

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Марченко Владимир Александрович

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ,  
ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГРИППА А(Н1N1)pdm09

1.5.10 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Жилинская Ирина Николаевна

Санкт-Петербург

2022

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	7
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Структура и функции белков вируса гриппа А.....	16
1.2 Патогенез гриппа .....	21
1.2.1 Молекулярные механизмы патогенеза гриппа.....	23
1.2.1.1 Интерферон и гены интерферонового ответа .....	23
1.2.2.2 Нейтрофилы и НК-клетки .....	26
1.2.2.3 Система комплемента .....	28
1.2.2.4 Провоспалительные цитокины и хемокины .....	29
1.3 Роль эндотелия в патогенезе гриппа .....	33
1.3.1 Морфоструктурная характеристика эндотелия кровеносных сосудов человека .....	33
1.3.2 Функциональные свойства эндотелиальных клеток .....	35
1.3.3 Роль эндотелия в регуляции тонуса кровеносных сосудов .....	38
1.3.4 Роль эндотелия в регуляции системы гемостаза .....	42
1.3.5 Роль эндотелия в воспалительной реакции .....	44
1.3.6 Грипп и эндотелий кровеносных сосудов .....	45
1.4 Грипп и сердечно-сосудистая система .....	49
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	53
2.1 Материалы исследования .....	53
2.1.1 Вирусы.....	53
2.1.2 Клеточные линии .....	53
2.1.3 Лабораторные животные .....	53
2.1.4 Плазма крови.....	54

2.2	Методы исследования.....	54
2.2.1	Вирусологические методы .....	54
2.2.1.1	Инфекционная активность вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в развивающихся куриных эмбрионах .....	54
2.2.1.2	Инфекционная активность вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в культуре клеток эндотелия EA.hy926 .....	55
2.2.2	Гистологические исследования.....	57
2.2.3	Иммуногистохимические исследования.....	57
2.2.3.1	Детекция NP антигена вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в культуре клеток эндотелия EA.hy926 методом иммуноферментного анализа .....	57
2.2.3.2	Детекция NP антигена вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в кровеносных сосудах легких и брыжейки крыс иммуногистохимическим методом .....	58
2.2.4	Иммуноферментный метод .....	61
2.2.4.1	Определение уровня антител к tPA в плазме крови крыс методом сэндвич иммуноферментного анализа .....	61
2.2.4.2	Определение уровня антител к PAI-1 в плазме крови крыс методом иммуноферментного анализа .....	61
2.2.5	Физиологические методы.....	62
2.2.5.1	Определение вазомоторной активности кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс .....	62
2.2.5.2	Моделирование экспериментальной гриппозной инфекции на крысах ..	63
2.2.5.3	Моделирование острой кардиомиопатии .....	64
2.2.6	Биоинформационные методы.....	65
2.2.6.1	Компьютерный поиск гомологичных аминокислотных последовательностей в эндотелиальных факторах (eNOS, PAI-1 и tPA) и вирусе гриппа .....	65

2.2.7	Статистический анализ данных .....	65
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		67
3.1	Влияние вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 на уровень экспрессии эндотелиальных факторов в культуре клеток эндотелия EA.hy926.....	67
3.1.1	Инфекционная активность вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в культуре клеток эндотелия EA.hy926 .....	67
3.1.2	Исследование уровня экспрессии eNOS и PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.....	68
3.1.2.1	Исследование уровня экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.....	69
3.1.2.2	Уровень экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.....	71
3.2	Функциональная активность кровеносных сосудов крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.....	74
3.2.1	Определение инфекционной активности вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 при адаптации в легких крыс.....	74
3.2.2	Клинические симптомы и масса тела крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.....	76
3.2.3	Гистологическое исследование кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.....	77
3.2.4	Детекция NP антигена в кровеносных сосудах легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.....	79
3.2.5	Оценка вазомоторной активности кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.....	81
3.2.6	Исследование экспрессии eNOS, tPA и PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 .....	86

3.2.6.1	Исследование экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудах легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 .....	87
3.2.6.2	Исследование экспрессии PAI-1 в кровеносных сосудах легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.....	89
3.2.6.3	Исследование экспрессии tPA в кровеносных сосудах легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.....	92
3.2.7	Определение концентрации PAI-1 и tPA в плазме крови крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.....	95
3.3	Функциональная активность кровеносных сосудов крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 .....	97
3.3.1	Детекция острой кардиомиопатии .....	97
3.3.2	Масса тела и клинические симптомы у крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.....	99
3.3.3	Определение инфекционной активности вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в легких и брыжейке крыс с острой кардиомиопатией .....	100
3.3.4	Оценка вазомоторной активности кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 ....	101
3.3.5	Исследование экспрессии eNOS, tPA и PAI-1 в кровеносных сосудах брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 .....	106
3.3.5.1	Исследование экспрессии eNOS в кровеносных сосудах брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 .	106
3.3.5.2	Исследование экспрессии PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 .....	109
3.3.5.3	Исследование экспрессии tPA в кровеносных сосудах брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 ....	113

3.3.6	Определение концентрации PAI-1 и tPA в плазме крови крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 .....	116
3.4	Сравнение аминокислотной последовательности эндотелиальных факторов с аминокислотной последовательностью белков вируса гриппа A(H1N1)pdm09 ..	118
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	120
	ВЫВОДЫ .....	132
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	133
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	135

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Грипп представляет собой инфекционное заболевание, занимающее одно из доминирующих положений в структуре инфекционной заболеваемости, как по числу случаев заболевания, так и по наносимому экономическому ущербу. Так, сезонный грипп, предположительно, вызывает заболевание у 1 млрд людей, в то время как тяжелое течение инфекции регистрируют, в среднем, у 3-5 млн больных. Количество летальных исходов от сезонного гриппа регистрируют у 290-650 тыс. заболевших [1]. Несмотря на тот факт, что интенсивным изучением возбудителя гриппа занимаются во многих лабораториях мира, патогенез данной инфекции остается предметом повышенного интереса большого числа исследователей. Связано это с тем, что проявления гриппозной инфекции достаточно разнообразны и включают клинические синдромы, касающиеся, не только верхнего и нижнего отдела респираторного тракта, но и системы гемостаза, а также сердечно-сосудистой системы. Взаимосвязь гриппозной инфекции и сердечно-сосудистых заболеваний клиницисты отмечали еще с конца 50-х годов XX века [2-4]. Так, грипп может приводить к различным аритмиям, острой ишемии миокарда, инфаркту, обострению застойной сердечной недостаточности и избыточной смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [5-10]. Последнее особенно важно, так как с окончанием эпидемии наблюдается избыточная (дополнительная) смертность от гриппа в группах риска: при наличии заболеваний сердца – 104 на 100 тыс. переболевших, а у больных с хронической патологией сердца и легких – 870 на 100 тыс. переболевших [11].

Одной из ведущих причин развития сердечно-сосудистых заболеваний считают дисфункцию клеток эндотелия. Установленным фактом для вируса гриппа является то, что он вызывает дисфункцию клеток эндотелия и активно вмешивается в систему гемостаза хозяина. Так, в НИИ гриппа были получены данные о том, что вирус гриппа А разных подтипов репродуцируется в клетках

эндотелия и вызывает гипоксию, дисфункцию и изменение их морфологии [12, 13].

В настоящее время установлено, что система гемостаза и эндотелий кровеносных сосудов являются мишенями для гриппозной инфекции, что открывает новые аспекты патогенеза этой инфекции и, соответственно, новые подходы к их терапии. Участие системы гемостаза и эндотелия при гриппе подтверждается клинической картиной в виде носовых кровотечений, геморрагий на коже и слизистых, микрогематурии, острого респираторного дистресс синдрома (ОРДС), диссеминированного внутрисосудистого синдрома (ДВС-синдрома), геморрагического отека легких и головного мозга. Подобная тяжелая клиническая картина отмечалась в эпидемиях гриппа 2009-2011, 2015-2016 гг. [14, 15].

Механизмы воздействия вируса гриппа на систему гемостаза и сосудистый эндотелий до сих пор остаются недостаточно изученными, тогда как их понимание является чрезвычайно актуальным, т.к. позволяет усовершенствовать схемы лечения гриппа.

### **Степень разработанности темы исследования**

Исследования по изучению механизмов развития дисфункции эндотелия и вовлечении системы гемостаза стали ведущими в изучении патогенеза вирусных инфекций, включая грипп. Оказалось, что большинство вирусов вызывают нарушения со стороны эндотелия сосудов и системы гемостаза, что можно объяснить тем, что система гемостаза принимает активное участие в защите организма от патогена [16]. Кроме того, появляется все больше данных о том, что повреждение эндотелия и изменения в системе гемостаза при инфекционных заболеваниях, включая вирусные, являются причиной развития аутоиммунных состояний [17].

В настоящее время установлено, что вирус гриппа поражает эндотелий кровеносных сосудов, вызывая дисфункцию эндотелия, что является одной из основных причин развития сердечно-сосудистых заболеваний [18]. Однако

механизм развития дисфункции эндотелия при гриппе до конца не выяснен, что не дает возможность прогнозирования развития осложнений при гриппе, особенно у больных, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Исследование роли эндотелия и системы гемостаза в репродукции и патогенезе вируса гриппа за последние 5-7 лет отражено более чем в 100 публикациях. Все они посвящены выяснению роли отдельных компонентов системы гемостаза при гриппозной инфекции. Так, было показано, что при гриппе выявляют модуляцию активности таких белков системы гемостаза, как фактора фон Виллебранда (vWF), матриксных металлопротеиназ, ингибитора фактора фон Виллебранда (ADAMTS 13), эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), тканевого активатора плазминогена (tPA), ингибитора тканевого активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), тканевого фактора (TF); возникает изменение агрегации тромбоцитов, нарушения проницаемости кровеносных сосудов и др. [19].

Одним из наиболее важных синтезируемых эндотелиальных факторов является эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS). Продуктом работы eNOS является оксид азота (NO) – эндогенный газ с вазодилатирующим действием, постоянно регулирующий диаметр кровеносных сосудов и поддерживающий антипролиферативное и антиапоптогенное действие в стенках кровеносных сосудов. Поддержание постоянного физиологического уровня NO за счет работы eNOS, играет исключительно важную роль в поддержании эндотелиального гомеостаза [20]. Уменьшение продукции NO, вызванное снижением активности eNOS, связывают с воспалительными процессами в кровеносных сосудах, атеросклерозом, фиброзом и нарушением тонуса стенки сосудов [21].

Важная роль в регуляции гемостаза при гриппе принадлежит PAI-1 и tPA. PAI-1 (serpin E1) является сериновой протеазой, синтезируемой преимущественно эндотелиальными клетками. В нормальных физиологических условиях PAI-1 контролирует активность урокиназного активатора плазминогена (uPA), тканевого активатора плазминогена (tPA), плазмина, матриксных металлопротеиназ, тем самым поддерживая тканевой гомеостаз [22]. PAI-1 играет

ключевую роль в тромботических состояниях, таких как тромбоз глубоких вен и инфаркт миокарда [23]. Снижение активности PAI-1 связывают с развитием геморрагического синдрома, а его повышение с риском тромбообразования.

tPA является сериновой протеазой, основная роль которой состоит в превращении плазминогена в плазмин для диссоциации фибринового сгустка, т.е. является активным участником фибринолиза. Показано, что tPA, помимо выполнения важной роли в развитии воспалительных реакций при вирусных инфекциях, может функционировать и как цитокин, регулируя некоторые сигнальные пути клетки, в частности, активируя NF-κB транскрипционный фактор, ответственный за развитие воспалительной реакции [24]. Установлено также, что tPA играет роль и в определении вирулентности вируса гриппа, т.к. плазмин (высвобождаемый из плазминогена путем его расщепления tPA) является и одним из основных ферментов, расщепляющих гемагглютинин вируса гриппа [25]. Точный механизм активации воспалительных процессов с участием tPA и PAI-1 неизвестен. Имеются данные о том, что при инфицировании клеток эндотелия активность tPA повышается через 12 часов после инфицирования почти в два раза. Повышение активности tPA в инфицированных клетках эндотелия отмечалось и при воздействии на клетки отдельных белков вируса гриппа (гемагглютинина и нейраминидазы) [26].

В отношении PAI-1 были получены данные, что эта сериновая протеаза снижает скорость распространения вируса гриппа, блокируя расщепление гемагглютинина [27, 28], что коррелирует с данными о роли tPA в репродукции гриппа [29]. Кроме того, получены данные и о том, что в развитии ДВС-синдрома при гриппе принимают активное участие и tPA, и PAI-1 [19]. При компьютерном анализе первичной структуры вирусных белков были обнаружены последовательности, мимикрирующие tPA и PAI-1, с высокой степенью гомологии (как и в случае с vWF), что указывает на важную роль этих белков в патогенезе гриппа [30].

В настоящее время отсутствуют данные по изучению механизмов воздействия вируса гриппа на функциональную активность кровеносных сосудов

и экспрессию эндотелиальных факторов *in vivo*. Вместе с тем механизмы развития дисфункции эндотелия при гриппозной инфекции являются чрезвычайно важным аспектом патогенеза гриппа и их изучение необходимо для совершенствования патогенетической терапии.

### **Цель исследования**

Изучение функциональной активности кровеносных сосудов при гриппозной инфекции у крыс, в том числе, при острой доксорубициновой кардиомиопатии.

### **Задачи исследования:**

1. Сравнить в динамике экспрессию эндотелиальных факторов (eNOS и PAI-1) в клетках EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (*in vitro*).
2. Отработать методику получения адаптированного вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на половозрелых крысах стока Wistar.
3. Оценить морфологическое состояние эндотелия кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (*in vivo*).
4. Оценить вазомоторную активность кровеносных сосудов крыс в том числе, при острой доксорубициновой кардиомиопатии, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.
5. Сравнить экспрессию эндотелиальных факторов (eNOS, PAI-1 и tPA) в кровеносных сосудах интактных и инфицированных вирусом гриппом A(H1N1)pdm09 крыс в том числе, при острой доксорубициновой кардиомиопатии.
6. Определить концентрацию эндотелиальных факторов (PAI-1 и tPA) в плазме крови крыс в том числе, при острой доксорубициновой кардиомиопатии, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.

### **Научная новизна**

Получены приоритетные данные о функциональной активности кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, в том числе, с острой доксорубициновой кардиомиопатией.

Впервые установлено, что вирус гриппа A(H1N1)pdm09 вызывает изменения уровня экспрессии эндотелиальных факторов в культуре клеток эндотелия EA.hy926 и эндотелии кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс с острой кардиомиопатией и без нее.

Впервые установлено, что при гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, наблюдается системное воздействие на кровеносные сосуды, о чем можно судить по изменению вазомоторной активности кровеносных сосудов не только легких, но и брыжейки крыс.

Впервые установлено, что вирус гриппа A(H1N1)pdm09 при инфицировании животных с острой кардиомиопатией значительно усиливает дисфункцию эндотелия, что отражается в существенных изменениях вазомоторной активности артерий брыжейки крыс и уровня экспрессии эндотелиальных факторов.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Выполненная работа представляет собой фундаментальное научное исследование, в результате которого получены приоритетные данные об изменении функциональной активности кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс с острой кардиомиопатией и без нее, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09. Так, показано, что при инфицировании крыс вирусом гриппа уже через 24 часа выявлены изменения в вазомоторной активности кровеносных сосудов легких и брыжейки, зарегистрированы гистологические изменения сосудов легких и обнаружены изменения в экспрессии ряда эндотелиальных факторов в эндотелии и плазме крови. Данные изменения сохраняются и через 96 часов после инфицирования вирусом гриппа. Полученные данные указывают на

развитие дисфункции эндотелия при гриппе, что может являться причиной развития сердечно-сосудистой патологии.

Таким образом, полученные данные позволяют дать рекомендацию о необходимости проведения скрининга ангиопротекторов для включения их в схему лечения гриппа (наряду с этиотропными препаратами), с целью коррекции эндотелиальной дисфункции. Особенно это важно для лиц с сопутствующими заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

### **Методология и методы исследования**

Методология проведенных исследований представляет собой совокупность классических вирусологических методов (культивирование вируса в системе развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ), определение инфекционной активности вируса), серологических реакций (постановка реакции гемагглютинации, иммуноферментного анализа), методов клеточной биологии (культивирование клеточной культуры эндотелия EA.hy926, инфицирование клеток вирус-содержащим материалом, определение инфекционной активности вируса в клеточной культуре, иммуноцитохимическое окрашивание), гистологических методов (окрашивание препаратов для обзорных целей и иммуногистохимическое обнаружение маркеров в парафиновых срезах), физиологических методов (проволочная миография), биоинформационных методов, а также методов математической статистики.

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

1. Вирус гриппа A(H1N1)pdm09 вызывает повреждение кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс стока Wistar, приводящее к изменению уровня экспрессии эндотелиальных факторов и вазомоторной активности уже через 24 ч после инфицирования.
2. Вирус гриппа A(H1N1)pdm09 усиливает повреждение кровеносных сосудов при инфицировании крыс с патологией сердечно-сосудистой системы (острой кардиомиопатией).

### **Личный вклад автора**

Автор лично планировал и выполнял все основные лабораторные исследования, включая культуральную работу с клеточной линией эндотелия кровеносных сосудов человека, окрашивание фиксированных клеток иммуноцитохимическим методом, адаптация штамма вируса гриппа к половозрелым крысам стока Wistar, окрашивание фиксированных тканей инфицированных животных иммуногистохимическим методом, морфометрические исследования, изоляция артерий легких и брыжейки. Анализ и статистическая обработка полученных результатов осуществлялось лично диссертантом.

### **Вклад соавторов**

При выполнении диссертационной работы методическая помощь автору была оказана: сотрудниками ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации Зелинской И.А., Тороповой Я.Г. – при проведении проволочной миографии; Е.Ю. Подъячевой – при моделировании острой кардиомиопатии. Общее руководство диссертационной работой осуществлено д.б.н. Жилинской И.Н.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты исследований подтверждены статистическим анализом с применением адекватно подобранных критериев описательной и аналитической статистики. Основные материалы диссертационной работы доложены на 9 отечественных конференциях и конгрессах, в том числе с международным участием: III международной научно-практической конференции: экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия (Россия, Смоленск, 2018), Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии с международным участием «Кашкинские чтения» (Россия, Санкт-Петербург, 2018-2022), XII Ежегодном конгрессе по инфекционным болезням с международным участием

(Россия, Москва, 2020), I Ежегодной интернет-конференции «Покровские чтения» (Россия, Москва, 2021), III Всероссийской конференции молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике», посвященная 55-летию со дня основания НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (Россия, Санкт-Петербург, 2022).

### **Публикации**

По теме диссертационной работы опубликовано 10 научных работ, из них 3 научные статьи (2 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки Российской Федерации, 1 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования), а также 7 тезисов докладов российских конференций и конгрессов, в том числе с международным участием.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 166 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 312 отечественных и зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 16 таблицами и 34 рисунками.

**Работа выполнена** в рамках Государственного задания (№ 121051900147-5) по теме: «Роль вирусов гриппа в развитии дисфункции эндотелия кровеносных сосудов». Работа поддержана грантом для студентов и аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга (2020 г.).

## Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Грипп занимает одно из ведущих мест в структуре инфекционной заболеваемости, оставаясь социально-значимой болезнью. Считалось, что основными клетками, поражающимися при гриппе, являются клетки эпителия респираторного тракта. Однако, за последние 20 лет получены доказательства поражения гриппом эндотелия кровеносных сосудов, что является новым аспектом для изучения патогенеза гриппозной инфекции.

Вызвав пандемию в 2009 г., вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 продолжает циркулировать в популяции людей наряду с вирусами А(Н3N2) и В. Отмечено, что для эпидемических сезонов, где преимущественно циркулировал вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, была характерна высокая частота госпитализации больных гриппом тяжелой степени тяжести и развития осложнений связанных с сердечно-сосудистой системой [15, 31-34].

Современные представления о патогенезе гриппозной инфекции, включают структуру и основные функции белков вируса гриппа А, а также молекулярные и клеточные механизмы иммунного ответа на внедрение вируса в организм. Также в патогенезе гриппа, в особенности при тяжелом течении, важную роль играет эндотелий кровеносных сосудов.

### 1.1 Структура и функции белков вируса гриппа А

Вирус гриппа А состоит из трех основных компонентов: 1) рибонуклеокапсида (РНП), состоящего из вРНК, РНК-зависимой РНК-полимеразы и белков NP и NEP; 2) матричного слоя, представленного М1 белком; 3) липидной оболочки, включающей вирусные трансмембранные белки (НА, NA, М2) и клеточные липиды [35] (Рисунок 1).

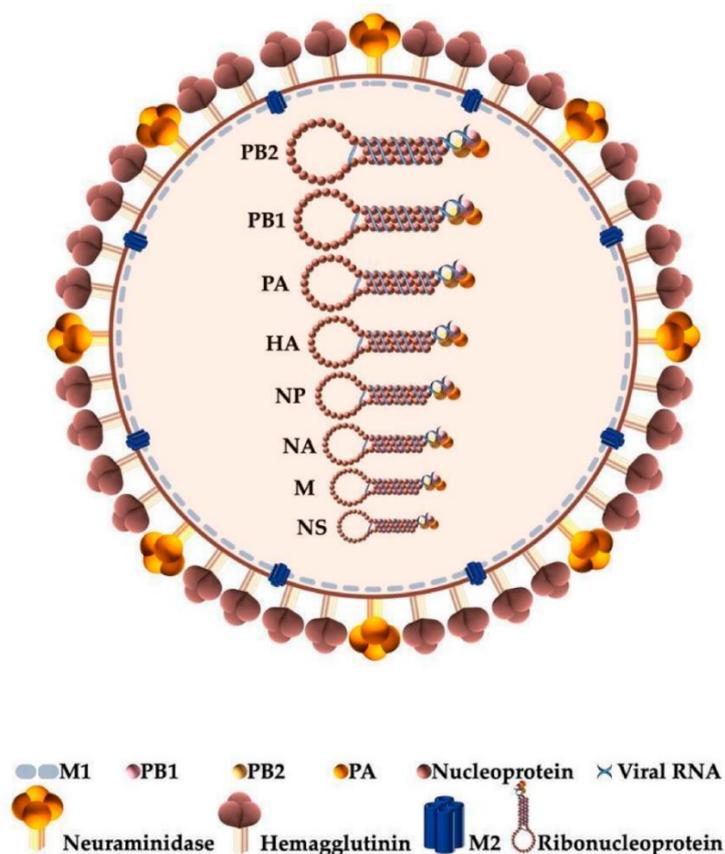


Рисунок 1 – Структура вируса гриппа А. Источник [36]

Геном вируса гриппа А содержит восемь одноцепочечных сегментированных РНК, имеющих отрицательную полярность и кодирующих от 12 до 17 вирусных белков.

Белки вируса гриппа можно разделить следующим образом:

1. поверхностные белки (НА, NA, M2);
2. внутренние белки (M1, NP, PA, PB1, PB2, NEP);
3. неструктурные белки (NS1, PB1-N40, PB1-F2, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42, NS3).

Гемагглютинин (НА) является основным поверхностным антигеном вируса гриппа. Так, около 80% всех поверхностных белков представлены именно молекулами НА [37]. НА является гомотримером и состоит из трех идентичных полипептидов, каждый из которых синтезируется в виде белка-предшественника – НА0 [38]. В дальнейшем под действием трипсина или трипсиноподобных

протеаз (НАТ, TMPRSS2, плазминоген) молекула HA0 подвергается протеолизу с образованием двух субъединиц – HA1 и HA2, соединенных дисульфидными мостиками [39, 40].

Расщепление HA0 является необходимым условием для продуктивного инфекционного процесса, а также обуславливает патогенность вируса и его тропизм к тканям [41]. Молекула гемагглютинина состоит из двух структурных областей – крупной дистальной глобулярной части, сформированной субъединицей HA1, включающей рецептор-связывающий сайт и область рудиментарной эстеразы и удлинённой проксимальной стволовой части, образованной субъединицей HA2 и N- и C-концами субъединицы HA1, включающей пептид слияния [42]. Стоит отметить, что антитела к гемагглютинуину обладают вируснейтрализующим действием, что используют в разработке противогриппозных вакцин и химиопрепаратов [43-46].

Функции гемагглютинина крайне важны на первых этапах инфекционного процесса, т.к. HA участвует:

- 1) в процессе адсорбции, связываясь с сиаловыми кислотами с  $\alpha 2,6$ - или  $\alpha 2,3$ -гликозидной связью на поверхности чувствительных клеток [47, 48];
- 2) в процессе слияния суперкапсида вируса с мембраной эндосомы, высвобождая РНП в цитоплазму клетки [49].

Нейраминидаза (NA) является вторым поверхностным гликопротеином вируса гриппа. Нейраминидаза представляет собой экзо- $\alpha$ -сиалидазу, которая расщепляет  $\alpha$ -кетозидную связь между терминальным остатком сиаловой кислоты и последующим моносахаридным остатком гликоконъюгатов [50]. В отличие от молекул гемагглютинина, которые распределены на поверхности суперкапсида равномерно, NA образует кластеры в тех участках, где вирусная частица отпочковывается от клетки [51]. Нейраминидаза выполняет сразу несколько важных функций, необходимых на разных стадиях инфекционного процесса:

- 1) отщепляет остатки сиаловой кислоты в составе муцинов респираторного тракта, что облегчает последующий процесс адсорбции вируса на чувствительных клетках [52];

2) помогает вирусам отпочковываться от инфицированной клетки, удаляя сialовую кислоту от NA, тем самым предотвращая процесс агрегации вирусов на инфицированной клетке [53];

3) у некоторых вирусов NA обладает плазминоген-связывающей активностью и катализирует превращение плазминогена в плазмин, который, в свою очередь, способен расщеплять гемагглютинин. Наличие данной особенности повышает вирулентность вируса гриппа [54].

Третий поверхностный белок – белок M2 представляет собой небольшой интегральный мембранный белок, функционирующий как ионный канал [55]. M2 белок выполняет ряд важных функций:

1) во время нахождения вируса в эндосоме участвует в транспорте протонов водорода внутрь вириона, снижая pH, тем самым опосредуя диссоциацию M1 белка и РНП и высвобождение вирусного генома в цитоплазму клетки [56];

2) поддерживает постоянный pH в аппарате Гольджи и цитоплазме, что предотвращает преждевременные изменения конформации молекул гемагглютинина [57];

3) взаимодействует с M1 белком и запускает процесс сборки вирусных частиц [58];

4) участвует в процессе отпочковывания вирионов [59];

5) активирует инфламмосомы и ингибирует слияния аутофагосом с лизосомами [60, 61].

Матриксный белок M1 является основным белком вируса гриппа – на его долю приходится до 40% от всей массы вириона. Располагаясь под липидной оболочкой вируса, белок M1 образует матриксный слой, который поддерживает целостность и стабильность вирусной частицы [62]. Белок M1 играет важную роль во многих этапах репродукции вируса, включая регуляцию стадии «раздевания» вируса, транспорт РНП в клетке, транскрипцию и репликацию вРНК, сборку, отпочковывание и морфогенез вирионов [63, 64, 35].

Нуклеопротеин (NP) представляет собой внутренний структурный белок, который тесно связан с вРНК, РНК-полимеразой и M1 белком, являясь важным

компонентом РНП [65]. Нуклеопротеин участвует во многих этапах инфекционного процесса, включая связывание и транслокацию вРНК в клетке-хозяина [66, 67], транскрипцию и репликацию вРНК [68, 69].

РНК полимеразы вируса гриппа представляет собой гетеротример и состоит из трех полимеразных белков: PB2, PB1 и PA.

PB2 белок связывается с кЭП-структурой клеточных пре-мРНК, что необходимо для инициации транскрипции [70]. PB2 белок играет важную роль в определении круга чувствительных к гриппу хозяев, а также в процессе адаптации вируса к новым организмам [71]. Кроме того, PB2 белок ингибирует активность митохондриального белка MAVS, который является частью системы врожденного иммунного ответа (RIG-I/MAVS), необходимого для инициации транскрипции провоспалительных цитокинов вследствие активации транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, IRF-1 и IRF-3 [72]. Белок PB2 или PB1-PB2 димер могут взаимодействовать в цитоплазме инфицированной клетки с белком теплового шока Hsp90, что стимулирует активность вирусной РНК-полимеразы за счет транслокации полимеразных белков в ядро и образования функционального полимеразного комплекса [73, 74].

PB1 белок является основной субъединицей вирусной РНК-полимеразы и участвует в транскрипции и трансляции, опосредуя каталитическую функцию РНК-полимеразного комплекса [75].

PA белок связан с PB1 субъединицей и выполняет следующие функции: 1) отщепляет кЭП-структуры от клеточной пре-мРНК, что необходимо для последующей транскрипции; 2) участвует в транскрипции и репликации РНК; 3) обладает сигналом ядерной локализации [76].

В состав вириона входит белок ядерного экспорта NEP (NS2), который ранее причисляли к неструктурным белкам. В составе NEP белка имеется два сигнала ядерного экспорта (NES), которые необходимы для экспорта РНП из ядра в цитоплазму для последующей сборки вирионов. Кроме того, NES регулирует транскрипцию вирусной мРНК, а также скорость отпочковывания вирионов [77].

Вирус гриппа, кроме структурных белков, также кодирует целый ряд неструктурных белков, которые участвуют в различных этапах жизненного цикла вируса. Так, белок NS1 способен накапливаться в цитоплазме инфицированных клеток, выполняя множество функций, включая ингибирование процессинга и трансляции клеточных мРНК и подавление противовирусного иммунитета [78].

В зависимости от штамма, геном вируса гриппа А также может кодировать следующие неструктурные белки: PA-X, PA-N155, PA-N182, PB1-N40, PB1-F2, M42 и NS3, чья экспрессия возможна за счет наличия альтернативной рамки считывания, альтернативного сплайсинга, или сдвига рамки считывания при трансляции мРНК [79-81]. Данные белки могут модулировать иммунный ответ, усиливать экспрессию и активность других вирусных белков, ингибировать процесс трансляции клеточных мРНК, являясь полноценными факторами патогенности вируса [82-84].

## **1.2 Патогенез гриппа**

Гриппозная инфекция является высококонтагиозным заболеванием с воздушно-капельным путем передачи. Инкубационный период, в среднем, составляет 2 дня и может варьировать от 1 до 4 дней. При инфицировании вирусами гриппа птиц инкубационный период может составлять до 8-9 дней [85].

Вирусы гриппа при попадании в организм вызывают повреждение клеток эпителия респираторного тракта и в большинстве случаев приводят к трахеобронхиту и появлению кашля. При неосложненном гриппе бронхоскопия позволяет обнаружить трахеобронхиальное воспаление, нарушение легочной вентиляции по обструктивному или рестриктивному типу, нарушение газообменной функции легких. Гиперреактивность воздушных путей может сохраняться в течение нескольких недель или месяцев после перенесенного заболевания [86].

Вирусемия при неосложненном течении гриппа возникает редко. Обнаружение вРНК и, в редких случаях, вирусов, сохранивших инфекционную активность в таких биологических жидкостях как кровь, моча, а также в

испражнениях, наблюдается, в основном, у пациентов с тяжелым течением гриппа, в частности, вызванного вирусом птичьего гриппа А(Н5N1), а также вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 в пандемию 2009 г. [87]. Диссеминация вируса из респираторного тракта возможна гематогенным путем, на что указывает изоляция вируса из тканей сердца, печени, селезенки, почек, надпочечников, мышц, плаценты и мягких мозговых оболочек у погибших от гриппа пациентов.

Длительность вирусной репродукции зависит от возраста и иммунного статуса больных, от условий окружающей среды, типа, подтипа и штамма вируса гриппа. При неосложненной инфекции, вызванной сезонным гриппом, вирус обнаруживают в верхних дыхательных путях примерно за 1 день до разгара заболевания, а инфекционная активность вируса в носовом секрете достигает максимальных значений через 1–3 дня от начала заболевания и обычно составляет  $10^4 - 10^7$  ТЦД<sub>50</sub>/мл [88]. Инфекционная активность вируса в секрете ротоглоточном обычно ниже. Вирус в бронхоальвеолярном лаваже обнаруживают лишь при гриппозной пневмонии. Так на модели гриппозной инфекции у мышей при интраназальном заражении инфекционная активность вируса в тканях легких составляла  $10^3 - 10^4$  ТЦД<sub>50</sub>/мл при первичной пневмонии и  $10^5 - 10^7$  ТЦД<sub>50</sub>/мл – при бактериально-вирусной пневмонии [89].

Активная репродукция вируса продолжается около 3–5 дней у взрослых и у детей старшей возрастной группы, однако у новорожденных детей и детей младшей возрастной группы может продолжаться до 1-3 недель, в частности, при отсутствии предшествующего иммунитета [90]. Также репродукция вируса может продолжаться в течение нескольких недель или месяцев у иммунокомпрометированных людей, включая реципиентов трансплантатов и пациентов с терминальной стадией ВИЧ-инфекции, указывая на важность клеточного звена иммунитета для полной элиминации вируса [91].

При сезонном гриппе в группу риска входят пожилые люди, дети, а также пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями, метаболическими заболеваниями или иммунокомпрометированные пациенты. У данных лиц чаще всего отмечаются пневмонии, поражение мозга и сердца [92, 93]. В свою очередь,

во время некоторых пандемий, в частности 1918 и 2009 гг., тяжелые случаи заболевания были отмечены преимущественно у людей младшей и средней возрастной группы, не имевших сопутствующих заболеваний [94, 95].

### **1.2.1 Молекулярные механизмы патогенеза гриппа**

Патогенез гриппа представляет собой комплексный процесс, включающий в себя адсорбцию и проникновение вируса в чувствительные клетки организма, репродукцию вируса, формирование воспалительного очага в тканях и защиту от врожденного и приобретенного иммунного ответа. Основным фактором, лимитирующим развитие инфекции, является воспалительный ответ [96].

Внедрение вируса в организм связано, в первую очередь, с прямым повреждением эпителия респираторного тракта, что приводит к развитию воспалительного ответа со стороны организма. Так, после инфицирования клетки вирусная РНК распознается в эндосоме и/или цитозоли при помощи паттерн-распознающих рецепторов (TLR-3, -7 и -8, RIG-I, NLR) [97]. Данное распознавание чужеродной РНК ведет к передаче активационного сигнала посредством белков адаптеров в ядро, после чего запускается активация целого ряда процессов, таких как активация экспрессии генов интерферонового ответа, синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, активация нейтрофилов, системы комплемента и других компонентов иммунного ответа.

#### **1.2.1.1 Интерферон и гены интерферонового ответа**

В настоящее время наиболее изучен механизм интерферонового ответа на внедрение вируса гриппа. Известно, что в этом ответе участвуют несколько важных ИФН-индуцируемых клеточных белков, обладающих противовирусной активностью, чья экспрессия при гриппе возрастает:

1. МхА белок при внедрении вируса гриппа способен связываться с NP антигеном и за счет его гидролиза инактивировать основной структурный белок вируса [98]. Кроме того, МхА белок распознает и ингибирует транспорт молекул РНП в ядро, т.о. блокирует ранние этапы репродукции вируса [99, 100].

2. 2'-5'-олигоаденилатсинтаза (AOS) и рибонуклеаза L способствуют деградации одноцепочечных сегментов РНК вируса гриппа в цитозоли. 2'-5'-олигоаденилатсинтаза конвертирует АТФ в 2'-5'-олигоаденилат, который связывается с латентной формой рибонуклеазы L. В свою очередь, активированная форма рибонуклеазы L связывается и расщепляет клеточные и вирусные оцРНК, включая РНК вируса гриппа, тем самым тормозя синтез вирусных белков и сборку вирионов [101].

3. NF-κB является одним из важных участников раннего противовирусного ответа, который индуцирует экспрессию сотни различных генов, включая гены кодирующие провоспалительные цитокины и хемокины (ИЛ-6, ФНО-α, CCL-2, CCL-5) [102, 103]. Однако роль данного белка при гриппе противоречива. Целый ряд исследователей показали, что низкая экспрессия NF-κB значительно снижает скорость репродукции вируса гриппа А (ВГА) или делает клетки резистентными к инфицированию [104]. Так, было показано, что в культуре клеток альвеолярной аденокарциномы A549 и плоскоклеточного рака легких U1752 различные белки, ингибирующие активацию сигнальных путей NF-κB (BAY-7085, BAY-7082 или SC75741), значительно снижали скорость репродукции ВГА в данных клеточных линиях [105]. С другой стороны, активация сигнального пути NF-κB приводит к перемещению этого фактора в ядро, где он совместно с регуляторными факторами интерферона (IRF) связывается с энхансером гена ИФН-β, а также привлекает дополнительные белки, что необходимо для транскрипции гена, кодирующего ИФН-β *in vivo* [106]. Также NF-κB запускает транскрипцию белков, инициирующих апоптоз, аутофагию и арест клеточного цикла, что позволяет лимитировать репродукцию вируса в клетке, а также стабилизирует мРНК ИФН-α и ИФН-β в клетке [107, 108].

4. Протеинкиназа R (PKR) способна инактивировать дцРНК вируса гриппа. Латентная форма протеинкиназы R, связываясь с вирусной РНК в месте образования двуцепочечного фрагмента РНК, активируется и запускает фосфорилирование с последующим гидролизом α-субъединицы эукариотического

фактора инициации трансляции (eIF2a), необходимого для синтеза полипептидов на рибосомах ЭПР. В итоге, тормозится процесс синтеза белков клетки-хозяина, а также белков вируса гриппа [109]. Кроме того, PKR также является адапторным белком в активации сигнального пути NF- $\kappa$ B [110]. Стоит отметить, что NP белок вируса гриппа способен взаимодействовать с клеточным белковым комплексом p58 IPK-Nsp40, высвобождать белок p58 IPK, который ингибирует противовирусную активность протеинкиназы R (PKR) [111].

5. Белок вилерин способен блокировать процесс отпочковывания вновь синтезированных вирионов гриппа. Так, вилерин внутриклеточно связывается и ингибирует фарнезилдифосфатсинтазу – фермент, необходимый для синтеза липидов, в частности, холестерина. В последующем происходит снижение текучести цитоплазматической мембраны и нарушение образование липидных рафтов – сайтов почкования вируса гриппа [112].

Необходимо отметить, что вирус гриппа А имеет целый ряд механизмов ускользания от иммунного ответа. Так, наиболее значимым вирусным белком считается белок NS1, который подавляет синтез ИФН различными путями:

1) блокирует распознавание RIG-I рецепторами 5'-фосфорилированной вирусной дцРНК [113];

2) тормозит олигомеризацию белка TRIM25, что необходимо для активации RIG-I-опосредованного сигнального пути [114];

3) тормозит активацию и транслокацию в ядро IRF-3, NF- $\kappa$ B и других факторов транскрипции, необходимых для синтеза ИФН [115, 116]. Таким образом, NS1 белок блокирует RIG-I-опосредованную активацию транскрипции ИФН- $\beta$  [117]. Кроме того, данный белок способен связываться с клеточным белком CPSF30 (30 кДа-субъединица фактора специфического расщепления и полиаденилирования), нарушая экспрессию клеточных белков за счет подавления полиаденилирования клеточных пре-мРНК [118, 119]. Полученные данные легли в основу разработки нового типа живой аттенуированной противогриппозной вакцины с делецией NS1 гена ( $\Delta$ NS1). Вакцинные штаммы вируса гриппа  $\Delta$ NS1 проникают в чувствительные клетки респираторного тракта, однако, не способны

ингибировать экспрессию ИФН и, тем самым, не нарушают формирование клеточного и гуморального иммунитета, что повышает иммуногенность вакцины [120].

Белок PB2 (в частности, варианты с аспаратом в 9 позиции) и PB1-F2 (варианты с серином в позиции 66) лимитируют продукцию ИФН- $\beta$  за счет блокирования митохондриального противовирусного белка MAVS – промежуточного звена в каскаде синтеза ИФН [84]. Субъединица PA, входящая в состав вирусной РНК-полимеразы, может отщепляет кэп-структуру у клеточных пре-мРНК, включая пре-мРНК ИФН- $\beta$  [111].

Также вирус гриппа А повышает экспрессию группы белков супрессирующих цитокиновый сигналинг (SOCS), что приводит к ингибированию активации JAK-STAT сигнального пути и, тем самым, блокирует экспрессию ИФН- $\alpha/\beta$  [121, 122].

### 1.2.2.2 Нейтрофилы и НК-клетки

Важными клетками врожденной иммунной системы являются нейтрофилы, которые первыми проникают в очаг воспаления при инфекции. Нейтрофилы способны подавлять и элиминировать вирус, используя различные стратегии, из которых основной является фагоцитоз [123]. Данный процесс представляет собой поглощение чужеродных микроорганизмов, который включает несколько этапов: активацию нейтрофилов, хемотаксис, рецепторное распознавание патогена, адгезию и собственно фагоцитоз. Активация нейтрофилов индуцируется различными медиаторами воспаления, включая ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , С3а, С5а, ИЛ-8, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и др. [124]. Процесс активации повышает выживаемость нейтрофилов и подготавливает данные клетки к дальнейшим этапам фагоцитоза [125]. Целенаправленное движение по градиенту концентрации к различным хемоаттрактантам (хемотаксис) позволяет нейтрофилам выходить из кровяного русла и проникать в очаг воспаления, после чего нейтрофилы распознают чужеродные молекулы посредством множества различных рецепторов (TLR,

CD13, Fc-рецепторы, рецепторы к комплементу). После распознавания поверхностных антигенов вируса гриппа (НА, NA) следует фагоцитоз – поглощение патогена с образованием специальных вакуолей – фагосом [126].

