

ВЛИЯНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ НА ОТЯГОЩЕНИЕ ВИРУС-АССОЦИИРОВАННОГО ОПЛ/ОРДС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА И ИММУНОСУПРЕССИИ

THE EFFECT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS ON VIRUS-ASSOCIATED ALI/ARDS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS AND IMMUNOSUPPRESSION

**A. Aleksandrov
T. Savateeva-Lyubimova**

Summary. In this article we study the effect of advanced glycation end products on virus-associated acute lung injury (ALI) in animals with associated premorbid pathology such as alloxan-induced diabetes mellitus (AIDS) and methotrexate-induced immunosuppression (MIS). The mouse-adapted pandemic influenza virus A/California/7/09MA (H1N1) pdm09 was used for modeling viral infection at a dose of LD50. The severity of ALI was assessed by the level of saturation index and morphological changes in lungs. Level of AGEs was measured in the supernatant of lung homogenates by fluorescence. AGEs showed significant role on virus-induced ALI associated with AIDS, but not with MIS. Obtained results may be relevant for developing new ways of relieving virus-associated ALI with associated premorbid pathology various pathogenesis.

Keywords: advanced glycation end products, acute lung damage, flu, diabetes mellitus, immunosuppression.

Александров Андрей Георгиевич

Аспирант, ФГБУ «НИИ группа им. А. А. Смородинцева»
Минздрава России, Санкт-Петербург
forphchemistry@gmail.com

Саватеева-Любимова Татьяна Николаевна

Д.м.н., профессор, в.н.с., ФГБУ «НИИ группа
им. А. А. Смородинцева» Минздрава России,
Санкт-Петербург
drug_safety@mail.ru

Аннотация. В статье представлены данные по изучению влияния конечных продуктов гликирования на течение вирус-ассоциированного острого повреждения лёгких (ОПЛ) у животных с преморбидной патологией в виде аллоксан-индуцированного сахарного диабета (АИСД) и метотрексат-индуцированной иммуносупрессии (МИИС). Моделирование вирус-ассоциированного ОПЛ осуществляли путём интраназального введения вируса гриппа штамма A/California/7/09MA в дозе LD50. Оценку тяжести течения ОПЛ проводили по уровню сатурации гемоглобина крови кислородом и патоморфологическим изменениям в лёгких. Содержание КПГ определяли в супернатанте гомогенатов лёгких по уровню флуоресценции. Проведённое исследование показало значимую роль конечных продуктов гликирования в отягощении течения ОПЛ на фоне АИСД, но не на фоне МИИС. Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых подходов к коррекции вирус-ассоциированного ОПЛ с учётом особенностей патогенетических звеньев сопутствующих заболеваний.

Ключевые слова: конечные продукты гликирования, острое повреждение легких, грипп, сахарный диабет, иммуносупрессия.

Введение

Известно, что в период эпидемии гриппа количество пациентов с тяжёлыми осложнениями резко возрастает, а применение этио- и патогенетической терапии не всегда является достаточным [1; 2]. Так, одним из осложнений гриппозной инфекции является острое повреждение лёгких (ОПЛ) и его отягощённая форма — острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС). По данным клинических исследований у больных с ОПЛ/ОРДС, получавших комплексную терапию, частота летального исхода доходила до 40% [3; 4; 5]. Прогрессирующее развитие дыхательной недостаточности у данной категории больных влияет на ряд обменных процессов, в том числе нарушая процесс кислородзави-

симого окислительного фосфорилирования, в котором глюкоза распадается до воды и углекислого газа. В результате возрастает доля анаэробной (неферментативной) утилизации глюкозы, приводящей к образованию конечных продуктов гликирования (КПГ). Последние играют значительную роль в отягощении течения ОПЛ/ОРДС, потенцируя воспалительные процессы и участвуя в непосредственном повреждении клеточной стенки эпителиоцитов респираторного тракта [6; 7]. Негативная роль чрезмерного накопления КПГ отмечена и в патогенезе осложнений широкого спектра заболеваний, в том числе, являющихся крайне неблагоприятным преморбидным фоном при гриппозной инфекции [8; 9; 10]. В связи с этим, представлялось актуальным изучение влияния КПГ на степень тяжести поражения лёгких у за-

раженных мышей при наличии преморбидной патологии различного генеза.

Целью данной работы явилось изучение вклада КПП в отягощение течения вирус-ассоциированного ОПЛУ животных с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом (АИСД) в сравнении с животными, у которых преморбидной патологией являлась метотрексат-индуцированная иммуносупрессия (МИИС).

Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на беспородных мышах самках (n=115), полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАН (Ленинградская область). Все манипуляции осуществлялись в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (Rus-LASA, 2012).

Вирус-ассоциированное ОПЛ моделировали путем интраназального введения штамма вируса гриппа A/California/7/09MA (H1N1) pdm09 в дозе, равной LD50 (10–3,4 в десятикратном разведении), определенной в предварительных экспериментах по методике Рида-Менча [11]. Штамм вируса гриппа A/California/7/09MA (H1N1) pdm09 был получен из рабочей коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России. Вирусную природу ОПЛ подтверждали постановкой реакции гемагглютинации по образованию характерного «зонтика» в смеси [12].

С целью создания у животных АИСД аллоксан моногидрат (Sigma-Aldrich, США) вводили в дозе 180 мг/кг подкожно однократно, предварительно определив уровень глюкозы в крови, забранной из буккального синуса. Концентрацию глюкозы определяли потенциометрически с помощью глюкометра (Германия). Через 10 дней у животных определяли уровень глюкозы в крови повторно. Критерием включения животных в эксперимент являлось увеличение концентрации глюкозы в 2,5 раза и выше по отношению к фоновым показателям [13]. Формирование МИИС вызывали введением метотрексата (Эбеве Фарма, Австрия) в дозе 1,25 мг/кг внутривенно один раз в 3 дня в течение 3-х недель [14].

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы: группа № 1 — интактные животные (n=15); группа № 2 — инфицированные мыши, получавшие 0,9% NaCl (n=40); группа № 3 — инфицированные мыши с преморбидным фоном в виде АИСД (n=60); группа № 4 — инфицированные мыши с преморбидным фоном в виде МИИС (n=60).

Животные из 2-й, 3-ей и 4-й группы были разделены на равные подгруппы. В первых подгруппах оценивали уровень летальности. Во вторых подгруппах часть животных подвергали плановой эвтаназии на 4-е и 7-е сутки после инфицирования с целью забора биоматериала. Оценку уровня сатурации гемоглобина крови кислородом проводили по методике Джонкинса [15]. Оценку оптической плотности растворов гемоглобина осуществляли на приборе АБхФк-02-«НПП-ТМ» (Россия). Концентрацию КПП определяли путём оценки уровня флуоресценции супернатанта гомогената лёгких при длинах волн: $\lambda_{ex}=360$ нм, $\lambda_{em}=440$ нм на флуоресцентном модуле прибора CLARIOstar (Германия) [16].

Лёгких животных после плановой эвтаназии, фиксировали в 10% формалине (pH=7,4), срезы окрашивали гематоксилин-эозином [17]. Степень поражения лёгких была оценена по методике, предложенной American Thoracic Society [18].

Оценку статистической значимости различий проводили при помощи программы Graphpad Prism 8. Для регистрируемых количественных параметров рассчитывали показатели описательной статистики, включавшие в себя среднее арифметическое значение параметра в группе (Mean), стандартное отклонение параметра (Std.Dev., SD), стандартную ошибку среднего (Std.Err., SE), 25-й и 75-й процентиля. Для оценки различий между выборками применяли тесты Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни. Представленные в таблицах и на рисунках данные указаны в виде среднего арифметического и его ошибки (Mean±SE). Динамика выживаемости представлена на кривых Каплана–Мейера, достоверность различий вычисляли с помощью критерия Мантела–Кокса. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Корреляционный анализ проведен при помощи теста ранговой корреляции Спирмена [19, 20].

Результаты и обсуждение

Гибель опытных животных происходила в период с 7-го по 13-й день после инфицирования. Общая летальность в период наблюдения у животных с АИСД и МИИС составила 70%, что было несколько выше, чем у мышей, получавших 0,9% раствор NaCl (50%). Значимых межгрупповых различий выявлено не было.

