a001.
20. Bullock P.T.B. A new glycation product “norpronyl-lysine,” and direct characterization of cross linking and other glycation adducts: NMR of model compounds and collagen / Bullock P.T.B., Reid D.G., Ying Chow W. [et al] // *Bioscience Reports*, 2014. – Vol.34, Iss.2, P. 83–92, doi:10.1042/bsr20130135.
21. Guo W.A. The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome / W.A. Guo, P.R. Knight, K. Raghavendran // *Intensive Care Medicine*, 2012.– Vol. 38, P. 1588-1598, doi: 10.1007/s00134-012-2624-y.
22. Bansal S. Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils in vitro / S. Bansal, M. Siddarth , Chawla, D. [et al] // *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2011. – Vol.361, Iss.1-2, P.289–296, doi:10.1007/s11010-011-1114-9.
23. Zhang M. Glycated Proteins Stimulate Reactive Oxygen Species Production in Cardiac Myocytes: Involvement of Nox2 (gp91phox)-Containing NADPH Oxidase. /Zhang M., Kho A.L., Anilkumar N [et al]// *Circulation*, 2006. – Vol.113, Iss.9, P.1235–1243, doi:10.1161/circulationaha.105.581397
24. Quispe-Laime A.M. H1N1 influenza A virus-associated acute lung injury: response to combination oseltamivir and prolonged corticosteroid treatment / A.M.

Quispe-Laime, J.D. Bracco, P.A. Barberio [et al] // Intensive Care Med, 2010. – Vol.36, P.33–41, doi: 10.1007/s00134-009-1727-6

25. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf (Дата обращения 01.08.19).

26. Tsai M. Impact of corticosteroid treatment on clinical outcomes of influenza-associated ARDS: a nationwide multicenter study / M.Tsai, K.Yang, M.Chan [et al] // Annals Intensive Care, 2020. – Vol. 10, Iss.1, Article number 26, doi: 10.1186/s13613-020-0642-4

27. Weiss, R. Interleukin-24 inhibits influenza A virus replication in vitro through induction of toll-like receptor 3 dependent apoptosis / Weiss R., Laengle J., Sachet M. [et al] // Antiviral Research, 2015. – Vol. 123, P. 93–104, doi:10.1016/j.antiviral.2015.09.005.

28. Sivak K.V. Adenosine A_{2A} Receptor as a Drug Target for Treatment of Sepsis / Sivak K.V., Vasin A.V., Egorov V.V [et al] // Molecular Biology, 2016. – Vol. 50. № 2. P. 200-212, doi: 10.1134/S0026893316020230.

29. Herold S. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment / Herold S., Becker C., Ridge K.M. [et al] // European Respiratory Journal, 2015. – Vol.45, Iss.5, P.1463–1478, doi:10.1183/09031936.00186214.

30. van Zoelen M.A. Targeting RAGE in sepsis / M.A. van Zoelen and T. van der Poll // Critical Care, 2008. – Vol.12, Iss.1, Article number 103, doi:10.1186/cc6187.

31. Liliensiek B. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response / B. Liliensiek, M.A. Weigand, A. Bierhaus [et al] // Journal of Clinical Investigation, 2004. – Vol.113, Iss.11, P. 1641–1650, doi:10.1172/jci18704.

32. Балаболкин М. И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете / М. И. Балаболкин // Сахарный диабет, 2002. –№ 4, С. 5-16.

33. Nowotny K. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus / K. Nowotny, T. Jung, A. Hühn [et al] // *Biomolecules*, 2015. – Vol.5, Iss.1, P.194–222, doi:10.3390/biom5010194.
34. Chawla D. Role of advanced glycation end products (AGEs) and its receptor (RAGE)-mediated diabetic vascular complications / D. Chawla and A.K. Tripathi // *Integrative Food, Nutrition and Metabolism*, 2019. – Vol.6, P. 1-6, doi: 10.15761/IFNM.1000267.
35. Dudhgaonkar S.P. Synergistic anti-inflammatory interaction between meloxicam and aminoguanidine hydrochloride in carrageenan-induced acute inflammation in rats / S.P. Dudhgaonkar, S.K. Tandan, A.S. Bhat [et al] // *Life Sciences*, 2006. – Vol.78, Iss.10, P.1044–1048, doi:10.1016/j.lfs.2005.06.002.
36. Kołodziej-Sobocińska M. In vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine influences free radicals production and macrophage activity in *Trichinella spiralis* infected low responders (C57BL/6) and high responders (BALB/c) mice / M. Kołodziej-Sobocińska and B. Machnicka-Rowińska // *Helminthologia*, 2012. – Vol. 49, P.189–200, doi: 10.2478/s11687-012-0038-6.
37. Matsui T. Sulforaphane reduces advanced glycation end products (AGEs)-induced inflammation in endothelial cells and rat aorta / Matsui T., Nakamura N., Ojima A. [et al]// *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2016. – Vol.26, Iss.9, P. 797–807, doi:10.1016/j.numecd.2016.04.008.
38. Das J. Taurine ameliorates alloxan-induced diabetic renal injury, oxidative stress-related signaling pathways and apoptosis in rats / J. Das, P.C. Sil // *Amino Acids*, 2012. – Vol. 43, Iss.4, P.1509-1523. doi: 10.1007/s00726-012-1225-y
39. Turk Z. Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control / Z. Turk, I. Misur, N. Turk [et al] // *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 1999. – Vol.37, Iss.8, P.813-820, doi: 10.1515/CCLM.1999.122

40. Iribarren C. Cigarette Smoking, Alcohol Consumption, and Risk of ARDS/ C. Iribarren, D.R. Jacobs, S. Sidney [et al] //Chest, 2000. – Vol. 117, Iss. 1, P. 163-168, doi: 10.1378/chest.117.1.163.
41. Donahoe M. Acute Respiratory Distress Syndrome: A Clinical Review/ M. Donahoe // Pulmonary Circulation, 2011. – Vol. 1, Iss. 2, P. 192-211, doi:10.4103/2045-8932.83454
42. Brewer L.A. The “Wet Lung” in War Casualties / L.A. Brewer, B. Burbank, P.C. Samson [et al] // Annals of surgery, 1946. – Vol. 123, Iss. 3, P. 343–362.
43. Ashbaugh D. Acute respiratory distress in adults/ D. Ashbaugh, B.D. Bigelow, T. Petty [et al]//The Lancet, 1967. – Vol. 290, Iss. 7511, P. 319-323, doi:10.1016/s0140-6736(67)90168-7.
44. Fishman A.P. Shock Lung: A Distinctive Nonentity/ A.P. Fishman //Circulation, 1973. – Vol. 47, Iss. 5, P. 921-923, doi:10.1161/01.cir.47.5.921.
45. Yernault J.C. Pulmonary mechanics and diffusion after 'shock lung'/ J.C. Yernault, M. Englert, R. Sergysels [et al]// Thorax, 1975. – Vol. 3, Iss. 3, P. 252-257, doi: 10.1136/thx.30.3.252.
46. Острый респираторный дистресс-синдром и гипоксемия / В.Л.Кассиль, Ю.Ю.Сапичева. –2-изд., перераб. идоп. –М. : МЕДпресс-информ, 2016. – 152 с.
47. Мороз В.В. Классификация острого респираторного дистресс-синдрома/ В.В. Мороз, А.М. Голубев // Общая реаниматология, 2007. – Том 3, № 6, С. 7-9, doi: 10.15360/1813-9779-2007-6-7-9.
48. Doyle R.L. Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality / R.L. Doyle, N. Szaflarski, G.W. Modin [et al] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1995. – Vol. 152, Iss. 6, P.1818-1824, doi:10.1164/ajrccm.152.6.8520742.
49. Ferguson N.D. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material/ N.D. Ferguson, E. Fan, L. Camporota [et al] // Intensive Care Medicine, 2012. – Vol. 38, Iss. 10, P. 1573-1582, doi:10.1007/s00134-012-2682-1.

50. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома. Клинические рекомендации [Электронный ресурс]. URL: <http://far.org.ru/recomendation?download=51%3Aards> (Дата обращения 02.08.19).
51. Мальцева Л.А. Респираторный дистресс-синдром: современные вопросы дефиниций, клинической картины, алгоритма диагностики / Л.А. Мальцева, Н.Ф. Мосенцев, Д.В. Базиленко [и др] // Медицина неотложных состояний, 2016. – Том 45, № 4, С. 108-110, doi: 10.22141/2224-0586.4.75.2016.75827.
52. Рябов Г.А. Гипоксия критических состояний / Г.А. Рябов – М.: Медицина, 1998. – 288 с.
53. Голубев А.М. Патогенез острого респираторного дистресс-синдрома/ А.М. Голубев, В.В. Мороз, Д.В. Сундуков// Общая реаниматология, 2012. – Том 8, № 4, С. 66-77, doi: 10.15360/1813-9779-2012-4-13
54. Пруткина Е.В. Особенности экспрессии дефензинов в легких при остром респираторном дистресс–синдроме на фоне гриппозной пневмонии/ Е.В. Пруткина, А.В. Сепп, Н.Н. Цыбиков [и др] // Пульмонология, 2013. – №1, С.59-63, doi: 10.18093/0869-0189-2013-0-1-59-63
55. Castro C.Y. ARDS and Diffuse Alveolar Damage: A Pathologist’s Perspective / C.Y. Castro // Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2006. – Vol. 18, Iss. 1, P.13-19, doi:10.1053/j.semtcvs.2006.02.001
56. Спирин А.В. Патоморфология респираторного дистресс-синдрома взрослых, ассоциированного с беременностью: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. мед.наук.(14.00.76) / Спирин Алексей Васильевич; Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию – Челябинск, 2008 – 26 с.
57. Светлицкая О.И. Морфологическая характеристика поражения внутренних органов при остром респираторном дистресс-синдроме вирусно-бактериальной этиологии/ О.И. Светлицкая, О.А. Юдина, Р.В. Кашанский [и др]//Вестник ВГМУ, 2018. – Том 17, №2, С. 55-62, doi: 10.22263/2312-4156.2018.2.55

58. Matthay M.A. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment / M.A. Matthay, R.L. Zemans// *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, 2011. – Vol.6, P.147-163. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130158
59. Этюды критической медицины, т. 2. Респираторная медицина. / Зильбер А.П. – Петрозаводск: «Изд-во ПетрГУ», 1996. – 488 с.
60. Росстальная А.Л. Острое повреждение легких: спорные вопросы и нерешенные проблемы (обзор литературы) / А.Л. Росстальная, Д.М. Сабиров, Р.Н. Акалаев [и др] // *Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*, 2016. –№ 3, С.66-72
61. Goncalves-de-Albuquerque C.F. Acute Respiratory Distress Syndrome: Role of Oleic Acid-Triggered Lung Injury and Inflammation / C.F. Goncalves-de-Albuquerque, A.R. Silva, P. Burth [et al]// *Mediators of Inflammation*, 2015. – Vol. 2015, Article ID 260465, doi:10.1155/2015/260465
62. Hagau N. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection/ N. Hagau, A. Slavcovici, D.N. Gongnanau [et al] // *CriticalCare*, 2010. – Vol. 14, Iss. 6, Article number: R203, doi:10.1186/cc9324
63. Beck-Schimmer B. Role of Epithelial ICAM-1 in Endotoxin-Induced lung Injury / B. Beck-Schimmer, R.C. Schimmer, T. Pasch // In: *Yearbook of Intatnsive Care and Emergency medicine*/ Ed. J. L. Vincent. – Springer, 2003. – P. 3–10, doi: 10.1007/978-1-4757-5548-0_1.
64. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // *Медицинская иммунология*, 2012. – Т.14, Вып.1-2, С. 9-20, doi: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-9-20
65. Gunther A. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema / A. Gьnther, C. Siebert, R. Schmidt [et al] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1996. – Vol. 153, Iss. 1, P. 176-184, doi:10.1164/ajrccm.153.1.8542113.

