

УДК 578.76, 616-092.9, 616-005
DOI: 10.24884/1682-6655-2023-22-4-74-86

В. А. МАРЧЕНКО^{1,3}, И. А. ЗЕЛИНСКАЯ², Я. Г. ТОРОПОВА²,
Д. В. МУХАМЕТДИНОВА², М. М. ГАЛАГУДЗА²,
Д. А. ЛИОЗНОВ¹, И. Н. ЖИЛИНСКАЯ^{1, 3}

Длительность системных нарушений вазомоторной функции эндотелия микрососудов, вызванных вирусом гриппа А(H1N1)pdm09

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 15/17

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 191015, Россия, Санкт-Петербург, Кирочная ул., д. 41
E-mail: vmarcenco@gmail.com

Статья поступила в редакцию 10.09.23 г.; принята к печати 27.10.23 г.

Резюме

Введение. Вирус гриппа (ВГ) А может инфицировать клетки эндотелия кровеносных сосудов и вызывать активацию и/или дисфункцию эндотелия. Ранее нами было показано, что ВГ А(H1N1)pdm09 приводит к изменениям функциональной активности кровеносных сосудов разных сосудистых регионов, а также вызывает различные морфопатологические изменения кровеносных сосудов легких крыс линии Вистар в остром периоде инфекции. **Цель** – изучить длительность системных нарушений вазомоторной функции эндотелия микрососудов, вызванных ВГ А(H1N1)pdm09. **Материалы и методы.** Крыс линии Вистар интраназально инфицировали ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09. Через 1, 4, 7, 14, 21, 30, 60 и 90 дней крыс (n=5) наркотизировали и проводили некропсию с извлечением брыжейки и легких. Уровень экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) определяли в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки с помощью иммуногистохимического анализа. Изучение вазомоторной активности артерий брыжейки проводили с помощью проволочного миографа. Инфекционную активность ВГ определяли в тканях легких и брыжейки. В качестве контроля выступали интактные животные на тех же временных промежутках. **Результаты.** ВГ А(H1N1)pdm09 вызывает снижение экспрессии eNOS на 13–39 % на протяжении 60 дней после инфицирования (p<0,05). Кроме того, ВГ также снижает максимальный ответ артерий брыжейки на вазодилататор на 74–108 % на протяжении 21 дня (p<0,0001) и снижает ответ на 16–26 % через 30 и 60 дней после инфицирования (p<0,0001) соответственно, а также увеличивает максимальный ответ артерий на вазоконстриктор на 26–57 % на протяжении 30 дней (p<0,05). Стоит отметить, что столь длительные изменения наблюдаются при элиминации вируса из легких животных уже к 7-му дню после инфицирования. **Заключение.** Таким образом, при экспериментальной инфекции, вызванной ВГ А(H1N1)pdm09 у крыс линии Вистар, наблюдается длительная дисфункция эндотелия, которая характеризуется: снижением экспрессии eNOS в клетках эндотелия микрососудов брыжейки на протяжении 60 дней после инфицирования, а также снижением ответа микрососудов брыжейки на вазодилататор и повышением ответа на вазоконстриктор на протяжении 60 и 30 дней соответственно. Регистрируемые изменения со стороны функциональной активности микрососудов брыжейки инфицированных крыс возникают в отсутствие вируса гриппа в тканях и сосудах брыжейки, а также на фоне полной элиминации вируса из легких животных к 7-му дню после заражения.

Ключевые слова: крысы линии Вистар, вирус гриппа А(H1N1)pdm09, эндотелиальная дисфункция микрососудов, эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS), иммуногистохимический анализ, проволочная миография

Для цитирования: Марченко В. А., Зелинская И. А., Торопова Я. Г., Мухаметдинова Д. В., Галагудза М. М., Лиознов Д. А., Жилинская И. Н. Длительность системных нарушений вазомоторной функции эндотелия микрососудов, вызванных вирусом гриппа А(H1N1)pdm09. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2023;22(4):74–86. Doi: 10.24884/1682-6655-2023-22-4-74-86.

V. A. MARCHENKO^{1,3}, I. A. ZELINSKAYA², Ya. G. TOROPOVA²,
D. V. MUKHAMETDINOVA², M. M. GALAGUDZA²,
D. A. LIOZNOV¹, I. N. ZHILINSKAYA^{1,3}

Duration of systemic alteration in vasomotor function of microvascular endothelium caused by the influenza A(H1N1)pdm09 virus

¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia
15/17, Professora Popova str., Saint Petersburg, Russia, 197376

² Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia
2, Akkuratova str., Saint Petersburg, Russia, 197341

³ Department of Medical Microbiology, North-Western State Medical University Named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia
41, Kirochnaya str., St. Petersburg, Russia, 191015
E-mail: vmarcenco@gmail.com

Received 10.09.23; accepted 27.10.23

Summary

Introduction. The influenza A virus (IAV) can infect vascular endothelial cells and cause activation and/or dysfunction of the endothelium. Previously, we have shown that the influenza A(H1N1)pdm09 virus leads to alteration in functional activity of blood vessels in different vascular beds, and also causes various histopathological changes in pulmonary blood vessels of Wistar rats in the acute period of infection. **Aim** – to study the duration of systemic alteration in vasomotor function of microvascular endothelium caused by the influenza A(H1N1)pdm09 virus. **Materials and methods.** The Wistar rats were intranasally infected with the influenza A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 virus and at 1, 4, 7, 14, 21, 30, 60 and 90 days post infection (dpi) they were anesthetized and necropsied. The expression level of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was determined in mesenteric vascular endothelium by immunohistochemistry. The vasomotor activity of the mesenteric arteries was studied using wire myography. **Results.** The influenza A(H1N1)pdm09 virus causes a decrease in eNOS expression by 13–39 % within 60 dpi ($p < 0.05$). In addition, the influenza virus also reduces the maximal response of mesenteric arteries to the vasodilator by 74–108 % within 21 days ($p < 0.0001$) and reduces the response by 16–26 % within 30 and 60 dpi ($p < 0.0001$), respectively, and also increases the maximum response of the arteries to the vasoconstrictor by 26–57 % within 30 dpi ($p < 0.05$). It should be noted that such long-term changes are observed while virus is eliminated by the 7th dpi. **Conclusion.** The influenza A(H1N1)pdm09 virus causes long-term endothelial dysfunction in the Wistar rats which is characterized by the reduced expression of eNOS in mesenteric microvascular endothelium within 60 dpi, decrease of the maximal response of mesenteric microvessels to vasodilator within 60 dpi and increase of the maximal response to vasoconstrictor within 30 dpi. Alterations of systemic functional activity of mesenteric microvessels in rats infected with influenza A(H1N1)pdm09 virus are registered in absence of the reproduction of virus in mesenteric blood vessels while virus is eliminated from pulmonary tissues by the 7th dpi.

Keywords: Wistar rats, influenza A(H1N1)pdm09 virus, microvascular endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), immunohistochemistry, wire myography

For citation: Marchenko V. A., Zelinskaya I. A., Toropova Ya. G., Mukhametdinova D. V., Galagudza M. M., Lioznov D. A., Zhilinskaya I. N. Duration of systemic alteration in vasomotor function of microvascular endothelium caused by the influenza A(H1N1)pdm09 virus. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2023;22(4):74–86. Doi: 10.24884/1682-6655-2023-22-4-74-86.

Введение

Гриппозная инфекция занимает одно из доминирующих положений в структуре инфекционных заболеваний как по количеству больных, так и по наносимому экономическому ущербу [1].

Первые данные, указывающие на возможность поражения сердечно-сосудистой системы при гриппозной инфекции были опубликованы клиницистами еще в середине XX века [2–4]. Так, в эпидемиях гриппа 1918–1920, 2009 и 2015–2016 гг. отмечалась особенно тяжелая клиническая картина в виде геморрагий на кожных покровах и слизистых оболочках, острого респираторного дистресс-синдрома, синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, геморрагического отека легких и мозга [5–8]. Гемор-

рагический синдром, как правило, характерен для тяжелых, а также фульминантных форм гриппозной инфекции и чаще связан с ВГ A(H1N1)pdm09 [9].

Известно, что вирусы гриппа способны инфицировать клетки эндотелия кровеносных сосудов за счет наличия на их поверхности сиаловых кислот с $\alpha 2$ -3- и $\alpha 2$ -6-гликозидной связью [10–12]. Так, было показано, что ВГ А, включая подтипы A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), способен приводить к апоптозу клеток эндотелия, а также изменять морфологию и экспрессию эндотелиальных факторов в культуре клеток эндотелия кровеносных сосудов человека HUVEC и EA.hy926 [13–16]. Кроме того, было показано, что ВГ A(H1N1)pdm09 в экспериментальной инфекции у крыс линии Вистар вызывал морфопатологиче-

ские изменения стенки кровеносных сосудов легких, а также существенные изменения функциональной активности кровеносных сосудов легких в остром периоде инфекции [17, 18]. Выявленные изменения со стороны эндотелиоцитов как *in vitro*, так и *in vivo* указывают на развитие дисфункции эндотелия (ДЭ) при гриппозной инфекции.