Оценка уровня КПП по величине флуоресценции в супернатанте лёгких у животных из всех опытных групп продемонстрировала прогрессивный характер их накопления в течение эксперимента. Максимальное увеличение уровня КПП на обоих сроках регистрации было отмечено у животных с АИСД. При этом межгрупповые различия носили значимый характер ($p=0,0317$) на 4-е сутки течения инфекционного процесса. Оценка величины сатурации ге-

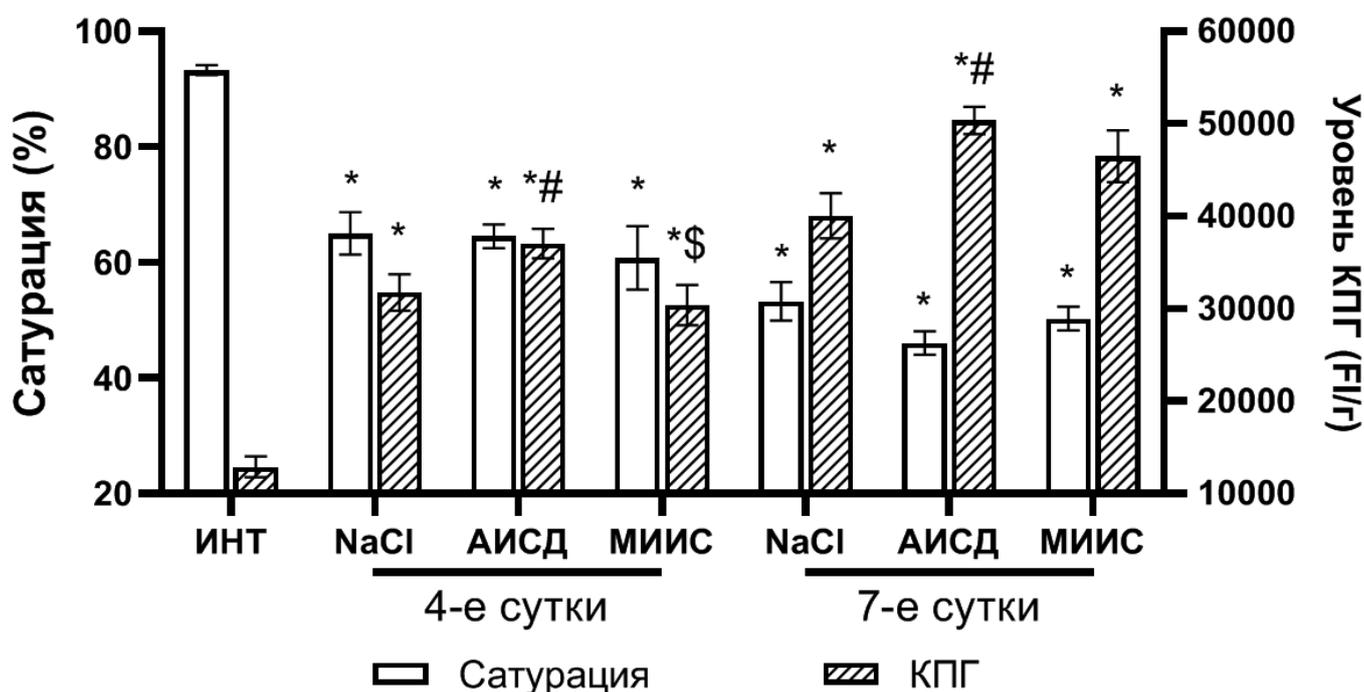


Рис. 1. Динамика изменения уровня сатурации гемоглобина крови кислородом (%) и концентрации КПГ в ткани лёгких по уровню флуоресценции(FI/g).

* – $p \leq 0,05$ по отношению к группе № 1; # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе № 2; \$ – $p \leq 0,05$ по отношению к группе № 3. Сравнения приведены внутри своего временного отрезка.

ИНТ — интактные мыши (группа № 1, $n=15$); NaCl — инфицированные мыши без преморбидной патологии (группа № 2, $n=40$); АИСД — инфицированные мыши с АИСД (группа № 3, $n=60$); МИИС — инфицированные мыши с МИИС (группа № 4, $n=60$).

моглобина крови кислородом у всех инфицированных животных показала прогрессирующее падение уровня данного показателя в процессе развития ОПЛ. Максимально выраженный характер нарушения легочного газообмена был отмечен на 7-е сутки эксперимента у мышей с АИСД.

Данные представлены на рисунке № 1.

Патоморфологическое исследование показало наличие кровоизлияний в лёгких у животных из всех опытных групп, площадь которых прогрессивно увеличивалась с 4-х по 7-е сутки после инфицирования. Гистологическое исследование выявило рост клеточных инфильтратов и отёчных проявлений в лёгочной паренхиме. Наблюдалось полнокровие сосудов, альтерация альвеолоцитов, сопровождавшаяся десквамацией клеток, оголением базальной мембраны, скоплением дебриса в альвеолярном пространстве. При этом наблюдаемые изменения у мышей с АИСД на 4-е сутки были более выражены, чем у мышей с МИИС.