66. Баутин А.Е. Использование сочетания маневра мобилизации альвеол и эндобронхиального введения экзогенного сурфактанта в комплексной терапии острого респираторного дистресс-синдрома после кардиохирургических вмешательств/ А.Е. Баутин // Вестник северо-западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, 2015. – Том 7, №1, С. 7-14
67. Kao K.-C. Diffuse alveolar damage associated mortality in selected acute respiratory distress syndrome patients with open lung biopsy/ K.-C. Kao, H.-C. Hu, C.-H. Chang [et al] // Critical Care, 2015. – Vol. 19, Iss. 1, Article number: 228, doi:10.1186/s13054-015-0949-y.
68. Ware L.B. The Acute Respiratory Distress Syndrome / L.B. Ware, M.A. Matthay // The New England Journal of Medicine, 2000. – Vol. 342, №18, P.1334-1349, doi: 10.1056/NEJM200005043421806.
69. Кассиль В.Л. Острый респираторный дистресс-синдром в современных представлениях об острой дыхательной недостаточности/ В.Л. Кассиль, М.А. Выжигина, С.В. Свиридов // Анестезиология и реаниматология, 2013 – № 2, С. 85-90.
70. Idell S. Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome /S. Idell, K.K. James, E.G. Levin [et al] // The Journal of clinical investigation, 1989. – Vol.84, Iss.2, P.695-705, doi: 10.1172/JCI114217.
71. Kim W.-Y. Sepsis and Acute Respiratory Distress Syndrome: Recent Update / W.-Y. Kim, S.-B. Hong // Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2016. – Vol. 79, Iss.2, P. 53-57, doi:10.4046/trd.2016.79.2.53.
72. Hukkanen R.R. Systemic Inflammatory Response Syndrome in Nonhuman Primates Culminating in Multiple Organ Failure, Acute Lung Injury, and Disseminated Intravascular Coagulation/ R.R. Hukkanen, H.D. Liggitt, R.D. Murnane [et al] // Toxicologic Pathology, 2009. – Vol. 37, Iss. 6, P. 799–804. doi:10.1177/0192623309343778.

73. Xiao Z. Attenuation of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Cyclosporine-A via Suppression of Mitochondrial DNA / Z. Xiao, B. Jia, X. Zhao [et al] // *Medical Science Monitor*, 2018. – Vol. 24, P. 7682–7688. doi: 10.12659/msm.909909.
74. Волков В.Е. Плевролёгочные осложнения у больных острым некротическим панкреатитом/ В.Е. Волков, С.В. Волков, Г.В. Жамков [и др.] // *Здравоохранение Чувашии*, 2017. – №3, С. 61-63.
75. Голубев А.М. Патогенез и морфология острого повреждения легких / А.М. Голубев, В.В. Мороз, Г.Н. Мещеряков [и др.] // *Общая реаниматология*, 2005. – Том 1, № 5, С. 5-12, doi: 10.15360/1813-9779-2005-5-5-12.
76. Мороз В.В. ОРДС — патогенез и терапевтические мишени/ В.В. Мороз, А.В. Власенко, А.М. Голубев // *Анестезиология и реаниматология*, 2014. – №4, С.45-52.
77. Matthay M. A. Intact Epithelial Barrier Function Is Critical for the Resolution of Alveolar Edema in Humans/ M. A. Matthay, J. P. Wiener-Kronish// *American Review of Respiratory Disease*, 1990. – Vol.142, № 6 (pt 1), P. 1250-1257, doi: 10.1164/ajrccm/142.6_pt_1.1250.
78. Острый респираторный дистресс-синдром: Практическое руководство/ Под.ред. Б.Р.Гельфанда, В.Л. Кассиля. – М.: Литтерра, 2007. – 232 с.
79. Han S. The Acute Respiratory Distress Syndrome: From Mechanism to Translation/ S. Han, R. K. Mallampalli // *The Journal of Immunology*, 2015. – Vol. 194, Iss. 3, P. 855–860. doi:10.4049/jimmunol.1402513.
80. Spadaro S. Biomarkers for Acute Respiratory Distress syndrome and prospects for personalised medicine/ S. Spadaro, M. Park, C. Turrini [et al] // *Journal of Inflammation*, 2019. – Vol. 16, Iss. 1, doi:10.1186/s12950-018-0202-y.
81. Butt Y. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review/ Y. Butt, A. Kurdowska, T.C. Allen // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2016. – Vol. 140, Iss. 4, P. 345–350, doi:10.5858/arpa.2015-0519-ra.

82. Ковальчук Л.В. Роль toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека / Л.В. Ковальчук, О.А. Свитич, Л.В. Ганковская [и др]// Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье", 2012. – № 2, с. 147-153.
83. Kuzmich N. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis / N. Kuzmich, K. Sivak, V. Chubarev [et al]// Vaccines, 2017. – Vol.5, Iss.4, Article number 34, doi:10.3390/vaccines5040034.
84. Тюкавкина С. Ю. Роль toll-подобных рецепторов в иммунопатогенезе нефропатий / С.Ю. Тюкавкина, А.В. Лабушкина, О.С. Оксенюк // Журнал фундаментальной медицины и биологии, 2017. – №1, С. 17-26.
85. Заморина С.А. Toll-подобные рецепторы – подъем по тревоге / С.А. Заморина, М.Б. Раев // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2016. – №2, С.9-13.
86. Толстопятова М.А. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей / М.А. Толстопятова, Г.А. Буслаева, И.Г. Козлов // Педиатрия. – 2009. – № 1. – С. 115-120.
87. Коровкина Е.С. Роль toll-подобных рецепторов в патогенезе воспалительных заболеваний бронхолегочной системы / Е.С. Коровкина, С.В. Кажарова // Инфекция и иммунитет, 2016 – Т.6, №.2, С.109-116. doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-109-116.
88. Абатуров А.Е. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 4. Внутриклеточные сигнальные пути TLR / А.Е. Абатуров, А.П. Волосовец, Е.И. Юлиш // Здоровье ребенка, 2012. – Т.8, Вып.43, С.163-167.
89. Байке Е.Е. Современные представления о роли Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний / Е.Е. Байке, Е.С. Богодухова // Дальневосточный медицинский журнал, 2015. – Т.4, С. 38-43.

90. Moors M.A. Activation of interleukin-1 receptor-associated kinase by gram-negative flagellin / M.A. Moors, L. Li, S.B. Mizel // *Infection and immunity*, 2001. – Vol.69, Iss.7, P.4424-4429, doi:10.1128/IAI.69.7.4424-4429.2001.
91. Kiziltas S. Toll-like receptors in pathophysiology of liver diseases / S. Kiziltas// *World Journal of Hepatology*, 2016. – Vol.8, Iss.32, P.1354-1369, doi:10.4254/wjh.v8.i32.1354.
92. Dorrington M.G. NF-kB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration/ M.G. Dorrington, I.D.C. Fraser // *Frontiers in Immunology*, 2019 – Volume 10, Article 705, doi: 10.3389/fimmu.2019.00705.
93. Kumar H. Toll-like receptors and innate immunity / Kumar H., Kawai T., Akira S. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. – Vol.388, Iss.4, P.621–625, doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.062.
94. Ковальчук Л.В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии./ Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 234 с.
95. Ярилин А.А. Иммунология./ Ярилин А.А. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 562 с.
96. Karin M. NF-kappa B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression / M. Karin, F.R. Greten // *Nature reviews. Immunology*, 2005. – Vol.5, Iss.10, P.749-759, doi:10.1038/nri1703.
97. Tracey K.J. Cachetin/TNF- α in Septic Shock and Septic Adult Respiratory Distress Syndrome/ K. J. Tracey, S.F. Lowry, A. Cerami // *American Review of Respiratory Disease*, 1988. – Vol. 138, Iss. 6, P. 1377–1379. doi:10.1164/ajrccm/138.6.1377
98. Donnelly T.J. Cytokine, complement, and endotoxin profiles associated with the development of the adult respiratory distress syndrome after severe injury/ T.J. Donnelly, P. Meade, M. Jagels [et al] // *Critical Care Medicine*, 1994. – Vol. 22, Iss. 5, P. 768-776, doi:10.1097/00003246-199405000-00010

99. Suter P.M. High Bronchoalveolar Levels of Tumor Necrosis Factor and Its Inhibitors, Interleukin-1, Interferon, and Elastase, in Patients with Adult Respiratory Distress Syndrome after Trauma, Shock, or Sepsis/ P.M. Suter, S. Suter, E. Girardin [et al]// *American Review of Respiratory Disease*, 1992. – Vol.145, Iss.5, P.1016–1022, doi:10.1164/ajrccm/145.5.1016
100. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология : учебник для медицинских вузов / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - 5-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2012. – 759 с.
101. Ибрагимов Р.Ш. Сравнительная характеристика клеточного состава пуповинной крови здоровых новорожденных и мобилизованной гранулоцитарным колониестимулирующим фактором периферической крови здоровых доноров / Р.Ш. Ибрагимов, Е.В. Райкина, Е.Ю. Осипова // *Онкогематология*, 2009. – №4, С. 45-50.
102. Lawlor K.E. Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis / K.E. Lawlor, I.K. Campbell, D. Metcalf // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. – Vol.101, Iss.31, P. 11398–11403, doi:10.1073/pnas.0404328101.
103. Berclaz P.-Y. GM-CSF Regulates a PU.1-Dependent Transcriptional Program Determining the Pulmonary Response to LPS / P.-Y. Berclaz, B. Carey, M.-D. Fillipi // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2007. – Vol.36, Iss.1, P.114–121, doi:10.1165/rcmb.2006-0174oc.
104. Geijsen N. Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family / N. Geijsen, L. Koenderman, P. Coffier // *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2001. – Vol.12, Iss.1, P.19–25, doi:10.1016/s1359-6101(00)00019-8.
105. Adachi T. The mechanism of IL-5 signal transduction / T. Adachi, R. Alam // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 1998. – Vol.275, Iss.3, P.623–633, doi:10.1152/ajpcell.1998.275.3.c623.