В свою очередь, ДЭ рассматривают как одну из ведущих причин развития сердечно-сосудистых патологий [19–22], что согласуется с данными, показавшими положительную корреляционную связь между эпидемиями гриппа и ростом числа госпитализированных пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Кроме того, во время эпидемий гриппа, а также после их окончания регистрируется избыточная смертность у пациентов из групп риска, в особенности с острыми и хроническими патологиями кардиоваскулярной и дыхательной систем [23, 24]. Также существует гипотеза, что пандемия гриппа 1918–1920 гг., вызванная вирусом гриппа А(H1N1), стала причиной значительного подъема сердечно-сосудистых заболеваний в первой половине XX века [25].

Цель: изучить длительность системных нарушений вазомоторной функции эндотелия микрососудов, при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гриппа А(H1N1)pdm09.

Материалы и методы исследования

Лабораторные животные. Для исследования использовали крыс линии Вистар (самцы в возрасте 4–6 недель и весом 200–250 граммов). Крысы содержались в отдельном боксе с целью исключить контакт с другими лабораторными животными. Условия содержания крыс были стандартными: полный пищевой рацион, соответствующий суточным нормативам питания для данного вида животных; суточный свето-темновой режим 12:12. Работа с животными проводилась с соблюдением принципов гуманного обращения с животными, регламентированных требованиями Европейской конвенции по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными (Страсбург, 1986), а также выведению их из эксперимента и последующей утилизации и была одобрена комитетом по биоэтике ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России (протокол № 03 от 24.01.2023 г.). В ходе эксперимента было использовано 60 животных, распределенных на 12 групп.

Вирус. В исследовании использовали ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09, предварительно адаптированный к половозрелым крысам. На последнем пассаже инфекционная активность ВГ составляла 6,6 lg ЭИД₅₀/мл. Титр гемагглютинирующей активности вируса в реакции гемагглютинации составлял 1:1024 [26].

Экспериментальная гриппозная инфекция. Животных из каждой экспериментальной группы (n=5) после наркотизации изофлураном интраназально инфицировали ВГ в объеме 0,2 мл. Через 1, 4, 7, 14, 21, 30, 60 и 90 дней после инфицирования крыс повторно наркотизировали и подвергали некропсии с

целью выделить ткани легких и брыжейки. Животным контрольной группы под анестезией интраназально вводили по 0,2 мл среды α -МЕМ с последующей наркотизацией и некропсией через 1, 30, 60 и 90 дней (n=5).

Инфекционная активность ВГ в тканях легких и брыжейки. Ткани легких взвешивали в стерильной чашке Петри, помещали в центрифужную пробирку и добавляли среду α -МЕМ (соотношение 1:10). Затем ткани гомогенизировали, а полученный 10 % гомогенат осаждали центрифугированием в течение 10–15 минут (1000×g). Ткани брыжейки помещали в центрифужную пробирку, добавляли 1 мл α -МЕМ, после чего гомогенизировали и центрифугировали (10 мин, 1000×g). Полученный супернатант использовали для инокуляции 10–12-дневных куриных эмбрионов. Для этого готовили десятикратные разведения вируса в 9 мл буферно-солевого раствора, вводили по 0,2 мл вирусосодержащей жидкости разведений от 10⁻¹ до 10⁻⁹, используя для каждого разведения по 5 эмбрионов. Куриные эмбрионы инкубировали в термостате при температуре 36 °С в течение 48 ч. По истечении срока инкубации из каждого эмбриона отбирали по 100 мкл аллантоисной жидкости, которую помещали в лунки планшета для иммунологических реакций. В каждую лунку добавляли по 100 мкл суспензии куриных эритроцитов. Через 30–40 минут контакта при комнатной температуре, после оседания эритроцитов в контроле, проводили учет реакции гемагглютинации. Инфекционную активность рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали как lg ЭИД₅₀/мл [27].

Иммуногистохимическое исследование. Для исследования использовали ткани легких вместе с внутрилегочными кровеносными сосудами, а также ткани и кровеносные сосуды брыжейки. Материал фиксировали в формалине в течение 1–2 дней при комнатной температуре. Гистологическая проводка выполнялась с использованием автоматического процессора Tissue-Tek VIP5 (*Sakura*, США) в изопропиловом спирте. С готовых гистологических блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм, которые помещали на предметные стекла с адгезивным покрытием (*Thermo Fisher Scientific*, США). Для детекции вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах легких и брыжейки инфицированных крыс использовали первичные мышинные моноклональные антитела к нуклеопротеину (NP) вируса гриппа А (Clone 6D11), полученные в отделе биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». Для определения уровня экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) использовали моноклональные мышинные антитела (*Abcam*, США, ab76198). Инкубацию срезов с первичными антителами в соотношении 1:500 и 1:100 для eNOS и NP соответственно 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*, Япония) при постоянных настройках

Инфекционный титр вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) в тканях легких и брыжейки инфицированных крыс (Mean±SD, *p<0,05 по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни, n=5)

Table 1

Infectious titer of the influenza A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 virus in pulmonary and mesenteric tissues of infected rats (Mean±SD, *p<0,05 compared with the control, Mann-Whitney U-test, n=5)

Время после инфицирования (дни)	Инфекционный титр вируса гриппа (lg ЭИД ₅₀ /мл)			
	Инфицированные крысы		Контроль	
	Легкие	Брыжейка	Легкие	Брыжейка
1	6,8±0,3*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
4	2,3±0,3*	0,0±0,0		
7	0,0±0,0	0,0±0,0		
14	0,0±0,0	0,0±0,0		
21	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
30	0,0±0,0	0,0±0,0		
60	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
90	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

с использованием бинаризации по синему каналу в автоматическом режиме с постоянными значениями порога [28].

В качестве основного исследуемого параметра был выбран параметр суммарной интенсивности (сумма интенсивности всех пикселей изучаемого объекта в поле зрения), поделенный на площадь заполнения; интенсивность экспрессии eNOS определяли в диапазоне регистрации сигнала между минимальными и максимальными значениями – 0–105.

Вазомоторную активность кровеносных сосудов брыжейки изучали на многоканальном проволочном миографе (DMT 620M, Дания). Сразу после эвтаназии животных брыжейку немедленно извлекали и помещали в чашку Петри, заполненную охлажденным раствором Кребса-Хензеляйта со следующим составом [мМ]: NaCl 119, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,17, CaCl₂ 1,6, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, глюкоза 5,5, ЭДТА 0,03.

Артерии брыжейки крыс монтировали в камере миографа при помощи двух проволок. От каждого животного исследованию подвергали по 3 сосуда 3-го порядка. Данные сосуды представляют собой микрососуды с диаметром 200–500 мкм, регулирующие поступление крови в обменные микрососуды 4-го порядка, диаметр которых в среднем составляет 50–150 мкм [29, 30].

После нормализации трансмурального давления (до 13,3 кПа) производили активацию сократительных механизмов посредством инкубации в гиперкалиевом растворе Кребса-Хензеляйта ([мМ]: NaCl 78,2, KCl 60, KH₂PO₄ 1,17, CaCl₂ 1,6, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, глюкоза 5,5, ЭДТА 0,03). Для исследования сократительной активности использовали протокол кумулятивного дозозависимого ответа на фенилэфрин. Сосуд инкубировали в камере со ступенчато увеличивающейся концентрацией фенилэфрина (ФЭ) от 10⁻⁷ до 10⁻⁵ М. Для исследования эндотелий-зависимого расслабления осуществляли предварительное сокращение сосуда фенилэфрином на 60 % от максимального в ходе протокола

дозозависимого сокращения. Затем производили инкубацию с ацетилхолином (АХ) по аналогичной сократительному ответу схеме. Регистрация данных производилась программой LabChart 8. Для полученных кривых рассчитывали концентрацию, обеспечивающую 50 % максимального ответа артерий на агонист (EC₅₀, мкМ) и величину максимального ответа (E_{max}, %), а также площадь под кривой «концентрация-ответ» (AUC). Полученные данные подвергали нормализации перед статистической обработкой.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 8 с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), а также метода нелинейной регрессии. Для представления полученных данных использовали среднее арифметическое (Mean), стандартное отклонение (SD) и стандартную ошибку среднего (SEM). Оценку статистической значимости проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни и критерия Даннета. Различия считали статистически значимыми для значений p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Клинические симптомы. В ходе исследования у крыс стока Вистар в контрольной и экспериментальной группах клинических симптомов не наблюдалось.