Стоит отметить, что нейтрофилы играют двоякую роль. С одной стороны, в экспериментальной модели гриппа на мышах было показано, что снижение количества нейтрофилов на ранней стадии гриппозной инфекции ассоциировано с диссеминацией вируса и отягощением заболевания [127]. Так, у мышей с нейтропенией выявляли более высокую вирусную нагрузку в легких, что приводило к усилению воспалительного процесса, отеку легких и дыхательной недостаточности [128]. С другой стороны, у людей и в модели гриппа на мышах значительное увеличение количества нейтрофилов (нейтрофилия) и чрезмерное их привлечение в очаг воспаления, возникающее при инфицировании высокопатогенными вирусами H1N1 и H5N1, усиливает повреждение легочной ткани при тяжелых формах и способствует развитию ОРДС [129, 130]. Это связано с чрезмерной активацией нейтрофилов, которые становятся одними из основных продуцентов активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов, а также синтезируют внеклеточные нейтрофильные ловушки, способные повреждать собственные клетки [131, 132].

Другими важными клетками врожденного иммунитета являются естественные киллеры, или НК-клетки. Данные крупные гранулярные лимфоциты, в отличие от других лимфоцитов не нуждаются в контакте с молекулами МНС для последующей активации. НК-клетки распознают НА вируса гриппа на поверхности вирус-инфицированных клеток при помощи рецепторов KIR, NKp44 и NKp46 [133, 134]. В дальнейшем НК-клетка индуцирует лизис инфицированной клетки за счет: 1) выброса цитотоксических гранул, содержащих белки перфорины и гранзим В; 2) взаимодействия с Fas-лигандом и индукции апоптоза; 3) антителозависимой цитотоксичности [135, 136]. Также естественные киллеры играют важную роль в активации адаптивного иммунного ответа. В частности, они вырабатывают ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13, необходимые для дифференциации Т-хелперов 2-го типа [134].

Стоит отметить, что наличие мутаций в сайтах гликозилирования HA в положении 122-124 и 133-135 приводит к снижению распознавания вирус-инфицированных клеток NK-клетками [137]. Также отдельные молекулы HA могут снижать экспрессию  $\zeta$ -цепи рецептора NKp46, нарушая активацию сигнальных путей и, тем самым, снижая цитотоксичность NK-клеток [138]. Более того, вирус гриппа А может напрямую инфицировать и вызывать гибель NK-клеток [139].

Кроме того, вирус также может подавлять дифференциацию и активность и других иммунных клеток. Так, например, вирусный белок NS1 нарушает способность дифференциации моноцитов в зрелые дендритные клетки, что в дальнейшем подавляет вирус-специфический CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ [140, 141].

### **1.2.2.3 Система комплемента**

При патогенезе гриппа активно участвует система комплемента. К системе комплемента относят более 30 сывороточных белков и несколько мембранных рецепторов [142, 143]. Известно три пути активации системы комплемента: классический путь, альтернативный путь и лектиновый путь.

Классический путь активации запускается иммуноглобулинами IgM, а также IgG определенных изотипов [144]. Компоненты системы комплемента способствуют опсонизации и элиминации вируса, а также индуцируют и усиливают иммунный ответ [145]. В частности, C3a и C5a являются сильными хемоаттрактантами, которые привлекают нейтрофилы, моноциты и макрофаги в сайт активации системы комплемента – в очаг воспаления. Данные активированные компоненты не только являются опсонинами, которые способны связываться с патогеном, но также запускают фагоцитоз при взаимодействии с рецепторами комплемента (CR), экспрессированными на различных иммунных клетках, включая макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы [146]. Кроме того, воздействуя на соответствующие рецепторы (C3aR и C5aR), которые расположены на поверхности тучных клеток, фагоцитов и эндотелиоцитов,

компоненты системы комплемента также усиливают синтез провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6) в данных клетках [147].

Альтернативный и лектиновый пути активации комплемента являются частью врожденного иммунитета, т.к. их активация опосредуется взаимодействием паттерн-распознающих рецепторов (TLR, NLR, коллектинов и др.) с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (РАМР) – фрагментами микробных молекул, имеющих консервативную структуру и встречающихся у целых групп различных патогенных микроорганизмов [148].

Стоит отметить, что М1 белок способен связываться с С1q, тем самым подавляя его активацию по классическому и лектиновому пути [149]. Кроме того, в составе М1 белка некоторых вирусов гриппа А имеется аминокислотная последовательность гомологичная последовательности, входящей в состав белка компонента комплемента С9 [150].

#### **1.2.2.4 Провоспалительные цитокины и хемокины**

Помимо интерферона инфицированные (не иммунные) клетки дыхательной системы также начинают экспрессировать различные цитокины и хемокины – биологически активные молекулы, запускающие и регулирующие локальную воспалительную реакцию.

В начале острого периода гриппа наблюдается повышение концентрации таких цитокинов как ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, которые синтезируют инфицированные клетки эпителия респираторного тракта. Вслед за этим повышается концентрация ИЛ-6 и других провоспалительных цитокинов и хемокинов, включая ИЛ-8, моноцитарный хемотаксический протеин-1, ИЛ-2, ССL-5/RANTES (хемокин, экспрессируемый Т-клетками при активации), СХСL-10/ИР-10 (ИФН- $\gamma$  индуцируемый белок-10), TGF- $\beta$ -2 (трансформирующий фактор роста бета-2) [151-153].

ФНО- $\alpha$  играет важную роль в патогенезе гриппа, являясь наряду с ИФН важным индуктором противовирусного иммунитета [154, 155]. Так было показано, что в эпителиальных клетках легких свиньи, инфицированных

различными вирусами гриппа, уровень экспрессии ФНО- $\alpha$  коррелировал с инфекционной активностью вируса. Обработка клеток ФНО- $\alpha$  в концентрации 100 нг/мл за 24 ч до заражения снижало инфекционную активность вирусов гриппа с 6,0-8,5 ТЦД<sub>50</sub>/мл до 0,5-0,8 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл [154]. В другом исследовании было показано, что предварительная обработка ФНО- $\alpha$  (10 нг/мл) клеточной культуры A549 усиливало экспрессию множества генов, участвующих в клеточном ответе, включая RIG-I, TLR-3, MyD88, TRIF и IRF7 [155].

ИЛ-1 (ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ ) – провоспалительный цитокин, усиливающий экспрессию целого ряда генов, необходимых для реализации воспалительной реакции. В частности, ИЛ-1 повышает экспрессию ИЛ-6, ИЛ-8, Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), ФНО- $\alpha$ . Так, было показано что при заражении мышей C57BL/6 нокаутных по рецептору к ИЛ-1 (IL-1R1<sup>-/-</sup>) вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) в летальных дозах (2000 или 500 БОЕ/мл) наблюдалась повышенная смертность по сравнению с контролем (мыши C57BL/6 без нокаутных генов). Также было обнаружено, что ИЛ-1 способствует привлечению CD4<sup>+</sup> Т-клеток в очаг воспаления, а также усиливает IgM-опосредованный гуморальный иммунитет [156].

Другим важным цитокином, чья концентрация при гриппе повышается, являются ИЛ-6. При инфицировании вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) мышей C57BL/6, нокаутных по гену, кодирующему ИЛ-6 (IL-6<sup>-/-</sup>), наблюдали повышенную смертность по сравнению с контролем, а также обнаруживали тяжелое поражение легких вместе с повышением проницаемости кровеносных сосудов. Так, в просвете дыхательных путей обнаруживали геморрагические экссудаты, лейкоцитарную инфильтрацию и периваскулярную агрегацию клеток. Стоит отметить, что ИЛ-6 контролирует клеточный иммунитет, т.к. является важным цитокином для активации, пролиферации и апоптоза CD4<sup>+</sup> Т-клеток [157].

Таким образом, провоспалительные цитокины и хемокины играют важную роль в элиминации вируса гриппа, запускают активацию и хемотаксис

нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов, а также способствуют формированию гуморального иммунитета [158].

Стоит отметить, что в составе белков вируса гриппа имеется целый ряд аминокислотных последовательностей, имеющих гомологию с различными цитокинами, что, по-видимому, также играет значительную роль в патогенезе гриппа. Так, в белках PA, NA и NP вируса A(H1N1)pdm09 имеются фрагменты аминокислот, гомологичные разным фрагментам молекулы ФНО- $\alpha$  [150]. Также обнаружена аминокислотная последовательность в составе NA, мимикрирующая фрагмент ИЛ-36 – цитокина, который связан с повреждением легочной ткани в экспериментальной гриппозной инфекции у мышей [159].

Уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов в плазме и сыворотке, как правило, одновременно коррелирует с инфекционной активностью вируса в секретах из верхних дыхательных путей, а также с тяжестью заболевания [160]. Однако при тяжелом течении гриппа может наблюдаться избыточный синтез провоспалительных цитокинов и выраженная активация иммунных клеток, приводя к цитокиновому шторму – одному из наиболее опасных состояний при гриппе [161].

Цитокиновый шторм представляет собой иммунопатологическую реакцию, которая характеризуется чрезмерным повышением в крови провоспалительных цитокинов и развитием системных патологических состояний, угрожающих жизни [162]. Наиболее важными индукторами цитокинового шторма считаются следующие цитокины и хемокины: ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8 и ССЛ-2. При цитокиновом шторме провоспалительные цитокины, помимо макрофагов и других лейкоцитов, также начинают синтезировать клетки эпителия слизистых оболочек, гепатоциты, клетки кожи, микроглии, хондроциты, лимфоидные клетки, что приводит к гиперцитокинемии [163, 164].

Ведущей причиной цитокинового шторма является патологическая активация эндотелия кровеносных сосудов, который становится основным продуцентом провоспалительных цитокинов. Патологическая активация эндотелия при гриппе приводит к синтезу провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ ,

ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ) и хемокинов (CXCL10, CCL5/RANTES) [165]. Повреждение кровеносных сосудов при цитокиновом шторме вызывает нарушение трофики тканей и органов и является основной причиной острого респираторного дистресс синдрома (ОРДС) [166].

ОРДС характеризуется гипоксемией и нарастанием дыхательной недостаточности, что является причиной полиорганной недостаточности и высокой летальности при гриппе (до 60%) [166].

Важное значение в активации эндотелия при ЦШ имеет рецептор сфингозин-1-фосфата (S1P1). Так, было показано, что использование специфического агониста сфингозин-1-фосфата (SYM5442) при заражении мышей C57BL/6 вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в дозе 5,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл носило протективный эффект и снижало степень повреждения легочной ткани [167].

Механизм воздействия вируса гриппа на ту или иную систему защиты организма до конца не изучен. Можно предположить, что одним из таких механизмов является молекулярная мимикрия. Вполне вероятно, что, гомологичные белкам иммунной системы, фрагменты вирусных белков дезорганизуют иммунную систему, высвобождаясь при протеолизе вирусных белков. Выщепление мимикрических фрагментов из вирусных белков может происходить за счет расщепления их либо клеточными, либо вирусными протеазами. У многих вирусов протеазы запрограммированы в их геноме, кроме того, протеазной активностью могут обладать и структурные вирусные белки. Подтверждением этого предположения могут служить данные об обнаружении протеазной активности полимеразного белка PA у вируса гриппа [168]. Другим механизмом дисрегуляции иммунного ответа, может быть индукция этими фрагментами аутоиммунных антител, которые способны блокировать клеточные белки, содержащие эти фрагменты. Возможность образования подобных аутоиммунных антител была продемонстрирована при изучении побочных действий в виде нарколепсии при вакцинации гриппозной вакциной Pandemrix vaccine (GlaxoSmithKline). Оказалось, что в структуре NP антигена, содержащегося в вакцине, имеется фрагмент аминокислотной

последовательности, гомологичный рецептору 2 гипокретина (орексина) и аутоиммунные антитела к данному фрагменту блокируют этот рецептор [169].

### **1.3 Роль эндотелия в патогенезе гриппа**

Согласно современным данным, грипп помимо эпителия респираторного тракта, также поражает эндотелий кровеносных сосудов, что является важным аспектом патогенеза гриппа.

#### **1.3.1 Морфоструктурная характеристика эндотелия кровеносных сосудов человека**

Эндотелий, как компонент сосудистой стенки представлен клеточным монослоем, расположенным на базальной мембране. Для эндотелия характерно пограничное положение, отсутствие межклеточного вещества, наличие специфических межклеточных контактов, обеспечивающих непрерывность монослоя [170].

Эндотелиоциты кровеносных сосудов имеют целый ряд особенностей, включая специфические органеллы и транспортные структуры:

1) Фенестры – пронизывающие эндотелиоциты поры диаметром 70 нм, увеличивающие проницаемость сосуда и облегчающие транспорт высокомолекулярных молекул внутрь стенки сосуда [171].

2) Кавеолы – везикулы колбовидной формы с диаметром 70 нм, которые, как правило, открываются на апикальной и базальной поверхности клетки. Основным компонентом кавеол является мембранный белок кавеолин-1, который выполняет структурную функцию, а также принимает участие в воспалительном ответе. Так, экспрессия кавеолина-1 может влиять на экспрессию рецепторов к ФНО- $\alpha$  и другим провоспалительным цитокинам [172, 173].

3) Везикуло-вакуолярные органеллы представляют собой локальные скопления мембранных везикул и вакуолей. Так как везикуло-вакуолярные органеллы содержат белок кавеолин-1 предполагается, что данные органеллы возникают в результате слияния некоторого числа кавеол [171].

4) Специфические межклеточные контакты. Барьерная функция основана на целостности эндотелия, которая достигается за счет межклеточных контактов, включая плотные, адгезивные и фокальные контакты [174, 175]. Плотные контакты представляют собой мультипротеиновые комплексы, функционирующие по «принципу застёжки», где латеральная поверхность эндотелиоцитов связана белками, включая клаудин, окклюдины и молекулы адгезии семейства JAM (Junctional adhesion molecules) [176-178]. Адгезивные контакты состоят из трансмембранного белка VE-кадгерина (CD144), мембранного белка клеточной адгезии PECAM-1, взаимодействующих с актиновыми микрофиламентами цитоскелета клетки [179]. VE-кадгерин и PECAM-1 могут регулировать экспрессию компонентов плотных контактов [174, 180]. В свою очередь, фокальные контакты представляют собой места прикрепления базолатеральной поверхности клеток с окружающим внеклеточным матриксом сосудистой стенки. Главными структурными компонентами фокальных контактов является трансмембранные рецепторы интегрины.

5) Тельца Вейбеля-Паладе являются особенностью эндотелия кровеносных сосудов и отсутствуют в эндотелии лимфатических сосудов. Данные палочковидные структуры, содержащие два основных компонента – фактор фон Виллебранда и P-селектин, которые играют важную роль в системе гемостаза и воспалительном процессе, соответственно [181]. Другими биологически активными веществами, депонируемыми в тельцах Вейбеля-Паладе, но в меньших количествах являются: ИЛ-8, эндотелин-1, ангиопоэтин-2, эотаксин-3, остеопротегерин и альфа-1,3-фукозилтрансферазы VI. Данные вещества являются провоспалительными медиаторами, принимающими участие в иммунном ответе, ангиогенезе и регуляции тонуса кровеносных сосудов в ответ на стрессорное воздействие [182].

Морфология эндотелия может быть весьма вариабельной и зависит от типа сосуда и тканевого окружения. Типичные эндотелиоциты – плоские и вытянутые, однако встречаются клетки с округлой или кубической формой. Так, эндотелиоциты, выстилающие аорту, плоские и сильно вытянуты в длину (55×10

мкм), а в легочных артериях эндотелиоциты короче и шире ( $30 \times 14$  мкм), что придает им прямоугольную форму. В легочных венах клетки эндотелия крупные и округлые, а в нижней полой вене длинные и плоские, что придает им прямоугольную форму [183].

Ориентация эндотелия в сосуде также может варьироваться. Так, в прямых участках сосудов эндотелиоциты вытянуты вдоль оси сосуда, тогда как в местах бифуркации сосуда ориентация изменяется [184, 185]. Такое расположение эндотелиоцитов на разных участках кровеносных сосудов зависит от гемодинамических условий, в частности, от скорости кровотока [171].

Всего выделяют два основных вида эндотелия: непрерывный (или соматический) и прерывистый (или синусоидальный). В свою очередь, непрерывный эндотелий может быть фенестрированным или окончатым и нефенестрированным (Рисунок 2).

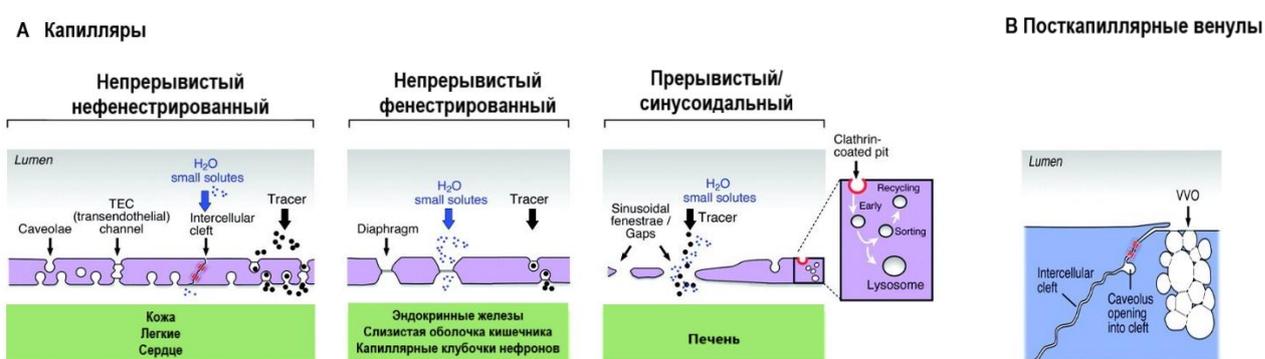


Рисунок 2 – Особенности строения эндотелиальных клеток кровеносных сосудов.

А. Эндотелий капилляров; В. Эндотелий посткапиллярных венул [171].

### 1.3.2 Функциональные свойства эндотелиальных клеток

Функциональные свойства эндотелия специфичны для определенных тканей и органов. Прорастая в различные ткани и органы, эндотелий попадает под воздействие определенного тканеспецифического окружения, вызывающего появление различий в морфологии, структуре и функциях данных клеток.

Эндотелий играет ключевую роль в поддержании нормальной физиологической деятельности сердечно-сосудистой системы, регулируя проницаемость и тонус сосудов, перфузию тканей, гемостаз, ангиогенез, а также участвуя во врожденном и адаптивном иммунном ответе [186]. За последние 70 лет, с момента начала использования электронной микроскопии, эндотелий из однородной и инертной популяции клеток, выстилающих кровеносные и лимфатические сосуды, стал самым крупным эндокринным органом, чья площадь равняется 3000-6000 м<sup>2</sup> [187]. Реализация своих функций возможна благодаря синтезу эндотелием биологически активных веществ с паракринным и/или аутокринным механизмом действия [170]. Основные функции эндотелиальных факторов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные эндотелиальные факторы и их функции [188].

Эндотелиальные факторы, участвующие в регуляции тонуса сосудов	
Вазоконстрикторы	Вазодилататоры
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. эндотелин-1;</li> <li>2. тромбоксан А<sub>2</sub>;</li> <li>3. ангиотензин II;</li> <li>4. реактивные формы кислорода;</li> <li>5. аденозин уридин тетрафосфат.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. NO;</li> <li>2. простаглицлин;</li> <li>3. эндотелиальный гиперполяризующий фактор;</li> <li>4. адреномедуллин.</li> </ol>
Эндотелиальные факторы, участвующие в гемостазе	
Тромбогенные	Атромбогенные
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. фактор фон Виллебранда;</li> <li>2. ингибитор активатора плазминогена 1 типа;</li> <li>3. тромбоцитарный фактор роста;</li> <li>4. ангиотензин II;</li> <li>5. эндотелин-1;</li> <li>6. фибронектин;</li> <li>7. тромбоспондин-1;</li> <li>8. фактор активации тромбоцитов.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. NO;</li> <li>2. система протеина С;</li> <li>3. тканевой активатор плазминогена;</li> <li>4. простаглицлин.</li> </ol>

Эндотелиальные факторы, влияющие на рост сосудов и гладкомышечной ткани	
Стимулирующие ангиогенез	Ингибирующие ангиогенез
1. NO; 2. фактор роста эндотелия сосудов; 3. эндотелин-1; 4. ангиотензин II; 5. реактивные формы кислорода.	1. тромбоспондин-1.
Эндотелиальные факторы, участвующие в воспалительном процессе:	
Провоспалительные	Противовоспалительные
1. фактор роста эндотелия сосудов; 2. молекулы клеточной адгезии (селектины, адгезины, кадгеринины); 3. хемоаттрактанты (CCL2, CCL3, CCL5); 4. фактор некроза опухоли альфа; 5. реактивные формы кислорода.	1. NO; 2. система протеина С.
Эндотелиальные факторы, участвующие в иммунном ответе:	
Усиливающие иммунный ответ	Подавляющие иммунный ответ
1. паттерн-распознающие рецепторы (TLR-2, TLR-4, NLR-1, NLR-2); 2. главный комплекс гистосовместимости (MHC I, MHC II*); 3. различные молекулы* (CD40, CD58, CD80, CD86, ICOSL).	3. лиганд рецептора программируемой клеточной гибели (PDL-1, PDL-2)

\* – экспрессируются эндотелием определенных тканей;

CD – кластер дифференциации, CCL – хемокиновый лиганд, содержащий C-C мотив, ICOSL – индуцибельный костимулирующий лиганд, TLR – толл-подобный рецептор, NLR – NOD-подобный рецептор, PDL – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели.

Все вышеперечисленные функции позволяют говорить о сосудистом эндотелии как о гигантском паракринном органе, распределенном по всем тканям человеческого организма и участвующем в регуляции множества

физиологических и биохимических процессов. Повреждение или нарушение функций эндотелия сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции – важным патогенетическим звеном целого ряда патологических состояний, включая заболевания сердечно-сосудистой системы.

### **1.3.3 Роль эндотелия в регуляции тонуса кровеносных сосудов**

Сосудистый эндотелий продуцирует целый ряд вазоактивных веществ. К основным эндотелий-зависимым факторам с вазодилатирующим эффектом относят: оксид азота (NO), простаглицлин (PGI<sub>2</sub>) и эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF). В свою очередь, тромбоксан А<sub>2</sub> (ТХА<sub>2</sub>) и эндотелин-1 (ЭТ-1) являются главными вазоконстрикторами. Тонкий баланс между факторами вазоконстрикции и дилатации определяет тонус сосудов и, соответственно, величину местного кровотока [189]. Ниже представлены данные о наиболее важных эндотелиальных факторах с вазоактивным действием.

Оксид азота является наиболее важным эндотелий-зависимым фактором, постоянно оказывающим вазодилатирующее действие за счет расслабления гладкомышечных клеток стенки кровеносных сосудов [190]. Помимо этого, NO обладает атромбогенным, противовоспалительным, антипролиферативным и вазопротективным действием, тормозя адгезию и агрегацию тромбоцитов [191], пролиферацию гладкомышечных клеток, адгезию лейкоцитов на эндотелии [192], а также блокируя окисление липопротеидов низкой плотности [193].

Синтез NO катализируется ферментом NO-синтазой (NOS). Всего выделяют три изоформы NO-синтазы:

1) нейрональная синтаза оксида азота (nNOS или NOS-1), обнаруженная в клетках нейронов периферической и центральной нервной системы, постоянно синтезирует NO в качестве сигнальной молекулы для регуляции выброса из нервных клеток нейротрансмиттеров [194];

2) индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS или NOS-2) экспрессируется макрофагами, дендритными клетками и Т-лимфоцитами только в ответ на провоспалительные цитокины или другие стимулы [195];

3) эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS или NOS-3) присутствует в ЭК кровеносных сосудов и поддерживает концентрацию NO на постоянном физиологическом уровне [196].

Известно, что данные изоформы экспрессируются также кардиомиоцитами [197], миоцитами, тромбоцитами, клетками гиппокампуса и некоторыми другими клетками [198].

Эндотелиальная синтаза оксида азота состоит из двух идентичных мономеров, где каждый мономер имеет три участка:

1) оксидазный N-концевой домен, имеющий сайты для связывания с гемом, субстратом, в качестве которого выступает аминокислота L-аргинин и тетрагидробиоптерином ( $B_4H$ ). Последний стабилизирует железо в структуре гема, а также повышает аффинность NOS к субстрату [199];

2) редуктазный C-концевой участок содержит сайты для связывания с кофакторами НАДФ, ФАД и ФМН и снабжает электронами оксидазный участок;

3) область между редуктазным и оксидазным участком состоит из последовательности из ~50 аминокислот и отвечает за связывание с кальмодулином (CaM), который запускает восстановление железа в геме, связывая кислород и обеспечивая перенос электронов от редуктазного домена к оксидазному [200].

Таким образом, активность eNOS зависит сразу от пяти кофакторов (гем,  $B_4H$ , НАДФ, ФАД и ФМН), что делает синтез NO в эндотелии одним из самых тонко регулируемых процессов в организме (Рисунок 3).

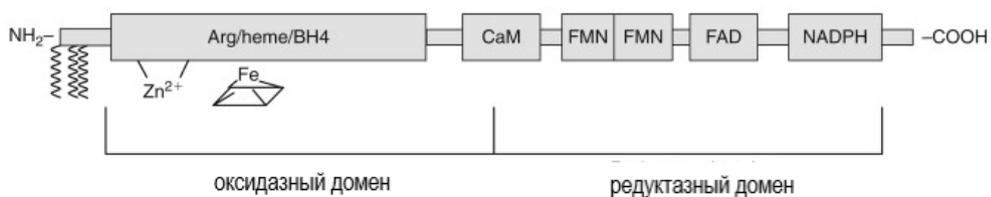


Рисунок 3 – Функциональные области eNOS. Примечание:  $BH_4$  – тетрагидробиоптерин, CaM – кальмодулин, FMN – флавиномононуклеотид, FAD –

флавинадениндинуклеотид, NADPH – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфат [201].

Эндотелиальная синтаза оксида азота локализована в кавеолах – колбообразных инвагинациях цитоплазматической мембраны [202]. Уровень активности eNOS постоянно контролирует белок кавеолин-1 – основной компонент кавеол и последовательность возле редуктазного С-концевого участка [203]. При воздействии на эндотелий химических и физических стимулов, в частности тромбина, гистамина, брадикинина и ацетилхолина, а также при изменении скорости кровотока, возникает активация  $Ca^{2+}$ -зависимых и  $Ca^{2+}$ -независимых сигнальных путей, что приводит к диссоциации связи между eNOS и кавеолином-1 и делая доступным участок для связывания с кальций-связывающим белком кальмодулином [204].

eNOS превращает аминокислоту L-аргинин в L-цитрулин с образованием NO в присутствии кислорода [205]. В нормальных физиологических концентрациях NO диффундирует через эндотелий в подлежащие гладкомышечные клетки, где связывается и активирует гуанилатциклазу [206], что увеличивает скорость превращения ГТФ в цГМФ [207]. Далее, цГМФ открывает  $K^+$ -каналы, что приводит к снижению скорости выхода  $Ca^{2+}$  и способствует его депонированию в саркоплазматическом ретикулуме [208, 209]. Данный эффект приводит к расслаблению гладкомышечных клеток, т.е. вызывает вазодилатацию [189].

Оксид азота играет важную роль в функционировании сердечно-сосудистой системы и ее адаптации в условиях патологического процесса [192]. Уменьшение образования или снижение биодоступности NO является одним из ведущих звеньев в патогенезе дисфункции эндотелия кровеносных сосудов [20]. В свою очередь, дисфункция эндотелия играет ключевую роль в таких патологических состояниях как атеросклероз, фиброз, легочная гипертензия, гипертрофическая кардиомиопатия, синдром полиорганной недостаточности, острая почечная недостаточность, антифосфолипидный синдром [21, 210-215].

Помимо NO, клетки эндотелия вырабатывают и другие вазодилататоры – простаглицлин и эндотелиальный гиперполяризующий фактор. Простаглицлин является метаболитом арахидоной кислоты, синтезируемым при участии циклооксигеназы-1 и -2 (ЦОГ-1, -2). Необходимо отметить, что при частичном или полном снижении продукции простаглицлина на фоне нормального уровня синтеза NO вазодилатация сохраняется. Однако, если синтез NO нарушен, то остаточная релаксация сосудов возникает за счет усиления синтеза простаглицлина, что указывает на участие данного простаноида в компенсаторном механизме вазодилатации [216, 189].

Эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF) также опосредует эндотелий-зависимую вазодилатацию. Предположительно механизм действия связан с открытием  $K^+$ -каналов гладкомышечных клеток, что приводит к выходу ионов  $K^+$  из клеток, тем самым вызывая гиперполяризацию цитоплазматической мембраны и дилатацию сосуда. Ингибиторы eNOS или циклооксигеназы, не способны подавлять активность EDHF, однако на активность фермента влияют ингибиторы  $K^+$ -каналов [217]. Таким образом, эндотелий-зависимая вазодилатация поддерживается в основном за счет постоянной активности eNOS, однако вазодилатация также возможна благодаря наличию компенсаторных механизмов, связанных с синтезом простаглицлина и EDHF.

Основными вазоконстрикторами, которые синтезируют клетки эндотелия, являются тромбоксан A2 (ТХА2) и эндотелин-1 (ЭТ-1). Тромбоксан A2 синтезируется из простогландина H2 при участии тромбоксан синтазы [218]. ТХА2 воздействует на простаноидные рецепторы, находящиеся на поверхности тромбоцитов и гладкомышечных клеток, тем самым вызывая активацию агрегации тромбоцитов и сокращение сосудов за счет депонирования и повышения внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$  [219, 220]. Кроме того, тромбоксан A2 вызывает сокращение гладкомышечных клеток бронхов, кишечника, мочевого пузыря и желчного пузыря [221].

Эндотелин-1 (ЭТ-1) представляет собой вазоконстриктор, синтезируемый в основном эндотелиоцитами. ЭТ-1 синтезируется под действием различных

химических стимулов, включая адреналин, тромбин, ангиотензин, вазопрессин, ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , ангиотензин II, свободные радикалы и др. [222]. Стоит отметить, что ЭТ-1 может вызывать как вазоконстрикцию, так и вазодилатацию. Так, воздействие ЭТ-1 на ЕТА- и ЕТВ<sub>2</sub>-рецепторы расположенные на мышечных клетках сосудов, приводит к сокращению сосуда, а воздействие на ЕТВ<sub>1</sub>-рецепторы запускает синтез оксида азота и вазодилатацию [223].

### **1.3.4 Роль эндотелия в регуляции системы гемостаза**

Эндотелий кровеносных сосудов активно участвует в регуляции коагуляции и фибринолиза, поддерживая сосудисто-тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз, а также фибринолиз [224]. Интактный эндотелий является тромборезистентным – поверхность мембран эндотелиоцитов и тромбоцитов обладает одинаковым отрицательным зарядом. Также атромбогенным эффектом обладают различные эндотелиальные факторы, включая NO, простациклин и tPA, которые ингибируют адгезию и агрегацию тромбоцитов на поверхности эндотелия [225].

При повреждении или активации эндотелия запускается синтез тромбогенных эндотелиальных факторов. Эндотелий синтезирует целый ряд факторов с прокоагулянтным действием: фактор фон Виллебранда (vWF), фактор активации тромбоцитов (PAF), тромбоксан А2, ингибитор тканевого активатора плазминогена (PAI-1) [226].

К атромбогенным факторам, относится тканевой активатор плазминогена (tPA). tPA является основным активатором лизиса фибринового сгустка и синтезируется преимущественно эндотелиальными клетками. tPA относится к семейству сериновых протеаз, состоит из 527-530 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 68 кДа. Активный центр tPA позволяет расщеплять связь Arg561-Val562 в молекуле плазминогена, в результате чего образуется плазмин – важный белок фибринолиза. В дальнейшем плазмин способен связываться с фибриновой сетью и расщеплять ее, вызывая лизис сгустка. Именно tPA, вырабатываемый эндотелием, поддерживает необходимый уровень

фибринолитической активности крови. В свою очередь, депрессия системы фибринолиза является важнейшим условием тромбоза сосудов [227].

Помимо tPA в фибринолизе схожим образом принимает участие урокиназный активатор плазминогена (uPA), который преимущественно синтезируется в почках [228].

Система протеина С (АПС) – важная антикоагулянтная система, в которую входит протеин С, протеин S, тромбомодулин, тромбин и ингибитор протеина С.

Тромбомодулин – трансмембранный белок, синтезируемый эндотелием, является рецептором к тромбину, который активно регулирует скорость процессов гемостаза [229].

Фактор фон Виллебранда (vWF) представляет собой белок с высокой молекулярной массой, который синтезируется преимущественно в эндотелии, а также в мегакариоцитах (клетки-предшественники тромбоцитов). vWF вместе с Р-селектином депонируется в специальных везикулах – тельцах Вейбеля-Паладе, которые имеются только в эндотелиальных клетках (ЭК) кровеносных сосудов и отсутствуют в эндотелии лимфатических сосудов. В данных палочковидных структурах происходит фолдинг и объединение субъединиц белка в один комплекс [230].

В системе фибринолиза среди эндотелиальных факторов важное место занимает ингибитор активатора плазминогена 1 типа (РАI-1) – основной ингибитор тканевого и урокиназного активаторов плазминогена, а также тканевого активатора [231]. Кроме того, РАI-1 может напрямую связываться и ингибировать плазмин [232]. РАI-1 представляет собой гликопротеин, который относится к семейству ингибиторов сериновых протеаз (serpin), или серпинов, с молекулярной массой 50 кДа и состоящий из 402 аминокислотных остатков. Выделяют две основные формы РАI-1: активную и неактивную, или латентную [233]. Активная форма РАI-1 может спонтанно превращаться в латентную форму за счет частичного погружения активного центра фермента вглубь молекулы [234]. В свою очередь латентная форма РАI-1 восстанавливает ферментативную активность при взаимодействии с витронектином [235]. Активная форма РАI-1

позволяет связываться с таргетной протеазой и образовывать ферментный комплекс в соотношении 1:1, после чего молекула PAI-1 разрушается [236, 237].

Стоит отметить, что PAI-1 является не только регулятором фибринолиза, но также ассоциирован с различными острыми и хроническими патологическими состояниями, включая заболевания мочевыделительной, легочной, сердечно-сосудистой систем и метаболический синдром [238, 239].

### **1.3.5 Роль эндотелия в воспалительной реакции**

При развитии инфекционного процесса ранняя воспалительная реакция позволяет ограничить распространение возбудителя, по возможности элиминируя его. На первых этапах из кровеносного русла в очаг воспаления привлекаются нейтрофилы, которые синтезируют провоспалительные цитокины (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и др.). Данные медиаторы воспаления усиливают мобилизацию иммунных клеток в очаг воспаления, что позволяет регулировать иммунный ответ в зависимости от вида патогена.

Эндотелий принимает активное участие в воспалительной реакции на всех ее этапах. Так, на поверхности эндотелия экспрессируются молекулы адгезии, которые позволяют лейкоцитам прикрепляться, а затем проникать через стенку кровеносного сосуда в очаг воспаления. На первых этапах из телец Вайбеля-Паладе в ответ на некоторые стимулы, в частности гистамина, в просвет сосуда секретируется P-селектин [240]. Одновременно эндотелиальные клетки синтезируют фактор активации тромбоцитов (PAF) [241]. Наличие в просвете сосуда P-селектина позволяет нейтрофилам связываться с эндотелиоцитами, а PAF активирует молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) и подготавливает клетку для последующей экстравазации нейтрофилов в ткани [242].

Эндотелиоциты также способны синтезировать цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8), а также выступать в качестве антигенпрезентирующих клеток [243].

Повреждение эндотелия кровеносных сосудов приводит к дисфункции эндотелия, что характеризуется изменением проницаемости, нарушением

адгезивных свойств и экспрессии ряда эндотелиальных факторов, тонко регулирующих сосудистый тонус, систему гемостаза, ангиогенез, а также участвующих в воспалительной реакции и иммунном ответе [225].

Дисфункцию клеток эндотелия считают одной из ведущих причин развития сердечно-сосудистых заболеваний, включая гипертоническую болезнь, коронарный синдром, хроническую сердечную недостаточность, инфаркт миокарда и поражение периферических артерий. Вероятно, с этим связана корреляция между эпидемиями гриппа и ростом числа госпитализированных больных с сердечно-сосудистой патологией [244].

### **1.3.6 Грипп и эндотелий кровеносных сосудов**

Вирус гриппа способен инфицировать и репродуцироваться в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека, т.к. данные клетки содержат на своей поверхности сиаловые кислоты с  $\alpha$ 2-6-гликозидной связью [245]. Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия приводит к снижению метаболизма. Так, при изучении активности дегидрогеназ (показатель метаболизма) с помощью МТТ-теста было показано, что показатели метаболизма клеток EA.hy926 снижаются, в среднем, на 40% через 18 ч после инфицирования различными подтипами вируса гриппа А и на 70% через 48 часов [12].

Инфекционная активность различных подтипов вируса гриппа А в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека, включая HUVEC и EA.hy926, достигает 3,5-4 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, что указывает на относительно высокую репродуктивную активность вирусов [13, 246, 247]. Было показано, что вирусы гриппа могут вызывать апоптоз клеток эндотелия за счет активации сигнального пути через рецепторы к ФНО- $\alpha$ . Это подтверждалось тем, что через 48 ч после инфицирования в клетках эндотелия наблюдали усиление экспрессии как самого ФНО- $\alpha$ , так и каспазы-3 – ключевой протеазы, расщепляющей цитоскелет и активирующей эндонуклеазу на терминальных стадиях апоптоза [247]. Кроме того, усиление экспрессии ФНО- $\alpha$  повышало образование стресс-фибрилл в эндотелиоцитах, что приводило к изменению морфологии клеток и

способствовало повышению проницаемости клеток и индуцировало апоптоз [248].

Наблюдаемое при гриппе повышение уровня провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-1 $\beta$ ) способствует увеличению активности трипсина в эндотелии, что вызывает деградацию и разрушение белка ZO-1 (zonula occludens-1), входящего в состав плотных межклеточных контактов. Таким образом, барьерная функция эндотелия нарушается, что способствует повышению проницаемости кровеносных сосудов [249].

Установлено, что избыточный апоптоз эндотелиоцитов является ключевым моментом в развитии эндотелиальной дисфункции. Так, ранее было показано, что в культуре клеток эндотелия кровеносных сосудов человека EA.hy926 и HUVEC, инфицированных различными подтипами вируса гриппа А, наблюдалась активация каспазы-3 уже через 30 минут после инфицирования [246, 247]. Кроме того, влияние отдельных поверхностных гликопротеинов вируса гриппа (HA, NA) на культуру клеток эндотелия EA.hy926, также вызывало активацию каспазы-3. С одной стороны, активация эффекторной каспазы 3-го типа необходима для осуществления апоптоза, а с другой стороны, необходима для продуктивной репродукции вируса [246]. Однако молекулярные механизмы апоптоза в клетках эндотелия остаются не до конца изученными [250].

При гриппе наблюдается дисрегуляция системы гемостаза с преобладанием процессов коагуляции над процессами фибринолиза [251]. Так, острая воспалительная реакция при гриппе сопровождается повреждением эндотелия кровеносных сосудов, в результате чего тканевой фактор (TF), присутствующий в субэндотелиальном слое, начинает взаимодействовать с циркулирующей кровью [252, 253]. Кроме того, эндотелиоциты и моноциты начинают экспрессировать тканевой фактор в ответ на различные провоспалительные цитокины (например, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-8) или при их инфицировании [254, 255].

В свою очередь, тканевой фактор (фактор свертывания крови III) запускает внешний путь свертывания крови, в результате чего образуется тромбин, необходимый для формирования тромба. Тромбин также усиливает процесс

коагуляции за счет активации факторов V, VIII, XI и XIII, запускает агрегацию тромбоцитов на поврежденной стенке кровеносного сосуда и последующее образование тромбоцитарно-фибринового сгустка [256].

При тяжелом течении гриппа наблюдается ДВС-синдром, который характеризуется декомпенсированной системной активацией процессов свертывания крови, что приводит к образованию микротромбов, нарушению микроциркуляции и способствует развитию полиорганной недостаточности [257]. Истощение факторов свертывания крови, а также резкое снижение количества тромбоцитов в последующем может сменяться массивными кровотечениями [258].

Одними из ключевых маркеров ДВС-синдрома являются PAI-1 и tPA, которые также участвуют в жизненном цикле вируса гриппа. Так, PAI-1 ингибирует трипсиноподобные протеазы (НАТ, TMPRSS2, триптазу, плазминоген) и тем самым подавляет протеолиз HA0, снижая инфекционную активность вновь синтезированных вирионов [28]. tPA конвертирует плазминоген в плазмин, что используется вирусом гриппа для расщепления HA0, т.к. плазмин обладает протеазной активностью [259]. Наблюдаемое при гриппе повышение уровня экспрессии PAI-1 и снижение экспрессии tPA, с одной стороны, снижает инфекционную активность вируса гриппа, с другой стороны, – может стать причиной развития ДВС-синдрома [28, 260, 261].

Активированный эндотелий при гриппе экспрессирует также vWF. Фактор фон Виллебранда накапливается в крови больных гриппом в виде мультимерных комплексов и способствует адгезии тромбоцитов и их агрегации на эндотелии, а также активирует VIII фактор свертываемости. Все вышеперечисленные изменения являются причиной тромбоза капиллярной сети легких [262].

Есть предположение, что фактор фон Виллебранда участвует в репродукции вируса гриппа. Так, нейраминидаза вируса гриппа может десиализировать vWF, т.к. его молекула содержит большое количество сиаловых кислот. Десиализированный фактор фон Виллебранда может непосредственно связываться с гликопротеином Ib тромбоцитов и вызывать их агрегацию [263]. О

важной роли vWF в регуляции гемостаза при гриппе могут указывать и данные о том, что в ряде белков вируса гриппа (PB2, PA, NA, NS1 и NS2) выявлены аминокислотные последовательности, мимикрирующие vWF, ADAMTS 13 и гликопротеина Ib тромбоцитов [30].