106. Watanabe S. Characterization of cis-regulatory elements of the c-myc promoter responding to human GM-CSF or mouse interleukin 3 in mouse proB cell line BA/F3 cells expressing the human GM-CSF receptor / S. Watanabe, S. Ishida, K. Koike [et al]// *Molecular Biology of the Cell*, 1995. – Vol.6, Iss.6, P.627–636, doi:10.1091/mbc.6.6.627.
107. Сологуб Т. В., Романцова М. Г., Кремень Н. В. и др. Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты). Учебное пособие для врачей [Электронный ресурс]. URL: <https://www.monographies.ru/ru/book/view?id=28> (Дата обращения 01.08.19).
108. Menezes S.L.S. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses/ S.L.S. Menezes, P.T. Bozza, H.C.C. Faria Neto [et al] // *Journal of Applied Physiology*, 2005. – Vol. 98, Iss. 5, P.1777-1783, doi:10.1152/jappphysiol.01182.2004.
109. Parsons P.E. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury/ P.E. Parsons, M.D. Eisner, B.T. Thompson [et al] // *Critical Care Medicine*, 2005. – Vol. 33, Iss.1, P.1-6, doi:10.1097/01.ccm.0000149854.61192.dc.
110. Meduri G. U. Inflammatory Cytokines in the BAL of Patients With ARDS/ G.U. Meduri, G. Kohler, S. Headley // *Chest*, 1995. – Vol.108, Iss.5, P.1303–1314, doi:10.1378/chest.108.5.1303.
111. Aisiku I.P. Plasma cytokines IL-6, IL-8, and IL-10 are associated with the development of acute respiratory distress syndrome in patients with severe traumatic brain injury / Aisiku I. P., Yamal J.-M., Doshi P. [et al]// *Critical Care*, 2016.– Vol.20, Iss.1, doi:10.1186/s13054-016-1470-7.
112. Swaroopa D. Association of serum interleukin-6, interleukin-8, and Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score with clinical outcome in patients with acute respiratory distress syndrome / D. Swaroopa, K. Bhaskar, T. Mahathi [et al] // *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian*

Society of Critical Care Medicine, 2016. – Vol.20, Iss.9, P.518–525, doi:10.4103/0972-5229.190369.

113. Lee S.A. Effects of glycyrrhizin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in a mouse model / Lee, S. A., Lee, S. H., Kim, J. Y [et al] // Journal of Thoracic Disease, 2019. – Vol.11, Iss.4, P.1287–1302, doi:10.21037/jtd.2019.04.14.

114. Singh R. Advanced glycation end-product: a review / R. Singh, A. Barden, T. Mori [et al] // Diabetologia, 2001. – Vol. 44, P. 129-146, doi: 10.1007/s001250051591.

115. Adrover, M. The pyridoxamine action on Amadori compounds: A reexamination of its scavenging capacity and chelating effect / Adrover M., Vilanova B., Frau J. [et al] // Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008. – Vol.16, Iss.10, P.5557–5569, doi:10.1016/j.bmc.2008.04.002.

116. Traoré K. Do advanced glycation end-products play a role in malaria susceptibility? / K. Traoré, C. Arama, M. Médebielle [et al] //Parasite, 2016. – Vol.23, Article number 15, doi: 10.1051/parasite/2016015

117. Rahbar S. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus / S. Rahbar, O. Blumenfeld, H.M. Ranney // Biochemical and Biophysical Research Communications, 1969. – Vol.36, Iss.5, P.838–843, doi:10.1016/0006-291x(69)90685-8.

118. Srivastava S.K. Characterization of a previously unidentified hemoglobin fraction / S.K. Srivastava, C. Van Loon, E. Beutler // Biochimica et Biophysica Acta, 1972. – Vol.278, Iss.3, P.617–621, doi:10.1016/0005-2795(72)90026-8.

119. Beutler E. Pyridoxine administration in sickle cell disease: An unsuccessful attempt to influence the properties of sickle hemoglobin / E. Beutler, N.V. Paniker, C.J. West // Biochemical Medicine, 1972. – Vol.6, Iss.2, P.139–143, doi:10.1016/0006-2944(72)90031-2.

120. Maillard L.C. Action des acides amines sur les sucres : formation des melanoidines par voie methodique [Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way] / L.C. Maillard // Comptes Rendus, 1912. – Vol.154, P.66–68.

121. Koenig R.J. Structure of Carbohydrate of Hemoglobin A1c / R.J. Koenig, S.H. Blobstein, A. Cerami // *The journal of biological chemistry*, 1977. – Vol.252, №.9, P.2992-2991.
122. Abraham E.C. Glycosylated minor components of human fetal hemoglobin / E.C. Abraham // *Biochimica et Biophysica Acta*, 1981. – Vol.667, Iss.1, P.168–176, doi:10.1016/0005-2795(81)90077-5.
123. Vaughan L. Nonenzymatic glycosylation of proteins: a new and rapid solution for in vitro investigation / L. Vaughan, R.W. Fischer, D.R. Zimmermann // *FEBS Letters*, 1984. – Vol.173, Iss.1, P.173–178, doi:10.1016/0014-5793(84)81041-8.
124. Tarsio J.F. Nonenzymatic Glycation of Fibronectin and Alterations in the Molecular Association of Cell Matrix and Basement Membrane Components in Diabetes Mellitus / J.F. Tarsio, B. Wigness, T.D. Rhode [et al] // *Diabetes*, 1985. – Vol.34, Iss.5, P.477–484. doi:10.2337/diab.34.5.477.
125. Andreassen T.T. Thermal stability of collagen in relation to non-enzymatic glycosylation and browning in vitro / T.T. Andreassen, H. Oxlund // *Diabetologia*, 1985. – Vol.28, Iss.9, P.687–691, doi:10.1007/bf00291977.
126. Bucala R. Advanced Glycosylation: Chemistry, Biology, and Implications for Diabetes and Aging / R. Bucala, A. Cerami // *Advances in Pharmacology*, 1992. – Vol.23, Iss.C, P.1-34, doi: 10.1016/S1054-3589(08)60961-8.
127. Титов В.Н. Глюкоза, гликотоксины и продукты гликирования протеинов: роль в патогенезе / В.Н. Титов, Н.В. Хохлова, Ю.К. Ширяева // *Клиническая медицина*, 2013. – Vol.91, Iss.3, P.15-24.
128. Thornalley P.J. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose / P.J. Thornalley, A. Langborg, H.S. Minhas, // *The Biochemical journal*, 1999. – Vol.344, Pt.1, P.109–116.
129. Thornalley P. J. Dicarbonyl Intermediates in the Maillard Reaction / P.J. Thornalley // *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005. – Vol.1043, Iss.1, P.111–117, doi:10.1196/annals.1333.014.

130. Hamada Y. Role of polyol pathway in nonenzymatic glycation / Y. Hamada, N. Araki, S. Horiuchi [et al] // *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1996. – Vol.11, P.95–98, doi:10.1093/ndt/11.suppl5.95.
131. Chung, S.S.M. (2003). Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress / S.S.M. Chung // *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003. – Vol.14, Iss.90003, P.233–236, doi:10.1097/01.asn.0000077408.15865.06.
132. Taniguchi N. Glycation vs. glycosylation: a tale of two different chemistries and biology in Alzheimer's disease / N. Taniguchi, M. Takahashi, Y. Kizuka [et al] // *Glycoconjugate Journal*, 2016. – Vol.33, Iss.4, P.487–497, doi:10.1007/s10719-016-9690-2.
133. Mehta, B. M., Deeth, H. C. Blocked Lysine in Dairy Products: Formation, Occurrence, Analysis, and Nutritional Implications / B.M. Mehta, H.C. Deeth // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015. – Vol.15, Iss.1, P.206–218, doi:10.1111/1541-4337.12178.
134. Wang Y. Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal / Y. Wang, C.-T. Ho // *Chemical Society Reviews*, 2012. – Vol.41, Iss.11, P.4140-4149, doi:10.1039/c2cs35025d.
135. Леонова Т.С. Влияние конечных продуктов глубокого гликирования на клеточные процессы / Т.С. Леонова, М.В. Вихнина, Т.В. Гришина [и др] // *Международный научно-исследовательский журнал*, 2018. – № 12, Вып.78, Часть 1, С.185-194, doi: 10.23670/IRJ.2018.78.12.034.
136. Спасов А. А., Ращенко А. И. Терапевтический потенциал разрывателей поперечных сшивок гликированных белков / А.А. Спасов, А.И. Ращенко // *Вестник Волгму*, 2016. – Вып. №1, Вып.57, С.12-15.
137. Вавилова А.А. Гликационный стресс и фотостарение кожи / А.А. Вавилова, Е.И. Губанова, В.В. Гладько // *Российский журнал кожных и венерических болезней*, 2017. – Т.20, №4, P.243-248, doi: 10.18821/1560-9588-2017-20-4-243-248.