Инфекционная активность ВГ в тканях легких и брыжейки крыс. Результаты оценки инфекционного титра ВГ в тканях легких и брыжейки крыс через 1, 4, 7, 14, 21, 30, 60 и 90 дней после инфицирования представлены в табл. 1.

Спустя 1 день после инфицирования титр ВГ в тканях легких составлял 6,8 lg ЭИД₅₀/мл. Через 4 дня инфекционная активность вируса значительно снижалась и составляла 2,3 lg ЭИД₅₀/мл. На последующих временных интервалах (через 7, 14, 21, 30, 60 и 90 дней) в тканях легких, а также на протяжении всего периода исследования в тканях брыжейки инфекционная активность ВГ не регистрировалась.

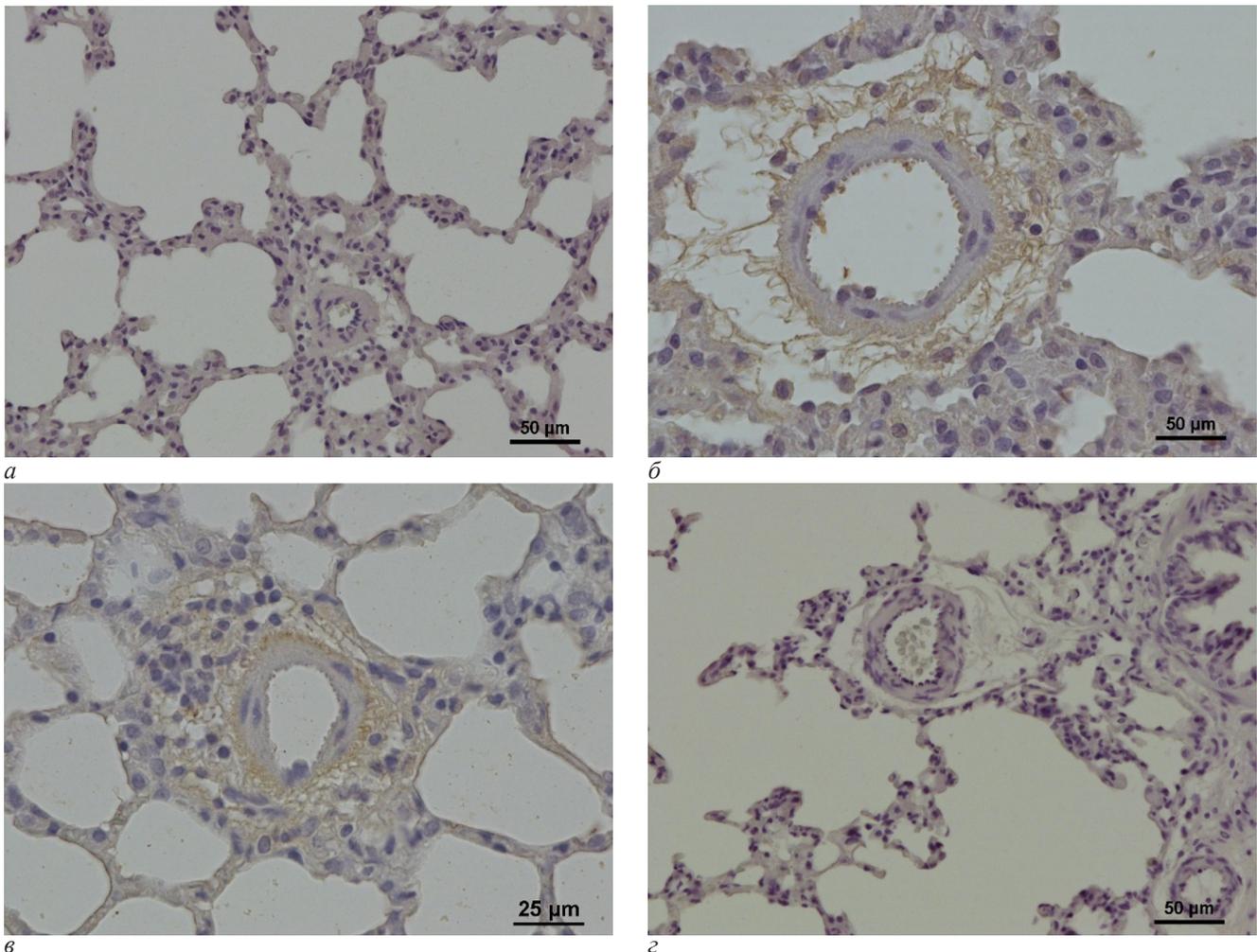


Рис. 1. Иммуногистохимический анализ локализации нуклеопротеина ВГ А в кровеносных сосудах легких крыс в контроле (а) и через 1 (б), 4 (с) и 7 дней (д) после инфицирования (ув. $\times 200$ для А, В, D; $\times 400$ для С)

Fig. 1. Immunohistochemical assay of nucleoprotein localization of IAV in the pulmonary blood vessels of control rats (a) and infected rats at 1 dpi (b), 4 dpi (c) and 7 dpi (d) (magnification $\times 200$ for A, B, D; $\times 400$ for C)

В тканях легких и брыжейки крыс контрольной группы ВГ не обнаруживали.

Детекция нуклеопротеина (НП) ВГ А в тканях и сосудах легких и брыжейки крыс. Для подтверждения репродукции вируса в кровеносных сосудах легких крыс проводили детекцию нуклеопротеина ВГ А. Как видно из рис. 1, НП обнаруживали только через 1 и 4 дня после инфицирования, что соответствует данным по изучению инфекционного титра ВГ в тканях легких (табл. 1). Также НП детектировали в мерцательном эпителии бронхиол и в альвеолах. Иммуногистохимическое исследование не выявило присутствие NP антигена вируса гриппа через 7 дней после инфицирования, а также на последующих временных сроках.

Исследование экспрессии eNOS в кровеносных сосудах брыжейки крыс, инфицированных ВГ А (H1N1) pdm09 в динамике. На рис. 2 представлена экспрессия eNOS через 1, 4, 7, 14, 21, 30, 60 и 90 дней после инфицирования.

Как видно из рис. 3, экспрессия eNOS была снижена на протяжении всего периода исследования. С целью количественного определения уровня экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс использовали отношение параметра суммарной интенсивности сигнала к площади заполнения (табл. 2, 3).

Как видно из данных табл. 2 уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов на всем протяжении исследования был снижен по сравнению с контролем: через 1 день на 22,5 %, через 4 дня на 20,08 %, через 7 дней на 16,62 %, через 14 дней на 16,12 % и через 21 день на 13,35 % ($p < 0,05$).

Как видно из данных табл. 3, уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов был снижен на 32,13 % через 30 дней и на 39,24 % через 60 дней ($p < 0,05$). Восстановление уровня экспрессии eNOS до контрольных значений наблюдалось только к 90-му дню после инфицирования.

На рис. 3 представлен уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс, инфицированных ВГ в динамике.

Оценка вазомоторной активности артерий брыжейки крыс, инфицированных ВГ А (H1N1) pdm09. Для оценки эндотелий-зависимого расслабления артерий использовали вазодилататор ацетилхолин. В качестве вазоконстриктора использовали фенилэфрин. Показатели вазомоторной активности артерий брыжейки крыс, инфицированных ВГ А (H1N1) pdm09, в динамике представлены в табл. 4.