Другой причиной эндотелиальной дисфункции является повышенная проницаемость сосудов вследствие нарушения барьерной функции эндотелия, являющаяся причиной отека за счет деградации межклеточных контактов:

1) вирус гриппа способен вызывать снижение концентрации клаудина-5 – основного белка плотных межклеточных контактов, вызывая их деградацию [264, 265];

2) медиаторы воспаления, в частности фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) могут запускать фосфорилирование и эндоцитоз VE-кадгерина, тем самым разрушая адгезионные межклеточные контакты [266].

Инфицирование эндотелия при тяжелом течении гриппа может становиться причиной цитокинового шторма. На сегодняшний день основной причиной цитокинового шторма является патологическая активация эндотелия кровеносных сосудов, при которой эндотелий становится основным продуцентом провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ) и хемокинов (CXCL10, RANTES) [162]. Вовлеченный в воспалительный процесс эндотелий становится дополнительным очагом воспаления, что способствует чрезмерной активации иммунных клеток и выбросу провоспалительных цитокинов и хемокинов, создавая положительную обратную связь. Использование агонистов к рецептору сфингозин-1-фосфата (S1P1), расположенного на поверхности эндотелия и играющего ключевую роль в чрезмерной активации при цитокиновом шторме на фоне гриппа, имеет протективный эффект на сосудистый эндотелий и может использоваться в рамках патогенетической терапии при тяжелых формах гриппа и COVID-19 [167, 267].

Таким образом, сосудистый эндотелий играет ключевую роль в усилении воспалительного ответа, развитии цитокинового шторма, ОРДС и ДВС-синдрома при гриппе.

#### 1.4 Грипп и сердечно-сосудистая система

Кровеносные сосуды являются связующим звеном между сердцем и тканями организма. Стенка кровеносных сосудов состоит из трех слоев: интимы (внутренний слой), меди (средний слой) и адвентициальной оболочки (внешний слой) [268]. Кровеносные сосуды классифицируются в зависимости от функций, локализации и размеров на артерии, вены и капилляры.

Адвентициальный слой состоит из коллагена, эластина и фибробластов и отвечает за целостность и механические свойства сосудов [269]. Основным компонентом адвентиции является коллаген, связывающий сосуд с прилегающими тканями. В некоторых случаях в состав адвентициального слоя также входят гладкомышечные клетки, расположенные вблизи меди [270].

Медиа сосудов, в основном, представлена гладкомышечными клетками, которые осуществляют сокращение и расслабление сосудов, тем самым поддерживая регуляцию кровообращения. Гладкомышечные клетки ориентированы спирально, образуя многочисленные слои. Так, в сосудах среднего калибра насчитывается до 40 слоев миоцитов, а в магистральных сосудах – до 60 слоев. Выделяют два фенотипа гладкомышечных клеток: сократительный и синтетический. Гладкомышечные клетки с сократительным фенотипом имеют множество миофиламентов, состоящих из белка актина, и минимальное количество эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и свободных рибосом. В свою очередь, у гладкомышечных клеток с синтетическим фенотипом, наоборот, имеется большое количество синтетических органелл. Кроме того, такие клетки могут пролиферировать и мигрировать в другие ткани [271].

Интима большинства сосудов представлена эндотелием, расположенным на базальной мембране и подэндотелиальным слоем, представленным рыхлой соединительной тканью. В составе магистральных артерий интима также содержит гладкомышечные клетки, а в некоторых случаях и небольшое количество лимфоцитов и моноцитов [272]. Капилляры в отличие от артерий и вен состоят лишь из эндотелия с базальной мембраной и отростчатыми клетками соединительной ткани – перицитами.

Эндотелий представляет собой анатомо-функциональный барьер, который отделяет циркулирующую кровь от стенки кровеносных сосудов. Клетки эндотелия сейчас расценивают как динамический эндокринный орган, выстилающий все кровеносные и лимфатические сосуды, а также полости сердца [273]. В связи с синтезом эндотелием целого ряда важных для сосудистого гемостаза молекул, его поражение является одним из важных звеньев в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [274].

Как уже было отмечено ранее, помимо респираторного тракта вирус гриппа может поражать клетки других тканей и органов, включая сердечно-сосудистую систему. Так, грипп повышает риск возникновения глубокого тромбоза вен и легочной эмболии, острого коронарного синдрома, аритмий, инфаркта миокарда и других заболеваний сердечно-сосудистой системы [5, 275-285].

Кроме того, при тяжелом течении гриппа наблюдаются такие осложнения со стороны системы гемостаза как ДВС-синдром, диффузное альвеолярное кровотечение, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура и др. [280]. Одними из ключевых маркеров ДВС-синдрома являются PAI-1 и tPA. Так, наблюдаемое при гриппе повышение уровня экспрессии PAI-1 и понижение экспрессии tPA с последующим снижением активности PAI-1 и повышением экспрессии tPA может стать причиной развития ДВС-синдрома [28, 260, 261].

Эпидемиологические наблюдения показали, что с окончанием эпидемии гриппа регистрируется избыточная (дополнительная) смертность в группах риска у больных с хронической патологией сердца и легких – 870 на 100 тыс. переболевших [11]. Однако точные механизмы поражения сердечно-сосудистой системы при гриппе до сих пор неизвестны.

Считается, что геморрагический инсульт при гриппе возникает из-за дисрегуляции эндотелий-опосредованной вазомоторной активности сосудов мозга и неспособности поддерживать оптимальный тонус сосудов, что может наблюдаться после перенесенного заболевания [286].

Острый миокардит, хотя и диагностируется в редких случаях при тяжелом течении гриппа, может быть причиной летального исхода [287]. Острый

миокардит сопровождается одышкой, болью в грудной клетке, снижением артериального давления, повышением концентрации некоторых ферментов (тропонины, МВ-фракция креатинкиназы, миоглобин и др.), изменением ЭКГ (низкий вольтаж, элевация сегмента ST, появление патологического зубца Q), появлением выпота в перикарде и в редких случаях тампонады сердца или жизнеугрожающими нарушениями сердечного ритма [10]. При остром миокардите в аутопсийном материале, полученном из сердечной мышцы от больных гриппом, регистрируются воспаление с лимфоцитарной инфильтрацией, интерстициальный отек, кровоизлияния и некроз кардиомиоцитов. Так, на модели гриппозного миокардита у мышей линии Balb/c было показано, что при интраназальном заражении животных вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) регистрировали повышение экспрессии тринсина в клетках миокарда, что коррелировало с инфекционной активностью вируса [288]. Даже невысокая концентрация трипсина активирует различные матриксные металлопротеиназы (ММР), что в свою очередь, запускает активацию провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6) [289]. Известно, что данные провоспалительные цитокины вызывают чрезмерный синтез оксида азота в сердце, что ведет к снижению уровня АТФ в клетке за счет активации митохондриального комплекса I и II и индукции апоптоза кардиомиоцитов вследствие нарушения баланса между промотором апоптоза белком Bак и ингибитором апоптоза белком Bcl-x [290, 291].

Активация ММР также повышает проницаемость эндотелия в составе эндокарда и способствует миграции иммунных клеток в очаг воспаления посредством деградации межклеточного матрикса и разрушения базальной мембраны кардиомиоцитов [292]. Стоит отметить, что деградация межклеточного матрикса вызывает апоптоз (аноиксис) кардиомиоцитов, в результате чего развивается дилатационная кардиомиопатия и сердечная недостаточность [293].

Для коррекции дисфункции эндотелия были предложены различные препараты, включая L-аргинин, статины, нитраты, блокаторы кальциевых каналов, бета-блокаторы, антиоксиданты, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и др. Однако, перечисленные препараты не обладали

эффективностью при гриппе, что указывает на то, что выбор ангиопротектора необходимо делать, учитывая патогенез заболевания, который до сих пор остается изученным не до конца [294].

Проблема дисфункции эндотелия является актуальной, особенно в свете текущей пандемии коронавирусной инфекции COVID-19. Подобно вирусу гриппа, коронавирус SARS-CoV-2 также поражает кровеносные сосуды (даже в большей степени, чем грипп), вызывая цитокиновый шторм, тромбозы, ОРДС [295].

Вполне вероятно, что при изучении патогенеза других вирусных заболеваний вызывающих ОРЗ, также будут выявлена дисфункция эндотелия кровеносных сосудов, приводящая к патологии сердечно-сосудистой системы. Становится очевидным, что проблема поражения сердечно-сосудистой системы при гриппе требует пристального изучения со стороны исследователей и ее решение приведет к более эффективному лечению не только гриппозной инфекции, но и остальных ОРВИ. Однако механизмы повреждения сосудистого эндотелия вирусом гриппа до сих пор неизвестны.

## **Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материалы исследования**

#### **2.1.1 Вирусы**

Для исследования был выбран вирус гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09. Вирус был получен из лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

#### **2.1.2 Клеточные линии**

В исследовании была использована перевиваемая клеточная линия эндотелия человека EA.hy926, предоставленная доктором Корой Джин Эйджел из отдела патологии университета Северной Каролины, США. Клетки культивировали в среде DMEM с глутамином (Биолот, Россия), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия). Для предотвращения бактериальной контаминации использовали антибиотики стрептомицин и пенициллин (Биолот, Россия). Клетки эндотелия культивировали в культуральных флаконах (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. В исследовании использовали 3-х дневную культуру клеток эндотелия EA.hy926, что соответствовало суточному монослою. Подсчет клеток проводили с помощью гемоцитометра открытого типа (камера Горяева). Посевная концентрация составляла  $7,2-7,8 \times 10^4$  кл/мл.

#### **2.1.3 Лабораторные животные**

Эксперименты выполнены на 115 крысах (самцах) стока Wistar, в возрасте от 2 до 4 мес., весом 200-260 граммов (питомник лабораторных животных Центра доклинической и трансляционной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург). Животные находились в отдельном боксе (с целью исключения контакта с другими лабораторными животными), на полном пищевом рационе, соответственно суточным нормативам питания для данного вида животных, при стандартном суточном свето-темновом режиме. Опыты

проводили, соблюдая принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. Массу тела животных определяли непосредственно перед инокуляцией вирусосодержащего материала, когда животное находилось под глубокой анестезией, а также перед некропсией.

Все исследования были согласованы и одобрены комитетом по биоэтике ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А Смородинцева» Минздрава России с последующим оформлением протоколов №№ 18 и 31 заседания комитета по биоэтике ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А Смородинцева» Минздрава России от 30.01.2020 г. и 25.02.2021 г.

#### **2.1.4 Плазма крови**

Взятие крови у крыс стока Wistar проводилось под наркозом из верхней полый вены в вакуумные пробирки с ЭДТА-К2 (Greiner, Австрия). После чего образцы центрифугировали ( $5000 \times g$ , 10 минут), плазму аликвотировали и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2 Методы исследования**

#### **2.2.1 Вирусологические методы**

##### **2.2.1.1 Инфекционная активность вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в развивающихся куриных эмбрионах**

Исследуемый вирус гриппа трижды пассировали через 10-12 дневные развивающиеся куриные эмбрионы. После каждого пассажа готовили десятикратные разведения вируса в 4,5 мл буферно-солевого раствора (PBS), а затем вводили по 0,2 мл вирусосодержащей жидкости из разведений от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ , используя на каждое разведение по 5 эмбрионов. Куриные эмбрионы инкубировали при температуре  $36^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч. По истечении срока инкубации отдельно из каждого эмбриона отбирали по 100 мкл аллантоисной жидкости, которую помещали в лунки планшета для иммунологических реакций.

Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл 0,5%-ной суспензии куриных эритроцитов. Через 30-40 минут контакта при комнатной температуре, после оседания эритроцитов в контроле, проводили учет гемагглютинации.

### **2.2.1.2 Инфекционная активность вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в культуре клеток эндотелия EA.hy926**

Определение инфекционной активности вируса в инфицированных клетках EA.hy926 проводили с помощью детекции NP-антигена вируса гриппа иммуноферментным методом, используя к данному антигену моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, полученные из отдела биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Суспензию клеток со стандартной посевной концентрацией разливали в 96-луночные планшеты (Nunc, Дания). Далее следовала инкубация клеток в поддерживающей среде (DMEM) до образования клеточного монослоя. Через сутки клетки инфицировали 10-ти кратными разведениями вируса (множественность инфекции, MOI 0,01) в поддерживающей среде. Для этого в каждую лунку вносили по 150 мкл вирусосодержащей жидкости. Контакт вируса с клетками проводили в течение 1 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C. Для обеспечения многоциклового репродукции вируса гриппа в вирусосодержащую жидкость добавляли трипсин ТРСК в концентрации 2 мкг/мл (Sigma, США). После инкубирования клетки отмывали от вируса и добавляли по 100 мкл поддерживающей среды с трипсином. Через 5 суток от момента заражения вирусом проводили иммуноферментный анализ.

Для определения гемагглютинирующей активности (ГА) вируса использовали реакцию гемагглютинации (РГА) с 0,5% куриными эритроцитами. С этой целью на 5-е сутки после инфицирования клеток отбирали по 50 мкл супернатанта и титровали в физиологическом растворе с добавлением 50 мкл куриных эритроцитов.

### 2.2.1.3 Инфекционная активность вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в легких и брыжейке крыс

Предварительно исследуемый вирус адаптировали в легких крыс стока Wistar. Адаптацию вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (Н1N1)pdm09 проводили путем серии из 10 пассажей через легкие крыс. Первой группе крыс, состоящей из 3 животных, интраназально инокулировали 0,2 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Спустя 24 часа после инфицирования проводили эвтаназию изофлураном (Laboratories Karizoo, Испания). В стерильных условиях крыс вскрывали и выделяли легкие, после чего делали 10% гомогенат легких в культуральной среде alpha-MEM (Биолот, Россия). Гомогенат центрифугировали при  $1000 \times g$  в течение 10 минут для осаждения клеточного дебриса, затем супернатант был аликвотирован и хранился на  $-80^{\circ}\text{C}$ . Аликвоты с гомогенатами, которые имели наибольшие титры инфекционной активности вируса, были выбраны для следующих пассажей.

Инфекционную активность вируса в гомогенатах легких крыс стока Wistar определяли в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали как Ig ЭИД<sub>50</sub>/мл. Для этого ткани легких помещали в предварительно взвешенную стерильную чашку Петри, после чего определяли их вес. Далее легкие помещали в центрифужную пробирку и добавляли культуральную среду  $\alpha$ -MEM, в соотношении 1:10 после чего ткани гомогенизировали и полученный 10% гомогенат осаждали центрифугированием в течение 10 минут при  $1000 \times g$ .

Ткани брыжейки помещали в центрифужную пробирку, а затем добавляли 1 мл  $\alpha$ -MEM с последующем гомогенизацией тканей. Затем использовали супернатант для инокуляции 10-12 дневных РКЭ. Для этого готовили десятикратные разведения вируса в 4,5 мл буферно-солевого раствора, а затем вводили по 0,2 мл вирусосодержащей жидкости из разведений от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ , используя на каждое разведение по 5 эмбрионов. Куриные эмбрионы инкубировали в термостате при температуре  $36^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч. По истечении срока инкубации отдельно из каждого эмбриона отбирали по 100 мкл

аллантаической жидкости, которую помещали в лунки планшета для иммунологических реакций. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл 0,5%-ной суспензии куриных эритроцитов. Через 30-40 минут контакта при комнатной температуре, после оседания эритроцитов в контроле, проводили учет гемагглютинации.

### **2.2.2 Гистологические исследования**

Исследование гистопатологических изменений в тканях и кровеносных сосудах легких и брыжейки проводили при адаптации вируса гриппа (на 9-м и 10-м пассаже), а также при инфицировании крыс адаптированным вирусом гриппа. Для этого материал фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 часов при комнатной температуре. Гистологическую проводку выполняли с использованием автоматического процессора замкнутого типа Shandon Excelsior ES (Thermo, Великобритания) в изопропиловом спирте. С готовых гистологических блоков, залитых в гомогенизированный парафин, изготавливали срезы толщиной 4-5 мкм на ротационном микротоме. Срезы депарафинизировали в ксилоле, дегидратировали в спиртах и окрашивали гематоксилин-эозином. При просмотре материала на световом микроскопе Nikon Eclipse E200 при увеличении  $\times 40$ ,  $\times 100$ ,  $\times 400$  (окуляр Nikon CFI 10 $\times$ /20, объективы Nikon E Plan 4 $\times$ /0,10 WD 30, Nikon E Plan 10 $\times$ /0,25 WD 7,0, Nikon E Plan 40 $\times$ /0,65 WD 0,65) определяли качество гистологической проводки и пригодность материала для дальнейшего исследования. Крысам в контрольной группе за 24 и 96 часов до вскрытия интраназально инокулировали 0,2 мл культуральной среды  $\alpha$ -MEM.

### **2.2.3 Иммуногистохимические исследования**

#### **2.2.3.1 Детекция NP антигена вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в культуре клеток эндотелия EA.hy926 методом иммуноферментного анализа**

Через 5 суток после заражения вирусом гриппа клетки эндотелия человека из лунок аспирировали поддерживающую среду, а затем клетки фиксировали 80% холодным ацетоном в течение 20 минут при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Затем лунки

трижды отмывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (рН 7,2–7,4). Далее в лунки добавляли 200 мкл 5% раствора обезжиренного молока (BioRad, США) и инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 1 часа. На следующем этапе из всех лунок раствор обезжиренного молока сливали и добавляли по 100 мкл конъюгата (соотношение антител 1:1000). Инкубацию проводили в течение 45 минут при температуре 37°C. После удаления конъюгата лунки трижды промывали ФСБ с твином 20. С помощью субстратной смеси проводили пероксидазную реакцию. Для этого в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата. Реакцию останавливали путем внесения 1Н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а затем измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля служили неинфицированные клетки EA.hy926.

### **2.2.3.2 Детекция NP антигена вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в кровеносных сосудах легких и брыжейки крыс иммуногистохимическим методом**

С парафиновых блоков легких крыс изготавливали срезы толщиной 4-5 мкм, после чего их помещали на предметные стекла с поли-L-лизиновым покрытием (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Для обнаружения вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах легких инфицированных крыс использовали первичные мышинные моноклональные антитела (Clone 6D11), полученные из отдела биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Предварительную температурную демаскировку не выполняли. Инкубацию срезов с первичными антителами в разведении 1:1000 проводили на протяжении 1 часа при комнатной температуре во влажной камере. Для детекции NP-антигена в аутопсийном материале использовали систему визуализации (Dako, Дания), включающей в себя реакцию с DAB-хромогеном.

Для количественной оценки интенсивности экспрессии NP антигена вируса гриппа и эндотелиальных факторов проводили морфометрические исследования, в ходе которых выполняли микрофотографирование микропрепаратов,

окрашенных иммуногистохимически к NP-антигену, на микроскопе Nikon Eclipse E200 с цифровой камерой Nikon DS-Fi1 и программным обеспечением Nis-Elements F3.2 с постоянными параметрами (разрешение Fast (Focus) – 1280×960 пикселей, Quality (Capture) – 2560×1920 пикселей; Exposure 30 ms (объектив ×40); Gain 1.70×; Contrast Enhanced; Advanced – Hemotoxilin, Red 1.05, Green 0.82, Blue 1.90) [285]. Предварительно проводили калибровку объектива Nikon E Plan 40x/0.65 WD 0.65 с использованием объект-микрометра 0-1мм/100 (Nikon). Фотосъемку кровеносных сосудов легких крыс производили на 6 произвольно выбранных полях зрения, используя увеличение ×40. Поля зрения с артериальными изменениями и дефектами окрашивания исключались при фотосъемке. Морфометрическую обработку полученных снимков проводили в программе Nis-Elements BR 4,40 (Nikon) при постоянных настройках с использованием бинаризации по синему каналу в автоматическом режиме с постоянными значениями порога. Среднюю интенсивность сигнала высчитывали как среднюю арифметическую интенсивность каждого пикселя (I) в RGB-модели (кодировка цвета с помощью трех основных цветов: красного, зеленого и синего) по следующей формуле:

$$I=1/3(R+G+B),$$

где R – интенсивность сигнала в красном спектре, G – интенсивность сигнала в зеленом спектре, B – интенсивность сигнала в синем спектре.

### **2.2.3.3 Определение уровня эндотелиальных факторов eNOS, PAI-1 и tPA в культуре клеток эндотелия EA.hy926 и в эндотелии кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс**

С парафиновых блоков легких и брыжейки крыс с острой кардиомиопатией изготавливали срезы толщиной 4-5 мкм, после чего их помещали на предметные стекла с поли-L-лизиновым покрытием (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Для определения уровня экспрессии эндотелиальных факторов

использовали моноклональные мышинные антитела к eNOS (Abcam, США), поликлональные кроличьи антитела к PAI-1 (Abcam, США) и моноклональные мышинные антитела к tPA (Novus Biologicals, США). Предварительную температурную демаскировку не выполняли. Инкубацию срезов с первичными антителами в разведении 1:200 (для PAI-1, tPA) и 1:500 (для eNOS) проводили на протяжении 1 часа при комнатной температуре во влажной камере. Для детекции исследуемого антигена в аутопсийном материале использовали систему визуализации (Dako, Дания), включающей в себя реакцию с DAB-хромогеном.

Морфометрическую обработку полученных снимков проводили в программе Nis-Elements BR 4,40 (Nikon) при постоянных настройках с использованием бинаризации по синему каналу в автоматическом режиме с постоянными значениями порога. Для каждого эндотелиального фактора был эмпирически подобран порог регистрации.

В качестве 3 основных исследуемых параметров были выбраны:

- 1) Площадь заполнения – площадь с сигналом в поле зрения.
- 2) Суммарная плотность – сумма отдельных оптических плотностей (О.П.) каждого пикселя в поле зрения. О.П. высчитывали по формуле:

$$\text{О.П.} = -\log \frac{\text{Значение интенсивности пикселя} + 0,5}{\text{Максимальное значение интенсивности}}$$

- 3) Суммарная интенсивность – сумма интенсивности всех пикселей изучаемого объекта в поле зрения; интенсивность определяли в диапазоне регистрации сигнала между минимальными и максимальными значениями для каждого исследуемого фактора.

## **2.2.4 Иммуноферментный метод**

### **2.2.4.1 Определение уровня антител к tPA в плазме крови крыс методом сэндвич иммуноферментного анализа**

Перед постановкой ИФА проводили подготовку стандартных образцов, содержащих определенную концентрацию анализируемого вещества. Для этого готовили стоковый стандарт tPA с концентрацией 1500 пг/мл. Путем двукратного разведения готовили семь стандартных образцов, используя раствор для разведения (Abscam, Великобритания).

В лунки 96 луночного планшета, сенсibilизированные моноклональными anti-tag антителами к первичным антителам anti-tPA с аффинной меткой (tag), добавляли по 50 мкл стандартных образцов и исследуемой плазмы крови в дубле. Затем добавляли 50 мкл смеси антител, которая содержала антитела anti-tPA с аффинной меткой (tag) и антитела anti-tPA, конъюгированные с пероксидазой хрена. После этого лунки закрывали пленкой для планшета и инкубировали при комнатной температуре в термошейкере (Biosan, Латвия) (60 мин, 400 об/мин). Содержимое лунок аспирировали и промывали трижды раствором для промывания, добавляя 350 мкл в каждую лунку. Затем вносили 100 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали в термошейкере (10 мин, 400 об/мин). Реакцию проявляли добавлением стоп реагента ( $H_2O_2$ ) в объеме 100 мкл. Результаты реакции учитывали в иммуноферментном анализаторе (Anthos, Австрия) при длине волны 450 нм. Концентрацию tPA в плазме крови крыс определяли исходя из стандартной кривой.

### **2.2.4.2 Определение уровня антител к PAI-1 в плазме крови крыс методом иммуноферментного анализа**

Перед постановкой ИФА проводили подготовку стандартных образцов, содержащих определенную концентрацию анализируемого вещества. Для этого готовили стоковый стандарт PAI-1 с концентрацией 50 нг/мл. Путем двукратного разведения готовили десять стандартных образцов, используя раствор для разведения (Abscam, Великобритания).

В лунки 96 луночного планшета, сенсibilизированные моноклональными первичными антителами anti-uPA, добавляли по 100 мкл стандартных образцов и исследуемой плазмы крови в дубле после чего инкубировали при комнатной температуре в термошейкере (Biosan, Латвия) (30 мин, 300 об/мин). Затем содержимое лунок аспирировали и промывали трижды раствором для промывания, добавляя 300 мкл в каждую лунку. Далее в каждую лунку добавляли первичные антитела и помещали планшет в термошейкер (30 мин, 300 об/мин). После инкубации содержимое лунок аспирировали и промывали трижды раствором для промывания, добавляя 300 мкл в каждую лунку. Затем в каждую лунку добавляли раствор вторичных антител в объеме 100 мкл после чего следовала стадия инкубации в термошейкере (30 мин, 300 об/мин). Далее содержимое лунок аспирировали и промывали трижды раствором для промывания, добавляя 300 мкл в каждую лунку. Затем вносили 100 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали в термошейкере (5 мин). Реакцию проявляли добавлением стоп реагента (1N H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в объеме 50 мкл. Результаты реакции учитывали в иммуноферментном анализаторе (Anthos, Австрия) при длине волны 450 нм. Концентрацию tPA в плазме крови крыс определяли исходя из стандартной кривой.

## **2.2.5 Физиологические методы**

### **2.2.5.1 Определение вазомоторной активности кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс**

Вазомоторную активность изучали на многоканальном проволочном миографе (DMT 620M, Дания). Сразу после эвтаназии животных органокомплекс сердце-легкие и брыжейку извлекали и помещали в чашку Петри, заполненную охлажденным раствором Кребса-Хензеляйта следующего состава [мМ]: NaCl 119, KCl 4,7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17, CaCl<sub>2</sub> 1,6, MgSO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25, глюкоза 5,5, ЭДТА 0,03. Дальнейшие манипуляции по выделению легочных артерий производили с использованием бинокулярной лупы, размещая чашку Петри на ледяной бане. Из верхней доли правого легкого выделяли участки латеральных артерий 2-3-го

порядка. Из вентрального участка верхних сегментов левого легкого выделяли артерии 2-го порядка. Из брыжейки выделяли по три артерии 3-го порядка.

Монтаж сосудов в камере миографа производили при помощи двух стальных проволок диаметром 40 мкм. Исследованию подвергали по 3 сосуда от каждого животного. После нормализации трансмурального давления производили активацию сократительных механизмов посредством инкубации в гиперкалиевом растворе Кребса-Хензеляйта ([мМ]: NaCl 78,2, KCl 60, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,17, CaCl<sub>2</sub> 1,6, MgSO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25, глюкоза 5,5, ЭДТА 0,03) и 10 мкМ серотонина (5-ТН) с последующей повторной отмывкой раствором Кребса-Хензеляйта. Для исследования сократительной функции использовали протокол кумулятивного дозозависимого ответа на серотонин. Сосуд инкубировали в растворах с концентрацией серотонина от 10<sup>-7</sup> до 10<sup>-5</sup> М. Для исследования эндотелий-зависимого расслабления осуществляли предварительное сокращение сосуда серотонином на 60% от максимального. Затем проводили инкубацию с ацетилхолином (АХ) по аналогичной сократительному ответу схеме. Регистрацию данных производили при помощи программы LabChart 8. Для полученных кривых рассчитывали концентрацию, обеспечивающую 50% максимального ответа (EC<sub>50</sub>, мкМ) и величину ответа при максимальной концентрации агониста (E<sub>max</sub>, %).

Для исследования сократительной функции артерий брыжейки вместо серотонина использовали фенилэфрин (ФЭ) по той же схеме.

#### **2.2.5.2 Моделирование экспериментальной гриппозной инфекции на крысах**

Адаптацию исследуемого вируса гриппа проводили путем серии из 10 пассажей через легкие крыс. Первой группе крыс, состоящей из 3 животных, интраназально инокулировали 0,2 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Спустя 24 часа после инфицирования проводили эвтаназию изофлураном. В стерильных условиях проводили некропсию животных и выделяли легкие, после чего делали 10% гомогенат легких в культуральной среде α-МЕМ. Гомогенат

центрифугировали при  $1000 \times g$  в течение 10 минут для осаждения клеточного дебриса, затем супернатант был аликвотирован и хранился на  $-80^{\circ}\text{C}$ . Аликвоты с гомогенатами, которые имели наибольшие титры инфекционной активности вируса, были выбраны для следующих пассажей.

### **2.2.5.3 Моделирование острой кардиомиопатии**

Острую кардиомиопатию вызывали в результате введения крысам доксорубицина – антибиотика из группы антрациклинов, обладающим существенной кардиотоксичностью [296].

Для этого использовали 20 крыс (самцов) стока Wistar массой 200-250 г. Рандомизацию животных по группам проводили методом случайной выборки. Крысы получали шесть доз доксорубицина (2,91 мг/кг внутривентриально через день, кумулятивная доза равнялась 17 мг/кг) в течение двух недель; выбранная кумулятивная доза адекватна для моделирования острой кардиомиопатии на крысах [297]. На протяжении всего эксперимента проводили взвешивание животных и корректировку доз. Для регистрации развития кардиомиопатии до введения доксорубицина и через два дня после его окончания проводили эхокардиографию (ЭхоКГ). Для выполнения эхокардиографического исследования использовали ультразвуковую установку высокого разрешения The Vevo 2100 (Fugifilm, Канада). Для обеспечения необходимого качества изображения применяли сосудистый линейный датчик с частотой 13 МГц. Перед проведением эхоКГ животное наркотизировали с использованием 2% изофлюрана и размещали на подогреваемом столике ( $37^{\circ}\text{C}$ ) в положении на спине. Над областью сердца предварительно удаляли шерсть для максимального контакта с ультразвуковым датчиком и гелем. В ходе исследования для оценки морфофункциональных показателей регистрировали следующие показатели:

- 1) ПСЛЖд – толщина передней стенки левого желудочка (ЛЖ) в диастолу, мм;
- 2) ЗСЛЖд – толщина задней стенки ЛЖ в диастолу, мм;
- 3) КДРЛЖ – конечный диастолический размер ЛЖ, мм;

- 4) КСРЛЖ – конечный систолический размер ЛЖ, мм;
- 5) ФУ – фракция укорочения,  $(\text{ФУ} (\%) = (\text{КДР} - \text{КСР})/\text{КДР} \times 100)$ .

В качестве критерия включения крыс в эксперимент использовали увеличение конечного систолического и диастолического размеров левого желудочка и снижение фракции укорочения. Кроме изменений, регистрируемых в ЭхоКГ, модель острой кардиомиопатии также подтверждали в гистологическом исследовании.

## **2.2.6 Биоинформационные методы**

### **2.2.6.1 Компьютерный поиск гомологичных аминокислотных последовательностей в эндотелиальных факторах (eNOS, PAI-1 и tPA) и вирусе гриппа**

Для компьютерного анализа был использован вирус гриппа А/Санкт-Петербург/RII04/2016 (H1N1)pdm09. Источником первичных структур белков анализируемого вируса и эндотелиальных факторов человека служили общедоступные в Интернете базы данных [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) и [www.nextprot.org](http://www.nextprot.org), соответственно. Поиск гомологичных последовательностей в структуре вирусных белков и эндотелиальных факторов осуществляли путем сравнения в них фрагментов длиной в 12 аминокислот, принимая родственными те из них, которые проявляли идентичность по  $\geq 8$  позициям.

В исследовании использовали международный код аминокислот: А — аланин, С — цистеин, D — аспарагиновая кислота, E — глутаминовая кислота, F — фенилаланин, G — глицин, H — гистидин, I — изолейцин, K — лизин, L — лейцин, M — метионин, N — аспарагин, P — пролин, Q — глутамин, R — аргинин, S — серин, T — треонин, V — валин, W — триптофан, Y — тирозин.

### **2.2.7 Статистический анализ данных**

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2016 и GraphPad Prism 8. Параметры описательной статистики включали: среднее значение показателя в группе (Mean),

стандартное отклонение (SD), стандартную ошибку среднего (SEM). Отличия между выборками оценивали с помощью параметрического теста Стьюдента, теста Даннета, непараметрического критерия Манна-Уитни, критерия Краскела-Уоллиса, дисперсионного анализа (ANOVA) и метода нелинейной регрессии.

Различия считали статистически значимыми для значений  $p < 0,05$ .

## Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Влияние вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на уровень экспрессии эндотелиальных факторов в культуре клеток эндотелия EA.hy926

#### 3.1.1 Инфекционная активность вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в культуре клеток эндотелия EA.hy926

Для исследования был выбран вирус гриппа A/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09, который трижды пассировали на куриных эмбрионах. Так, инфекционная активность исследуемого вируса составила 8-9 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл.

Для определения возможности репродукции исследуемого вируса гриппа культуру клеток эндотелия инфицировали при значениях множественности заражения (MOI) 0,01. Инфекционную активность вируса в клетках оценивали по содержанию внутриклеточного NP антигена вируса гриппа иммуноферментным методом, используя к данному антигену моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Рисунок 4).

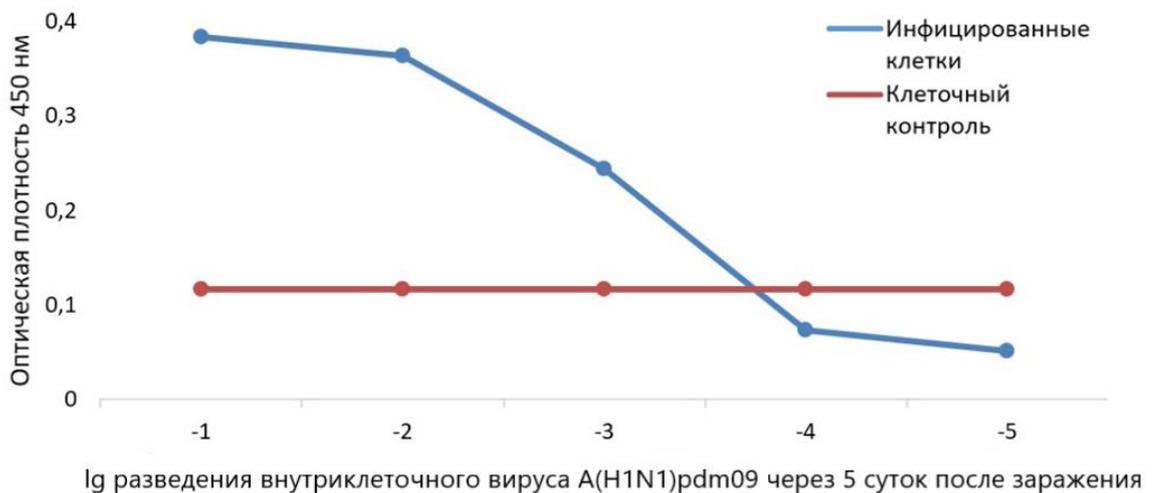


Рисунок 4 – Детекция внутриклеточного NP антигена вируса гриппа A в инфицированных клетках EA.hy926 иммуноферментным методом.

Как видно из рисунка 4, минимальную концентрацию внутриклеточного NP антигена вируса гриппа А в инфицированных клетках обнаруживали в разведении, соответствующем  $3,5 \lg$  (по сравнению с клеточным контролем), что указывает на инфекционную активность вируса, равную  $3,5 \lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Гемагглютинирующая активность вируса в супернатанте через 5 суток после инфицирования клеток эндотелия EA.hy926 составила 1:64.

### **3.1.2 Исследование уровня экспрессии eNOS и PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09**

Важными эндотелиальными факторами, играющими ключевую роль в поддержании тонуса сосудов и системы гемостаза, являются eNOS, PAI-1 и tPA. Изменение экспрессии данных эндотелиальных факторов рассматривают как причину дисфункции эндотелия. В первую очередь, эндотелиальная дисфункция – это недостаток продукции или биодоступности оксида азота [298]. Эндотелиальная синтаза оксида азота – критически важный фермент, который постоянно синтезирует NO, оказывающий вазодилатирующий, противовоспалительный, антипролиферативный, атромбогенный и вазопротекторный эффект [190-193]. Повышение или снижение активности PAI-1 влияет на процессы тромбообразования и фибринолиза, а чрезмерная модуляция активности данного эндотелиального фактора является основным маркером ДВС-синдрома [261].

Экспрессию эндотелиальных факторов – eNOS и PAI-1 в клетках эндотелия кровеносных сосудов EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, исследовали в динамике – через 6 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч. Уровень экспрессии эндотелиальных факторов исследовали иммуноцитохимическим методом.

### 3.1.2.1 Исследование уровня экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09

На рисунке 5А представлена экспрессия eNOS в неинфицированных клетках (контроль). На рисунках 5В-Г представлены результаты экспрессии eNOS в инфицированных вирусом гриппа клетках эндотелия через 6 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч.

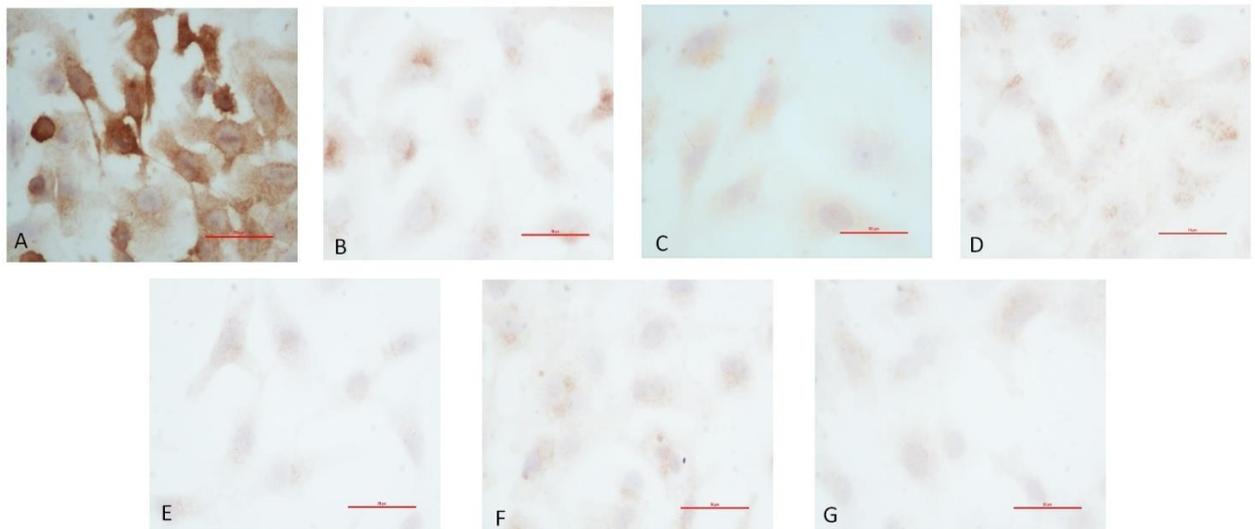


Рисунок 5 – Экспрессия eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 с использованием мышиных моноклональных антител к eNOS.

А – неинфицированные клетки (контроль); В-Г – клетки через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 часа после инфицирования вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (ув.  $\times 40$ ; окрашивание клеток DAB-хромогеном).

Как видно из рисунков 5В-Г, экспрессия eNOS, в инфицированных вирусом гриппа клетках эндотелия была резко снижена на протяжении всего исследуемого периода по сравнению с контролем (Рис. 5А).

Для количественного определения уровня экспрессии eNOS в инфицированных клетках эндотелия определяли три основных параметра сигнала через 6 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч (Табл. 2).

Таблица 2 – Уровень экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, %).

Параметры сигнала, относительные значения (%)	Контроль клеток	Время после инфицирования клеток (ч)					
	6-72 ч (n=15)	6 (n=15)	12 (n=15)	18 (n=15)	24 (n=15)	48 (n=15)	72 (n=15)
Площадь заполнения	100±13,8	6,5±1,7*	11,2±2,6*	4,1±1,3*	2,4±0,5*	2,4±0,6*	2,5±0,3*
Суммарная плотность	100±8,9	3,9±1,1*	8,8±2,4*	2,6±0,7*	1,8±0,5*	1,4±0,4*	1,6±0,2*
Суммарная интенсивность	100±17,1	7,9±2,1*	12,1±2,8*	5,4±1,5*	2,9±0,6*	3,1±0,7*	3,3±0,4*

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Даннета,  $n=15$ .

Как видно из таблицы 2, динамика изменения сигнала по трем параметрам в интервале 6-72 часов совпадает.

Основываясь на этих данных, для оценки активности eNOS при инфицировании клеток эндотелия EA.hy926 вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в качестве основного параметра сигнала был выбран параметр суммарной интенсивности (Рисунок 6).

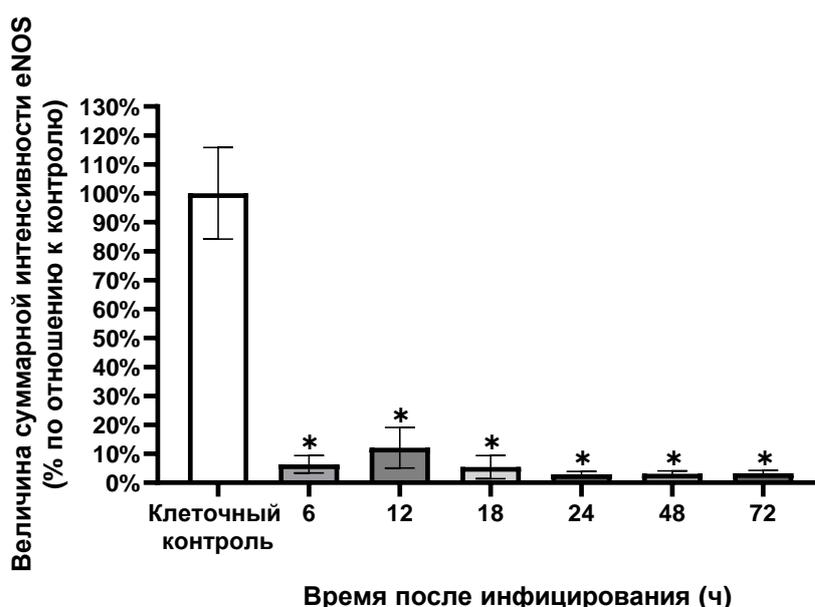


Рисунок 6 – Динамика изменения уровня экспрессии eNOS по величине суммарной интенсивности в культуре клеток эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, %).

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Даннета,  $n=15$ .

Как видно из рисунка 6, экспрессия eNOS в инфицированных клетках, снижалась до  $7,9 \pm 2,1\%$  уже через 6 ч (суммарная интенсивность в клеточном контроле была принята за 100%). Через 12 ч уровень экспрессии этого фактора несколько повышался до  $12,1 \pm 2,8\%$ , через 18 ч снижался до  $5,4 \pm 1,5\%$  и через 24 ч уровень достигал своего минимума –  $2,9 \pm 0,6\%$ . Через 48 ч уровень экспрессии eNOS составлял  $3,1 \pm 0,7\%$ , а через 72 ч –  $3,3 \pm 0,4\%$ .

Таким образом, вирус гриппа A(H1N1)pdm09 вызывал снижение экспрессии eNOS в клетках эндотелия человека (в 8 раз и более) на протяжении всего периода исследования.

### 3.1.2.2 Уровень экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09

Экспрессия PAI-1 в неинфицированных клетках (контроль) представлена на рисунке 7А. На рисунках 7В-Г представлены результаты по изменению экспрессии PAI-1 в инфицированных вирусом гриппа клетках эндотелия через 6 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч.

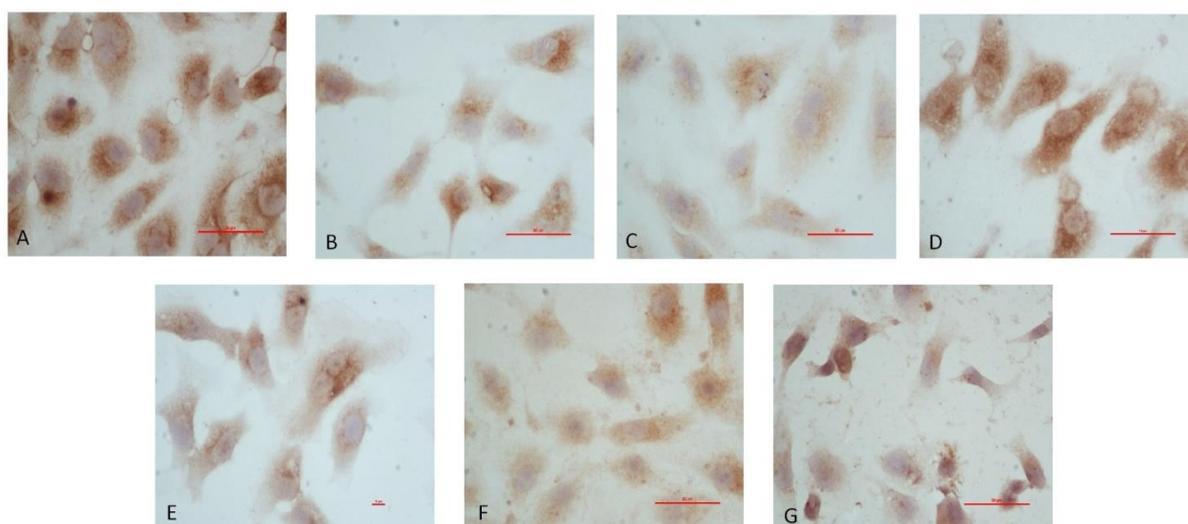


Рисунок 7 – Экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 с использованием поликлональных кроличьих антител к PAI-1. А – неинфицированные клетки (контроль); В-Г – клетки через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 часа после инфицирования исследуемым вирусом (ув.  $\times 40$ ; окрашивание клеток DAB-хромогеном).

Как видно из рисунков 7В-Г экспрессия PAI-1 в инфицированных клетках эндотелия варьировала на протяжении всего периода исследования по сравнению с контролем (Рисунок 7А).

Данные по основным параметрам сигнала для оценки экспрессии PAI-1 приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Уровень экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, %).

Параметры сигнала, относительные значения (%)	Контроль клеток	Время после инфицирования (ч)					
	6-72 ч (n=15)	6 (n=15)	12 (n=15)	18 (n=15)	24 (n=15)	48 (n=15)	72 (n=15)
Площадь заполнения	100±15,1	39,2±3,2*	36,7±5,5*	117±9,7	17,2±3,3*	21,1±4,7*	33,3±5,6*
Суммарная плотность	100±11,2	25,4±2,4*	25,3±4,1*	107,7±8,9	13,8±2,8*	18,4±4,2*	30,4±5,4*
Суммарная интенсивность	100±13,4	49,6±5,7*	43,2±4,9*	116,7±8,5	18,9±4,2*	23,5±5*	35±5,8*

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Даннета,  $n=15$ .

Как видно из таблицы 3 максимальные значения параметров сигналов в инфицированных вирусом гриппа клетках эндотелия были зарегистрированы через 18 часов после инфицирования клеток, а минимальные – через 24 часа. Так, суммарная интенсивность PAI-1 снижалась на протяжении первых 12 ч: через 6 часов экспрессия снижалась до  $49,6 \pm 5,7\%$  (суммарная интенсивность в клеточном контроле была принята за 100%), а через 12 часов составляла уже  $43,2 \pm 4,9\%$ , после чего наблюдалось резкое повышение экспрессии уже через 18 ч после инфицирования клеток эндотелия –  $116,7 \pm 8,5\%$ . Наиболее выраженное снижение экспрессии PAI-1 было зарегистрировано через 24 часа после инфицирования –  $18,9 \pm 4,2\%$ , а через 48 и 72 часа уровень экспрессии составлял  $23,5 \pm 5,0\%$  и  $35 \pm 5,8\%$ , соответственно.

Как и в случае исследования экспрессии eNOS, количественную оценку уровня экспрессии PAI-1 проводили по параметру суммарной интенсивности (Рисунок 8).

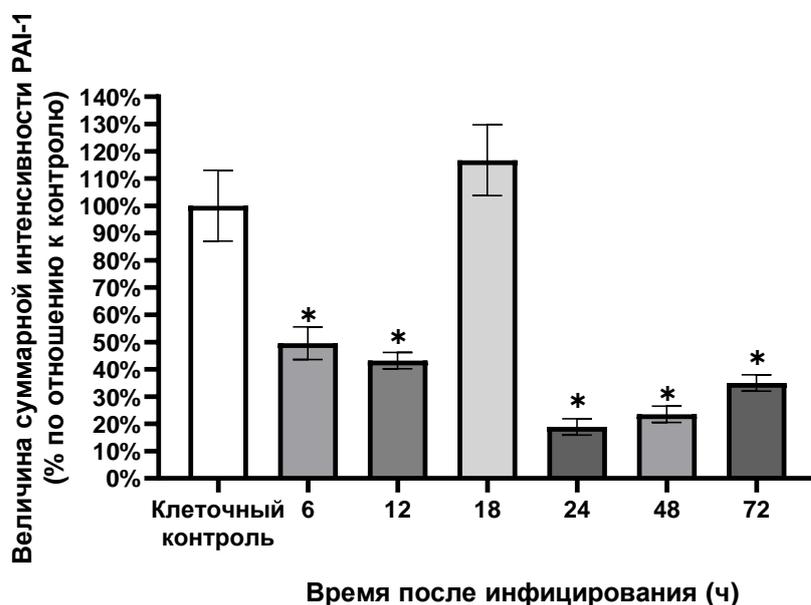


Рисунок 8 – Динамика изменения уровня экспрессии PAI-1 по величине суммарной интенсивности в культуре клеток эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, %).

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Даннета,  $n=15$ .

Таким образом, в клетках эндотелия, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, экспрессия PAI-1 в значительной степени варьировала на протяжении всего исследуемого периода по сравнению с контролем клеток. Так, уровень снижался в 2 и более раза в первые 12 часов после инфицирования клеток. Через 18 часов наблюдали тенденцию к повышению экспрессии в 1,16 раз, после чего на всех последующих сроках исследования снова следовало снижение экспрессии в 3-5 раз по сравнению с клеточным контролем.

Таким образом, модуляция экспрессии PAI-1 и резкое снижение экспрессии eNOS в инфицированных клетках эндотелия подтверждает способность вируса гриппа A(H1N1)pdm09 влиять на экспрессию эндотелиальных факторов и тем самым индуцировать эндотелиальную дисфункцию. Кроме того, наблюдаемое

через 12, 24 и 48 ч снижение экспрессии PAI-1 может являться причиной геморрагического синдрома, наблюдаемого при тяжелой гриппозной инфекции. В свою очередь, тенденция к повышению экспрессии PAI-1 наблюдаемая через 18 ч после инфицирования клеток эндотелия исследуемым вирусом может запускать процессы тромбообразования, вплоть до развития ДВС-синдрома.

### **3.2 Функциональная активность кровеносных сосудов крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09**

Для изучения влияния вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 на функциональную активность кровеносных сосудов, вирус предварительно адаптировали в последовательных пассажах в легких крыс стока Wistar.

#### **3.2.1 Определение инфекционной активности вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 при адаптации в легких крыс**

Инфекционную активность исследуемого вируса гриппа во время адаптации определяли на куриных эмбрионах, начиная с 4 пассажа по общепринятой методике (Табл. 4).

Таблица 4 – Результаты титрования вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 на куриных эмбрионах.

№ пассажа	Инфекционная активность вируса гриппа (lg ЭИД <sub>50</sub> /мл)	
	Неинфицированные крысы (контроль, n=3)	Инфицированные крысы (n=3)
4	0,0±0,0	6,0±0,0*
5	0,0±0,0	5,2±0,3*
6	0,0±0,0	6,2±0,3*
7	0,0±0,0	6,2±0,3*
8	0,0±0,0	6,2±0,3*
9	0,0±0,0	6,6±0,2*
10	0,0±0,0	7,0±0,0*

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем. Показаны стандартные отклонения по 5 повторам.

Как следует из данных, представленных в таблице 4, исследуемый вирус активно репродуцировался в легких половозрелых крыс (8-10 недель). Для дальнейшего исследования были выбраны вирусы, прошедшие 9-й и 10-й пассаж в легких крыс. Выбор этих пассажей согласовывался с данными об инфекционной активности вирусов гриппа у новорожденных и шестидесятидневных крыс [287].

Основываясь на полученных данных по инфекционной активности исследуемого вируса гриппа, а также результатах гистологического исследования тканей и кровеносных сосудов легких, был сделан вывод о том, что для дальнейших исследований целесообразно использовать вирус гриппа, прошедший 9 пассажей через легкие крыс, который приводил к более выраженным гистопатологическим изменениям в кровеносных сосудах (Рисунок 9).

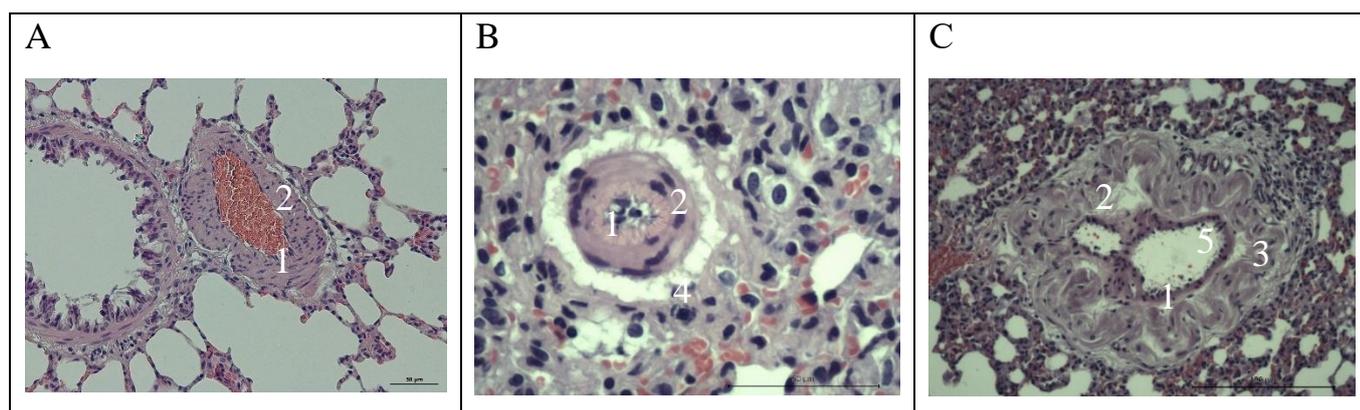


Рисунок 9 – Гистологическое исследование кровеносных сосудов легких крыс в 9-ом пассаже вируса гриппа A(H1N1)pdm09.

А – контрольный срез кровеносного сосуда легких крысы; В – срез артериолы мелкого калибра; С – срез артериолы среднего калибра.

Обозначения: 1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда; 3 – разволокнение меди; 4 – выраженный спазм; 5 – нити фибрина в просвете сосуда (ув.  $\times 100$  для А; ув.  $\times 400$  для В; ув.  $\times 200$  для С; окрашивание гематоксилином и эозином).

Титр гемагглютинирующей активности исследуемого адаптированного вируса в реакции гемагглютинации составил 1:1024.

### 3.2.2 Клинические симптомы и масса тела крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09

В исследовании использовали 30 крыс самцов, которые были разбиты на три группы: две группы опытные и одна контрольная (n=10). Крысам из каждой опытной группы после наркотизации интраназально инокулировали адаптированный вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 с заражающей дозой 6,6 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Схема опыта представлена на рисунке 10.

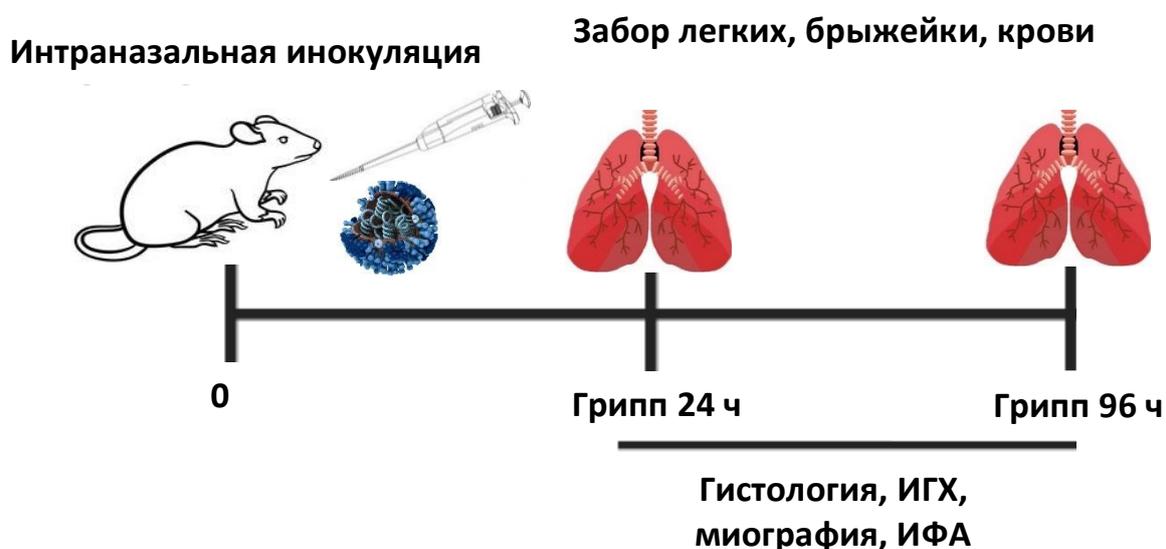


Рисунок 10 – Схема исследований к разделу 3.2

В ходе исследования у половозрелых крыс в контрольной и опытных группах клинических симптомов не наблюдали.

Изменение массы тела крыс в контрольной и экспериментальных группах представлено на рисунке 11.

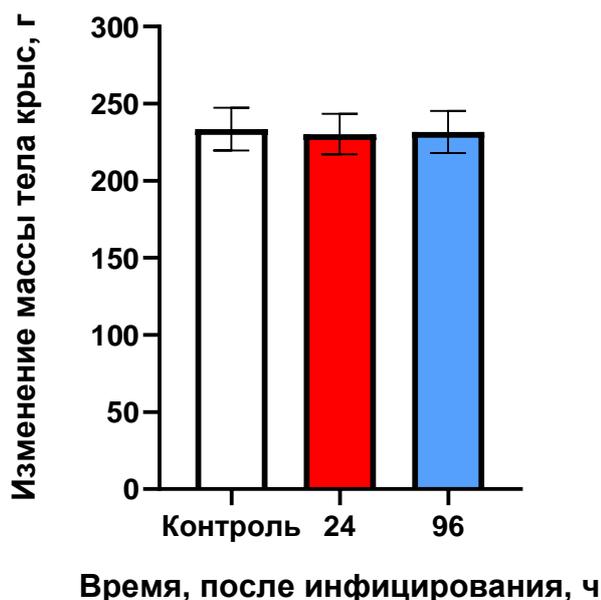


Рисунок 11 – Масса тела крыс через 24 и 96 ч после инфицирования вирусом гриппа А(Н1N1)рdm09 (Mean±SD, г).

Примечание:  $p > 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни,  $n=10$ .

Как видно из рисунка 11 изменений в массе тела крыс через 24 и 96 часов после инфицирования по сравнению с контролем не обнаружено.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что у крыс наблюдается субклиническая форма гриппозной инфекции.

### **3.2.3 Гистологическое исследование кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)рdm09**

Для выявления гистологических изменений в динамике (через 24 и 96 часов после инфицирования) были выбраны кровеносные сосуды легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа (Рисунок 12).

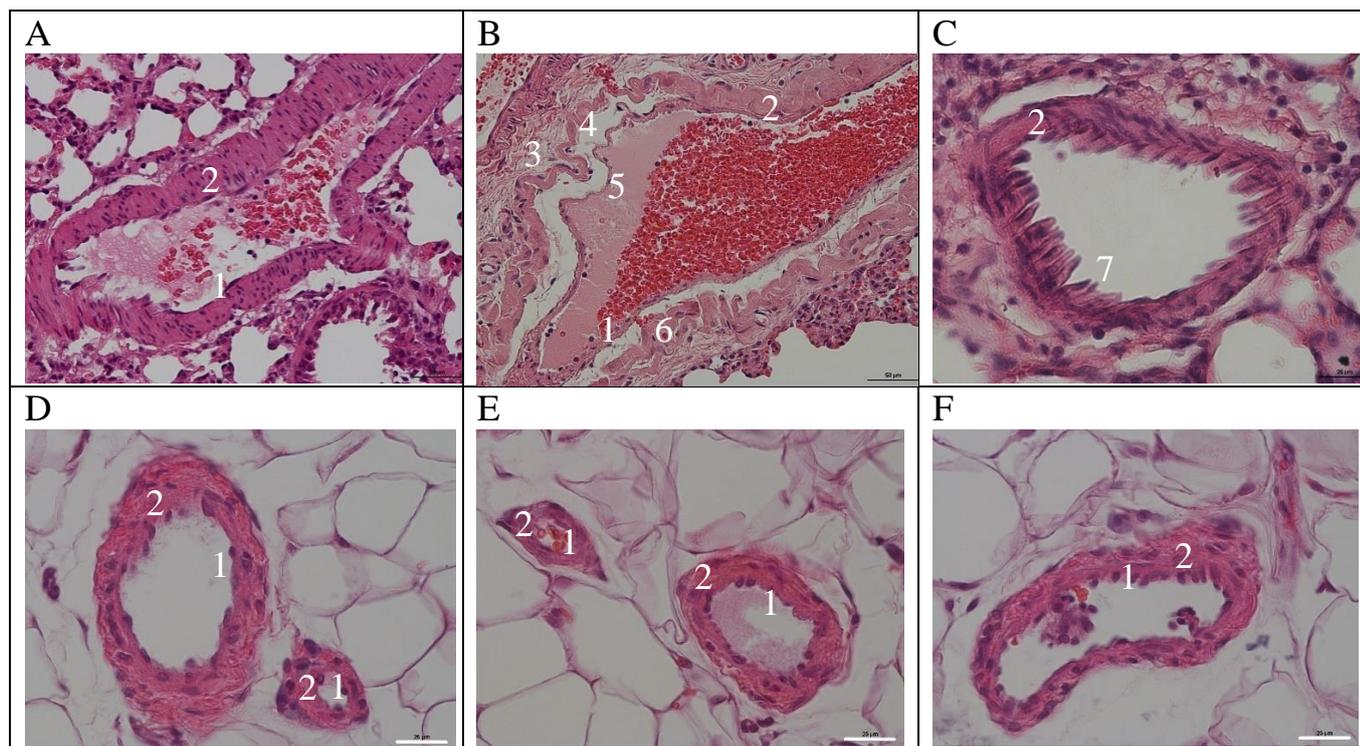


Рисунок 12 – Гистологическое исследование кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.

А – кровеносный сосуд легких крысы из контрольной группы; В – кровеносный сосуд легких крысы через 24 ч после инфицирования; С – кровеносный сосуд легких крысы через 96 ч после инфицирования; D – кровеносные сосуды брыжейки крысы из контрольной группы; E – кровеносные сосуды брыжейки крысы через 24 ч после инфицирования; F – кровеносные сосуды брыжейки крысы через 96 ч после инфицирования.

Обозначения: 1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда; 3 – разволокнение адвентиции; 4 – разволокнение меди; 5 – истончение эндотелиального слоя; 6 – экстравазация эритроцитов; 7 – эндотелий по типу «частокола» (увеличение  $\times 200$  для А, В; увеличение  $\times 400$  для С, D, E, F; окрашивание гематоксилином и эозином).

На протяжении всего исследуемого периода в большинстве кровеносных сосудов легких были обнаружены различные патологические изменения. Как видно из рисунка 12В, в артериоле среднего калибра через 24 ч после

инфицирования по сравнению с контролем (Рисунок 12А) наблюдали следующие патологические изменения: расслоение сосудистой стенки, истончение эндотелиального слоя с признаками нарушения целостности, отслоение меди от эндотелия и адвентициальной оболочки, местами расслоение меди на отдельные мышечные пучки, адвентиция в виде отдельных волокон соединительной ткани, небольшие фокусы экстравазации эритроцитов. В артериоле через 96 ч после инфицирования наблюдали выраженное изменение морфологии эндотелиоцитов по «типу частокола» (Рисунок 12С).

Со стороны мерцательного эпителия респираторного тракта были также обнаружены следующие гистопатологические изменения: слущивание мерцательного эпителия бронхиол и отек подслизистого слоя бронхиол.

Таким образом, в процессе репродукции исследуемого вируса гриппа были выявлены гистопатологические изменения как в кровеносных сосудах легких (спазм различной выраженности, разволокнение адвентиции и меди, истончение цитоплазмы эндотелия, десквамация эндотелиоцитов, изменение морфологии эндотелиоцитов по «типу частокола»), так и в легочной паренхиме крыс (геморрагический экссудат в просвете бронхов, спазм и отек бронхиол, слущивание мерцательного эпителия бронхиол, неравномерная воздушность и мелкие очаги с экссудатом в легочной ткани, инфильтрация мононуклеарных клеток, присутствие апоптозных телец), что соответствует гистопатологическим изменениям, которые были зарегистрированы в аутопсийном материале от взрослых пациентов, умерших в 2009 г. от вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 [14].

#### **3.2.4 Детекция NP антигена в кровеносных сосудах легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)рdm09**

Для подтверждения репродукции вируса в кровеносных сосудах легких и брыжейки крыс проводили детекцию NP антигена вируса гриппа А с помощью иммуногистохимического анализа (Рисунок 13).

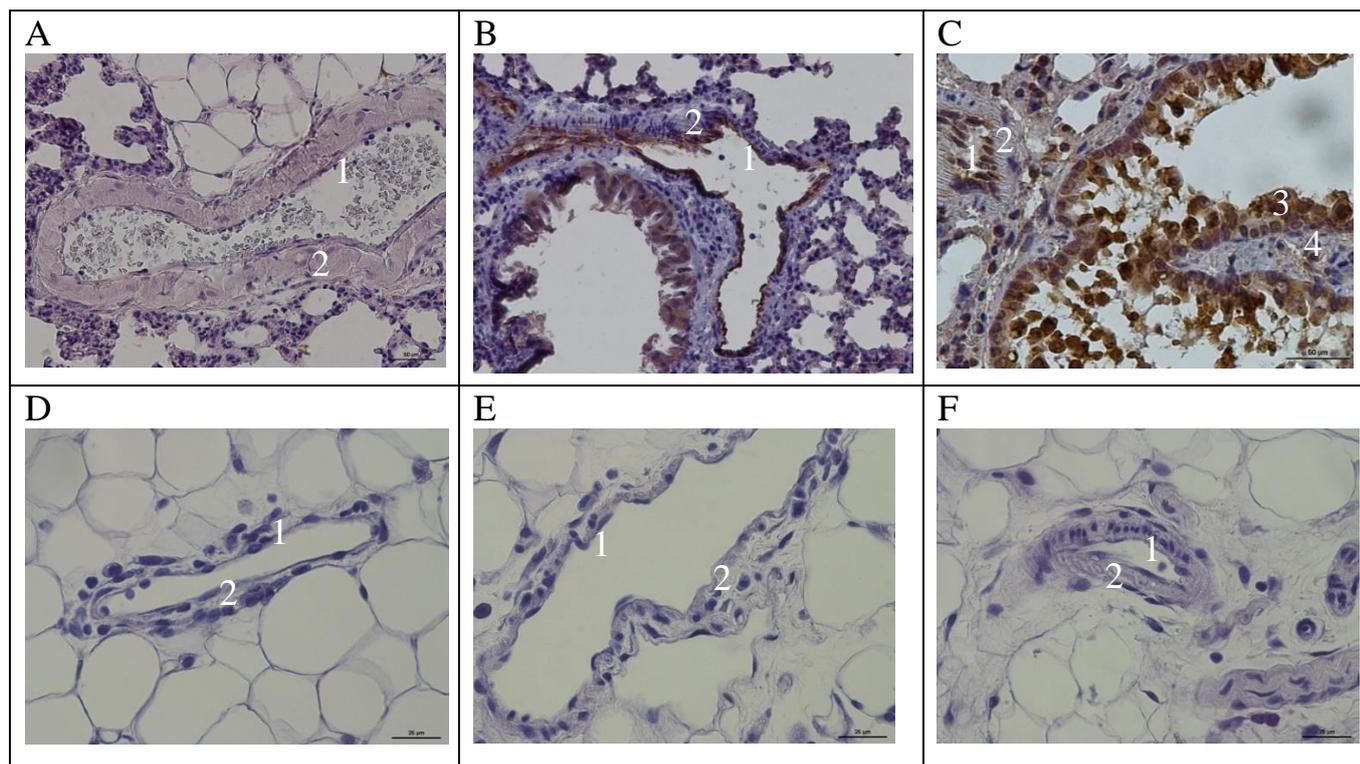


Рисунок 13 – Экспрессия NP антигена вируса гриппа А в кровеносных сосудах легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.

А – кровеносный сосуд легких крысы из контрольной группы; В – кровеносный сосуд и мерцательный эпителий бронхиолы крысы через 24 ч после инфицирования; С – кровеносный сосуд и мерцательный эпителий бронхиолы крысы через 96 ч после инфицирования; D – кровеносный сосуд брыжейки крысы из контрольной группы; E – кровеносный сосуд брыжейки крысы через 24 ч после инфицирования; F – кровеносный сосуд брыжейки крысы через 96 ч после инфицирования.

Обозначения: 1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда; 3 – мерцательный эпителий бронхиолы; 4 – подслизистый слой бронхиолы; (увеличение  $\times 200$  для А, В, С; увеличение  $\times 400$  для D, E, F; окрашивание DAB-хромогеном).

На рисунке 13В показана локализация NP антигена в эндотелии артериолы легких через 24 ч после инфицирования. Также NP антиген был обнаружен в мерцательном эпителии бронхиолы и в альвеолах. На рисунке 13С представлен NP антиген в эндотелии артериолы через 96 ч после инфицирования. Кроме того,

NP антиген удалось обнаружить в мерцательном эпителии бронхиол. Иммуногистохимическое исследование не выявило присутствие NP антигена вируса гриппа А в срезах сосудов и тканях легких крыс из контрольной группы (Рисунок 13А).

NP антиген вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах брыжейки крыс из контрольной и опытных групп выявлен не был (Рисунок 13D-F).

### 3.2.5 Оценка вазомоторной активности кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(H1N1)pdm09

Для определения вазомоторной активности кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс от каждого животного выделяли три сосуда: 1) две артерии 2-3-го порядка из верхней доли правого легкого; 2) одну артерию 2-го порядка из вентрального участка верхних сегментов левого легкого. Из брыжейки выделяли по три артерии 3-го порядка.

Вазомоторную активность кровеносных сосудов крыс оценивали через 24 и 96 ч после инфицирования вирусом гриппа А(H1N1)pdm09. Эти интервалы времени были обусловлены максимальной репродукцией вируса в тканях и сосудах легких через 24 ч и резким снижением инфекционной активности вируса через 96 ч (Таблица 5).

Таблица 5 – Инфекционная активность вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в тканях легких и брыжейке инфицированных крыс.

Время после инфицирования, ч	Инфекционная активность вируса гриппа (lg ЭИД <sub>50</sub> /мл)			
	Неинфицированные крысы (контроль)		Инфицированные крысы	
	В легких (n=10)	В легких (n=10)	В легких (n=10)	В брыжейке (n=10)
24	0,0	0,0	6,6±0,2*	0,0
96	0,0	0,0	2,2±0,3*	0,0

Примечание: \*p<0,05 по сравнению с контролем.

Для изучения эндотелий-зависимого расслабления артерий использовали вазодилататор ацетилхолин. Для изучения сократительной функции использовали два вазоконстриктора – серотонин и фенилэфрин. Это связано с тем, что артерии легких лучше отвечают на серотонин, а артерии брыжейки на фенилэфрин. В контрольной группе, состоящей из крыс, которым инокулировали  $\alpha$ -МЕМ в объеме 0,2 мл, вирус гриппа в тканях легких и брыжейки не обнаружен.

Вазомоторная активность артерий легких крыс, инфицированных вирусом гриппа, изменялась на протяжении всего периода исследования (Таблица 6).

Таблица 6 – Показатели вазомоторной активности артерий легких крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 (Mean $\pm$ SEM).

Агонист	Показатель	Контроль (здоровые крысы) (n=10)	Грипп 24 ч (n=10)	Грипп 96 ч (n=10)
Вазоконстриктор (серотонин; 5- НТ)	log EC <sub>50</sub> , M	-6,07 $\pm$ 0,12	-6,02 $\pm$ 0,21	-5,76 $\pm$ 0,54
	E <sub>max</sub> , %	35,53 $\pm$ 4,12	22,39 $\pm$ 5,11	21,84 $\pm$ 5,78
Вазодилататор (ацетилхолин; АХ)	log EC <sub>50</sub> , M	-5,64 $\pm$ 0,26	-6,45 $\pm$ 0,62	-5,81 $\pm$ 0,57
	E <sub>max</sub> , %	48,55 $\pm$ 11,51	42,42 $\pm$ 16,28	36,95 $\pm$ 20,32

Примечание:  $p > 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Даннета,  $n=10$ .

logEC<sub>50</sub> – концентрация агониста обеспечивающая 50% от максимального ответа;

E<sub>max</sub>, % – величина ответа при максимальной концентрации агониста.

Как видно из таблицы 6, ответ артерий легких при максимальной концентрации вазоконстриктора (серотонина) снижался через 24 ч на 13% и составлял 22,39% по сравнению с контролем и оставался на том же низком уровне – 21,84% через 96 ч после инфицирования. В свою очередь, ответ артерий легких при максимальных концентрациях вазодилататора (ацетилхолина) снижался через 24 ч на 6% и составлял 42,42% по сравнению с контролем и снижался на 11,6% (до 36,95%) через 96 ч после инфицирования.

Результаты кумулятивного дозозависимого ответа артерий легких крыс на вазоконстриктор и вазодилататор представлены на рисунке 14.

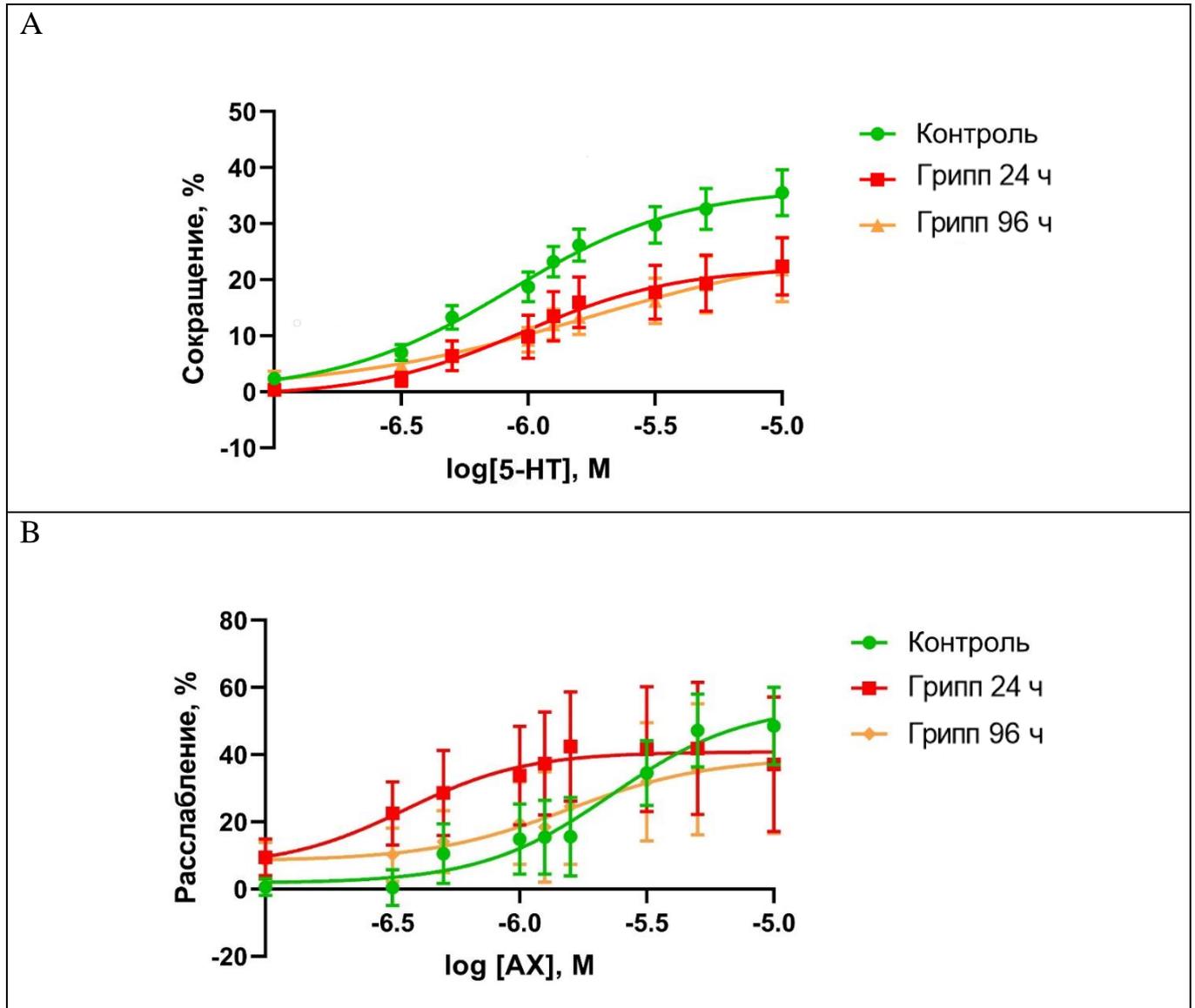


Рисунок 14 – Дозозависимые кривые «концентрация-ответ» артерий легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SEM, %).

А – серотонин-зависимое сокращение, В – ацетилхолин-зависимое расслабление.  
Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Даннета,  $n=10$ .

Как видно из рисунка 14, через 24 и 96 ч после инфицирования вирусом гриппа со стороны артерий легких крыс наблюдали тенденцию к снижению

ответа на 0,5-13% на различные концентрации вазоконстриктора (Рисунок 14А). В свою очередь, ответ артерий легких на вазодилататор при минимальных и средних концентрациях повышался на 6-17% через 24 ч после инфекции и практически достигал контрольных значений через 96 ч (Рисунок 14В).

Вазомоторная активность артерий брыжейки, в отличие от артерий легких, в значительной степени отличалась от контроля на протяжении всего периода исследования (Таблица 7).

Таблица 7 – Показатели вазомоторной активности артерий брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)рdm09 (Mean±SEM).

Агонист	Показатель	Контроль (n=10)	Грипп 24 ч (n=10)	Грипп 96 ч (n=10)
Вазоконстриктор (фенилэфрин; ФЭ)	log EC <sub>50</sub> , М	-6,00±0,04	-6,39±0,10	-6,26±0,13
	E <sub>max</sub> , %	84,66±1,68	114,43±8,33*	120,73±8,82***
Вазодилататор (ацетилхолин; АХ)	log EC <sub>50</sub> , М	-6,71±0,18	-6,32±0,19	-6,10±0,30
	E <sub>max</sub> , %	100,98±0,73	4,19±7,83****	26,98±9,15***

Примечание: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 по сравнению с контролем, критерий Даннета, n=10.

logEC<sub>50</sub> – концентрация агониста обеспечивающая 50% от максимального ответа;

E<sub>max</sub>, % – величина ответа при максимальной концентрации агониста.

Так, ответ артерий брыжейки при максимальных концентрациях вазоконстриктора через 24 ч после инфицирования повышался на 29,7% и составлял 114,43% (p<0,05) по сравнению с контролем. Через 96 ч после инфицирования ответ артерий брыжейки на максимальные концентрации вазоконстриктора повышался на 36% и достигал значений 120,72% (p<0,01). Ответ артерий брыжейки при максимальных концентрациях вазодилататора резко снижался через 24 ч после инфицирования более чем в 20 раз до 4,19% (p<0,0001)

по сравнению с контролем и был снижен почти в 4 раза и составлял 26,95% ( $p < 0,0001$ ) через 96 ч.

Результаты кумулятивного дозозависимого ответа артерий брыжейки крыс на вазоконстриктор и вазодилататор представлены на рисунке 15.

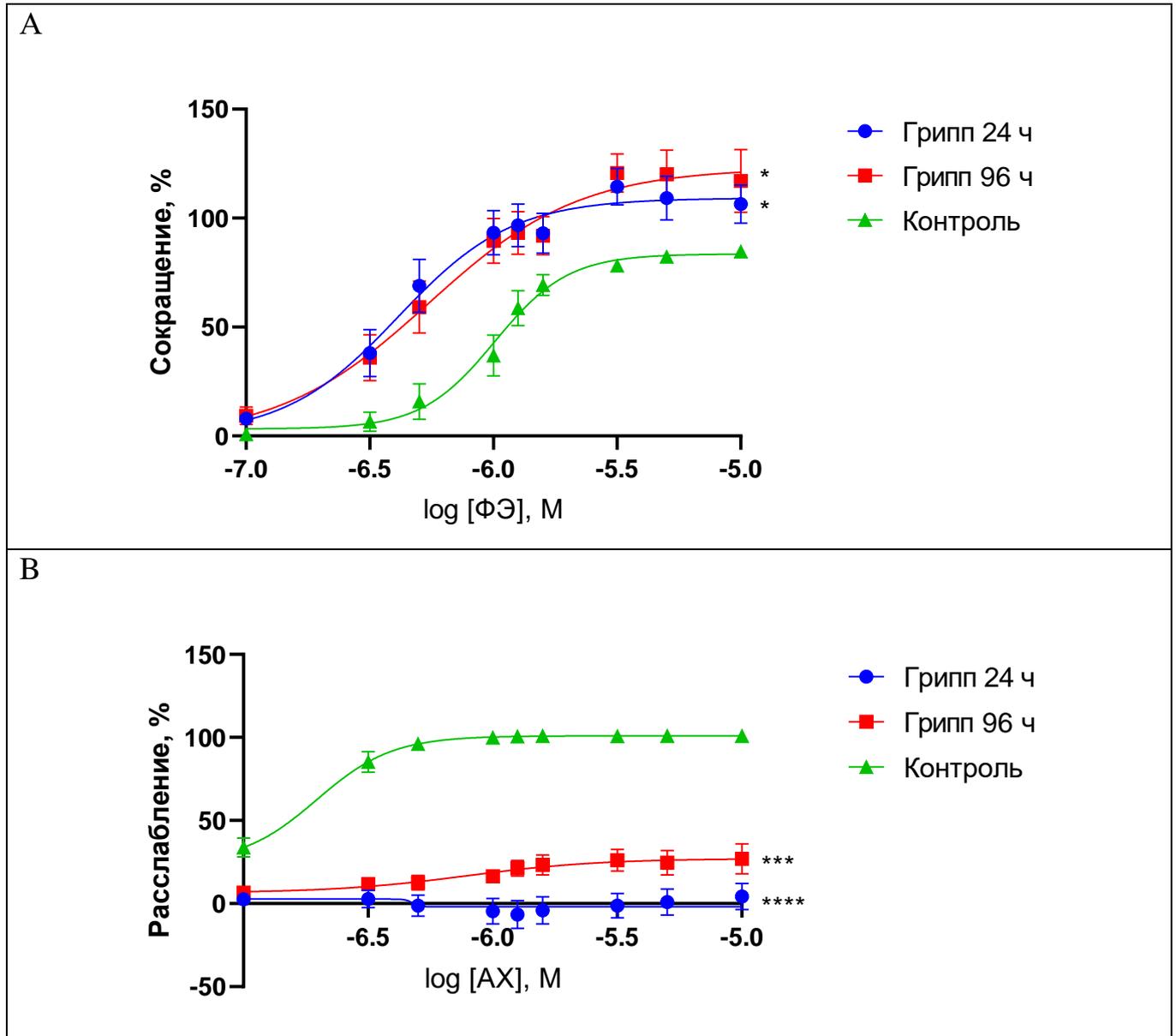


Рисунок 15 – Дозозависимые кривые «концентрация-ответ» артерий брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(H1N1)pdm09.