Полуколичественная оценка поражения лёгочной паренхимы показала рост повреждения лёгких мышей

с преморбидной патологией на 4-е и 7 сутки после инфицирования по отношению к животным, получавшим плацебо. При этом у мышей с АИСД данный рост носил значимый характер, как на 4-е, так и 7-е сутки, в то время как у мышей с МИИС данные различия носили характер тенденции. В свою очередь у мышей с экспериментальным сахарным диабетом рост повреждения лёгких на 4-е сутки значимо превышал таковой у мышей с экспериментальной иммуносупрессией. Поражений в лёгких интактных животных не наблюдали ($0,03 \pm 0,00$ балла при полуколичественной оценке). Данные приведены в таблице 1.

Проведённый корреляционный анализ выявил различия во взаимосвязи между степенью поражения лёгких и уровнем КПГ у животных с различной преморбидной патологией. Так, у мышей с АИСД наблюдалась значимая обратная зависимость между уровнем КПГ и функциональной активностью лёгких, оценённой по величине уровня насыщения гемоглобина крови кислородом ($r = -0,8039$ при $p = 0,0162$), в отличие от животных с МИИС ($r = -0,4256$ при $p = 0,2931$). Отмечено наличие взаимосвязи между ростом уровня КПГ и выраженно-

Таблица 1. Суммарная полуколичественная оценка поражения лёгких (Mean±SE, баллы)

Экспериментальные группы	Дни эксперимента	
	4-е сутки	7-е сутки
Группа № 2 (n=5)	0,40±0,01*	0,63±0,01*
Группа № 3 (n=5)	0,51±0,02*#	0,71±0,01*#
Группа № 4 (n=5)	0,46±0,01*§	0,73±0,02*#

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к группе № 1, # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе № 2, § – $p \leq 0,05$ по отношению к группе № 3.

Группа № 1 — интактные мыши, группа № 2 — инфицированные мыши без преморбидной патологии, группа № 3 — мыши инфицированные с АИДС, группа № 4 — мыши инфицированные с МИИС.

стью повреждения лёгочной паренхимы у инфицированных мышей с преморбидными патологиями, при этом корреляционная зависимость у мышей с АИДС была более выражена по сравнению с животными с МИИС ($r=0,8701$ при $p=0,0050$, $r=0,7605$ при $p=0,0285$).

Заключение

Проведённое сравнительное исследование выявило различную степень вовлеченности КПГ в отягощение ОПЛ, индуцированного вирусом гриппа А/Н1N1pdm 09 в условиях преморбидной патологии различного генеза. Наряду с более выраженным ростом КПГ у мышей с обеими преморбидными патологиями по сравнению с животными, получавшим плацебо, наиболее значительный прирост данных продуктов наблюдался у мышей с АИДС. Аналогично и степень вовлеченности КПГ в развитие ОПЛ была значимо выше у животных с сахарным диабе-

том, чем у мышей с иммуносупрессией, по показателям степени насыщения гемоглобина кислородом и повреждения легочной паренхимы.

Наблюдаемые различия могут быть объяснены изначально высокой концентрацией глюкозы при АИДС, что провоцирует чрезмерное образование предшественников КПГ в условиях развивающейся гипоксии [21; 22]. В то же время антиметаболит метотрексат, вследствие своего специфического механизма действия, вызывает повреждение ДНК, что лежит в основе нарушения процессов синтеза белков, являющихся необходимым субстратом для избыточного образования КПГ [9; 10; 23].