Так, максимальный ответ артерий брыжейки на фенилэфрин был увеличен по сравнению с контролем: на 29,77 % через 1 день после инфицирования

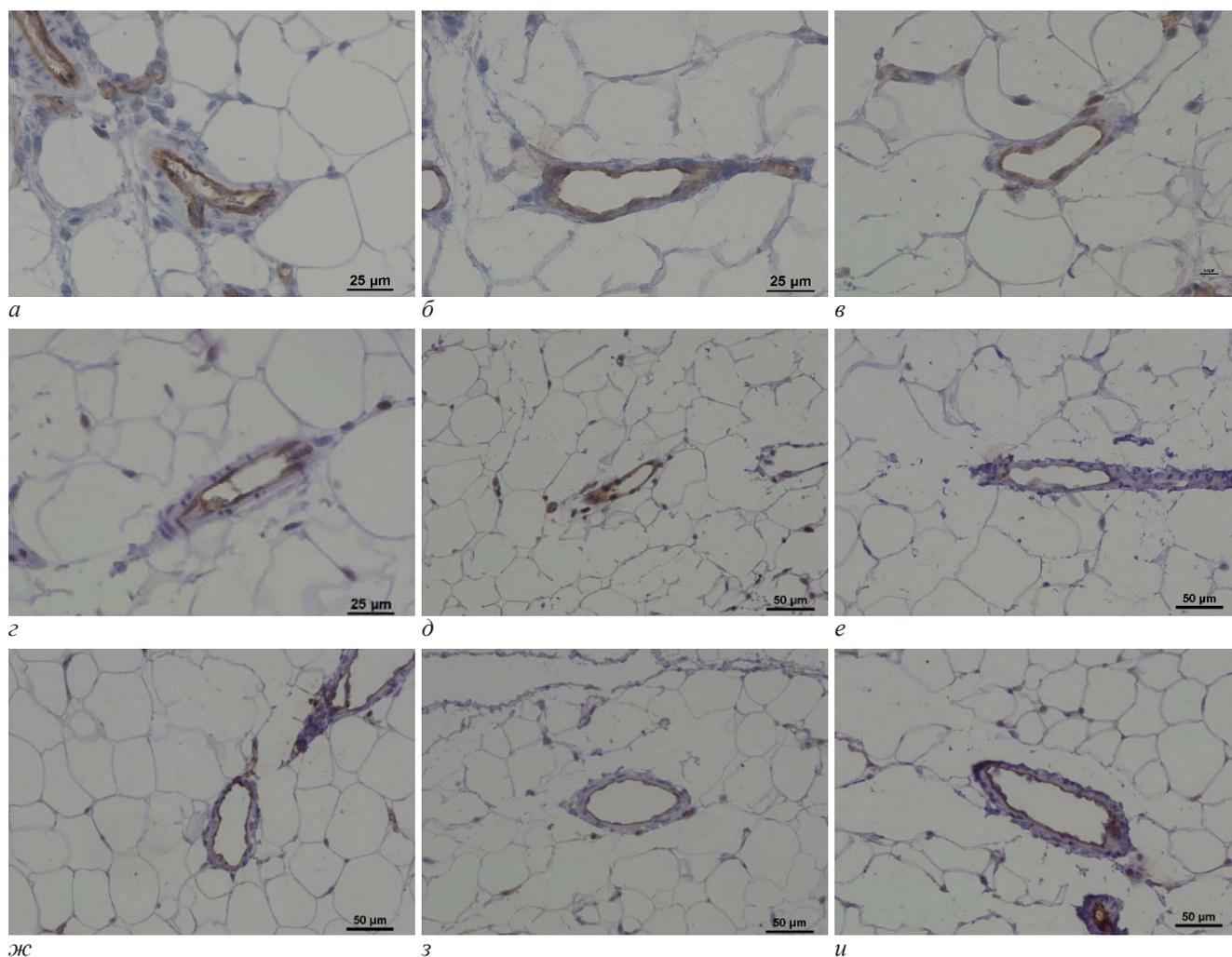


Рис. 2. Экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс в контроле (а) и инфицированных ВГ А(H1N1) pdm09 через 1, 4, 7, 14, 21, 30, 60 и 90 дней после инфицирования (б–и) (ув. $\times 200$, $\times 400$; окрашивание гематоксилином и эозином)
 Fig. 2. The eNOS expression in the mesenteric vascular endothelium of the control (a) and infected rats at 1, 4, 7, 14, 21, 30, 60 and 90 dpi (б–и) (magnification $\times 200$, $\times 400$; H&E staining)

Таблица 2

Уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс, инфицированных вирусом А(H1N1)pdm09, через 1, 4, 7, 14 и 21 день (Mean \pm SD, у. е.)

Table 2

The eNOS expression in the mesenteric vascular endothelium of the rats infected with the influenza A(H1N1)pdm09 virus at 1, 4, 7, 14 and 21 dpi (Mean \pm SD, conventional units)

Экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс, инфицированных ВГ А(H1N1)pdm09 (суммарная интенсивность сигнала/площадь заполнения)		
День	Контроль (n=5)	Инфицированные крысы (n=5)
1-й	806,57 \pm 19,29	625,09 \pm 120,7**
4-й		644,58 \pm 99,62**
7-й		672,47 \pm 95,19*
14-й		676,5 \pm 77,84**
21-й		698,85 \pm 24,34***

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, критерий Даннета, 10 сосудов от каждого животного, $n=5$.

($p < 0,05$), на 36,07 % через 4 дня ($p < 0,001$), на 57,54 % через 7 дней ($p < 0,001$), на 26,61 % через 21 день и на 46,75 % через 30 дней. Увеличение чувствительности артерий к вазоконстриктору наблюдалось через 7, 30 и 90 дней.

В свою очередь, максимальный ответ артерий брыжейки на ацетилхолин был резко снижен по сравнению с контролем: на 96,79 % через 1 день после инфицирования, на 74,1 % через 4 дня, на 77,94 % через 7 дней, на 81,33 % через 14 дней, на 108,82 % через

Уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс, инфицированных ВГ А(H1N1) pdm09 через 30, 60 и 90 дней (Mean±SD, у. е.)

Table 3

The eNOS expression in the mesenteric vascular endothelium of the rats infected with the influenza A(H1N1)pdm09 virus at 30, 60 and 90 dpi (Mean±SD, conventional units)

Экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс, инфицированных вирусом гриппа А(H1N1)pdm09 (суммарная интенсивность сигнала/площадь заполнения)		
День	Контроль (n=5)	Инфицированные крысы (n=5)
30-й	757,48±29,63	514,09±178,3*
60-й	709,74±24,56	431,19±199,8*
90-й	680,45±19,88	677,74±11,07

* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, критерий Манна–Уитни, 10 сосудов от каждого животного, $n=5$.

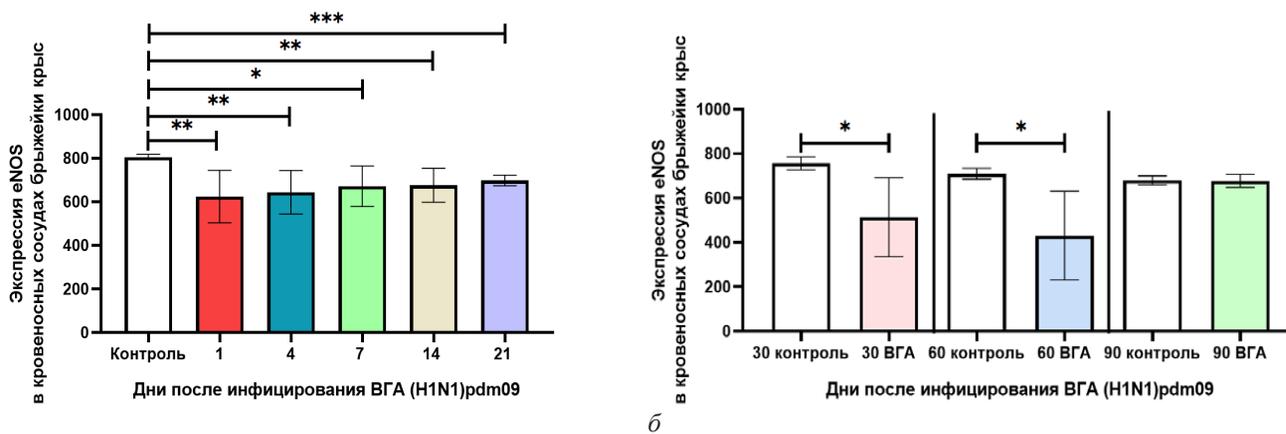


Рис. 3. Экспрессия eNOS в клетках эндотелия кровеносных сосудов брыжейки крыс, инфицированных ВГ А(H1N1)pdm09 (Mean±SD): * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, критерий Даннета для (а), критерий Манна–Уитни для (б), 10 сосудов от каждого животного, $n=5$

Fig. 3. The eNOS expression in the mesenteric vascular endothelial cells of the rats infected with the influenza A(H1N1)pdm09 virus (Mean±SD): * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ compared with the control rats, Dunnett's test (a), Mann–Whitney U-test (b), 10 blood vessels of 5 rats in every group

21 день. Через 30 и 60 дней также регистрировали снижение максимального ответа, но несколько менее выраженное: на 16,15 % и 22,6 % соответственно. Увеличение чувствительности артерий к вазодилатору не регистрировали.

Результаты кумулятивного дозозависимого ответа артерий брыжейки крыс на вазоконстриктор и вазодилатор в динамике представлены на рис. 4.

На рис. 5 представлены данные по интегральному ответу артерий брыжейки крыс, инфицированных ВГ в динамике.