А – фенилэфрин-зависимое сокращение, В – ацетилхолин-зависимое расслабление.

Примечание: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  по сравнению с контролем, критерий Даннета,  $n=10$ .

Как видно из рисунка 15, кумулятивный дозозависимый ответ артерий брыжейки, в целом, совпадал с ответом артерий на максимальные концентрации вазоконстриктора и вазодилататора. Так, через 24 и 96 ч после инфицирования дозозависимый ответ артерий брыжейки на различные концентрации вазоконстриктора повышался на 6-53% по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), а дозозависимый ответ артерий брыжейки на различные концентрации вазодилататора снижался на 30-95% ( $p < 0,01$ ) через 24 ч и снижался на 27-75% ( $p < 0,001$ ) по через 96 ч после инфицирования.

Таким образом, ответ артерий легких и брыжейки крыс, инфицированных адаптированным вирусом A(H1N1)pdm09, на вазоконстрикцию и вазодилатацию резко отличался, что является отражением физиологических особенностей данных кровеносных сосудов. Так, известно, что внутрилегочные артерии входят в легочной круг кровообращения, обеспечивая процессы газообмена в легочных альвеолах. В отличие от всех остальных артерий легочные артерии несут венозную кровь, чей газовый состав заметно отличается от артериальной крови [288]. Это отличие, вероятно, и обуславливает разницу в вазомоторной активности кровеносных сосудов легких и брыжейки.

### **3.2.6 Исследование экспрессии eNOS, tPA и PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09**

Для того чтобы подтвердить наличие изменений в экспрессии эндотелиальных факторов в культуре клеток эндотелия EA.hy926, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, дополнительно проводили иммуногистохимическое исследование *in vivo*. Для этого использовали срезы кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных адаптированным вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в динамике – через 24 и 96 ч.

### 3.2.6.1 Исследование экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудах легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09

На рисунке 16 представлена экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс из контрольной группы (Рисунок 16А) и через 24 ч и 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом (Рисунок 16В и 16С, соответственно).

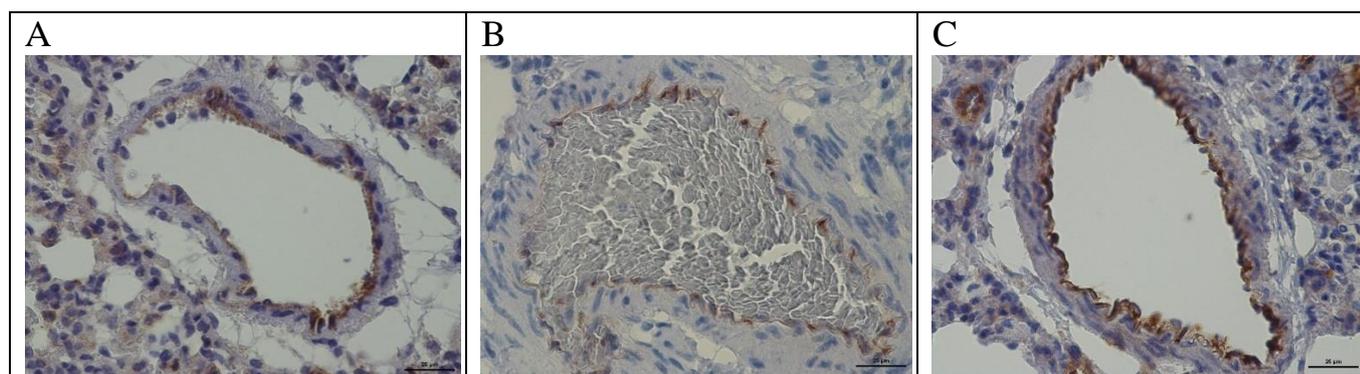


Рисунок 16 – Экспрессия eNOS в клетках эндотелия кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, с использованием моноклональных антител к eNOS.

А – контрольная группа; В – срез кровеносного сосуда крысы через 24 ч после инфицирования исследуемым вирусом; С – срез кровеносного сосуда крысы через 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом (ув.  $\times 400$ ; окрашивание клеток ДАВ-хромогеном).

Как видно из рисунка 16В-С, экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных адаптированным вирусом гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09, варьировала на протяжении всего исследуемого периода по сравнению с контролем (Рисунок 16А).

Для количественного определения уровня экспрессии eNOS в клетках эндотелия кровеносных сосудов легких крыс определяли три основных параметра (Таблица 8).

Таблица 8 – Уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, у.е.).

Параметры сигнала	Контрольная группа (n=10)	Опытная группа	
		Время после инфицирования (ч)	
		24 ч (n=10)	96 ч (n=10)
Площадь заполнения	10984,0±2729,3	6649,8±1458,8*	24988,7±8129,9*
Суммарная плотность	7179,1±1766,0	4104,3±944,0*	16998,6±5260,5*
Суммарная интенсивность	14452,7±3371,6	7643,7±1802,3*	30092,7±10042,9*

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Краскела-Уоллиса.

В качестве основного параметра сигнала использовали параметр суммарной интенсивности (Рисунок 17).

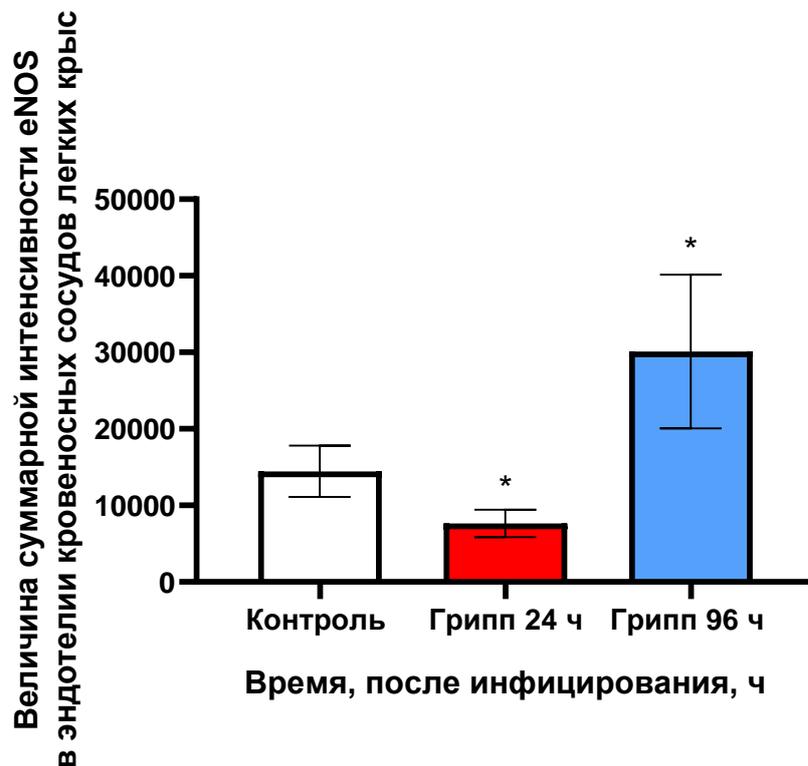


Рисунок 17 – Динамика изменения уровня экспрессии eNOS по величине суммарной интенсивности в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, у.е.).

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Краскела-Уоллиса,  $n=30$ .

Так, уровень суммарной интенсивности eNOS в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, снижался в 1,89 раза ( $p < 0,05$ ) через 24 ч после инфицирования по сравнению с контролем. Через 96 ч после инфицирования наблюдали повышение уровня суммарной интенсивности eNOS в 2 раза ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс через 24 часа снижалась почти в 2 раза, что частично подтверждает ранее полученные данные по изучению экспрессии eNOS в инфицированных клетках эндотелия *in vitro*. Повышение экспрессии eNOS через 96 ч после инфицирования в 2 раза, возможно, указывает на активацию компенсаторных механизмов организма, призванных уменьшить функциональные сдвиги со стороны кровеносных сосудов при гриппозной инфекции. Стоит отметить, что увеличение экспрессии eNOS также можно рассматривать как патологическую реакцию. Повышение активности эндотелиальной синтазы оксида азота приводит к избытку NO, который находится в избытке и взаимодействует с супероксиданионом, в результате чего образуется пероксинитрит – свободный радикал с длительным периодом полураспада, вызывающий окислительный стресс и усиливающий дисфункцию эндотелия [20].

### **3.2.6.2 Исследование экспрессии PAI-1 в кровеносных сосудах легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09**

На рисунке 18 представлена экспрессия PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс стока Wistar из контрольной группы (Рисунок 18А) и через 24 ч и 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом (Рисунок 18В и 18С, соответственно).

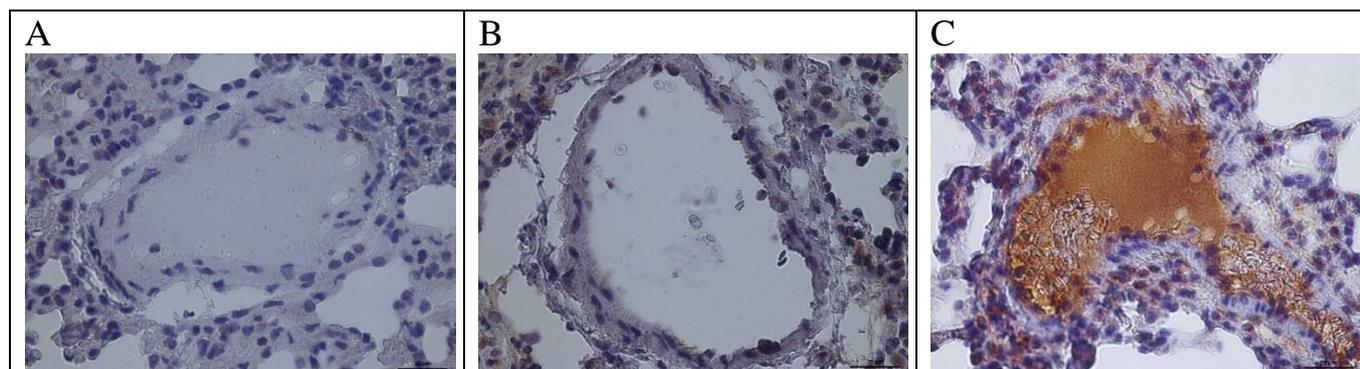


Рисунок 18 – Экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, с использованием поликлональных антител к PAI-1.

А – контрольная группа; В – срез кровеносных сосудов крыс через 24 ч после инфицирования; С – срез кровеносных сосудов крыс через 96 ч после инфицирования (ув.  $\times 400$ ; окрашивание клеток ДАВ-хромогеном).

Как видно из рисунка 18В и 18С, экспрессия PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, визуально слабо отличалась от контроля (Рисунок 18А). Однако, проведенное морфометрическое исследование с использованием программного обеспечения Nis-Elements BR 4,40 (Nikon, Япония) позволило выявить изменения в экспрессии PAI-1 в эндотелии сосудов крыс при инфицировании исследуемым вирусом.

Для количественного определения уровня экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия кровеносных сосудов легких крыс стока Wistar, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, определяли три основных параметра (Таблица 9).

Таблица 9 – Уровень экспрессии PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, у.е.).

Параметры сигнала	Контрольная группа (n=10)	Опытная группа	
		Время после инфицирования (ч)	
		24 ч (n=10)	96 ч (n=10)
Площадь заполнения	523,9±357,8	3078,6±1248,4*	3804,8±1303,2*
Суммарная плотность	335,8±231,5	1948,4±807,8*	2408,1±885,7*
Суммарная интенсивность	639,0±442,1	3346,4±1542,2*	4181,1±1690,9*

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллиса.

В качестве основного параметра сигнала использовали параметр суммарной интенсивности (Рисунок 19).

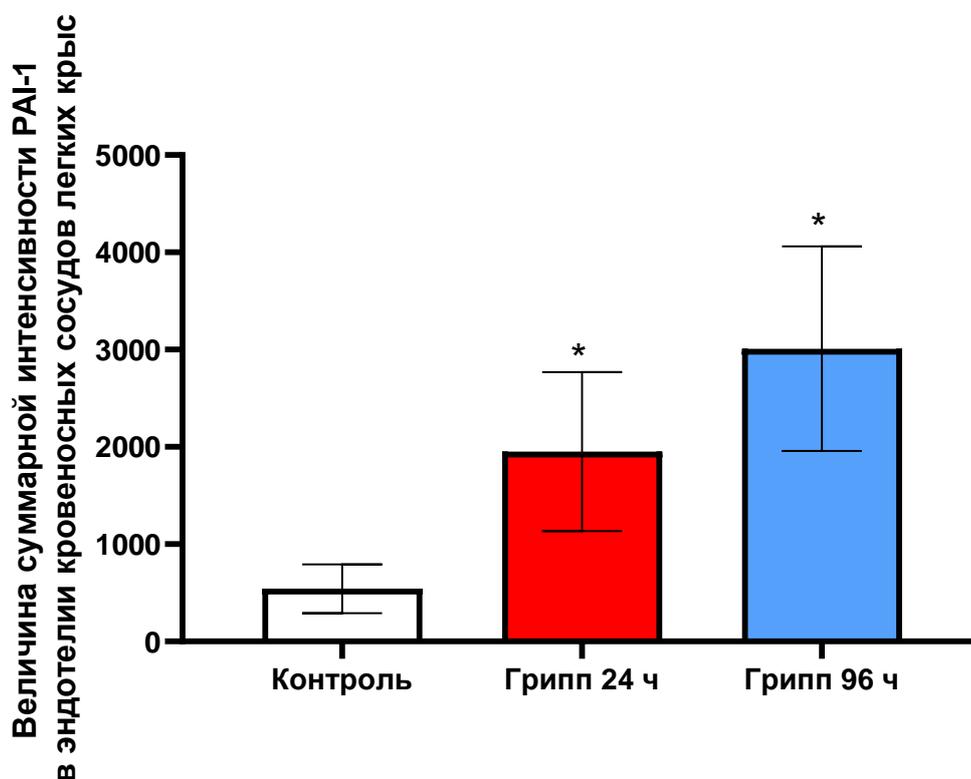


Рисунок 19 – Динамика изменения уровня экспрессии PAI-1 по величине суммарной интенсивности в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, у.е.).

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллиса,  $n=30$ .

Так, уровень суммарной интенсивности PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных адаптированными вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, повышался в 5,23 раза и составил  $3346,4 \pm 1542,2$  по сравнению с контролем –  $639,0 \pm 442,1$  ( $p < 0,05$ ). Через 96 ч после инфицирования уровень суммарной интенсивности PAI-1 повышался в 6,54 раза и составлял  $4181,1 \pm 1690,9$  по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, экспрессия PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных исследуемым вирусом, повышалась на протяжении всего периода исследования, что может служить причиной тромбообразования, вплоть до развития ДВС-синдрома.

### 3.2.6.3 Исследование экспрессии tPA в кровеносных сосудах легких крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09

На рисунке 20 представлена экспрессия tPA в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс из контрольной группы (Рисунок 20А) и через 24 ч и 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом (Рисунок 20В и 20С, соответственно).

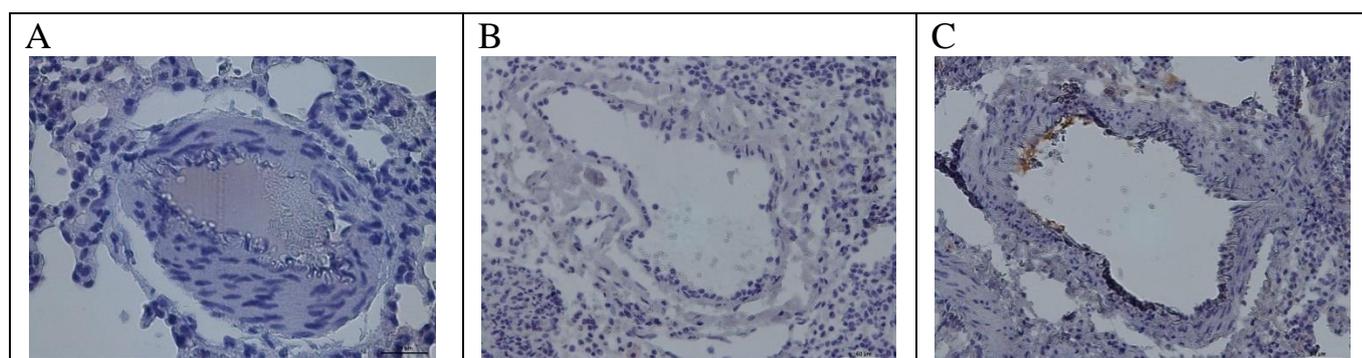


Рисунок 20 – Экспрессия tPA в клетках эндотелия кровеносных сосудов легких крыс инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, с использованием моноклональных антител к tPA.

А – контрольная группа; В – срез кровеносных сосудов крыс через 24 ч после инфицирования исследуемым вирусом; С – срез кровеносных сосудов крыс через 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом (ув.  $\times 400$  для А, С; ув.  $\times 200$  для В; окрашивание клеток ДАВ-хромогеном).

Как видно из рисунка 20В и 20С, экспрессия tРА в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс стока Wistar, инфицированных исследуемым вирусом гриппа, через 24 и 96 ч визуально не отличалась от контроля (Рисунок 20А). Морфометрическое исследование с использованием программного обеспечения Nis-Elements BR 4,40 (Nikon, Япония) позволило выявить изменения в экспрессии tРА в эндотелии сосудов легких крыс при инфицировании исследуемым вирусом через 96 ч (Таблица 10).

Таблица 10 – Уровень экспрессии tРА в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 (Mean±SD, у.е.).

Параметры сигнала	Контрольная группа (n=10)	Опытная группа	
		Время после инфицирования (ч)	
		24 ч (n=10)	96 ч (n=10)
Площадь заполнения	374,9±89,1	401,8±162,5	740,9±230,1*
Суммарная плотность	231,4±57,6	298,9±105,1	592,7±148,9*
Суммарная интенсивность	439,1±110,1	490,7±200,8	967,2±284,3*

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллиса.

В качестве основного параметра сигнала использовали параметр суммарной интенсивности (Рисунок 21).

Так, уровень суммарной интенсивности tРА в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09, составил  $490,7 \pm 200,8$  и практически равнялся контролю  $439,1 \pm 110,1$  ( $p > 0,05$ ). Через 96 ч после инфицирования уровень суммарной интенсивности tРА повышался в 2,2 раза и составлял  $967,2 \pm 284,3$  ( $p < 0,05$ ).

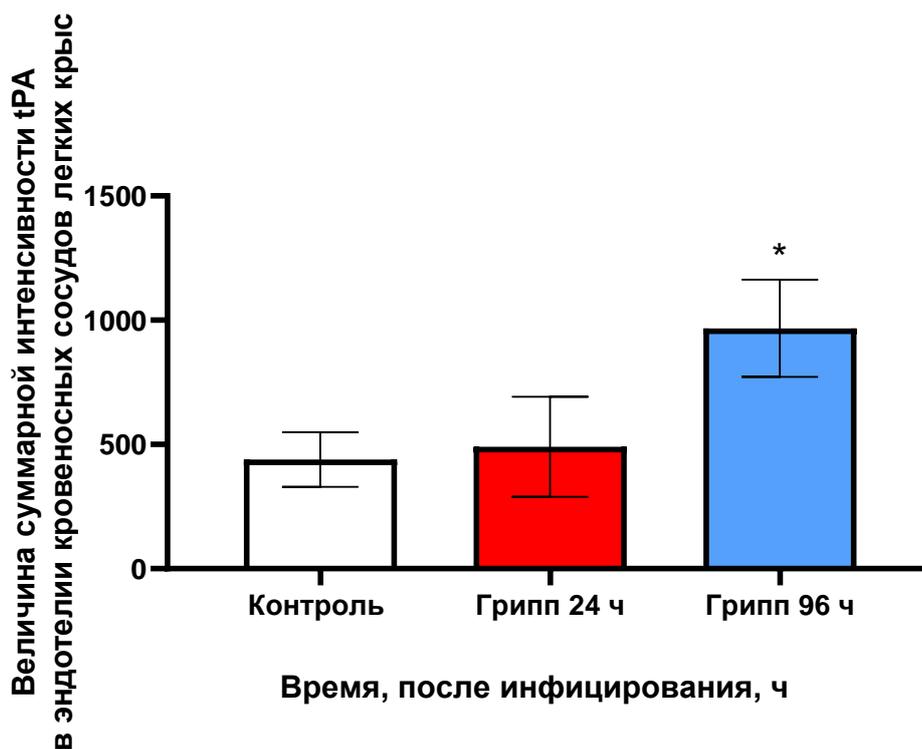


Рисунок 21 – Динамика изменения уровня экспрессии tPA по величине суммарной интенсивности в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, у.е.).

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Краскела-Уоллиса,  $n=30$ .

Как показали результаты исследований (раздел 3.2.5.2 и 3.2.5.3), динамика изменения экспрессии PAI-1 и tPA в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс по сравнению с динамикой изменения экспрессии этих факторов в культуре клеток эндотелия EA.hy926 существенно отличалась. Это можно объяснить тем, что PAI-1 и tPA не депонируются в клетках эндотелия, а сразу секретируются в просвет сосуда непосредственно после их активации. Это явилось обоснованием для проведения исследований по определению концентрации PAI-1 и tPA в плазме крови крыс, инфицированных исследуемым вирусом гриппа.

### 3.2.7 Определение концентрации PAI-1 и tPA в плазме крови крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09

Помимо тканей легких у крыс из контрольной и экспериментальных групп также проводили взятие венозной крови с целью получения плазмы. Плазму аликвотировали и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Динамика изменения концентрации PAI-1 в плазме крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 представлена на рисунке 22.

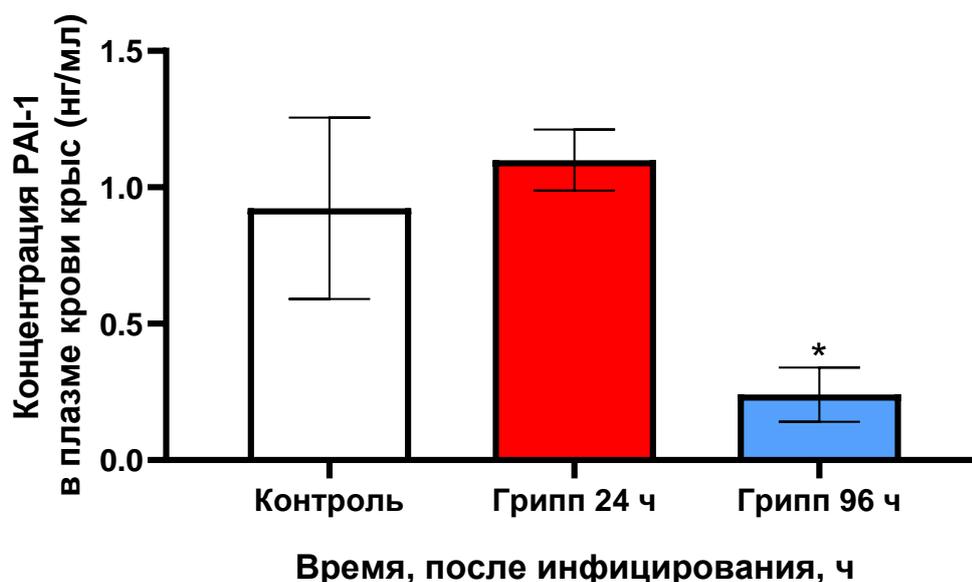


Рисунок 22 – Концентрация PAI-1 в плазме крови крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, нг/мл).

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни,  $n=5$ .

Как видно из рисунка 22, концентрация PAI-1 в плазме крови крыс, инфицированных исследуемым вирусом гриппа, в ходе исследования изменялась по сравнению с контролем. Так, через 24 ч после заражения концентрация PAI-1 несколько повышалась и составляла  $1,104 \pm 0,11$  нг/мл по сравнению с контролем –  $0,923 \pm 0,33$  нг/мл. Через 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом концентрация PAI-1 в плазме крови крыс снижалась в 3,84 раза до  $0,24 \pm 0,09$  нг/мл ( $p < 0,05$ ).

Динамика изменения концентрации tPA в плазме крыс стока Wistar, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, представлена на рисунке 23.

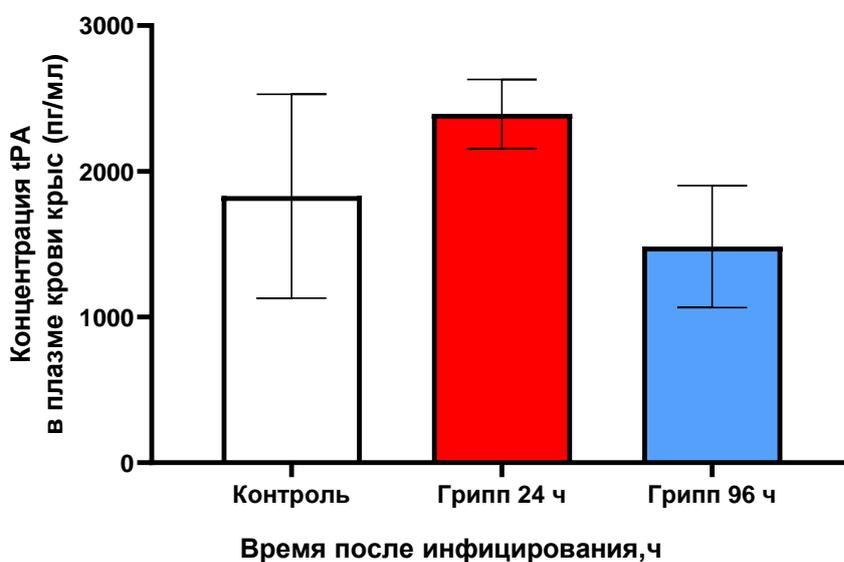


Рисунок 23 – Концентрация tPA в плазме крови крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, пг/мл).

Примечание:  $p > 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни,  $n=5$ .

Как видно из рисунка 23, концентрация tPA в плазме крови крыс, инфицированных вирусом гриппа, также несколько изменялась по сравнению с контролем, однако в меньшей степени, чем концентрация PAI-1. Так, через 24 ч после заражения концентрация tPA несколько повышалась и составляла  $2393,4 \pm 236,41$  пг/мл по сравнению с контролем –  $1829,5 \pm 699,8$  пг/мл. Через 96 ч после заражения концентрация tPA незначительно снижалась до  $1483,2 \pm 418,54$  пг/мл.

Полученные данные указывают на то, что вирус гриппа вызывает изменение экспрессии таких эндотелиальных факторов как PAI-1 и tPA в плазме крови крыс. Статистически достоверные различия были обнаружены лишь между концентрацией PAI-1 в контроле и через 96 ч после инфицирования ( $p < 0,05$ ). Одновременное уменьшение концентрации PAI-1 и тенденция к повышению

концентрации tPA может являться причиной геморрагического синдрома, наблюдаемого при тяжелой гриппозной инфекции.

### **3.3 Функциональная активность кровеносных сосудов крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09**

Для изучения воздействия вируса гриппа на кровеносные сосуды при сопутствующей сердечно-сосудистой патологии была использована модель острой доксорубициновой кардиомиопатии на крысах стока Wistar.

В исследовании использовали 20 крыс самцов в возрасте от 2 до 4 месяцев, массой тела от 200 до 250 граммов, которые были разбиты на четыре группы: две группы опытные и две контрольные (n=5). После подтверждения развития кардиомиопатии крыс из опытных групп инфицировали вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 в объеме 0,2 мл. Через 24 и 96 ч после инфицирования крыс повторно наркотизировали с последующей эвтаназией для выделения органокомплекса сердце-легкие и брыжейки. Кроме того, у крыс также проводили забор крови из верхней полой вены.

Крысам в контрольных группах, под анестезией интраназально вводили по 0,2 мл культуральной среды  $\alpha$ -MEM, после чего через 24 и 96 ч проводили наркотизацию и некропсию.

#### **3.3.1 Детекция острой кардиомиопатии**

Для подтверждения развития острой кардиомиопатии проводили эхокардиографию и гистологическое исследование миокарда крыс.

В качестве основных параметров ЭхоКГ использовали: 1) конечный систолический размер стенки левого желудочка; 2) конечный диастолический размер стенки левого желудочка; 3) фракцию укорочения; 4) толщину задней стенки левого желудочка в диастолу; 5) толщину передней стенки левого желудочка в диастолу.

Так, после окончания введения доксорубицина у животных отмечалось увеличение конечно-систолического и диастолического размеров левого

желудочка по сравнению с исходным значением (Рисунок 24). В связи с этим, у животных наблюдалось снижение фракции укорочения (ФУ) на 23% от исходного значения, что является одним из показателей развития субклинической кардиотоксичности.

Была выявлена значимая разница по размеру задней стенки левого желудочка в диастолу, тогда как размер передней стенки левого желудочка не отличался от исходных значений. Действие доксорубина приводит к расширению камер сердца и нарушению сократительной функции миокарда, благодаря повреждению и, соответственно, сокращению полноценно функционирующих кардиомиоцитов.

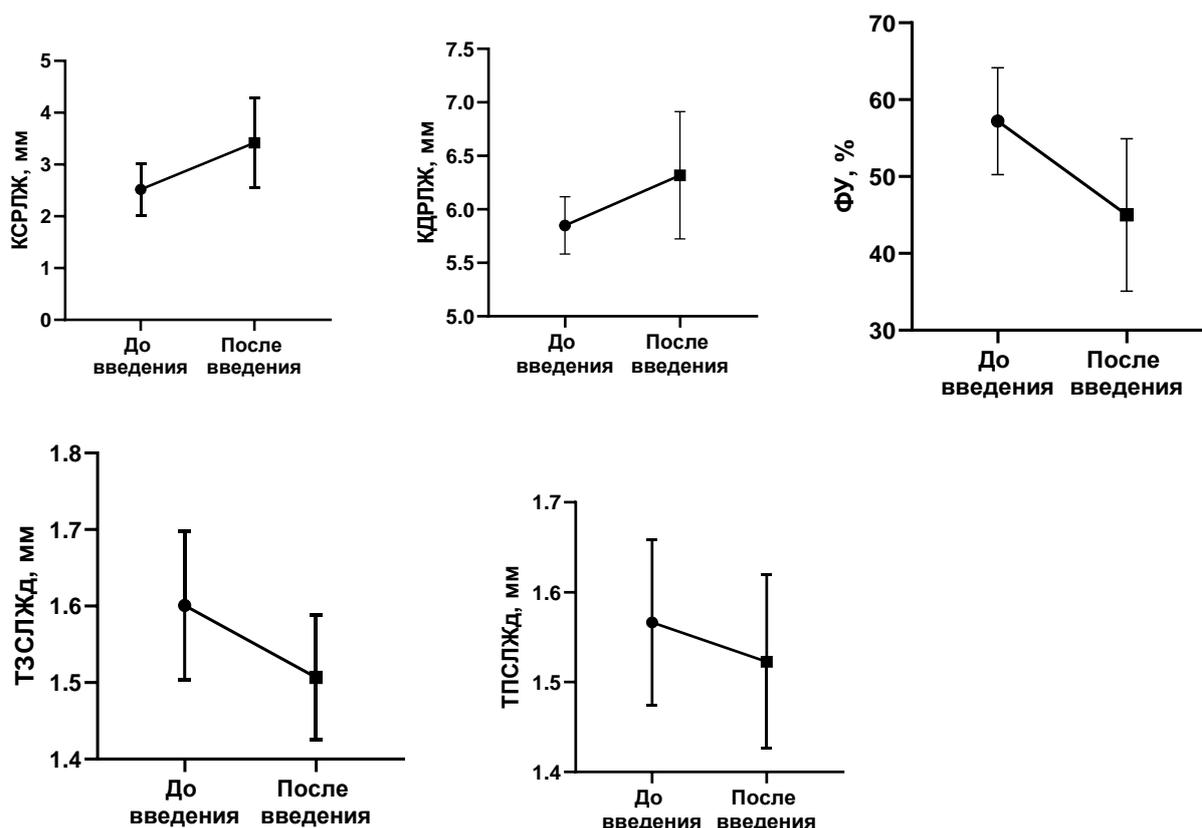


Рисунок 24 – Параметры эхокардиографии у крыс после интраперитонеального введения доксорубина (Mean±SD). Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с исходным значением, критерий Краскела-Уоллиса,  $n=20$ .

Обозначения:

- 1) КСРЛЖ – конечный систолический размер стенки левого желудочка, мм;
- 2) КДРЛЖ – конечный диастолический размер стенки левого желудочка, мм;
- 3) ФУ – фракция укорочения (%);
- 4) ТЗСЛЖд – толщина задней стенки левого желудочка в диастолу, мм;
- 5) ТПСЛЖд – толщина передней стенки левого желудочка в диастолу, мм.

Для подтверждения острой кардиомиопатии использовали гистологическое исследование аутопсийного материала миокарда крыс, где наблюдали следующие гистопатологические изменения по сравнению с контролем: анизонуклеоз (ядра клеток разного размера), некроз отдельных кардиомиоцитов, кариолизис (Рисунок 25В).

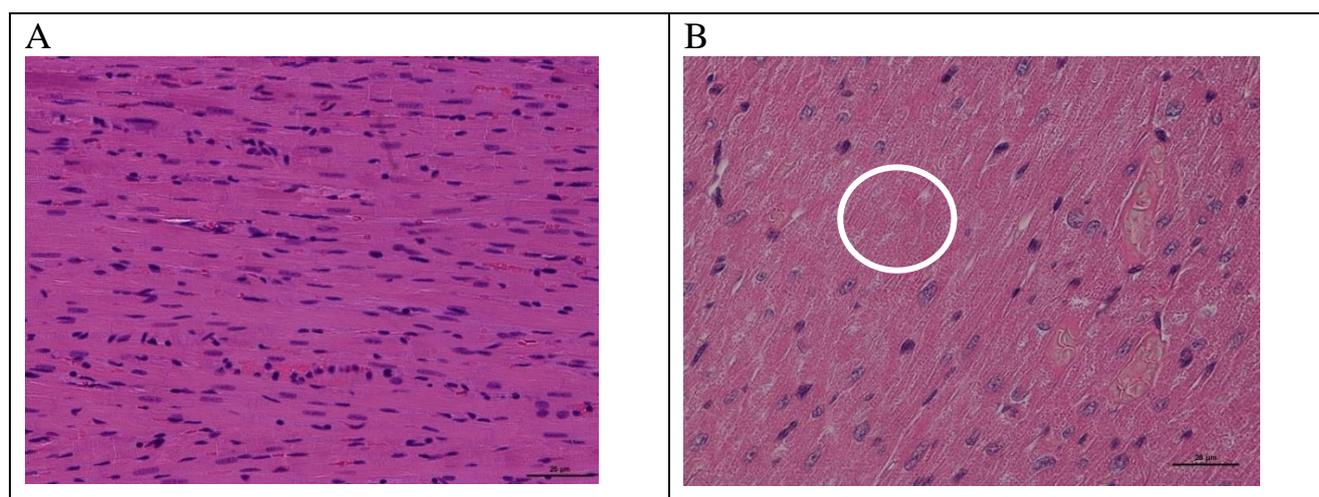


Рисунок 25 – Гистологическое исследование миокарда крыс после интраперитонеального введения доксорубицина. А – миокард здоровой крысы, В – миокард крысы с острой кардиомиопатией (ув.  $\times 200$  для А, В).

Обозначения: Зона кариолиза выделена белым кругом.

### 3.3.2 Масса тела и клинические симптомы у крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09

Введение крысам доксорубицина внутрибрюшинно в течение 2 недель (кумулятивная доза 17 мг/кг) приводило к значительной потере массы тела

животных. Так, в среднем, крысы теряли 6-9 грамм в сутки. При инфицировании гриппом крысы теряли в сутки, в среднем, 8-10 грамм.

У животных с кардиомиопатией на 2-4 сутки после инфицирования исследуемым вирусом гриппа наблюдалась адинамия, отказ от пищи и воды, снижение или отсутствие реакции на внешние стимулы. Тяжесть состояния со временем прогрессировала. Со стороны респираторного тракта выявляли хрипы.

В ходе исследования также регистрировали летальность. Так, около 40% крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных исследуемым вирусом гриппа, погибли на 3 день после заражения, тогда как ранее проведенные исследования позволили установить, что крысы с острой кардиомиопатией, индуцированной данной кумулятивной дозой доксорубина, жизнеспособны в течение 10-16 дней.

Таким образом, гриппозная инфекция, вызванная вирусом гриппа А(Н1N1)рdm09 отягощает течение острой кардиомиопатии, а также может стать причиной летального исхода.

### **3.3.3 Определение инфекционной активности вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 в легких и брыжейке крыс с острой кардиомиопатией**

Результаты оценки инфекционной активности исследуемого вируса гриппа в тканях легких и брыжейке крыс с острой кардиомиопатией через 24 и 96 ч после инфицирования представлены в таблице 11. Как видно из таблицы, через 24 ч в тканях легких крыс инфекционная активность вируса составляла  $7,2 \pm 0,3$  lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Через 96 ч инфекционная активность вируса значительно снижалась и составляла  $2,6 \pm 0,5$  lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. В брыжейке инфицированных крыс на протяжении всего периода исследования, инфекционная активность вируса не регистрировалась. Во всех группах в тканях брыжейки крыс вирус гриппа не был обнаружен.

Таблица 11 – Инфекционная активность вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 в тканях легких инфицированных крыс с острой кардиомиопатией.

Время после заражения, ч	Инфекционная активность вируса гриппа (lg ЭИД <sub>50</sub> /мл)			
	Контроль №1 (неинфицированные здоровые крысы, n=5)	Контроль №2 (неинфицированные крысы с острой кардиомиопатией, n=5)	Инфицированные крысы без кардиомиопатии (n=5)	Инфицированные крысы с острой кардиомиопатией (n=5)
24	0,0	0,0	6,6±0,2*#	7,2±0,3*#
96	0,0	0,0	2,2±0,3*#	2,6±0,5*#

Примечание: \*,# p<0,05 по сравнению с контролями №№ 1 и 2, соответственно.

При сравнении инфекционной активности вируса гриппа в тканях легких крыс без сердечно-сосудистой патологии и крыс с острой кардиомиопатией, оказалось, что инфекционная активность вируса гриппа была несколько выше у крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч и 96 ч после инфицирования, что указывает на усиление патологического воздействия вируса гриппа на фоне сердечно-сосудистой патологии. Отсутствие вируса гриппа в тканях брыжейки указывает на то, что экспериментальная гриппозная инфекция, вызванная вирусом гриппа А(Н1N1)рdm09 у крыс с острой кардиомиопатией, не приводит к вирусемии и не носит системный характер.

### **3.3.4 Оценка вазомоторной активности кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)рdm09**

Вазомоторную активность кровеносных сосудов крыс с острой кардиомиопатией также оценивали через 24 и 96 ч после их инфицирования вирусом гриппа А(Н1N1)рdm09. Исследование проводили только на артериях брыжейки крыс, т.к. острая кардиомиопатия, вызванная доксорубицином, вызывала незначительные повреждения стенок кровеносных сосудов легких. В

качестве контроля использовали: 1) группу здоровых животных, 2) группу животных с острой кардиомиопатией, не инфицированных вирусом гриппа. В каждой группе использовали по 5 животных.

Показатели вазомоторной активности артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа, представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Показатели вазомоторной активности артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SEM).

Агонист	Показатель	Контроль (здоровые крысы) (n=5)	Кардиомиопатия 24 ч (n=5)	Кардиомиопатия + грипп 24 ч (n=5)	Кардиомиопатия 96 ч (n=5)	Кардиомиопатия + грипп 96 ч (n=5)
Вазоконстриктор (фенилэфрин, ФЭ)	log EC <sub>50</sub> , М	-6,00±0,04	-5,29±0,05****	-2,86±0,56**	-5,82±0,18	-5,39±0,18*
	E <sub>max</sub> , %	84,66±1,68	89,54±8,00	10,38±2,21****	94,02±5,87	48,20±10,59*
Вазодилататор (ацетилхолин, АХ)	log EC <sub>50</sub> , М	-6,71±0,18	-6,35±0,07	-6,50±0,86	-5,62±0,10***	-5,46±0,10***
	E <sub>max</sub> , %	100,98±0,73	86,02±6,18	-50,52±32,59*	86,50±10,79	78,03±5,41*

Примечание: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 по сравнению с контрольной группой.

logEC<sub>50</sub> – концентрация агониста обеспечивающая 50% от максимального ответа; E<sub>max</sub>, % – величина ответа при максимальной концентрации агониста.

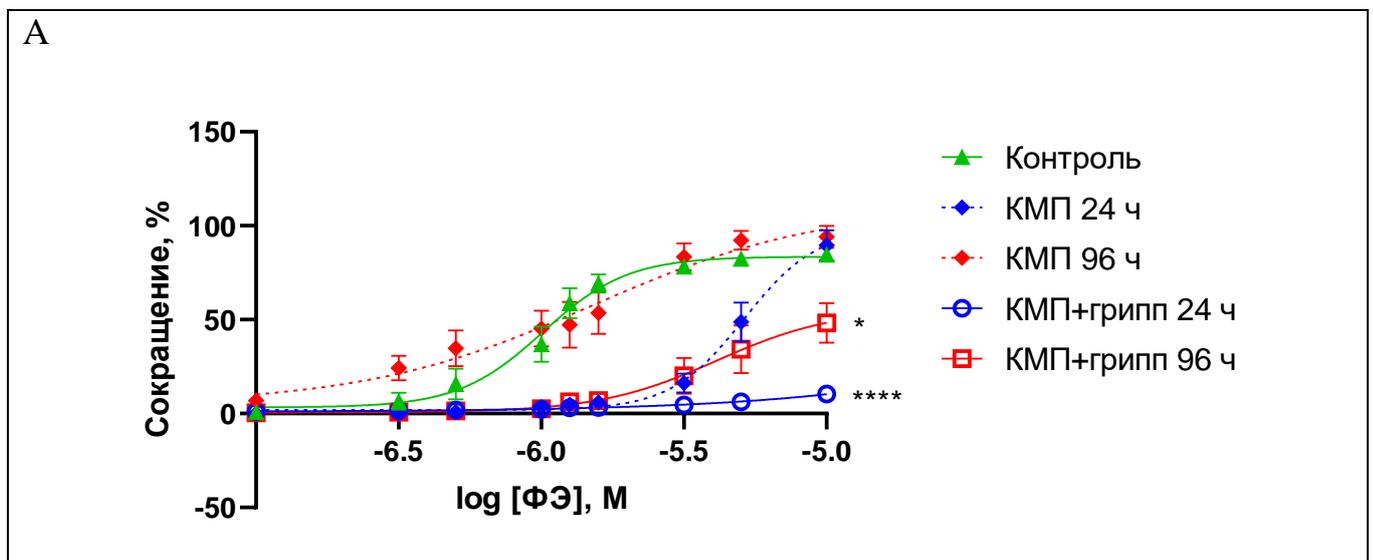
Как видно из таблицы 12, показатели вазомоторной активности артерий брыжейки у крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа, значительно отличались от вазомоторной активности у неинфицированных животных с острой кардиомиопатией, а также у здоровых особей.

Так, ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования на максимальные концентрации вазоконстриктора снижался на 79,16% по сравнению с неинфицированными крысами с острой

кардиомиопатией ( $p < 0,0001$ ) и на 74,28% по сравнению со здоровыми крысами ( $p < 0,0001$ ). Через 96 ч после инфицирования ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией на максимальные концентрации вазоконстриктора снижался на 45,82% по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией ( $p < 0,05$ ) и на 36,46% по сравнению со здоровыми крысами ( $p < 0,05$ ).

В свою очередь, ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования при максимальных концентрациях вазодилатора резко снижалась до отрицательных значений (на 136,54%) по сравнению с ответом артерий неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией ( $p < 0,05$ ) и еще сильнее снижалась (на 151,5%) по сравнению со здоровыми крысами ( $p < 0,05$ ). Максимальный ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 96 ч после инфицирования при максимальных концентрациях вазодилатора был снижен на 8,47% по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией и на 22,95% по сравнению со здоровыми крысами ( $p < 0,05$ ).

Результаты кумулятивного дозозависимого ответа артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией на вазоконстриктор и вазодилатор представлены на рисунке 26.



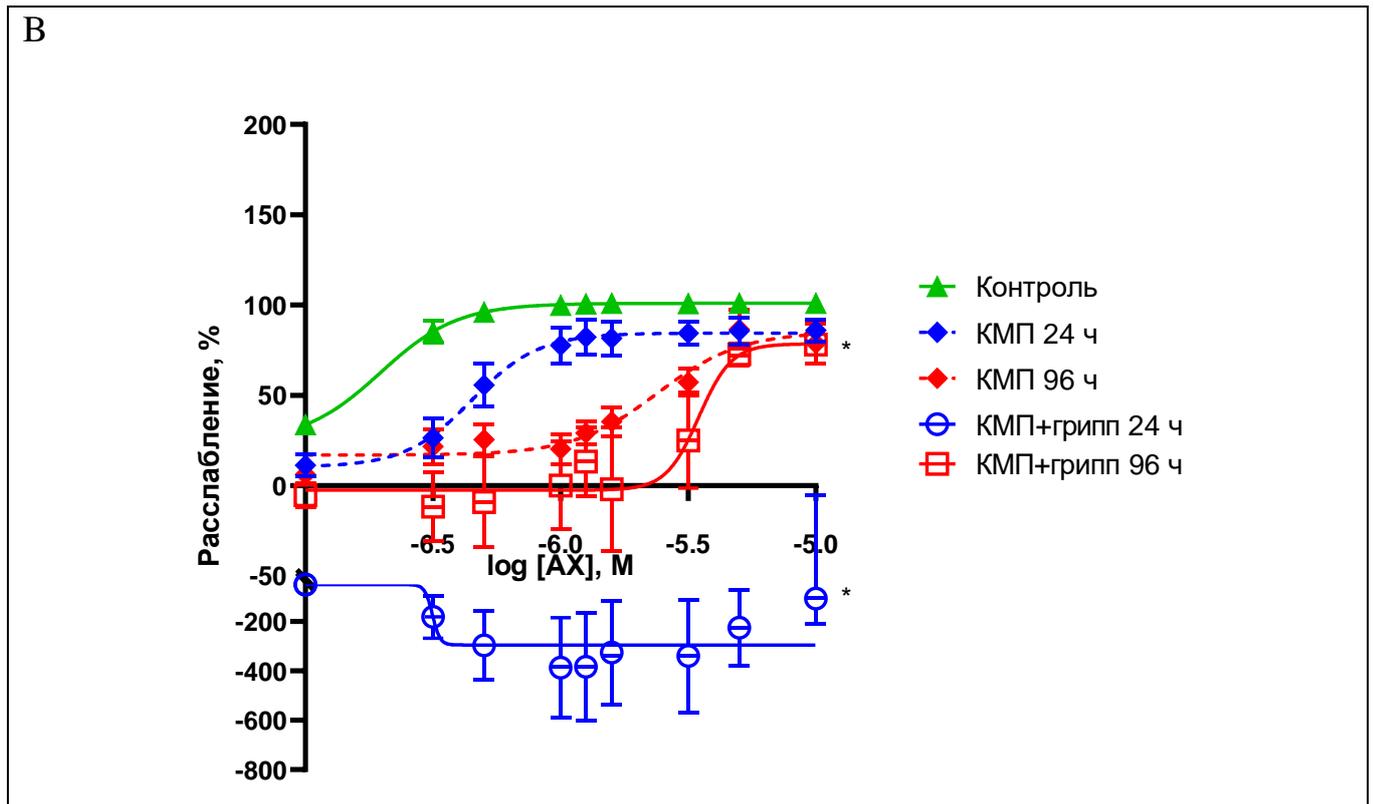


Рисунок 26 – Дозозависимые кривые «концентрация-ответ» артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)рdm09.

А – фенилэфрин-зависимое сокращение, В – ацетилхолин-зависимое расслабление.

Примечание: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  по сравнению с контролем, критерий Брауна-Форсайта,  $n = 15$ .

Обозначения: КМП – острая кардиомиопатия.

Как видно из рисунка 26А, дозозависимый ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования на средние и высокие концентрации вазоконстриктора снижался на 2-84% по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией и снижался на 2-74% по сравнению со здоровыми животными. Через 96 ч дозозависимый ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией на различные концентрации вазоконстриктора снижался на 8-63% по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией и на 14-63% по сравнению со здоровыми крысами.

Динамика изменения дозозависимого ответа со стороны артерий брыжейки у крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных гриппом, на вазодилатацию носил еще более выраженный характер. Так, через 24 ч после инфицирования дозозависимый ответ на вазодилатацию со стороны артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией имел инвертированный характер и снижался до отрицательных значений на 61-469% по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией и на снижался на 83-487% по сравнению со здоровыми животными. Через 96 ч после инфицирования дозозависимый ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией при различных концентрациях вазодилататора снижен на 8-37% по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией и на 22-105% по сравнению с ответом у здоровых крыс.

Таким образом, вирус гриппа в разной степени снижал максимальный и дозозависимый ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией на вазоконстриктор и вазодилататор. Наиболее выраженные изменения в вазомоторной активности со стороны сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией наблюдали через 24 ч после инфицирования. Так, максимальный и дозозависимый ответ артерий брыжейки на вазодилататор имел инвертированный характер со стороны большинства исследуемых сосудов крыс и снижался до отрицательных значений, что указывает на выраженную дисфункцию эндотелия. Изменения максимального и дозозависимого ответа на вазоконстриктор со стороны сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией также наиболее выражены через 24 ч после инфицирования. Изменения вазомоторной активности артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией сохранялись, хотя и в меньшей степени, и через 96 ч после инфицирования. Все вышесказанное указывает на длительность сохранения патологической вазомоторной активности сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией при гриппозной инфекции и соотносится с динамикой изменения инфекционной активности вируса гриппа в тканях легких крыс.

### 3.3.5 Исследование экспрессии eNOS, tPA и PAI-1 в кровеносных сосудах брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09

#### 3.3.5.1 Исследование экспрессии eNOS в кровеносных сосудах брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09

На рисунке 27 представлена экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс из двух контрольных групп – неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч (Рисунок 27А) и 96 ч (Рисунок 27В) после введения  $\alpha$ -МЕМ и двух опытных групп – крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч (Рисунок 27С) и 96 ч (Рисунок 27D) после инфицирования вирусом гриппа.

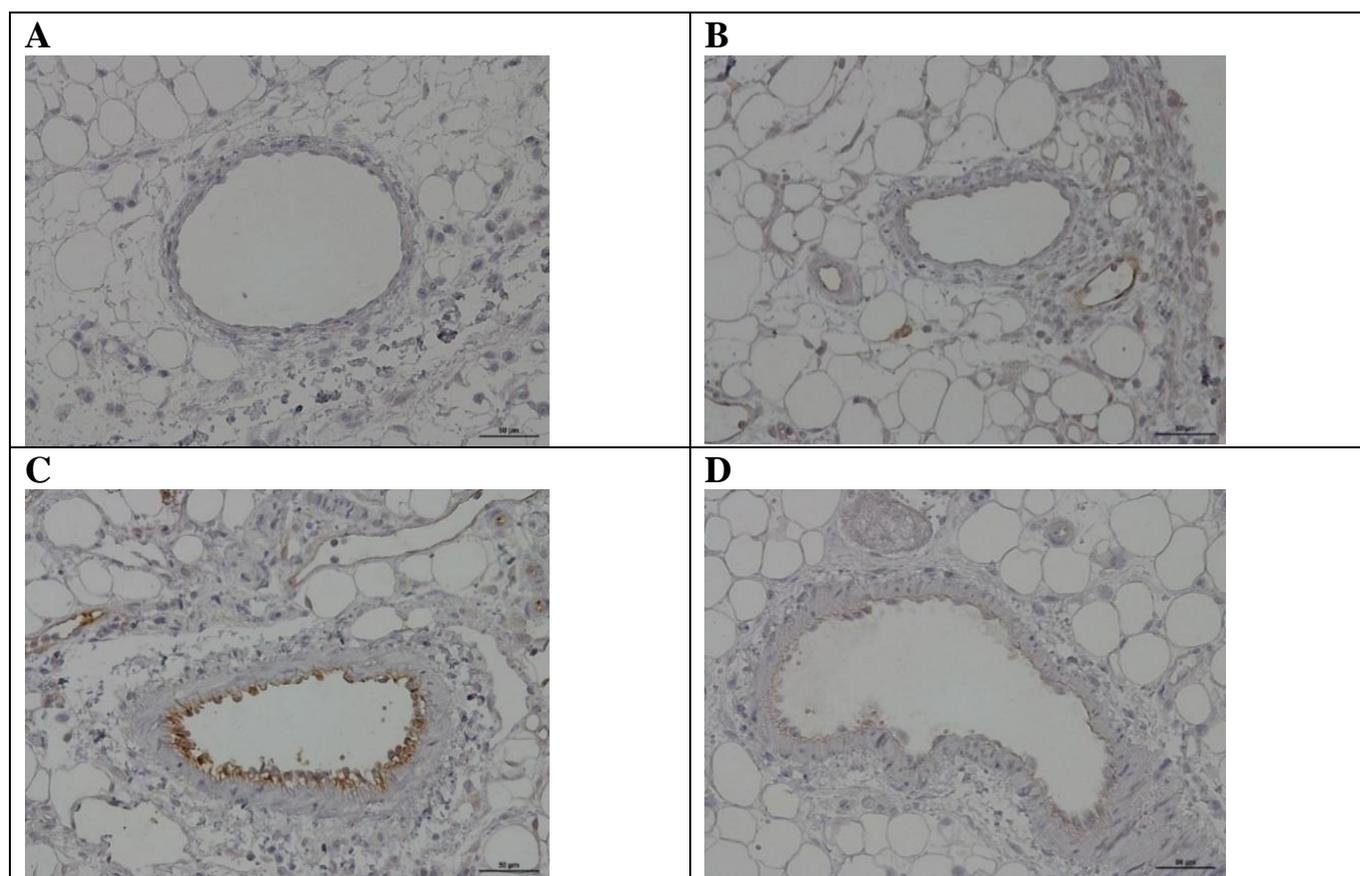


Рисунок 27 – Уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.

А – контрольный срез сосуда крысы с острой кардиомиопатией через 24 ч; В – контрольный срез сосуда крысы с острой кардиомиопатией через 96 ч; С – сосуд

крысы с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования; D – сосуд крысы с острой кардиомиопатией через 96 ч после инфицирования.

Как видно из рисунка 27, экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс в контрольной группе неинфицированных животных с кардиомиопатией через 24 ч минимальна, тогда как через 96 ч она увеличивается. Уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс стока Wistar с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 был значительно увеличен по сравнению с контролем (неинфицированные крысы с кардиомиопатией через 24 ч после введения  $\alpha$ -MEM). В свою очередь, уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс стока Wistar с острой кардиомиопатией через 96 ч после инфицирования, значительно снижался по сравнению с контролем (неинфицированные крысы с кардиомиопатией через 96 ч после введения  $\alpha$ -MEM).

Для количественного определения уровня экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс определяли три основных параметра (Таблица 13).

Таблица 13 – Уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean $\pm$ SD, у.е.).

Параметры сигнала	Контрольная группа (неинфицированные крысы с кардиомиопатией)		Опытная группа (крысы с кардиомиопатией, инфицированные вирусом гриппа)	
	Время после введения $\alpha$ -MEM (ч)		Время после инфицирования (ч)	
	24 ч (n=5)	96 ч (n=5)	24 ч (n=5)	96 ч (n=5)
Площадь заполнения	2387,0 $\pm$ 423,5	23848,8 $\pm$ 6548,6	40641,0 $\pm$ 14438,2*	6406,5 $\pm$ 3091,7*
Суммарная плотность	1544,5 $\pm$ 274,0	15431,4 $\pm$ 4237,3	26297,1 $\pm$ 9342,4*	5120,8 $\pm$ 2000,5*
Суммарная интенсивность	2948,7 $\pm$ 523,2	29460,4 $\pm$ 8089,5	50203,6 $\pm$ 17835,5*	7914,0 $\pm$ 3819,2*

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллиса.

Как видно из таблицы 13, максимальные значения параметров сигналов в клетках эндотелия были зарегистрированы в кровеносных сосудах крыс с острой кардиомиопатией через 24 часа после инфицирования, а минимальные значения – у неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией.

Для количественного определения уровня экспрессии eNOS в клетках эндотелия кровеносных сосудов брыжейки крыс с сопутствующей острой кардиомиопатией, инфицированных исследуемым вирусом, использовали параметр суммарной интенсивности сигнала (Рисунок 28).

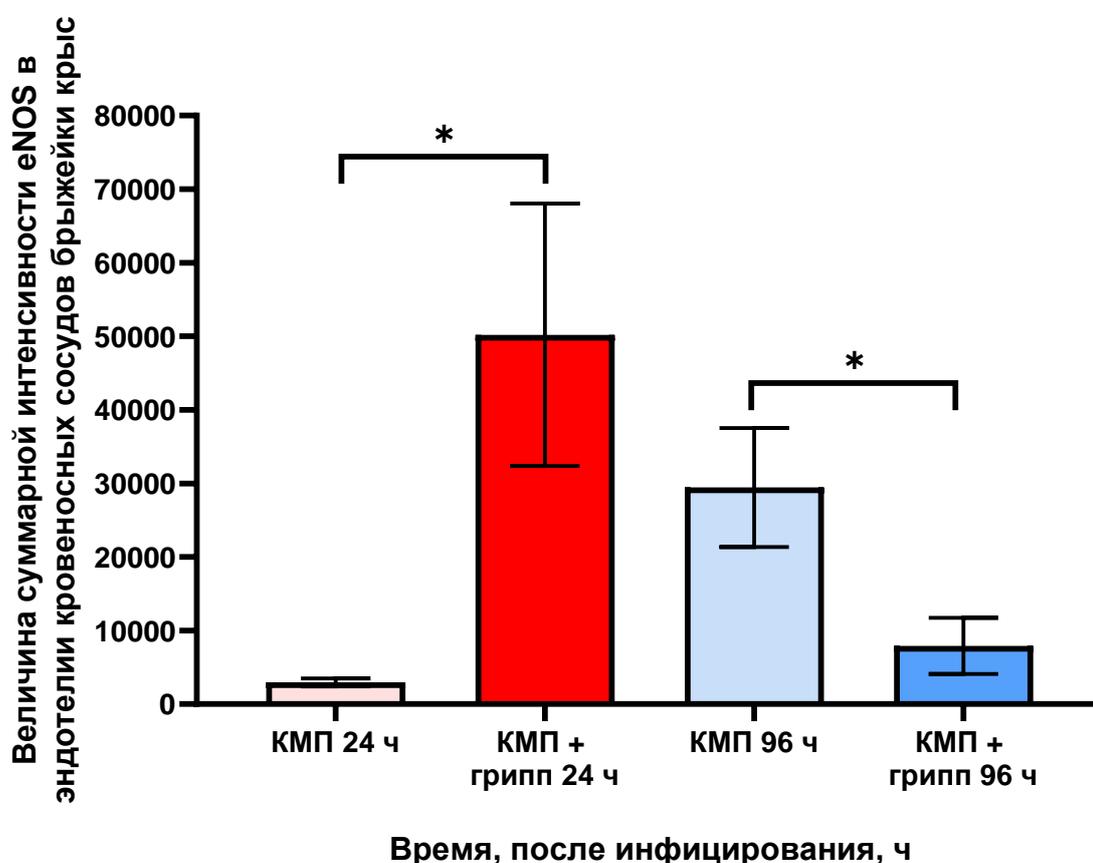


Рисунок 28 – Уровень экспрессии eNOS по величине суммарной интенсивности в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, у.е.).

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Манна-Уитни,  $n=30$ .

Обозначения: КМП – острая кардиомиопатия.

Как видно из рисунка 28, суммарная интенсивность eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования исследуемым вирусом резко повышалась (в 17 раз) и составляла  $50203,6 \pm 17835,56$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению контрольными значениями у неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией на тех же временных сроках ( $2948,7 \pm 523,2$ ). В свою очередь, через 96 ч после инфицирования экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки инфицированных крыс снижалась (в 3,72 раза) и составляла  $7914,0 \pm 3819,2$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с экспрессией у неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией на тех же временных сроках –  $29465,2 \pm 8222,41$ .

Таким образом, экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией существенно варьировала на протяжении всего периода исследования. Чрезмерное повышение экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования указывает на патологическую гиперактивацию данного фермента. В свою очередь, снижение экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 96 ч после инфицирования может указывать на истощение компенсаторных механизмов, поддерживающих адекватную функциональную активность кровеносных сосудов, что ведет к развитию терминальной стадии с нарастанием гипоксии и последующим нарушением функционирования тканей и органов.

### **3.3.5.2 Исследование экспрессии PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09**

На рисунке 29 представлена экспрессия PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс из двух контрольных групп – неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией через 24 и 96 ч после введения  $\alpha$ -MEM (Рисунок 29А и 29В, соответственно) и экспериментальных групп – крыс с острой

кардиомиопатией через 24 ч и 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом (Рисунок 29С и 29D).

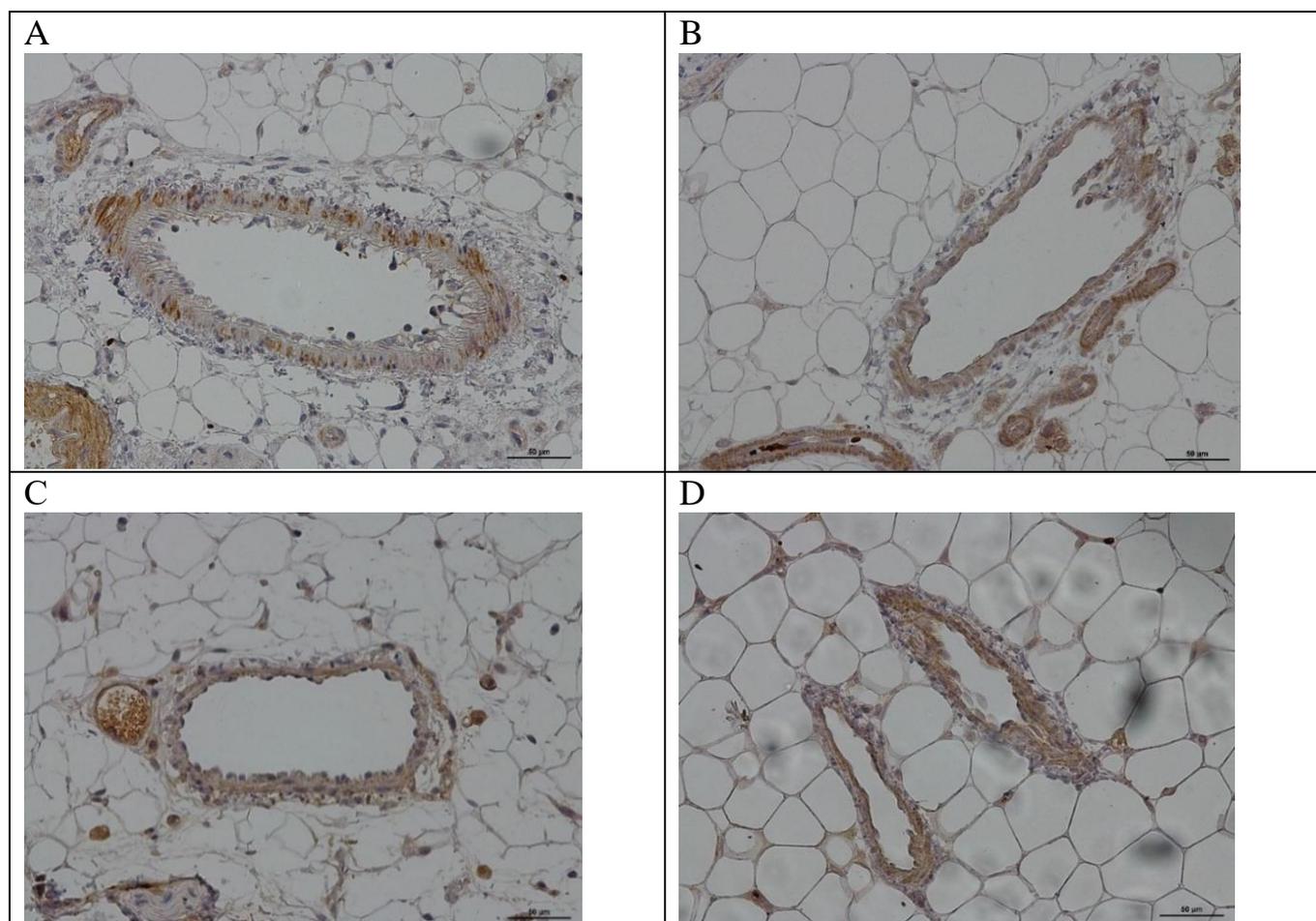


Рисунок 29 – Экспрессия PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.

А – контрольный срез сосуда крысы с острой кардиомиопатией через 24 ч; В – контрольный срез сосуда крысы с острой кардиомиопатией через 96 ч; С – сосуд крысы с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования исследуемым вирусом; D – сосуд крысы с острой кардиомиопатией через 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом.

Как видно из рисунка 29, экспрессия PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс в контрольных и опытных группах визуально сильно не различалась. Однако проведенное морфометрическое исследование позволило

выявить повышение экспрессии PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс через 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом гриппа по сравнению с экспрессией PAI-1 у неинфицированных крыс на тех же временных сроках (Таблица 14).

Таблица 14 – Уровень экспрессии PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, у.е.).

Параметры сигнала	Контрольная группа (неинфицированные крысы с кардиомиопатией)		Опытная группа (крысы с кардиомиопатией, инфицированные вирусом гриппа)	
	Время после введения α-МЕМ (ч)		Время после инфицирования (ч)	
	24 ч (n=5)	96 ч (n=5)	24 ч (n=5)	96 ч (n=5)
Площадь заполнения	111592,6±72523,2	60786,0±35494,1	84595,3±80153,2	300052,6±118314,1*
Суммарная плотность	80282,4±46926,8	47120,9±22966,7	53541,3±51863,8	223919,8±76556,2*
Суммарная интенсивность	128267,4±89587,6	77930,8±43845,6	109155,3±99012,8	379813,5±146152,8*

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллиса.

Для количественного определения уровня экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных исследуемым вирусом гриппа, использовали параметр суммарной интенсивности сигнала (Рисунок 30).

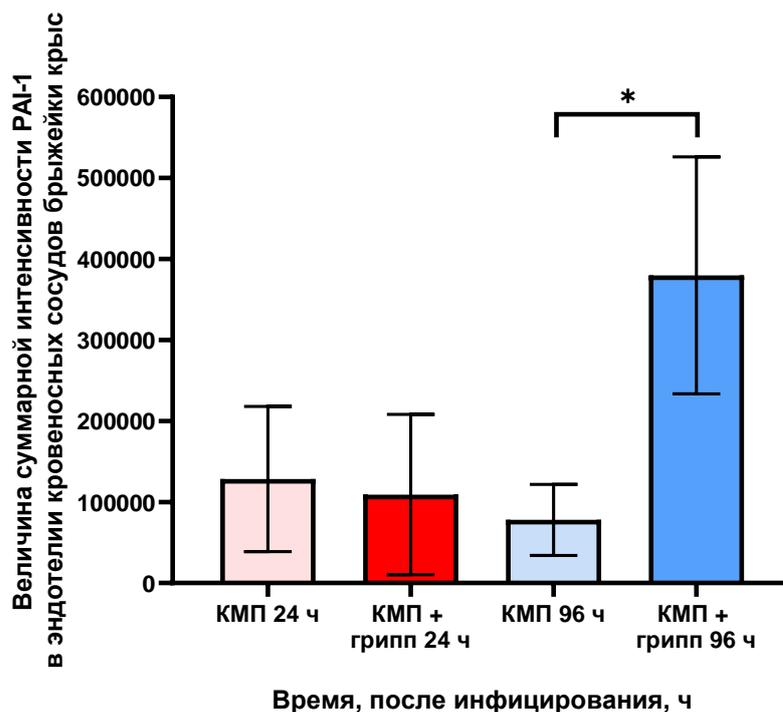


Рисунок 30 – Динамика изменения уровня экспрессии PAI-1 по величине суммарной интенсивности в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (Mean±SD, у.е.).

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллиса,  $n=30$ .

Как видно из рисунка 30, уровень суммарной интенсивности PAI-1 в эндотелии брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования вирусом гриппа составлял  $109155,3 \pm 99012,8$  и практически не отличался от суммарной интенсивности PAI-1 у неинфицированных крыс на тех же временных сроках –  $128267,4 \pm 89587,6$ . Через 96 ч после инфицирования крыс с острой кардиомиопатией уровень суммарной интенсивности повышался в 3,47 раза и составлял  $379813,5 \pm 146152,8$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем –  $77930,8 \pm 43845,6$  (неинфицированные крысы с острой кардиомиопатией на тех же временных сроках).

Таким образом, через 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом у крыс с острой кардиомиопатией резко повышался уровень PAI-1.

### 3.3.5.3 Исследование экспрессии tPA в кровеносных сосудах брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09

На рисунке 31 представлена экспрессия tPA в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс из двух контрольных групп – неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией через 24 и 96 ч после введения  $\alpha$ -МЕМ (Рисунок 31А и 31В, соответственно) и экспериментальных групп – крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч и 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом (Рисунок 31С и 31D).

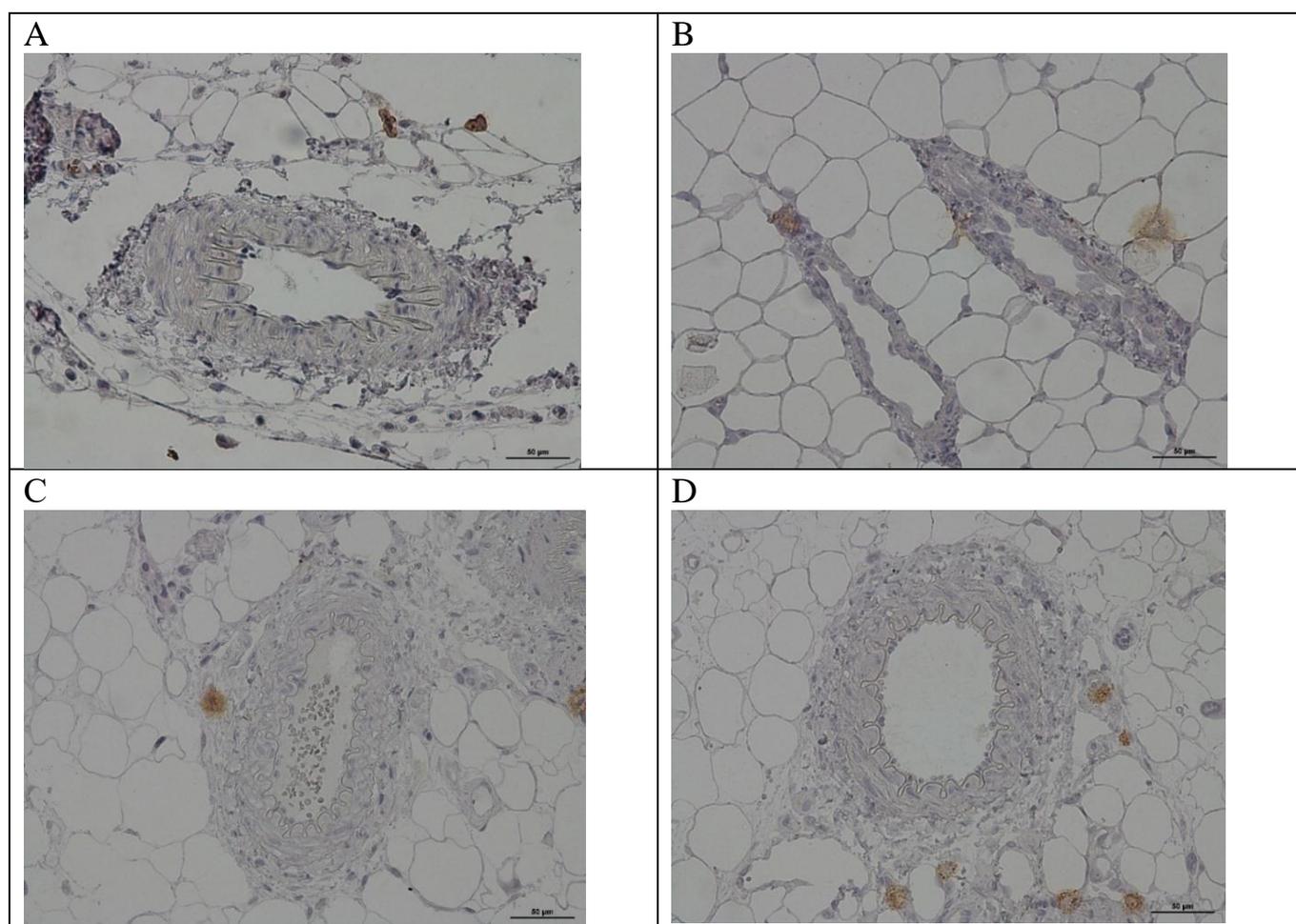


Рисунок 31 – Экспрессия tPA в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных адаптированным вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.

А – контрольный срез сосуда крысы с острой кардиомиопатией через 24 ч; В – контрольный срез сосуда крысы с острой кардиомиопатией через 96 ч; С – сосуд

крысы с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования; D – сосуд крысы с острой кардиомиопатией через 96 ч после инфицирования.

Как видно из рисунка 31, экспрессия tPA в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс в контрольных и опытных группах визуально не различалась. Проведенное в дальнейшем морфометрическое исследование также не выявило изменений в экспрессии PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс через 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом гриппа по сравнению с контролем (Таблица 15).

Таблица 15 – Уровень экспрессии tPA (Mean±SD, у.е.) в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных адаптированным вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.

Параметры сигнала	Контрольная группа (неинфицированные крысы с кардиомиопатией)		Опытная группа (крысы с кардиомиопатией, инфицированные вирусом гриппа)	
	Время после введения α-МЕМ (ч)		Время после инфицирования (ч)	
	24 ч (n=5)	96 ч (n=5)	24 ч (n=5)	96 ч (n=5)
Площадь заполнения	3202,1± 1158,6	3409,9± 1432,2	3053,2± 1863,7	2514,2± 1874,6
Суммарная плотность	2354,4± 749,7	2418,3± 926,7	2008,6± 1205,9	3670,7± 1213,0
Суммарная интенсивность	3812,1± 1431,3	3919,5± 1769,3	3509,5± 2302,3	2993,1± 2315,8

Примечание: \*p<0,05 по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллиса.

Как видно из таблицы 15, экспрессия tPA в клетках эндотелия кровеносных сосудов брыжейки инфицированных и неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией статистически не различалась.

Для количественного определения уровня экспрессии tPA в клетках эндотелия кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией,

инфицированных исследуемым вирусом гриппа, использовали параметр суммарной интенсивности сигнала (Рисунок 32).

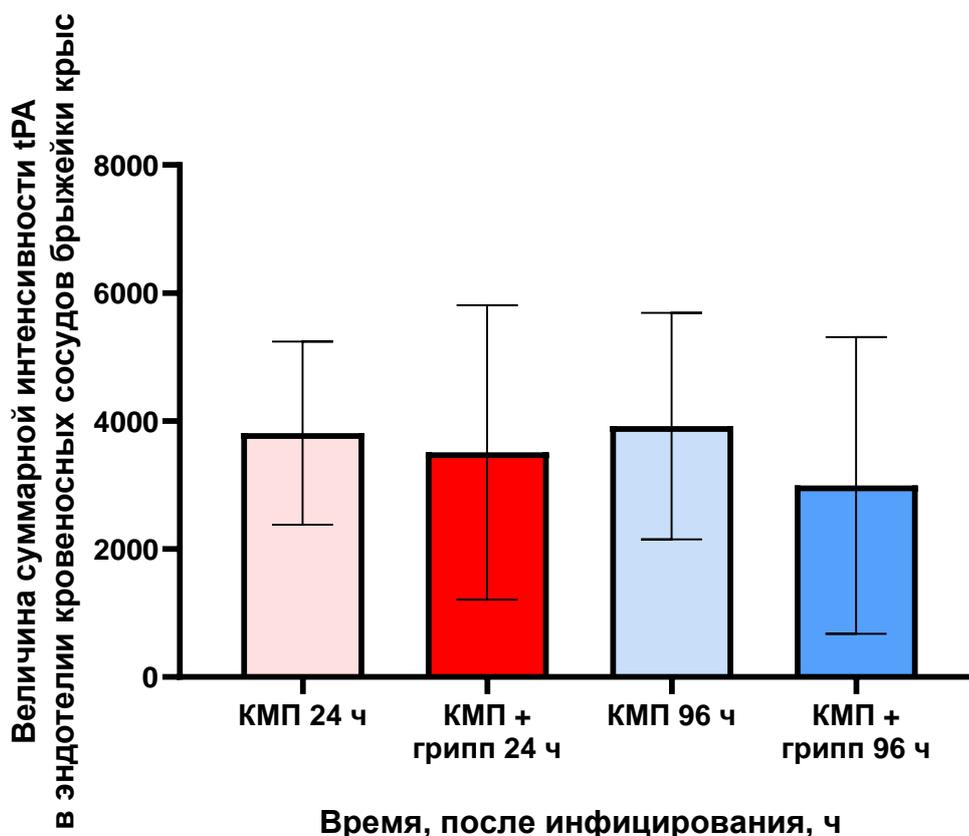


Рисунок 32 – Динамика изменения уровня экспрессии tPA (Mean±SD, у.е.) по величине суммарной интенсивности в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.

Примечание:  $p > 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллиса,  $n=30$ .

Обозначения: КМП – острая кардиомиопатия.

Таким образом, экспрессия tPA в клетках эндотелия кровеносных сосудов брыжейки инфицированных и неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией статистически не различалась. Так как PAI-1 и tPA практически не депонируются в клетках эндотелия, а сразу секретируются в просвет сосуда непосредственно после их активации были дополнительно проведены исследования по определению концентрации PAI-1 и tPA в плазме крови крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных исследуемым вирусом гриппа.

### 3.3.6 Определение концентрации PAI-1 и tPA в плазме крови крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09

Как видно из рисунка 33 концентрация PAI-1 в плазме крови крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных исследуемым вирусом в ходе исследования, варьировала по сравнению с контролем. Так, через 24 ч после инфицирования концентрация PAI-1 повышалась в 8 раз и составляла  $8,054 \pm 2,44$  нг/мл по сравнению со здоровыми крысами (контроль) –  $1,002 \pm 0,31$  нг/мл ( $p < 0,05$ ) и неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией –  $1,243 \pm 0,28$  нг/мл ( $p < 0,05$ ). Через 96 ч после инфицирования концентрация PAI-1 снижалась до  $1,491 \pm 0,33$  нг/мл, что практически соответствовало значениям у неинфицированных крыс –  $1,225 \pm 0,20$  нг/мл.

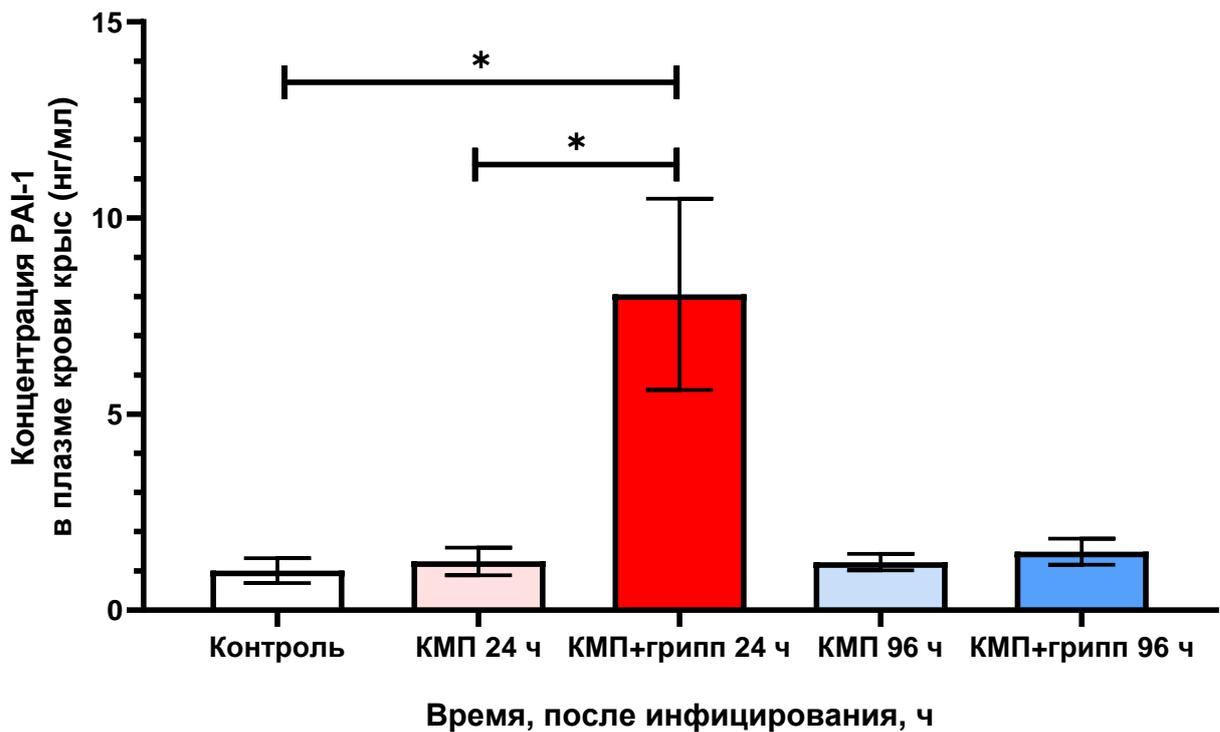


Рисунок 33 – Концентрация PAI-1 (Mean±SD, нг/мл) в плазме крови крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09. Примечание: \* $p < 0,05$ , по сравнению с контрольной группой, критерий Манна-Уитни,  $n=5$ .

Обозначения: КМП – острая кардиомиопатия.

Концентрация tPA в плазме крови крыс с сопутствующей острой кардиомиопатией, инфицированных исследуемым вирусом гриппа, также изменялась по сравнению с контролем (Рисунок 34).

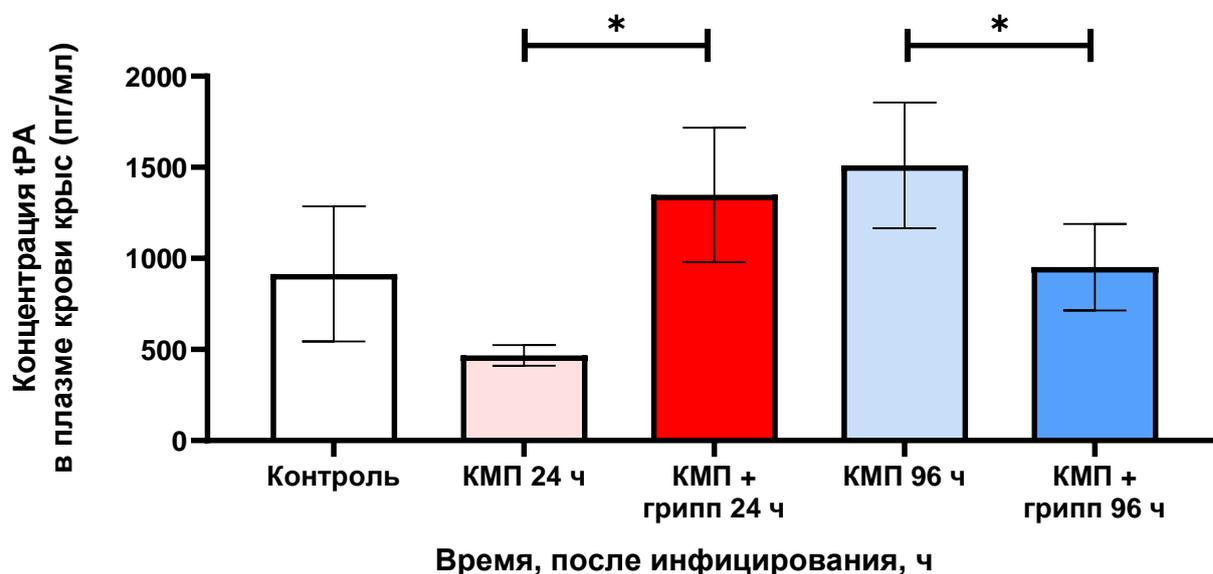


Рисунок 34 – Концентрация tPA (Mean±SD, пг/мл) в плазме крови крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.

Примечание: \* $p < 0,05$ , по сравнению с контрольной группой, критерий Манна-Уитни,  $n=5$ .

Обозначения: КМП – острая кардиомиопатия.

Как видно из рисунка 34 у крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования концентрация tPA повышалась (в 2,88 раза) и составляла  $1348,5 \pm 369,4$  ( $p < 0,01$ ) по сравнению с концентрация tPA у неинфицированных животных ( $467,2 \pm 57,2$ ). Через 96 ч после инфицирования концентрация tPA снижалась (в 1,58 раза) до  $951,7 \pm 237,3$  нг/мл по сравнению с контролем (неинфицированные крысы) –  $1511,1 \pm 345,1$  нг/мл ( $p < 0,05$ ).

Полученные данные указывают на то, что вирус гриппа вызывает изменение экспрессии таких эндотелиальных факторов как PAI-1 и tPA в плазме крови крыс, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, с острой кардиомиопатией. Наблюдаемое через 24 ч после инфицирования повышение концентрации tPA и концентрации PAI-1 указывает на значительное влияние вируса гриппа на систему гемостаза.

### 3.4 Сравнение аминокислотной последовательности эндотелиальных факторов с аминокислотной последовательностью белков вируса гриппа А(Н1N1)pdm09

Результат анализа аминокислотной последовательности эндотелиальных факторов, мимикрия к которым выявлена в белках вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 2016 г., представлен в таблице 16.

Таблица 16 – Сравнение аминокислотных фрагментов, мимикрирующих эндотелиальные факторы, в белках вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 2016 г.

Эндотелиальные факторы	Белки вируса гриппа 2016 г. А/Санкт-Петербург/RII04/2016 (H1N1)pdm09													
	PB2													
eNOS	K	R	K	R	D	S	S	I	L	T	D	S	Q	(736-747)
	:				:	:							:	
	R	R	K	R	K	E	S	S	N	T	D	S	A	(627-638)
HA														
PAI-1	L	L	V	L	L	E	N	E	R	T	L	D		(442-453)
							:							
	G	L	E	L	L	E	S	E	I	T	Y	D		(278-289)
eNOS	E	K	N	V	T	V	T	H	S	V	N	L		(38-49)
					:						:			
	E	I	N	V	A	V	L	H	S	Y	Q	L		(401-412)
NA														
PAI-1	K	I	F	R	I	E	K	G	K	I	I	K	S	(254-265)
						:			:				:	
	F	I	Q	R	I	S	K	G	G	L	I	K	T	(271-282)
M1														
eNOS	K	E	V	S	L	S	Y	S	T	G	A	L		(113-124)
						:			:					
	K	E	S	S	N	T	D	S	A	G	A	L		(631-642)
PAI-1	K	E	V	S	L	S	Y	S	T	G	A	L		(113-124)
				:						:				
	K	E	V	P	L	S	A	L	T	N	I	L		(266-277)
NEF														
eNOS	Q	L	L	L	E	V	E	Q	E	I	R	A		(104-115)
								:		:				
	Q	R	L	Q	E	V	E	A	E	V	A	A		(148-159)

Примечание:

| - идентичные аминокислоты

: - изофункциональные аминокислоты

\* - последовательность аминокислот фрагмента белка вируса

\*\* - последовательность аминокислот фрагмента белка гемостаза

Как видно из таблицы 16, в белках вируса A(H1N1)pdm09 найдено 7 фрагментов с гомологией к эндотелиальным факторам. Белок M1 и HA содержат по 2 фрагмента, гомологичных eNOS и PAI-1, соответственно. В белках PB2 и NEF найдена мимикрия к фрагментам аминокислотных последовательностей eNOS. Также в NA найдена мимикрия к фрагментам аминокислотных последовательностей PAI-1.

---

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет сделать вывод об изменении экспрессии эндотелиальных факторов и вазомоторной активности, что указывает на существенное поражение кровеносных сосудов при гриппозной инфекции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании изучали функциональную активность кровеносных сосудов при экспериментальной гриппозной нелетальной инфекции, вызванной вирусом гриппа А(Н1N1)pdм09. Для этого определяли экспрессию ряда эндотелиальных факторов в эндотелии кровеносных сосудов и в плазме крови, а также гистопатологические и вазомоторные изменения со стороны кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (Н1N1)pdм09, у преморбидно здоровых крыс и животных с острой кардиомиопатией.

На первом этапе был изучен уровень экспрессии ряда эндотелиальных факторов таких как eNOS, PAI-1 и tPA в культуре клеток эндотелия (*in vitro*), а также в эндотелии кровеносных сосудов легких и брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdм09 (*in vivo*). Так, экспрессия eNOS в инфицированной вирусом гриппа культуре клеток эндотелия EA.hy926 (*in vitro*) была резко снижена на протяжении всего исследуемого периода по сравнению с контролем. Уровень экспрессии eNOS снижался до 7,9% уже через 6 ч после инфицирования клеток (контроль принят за 100%), к 12 часам уровень несколько повышался и составлял 12,1%, через 18 ч снижался до 5,4%, а через 24 ч достигал своего минимума – 2,9%. Через 48 и 72 ч уровень экспрессии eNOS составлял 3,1% и 3,3%, соответственно.

Для изучения влияния вируса гриппа А(Н1N1)pdм09 на экспрессию eNOS в эндотелии кровеносных сосудов (*in vivo*), исследуемый вирус гриппа предварительно адаптировали в легких крыс путем серии последовательных пассажей. Так, уже через 24 ч после инфицирования у животных развивалась гриппозная нелетальная инфекция с субклиническим течением [299]. Масса тела инфицированных крыс не снижалась по сравнению с контролем, что согласуется с полученными данными на новорожденных и 60-ти дневных крыс линии Sprague-Dawley и Fischer-344 [300, 301]. Инфекционная активность исследуемого вируса с 4-го до 10-го пассажа включительно составляла 6-7 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, что указывает на

интенсивную репродукцию вируса гриппа в тканях легких инфицированных крыс стока Wistar. Репродукция вируса была подтверждена детекцией NP антигена вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах легких в иммуногистохимическом исследовании. Также в процессе адаптации исследуемого вируса уже через 24 ч после инфицирования были выявлены гистопатологические изменения как в кровеносных сосудах легких (разволокнение и набухание меди, набухание эндотелиоцитов, десквамация эндотелия, нити фибрина в просвете сосудов), так и в тканях легких крыс (геморрагический экссудат в просвете бронхов, спазм и отек бронхиол, сдувание эпителиоцитов бронхиол, неравномерная воздушность и мелкие очаги с экссудатом в легочной ткани, инфильтрация мононуклеарных клеток, присутствие апоптозных телец).

Как и в случае уровня экспрессии eNOS *in vitro*, уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс изменялся: через 24 ч после инфицирования исследуемым вирусом гриппа снижался в 1,89 раза и повышался в 2 раза по сравнению с контролем через 96 ч. Известно, что снижение экспрессии eNOS в клетках эндотелия приводит к снижению синтеза NO и нарушению процессов регуляции вазорелаксации и вазоконстрикции, что является одним из ведущих звеньев в патогенезе дисфункции эндотелия кровеносных сосудов [191, 302]. Одним из механизмов снижения синтеза NO является снижение доступности кофакторов в эндотелиоцитах (гем, тетрагидробиоптерин, НАДФ, ФАД и ФМН), что приводит к разобщению eNOS с субстратом (L-аргинин), в результате чего eNOS, продолжая получать электроны от НАДФ, поставляет их другому субстрату – молекулярному кислороду, в результате чего образуются высокоактивные формы кислорода (в частности, супероксиданион) [284]. Свободные радикалы в дальнейшем могут вызывать окислительный стресс и усиливать дисфункцию эндотелия. С другой стороны, снижение биодоступности NO, вырабатываемой eNOS, может компенсироваться за счет индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). Экспрессия iNOS связана с увеличением синтеза провоспалительных цитокинов и активацией транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B,

что было зарегистрировано при гриппе [195, 303]. При этом концентрация NO может резко увеличиваться с наномолярной до микромолярной, и как было отмечено, рядом авторов, находясь в избытке, оксид азота может взаимодействовать с супероксиданионом, в результате чего образуется пероксинитрит, высокая концентрация которого коррелирует с гибелью эндотелиальных клеток путем апоптоза или некроза [304, 305]. NO-индуцируемое перекисное окисление липидов в данном случае может вызывать повреждение сосудистой стенки и еще больше усугубляет дисфункцию эндотелия [306].

Повышение экспрессии eNOS в клетках эндотелия кровеносных сосудов легких крыс (*in vivo*) через 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом в 2 раза по сравнению с контролем может указывать на возможную активацию компенсаторных механизмов организма, призванных уменьшить функциональные сдвиги со стороны кровеносных сосудов при гриппозной инфекции. Стоит отметить, что увеличение экспрессии eNOS также можно рассматривать как патологическую реакцию – находясь в избытке NO взаимодействует с супероксиданионом, в результате чего образуется пероксинитрит – свободный радикал с длительным периодом полураспада, вызывающий окислительный стресс и усиливающий дисфункцию эндотелия.

Что касается PAI-1, то получены следующие результаты (*in vitro*): через 6 часов после инфицирования клеток эндотелия EA.hy926 экспрессия PAI-1 снижалась до 49,6% (контроль принят за 100%), через 12 часов составляла 43,2%, после чего наблюдалось ее резкое повышение экспрессии уже через 18 ч – 116,7%. Наиболее выраженное снижение уровня экспрессии было зарегистрировано через 24 часа – 18,9% (контроль принят за 100%) и далее наблюдали повышение через 48 и 72 ч – 23,5% и 35%, соответственно.

Полученные результаты о модуляции экспрессии PAI-1 (*in vitro*), в целом, соотносятся с полученными ранее данными по изменению экспрессии тканевого активатора плазминогена (tPA) в инфицированных вирусами гриппа клетках эндотелия человека EA.hy926: экспрессия PAI-1 через 12 часов снижалась, а экспрессия tPA повышалась, и, наоборот, через 18 часов экспрессия tPA

снижалась, а PAI-1 – повышалась [26]. Подобное сочетанное взаимодействие двух эндотелиальных факторов PAI-1 и tPA (снижение одного и повышение другого и, наоборот) является одним из ведущих патофизиологических механизмов развития ДВС-синдрома, наблюдаемым при гриппе и других вирусных инфекциях [307, 308].

При изучении экспрессии PAI-1 в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс (*in vivo*), инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, было показано, что уровень экспрессии PAI-1 через 24 ч после инфицирования повышался в 3,27 раза по сравнению с контролем (принят за 100%) и через 96 ч повышался еще больше – в 4,7 раза.

Изучение экспрессии tPA в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс (*in vivo*) не выявило статистически значимые изменения уровня экспрессии tPA через 24 ч после инфицирования по сравнению с контролем; через 96 ч уровень экспрессии tPA повышался в 2,19 раз.

Как показали результаты исследования динамика изменения экспрессии PAI-1 и tPA в эндотелии кровеносных сосудов легких крыс (*in vivo*), инфицированных вирусом гриппа, отличалась по сравнению с динамикой изменения экспрессии этих факторов *in vitro*. Это можно объяснить тем, что PAI-1 и tPA практически не депонировались в клетках эндотелия, а сразу секретировались в просвет сосуда непосредственно после их активации. Это явилось обоснованием для проведения исследований по определению концентрации PAI-1 и tPA в плазме крови крыс, инфицированных исследуемым вирусом гриппа.

Концентрация tPA в плазме крови крыс, инфицированных исследуемым вирусом гриппа, через 24 ч несколько повышалась. В свою очередь, концентрация PAI-1 в плазме крови крыс через 24 ч после инфицирования практически не изменилась по сравнению с контролем, а через 96 ч снизилась в 3,84 раза по сравнению с контролем.

Полученные данные указывают на то, что вирус гриппа вызывает изменение экспрессии таких эндотелиальных факторов, как PAI-1 и tPA в плазме крови крыс,

инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09, и в целом коррелируют с результатами полученными при изучении экспрессии PAI-1 и tPA *in vitro*.

Таким образом, модуляция экспрессии eNOS, PAI-1 и tPA *in vitro* и *in vivo*, подтверждает способность вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 влиять на экспрессию эндотелиальных факторов и тем самым индуцировать эндотелиальную дисфункцию, а также приводить к дисрегуляции системы гемостаза, что может стать причиной развития геморрагического синдрома и ДВС-синдрома.

Для определения механизмов влияния вируса гриппа на экспрессию эндотелиальных факторов была выдвинута гипотеза о мимикрии между аминокислотными фрагментами вирусных белков и фрагментами, входящих в состав эндотелиальных факторов.

Так, в составе сразу четырех вирусных белков вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 (PB2, HA, NEF и M1) обнаружены аминокислотные фрагменты гомологичные фрагментам в молекуле eNOS. Мимикрия между фрагментами в белке PAI-1 найдена в трех белках вируса, в частности, в молекулах HA, NA и M1. Можно предположить, что, гомологичные белкам системы гемостаза, фрагменты вирусных белков дезорганизуют процессы коагуляции и фибринолиза, высвобождаясь при протеолизе вирусных белков. Выщепление мимикрических фрагментов из вирусных белков может происходить за счет расщепления их либо клеточными, либо вирусными протеазами.

У многих вирусов протеазы запрограммированы в их геноме, кроме того, протеазной активностью могут обладать и структурные вирусные белки. Подтверждением этого предположения могут служить данные об обнаружении протеазной активности полимеразного белка PA у вируса гриппа [309]. Таким образом можно предположить, что наличие сразу нескольких гомологичных последовательностей в вирусных белках к различным эндотелиальным факторам позволяет вирусу активно вмешиваться в их экспрессию и тем самым влиять на систему гемостаза.

При изучении влияния вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 на кровеносные сосуды *in vivo* были получены приоритетные данные по изучению

гистопатологических изменений и вазомоторной активности как сосудов легких крыс (именно легкие являются органом, наиболее подверженным поражению при гриппе), так и кровеносных сосудов брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09. Данные исследования проводили в динамике – через 24 и 96 ч после инфицирования исследуемым вирусом гриппа.

Гистопатологические изменения со стороны кровеносных сосудов легких крыс при их инфицировании исследуемым вирусом гриппа регистрировали уже через 24 ч: выявляли спазм разной степени выраженности, в ряде сосудов крупного и среднего калибра эндотелий отслаивался от меди, а медиа – от адвентиции, наблюдалось частичное разволокнение меди и адвентиции. Местами наблюдалось истончение цитоплазмы эндотелиоцитов, их десквамация, а также экстравазация эритроцитов. Кровеносные сосуды мелкого калибра были умеренно спазмированы, встречалась десквамация эндотелия, изменение морфологии эндотелия по типу «частокола». Через 96 ч после инфицирования в крупных сосудах легких дезинтеграция эндотелия от меди встречалась реже или отсутствовала, десквамация эндотелия не наблюдалась, экстравазация отсутствовала. Однако, несмотря на значительное снижение инфекционной активности в тканях легких через 96 ч после инфицирования изменение морфологии эндотелий по типу «частокола» встречалось чаще, чем через 24 ч. Стоит отметить, что изменение морфологии эндотелиоцитов кровеносных сосудов, хотя и является признаком эндотелиальной дисфункции, необходимо для реализации иммунного ответа. Так, изменение морфологии эндотелия по типу «частокола», облегчает прохождение иммунных клеток через эндотелий кровеносных сосудов в очаг воспаления. В свою очередь, в кровеносных сосудах брыжейки при гриппе гистопатологические изменения не выявляли. Таким образом, гистопатологические изменения сохранялись в кровеносных сосудах легких крыс, инфицированных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09, на протяжении всего периода исследования [299].

Репродукция вируса в кровеносных сосудах была подтверждена детекцией NP антигена вируса гриппа А. При этом экспрессия NP антигена в эндотелии

кровеносных сосудов легких сохранялась на протяжении всего исследуемого периода.

Исследование вазомоторной активности (кумулятивного дозозависимого ответа) артерий легких крыс позволило установить следующее: со стороны артерий легких наблюдали тенденцию к снижению ответа на различные концентрации вазоконстриктора по сравнению с контролем через 24 ч и 96 ч после инфицирования вирусом гриппа. В свою очередь, ответ артерий легких на вазодилататор при минимальных и средних концентрациях был несколько снижен через 24 ч после инфекции и достигал контрольных значений через 96 ч после инфекции. Таким образом, со стороны артерий легких при гриппе наблюдали снижение ответа на вазоконстриктор и отчетливую тенденцию к увеличению ответа на вазодилататор.

Вазомоторная активность артерий брыжейки, в отличие от артерий легких в значительной степени отличалась от контроля на протяжении всего периода исследования. Так, результаты кумулятивного дозозависимого ответа артерий брыжейки крыс, позволили выявить следующее: через 24 и 96 ч после инфицирования ответ артерий брыжейки на разные концентрации вазоконстриктора усиливался (на 5-20%) по сравнению с контролем (100%). В свою очередь дозозависимый ответ артерий брыжейки крыс на вазодилататор через 24 ч резко снижался (на 40-100%); через 96 ч ответ на вазодилататор также был резко снижен (на 40-75%) по сравнению с контролем.

Следует обратить внимание на тот факт, что ответ артерий легких и брыжейки крыс, инфицированных исследуемым вирусом гриппа, на вазоконстрикцию и вазодилатацию резко различался, что является отражением физиологических особенностей органов, из которых были изолированы данные кровеносные сосуды. Так, известно, что внутрилегочные артерии входят в легочной круг кровообращения, обеспечивая процессы газообмена в легочных альвеолах. В отличие от всех остальных артерий легочные артерии несут венозную кровь, чей газовый состав заметно отличается от артериальной крови [310]. Именно данное отличие и обуславливает разницу в вазомоторной

активности кровеносных сосудов легких и брыжейки. Кроме того, резкое изменение вазомоторной активности артерий легких привело бы к острой дыхательной недостаточности.

Также было отмечено резкое изменение вазомоторной активности артерий брыжейки у инфицированных крыс при отсутствии гистопатологических изменений и репродукции вируса гриппа непосредственно в кровеносных сосудах брыжейки. Установленным фактом является то, что эндотелий сосудов является основным регулятором гемостаза, поэтому нарушение функциональной активности легочных сосудов при гриппозной инфекции приводит к нарушению регуляции системы гемостаза, включающей коагуляцию, фибринолиз, агрегацию тромбоцитов и т.д. Можно предположить, что дисрегуляция функциональной активности кровеносных сосудов легких при гриппе может стать триггером для изменения состояния стенки кровеносных сосудов в других тканях и органах. Все вышесказанное указывает на системное поражение кровеносных сосудов при гриппе.

Таким образом, изучение функциональной активности кровеносных сосудов в модели нелетальной гриппозной инфекции на крысах позволило выявить целый ряд патологических изменений, связанных с экспрессией эндотелиальных факторов, вазомоторной активностью сосудов и морфологией стенки сосудов. Так, данные изменения регистрировали уже через 24 ч после инфицирования гриппом и сохранялись на протяжении 96 ч, несмотря на тот факт, что репродукция вируса гриппа резко снижалась с 6,6 до 2,2 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Таким образом, все вышеуказанное подтверждает тот факт, что вирус гриппа А(Н1N1)рdm09 вызывает поражение кровеносных сосудов и развитие эндотелиальной дисфункции.

Были проведены также исследования по изучению функциональной активности кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 и 96 ч после инфицирования вирусом А(Н1N1)рdm09.

Для моделирования острой кардиомиопатии использовали антибиотик из группы антрациклинов – доксорубицин. Известно, что данный антибиотик обладает следующим механизмом действия:

- 1) нарушает синтез нуклеиновых кислот путем интеркалирования между п.о.;
- 2) ингибирует активность ДНК-топоизомеразы 2 типа;
- 3) вызывает модификацию в гистонах, что снижает скорость репарации ДНК;
- 4) повышает образование активных форм кислорода, что вызывает оксидативный стресс и повреждение клеточных мембран и нуклеиновых кислот [311].

Помимо антимиотического действия, доксорубицин обладает выраженной кардиотоксичностью. Так, в исследованиях *in vitro* было показано, что доксорубицин повышает синтез активных форм кислорода в кардиомиоцитах, что способствует развитию оксидативного стресса. Однако, основным повреждающим фактором является ингибирование ДНК-топоизомеразы 2b, что приводит к разрыву цепей ДНК и гибели клеток миокарда [312].

При введении крысам доксорубицина в кумулятивной дозе 17-20 мг/кг в течение короткого периода времени (до 2-х недель) развивалась острая кардиомиопатия, которая характеризовалась снижением фракции выброса левого желудочка и увеличением конечного систолического и диастолического размеров левого желудочка.

У животных с кардиомиопатией на 2-4 сутки после инфицирования вирусом гриппа А(H1N1)pdm09 отмечали появление таких клинических симптомов, как адинамия, анорексия, снижение или полное отсутствие реакции на внешние стимулы. Тяжесть состояния со временем прогрессировала. Так, около 40% крыс с кардиомиопатией, инфицированных исследуемым вирусом гриппа, погибали на 3 день после заражения.

Изучение инфекционной активности вируса гриппа в гомогенатах легких крыс с кардиомиопатией показало усиление этой активности через 24 и 96 ч (7,2 и

2,6 lg ЭИД<sub>50</sub>, соответственно) по сравнению с крысами, инфицированными гриппом, но без острой кардиомиопатии (6,5 и 2,2 lg ЭИД<sub>50</sub>). В брыжейке инфицированных крыс на протяжении всего периода исследования, инфекционная активность вируса не регистрировалась; гистопатологические изменения не выявляли.

Изучение вазомоторной активности кровеносных сосудов крыс с острой кардиомиопатией проводились только на артериях брыжейки, т.к. сосуды легких при острой кардиомиопатии в редких случаях могут повреждаться, что делает их непригодными для изучения. Показатели вазомоторной активности артерий брыжейки у крыс с острой кардиомиопатией инфицированных вирусом гриппа значительно отличались от вазомоторной активности сосудов у неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией, а также у здоровых крыс. Так, кумулятивный дозозависимый ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования снижался (на 5-80%) только при максимальных концентрациях вазоконстриктора по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией и снижался (на 5-75%) на всех концентрациях вазоконстриктора по сравнению со здоровыми крысами. Через 96 ч кумулятивный дозозависимый ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией снижался (на 5-60%) на всех концентрациях вазоконстриктора по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией и снижался (на 5-65%) на всех концентрациях вазоконстриктора по сравнению со здоровыми крысами.

В свою очередь, кумулятивный дозозависимый ответ артерий брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования значительно снижался (на 50-380%) на всех концентрациях вазодилататора (до отрицательных значений) по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией и еще сильнее снижался (на 80-480%) по сравнению со здоровыми крысами. Следует отметить, что снижение интенсивности расслабления артерий на воздействие ацетилхолина на 30% рассматривают как легкую форму эндотелиальной дисфункции, а снижение на 60% и более – как

тяжелую форму дисфункции эндотелия [302]. Через 96 ч кумулятивный дозозависимый ответ артерий брыжейки снижался (на 5-35%) на всех концентрациях вазодилататора по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией и снижался (на 20-100%) по сравнению со здоровыми крысами. Все вышесказанное указывает на то, что инфицирование вирусом гриппа крыс с острой кардиомиопатией приводит к резкому усилению поражения кровеносных сосудов уже через 24 ч после инфицирования.

Экспрессию эндотелиальных факторов изучали в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс с острой кардиомиопатией. Так, через 24 ч после инфицирования исследуемым вирусом экспрессия eNOS повышалась в 17 раз по сравнению контрольными значениями у неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией на тех же временных сроках. В свою очередь, через 96 ч после инфицирования экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки инфицированных крыс снижалась в 3,72 раза по сравнению с экспрессией у неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией на тех же временных сроках.

Экспрессия PAI-1 в эндотелии брыжейки крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования вирусом гриппа практически не отличалась от контрольных значений у неинфицированных крыс на тех же временных сроках. Через 96 ч после инфицирования крыс с острой кардиомиопатией экспрессия PAI-1 повышалась в 4,87 раза по сравнению с контролем. Экспрессия tPA в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс в контрольных и экспериментальных группах статистически не отличалась.

Концентрация PAI-1 в плазме крови крыс с острой кардиомиопатией, инфицированных исследуемым вирусом в ходе исследования, варьировала: через 24 ч после инфицирования концентрация PAI-1 повышалась в 8 раз по сравнению со здоровыми крысами (контроль) и в 6,43 раза по сравнению с неинфицированными крысами с острой кардиомиопатией; через 96 ч концентрация PAI-1 в плазме крови крыс с острой кардиомиопатией снижалась до контрольных значений у неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией.

Концентрация tPA в плазме крови крыс с острой кардиомиопатией через 24 ч после инфицирования концентрация повышалась в 2,7 раза по сравнению с концентрацией tPA у неинфицированных крыс с острой кардиомиопатией. Через 96 ч после инфицирования концентрация tPA несколько снижалась в 1,42 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, гриппозная инфекция, вызванная вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, отягощает течение острой кардиомиопатии, а также может стать причиной летального исхода.

Таким образом, полученные данные позволяют дать рекомендацию о необходимости проведения скрининга ангиопротекторов для включения их в схему лечения гриппа (наряду с этиотропными препаратами), с целью коррекции эндотелиальной дисфункции. Особенно это важно для лиц с сопутствующими заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

## ВЫВОДЫ

1. Репродукция вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в культуре клеток эндотелия EA.hy926 (in vitro) приводит к резкому снижению уровня экспрессии eNOS и модуляции экспрессии PAI-1.

2. Адаптированный вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, способен вызывать продуктивную нелетальную инфекцию с субклиническим течением у половозрелых крыс стока Wistar.

3. Установлено, что вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 снижает экспрессию eNOS и модулирует экспрессию PAI-1 и tPA в эндотелии кровеносных сосудов легких, а также модулирует активность PAI-1 и tPA в плазме крови крыс (in vivo).

4. Вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 вызывает повреждение кровеносных сосудов легких, выражающееся в изменении гистологии и вазомоторной активности; в кровеносных сосудах брыжейки регистрируются изменения только вазомоторной активности.

5. Вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 при инфицировании животных с острой кардиомиопатией значительно усиливает дисфункцию эндотелия, что отражается в существенных изменениях уровня экспрессии эндотелиальных факторов и вазомоторной активности артерий брыжейки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ADAMTS 13 – протеаза, расщепляющая фактор фон Виллебранда

EA.hy926 – перевиваемая культура клеток эндотелия кровеносных сосудов человека

eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота

HA – гемагглютинин

HUVEC – первичная культура клеток эндотелия пупочной вены

IgM – иммуноглобулины класса M

IgG – иммуноглобулины класса G

IRF – регуляторный фактор интерферона

lg – десятичный логарифм

M1 – матриксный белок 1 типа

M2 – матриксный белок 2 типа (ионный канал)

NA – нейраминидаза

NFkB – ядерный фактор kB

NP – нуклеопротеин

NS2/NEP – неструктурный белок 2/белок ядерного экспорта

PA – белок полимеразного комплекса (polymerase acid)

PAI-1 – ингибитор тканевого активатора плазминогена 1 типа

PB1 – белок полимеразного комплекса (polymerase basic 1)

PB2 – белок полимеразного комплекса (polymerase basic 2)

TLR – толл-подобные рецепторы

tPA – тканевой активатор плазминогена

vWF – фактор фон Виллебранда

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДВС-синдром – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

РКЭ – развивающиеся куриные эмбрионы

РНП – рибонуклеопротеин

РФК – реактивные формы кислорода

ТЦД<sub>50</sub> – 50-% тканевая цитопатическая инфекционная доза

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

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЭИД<sub>50</sub> – 50-% эмбриональная инфекционная доза

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. WHO. WHO News release. Up to 650 000 people die of respiratory diseases linked to seasonal flu each year. December 14, 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/seasonal-flu/en///> – 2017. – V. – №.
2. Barber H. A case of influenzal myocarditis // *The Clinical journal*. – 1947. – Vol. 76, № 5. – P. 181-183.
3. Lyon E. Modern viewpoints on cardiovascular disturbances in influenza // *Acta Medica Orientalia*. – 1952. – Vol. 11, № 2-3. – P. 25-34.
4. Сергеев Н.В. Поражения сердечно-сосудистой системы при гриппе // М. – 1962. – С. 94.
5. Warren-Gash C, Hayward AC, Hemingway H, et al. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review // *Lancet Infect Dis*. – 2009. – Vol. 9, № 10. – P.601–610.
6. Greaves K, Oxford JS, Price CP, et al. The prevalence of myocarditis and skeletal muscle injury during acute viral infection in adults: measurement of cardiac troponins in 152 patients with acute influenza infection // *Arch Intern Med*. – 2003. – Vol. 163, – P.165-168.
7. Carrat F, Leruez-Ville M, Tonnellier M, et al. A virologic survey of patients admitted to a critical care unit for acute cardiorespiratory failure // *Intensive Care Med*. – 2006. – Vol. 32, № 1. – P. 156-159.
8. Protonotarios A, Marelli-Berg F. Influenza-associated cardiac injury: a disease of the cardiac conduction system? // *Cardiovasc Res*. – 2021. – Vol. 117, № 3. – P. 643-644.
9. Ison MG, Campbell V, Rembold C, et al. Cardiac findings during uncomplicated acute influenza in ambulatory adults // *Clin Infect Dis*. – 2005. – Vol. 40, № 3. – P.415-422.

10. Mamas MA, Fraser D, Neyses L. Cardiovascular manifestations associated with influenza virus infection // *Int J Cardiol.* – 2008. – Vol. 130, №3. P.304-9.
11. Nguyen JL, Yang W, Ito K, et al. Seasonal Influenza Infections and Cardiovascular Disease Mortality // *JAMA Cardiol.* – 2016. – Vol. 1, № 3. – P. 274-281.
12. Азаренок А.А., Еропкина Е.М., Прочуханова А.Р и др. Воздействие вирусов гриппа А и их поверхностных белков на метаболизм клеток эндотелия кровеносных сосудов человека // *Вопросы вирусологии.* – 2013. – Т. 58, №3. – С. 15-27.
13. Жилинская И.Н., Азаренок А.А., Ильинская Е.В. и др. Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека // *Вопросы вирусологии.* – 2012. – Т. 57, № 2. – С. 20-23.
14. Гладков С.А., Григорьева И.В., Дедов В.А. и др. Клинико-морфологические сопоставления в случаях летальных исходов при гриппе в 2009-2011 гг. // *Журнал инфектологии.* – 2011. – Т. 3, № 4. – С. 55-61.
15. Львов Д.К., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. и др. Эпидемический сезон 2015-2016 гг. в России и мире: особенности циркуляции вирусов гриппа, динамика заболеваемости, клинические аспекты и алгоритм лечения // *Терапевтический архив.* – 2016. – Т. 88, № 11. – С.112-120.
16. Young MR. Endothelial cells in the eyes of an immunologist // *Cancer Immunol Immunother.* – 2012. – Vol. 61, № 10, – P. 1609-1616.
17. Arango MT, Shoenfeld Y, Cervera R, et al. Infection and autoimmune diseases. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., editors. *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18. Chapter 19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459437/>
18. Widmer RJ, Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease // *Glob Cardiol Sci Pract.* – 2014. – V. 2014, №3. – P. 291-308.

19. Yang Y, Tang H. Aberrant coagulation causes a hyper-inflammatory response in severe influenza pneumonia // *Cell Mol Immunol.* – 2016. – Vol. 13, № 4. – P. 432-442.
20. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function // *Eur Heart J.* – 2012. – V. 33, № 7. – P.829-837d.
21. Gliozzi M, Scicchitano M, Bosco F, et al. Modulation of Nitric Oxide Synthases by Oxidized LDLs: Role in Vascular Inflammation and Atherosclerosis Development // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 13. – P. 3294.
22. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis // *J Cell Physiol.* – 2012. – Vol. 227, №2. – P.493-507.
23. Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, et al. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1 // *ScientificWorldJournal.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 858293.
24. Lin L, Hu K. Tissue-type plasminogen activator modulates macrophage M2 to M1 phenotypic change through annexin A2-mediated NF- $\kappa$ B pathway // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 50. – P.88094-88103.
25. Lazarowitz SG, Goldberg AR, Choppin PW. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen // *Virology.* – 1973. – Vol. 56, №1, – P. 172-80.
26. Азаренок А.А., Ляпина Л.А., Оерган Т.Ю. и др. Изменение активности тканевого активатора плазминогена клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа А и его поверхностных белков // *Тромбоз, гемостаз, реология.* – 2014. – № 1. – С. 70-77.
27. Horvath CM. A serpin takes a bite out of the flu // *Cell Host Microbe.* – 2015. – Vol. 17, № 3. – P. 283-284.
28. Dittmann M, Hoffmann HH, Scull MA, et al. A serpin shapes the extracellular environment to prevent influenza A virus maturation // *Cell.* – 2015. – Vol. 160, № 4. – P. 631-643.
29. Tse LV, Marcano VC, Huang W, et al. Plasmin-mediated activation of pandemic H1N1 influenza virus hemagglutinin is independent of the viral neuraminidase // *Journal of Virology.* – 2013. – Vol. 87, № 9. – P. 5161-5169.

30. Жилинская И.Н., Фадеев А.В., Азаренок А.А. и др. Детерминация гомологичных фрагментов в структуре белков вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 2009 и 2016 годов выделения и белков системы гемостаза человека // Тромбоз, гемостаз, реология. – 2017. – Т. 69, №1. – С. 64-76.
31. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study // Lancet Infect Dis. – 2012. – Vol. 12, № 9. – P. 687-695.
32. Minchole E, Figueredo AL, Omeñaca M, et al. Seasonal Influenza A H1N1pdm09 Virus and Severe Outcomes: A Reason for Broader Vaccination in Non-Elderly, At-Risk People // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 11. – P. e0165711.
33. Карпова Л.С., Соминина А.А., Дмитриева М.Н. и др. Сравнительный анализ пандемии гриппа А(Н1N1)PDM09 в России (2009-2010 гг.) и последующих эпидемий (2011-2014 гг.) // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т. 79, № 6. – С. 8-16.
34. Гольдштейн Э.М. Смертность от болезней системы кровообращения и болезней органов дыхания, ассоциированная с гриппом, в Российской Федерации во время сезонов гриппа с 2013-2014 до 2018-2019 // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2019. – Т. 12, № 1. – С. 9-16
35. Nayak DP, Hui EK, Barman S. Assembly and budding of influenza virus // Virus Res. – 2004. – Vol. 106, № 2. – P. 147–65.
36. Rosário-Ferreira N, Preto AJ, Melo R, et al. The Central Role of Non-Structural Protein 1 (NS1) in Influenza Biology and Infection // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21, № 4, – P. 1511.
37. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, et al. Influenza virus morphogenesis and budding // Virus Res. – 2009. – Vol. 143, № 2. – P. 147-161.
38. Gething MJ, McCammon K, Sambrook J. Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport // Cell. – 1986. – Vol. 46, № 6. – P. 939-950.

39. Bottcher E, Matrosovich T, Beyerle M, et al. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium // *J Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 19. – P. 9896–8.
40. Laver WG. Separation of two polypeptide chains from the hemagglutinin subunit of influenza virus // *Virology.* – 1971. – Vol. 45, № 1. – P. 275-288.
41. Klenk HD, Rott R. The molecular biology of influenza virus pathogenicity // *Adv Virus Res.* – 1988. – Vol. 34, – P. 247-281.
42. Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus // *Annu Rev Biochem.* – 1987. – Vol. 56, – P. 365-394.
43. Wu NC, Wilson IA. Influenza Hemagglutinin Structures and Antibody Recognition // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2020. – Vol. 10, № 8. – P. a038778.
44. Chen JR, Ma C, Wong CH. Vaccine design of hemagglutinin glycoprotein against influenza // *Trends Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29, № 9. – P. 426-434.
45. Knossow M, Skehel JJ. Variation and infectivity neutralization in influenza // *Immunology.* – 2006. – Vol. 119, № 1. – P. 1-7.
46. Yang J, Li M, Shen X, et al. Influenza A virus entry inhibitors targeting the hemagglutinin // *Viruses.* – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. 352-373.
47. Copeland CS, Doms RW, Bolzau EM, et al. Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport // *J Cell Biol.* – 1986. – Vol. 103, № 4. – P. 1179-1191.
48. Stray SJ, Cummings RD, Air GM. Influenza virus infection of desialylated cells // *Glycobiology.* – 2000. – Vol. 10, № 7. – P. 649-658.
49. Ivanovic T, Choi JL, Whelan SP, et al. Influenza-virus membrane fusion by cooperative fold-back of stochastically induced hemagglutinin intermediates // *Elife.* – 2013. – Vol. 2, – P. e00333.
50. Varghese JN, Colman PM. Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution // *J Mol Biol.* – 1991. – Vol. 21, № 2. – P. 473-486.

51. Calder LJ, Wasilewski S, Berriman JA, et al. Structural organization of a filamentous influenza A virus // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – Vol. 107, №3. – P. 10685-10690.
52. Shtyrya YA, Mochalova LV, Bovin NV. Influenza virus neuraminidase: structure and function // *Acta Naturae*. – 2009. – Vol. 1, № 2. – P. 26-32.
53. Wagner R, Wolff T, Herwig A, et al. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics // *J Virol*. – 2000. – Vol. 74, № 14. – P. 6316-6323.
54. Goto H, Wells K, Takada A, et al. Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus // *J Virol*. – 2001. – Vol. 75, №19. – P. 9297-9301.
55. Takeda M, Pekosz A, Shuck K, et al. Influenza a virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture // *J Virol*. – 2002. – Vol. 76, №3. – P. 1391-1399.
56. Helenius A. Unpacking the incoming influenza virus // *Cell*. – 1992. – Vol. 69, №4. – P. 577-578.
57. Ciampor F, Bayley PM, Nermut MV, et al. Evidence that the amantadine-induced, M2-mediated conversion of influenza A virus hemagglutinin to the low pH conformation occurs in an acidic trans Golgi compartment // *Virology*. – 1992. – Vol. 188, № 1. – P. 14-24.
58. Chen BJ, Leser GP, Jackson D, et al. The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding // *J Virol*. – 2008. – Vol. 82, № 20. – P. 10059–70.
59. Rossman JS, Jing X, Leser GP, et al. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission // *Cell*. – 2010. – Vol. 142, № 6. – P. 902–913.
60. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel // *Nat Immunol*. – 2010. – Vol. 11, № 5. – P. 404-410.

61. Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes // *Cell Host Microbe*. – 2009. – Vol. 6, № 4. – P. 367-380.
62. Harris A, Forouhar F, Qiu S, et al. The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1 // *Virology*. – 2001. – Vol. 289, № 1. – P. 34-44.
63. Yasuda J, Nakada S, Kato A, et al. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix // *Virology*. – 1993. – Vol. 196, № 1. – P. 249-255.
64. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding // *Virology*. – 2011. – Vol. 411, № 2. – P. 229-236.
65. Einfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins // *Nat Rev Microbiol*. – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 28-41.
66. Martin K, Helenius A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus // *J Virol*. – 1991. – Vol. 65, № 1. – P. 232-244.
67. Digard P, Elton D, Bishop K, et al. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments // *J Virol*. – 1999. – Vol. 73, № 3. – P. 2222-2231.
68. Herz C, Stavnezer E, Krug R, et al. Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells // *Cell*. – 1981. – Vol. 26, № 3. – P. 391-400.
69. Jackson DA, Caton AJ, McCready SJ, Cook PR. Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus // *Nature*. – 1982. – Vol. 296, № 5855. – P. 366-368.
70. Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, et al. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2 // *Nat Struct Mol Biol*. – 2008. – Vol. 15, № 5. – P. 500-506.
71. Subbarao EK, London W, Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range // *J Virol*. – 1993. – Vol. 67, № 4. – P. 1761-1764.