138. Ансари Н.А. Неферментативное гликозилирование белков: от диабета до рака / Н.А. Ансари, З. Рашид // Биомедицинская химия, 2010. – Т.56, Вып.2, С.168-178.
139. Иванникова Е.В. Роль конечных продуктов гликирования и их рецепторов в развитии осложнений сахарного диабета / Е.В. Иванникова, О.М. Смирнова // Эффективная фармакотерапия, 2019. – Вып.5, С.20-26.
140. Baynes, J.W. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis / J.W. Baynes, S.R. Thorpe // Free Radical Biology and Medicine, 2000. – Vol.28, Iss.12, P.1708–1716, doi:10.1016/s0891-5849(00)00228-8.
141. Kaur S. Serum methylglyoxal level and its association with oxidative stress and disease severity in patients with psoriasis / S. Kaur, K. Zilmer, V. Leping, [et al] // Archives of Dermatological Research, 2013. – Vol.305, Iss.6, P.489–494, doi:10.1007/s00403-013-1362-5.
142. Kiuchi K. Increased serum concentrations of advanced glycation end products: a marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients / Kiuchi K. // Heart, 2001. – Vol.85, Iss.1, P.87–91. doi:10.1136/heart.85.1.87.
143. Genuth S. Glycation and Carboxymethyllysine Levels in Skin Collagen Predict the Risk of Future 10-Year Progression of Diabetic Retinopathy and Nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Participants With Type 1 Diabetes / S. Genuth, W. Sun, P. Cleary [et al] // Diabetes, 2005. – Vol.54, Iss.11, P.3103–3111, doi:10.2337/diabetes.54.11.3103.
144. Menini S. The advanced glycation end-product N ϵ -carboxymethyllysine promotes progression of pancreatic cancer: implications for diabetes-associated risk and its prevention / S. Menini, C. Iacobini, L. de Latouliere [et al] // The Journal of Pathology, 2018. – Vol.245, Iss.2, P.197–208, doi:10.1002/path.5072.
145. Heijst J.W.J. Advanced Glycation End Products in Human Cancer Tissues: Detection of N ϵ -(Carboxymethyl)lysine and Argpyrimidine / J.W.J. Heijst, H.W.M. Niessen, K. Hoekman [et al] // Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. – Vol.1043, Iss.1, P.725–733, doi:10.1196/annals.1333.084.

146. Sasaki N. Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques / N. Sasaki, M. Takeuchi, H. Chowei // *Neuroscience Letters*, 2002. – Vol.326, Iss.2, P.117–120, doi:10.1016/s0304-3940(02)00310-5.
147. Лебедев П.А. Флюоресцентный метод определения содержания конечных продуктов гликирования в коже у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией и катарактой / П.А. Лебедев, И.В. Малов, Е.С. Пшеницына [etal] // *Практическая медицина*, 2018. – Т.16, №3, 110-113.
148. Paul R.G. The effect of advanced glycation end product formation upon cell-matrix interactions / R.G. Paul, A.J. Bailey // *The international journal of biochemistry & cell biology*, 1999. – Vol. 31. №6. P.653–660, doi: 10.1016/s1357-2725(99)00023-0.
149. Oya T. Methylglyoxal Modification of Protein / T. Oya, N. Hattori, Y. Mizuno [et al] // *Journal of Biological Chemistry*, 1999. – Vol.274, Iss.26, P.18492–18502, doi:10.1074/jbc.274.26.18492.
150. Casselmann C. Age-Dependent Expression of Advanced Glycation End Product Receptor Genes in the Human Heart / C. Casselmann, A. Reimann, I. Friedrich [et al] // *Gerontology*, 2004. – Vol.50, Iss.3, P.127–134, doi:10.1159/000076770.
151. Успенская Ю.А. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления / Ю.А. Успенская, К. Комлева, Е.А. Пожиленкова [и др.] // *Вестник РАМН*, 2015. – Т.70, Вып.6, с. 694-700.
152. Lander H.M. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress/ H.M. Lander, J.M. Tauras, J.S. Ogiste et al.// *Journal of Biological Chemistry*, 1997.– Vol. 272, P.17810-17814, doi: 10.1074/jbc.272.28.17810.
153. Neumann A. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-κB activation and cytokine expression / A. Neumann, R. Schinzel, D. Palm [et al] // *FEBS Letters*, 1999. – Vol.453, Iss.3, 283–287. doi:10.1016/s0014-5793(99)00731-0.

154. Ren X. Advanced glycation end-products decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells / X. Ren, L. Ren, Q. Wei [et al]// Cardiovascular Diabetology, 2017. – Vol.16, Iss.1, doi:10.1186/s12933-017-0531-9.
155. Проскурина А.С. Экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции в дендритных клетках человека, активированных двуцепочечной днк / Проскурина А.С., Орищенко К.Е., Поттер Е.А [и др]// Вавиловский журнал генетики, 2017. – Т.21, №6, С 717-727.
156. Мартынова Е. А. Регуляция активности каспаз в апоптозе / Е. А. Мартынова // Биорганическая химия, 2003. – Т.29, Вып.5, С.518-543.
157. Rouhiainen A. RAGE-Mediated Cell Signaling / A. Rouhiainen, J. Kuja-Panula, S. Tumova [et al] //In: Calcium-Binding Proteins and RAGE. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)/ Ed. C. Heizmann. – Humana Press, Totowa, NJ., 2012. – Vol 963. P.239–263. doi:10.1007/978-1-62703-230-8_15.
158. Успенская Ю.А. Рецепторы конечных продуктов гликирования белков RAGE: лиганды, биологические эффекты и роль в нейродегенерации / Успенская Ю.А., Горина Я.В., Салмин В.В. [и др.] // Вестник Новосибирского гос. ун-та. Серия: Биология, клиническая медицина, 2014. – Т. 12, Вып. 4. С. 68–76.
159. Vlassara H. Nonlinear partial differential equations and applications: Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy / H. Vlassara, W. Cai, J. Crandall [et al] // Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. – Vol.99, Iss.24, P.15596–15601, doi:10.1073/pnas.242407999.
160. Vlassara, H. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling / H.Vlassara, M. Brownlee, K. Manogue [et al] // Science, 1998. – Vol.240, Iss.4858, P.1546–1548, doi:10.1126/science.3259727.
161. Wang L. RAGE Plays a Role in LPS-Induced NF- κ B Activation and Endothelial Hyperpermeability / L. Wang, J. Wu, X. Guo [et al] // Sensors, 2017. – Vol.17, Iss.4, Article number 722, doi:10.3390/s17040722.

162. Blondonnet R. RAGE inhibition reduces acute lung injury in mice / R. Blondonnet, J. Audard, C. Belville [et al] // *Scientific Reports*, 2017. – Vol.7, Iss.1, doi:10.1038/s41598-017-07638-2.
163. Jabaudon M. Receptor for advanced glycation end-products and ARDS prediction: a multicentre observational study / M. Jabaudon, P. Berthelin, T. Pranal [et al] // *Scientific Reports*, 2018. – Vol.8, Iss.1, doi:10.1038/s41598-018-20994-x.
164. Yamawaki H. Methylglyoxal mediates vascular inflammation via JNK and p38 in human endothelial cells / H. Yamawaki, K. Saito, M. Okada [et al] // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2008. – Vol.295, Iss.6, P.1510–1517, doi:10.1152/ajpcell.00252.2008.
165. Vulesevic B. Methylglyoxal-Induced Endothelial Cell Loss and Inflammation Contribute to the Development of Diabetic Cardiomyopathy / B. Vulesevic, B. McNeill, F. Giacco [et al] // *Diabetes*, 2016. – Vol.65, Iss.6, P.1699–1713, doi:10.2337/db15-0568.
166. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging / M. Brownlee // *Annual Review of Medicine*, 1995. – Vol.46, Iss.1, P.223–234, doi:10.1146/annurev.med.46.1.223.
167. Иванникова Е.В. Конечные продукты гликирования, факторы роста фибробластов и развитие атеросклероза у больных сахарным диабетом 2 типа / Е.В. Иванникова, В.Ю. Калашников, О.М. Смирнова // *Проблемы эндокринологии*, 2016. –Т.62, №5, С.26-27.
168. Fishman S.L. The role of advanced glycation end-products in the development of coronary artery disease in patients with and without diabetes mellitus: a review / S.L. Fishman, H. Sonmez, C. Basman [et al] // *Molecular Medicine*, 2018. – Vol.24, Iss.1, doi:10.1186/s10020-018-0060-3.
169. Душкин М.И. Макрофаги и атеросклероз: патофизиологические и терапевтические аспекты / М.И. Душкин // *Сибирский научный медицинский журнал*, 2006. – №2, С.47-55.

170. Козлов С.Г. Избыточное образование конечных продуктов гликирования как возможная причина повышенного риска возникновения рестеноза после стентирования коронарных артерий у больных сахарным диабетом / С.Г. Козлов, З.А. Габбасов, С.В. Бязрова // *Атеросклероз и дислипидемии*, 2015. – № 3. С.5-13.
171. Дмитриев В.А. Неспецифическое воспаление и структурные изменения артерий у мужчин с гипертонической болезнью среднего и высокого риска развития сердечно-сосудистых осложнений / В.А. Дмитриев, Е.В. Ошепкова, В.Н. Титов [и др.] // *Терапевтический архив*, 2012. – №9, С.53-57.
172. Войтковская К.С. Синдром острого повреждения легких: определение, патогенез, экспериментальные модели и роль мезенхимальных стволовых клеток при лечении животных / К.С. Войтковская, А.Л. Черняев // *Вестник современной клинической медицины*, 2012. – Т.5, №2, С.60-67.
173. Pelosi P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different / P. Pelosi, D. D'Onofrio, D. Chiumello [et al] // *European Respiratory Journal*, 2003. – Vol.22, P.48–56, doi:10.1183/09031936.03.00420803.
174. Новикова Н.А. Молекулярные аспекты взаимодействия вирусов с клеткой. Учебное пособие / Н.А. Новикова – Нижний Новгород: Изд-во: ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2015. – 87 с.
175. *Influenza Report* / Eds. Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W. – Flying Publisher 2006. – 225 p.
176. Fukuyama S. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors / S. Fukuyama, Y. Kawaoka // *Current Opinion in Immunology*, 2011. – Vol.23, Iss.4, P.481–486, doi:10.1016/j.coi.2011.07.016.
177. Wasik B.R. Effects of Sialic Acid Modifications on Virus Binding and Infection / B.R. Wasik, K.N. Barnard, C.R. Parrish // *Trends in Microbiology*, 2016. – Vol.24, Iss.12, P.991–1001. doi:10.1016/j.tim.2016.07.005.
178. Ramos-Nascimento A. KIF13A mediates trafficking of influenza A virus ribonucleoproteins / A. Ramos-Nascimento, B. Kellen, F. Ferreira [et al] // *Journal of Cell Science*, 2017. – Vol.130, Iss.23, P.4038–4050, doi:10.1242/jcs.210807.