Как видно из рис. 5, интегральный ответ артерий на вазодилатор был значительно снижен на протяжении первых трех недель после инфицирования ($p < 0,05$). Также снижение интегрального ответа на ацетилхолин наблюдали через 60 дней ($p < 0,05$). В свою очередь, ответ артерий брыжейки инфицированных крыс на фенилэфрин был повышен в течение первых 4 дней, а также через 30 дней после инфицирования ($p < 0,05$).

Грипп представляет собой высококонтагиозную острую вирусную инфекцию, которая ежегодно вызывает от 3 до 5 миллионов случаев тяжелых респираторных заболеваний, из которых до 650 тысяч заканчиваются летальным исходом [1]. Инфицируя преимущественно клетки респираторного тракта, вирусы гриппа также могут инфицировать клет-

ки эндотелия кровеносных сосудов [10–12], что приводит к активации или дисфункции эндотелия [31, 32].

Следует отметить, что активация и дисфункция эндотелия представляют собой близкие, но не тождественные понятия [33]. Так, активация эндотелия характеризуется изменением фенотипа клеток в результате повышения экспрессии генов, кодирующих провоспалительные, вазоконстрикторные и протромбогенные эндотелиальные факторы [32–34]. Активация эндотелия при гриппе может возникать как при непосредственном внедрении вируса в клетку, так и в ответ на высокие концентрации некоторых провоспалительных цитокинов (ФНО, ИЛ-1) в кровеносном русле [31, 32, 35].

В свою очередь, ДЭ характеризуется стойким изменением структуры и/или функциональной активности эндотелия, приводящим к нарушению сосудистого тонуса, тромбозу и другим осложнениям [33, 36]. Одним из наиболее важных последствий ДЭ является снижение синтеза и/или биодоступности оксида азота (за счет снижения активности eNOS), который не только является самым мощным эндогенным вазодилатором, но также обладает антимикробным, противовоспалительным, антиатерогенным, антипролиферативным и антиагрегантным действием [37–40].

Показатели вазомоторной активности артерий брыжейки крыс, инфицированных ВГ А(H1N1)pdm09 (Mean±SEM)

Table 4

Vasomotor activity of the mesenteric arteries of the rats infected with the influenza A(H1N1)pdm09 virus (Mean±SEM)

Агонист	Фенилэфрин (ФЭ)		Ацетилхолин (АХ)	
	Log EC ₅₀ , М	E _{max} , %	Log EC ₅₀ , М	E _{max} , %
<i>Контрольная группа</i>				
1–21-й день	-6,00±0,04	84,66±1,68	-6,71±0,18	100,98±0,73
30-й день	-5,73±0,04	122,63±6,22	-6,25±0,07	94,56±1,29
60-й день	-5,87±0,04	111,35±9,95	-6,16±0,08	97,52±1,29
90-й день	-5,89±0,03	127,18±5,58	-5,93±0,10	48,36±8,59
<i>Опытная группа</i>				
1-й день	-6,39±0,10	114,43±8,33*	-6,32±0,19	4,19±7,83 ****
4-й день	-6,26±0,13	120,73±8,82 ***	4,19±7,83	26,98±9,15 ****
7-й день	-5,69±0,10 *	142,20±12,37 **	-6,10±0,23	23,04±8,50 ****
14-й день	-5,76±0,13	114,68±16,28	-6,26±0,28	19,65±7,13 ****
21-й день	-5,91±0,16	111,27±5,62 **	-6,25±0,58	-7,84±7,75 ****
30-й день	-6,01±0,06 **	169,38±11,39 **	-6,37±0,08	78,41±6,24 *
60-й день	-5,63±0,13	114,92±14,69	-6,05±0,09	70,92±6,10 **
90-й день	-6,10±0,07 *	112,21±8,31	-5,98±0,15	35,54±7,45

Примечание: logEC₅₀ – концентрация агониста, обеспечивающая 50 % от максимального ответа; E_{max}, % – величина ответа при максимальной концентрации агониста. * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001, **** – p<0,0001 по сравнению с контролем, критерий Даннета для сравнения показателей в опытных группах с одним контролем (1–21 день), критерий Манна–Уитни для сравнения двух групп между собой через 30, 60 и 90 дней, 3 сосуда от каждого животного, n=5.

ДЭ одновременно рассматривают как одно из основных неспецифических звеньев патогенеза как и фактор риска развития различных заболеваний сердечно-сосудистой системы, включая атеросклероз, гипертонию, гипертрофическую кардиомиопатию, ишемический инсульт и другие патологии [19–22].

В настоящем исследовании изучали длительность системного влияния вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 на кровеносные сосуды брыжейки крыс линии Вистар через 1, 4, 7, 14, 21, 30, 60 и 90 дней.

Изучение инфекционной активности ВГ в тканях легких и брыжейки животных показало, что активная репродукция вируса наблюдалась на протяжении первых 96 ч и только в тканях легких. Так, инфекционный титр вируса в гомогенатах легких крыс через 1 день после инфицирования составил 6,8 lg ЭИД₅₀/мл и снижался через 4 дня до 2,3 lg ЭИД₅₀/мл. С целью подтвердить репродукцию ВГ в тканях и кровеносных сосудах легких и брыжейки проводили иммуногистохимическое исследование с детекцией нуклеопротеина ВГ А. Так, нуклеопротеин вируса локализовался в мерцательном эпителии бронхиол и в альвеолах, а также в эндотелии кровеносных сосудов на протяжении первых 96 ч после инфицирования, что коррелирует с данными по оценке инфекционного титра ВГ в тканях легких животных. На всех последующих временных интервалах (через 7, 14, 21, 30, 60 и 90 дней) инфекционный титр вируса в тканях легких крыс не определялся. Таким образом,

ВГ А(H1N1)pdm09 элиминируется из организма крыс через 7 дней после инфицирования, что, в целом, согласуется с данными литературы [41, 42].

Изучение уровня экспрессии eNOS в клетках эндотелия кровеносных сосудов брыжейки позволило выявить снижение экспрессии данного эндотелиального фермента на протяжении 60 дней после инфицирования. Так, экспрессия eNOS была снижена на 13–22 % на протяжении 21 дня после инфицирования, тогда как через 30 и 60 дней экспрессия снижалась на 32 и 39 % соответственно. Нормализация уровня экспрессии eNOS наблюдалась лишь через 90 дней после инфицирования.

Снижение уровня экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов при гриппе может возникать вследствие следующих причин:

1) **прямое цитопатическое действие вируса.** Вирусы гриппа А способны инфицировать клетки эндотелия, вызывая изменение морфологии, снижение метаболизма клеток, а также индуцируя процессы апоптоза [13, 42–44]. Также было показано, что вирус А(H1N1)pdm09 непосредственно вызывает значительное снижение экспрессии eNOS в культуре клеток EA.hy926 в течение 72 ч после инфицирования [15];

2) **оксидативный стресс.** Известно, что при гриппе наблюдается повышение продукции активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) [45]. Незначительное повышение концентрации свободных радикалов позволяет усилить иммунный ответ, однако при

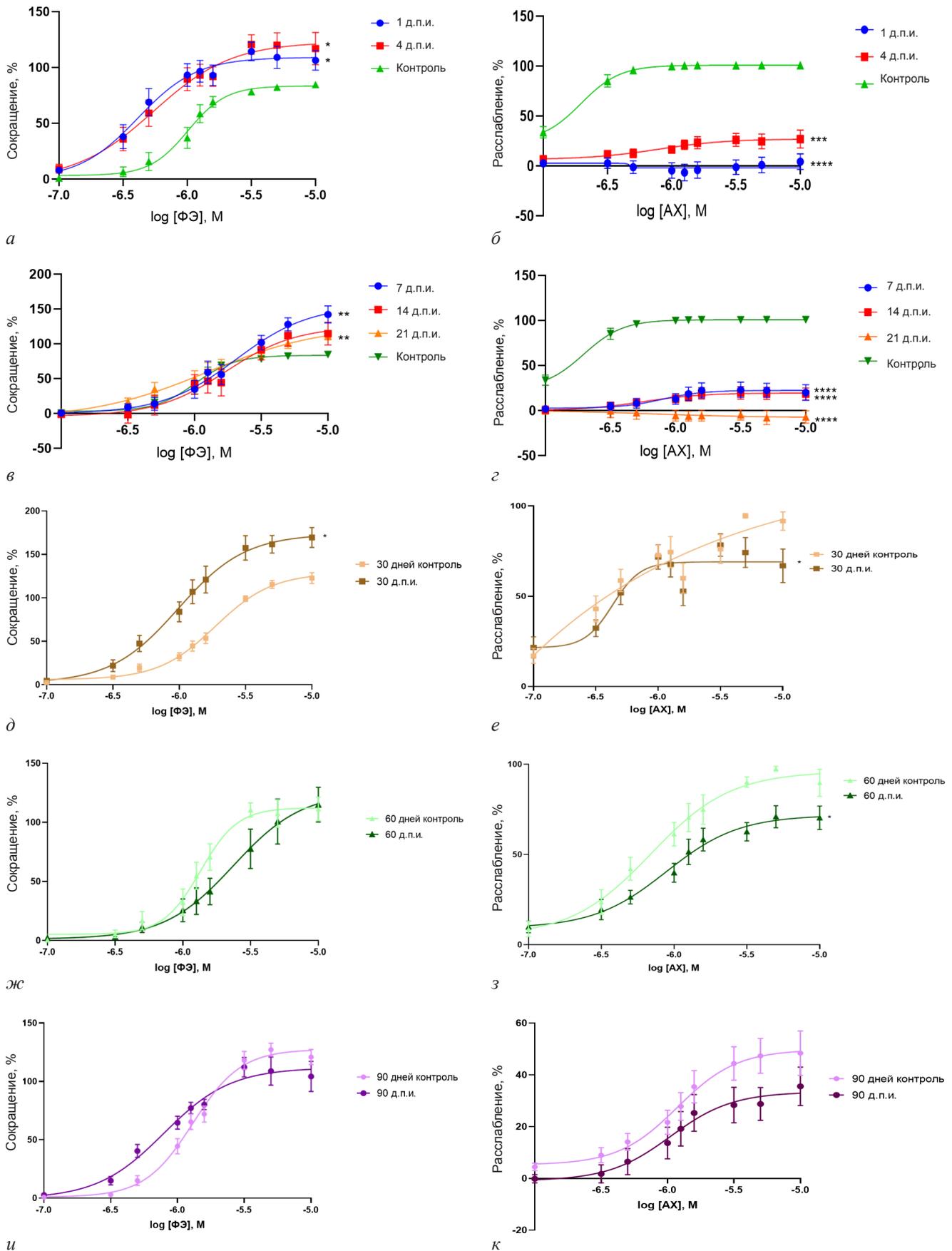


Рис. 4. Дозозависимые кривые «концентрация-ответ» артерий брыжейки крыс, инфицированных ВГ А(H1N1)pdm09 (Mean±SEM): * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$ по сравнению с контролем, критерий Даннета для *a–г*; критерий Манна–Уитни для *д–к*, $n=5$; *a, в, д, ж, и* – фенилэфрин-зависимое сокращение; *б, з, е, з, к* – ацетилхолин-зависимое расслабление

Fig. 4. Dose-dependent concentration-response curves of mesenteric arteries of the rats infected with the influenza A(H1N1)pdm09 virus (Mean±SEM): * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$ compared with control group, Dunnett's test for single control group compared with rats at 1, 4, 7, 14 and 21 dpi, Mann-Whitney U-test for comparison of groups at 30, 60 and 90 dpi, 3 blood vessels of 5 rats in every group); *a, в, д, ж, и* – phenylephrine-dependent vasoconstriction; *б, з, е, з, к* – acetylcholine-dependent vasorelaxation

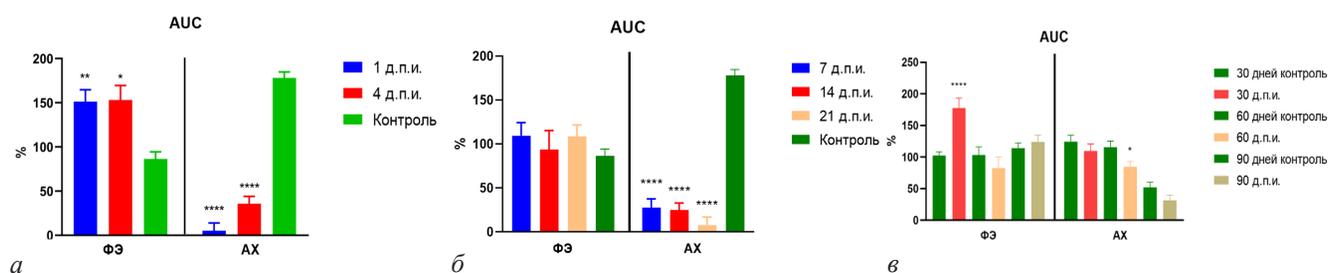


Рис. 5. Интегральный ответ артерий брыжейки крыс, инфицированных ВГ A(H1N1)pdm09 через 1–4 дня (а), 7–21 день (б), 30–90 дней (в) (Mean±SEM): * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$ по сравнению с контролем, критерий Даннета для а и б, критерий Манна – Уитни для в, $n = 5$

Fig. 5. Integral response of mesenteric arteries of the rats infected with the influenza A(H1N1)pdm09 virus at 1–4 dpi (a), 7–21 dpi (b), and 30–90 dpi (c) (Mean±SEM): * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$ compared with control, Dunnett's test for a and b, Kruskal – Wallis test for c, 3 blood vessels of 5 rats in every group

чрезмерной продукции наблюдается патологическая активация эндотелия [46]. Так, супероксид анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$) способен связываться и инактивировать NO, а также проникать в клетки эндотелия и окислять наиболее важный кофактор для eNOS – тетрагидробиоптерин (BH_4) [47]. Именно снижение биодоступности тетрагидробиоптерина расценивают как одну из наиболее важных причин разобщения eNOS. В результате данного патологического процесса происходит переключение ферментной активности eNOS на выработку супероксид анион-радикала [47, 48]. Таким образом, возникает «порочный круг», усиливающий патологическую активацию эндотелия и способствуя индукции эндотелиальной дисфункции [49].

Другой возможной причиной столь длительной дисрегуляции экспрессии eNOS является молекулярная мимикрия между белками вируса гриппа и клетки-хозяина. Так, было показано, что в составе всех белков ВГ найдены фрагменты аминокислотных последовательностей с высокой степенью гомологии фрагментам в составе различных белков системы гемостаза. Так, в составе четырех белков исследуемого ВГ (HA, M1, NS2 и PB1) имеются фрагменты мимикрирующие различные фрагменты в составе eNOS [50].

Изучение вазомоторной активности артерий брыжейки инфицированных животных выявило существенные изменения в ответе сосудов как на фенилэфрин, так и на ацетилхолин. Так, максимальный ответ артерий на ФЭ в течение первых 30 дней после инфицирования был увеличен на 26–57 % по сравнению с контролем. Это также является косвенным свидетельством развития дисфункции эндотелия, не способного адекватно компенсировать сократительную стимуляцию и предотвращать вазоспазм. Увеличение чувствительности артерий к ФЭ наблюдалось через 7, 30 и 90 дней, что свидетельствует о длительных изменениях, присутствующих в пути активации ФЭ-зависимой вазоконстрикции.

В свою очередь, максимальный ответ артерий брыжейки на АХ был снижен на 74–108 % на протяжении 21 дня и снижен на 16–26 % через 30 и 60 дней после инфицирования, соответственно. При этом чувствительность артерий к ацетилхолину не изменялась. Стоит отметить, что через 21 день после инфекции регистрировали отрицательный ответ на вазодилатор, что говорит об инверсии ответа, в результате чего ацетилхолин вместо вазодилатации

вызывает вазоконстрикцию. Регистрируемые отрицательные значения ответа артерий на ацетилхолин могут наблюдаться при ряде сердечно-сосудистых заболеваний, включая гипертонию, атеросклероз и острый коронарный синдром [51, 52]. По всей видимости, именно через 21 день после инфицирования наблюдаются наиболее существенные изменения вазомоторной активности сосудов.

Необходимо отметить, что снижение интенсивности ответа артерий на воздействие вазодилатора ацетилхолина на 30 % следует рассматривать как легкую форму ДЭ, а снижение на 60 % и более – как тяжелую форму ДЭ [53]. Полученные в ходе исследования данные, указывают на то, что ВГ A(H1N1)pdm09 способен вызывать тяжелую форму ДЭ на протяжении 21 дня после инфицирования.

Заключение

Таким образом, при экспериментальной инфекции, вызванной ВГ A(H1N1)pdm09 у крыс линии Вистар, наблюдается длительная ДЭ, которая характеризуется снижением экспрессии eNOS в клетках эндотелия микрососудов брыжейки на протяжении 60 дней после инфицирования, а также снижением ответа микрососудов брыжейки на вазодилатор и повышением ответа на вазоконстриктор на протяжении 60 и 30 дней, соответственно.

Регистрируемые изменения со стороны функциональной активности микрососудов брыжейки инфицированных крыс возникают в отсутствие вируса гриппа в тканях и сосудах брыжейки, а также на фоне полной элиминации вируса из легких животных к 7 дню после заражения.