72. Graef KM, Vreede FT, Lau YF, et al. The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon // *J Virol.* – 2010. – Vol. 84, № 17. – P. 8433-8445.
73. Naito T, Momose F, Kawaguchi A, et al. Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits // *J Virol.* – 2007. – Vol. 81, № 3. – P. 1339-1349.
74. Momose F, Naito T, Yano K, et al. Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 47. – P. 45306-45314.
75. Digard P, Blok VC, Inglis SC. Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes // *Virology.* – 1989. – Vol. 171, № 1. – P. 162-169.
76. Portela A, Zürcher T, Nieto A, et al. Replication of orthomyxoviruses // *Adv Virus Res.* – 1999. – Vol. 54, – P. 319-348.
77. Lin D, Lan J, Zhang Z. Structure and function of the NS1 protein of influenza A virus // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2007. – Vol. 39, № 3. – P. 155-162.
78. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response // *Science.* – 2012. – Vol. 337, № 6091. – P. 199-204.
79. Vasin AV, Temkina OA, Egorov VV, et al. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins // *Virus Res.* – 2014. – Vol. 185, – P. 53-63.
80. Firth AE, Jagger BW, Wise HM, et al. Ribosomal frameshifting used in influenza A virus expression occurs within the sequence UCC\_UUU\_CGU and is in the +1 direction // *Open Biol.* – 2012. – Vol. 2, № 10. – P. 120109.
81. Dubois J, Terrier O, Rosa-Calatrava M. Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less // *mBio.* – 2014. – Vol. 5, № 3. – P. e00070-e14.

82. Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, et al. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA // *J Virol.* – 2013. – Vol. 87, № 5. – P. 2455-2462.
83. Košík I, Práznovská M, Košíková M, et al. The ubiquitination of the influenza A virus PB1-F2 protein is crucial for its biological function // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. e0118477.
84. Varga ZT, Ramos I, Hai R, et al. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein // *PLoS Pathog.* – 2011. – Vol. 7, № 6. – P. e1002067.
85. Paules C, Subbarao K. Influenza // *Lancet.* – 2017. – Vol. 390, № 10095. – P. 697-708.
86. Zambon MC. Epidemiology and pathogenesis of influenza // *J Antimicrob Chemother.* – 1999. – Vol. 44, № B. – P. 3-9.
87. Tse H, To KK, Wen X, et al. Clinical and virological factors associated with viremia in pandemic influenza A/H1N1/2009 virus infection // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 9. – P. e22534.
88. Kaiser L, Briones MS, Hayden FG. Performance of virus isolation and Directigen Flu A to detect influenza A virus in experimental human infection // *J Clin Virol.* – 1999. – Vol. 14, № 3. – P. 191-197.
89. Iverson AR, Boyd KL, McAuley JL, et al. Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus* // *J Infect Dis.* – 2011. – Vol. 203, № 6. – P. 880-888.
90. Esposito S, Daleno C, Baldanti F, et al. Viral shedding in children infected by pandemic A/H1N1/2009 influenza virus // *Virology.* – 2011. – Vol. 8, – P. 349.
91. van der Vries E, Stittelaar KJ, van Amerongen G, et al. Prolonged influenza virus shedding and emergence of antiviral resistance in immunocompromised patients and ferrets // *PLoS Pathog.* – 2013. – Vol. 9, №5. – P. e1003343.
92. Zimmer SM, Burke DS. Historical perspective – Emergence of influenza A (H1N1) viruses // *N Engl J Med.* – 2009. – Vol. 361, № 3. – P. 279-285.

93. Gagnon A, Miller MS, Hallman SA, et al. Age-specific mortality during the 1918 influenza pandemic: unravelling the mystery of high young adult mortality // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. e69586.
94. Shieh WJ, Blau DM, Denison AM, et al. 2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States // *Am J Pathol*. – 2010. – Vol. 177, № 1. – P. 166-175.
95. Sheng ZM, Chertow DS, Ambroggio X, et al. Autopsy series of 68 cases dying before and during the 1918 influenza pandemic peak // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – Vol. 108, № 39. – P. 16416-16421.
96. Nicholson KG. Human influenza. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. *Textbook of Influenza*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. – 1998. – P.219–264.
97. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, et al. Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells // *J Immunol*. – 2007. – Vol. 178, № 6. – P. 3368-3372.
98. Nigg PE, Pavlovic J. Oligomerization and GTP-binding Requirements of MxA for Viral Target Recognition and Antiviral Activity against Influenza A Virus // *J Biol Chem*. – 2015. – Vol. 290, № 50. – P. 29893-29906.
99. Haller O, Staeheli P, Schwemmle M, et al. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity // *Trends Microbiol*. – 2015. – Vol. 23, № 3. – P. 154-163.
100. Xiao H, Killip MJ, Staeheli P, et al. The human interferon-induced MxA protein inhibits early stages of influenza A virus infection by retaining the incoming viral genome in the cytoplasm // *J Virol*. – 2013. – Vol. 87, № 23. P. 13053-13058.
101. Kristiansen H, Gad HH, Eskildsen-Larsen S, et al. The oligoadenylate synthetase family: an ancient protein family with multiple antiviral activities // *J Interferon Cytokine Res*. – 2011. – Vol. 31, № 1. – P. 41-47.

102. Pang IK, Pillai PS, Iwasaki A. Efficient influenza A virus replication in the respiratory tract requires signals from TLR7 and RIG-I // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. – Vol. 110, № 34. – P. 13910-13915.
103. Gao R, Bhatnagar J, Blau DM, et al. Cytokine and chemokine profiles in lung tissues from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1): role of the host immune response in pathogenesis // *Am J Pathol*. – 2013. – Vol. 183, № 4. – P. 1258-1268.
104. Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B // *Nature*. – 1990. – Vol. 344, № 6267. – P. 678-682.
105. Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, et al. Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection // *J Gen Virol*. – 2004. – Vol. 85, № 8. – P. 2347-2356.
106. Maelfait J, Roose K, Bogaert P, et al. A20 (Tnfrsf3) deficiency in myeloid cells protects against influenza A virus infection // *PLoS Pathog*. – 2012. – Vol. 8, № 3. – P. e1002570.
107. Sadler AJ, Williams BR. Structure and function of the protein kinase R // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2007. – Vol. 316, – P. 253-292.
108. Schulz O, Pichlmair A, Rehwinkel J, et al. Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity // *Cell Host Microbe*. – 2010. – Vol. 7, № 5. – P. 354-361.
109. Li S, Min JY, Krug RM, et al. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA // *Virology*. – 2006. – Vol. 349, № 1. – P. 13-21.
110. Kumar A, Haque J, Lacoste J, et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1994. – Vol. 91, № 14. – P. 6288-6292.
111. Sharma K, Tripathi S, Ranjan P, et al. Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 6. – P. e20215.

112. Wang X, Hinson ER, Cresswell P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts // *Cell Host Microbe*. – 2007. – Vol. 2, № 2. – P. 96-105.
113. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates // *Science*. – 2006. – Vol. 314, № 5801. – P. 997-1001.
114. Gack MU, Albrecht RA, Urano T, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I // *Cell Host Microbe*. – 2009. – Vol. 5, № 5. – P. 439-449.
115. Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, et al. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors // *J Virol*. – 2002. – Vol. 76, № 21. – P. 11166-11171.
116. Talon J, Horvath CM, Polley R, et al. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein // *J Virol*. – 2000. – Vol. 74, № 17. – P. 7989-7996.
117. Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, et al. IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein // *Cell Microbiol*. – 2007. – Vol. 9, № 4. – P. 930-938.
118. Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, et al. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs // *Mol Cell*. – 1998. – Vol. 1, № 7. – P. 991-1000.
119. Noah DL, Twu KY, Krug RM. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs // *Virology*. – 2003. – Vol. 307, № 2. – P. 386-395.
120. Wang P, Zheng M, Lau SY, et al. Generation of DelNS1 Influenza Viruses: a Strategy for Optimizing Live Attenuated Influenza Vaccines // *mBio*. – 2019. – Vol. 10, № 5. – P. e02180-19.

121. Pauli EK, Schmolke M, Wolff T, et al. Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 4, № 11. – P. e1000196.
122. Pothlichet J, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway // *J Immunol.* – 2008. – Vol. – 180, № 4. – P. 2034-2038.
123. George ST, Lai J, Ma J, et al. Neutrophils and Influenza: A Thin Line between Helpful and Harmful // *Vaccines (Basel).* – 2021. – Vol. 9, № 6. – P. 597.
124. Mol S, Hafkamp FMJ, Varela L, et al. Efficient Neutrophil Activation Requires Two Simultaneous Activating Stimuli // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 18. – P. 10106.
125. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity // *Nat Rev Immunol.* – 2011. – Vol. 11, № 8. – P. 519-531.
126. Hurst JK. What really happens in the neutrophil phagosome? // *Free Radic Biol Med.* – 2012. – Vol. 53, № 3. – P. 508-520.
127. Tate MD, Brooks AG, Reading PC. The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice // *Respir Res.* – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 57.
128. Tate MD, Deng YM, Jones JE, et al. Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 183, № 11. – P. 7441-7450.
129. Perrone LA, Plowden JK, García-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 4, № 8. – P. e1000115.
130. Tang BM, Shojaei M, Teoh S, et al. Neutrophils-related host factors associated with severe disease and fatality in patients with influenza infection // *Nat Commun.* – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 3422.

131. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis // *Am J Pathol.* – 2011. – Vol. 179, № 1. – P. 199-210.
132. Zemans RL, Colgan SP, Downey GP. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2009. – Vol. 40, № 5. – P. 519-535.
133. Schultz-Cherry S. Role of NK cells in influenza infection // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2015. – Vol. 386, – P. 109-120.
134. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy // *Front Immunol.* – 2017. – Vol. 8, – P. 1124.
135. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset // *Blood.* – 2001. – Vol. 97, № 10. – P. 3146-3151.
136. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells // *Annu Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 31, – P. 163-194.
137. Owen RE, Yamada E, Thompson CI, et al. Alterations in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 viruses are associated with reduced natural killer cell lysis of infected cells // *J Virol.* – 2007. – Vol. 81, № 20. – P. 11170-11178.
138. Mao H, Tu W, Liu Y, et al. Inhibition of human natural killer cell activity by influenza virions and hemagglutinin // *J Virol.* – 2010. – Vol. 84, № 9. – P. 4148-4157.
139. Mao H, Tu W, Qin G, et al. Influenza virus directly infects human natural killer cells and induces cell apoptosis // *J Virol.* – 2009. – Vol. 83, № 18. – P. 9215-9222.
140. Boliar S, Chambers TM. A new strategy of immune evasion by influenza A virus: inhibition of monocyte differentiation into dendritic cells // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2010. – Vol. 136, № 3-4. – P. 201-210.

141. Fernandez-Sesma A, Marukian S, Ebersole BJ, et al. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein // *J Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 13. – P. 6295-6304.
142. Holers VM. Complement and its receptors: new insights into human disease // *Annu Rev Immunol.* – 2014. – Vol. 32, – P. 433-459.
143. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation // *Front Immunol.* – 2015. – Vol. 6, – P. 262.
144. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis // *Nat Immunol.* – 2010. – Vol. 11, № 9. – P. 785-797.
145. Stoermer KA, Morrison TE. Complement and viral pathogenesis // *Virology.* – 2011. – Vol. 411, № 2. – P. 362-373.
146. van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. Macrophage complement receptors and pathogen clearance // *Cell Microbiol.* – 2007. – Vol. 9, № 9. – P. 2095-2102.
147. Zhang X, Kimura Y, Fang C, et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo // *Blood.* – 2007. – Vol. 110, № 1. – P. 228-236.
148. Черешнев В.А., Черешнева М.В. Иммунологические механизмы локального воспаления // *Медицинская иммунология.* – 2011. – Т. 13, № 6. – С. 557-568.
149. Zhang J, Li G, Liu X, et al. Influenza A virus M1 blocks the classical complement pathway through interacting with C1qA // *J Gen Virol.* – 2009. – Vol. 90, № 11. – P. 2751-2758.
150. Irina N. Zhilinskaya, Vladimir A. Marchenko, Evgeny P. Kharchenko. Mimicry between proteins of human and avian influenza viruses and host immune system proteins // *AIMS Allergy and Immunology.* – 2021. – Vol. 5, № 2. – P. 64-72.
151. Lee N, Wong CK, Hui DS, et al. Role of human Toll-like receptors in naturally occurring influenza A infections // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2013. – Vol. 7, № 5. – P. 666-675.

152. Lam WY, Yeung AC, Chu IM, et al. Profiles of cytokine and chemokine gene expression in human pulmonary epithelial cells induced by human and avian influenza viruses // *Virol J.* – 2010. – Vol. 7, – P. 344.
153. Hayden FG, Fritz R, Lobo MC, Alvord W, Strober W, Straus SE. Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense // *J Clin Invest.* – 1998. – Vol. 101, № 3. – P. 643-649.
154. Seo SH, Webster RG. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells // *J Virol.* – 2002. – Vol. 76, № 3. – P. 1071-1076.
155. Matikainen S, Sirén J, Tissari J, et al. Tumor necrosis factor alpha enhances influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression // *J Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 7. – P. 3515-3522.
156. Schmitz N, Kurrer M, Bachmann MF, et al. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. *J Virol.* – 2005. – Vol. 79, № 10. – P. 6441-6448.
157. Lauder SN, Jones E, Smart K, et al. Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology // *Eur J Immunol.* – 2013. – Vol. 43, № 10. – P. 2613-2625.
158. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – Vol. 14, № 5. – P. 315-328.
159. Aoyagi T, Newstead MW, Zeng X, et al. IL-36 receptor deletion attenuates lung injury and decreases mortality in murine influenza pneumonia // *Mucosal Immunol.* – 2017. – Vol. 10, № 4. – P. 1043-1055.
160. Lee N, Wong CK, Chan PK, et al. Cytokine response patterns in severe pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza among hospitalized adults // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 10. – P. e26050.
161. Liu Q, Zhou YH, Yang ZQ. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy // *Cell Mol Immunol.* – 2016. – Vol. 13, № 1. – P. 3-10.

162. Потапнев М.П. Цитокиновый шторм: причины и последствия // Иммунология. – 2021. – Т. 42, № 2. – С. 175–188.
163. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines // Chest. – 2000. – Vol. 118, № 2. – P. 503-508.
164. Carcillo J.A., Shakoory B. Cytokine storm and sepsis-induced multiple organ dysfunction syndrome. In: R.G. Cron, E.M. Behrens (eds). Cytokine Storm Syndrome. Cham: Springer. – 2019. – P. 451–64.
165. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, et al. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation // J Clin Invest. – 1996. – Vol. 97, № 2. – P. 493-500.
166. Ramsey C, Kumar A. H1N1: viral pneumonia as a cause of acute respiratory distress syndrome // Curr Opin Crit Care. – 2011. – Vol. 17, № 1. – P. 64-71.
167. Zhao J, Zhu M, Jiang H, et al. Combination of sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) agonist and antiviral drug: a potential therapy against pathogenic influenza virus // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 5272.
168. Chen X, Liu S, Goraya MU, Maarouf M, et al. Host Immune Response to Influenza A Virus Infection // Front Immunol. – 2018. – Vol. 9, – P. 320.
169. Saariaho AH, Vuorela A, Freitag TL, et al. Autoantibodies against ganglioside GM3 are associated with narcolepsy-cataplexy developing after Pandemrix vaccination against 2009 pandemic H1N1 type influenza virus // J Autoimmun. – 2015. – Vol. 63, – P. 68-75.
170. Стрельникова Е. А., Трушкина П. Ю., Суров И. Ю., и др. Эндотелий *in vivo* и *in vitro*. Часть 1: гистогенез, структура, цитофизиология и ключевые маркеры // Наука молодых – Eruditio Juvenium. – 2019. – Т. 7, № 3, – С. 450-465.
171. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms // Circ Res. – 2007. – Vol. 100, № 2. – P. 158-173.
172. D'Alessio A, Al-Lamki RS, Bradley JR, et al. Caveolae participate in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and internalization in a human endothelial cell line // Am J Pathol. – 2005. – Vol. 166, № 4. – P. 1273-1282.

173. Bouzin C, Brouet A, De Vriese J, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on the lymphocyte-endothelium interactions: identification of caveolin-1 and nitric oxide as control points of endothelial cell anergy // *J Immunol.* – 2007. – Vol. 178, № 3. – P. 1505-1511.
174. Dejana E, Orsenigo F, Molendini C, et al. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. – *Cell Tissue Res.* – 2009. – Vol. 335, № 1. – P. 17-25.
175. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) // *Curr Opin Hematol.* – 2016. – Vol. 23, № 3. – P. 253-259.
176. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood-brain barrier // *Neurobiol Dis.* – 2010. – Vol. 37, № 1. – P. 13-25.
177. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease // *Pharmacol Rev.* – 2005. – Vol. 57, № 2. – P. 173-185.
178. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability // *Physiol Rev.* – 2006. – Vol. 86, № 1. – P. 279-367.
179. Dejana E, Vestweber D. The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2013. – Vol. 116, – P. 119-144.
180. Dejana E, Giampietro C. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability // *Curr Opin Hematol.* – 2012. – Vol. 19, № 3. – P. 218-223.
181. Kalagara T, Moutsis T, Yang Y, et al. The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium // *Blood Adv.* – 2018. – Vol. 2, № 18. – P. 2347-2357.
182. McCormack JJ, Lopes da Silva M, Ferraro F, et al. Weibel-Palade bodies at a glance // *J Cell Sci.* – 2017. – Vol. 130, № 21. – P. 3611-3617.
183. Kibria G, Heath D, Smith P, Biggar R. Pulmonary endothelial pavement patterns // *Thorax.* – 1980. – Vol. 35, № 3. – P. 186-191.
184. Passerini AG, Polacek DC, Shi C, et al. Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the

- adult porcine aorta // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – Vol. 101, № 8. – P. 2482-2487.
185. Lupu C, Westmuckett AD, Peer G, et al. Tissue factor-dependent coagulation is preferentially up-regulated within arterial branching areas in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis // *Am J Pathol.* – 2005. – Vol. 167, № 4. – P. 1161-1172.
186. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium // *Handb Exp Pharmacol.* – 2006. – Vol. 176, № 1. – P. 1-40.
187. Gimbrone M.A. Vascular endothelium: nature's blood container. In: Gimbrone M.A., editor. *Vascular endothelium in hemostasis and thrombosis.* Churchill Livingstone; New York, NY, USA. – 1986. – P. 1-13.
188. Каде А.Х., Занин С.А., Губарева Е.А., и др. Физиологические функции сосудистого эндотелия // *Фундаментальные исследования.* – 2011. – Т. 11, № 3. – С. 611-617.
189. Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, et al. The endothelium and its role in regulating vascular tone // *Open Cardiovasc Med J.* – 2010. – Vol. 4, – P. 302-312.
190. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man // *Lancet.* – 1989. – Vol. 334, № 8670, – P. 997-1000.
191. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium // *Lancet.* – 1987. – Vol. 330, № 8567. – P. 1057-1058.
192. Vallance P. Nitric oxide in the human cardiovascular system – SKB lecture 1997 // *Br J Clin Pharmacol.* – 1998. – Vol. 45, № 5. – P. 433-439.
193. Barbato JE, Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease // *J Vasc Surg.* – 2004. – Vol. 40, № 1. – P. 187-193.
194. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function // *Prog Neurobiol.* – 2001. – Vol. 64, № 1. – P. 51-68.
195. Xue Q, Yan Y, Zhang R, et al. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 12. – P. 3805.

196. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1992. – Vol. 89, № 14. – P. 6348-6352.
197. Balligand JL, Kobzik L, Han X, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes // *J Biol Chem*. – 1995. – Vol. 270, № 24. – P. 14582-14586.
198. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, et al. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology // *Cell Mol Life Sci*. – 1999. – Vol. 55, № 8-9. – P. 1078-1087.
199. Werner ER, Gorren AC, Heller R, et al. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects // *Exp Biol Med (Maywood)*. – 2003. – Vol. 228, № 11. – P. 1291-1302.
200. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1993. – Vol. 90, № 22. – P. 10769-10772.
201. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases // *Cancer Metastasis Rev*. – 1998. – Vol. 17, № 1. – P. 7-23.
202. Воробьев Р.И., Шумахер Г.И., Хорева М.А., и др. Роль кавеол и кавеолинов в норме и патологии // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2008. – Т. 7, № 8. – С. 105-111.
203. Mineo C, Shaul PW. Regulation of eNOS in caveolae // *Adv Exp Med Biol*. – 2012. – Vol. 729, – P. 51-62.
204. Wu KK. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression // *Ann N Y Acad Sci*. – 2002. – Vol. 962, – P. 122-130.
205. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine // *Nature*. – 1988. – Vol. 333, № 6174. – P. 664-666.
206. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary

- artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1986. – Vol. 237, № 3. – P. 893-900.
207. Jones KA, Wong GY, Jankowski CJ, et al. cGMP modulation of Ca<sup>2+</sup> sensitivity in airway smooth muscle // *Am J Physiol.* – 1999. – Vol. 276, № 1. – P. L35-L40.
208. Collins P, Griffith TM, Henderson AH, et al. Endothelium-derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: a cyclic guanosine monophosphate-mediated effect // *J Physiol.* – 1986. – Vol. 381, – P. 427-437.
209. Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, et al. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells // *Mol Pharmacol.* – 1991. – Vol. 40, № 6. – P. 923-931.
210. Cella G, Bellotto F, Tona F, et al. Plasma markers of endothelial dysfunction in pulmonary hypertension // *Chest.* – 2001. – Vol. 120, № 4. – P. 1226-1230.
211. Dimitrow PP. Coronary endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Chest.* – 2002. – Vol. 121, № 4. – P. 1374-1375.
212. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome // *Blood.* – 2003. – Vol. 101, № 10. – P. 3765-3777.
213. Ruschitzka F, Shaw S, Gygi D, et al. Endothelial dysfunction in acute renal failure: role of circulating and tissue endothelin-1 // *J Am Soc Nephrol.* – 1999. – Vol. 10, № 5. – P. 953-962.
214. Blum A, Simsolo C. The antiphospholipid syndrome and endothelial function // *Isr Med Assoc J.* – 2004. – Vol. 6, № 9. – P. 556-558.
215. Yavuz D, Deyneli O, Akpinar I, et al. Endothelial function, insulin sensitivity and inflammatory markers in hyperprolactinemic pre-menopausal women // *Eur J Endocrinol.* – 2003. – Vol. 149, № 3. – P. 187-193.
216. Beverelli F, Béa ML, Puybasset L, et al. Chronic inhibition of NO synthase enhances the production of prostacyclin in coronary arteries through upregulation of the cyclooxygenase type 1 isoform // *Fundam Clin Pharmacol.* – 1997. – Vol. 11, № 3. – P. 252-259.

217. Ozkor MA, Quyyumi AA. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function // *Cardiol Res Pract.* – 2011. – Vol. 2011, – P. 156146.
218. Bunting S, Moncada S, Vane JR. The prostacyclin – thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications // *Br Med Bull.* – 1983. – Vol. 39, № 3. – P. 271-276.
219. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists // *Am J Cardiol.* – 1991. – Vol. 68, № 7. – P. 11B-15B.
220. Alexander RW, Griendling KK. Signal transduction in vascular smooth muscle // *J Hypertens Suppl.* – 1996 – Vol. 14, № 5. – P. S51-S54.
221. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology // *Pharmacol Ther.* – 2008. – Vol. 118, № 1. – P. 18-35.
222. Васина Л.В., Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 4-15.
223. Kowalczyk A, Kleniewska P, Kolodziejczyk M, et al. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* – 2015. – Vol. 63, № 1. – P. 41-52.
224. Балуда В. П., Балуда М. В., Деянов И. И. и др. Физиология системы гемостаза. М, – 1995, – С. 265.
225. Локтионова И. Л., Покровский М. В., Рагулина В. А. и др. Состояние функции сосудистого эндотелия при инфекционной патологии различной этиологии // *Актуальные проблемы медицины.* – 2012. – №4, № 123, С. 20-31.
226. Бабичев А. В. Роль эндотелия в механизмах гемостаза // *Педиатр.* – 2013. – Т. 4, № 1, – С. 122-127.
227. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis // *Br J Haematol.* – 2005. – Vol. 129, № 3. – P. 307-321.

228. Beqaj S, Shah AM, Ryan JM. Identification of cells responsible for urokinase-type plasminogen activator synthesis and secretion in human diploid kidney cell cultures // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2004. – Vol. 40, № 3-4. – P. 102-107.
229. Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin // *J Thromb Haemost.* – 2003. – Vol. 1, № 7. – P. 1515-1524.
230. Nightingale T, Cutler D. The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story // *J Thromb Haemost.* – 2013. – Vol. 11, № Suppl 1, – P. 192-201.
231. Жалялов А.С., Баландина А.Н., Купраш А.Д. и др. Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* –2017. – Т. 16, № 1. – С. 69-82.
232. Hekman CM, Loskutoff DJ. Bovine plasminogen activator inhibitor 1: specificity determinations and comparison of the active, latent, and guanidine-activated forms // *Biochemistry.* – 1988. – Vol. 27, № 8. – P. 2911-2918.
233. Cale JM, Lawrence DA. Structure-function relationships of plasminogen activator inhibitor-1 and its potential as a therapeutic agent // *Curr Drug Targets.* – 2007. – Vol. 8, № 9. – P. 971-981.
234. Mottonen J, Strand A, Symersky J, et al. Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1 // *Nature.* – 1992. – Vol. 355, № 6357. – P. 270-273.
235. Declerck PJ, De Mol M, Alessi MC, et al. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin) // *J Biol Chem.* – 1988. – Vol. 263, № 30. – P. 15454-15461.
236. Egelund R, Rodenburg KW, Andreasen PA, et al. An ester bond linking a fragment of a serine proteinase to its serpin inhibitor // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 37, № 18. – P. 6375-6379.

237. Lawrence DA, Ginsburg D, Day DE, et al. Serpin-protease complexes are trapped as stable acyl-enzyme intermediates // *J Biol Chem.* – 1995. – Vol. 270, № 43. – P. 25309-25312.
238. Danø K, Andreasen PA, Grøndahl-Hansen J, et al. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer // *Adv Cancer Res.* – 1985. – Vol. 44, – P. 139-266.
239. Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system // *J Clin Invest.* – 1991. – Vol. 88, № 4. – P. 1067-1072.
240. Birch KA, Ewenstein BM, Golan DE, et al Prolonged peak elevations in cytoplasmic free calcium ions, derived from intracellular stores, correlate with the extent of thrombin-stimulated exocytosis in single human umbilical vein endothelial cells // *J Cell Physiol.* – 1994. – Vol. 160, № 3. – P. 545-554.
241. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1984. – Vol. 81, № 11. – P. :3534-3538.
242. Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, et al. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils // *J Cell Biol.* – 1991. – Vol. 115, № 1. – P. 223-234.
243. Rose ML. Endothelial cells as antigen-presenting cells: role in human transplant rejection // *Cell Mol Life Sci.* – 1998. – Vol. 54, № 9. – P. 965-978.
244. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction // *J Am Soc Nephrol.* – 2004. – Vol. 15, № 8. – P. 1983-1992.
245. Abe Y, Smith CW, Katkin JP, et al. Endothelial alpha 2,6-linked sialic acid inhibits VCAM-1-dependent adhesion under flow conditions // *J Immunol.* – 1999. – Vol. 163, № 5. – P. 2867-2876.
246. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets // *Blood.* – 1999. – Vol. 93, № 11. – P. 3831-3838.

247. Sumikoshi M, Hashimoto K, Kawasaki Y, et al. Human influenza virus infection and apoptosis induction in human vascular endothelial cells // *J Med Virol.* – 2008. – Vol. 80, № 6. – P. 1072-1078.
248. Petrache I, Birukova A, Ramirez SI, et al. The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2003. – Vol. 28, №5. – P. 574-581.
249. Wang S, Le TQ, Kurihara N, et al. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza // *J Infect Dis.* – 2010. – Vol. 202, № 7. – P. 991-1001.
250. Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function // *Tissue Barriers.* – 2015. – Vol. 3, № 1-2. – P. e978720.
251. Antoniak S, Mackman N. Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection // *Blood.* – 2014. – Vol. 123, № 17. – P. 2605-2613.
252. Visseren FL, Bouwman JJ, Bouter KP, et al. Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses // *Thromb Haemost.* – 2000. – Vol. 84, № 2. – P. 319-324.
253. Marsden PA. Inflammation and coagulation in the cardiovascular system: the contribution of influenza // *Circ Res.* – 2006. – Vol. 99, № 11. – P. 1152-1153.
254. Shibamiya A, Hersemeyer K, Schmidt Wöll T, et al. A key role for Toll-like receptor-3 in disrupting the hemostasis balance on endothelial cells // *Blood.* – 2009. – Vol. 113, № 3. – P. 714-722.
255. Bouwman JJ, Visseren FL, Bosch MC, et al. Procoagulant and inflammatory response of virus-infected monocytes // *Eur J Clin Invest.* – 2002. – Vol. 32, № 10. – P. 759-766.
256. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation // *Thromb Haemost.* – 2002. – Vol. 88, № 2. – P. 186-193.
257. Levi M, Sivapalaratnam S. Disseminated intravascular coagulation: an update on pathogenesis and diagnosis // *Expert Rev Hematol.* – 2018. – Vol. 11, № 8. – P. 663-672.

258. Papageorgiou C, Jourdi G, Adjambri E, et al. Disseminated Intravascular Coagulation: An Update on Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutic Strategies // *Clin Appl Thromb Hemost.* – 2018. – Vol. 24, № 9. – P. 8S-28S.
259. LeBouder F, Morello E, Rimmelzwaan GF, et al. Annexin II incorporated into influenza virus particles supports virus replication by converting plasminogen into plasmin // *J Virol.* – 2008. – Vol. 82, № 14. – P. 6820-6828.
260. Visseren FL, Verkerk MS, Bouter KP, et al. Interleukin-6 production by endothelial cells after infection with influenza virus and cytomegalovirus // *J Lab Clin Med.* – 1999. – Vol. 134, № 6. – P. 623-630.
261. Watanabe R, Wada H, Miura Y, et al. Plasma levels of total plasminogen activator inhibitor-I (PAI-I) and tPA/PAI-1 complex in patients with disseminated intravascular coagulation and thrombotic thrombocytopenic purpura // *Clin Appl Thromb Hemost.* – 2001. – Vol. 7, № 3. – P. 229-233.
262. Armstrong SM, Darwish I, Lee WL. Endothelial activation and dysfunction in the pathogenesis of influenza A virus infection // *Virulence.* – 2013. – Vol. 4, № 6. – P. 537-542.
263. Akiyama R, Komori I, Hiramoto R, Isonishi A, Matsumoto M, Fujimura Y. H1N1 influenza (swine flu)-associated thrombotic microangiopathy with a markedly high plasma ratio of von Willebrand factor to ADAMTS13 // *Intern Med.* – 2011. – Vol. 50, № 6. – P. 643-647.
264. Armstrong SM, Wang C, Tigdi J, et al. Influenza infects lung microvascular endothelium leading to microvascular leak: role of apoptosis and claudin-5 // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. e47323.
265. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, et al. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects // *Semin Cell Dev Biol.* – 2015. – Vol. 38, – P. 16-25.
266. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin // *Nat Cell Biol.* – 2006. – Vol. 8, № 11. – P. 1223-1234.

267. Naz F, Arish M. Battling COVID-19 Pandemic: Sphingosine-1-Phosphate Analogs as an Adjunctive Therapy? // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11, – P. 1102.
268. Herdson PB. Some newer concepts of the fine structure of normal and diseased blood vessels // *Med Clin North Am.* – 1967. – Vol. 51, № 1. – P. 139-150.
269. Frencii J. E. The structure and function of the blood vessel wall. In: *Vascular Factors und Thrombosis.* (Ed. K. M. Brinkhous). – 1970, – P. 11-22.
270. Hadley G. Basic Histology // *J Anat.* – 2007. – Vol. 211, № 3. – P. 412-413.
271. Campbell GR, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis // *Exp Mol Pathol.* – 1985. – Vol. 42, № 2. – P. 139-162.
272. Rhodin J. A. G. (1984) The cardiovascular system. In: *HandBook of Physiology,* Vol. 4. (Eds S. R. Geiger, E. M. Renkin & C. C. Michel). – 1984. – P. 7-10.
273. Herrmann J, Lerman A. The endothelium - the cardiovascular health barometer // *Herz.* – 2008. – Vol. 33, № 5. – P. 343-353.
274. Tennant M, McGeachie JK. Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances // *Aust N Z J Surg.* – 1990. – Vol. 60, № 10. – P. 747-753.
275. Smeeth L, Cook C, Thomas S, et al. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting // *Lancet.* – 2006. – Vol. 367, № 9516. – P. 1075-1079.
276. Corrales-Medina VF, Madjid M, Musher DM. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes // *Lancet Infect Dis.* – 2010. – Vol. 10, № 2. – P. 83-92.
277. Drexler H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans // *Cardiovasc Res.* – 1999. – Vol. 43, № 3. – P. 572-579.
278. Ludwig A, Lucero-Obusan C, Schirmer P, Winston C, Holodniy M. Acute cardiac injury events  $\leq 30$  days after laboratory-confirmed influenza virus infection among U.S. veterans, 2010-2012 // *BMC Cardiovasc Disord.* – 2015. – Vol. 15, – P. 109.

279. Kwong JC, Schwartz KL, Campitelli MA, et al. Acute Myocardial Infarction after Laboratory-Confirmed Influenza Infection // *N Engl J Med.* – 2018. – Vol. 378, № 4. – P. 345-353.
280. Barnes M, Heywood AE, Mahimbo A, et al. Acute myocardial infarction and influenza: a meta-analysis of case-control studies // *Heart.* – 2015. – Vol. 101, № 21. – P. 1738-1747.
281. Fagnoul D, Pasquier P, Bodson L, et al. Myocardial dysfunction during H1N1 influenza infection // *J Crit Care.* – 2013. – Vol. 28, № 4. – P. 321-327.
282. Tseng GS, Hsieh CY, Hsu CT, et al. Myopericarditis and exertional rhabdomyolysis following an influenza A (H3N2) infection // *BMC Infect Dis.* – 2013. – Vol. 13, – P. 283.
283. Lobo ML, Taguchi Â, Gaspar HA, et al. Fulminant myocarditis associated with the H1N1 influenza virus: case report and literature review // *Rev Bras Ter Intensiva.* – 2014. – Vol. 26, № 3. – P. 321-326.
284. Lubrano V, Balzan S. Roles of LOX-1 in microvascular dysfunction // *Microvasc Res.* – 2016. – Vol. 105, – P. 132-140.
285. Kwok CS, Aslam S, Kontopantelis E, et al. Influenza, influenza-like symptoms and their association with cardiovascular risks: a systematic review and meta-analysis of observational studies // *Int J Clin Pract.* – 2015. – Vol. 69, № 9. – P. 928-937.
286. Elkind MS, Sciacca RR, Boden-Albala B, et al. Leukocyte count is associated with reduced endothelial reactivity // *Atherosclerosis.* – 2005. Vol. 181, № 2. – P. 329-338.
287. Baral N, Adhikari P, Adhikari G, et al. Influenza Myocarditis: A Literature Review // *Cureus.* – 2020. – Vol. 12, № 12. – P. e12007.
288. Pan HY, Yamada H, Chida J, et al. Up-regulation of ectopic trypsin in the myocardium by influenza A virus infection triggers acute myocarditis // *Cardiovasc Res.* – 2011. – Vol. 89, № 3.. – P. 595-603.

289. Rosário HS, Waldo SW, Becker SA, et al. Pancreatic trypsin increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemia-reperfusion in the rat // *Am J Pathol.* – 2004. – Vol. 164, № 5. – P. 1707-1716.
290. Tatsumi T, Akashi K, Keira N, et al. Cytokine-induced nitric oxide inhibits mitochondrial energy production and induces myocardial dysfunction in endotoxin-treated rat hearts // *J Mol Cell Cardiol.* – 2004. – Vol. 37, № 3. – P. 775-784.
291. Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, et al. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x // *Circ Res.* – 1999. – Vol. 84, № 1. – P. 21-33.
292. Westermann D, Savvatis K, Schultheiss HP, et al. Immunomodulation and matrix metalloproteinases in viral myocarditis // *J Mol Cell Cardiol.* – 2010. – Vol. 48, № 3. – P. 468-473.
293. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2003. – Vol. 23, № 12. – P. 2146-2154.
294. Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment // *World J Cardiol.* – 2015. – Vol. 7, № 11. – P. 719-741.
295. Latreille E, Lee WL. Interactions of Influenza and SARS-CoV-2 with the Lung Endothelium: Similarities, Differences, and Implications for Therapy // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 161.
296. Шуйкова К. В., Емелина Е. И., Гендлин Г. Е., и др. Кардиотоксичность современных химиотерапевтических препаратов // *Атмосфера. Новости кардиологии.* – 2012. – Т. 3, – С. 9-19.
297. Robert J. Preclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory animals: predictiveness and pitfalls // *Cell Biol Toxicol.* – 2007. – Vol. 23, № 1. – P. 27-37.
298. Марков Х.М. Сосудистые эффекты липопротеинов и оксид азота: клеточные и молекулярные механизмы // *Патолог. физиология и эксперим. терапия.* – 2006. – № 3. – С. 2-7.

299. Marchenko V, Zelinskaya I, Toropova Y, et al. Influenza A Virus Causes Histopathological Changes and Impairment in Functional Activity of Blood Vessels in Different Vascular Beds // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 2. – P. 396.
300. Ibanes JD, Morgan KT, Burleson GR. Histopathological changes in the upper respiratory tract of F344 rats following infection with a rat-adapted influenza virus // *Vet Pathol*. – 1996. – Vol. 33, №4. – P. 412-418.
301. Daniels MJ, Selgrade MK, Doerfler D, et al. Kinetic profile of influenza virus infection in three rat strains // *Comp Med*. – 2003. – Vol. 53, № 3. – P. 293-298.
302. Daiber A, Xia N, Steven S, et al. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease // *Int J Mol Sci*. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 187.
303. Garoufalis E, Kwan I, Lin R, et al. Viral induction of the human beta interferon promoter: modulation of transcription by NF-kappa B/rel proteins and interferon regulatory factors // *J Virol*. – 1994. – Vol. 68, № 8. – P. 4707-4715.
304. Pritchard KA Jr, Ackerman AW, Gross ER, et al. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276, № 21. – P. 17621-17624.
305. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // *Pharmacol Rev*. – 1991. – Vol. 43, № 2. – P. 109-142.
306. Natarajan M, Konopinski R, Krishnan M, et al. Inhibitor- $\kappa$ B kinase attenuates Hsp90-dependent endothelial nitric oxide synthase function in vascular endothelial cells // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2015. – Vol. 308, № 8. – P. C673-C683.
307. Wada H, Nobori T, Watanabe R, et al. Plasma Levels of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) and Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) in Patients with Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) // *Turk J Haematol*. – 2002. – Vol. 19, № 2. – P. 235-237.
308. Keller TT, van der Sluijs KF, de Kruif MD, et al. Effects on coagulation and fibrinolysis induced by influenza in mice with a reduced capacity to generate

- activated protein C and a deficiency in plasminogen activator inhibitor type 1 // *Circ Res.* – 2006. – Vol. 99, № 11. – P. 1261-1269.
309. Hara K, Shiota M, Kido H, Watanabe K, Nagata K, Toyoda T. Inhibition of the protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit by viral matrix protein // *Microbiol Immunol.* – 2003. – Vol. 47, № 7. – P. 521-526.
310. Koul PA, Khan UH, Wani AA, et al. Comparison and agreement between venous and arterial gas analysis in cardiopulmonary patients in Kashmir valley of the Indian subcontinent // *Ann Thorac Med.* – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. 33-37.
311. Chaulin AM, Abashina OE, Duplyakov DV. Pathophysiological mechanisms of cardiotoxicity in chemotherapeutic agents // *Russian Open Medical Journal.* – 2020. – Vol. 9, – P. e0305.
312. Kong CY, Guo Z, Song P, et al. Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death // *Int J Biol Sci.* – 2022. – Vol. 18, № 2. – P. 760-770.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает свою искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук Жилинской Ирине Николаевне за предложенную интересную тему диссертации, а также за неоценимый вклад не только в исполнении данной работы на всех этапах, но и в формировании автора как специалиста, за личный пример, придающего сил в непростых ситуациях.

Автор выражает огромную признательность сотрудникам ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»: Войцеховской Е.М., к.м.н. Вакину В.С., к.б.н. Амосовой И.В., к.б.н. Грудинину М.П., к.б.н. Кузнецовой Е.В., к.б.н. Сорокину Е.В., к.б.н. Писаревой М.М., д.б.н. Кривицкой В.З. за консультативную и практическую помощь, оказанную в ходе выполнения исследований.

Автор также выражает отдельную благодарность сотрудникам ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» – Зелинской И.А., к.м.н. Тороповой Я.Г. за помощь в исследовании вазомоторной функции кровеносных сосудов и Подъячевой Е.Ю. за помощь в моделировании острой кардиомиопатии.