179. Bedi S.. Friend or Foe: The Role of the Cytoskeleton in Influenza A Virus Assembly / S. Bedi, A. Ono// *Viruses*, 2019. – Vol.11, Iss.1, Article number: 46, doi:10.3390/v11010046.
180. Чизмаджев Ю.А. Как вирус проникает в клетку / Ю.А. Чизмаджев // *Природа*, 2003. – N 4.-С.69-74.
181. Щелканов М.Ю. Патогенез гриппа: механизмы модуляции белками возбудителя / М.Ю. Щелканов, А.Ф. Попов, А.И. Симакова [и др.] // *Журнал инфектологии*, 2015. – Т.7, №2, С.31-46. doi: 10.22625/2072-6732-2015-7-2-31-46.
182. Lorieau J.L. The impact of influenza hemagglutinin fusion peptide length and viral subtype on its structure and dynamics / J.L. Lorieau, J.M. Louis, A. Vax // *Biopolymers*, 2012. – Vol.99, Iss.3, P.189–195, doi:10.1002/bip.22102.
183. Cros J.F. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses / J.F. Cros, P. Palese// *Virus Research*, 2003. – Vol.95, Iss.1-2, P.3–12, doi:10.1016/s0168-1702(03)00159-x.
184. Bui M. Role of the Influenza Virus M1 Protein in Nuclear Export of Viral Ribonucleoproteins / M. Bui, E.G. Wills, A. Helenius [et al]// *Journal of Virology*, 2000. – Vol.74, Iss.4, P.1781–1786, doi:10.1128/jvi.74.4.1781-1786.2000.
185. Смирнова Т.Д. Участие цитоскелета клетки в инфекционном цикле вирусов гриппа А / Т.Д. Смирнова, Д.М. Даниленко, А.В. Слита // *Цитология*, 2013. – Том 55, № 2, С.92-100.
186. Вопросы общей вирусологии: Учебное пособие / под ред. О.И. Киселёва, И.Н. Жилинской – СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2007. – 374 с.
187. Жилинская, И.Н. Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека / И.Н. Жилинская, А.А. Азаренок, Е.В. Ильинская [и др.]// *Вопросы вирусологии*, 2012. – Т.57,№2, С.20-23.
188. Cifuentes-Mucoz N. Direct cell-to-cell transmission of respiratory viruses: The fast lanes / N. Cifuentes-Mucoz, R. E. Dutch, R. Cattaneo // *PLOS Pathogens*, 2018. – Vol.14, Iss.6, Article number: e1007015, doi:10.1371/journal.ppat.1007015.

189. Павелкина В.Ф, Ласеева М.Г. эндогенная интоксикация и возможности ее коррекции при гриппе / В.Ф. Павелкина, М.Г. Ласеева // Казанский медицинский журнал, 2008. – Т.89, № 4. – С. 449-452.
190. Сергеева И.В. Особенности течения гриппа и вирусно-бактериальных пневмоний (по материалам многопрофильных стационаров г. Красноярск). Монография / И.В. Сергеева, И.В. Демко. – М.: ИД «Академия Естествознания», 2017. –179 с.
191. To K.K.W. Delayed Clearance of Viral Load and Marked Cytokine Activation in Severe Cases of Pandemic H1N1 2009 Influenza Virus Infection / K.K.W. To, I.F.N. Hung, I.W.S. Li [et al] // *Clinical Infectious Diseases*, 2010. – Vol.50, Iss.6, P.850–859, doi:10.1086/650581.
192. Mori I. Viremia induced by influenza virus / I. Mori, T. Komatsu, K. Takeuchi [et al] // *Microbial Pathogenesis*, 1995. – Vol.19, Iss.4, P.237–244.
193. Чарторижская Н.Н. Патологическая анатомия изменений внутренних органов при синдроме острого повреждения легких на фоне гриппа А/Н1N1 в Забайкальском крае / Н.Н. Чарторижская, А.В. Сепп, Е.В. Пруткина // *Кубанский научный медицинский вестник*, 2010. – Т.122, №8, С. 192-196.
194. Paget C. Mechanisms of Bacterial Superinfection Post-influenza: A Role for Unconventional T Cells / C. Paget, F. Trottein // *Frontiers in immunology*, 2019. – Vol.10, Iss.336, doi: 10.3389/fimmu.2019.00336.
195. Florescu D. F. The complex link between influenza and severe sepsis / D.F. Florescu, A.C. Kalil // *Virulence*, 2013. – Vol.5, Iss.1, P.137–142.
196. Егоров А.Ю. Проблема бактериальных осложнений при респираторных вирусных инфекциях / А.Ю. Егоров// *MicrobiologyIndependentResearchJournal*, 2018. –Vol.5, № 1. – P.1-11, doi: 10.18527/2500-2236-2018-5-1-1-11.
197. Сомова Л.М. Апоптоз и инфекционные болезни / Л.М. Сомова, Н.Н. Беседнова, Н.Г. Плехова // *Инфекция и иммунитет*, 2014. – Vol. 4, № 4, P. 303-314, doi: 10.15789/2220-7619-20144-303-318.

198. Фильченков А.А. Механизмы регуляции апоптоза и антиапоптотическое действие онкогенных вирусов / А.А. Фильченков, З.А. Бутенко // Биополимеры и клетка, 2000. – Т. 16, № 6, С. 455-467.
199. Ehrhardt C. Influenza A Virus NS1 Protein Activates the PI3K/Akt Pathway To Mediate Antiapoptotic Signaling Responses / C. Ehrhardt, T. Wolff, S. Pleschka [et al] // Journal of Virology, 2007. – Vol.81, Iss.7, P.3058–3067, doi:10.1128/jvi.02082-06.
200. Васин А.В. Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека / А.В. Васин, А.В. Петрова-Бродская, М.А. Плотникова [и др.] // Вопросы вирусологии, 2017. – Т.62, №6, С.246-258, doi: 10.18821/0507-4088-2017-62-6-246-258.
201. Zhao Y. Up-Regulated Expression of WNT5a Increases Inflammation and Oxidative Stress via PI3K/AKT/NF- κ B Signaling in the Granulosa Cells of PCOS Patients / Zhao Y., Zhang C., Huang Y. [et al] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015. – Vol.100, Iss.1, P.201–211, doi:10.1210/jc.2014-2419.
202. Bullock B, Benham MD. Bacterial Sepsis. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537054/> (Дата обращения 01.08.19).
203. Zhao J. Combination of sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) agonist and antiviral drug: a potential therapy against pathogenic influenza virus/ J.Zhao, M. Zhu, H. Jiang [et al] // Scientific Reports, 2019. – Vol.9, Iss.1, Article number: e5272, doi:10.1038/s41598-019-41760-7.
204. Maniatis N.A. The endothelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome / N.A. Maniatis, S.E. Orfanos // Current Opinion in Critical Care, 2008. – Vol.14, Iss.1, doi:10.1097/mcc.0b013e3282f269b9.
205. Armstrong S. M. Endothelial activation and dysfunction in the pathogenesis of influenza A virus infection / S.M. Armstrong, I. Darwish, W.L. Lee // Virulence, 2013. – Vol. 4, Iss. 6, P. 537–542, doi:10.4161/viru.25779.
206. Тяжелова В.Г. Роль взаимодействия доменов сигнальных белков и образуемых сигнальными белками комплексов в инициации апоптоза / В.Г.

- Тяжелова // Известия российской академии наук. Серия биологическая, 2007. – №2, С.133-144.
207. Hotchkiss R.S. Sepsis-induced apoptosis caused progressive profound depletion of B and CD⁺ T lymphocytes in humans / Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E. [et al] // The Journal of Immunology, 2001. – Vol.166, P.6952–6953, doi: 10.4049/jimmunol.166.11.6952.
208. Parrino J. Prevention of immune cell of apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections / J. Parrino, R.S. Hotchkiss, M. Bray// Emerging infectious diseases, 2007. – Vol.13, №2, P.191–197, doi:10.3201/eid1302.060963.
209. Zamarin D. Influenza Virus PB1-F2 Protein Induces Cell Death through Mitochondrial ANT3 and VDAC1 / D. Zamarin, A. Garcia-Sastre, X. Xiao [et al] // PLoS Pathogens, 2005. – Vol.1, Iss,1, Article number: e4, doi:10.1371/journal.ppat.0010004.
210. Varga Z.T. The influenza A virus protein PB1-F2 / Z.T. Varga, P. Palese // Virulence, 2011. – Vol.2, Iss.6, P.542–546, doi:10.4161/viru.2.6.17812
211. Pasricha G. Apoptotic and Early Innate Immune Responses to PB1-F2 Protein of Influenza A Viruses Belonging to Different Subtypes in Human Lung Epithelial A549 Cells / G. Pasricha, S. Mukherjee, A. K. Chakrabarti // Advances in Virology, 2018. – Vol. 1-12, doi:10.1155/2018/5057184.
212. Пат. RU 2 285 961 С2 Российская Федерация, Способ моделирования острого повреждения легких / Мороз В.В., Голубев А.М., Мещеряков Г.Н., Лысенко Д.В.; заявитель и патентообладатель ГУ Научно-исследовательский институт общей реаниматологии РАМН. - №2004134555/14; заявл. 2004.11.29; опубл. 2006.10.20.
213. Verjans E. Initiation of LPS-induced pulmonary dysfunction and its recovery occur independent of T cells / E. Verjans, S. Kanzler, K. Ohl [et al] // BMC Pulmonary Medicine, 2018. – Vol. 18, Iss.1, Article number: 174, doi:10.1186/s12890-018-0741-2.

214. Li L. Classical dendritic cells regulate acute lung inflammation and injury in mice with lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome / L. Li, L. Dong, D. Zhao [et al] // *International Journal of Molecular Medicine*, 2019. – Vol. 44, Iss. 2, P. 617-629, doi: 10.3892/ijmm.2019.4208.
215. Kasotakis G. Valproic acid mitigates the inflammatory response and prevents acute respiratory distress syndrome in a murine model of *Escherichia coli* pneumonia at the expense of bacterial clearance/ G. Kasotakis, M. Galvan, E. King [et al] // *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2017. – Vol. 82, Iss. 2, P.758-765, doi: 10.1097/ta.0000000000001389.
216. Li H. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS / H. Li, X. Zhou, H. Tan [et al] // *Oncotarget*, 2018 – Vol. 9, Iss. 2, P.1772–1784, doi: 10.18632/oncotarget.22744.
217. Zhang Y. Glycyrrhizin acid prevent hydrochloric acid-induced inhalational lung injury in mice through inhibition of MAPK pathway / Y. Zhang, J.-M. Du, X.-M. Deng // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2018. – Vol.11, Iss.9, P.9264-9271.
218. Власенко А.В. Механизмы патогенеза, диагностика и лечение острого респираторного дистресс-синдрома. Часть 1/ А.В. Власенко, А.М. Голубев, В. Г. Алексеев [и др] // *Медицинский алфавит*, 2017 – Т. 1, №5, С. 5-13.
219. Goncalves-de-Albuquerque C.F. Oleic Acid Induces Lung Injury in Mice through Activation of the ERK Pathway / C.F. Goncalves-de-Albuquerque, A.R. Silva, P. Burth [et al] // *Mediators of Inflammation*, 2012. – Vol.2012, P.1-11, doi: 10.1155/2012/956509.
220. Weiner R.E. Detection of Oleic Acid-Induced Lung Injury in Rats Using ¹¹¹In-Labeled Anti-Rat Intercellular Adhesion Molecule-1/ R.E. Weiner, D.E. Sasso, M.A. Gionfriddo [et al] // *The journal of nuclear medicine*, 2001. – Vol.42, №7, P.1109-1115.
221. Пат. RU 2 541 831 С2 Российская Федерация, Способ моделирования и фармакологической коррекции острого повреждения легких в эксперименте / Куликов О.А., Инчина В.И., Семенов А.В., Семёнова Е.В.; заявитель и

- патентообладатель ФГБУ ВПО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва. - №2013129259/14; заявл. 2013.06.25; опубл. 2015.02.20.
222. Smith B.J. Assessing the Progression of Ventilator-Induced Lung Injury in Mice / B.J. Smith, J.H.T. Bates // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2013. – Vol. 60, Iss. 12, P.3449-3457, doi:10.1109/tbme.2013.2267151.
223. Сабиров Д.М. ИВЛ-индуцированные повреждения легких / Д.М. Сабиров, Р.Ш. Мавлян-Ходжаев, Р.Н. Акалаев [и др.] // *Общая реаниматология*, 2014. – Т.10, № 6. – С. 24-31.
224. Wu C. Lipopolysaccharide-induced endotoxemia in corn oil-preloaded mice causes an extended course of lung injury and repair and pulmonary fibrosis: A translational mouse model of acute respiratory distress syndrome/ C. Wu, C.E. Evans, Z. Dai [et al] // *PLOS ONE*, 2017. – Vol.12, Iss.3, Article number: e0174327, doi:10.1371/journal.pone.0174327.
225. Tseng T.-L. Oroxylin-A Rescues LPS-Induced Acute Lung Injury via Regulation of NF- κ B Signaling Pathway in Rodents / T.-L. Tseng, M.-F. Chen, M.-J. Tsai [et al] // *PLOS ONE*, 2012. – Vol.7, Iss.10, Article number: e47403, doi:10.1371/journal.pone.0047403.
226. Dhanireddy S. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia / S. Dhanireddy, W.A. Altemeier, G. Matute-Bello [et al] // *Laboratory Investigation*, 2006. – Vol. 86, Iss. 8, P. 790–799, doi:10.1038/labinvest.3700440.
227. Traylor Z.P. Influenza A H1N1 induces declines in alveolar gas exchange in mice consistent with rapid post-infection progression from acute lung injury to ARDS/ Z.P. Traylor, F. Aeffner, I.C. Davis // *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2012. – Vol.7, Iss.3, P. 472–479, doi:10.1111/j.1750-2659.2012.00414.x.
228. Zhang Y. Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by a Swine 2009 H1N1 Variant in Mice / Y. Zhang, H. Sun, L. Fan [et al] // *PLOS ONE*, 2012. – Vol.7, Iss.1, e29347, doi:10.1371/journal.pone.0029347.
229. Xu T. Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Avian Influenza A (H5N1) Virus in Mice / T. Xu, J. Qiao, L. Zhao [et al] // *American Journal of*

Respiratory and Critical Care Medicine, 2006. – Vol.174, Iss.9, P.1011–1017, doi:10.1164/rccm.200511-1751oc.

230. Li Y. Mesenchymal stromal cell treatment prevents H9N2 avian influenza virus-induced acute lung injury in mice / Y. Li, J. Xu, W. Shi [et al] // Stem Cell Research & Therapy, 2016. – Vol.7, Iss.1, doi: 10.1186/s13287-016-0395-z.

231. Ng H.H. Doxycycline treatment attenuates acute lung injury in mice infected with virulent influenza H3N2 virus: Involvement of matrix metalloproteinases / H.H. Ng, T. Narasaraju, M.C. Phoon [et al] // Experimental and Molecular Pathology, 2012. – Vol.92, Iss.3, P.287–295, doi: 10.1016/j.yexmp.2012.03.003.

232. Serkedjieva J. Protective Effect of Polyphenol-Rich Extract on Acute Lung Injury in Influenza Virus Infected Mice / J. Serkedjieva, T. Stefanova, E. Krumova [et al] // Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2009. – Vol.23, Iss.3, P.1355–1359, doi:10.1080/13102818.2009.10817669.

233. Suliman H.B. Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase / H.B. Suliman, L.K. Ryan, L. Bishop [et al] // American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2001. – Vol.280, Iss.1, P.69-78, doi:10.1152/ajplung.2001.280.1.169.

234. Стандарты специализированной медицинской помощи [Электронный ресурс]. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/stranitsa-983/2-standarty-spetsializirovannoy-meditsinskoy-pomoschi> (Дата обращения 09.08.19).

235. Осидак Л.В. Грипп у детей. Клинико-патологические особенности, основные принципы диагностики и терапии. Методические рекомендации / Л.В. Осидак, В.П. Дриневский, И.М. Воронцов [и др.]. – Санкт-Петербург.: Серия «Методические рекомендации: специалисты специалистам». Выпуск 1, 2006. – 47 с.

236. Химиопрепараты и химиотерапия гриппа / О.И.Киселёв – СПб.: ООО «Издательство “Росток”», 2012. – 272 с.

237. Лазарева Н.Б., Журавлева М.В., Пантелеева Л.Р. Клинико-фармакологические подходы к современной противовирусной терапии гриппа / Н.Б. Лазарева, М.В. Журавлева, Л.Р. Пантелеева // Медицинский Совет, 2018. – №6, С.50-54, doi: 10.21518/2079-701X-2018-6-50-54.
238. Орлова Н.В. Грипп. диагностика, стратегия выбора противовирусных препаратов / Н.В. Орлова // Медицинский Совет, 2017. – №20, С.80-86, doi: 10.21518/2079-701X-2017-20-80-86.
239. Yuan S. Drugs to cure avian influenza infection-multiple ways to prevent cell death / S. Yuan // Cell Death and Disease, 2013. – Vol.4, Article number: e835, doi:10.1038/cddis.2013.367.
240. Zheng B.-J. Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus / B.-J. Zheng, K.-W. Chan, Y.-P. Lin [et al] // Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. – Vol.105, Iss.23, P.8091–8096, doi:10.1073/pnas.0711942105.
241. Wang C. Geldanamycin Reduces Acute Respiratory Distress Syndrome and Promotes the Survival of Mice Infected with the Highly Virulent H5N1 Influenza Virus/ C. Wang, P. Liu, J. Luo [et al]//Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017. – Vol. 7, Article number: 267, doi: 10.3389/fcimb.2017.00267.
242. Marczin N. Tyrosine kinase inhibitors suppress endotoxin- and IL-1 beta-induced NO synthesis in aortic smooth muscle cells / N. Marczin, A. Papapetropoulos, J.D. Catravas// American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1993. – Vol.265, Iss.3, P.1014–H1018, doi:10.1152/ajpheart.1993.265.3.h1014.
243. Chavany C. p185erbB2 binds to GRP94 in vivo. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2 / C. Chavany, E. Mimnaugh, P. Miller [et al] // The Journal of biological chemistry, 1996. – Vol.271, P.4974–4977, doi: 10.1074/jbc.271.9.4974.
244. Chase G. Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture / G. Chase, T. Deng, E. Fodor [et al] // Virology, 2008. – Vol.377, Iss.2, P.431-439, doi: 10.1016/j.virol.2008.04.040.

245. Козеко Л.Е. Изменения синтеза белков теплового шока и термоустойчивости проростков *Arabidopsis thaliana* при ингибировании Hsp90 гелданамицином / Л.Е. Козеко // Цитология, 2014. – Том 56, № 2, С. 419–426.
246. Zhang Y. Sulphoxythiocarbamates modify cysteine residues in HSP90 causing degradation of client proteins and inhibition of cancer cell proliferation / Y. Zhang, S. Dayalan Naidu, K. Samarasinghe [et al] // British journal of cancer, 2014. – Vol.110, P. 71–82, doi:10.1038/bjc.2013.710.
247. Ghosh S. Hsp90 C-Terminal Inhibitors Exhibit Antimigratory Activity by Disrupting the Hsp90 α /Aha1 Complex in PC3-MM2 Cells / S. Ghosh, H.E. Shinogle, G. Garg [et al] // ACS Chemical Biology, 2014. – Vol.10, Iss.2, P.577–590, doi:10.1021/cb5008713.
248. Новоселова Т.В. Влияние гелданамицина на экспрессию сигнальных белков и белков теплового шока в нормальных лимфоцитах мышей / Т.В. Новоселова, Д.А. Черенков, М.О. Хренов [и др.] // Цитология, 2008. – Т.50, № 7, С.629-635.
249. Baranovich T. The Hemagglutinin Stem-Binding Monoclonal Antibody VIS410 Controls Influenza Virus-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome / T. Baranovich, J.C. Jones, M. Russier [et al] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016. – Vol.60, Iss.4, P. 2118-2131, doi: 10.1128/AAC.02457-15.
250. Tharakaraman K. A broadly neutralizing human monoclonal antibody is effective against H7N9 / K. Tharakaraman, V. Subramanian, K. Viswanathan [et al] // Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. – Vol.112, Iss.35, P.10890–10895, doi:10.1073/pnas.1502374112.
251. Gaddam R.R. ACE and ACE2 in Inflammation: A Tale of Two Enzymes / R.R. Gaddam, S. Chambers, M. Bhatia // Inflammation & Allergy - Drug Targets, 2014. – Vol.13, Iss.4, P.224-234, doi: 10.2174/1871528113666140713164506.
252. Jin H.-Y. ACE2 Deficiency Enhances Angiotensin II-Mediated Aortic Profilin-1 Expression, Inflammation and Peroxynitrite Production / H.-Y. Jin, B. Song, G.Y. Oudit [et al] // PLoS ONE, 2012. – Vol.7, Iss.6, Article number: e38502, doi:10.1371/journal.pone.0038502.

253. Yang P. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) mediates influenza H7N9 virus-induced acute lung injury / P. Yang, H. Gu, Zh. Zhao [et al] // *Scientific Reports*, 2014. – № 4, Article number: 7027, doi: 10.1038/srep07027.
254. Imai Y. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure / Y. Imai, K. Kuba, S. Rao [et al] // *Nature*, 2005. – Vol.436, Iss.7047, P.112–116, doi:10.1038/nature03712.
255. Singer B.D. Regulatory T cell DNA methyltransferase inhibition accelerates resolution of lung inflammation / B.D. Singer, J.R. Mock, N.R. Aggarwal [et al] // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2015. – Vol.52, №5, P.641-652, doi: 10.1165/rcmb.2014-0327OC.
256. Rojas M. Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells in Repair of the Injured Lung / M. Rojas, J. Xu, C. R. Woods [et al] // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2005. – Vol.33, Iss.2, P.145-152, doi:10.1165/rcmb.2004-0330oc.
257. Kierdorf K. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond / K. Kierdorf, G. Fritz // *Journal of Leukocyte Biology*, 2013. – Vol.94, Iss.1, P. 55–68.
258. Stogsdill J.A. Embryonic overexpression of receptors for advanced glycation end products by alveolar epithelium induces an imbalance between proliferation and apoptosis / J.A. Stogsdill, M.P. Stogsdill, J.L. Porter [et al] // *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2012. – Vol.47, Iss.1, P.60–66, doi: 10.1165/rcmb.2011-0385OC.
259. Saadat S. Aminoguanidine affects systemic and lung inflammation induced by lipopolysaccharide in rats / S. Saadat, F. Beheshti, V.R. Askari [et al] // *Respiratory Research*, 2019. – Vol.20, Iss.1, doi: 10.1186/s12931-019-1054-6.
260. Tsuji C. Increased production of nitrotyrosine in lung tissue of rats with radiation-induced acute lung injury / C. Tsuji, S. Shioya, Y. Hirota [et al] // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000. – Vol.278, Iss.4, P.719–L725, doi: 10.1152/ajplung.2000.278.4.1719.

261. Kumar R. S. Inhibition of Advanced Glycation End products formation and inflammation in *C. elegans*: studies of potential of *Lyngbya* sp. against expression of stress related genes and Live cell imaging / R.S. Kumar, G. Shakambari, B. Ashokkumar [et al] // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019. – Vol.17, P.233-241, doi:10.1016/j.bcab.2018.11.020.
262. Zou C.-G. The DAF-16/FOXO Transcription Factor Functions as a Regulator of Epidermal Innate Immunity / C.-G. Zou, Q. Tu, J. Niu [et al] // *PLoS Pathogens*, 2013. – Vol.9, Iss.10, Article number: e1003660, doi:10.1371/journal.ppat.1003660.
263. Berry, J.P. Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from a freshwater species of *Lyngbya* isolated from the Florida Everglades / J.P. Berry, M. Gantar, R.E. Gawley [et al] // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2004. – Vol.139, Iss.4, P.231–238, doi:10.1016/j.cca.2004.11.005.
264. Bierhaus A. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappa B is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells / A. Bierhaus, S. Chevion, M. Chevion [et al] // *Diabetes*, 1997. – Vol.46, Iss.9, P.1481–1490, doi:10.2337/diab.46.9.1481.
265. Feng B. Atorvastatin exerts its anti-atherosclerotic effects by targeting the receptor for advanced glycation end products / Feng B., Xu L., Wang H. [et al] // *Biochimica et biophysica acta*, 2011. – Vol.1812, Iss.9, P.1130-1137, doi:10.1016/j.bbadis.2011.05.007.
266. Chen S. Inhibiting receptor for advanced glycation end product (AGE) and oxidative stress involved in the protective effect mediated by glucagon-like peptide-1 receptor on AGE induced neuronal apoptosis / S. Chen, L. Yin, Z. Xu [et al] // *Neuroscience Letters*, 2016. – Vol.612, P.193–198, doi:10.1016/j.neulet.2015.12.007.
267. Chang G.-J. Inhibition of Advanced Glycation End Products Formation Attenuates Cardiac Electrical and Mechanical Remodeling and Vulnerability to Tachyarrhythmias in Diabetic Rats / G.-J. Chang, Y.-H. Yeh, W.-J. Chen [et al] //

- Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019. – Vol.368, Iss.1, P.66-78, doi:10.1124/jpet.118.252080.
268. Li Y.M. Prevention of cardiovascular and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine / Y.M. Li, M. Steffes, T. Donnelly [et al] // Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. – Vol.93, Iss.9, P.3902–3907, doi:10.1073/pnas.93.9.3902.
269. Hammes H.P. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy / H.P. Hammes, S. Martin, K. Federlin [et al] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1991.– Vol.88, Iss.24, P.11555-11558, doi: 10.1073/pnas.88.24.11555.
270. Brownlee M. Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications / M. Brownlee // Diabetes, 1994. – Vol.43, Iss.6, P.836-841, doi: 10.2337/diab.43.6.836.
271. Wu J. Pentoxifylline alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis and early atherosclerosis in rats by inhibiting AGE and RAGE expression / J. Wu, M. Zhao, H. Zheng [et al] // Acta Pharmacologica Sinica, 2010. – Vol.31, Iss.10, P.1367-1375, doi:10.1038/aps.2010.110.
272. Beisswenger P.J. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes / P.J. Beisswenger, S.K. Howell, A.D. Touchette [et al] // Diabetes, 1999. – Vol.48, Iss.1, P.198-202, doi: 10.2337/diabetes.48.1.198.
273. Kochakian M. Chronic Dosing With Aminoguanidine and Novel Advanced Glycosylation End Product-Formation Inhibitors Ameliorates Cross-Linking of Tail Tendon Collagen in STZ-Induced Diabetic Rats / M. Kochakian, B.N. Manjula, J.J. Egan // Diabetes, 1996. – Vol.45, Iss.12, P.1694–1700, doi:10.2337/diab.45.12.1694.
274. Candido R. A Breaker of Advanced Glycation End Products Attenuates Diabetes-Induced Myocardial Structural Changes / R. Candido // Circulation Research, 2003. – Vol.92, Iss.7, P.785–792, doi:10.1161/01.res.0000065620.39919.20.
275. Forbes J.M. Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation / J.M. Forbes, T. Soulis, V. Thallas [et al] // Diabetologia, 2001. – Vol.44, Iss.1, P.108–114, doi: 10.1007/s001250051587.

276. Li X. Quercetin Inhibits Advanced Glycation End Product Formation by Trapping Methylglyoxal and Glyoxal / X. Li, T. Zheng, S. Sang [et al] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014. – Vol.62, Iss.50, P.12152–12158, doi:10.1021/jf504132x
277. Hafizur R.M. Prevention of advanced glycation end-products formation in diabetic rats through beta-cell modulation by *Aegle marmelos* / R.M. Hafizur, S. Momin, N. Fatima // *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017. – Vol.17, Iss.1, Article number: 227, doi:10.1186/s12906-017-1743-y.
278. Rahbara S. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation/ S. Rahbar, R. Natarajana, K. Yerneni [et al] // *Clinica Chimica Acta*, 2000. – Vol. 301, Iss. 1-2, P.65-77, doi: 10.1016/S0009-8981(00)00327-2.
279. Tanaka Y. Inhibitory effect of metformin on formation of advanced glycation end products / Y. Tanaka, H. Iwamoto, T. Onuma [et al] // *Current Therapeutic Research*, 1997. – Vol.58, Iss.10, P.693–697, doi:10.1016/s0011-393x(97)80103-8.
280. Adeshara K.A. Pioglitazone inhibits advanced glycation induced protein modifications and down-regulates expression of RAGE and NF- κ B in renal cells / K.A. Adeshara, S.B. Agrawal, S.M. Gaikwad [et al] // *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. – Vol.119, P.1154–1163, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.026.
281. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 [Электронный ресурс]. URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF> (Дата обращения 04.10.2018).
282. СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. N 51 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)" [Электронный ресурс]. URL: <https://rospotrebnadzor.ru/bitrix/redirect.php?event1=file&event2=download&event3=vivarii.docx&goto=/upload/iblock/e9e/vivarii.docx> (Дата обращения 02.08.19).

283. Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.scbmt.ru/mag/polojenie.pdf> (Дата обращения 02.08.19).
284. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях/ под редакцией Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. — М.: Профиль, 2010. — 358 с.
285. Талукдар Д. Критическое сравнение токсического и полезного действия метилглиоксаля/ Д. Талукдар, Б.С. Чаудхури, М. Рай [и др.] // Биохимия, 2009. — Том 74, Вып. 10, С. 1301-1313.
286. Jung E. Ethyl Pyruvate Prevents Renal Damage Induced by Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation End Products / E. Jung, W.S. Kang, K. Jo [et al] // Journal of Diabetes Research, 2019. — Vol. 2019, P. 1-9, doi:10.1155/2019/4058280
287. Berlanga J. Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds / J. Berlanga, D. Cibrian, I. Guillen [et al] // Clinical Science, 2005. — Vol.109, Iss.1, P.83-95, doi:10.1042/cs20050026
288. Nagai R. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications / R. Nagai, D.B. Murray, T.O. Metz [et al] // Diabetes, 2012. — Vol.61, Iss.3, P.549-559, doi:10.2337/db11-1120
289. Yu P.H. Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: implications for advanced glycation and diabetic complications / P.H. Yu, D.M. Zuo // Diabetologia, 1997. — Vol.40, Iss.11, P.1243-1250. doi: 10.1007/s001250050816
290. Общая вирусология: Методические указания / Н.А. Ожередова, М.Н. Вережкина, Е.В. Светлакова; Ставропольский государственный аграрный университет. — Ставрополь: АГРУС, 2013. - 50 с
291. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных/под ред. академика РАН Д.К. Львова. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2013. —1200 с.

292. Govindarajulu Z. Statistical Techniques in Bioassay / Z. Govindarajulu – Switzerland: Karger, 2001. – 234 p.
293. Barnard D.L. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy / D.L. Barnard // Antiviral Research, 2009. – Vol.82, Iss.2, P.110-122, doi: 10.1016/j.antiviral.2008.12.014.
294. Jonxis J.H.P. The determination of oxygen saturation in small amounts of blood, by means of the Pulfrich step photometer / J.H.P. Jonxis // Acta Medica Scandinavica, 1943. – Vol.115, Iss.5, P.425–428, doi: 10.1111/j.0954-6820.1943.tb15858.x.
295. Кассирский И.А. Клиническая гематология. / И.А. Кассирский, Г.А. Алексеев – М., «Медицина», 1970 – 800 с.
296. Манских В.Н. Патоморфология лабораторной мыши Т.1 Технические аспекты. Общая и органная патология / В.Н. Манских – ВАКО Москва, 2016. – 208 с.
297. Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике: Руководство / Под ред. П.Г.Малькова, Г.А.Франка – изд. 2-е дополненное – М. ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 108 с.
298. Янин В.Л. Учебно-методическое пособие для аспирантов очной формы обучения к практическим занятиям по дисциплине «Методы исследования в цитологии и гистологии». Учебно-методическое пособие / В.Л. Янин, О.М. Бондаренко, Н.А. Сазонова– Ханты Мансийск: БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 2015. – 65 с.
299. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. Издание пятое, исправленное и дополненное / Г.А. Меркулов – Изд. Медицина, Ленинградское отделение, 1969. – 424 с.
300. Matute-Bello G. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals / G. Matute-Bello, G. Downey, B.B. Moore [et al] // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2011. – Vol.44, Iss.5, P.725-738, doi: 10.1165/rcmb.2009-0210ST.

301. Yanagisawa K. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients / K. Yanagisawa, Z. Makita, K. Shiroshita [et al] // *Metabolism*, 1998. – Vol.47, Iss.11, P.1348–1353, doi: 10.1016/s0026-0495(98)90303-1.
302. Ровнягина Н.Р. Детектирование конформационных изменений альбумина при его гликировании и термической денатурации методами флуоресцентной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния / Н.Р. Ровнягина, Т.Н. Тихонова, Д.С. Молоденский [и др.] // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика*, 2017. –Т.17, Вып.3, С.179-190, doi: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-179-190.
303. Dunn J.S. Experimental alloxan diabetes in the rat / J.S. Dunn, N.G.B. Mclethie // *The Lancet*, 1943. – Vol.242, Iss.6265, P.384-387, doi: 10.1016/S0140-6736(00)87397-3.
304. Можейко Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета Часть I. Аллоксановый диабет / Л.А. Можейко // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, 2013. –№3, С.26-29.
305. Kikumoto Y. Sensitization to alloxan-induced diabetes and pancreatic cell apoptosis in acatalasemic mice / Y. Kikumoto, H. Sugiyama, T. Inoue [et al] // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010. – Vol.1802, Iss.2, P.240–246, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.10.009.
306. Kalungia A.C. Opuntia stricta cladode extract reduces blood glucose levels in alloxan-induced diabetic mice / A.C. Kalungia, M. Mataka, P. Kaonga [et al] // *International Journal of Diabetes Research*, 2018. – Vol., Iss.1, P.1-11,doi: 10.5923/j.diabetes.20180701.01.
307. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. Ю.А. Данилова, под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова – М., Практика, 1998. – 459 с.
308. Гржибовский А.М. Корреляционный анализ // *Экология человека*, 2008. – №. 9, С. 50-60.

309. Черняев А.Л. Патологическая анатомия пневмонии / А.Л. Черняев, М.В. Самсонова // Практическая пульмонология, 2012. – №4, С.46-49.
310. Lv J. Pulmonary immune responses to 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in mice/ J. Lv, D. Wang, Y.-H. Hua [et al] // BMC Infectious Diseases, 2014. – Vol.14, Articlenumber:197, doi:10.1186/1471-2334-14-197.
311. Лискина И.В. Гистоморфологическая характеристика идиопатических интерстициальных пневмоний / И.В. Лискина, Н.Е. Моногарова // Український пульмонологічний журнал, 2007. –№ 4, С.37-43.
312. Пруткина Е.В. Воспроизведение в эксперименте стадий развития респираторного дистресс-синдрома / Е.В. Пруткина, А.В. Сепп, Н.Н. Цибилов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. – Т.155, № 6, С.784-787.
313. Short K. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome / K. Short, E. Kroeze, R. Fouchier [et al] // The Lancet. InfectionDisease, 2014. –Vol.14, Iss.1, P.57–69, doi:10.1016/S1473-3099(13)70286-X.
314. Патофизиология углеводного обмена. Сахарный диабет. Методическая разработка для самостоятельной работы студентов лечебного и педиатрического факультетов / под ред. проф. Г.В. Порядина, проф. Ж.М. Салмаси – М., РГМУ, 2013. – 38 с.
315. Khan M.I. Hypoxia driven glycation: Mechanisms and therapeutic opportunities / M.I. Khan, S. Rath, V.M. Adhami [et al] // Seminars in cancer biology, 2018. – Vol.49, P.75-82, doi:10.1016/j.semcancer.2017.05.008.
316. Емельянов В.В. Неферментативное гликозилирование белков: химия, патофизиология, перспективы коррекции / В.В. Емельянов, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2010. – Т.8, Вып.1, С.3-15.
317. van Zoelen M.A. The role of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in infection / M.A. van Zoelen, A. Achouiti, T. van der Poll // Critical Care, 2011. – Vol.15, Iss.208, doi: 10.1186/cc9990.

318. Rojas A. Advanced Glycation and ROS: a link between diabetes and heart failure / A. Rojas, E. Mercadal, H. Figueroa [et al] // *Current Vascular Pharmacology*, 2008. – Vol.6, Iss.1, P.44-51, doi: 10.2174/157016108783331312
319. Козинец Г.И. Морфофункциональное состояние эритроцитов периферической крови при поздних сосудистых осложнениях сахарного диабета типа 2 (обзор литературы) / Г.И. Козинец, Т.П. Бондарь // *Клиническая лабораторная диагностика*, 2002. – №12, С.22-34.
320. Герасимов Л.В., Мороз В.В., Исакова А.А. Микрореологические нарушения при критических состояниях. / Л.В. Герасимов, В.В. Мороз, А.А. Исакова // *Общая реаниматология*, 2010. – Т.6, №1, С.74-78, doi: 10.15360/1813-9779-2010-1-74.
321. Basta G. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses / G. Basta, G. Lazzarini, M. Massaro [et al] // *Circulation*, 2002. – Vol.105, Iss.7, P.816-822, doi:10.1161/hc0702.104183.
322. Ohtsu A. Advanced glycation end products and lipopolysaccharides stimulate interleukin-6 secretion via the RAGE/TLR4-NF- κ B-ROS pathways and resveratrol attenuates these inflammatory responses in mouse macrophages / A. Ohtsu, Y. Shibutani, K. Seno [et al] // *Experimental and therapeutic medicine*, 2017. – Vol.14, Iss.5, P.4363-4370, doi:10.3892/etm.2017.5045.
323. Иванникова Е.В. Изучение роли факторов роста фибробластов (BFGF, TGFB1), маркеров воспаления (IL-6, TNF-А, CRP) и конечных продуктов гликирования (AGE, RAGE) у пациентов с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа / Е.В. Иванникова, К.В. Мелкозёров, В.Ю. Калашников [и др.] // *Сахарный диабет*, 2013. – №.3, Вып.60, С.64-70.
324. Yan S.D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins / S.D. Yan, A.M. Schmidt, G.M. Anderson [et al] // *The Journal of biological chemistry*, 1994. – Vol.269, Iss.13, P.9889-9897.

325. Wang J. Methylglyoxal administration induces inflammatory response and microglial activation in the mouse retina / J. Wang, J. Lin, M. Aras [et al] // *Diabetologie und Stoffwechsel*, 2014. – Vol.9, Article number: S01, doi: 10.1055/s-0034-1375012.
326. Schalkwijk C. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications and other age-related diseases / C. Schalkwijk, C.D. Stehouwer // *Physiological Reviews*, 2019. – Vol.100, Iss.1, P.407-461, doi:10.1152/physrev.00001.2019
327. Афанасьева О.И. Отягощенный преморбидный фон как фактор риска неблагоприятного течения гриппа у детей / О.И. Афанасьева, Е.Г. Королева, В.П. Дриневский [и др.] // *Детские инфекции*, 2011. – Т.10, №4, С.25-28.
328. Marshall R.J. Glycemic Variability in Diabetes Increases the Severity of Influenza / R.J. Marshall, P. Armart, K.D. Hulme [et al] // *mBio*, 2020. – Vol.11, Iss.2, Article number: e02841-19, doi:10.1128/mBio.02841-19.
329. von der Beck D. Characteristics and outcomes of a cohort hospitalized for pandemic and seasonal influenza in Germany based on nationwide inpatient data / D. von der Beck, W. Seeger, S. Herold [et al] // *PLoS ONE*, 2017. – Vol.12, Iss.7, Article number: e0180920, doi: 10.1371/journal.pone.018092.
330. Soubani A.O. The outcome of acute respiratory distress syndrome in relation to body mass index and diabetes mellitus / A.O. Soubani, W. Chen, H. Jang // *Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care*, 2015. – Vol.44, Iss.5, P.441–447. doi: 10.1016/j.hrtlng.2015.06.007.
331. Yu S. Role of Diabetes in the Development of Acute Respiratory Distress Syndrome / S. Yu, D.C. Christiani, B.T. Thompson [et al] // *Critical Care Medicine*, 41(12), 2720–2732. doi:10.1097/ccm.0b013e318298a2eb.
332. Djordjević Z. Risk factors for acute respiratory distress syndrome development in patients with type A influenza (H1N1) / Z. Djordjević, Z. Lazić, O. Gajović [et al] // *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 2012. – Vol.140, Iss.7-8, P.441-447, doi:10.2298/sarh1208441d.

333. Boyle A.J. Identifying associations between diabetes and acute respiratory distress syndrome in patients with acute hypoxemic respiratory failure: an analysis of the LUNG SAFE database / A.J. Boyle, F. Madotto, J.G. Laffey [et al] // *Critical Care*, 2018. – Vol.22, Iss.1, Article number 268, doi: :10.1186/s13054-018-2158-y.
334. Wang L.-M. Hypoxia-induced acute lung injury is aggravated in Streptozotocin diabetic mice / L.-M. Wang, N.-Z. Zhong, S.-J. Liu [et al] // *Experimental Lung Research*, 2014. – Vol.41, Iss.3, P.146–154, doi:10.3109/01902148.2014.983280.