Следует отметить, что столь длительная ДЭ при гриппе может стать причиной или усугубить течение уже имеющихся заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Статья написана на основе диссертационного исследования Марченко Владимира Александровича (работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в 2022 г.).

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare that they have no conflicts of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства Здравоохранения (тема № 223012300007-6 «Роль вирусов гриппа в развитии дисфункции эндотелия кровеносных сосудов»). / This research was supported by the state assignment of the Ministry of Health of Russia (registration number: 223012300007-6 «The role of influenza viruses in the development of endothelial dysfunction of blood vessels»).

Литература / References

1. Office WHOEMR. Global Influenza Strategy 2019-2030 / *Wkly Epidemiol Monit* 2019.
2. Barber H. A case of influenzal myocarditis. *Clin J*. 1947; 76(5):181-183.
3. Lyon E. Modern viewpoints on cardiovascular disturbances in influenza. *Acta Medica Orientalia*. 1952;11(2-3):25-34.
4. Сергеев Н.В. Поражения сердечно-сосудистой системы при гриппе // *Вестн. Академии мед. наук СССР*. – 1962. – Т. 17, № 2. – С. 15–22. [Sergeev NV, Leites FL. *Vestnik Akademii Meditsinskikh Nauk SSSR*. 1962;17(2):15-22. (in Russ.)].
5. Gilbert CR, Vipul K, Baram M. Novel H1N1 influenza A viral infection complicated by alveolar hemorrhage. *Respir Care*. 2010;55(5):623-625.
6. Эсауленко Е.В., Стуколкин К.О., Дунаева Н.В. и др. Редкие симптомы (диарея, менингизм, геморрагический синдром) у больных гриппом различных субтипов // *Вестн. НовГУ*. – 2013. – Т. 1, № 71. – С. 93–97. [Esaulenko EV, Stukolkin KO, Dunaeva NV, Grigor'eva IV, Bondar ES, Pozdnikova MG. Rare symptoms (diarrhea, meningism, hemorrhagic syndrome) in patients with different influenza virus subtypes. *Vestnik NovSU*. 2013;1(71):93-97. (In Russ.)].
7. Yang Y, Tang H. Aberrant coagulation causes a hyper-inflammatory response in severe influenza pneumonia. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(4):432-442. Doi: 10.1038/cmi.2016.1.
8. Чучалин А.Г., Черняев А.Л., Зайратьяныч О.В. и др. Патологическая анатомия легких при гриппе А (H1N1), по данным аутопсий // *Пульмонология*. – 2010. – № 1. – С. 5–11. [Chuchalin AG, Chernyaev AL, Zairatyants OV, Kelly EI, Rogov KA, Mikhaleva LM, Trusov AE, Samsonova MV, Chartorizhskaya NN. Pathological anatomy of the lungs in influenza A (H1N1) (autopsy data). *Pulmonology*. 2010;(1):5-11. (In Russ.)]. Doi: 10.18093/0869-0189-2010-1-5-11.
9. Сулима Д.Л., Карев В.Е., Жданов К.В. Гипертоксический грипп // *Журн. инфектол.* – 2010. – Т. 2, № 1. – С. 75–79. [Sulima DL, Karev VE, Zhdanov KV. Hypertoxic flu. *J Infectology*. 2010;2(1):75-79. (In Russ.)]. Doi: 10.22625/2072-6732-2010-2-1-75-79.
10. Zeng H, Goldsmith CS, Maines TR, Belser JA, Gustin KM, Pekosz A, Zaki SR, Katz JM, Tumpey TM. Tropism and infectivity of influenza virus, including highly pathogenic avian H5N1 virus, in ferret tracheal differentiated primary epithelial cell cultures. *J Virol*. 2013;87(5):2597-2607. Doi: 10.1128/JVI.02885-12.
11. Abe Y, Smith CW, Katkin JP, Thurmon LM, Xu X, Mendoza LH, Ballantyne CM. Endothelial alpha 2,6-linked sialic acid inhibits VCAM-1-dependent adhesion under flow conditions. *J Immunol*. 1999;163(5):2867-2876.
12. Cioffi DL, Pandey S, Alvare DF, Cioffi EA. Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012; 302(10):L1067-L1077. Doi: 10.1152/ajplung.00190.2011.
13. Zhang S, Wu Y, Xuan Z, Chen X, Zhang J, Ge D, Wang X. Screening differential miRNAs responsible for permeability in-

crease in HUVECs infected with influenza A virus. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186477. Doi: 10.1371/journal.pone.0186477.

14. Sumikoshi M, Hashimoto K, Kawasaki Y, Sakuma H, Suzutani T, Suzuki H, Hosoya M. Human influenza virus infection and apoptosis induction in human vascular endothelial cells. *J Med Virol*. 2008;80(6):1072-1078. Doi: 10.1002/jmv.21185.

15. Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А. и др. Экспрессия эндотелиальных факторов в клетках эндотелия человека при инфекции, вызванной вирусом группа А(H1N1)pdm09 (Orthomyxoviridae; Alphainfluenzavirus) // *Вопр. вирусол.* – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 198–210. [Marchenko VA, Barashkova SV, Zelinskaya IA, Toropova YG, Ramsay ES, Zhilinskaya IN. Modulation of endothelial factors activity in human endothelial cells in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection. *Probl. Virol*. 2021;66(3):198-210. (In Russ.)]. Doi: 10.36233/0507-4088-48.

16. Азаренок А.А., Еропкина Е.М., Прочуханова А.Р. и др. Воздействие вирусов группа А и их поверхностных белков на метаболизм клеток эндотелия кровеносных сосудов человека // *Вопр. вирусол.* – 2013. – Т. 58, № 3. – С. 25–27. [Azarenok AA, Eroпкина EM, Prochukhanova AR, Shaldzhyan AA, Kozlova NM, Kozeletskaya KN, Zhilinskaya IN. The influenza viruses and their surface proteins impact on the metabolism of human blood vessel endothelial cells. *Probl. Virol*. 2013;58(3):25-27. (In Russ.)].

17. Marchenko V, Mukhametdinova D, Amosova I, Lioznov D, Zhilinskaya I. Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Alters Expression of Endothelial Factors in Pulmonary Vascular Endothelium in Rats. *Viruses*. 2022;14(11):2518. Doi: 10.3390/v14112518.

18. Marchenko V, Zelinskaya I, Toropova Y, Shmakova T, Podyacheva E, Lioznov D, Zhilinskaya IN. Influenza A Virus Causes Histopathological Changes and Impairment in Functional Activity of Blood Vessels in Different Vascular Beds. *Viruses*. 2022;14(2):396. Doi: 10.3390/v14020396.

19. Widmer RJ, Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2014;(3):291-308. Doi: 10.5339/gcsp.2014.43.

20. Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(3):183-198.

21. Gallo G, Volpe M, Savoia C. Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. *Front Med (Lausanne)*. 2022;8:798958. Doi: 10.3389/fmed.2021.798958

22. Giannitsi S, Bougiakli M, Bechlioulis A, Naka K. Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation. *JRSM Cardiovasc Dis*. 2019;8:2048004019843047. Doi: 10.1177/2048004019843047.

23. van Asten L, Harmsen CN, Stoeldraijer L, Klinkenberg D, Teirlinck AC, de Lange MMA, Meijer A, van de Kasstele J, van Gageldonk-Lafeyer AB, van den Hof S, van der Hoek W. Excess Deaths during Influenza and Coronavirus Disease and Infection-Fatality Rate for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(2):411-420. Doi: 10.3201/eid2702.202999.

24. Эпидемиологические параллели внебольничных пневмоний, гриппа и ОРВИ в г. Москве / Салтыкова Т.С., Жигарловский Б.А., Брико Н.И., Вязовиченко Ю.В. // *Туберкулез и болезни легких*. – 2020. – Т. 98, № 3. – С. 6–12. [Saltykova TS, Zhigarlovskiy BA, Briko NI, Vязovichenko YuV. Epidemiological parallels of community-acquired pneumonia, influenza and ARVI in Moscow. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2020;98(3):6-12. (In Russ.)]. Doi: 10.21292/2075-1230-2020-98-3-6-12.

25. Azambuja MI. Spanish flu and early 20th-century expansion of a coronary heart disease-prone subpopulation. *Tex Heart Inst J*. 2004;31(1):14-21.
26. Марченко В.А., Барашикова С.В., Зелинская И.А. и др. Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar // *Вопр. вирусол.* – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 155-166. [Marchenko VA, Barashkova SV, Zelinskaya IA, Toropova YG, Sorokin EV, Zhilinskaya IN. Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats. *Probl. Virol*. 2020;65(3):159-166. (In Russ.)]. Doi: 10.36233/0507-4088-48.
27. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol*. 1938;27:493-497.
28. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 2006;49(4):411-424. Doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x.
29. Pourageaud F, De Mey JG. Structural properties of rat mesenteric small arteries after 4-wk exposure to elevated or reduced blood flow. *Am J Physiol*. 1997;273(4):H1699-H1706. Doi: 10.1152/ajpheart.1997.273.4.H1699.
30. Nyvad J, Mazur A, Postnov DD et al. Intravital investigation of rat mesenteric small artery tone and blood flow. *J Physiol*. 2017;595(15):5037-5053. Doi:10.1113/JP274604.
31. Armstrong SM, Darwish I, Lee WL. Endothelial activation and dysfunction in the pathogenesis of influenza A virus infection. *Virulence*. 2013;4(6):537-542. Doi: 10.4161/viru.25779.
32. Short KR, Kuiken T, Van Riel D. Role of Endothelial Cells in the Pathogenesis of Influenza in Humans. *J Infect Dis*. 2019;220(11):1859-1860. Doi: 10.1093/infdis/jiz349.
33. Власов Т.Д., Петрищев Н.Н., Лазовская О.А. Дисфункция эндотелия. Правильно ли мы понимаем этот термин? // *Вестн. анестезиол. и реаниматол.* – 2020. – Т. 17, № 2. – С. 76–84. [Vlasov TD, Petrishev NN, Lazovskaya OA. Endothelial dysfunction. Do we understand this term properly? *Messenger Anesthesiol Resusc.* 2020;17(2):76-84. (In Russ.)]. Doi: 10.21292/2078-5658-2020-17-2-76-84.
34. Hunt BJ, Jurd KM. Endothelial cell activation. A central pathophysiological process. *BMJ*. 1998;316(7141):1328-1329. Doi: 10.1136/bmj.316.7141.1328.
35. Pober JS. Activation and injury of endothelial cells by cytokines. *Pathol Biol (Paris)*. 1998;46(3):159-163.
36. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):168-175. Doi: 10.1161/01.atv.0000051384.43104.fc.
37. Levine AB, Punahaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology*. 2012;122(1):55-68. Doi: 10.1159/000338150.
38. Yuyun MF, Ng LL, Ng GA. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? *Microvasc Res*. 2018;119:7-12. Doi: 10.1016/j.mvr.2018.03.012.
39. De Groot MA, Fang FC. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin Infect Dis*. 1995;21(Suppl 2):S162-S165. Doi: 10.1093/clinids/21.supplement_2.s162.
40. Minuz P, Lechi C, Gaino S et al. Oxidized LDL and reduction of the antiaggregating activity of nitric oxide derived from endothelial cells. *Thromb Haemost*. 1995;74(4):1175-1179.
41. Daniels MJ, Selgrade MK, Doerfler D, Gilmour MI. Kinetic profile of influenza virus infection in three rat strains. *Comp Med*. 2003;53(3):293-298.
42. Ibanes JD, Morgan KT, Burlison GR. Histopathological Changes in the Upper Respiratory Tract of F344 Rats Following Infection with a Rat-adapted Influenza Virus. *Vet Pathol*. 1996;33(4):412-418. Doi: 10.1177/030098589603300407.
43. Sumikoshi M, Hashimoto K, Kawasaki Y et al. Human influenza virus infection and apoptosis induction in human vascular endothelial cells. *J Med Virol*. 2008;80(6):1072-1078. Doi: 10.1002/jmv.21185.
44. Жилинская И.Н., Азаренок А.А., Ильинская Е.В. и др. Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека // *Вопр. вирусол.* – 2012. – Т. 57, № 2. – С. 20–23. [Zhilinskaya IN, Azarenok AA, Ilynskaya EV, Prochukhanova AR, Vorobyev SL, Sorokin EV, Tsareva TR. Reproduction of influenza virus in the endothelial cells of human blood vessels (In Russ.)].
45. Liu M, Chen F, Liu T, Chen F, Liu S, Yang J. The role of oxidative stress in influenza virus infection. *Microbes Infect*. 2017;19(12):580-586. Doi: 10.1016/j.micinf.2017.08.008.
46. Higashi Y, Maruhashi T, Noma K, Kihara Y. Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. *Trends Cardiovasc Med*. 2014;24(4):165-169. Doi: 10.1016/j.tcm.2013.12.001.
47. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-C1437. Doi: 10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424.
48. Förstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol*. 2011;164(2):213-223. Doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01196.x.
49. Janaszak-Jasiecka A, Ploska A, Wierońska JM et al. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets. *Cell Mol Biol Lett*. 2023;28(1):21. Doi: 10.1186/s11658-023-00423-2.
50. Жилинская И.Н., Марченко В.А., Харченко Е.П. Сравнение фрагментов, мимикрирующих белки системы гемостаза человека, в белках вирусов гриппа А/Н1N1 и коронавируса // *Мол. генетика, микробиол. и вирусол.* – 2022. – Т. 40, № 4. – С. 43–46. [Zhilinskaya IN, Marchenko VA, Kharchenko EP. Comparison of fragments in human hemostatic proteins that mimics fragments in proteins of A/H1N1 viruses and coronaviruses. *Mol Gen Microbiol Virol*. 2022;40(4):43-46. (In Russ.)]. Doi: 10.17116/molgen20224004143.
51. Suzuki S, Kaikita K, Yamamoto E, Jinnouchi H, Tsujita K. Role of acetylcholine spasm provocation test as a pathophysiological assessment in nonobstructive coronary artery disease. *Cardiovasc Interv Ther*. 2021;36(1):39-51. Doi: 10.1007/s12928-020-00720-z.
52. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*. 1990;81(2):491-497. Doi:10.1161/01.cir.81.2.491.
53. 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;20(1):187. Doi: 10.3390/ijms20010187.

Информация об авторах:

Марченко Владимир Александрович – канд. мед. наук, научный сотрудник отдела биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, ассистент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: vmarcenco@gmail.com, ORCID: 0000-0001-6870-3157.

Зелинская Ирина Александровна – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментальной биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: irina.selinskaja@gmail.com, ORCID: 0000-0002-1971-3444.

Торопова Яна Геннадьевна – д-р биол. наук, зав. научно-исследовательской лабораторией биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: yana.toropova@mail.ru, ORCID: 0000-0003-1629-7868.

Мухаметдинова Дарья Владимировна – лаборант-исследователь научно-исследовательской группы экспериментальной патоморфологии Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: mukh.dv@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-7109-1187.

Галагуза Михаил Михайлович – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: galagoudza@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5129-9944.

Лиюнов Дмитрий Анатольевич – д-р мед. наук, профессор, директор ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, зав. кафедрой инфекционных болезней ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: dmitry.lioznov@influenza.spb.ru, ORCID: 0000-0003-3643-7354.

Жилинская Ирина Николаевна – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева», профессор кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: irina@influenza.spb.ru, ORCID: 0000-0002-0084-1323.

Authors information

Marchenko Vladimir A. – Candidate (Ph.D.) of Medical Sciences, Researcher, Biotechnology Department, Smorodintsev Re-

search Institute of Influenza, Assistant, Medical Microbiology Department, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia, e-mail: vmarcenco@gmail.com, ORCID: 0000-0001-6870-3157.

Zelinskaya Irina A. – Researcher, Research Laboratory of Bioprosthetics and Cardiac Protection, Center for Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Institute, Saint Petersburg, Russia, e-mail: irina.selinskaja@gmail.com, ORCID: 0000-0002-1971-3444.

Toropova Yana G. – Sc. D. (Biology), Head, Research Laboratory of Bioprosthetics and Cardiac Protection, Center for Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Institute, Saint Petersburg, Russia, e-mail: yana.toropova@mail.ru, ORCID: 0000-0003-1629-7868.

Mukhametdinova Darya V. – Research Assistan, Experimental Pathomorphology Group, Center for Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Institute, Saint Petersburg, Russia, e-mail: mukh.dv@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-7109-1187.

Galagudza Michael M. – MD, Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Director, Institute of Experimental Medicine, of Almazov National Medical Research Institute, Saint Petersburg, Russia, e-mail: galagoudza@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5129-9944.

Liuznov Dmitry A. – MD, Professor, Director, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Head, Department of Infectious Diseases, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: dmitry.lioznov@influenza.spb.ru, ORCID: 0000-0003-3643-7354.

Zhilinskaya Irina N. – Sc. D. (Biology), Leading Researcher, Biotechnology Department, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Professor, Medical Microbiology Department, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St Petersburg, Russia, e-mail: irina@influenza.spb.ru, ORCID: 0000-0002-0084-1323.