Полученные результаты могут быть полезными при разработке новых подходов к экспериментальной терапии ОПЛ/ОРДС вирусного генеза с учетом особенностей патогенеза преморбидной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грипп у взрослых: методические рекомендации по диагностике, лечению, специфической и неспецифической профилактике / Под ред. А. Г. Чучалина, Т. В. Сологуб. — СПб.: НП-Принт, 2014. — 192 с.
2. Киселев О. И. Пандемии начала XXI века. Грипп птиц и пандемия «свиного» гриппа H1N1 2009 г. — СПб.: Фолиант, 2016. — 368 с.
3. Lobo S.M., Watanabe A. S.A., Salomão M. L.M. et al. Excess mortality is associated with influenza a (H1N1) in patients with severe acute respiratory infections.// *Journal of Clinical Virology*, 2019. — Vol. 116, P. 62–68, doi:10.1016/j.jcv.2019.05.003
4. Jaber S., Conseil M., Coisel Y. et al. Grippe A (H1N1) et SDRA: caractéristiques des patients admisenréanimation et prise en charge. *Revue de la littérature// Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 2010. — Vol. 29, Iss. 2, P. 117–125. doi:10.1016/j.annfar.2009.12.026
5. Töpfer L., Menk M., Weber-Carstens S. et al. Influenza A (H1N1) vs non-H1N1 ARDS: Analysis of clinical course// *Journal of Critical Care*, 2014. — Vol. 29, Iss. 3, P. 340–346. doi:10.1016/j.jcrc.2013.12.013
6. Kim KM, Jung DH, Jang DS, et al. Puerarin suppresses AGEs-induced inflammation in mouse mesangial cells: a possible pathway through the induction of heme oxygenase-1 expression. *ToxicolApplPharmacol*. 2010;244(2):106–113. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.023>.
7. Byun K, Yoo Y, Son M, et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *PharmacolTher*. 2017;177:44–55. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.030>.
8. Медведева, С. Ю. Токсическое действие аллоксана в динамике аллоксанового диабета/Медведева С.Ю., Булавинцева Т. С., Данилова И. Г., Гетте И. Ф., Сенцов В. Г./Вестник уральской медицинской академической науки, 2012. — № 3, С. 30–33.
9. Cetinkaya A. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats/A. Cetinkaya, E. Bulbuloglu, E. B. Kurutas, B. Kantarceken//*Medical science monitor*, 2006. — Vol. 12, Iss. 8, P. 274–278.
10. Ланкин В. З. Механизмы окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессах /В.З. Ланкин, А. К. Тихазе, В. И. Капелько, Г. С. Шепелькова, К. Б. Шумаев, О. М. Панасенко, Г. Г. Коновалова, Ю. Н. Беленков//*Биохимия*. — 2007, Том 72, Вып. 10, С. 1330–1341

11. Bursleson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology: A laboratory manual*. London, UK: Academic press; 1992. pp. 53–57
12. Ожередова Н.А., Веревкин М. Н., Светлакова Е. В. *Общая вирусология: Методические указания*. — Ставрополь: АГРУС, 2013. — 50 с.
13. Kikumoto Y, Sugiyama H, Inoue T, et al. Sensitization to alloxan-induced diabetes and pancreatic cell apoptosis in acatalasemic mice // Y. Kikumoto, H. Sugiyama, T. Inoue et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Basis of Disease*, 2010. — Vol. 1802, Iss. 2, P. 240–246, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.10.009
14. Шитов Л. Н. Влияние иммунодепрессантов на численность стафилококков в составе микрофлоры толстой кишки / Л. Н. Шитов // *Современные проблемы науки и образования*, 2008. — № 1, С. 151–152
15. Jonxis, J.H.P. The determination of oxygen saturation in small amounts of blood, by means of the Pulfrich step photometer // *Acta Medica Scandinavica*, 1943. — Vol. 115, Iss. 5, P. 425–428, doi: 10.1111/j.0954–6820.1943.tb15858.x
16. Yanagisawa K., Makita Z., Shiroshita K., et al. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients // *Metabolism*, 1998. — Vol. 47, Iss. 11, P. 1348–1353, doi: 10.1016/s0026–0495(98)90303–1
17. Коржевский Д. Э. *Основы гистологической техники* / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. — СПб: СпецЛит, 2010. — 95 с.
18. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(5):725–738. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009–0210ST>.
19. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Пер. с англ. — М., Практика, 1998. — 459 с.
20. Гржибовский А.М. Корреляционный анализ // *Экология человека*, 2008. — № 9, С. 50–60.
21. Титов В.Н., Хохлова, Н.В., Ширяева, Ю. К. Глюкоза, гликотоксины и продукты гликирования протеинов: роль в патогенезе // *Клиническая медицина*, 2013. — № 91 Вып.3, С. 15–24.
22. Можейко Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета часть I. Аллоксановый диабет // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, 2013. — № 43, Вып. 3, 2013, С. 26–29.
23. Оковитый С. В. *Клиническая фармакология иммунодепрессантов* // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, 2003. — № 2, вып. 2, С. 2–34.

© Александров Андрей Георгиевич (forphchemistry@gmail.com), Саватеева-Любимова Татьяна Николаевна (drug_safety@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева