

**ПАТОМОРФОЛОГИЯ ЛЁГКИХ И СЕЛЕЗЁНКИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ГРИППОЗНОЙ
ИНФЕКЦИИ**

Пашнина Н.Я.¹, Мальчиков И.А.¹, Григорьева Ю.В.^{1,2}, Тузанкина И.А.³

¹ *Федеральное бюджетное учреждение науки «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Екатеринбург*

² *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Екатеринбург*

³ *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук*

**PATHOMORPHOLOGY OF LUNGS AND SPLEEN OF EXPERIMENTAL
ANIMALS IN INFLUENZA INFECTION**

Pashnina N.Ya., Malchikov I.A., Grigoryeva Yu.V., Tuzankina I. A.

Аннотация

При моделировании гриппозной вирусной инфекции *in vivo* исследованы патоморфологические признаки изменений в органах и тканях экспериментальных животных после воздействия препарата Имунорикс. Результаты моделирования вирусных инфекций в условиях эксперимента на животных позволяют сделать вывод, что данный препарат оказывал

положительное действие на всех сроках гриппозной инфекции на регенерацию тканей легкого и селезенки.

Ключевые слова: *эксперимент, вирус гриппа, препарат Имунорикс*

While influenza virus infection in vivo was modelled, pathomorphological signs of changes in the organs and tissues of experimental animals after exposure with Imunorix drug were studied. The results of modelling of viral infections in animal experiments suggest that this drug had a positive effect on regeneration of lung and spleen tissues at all the stages of the influenza infection.

Key words: *experiment, influenza virus, drug Imunorix*

Ежегодно в мире гриппом болеют от 3 до 5 млн. человек, нанося большой ущерб здоровью населения и приводя к огромным финансовым затратам на лечение и реабилитацию больных [1, 7]. Существует опасность образования реассортантов вирусов гриппа человека, птиц и свиней, высокопатогенных для человека [3, 6, 8]. За последние годы эпидемическая ситуация по гриппу осложняется эпидемическим распространением заболеваний, вызванных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, которым был присвоен шестой (максимальный) уровень опасности для людей [14, 12, 15]. Разработка гриппозных вакцин, эффективных в отношении нового циркулирующего возбудителя, требует относительно длительного промежутка времени [4, 5, 9, 11, 13]. Поэтому на этот период этиотропные профилактические препараты могут быть единственным средством предотвращения распространения вирусной инфекции [2, 10]. В связи с этим поиск и возможность использования новых или существующих противогриппозных препаратов, активных в отношении вариантов вируса, представляет большую практическую значимость.

Целью настоящего исследования являлось моделирование гриппозной инфекции с оценкой патоморфологических изменений и

определения возможности вовлечения органов в инфекционный процесс при использовании препарата Имунорикс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эталонный вирус

Эталонный штамм вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) (ВГ), получен из ФГБУ НИИ гриппа МЗ С-Петербург. В работе использовали вируссодержащую жидкость с инфекционным титром $4,5 \lg$ ЦПД50/0,2 мл и D₁₀ 90% для лабораторных мышей.

Исследуемый препарат

Имуномодулятор Имунорикс (Пидотимод®) производства Доппель Фармацеутици С.Р.Л., Виа Мартири делле Фоибе, 129016, Кортемаджоре (Пьяченца), Италия.

Лабораторные животные

Для проведения экспериментальных исследований было использовано 80 беспородных белых мышей, которых получали из питомника-вивария при ОКБ №1 г. Екатеринбурга. Все исследования выполнялись в соответствии с правилами проведения работ по использованию экспериментальных животных (GLP), а также приказом МЗ РФ №267 от 19.06.03 г.

Для моделирования гриппозной инфекции были сформированы следующие группы:

- группа I (основная) мыши массой 20–22 г (n=20) были инфицированы интраназально ВГ А/PR/8/34 (H1N1) с инфекционным титром $4,5 \lg$ ТЦД50/мл в объеме 0,05 мл для воспроизведения гриппозной инфекции. Мышам из этой подгруппы давали ежедневно, за 1 день до и после заражения в течение 11 дней в профилактических целях, иммуномодулятор Имунорикс в объеме 0,025 мг/л per os (в перерасчете на массу тела животного);

- группа II (сравнения) - мыши массой 20–22 г (n=20) были инфицированы интраназально ВГ А/PR/8/34 (H1N1) с инфекционным титром 4,5 lg ТЦД50/мл в объеме 0,05 мл – для воспроизведения гриппозной инфекции;

- группа III (сравнения) (n=20). Мышам из этой подгруппы давали ежедневно иммуномодулятор Имунорикс в объеме 0,025 мг/л per os (в перерасчете на массу тела животного) в течение 11 дней;

- группа IV (контрольная) (n=20) состояла из мышей, которым интраназально закапывали 0,05 мл 0,9% физиологического раствора.

Мышей выводили из опыта эфирным наркозом в соответствии с этическими правилами о работе с лабораторными животными.

Метод патолого-гистологических исследований. Образцы органов (легких, печени, головного мозга, почек) обрабатывали по общепринятой методике. Серийные срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, по методу Ван Гизона. Органы животных фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и по стандартной методике заливали в парафиновые блоки. Микроскопировали и фотографировали срезы с помощью светооптического микроскопа «Axiostar plus» («Zeiss»). Исследовали ткани легких, тимуса, печени, почек, селезенки экспериментальных животных. Отбор материалов и органов осуществляли в динамике на 3-и, 6-е, 8-е и 11-е сутки с момента инфицирования ВГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При патолого-гистологическом исследовании наблюдались изменения только в легких и селезенке. Гистологическое исследование выявило следующее.

Легкие. В контрольной (IV) и группе сравнения III видимых патогистологических изменений в легких не выявлено (Рис. 1).

В группе I при гриппозной инфекции с ежедневным введением Имунорикса^R наблюдается ярко выраженная воспалительная реакция в

виде периваскулярных и перибронхиальных лимфоидных инфильтратов на всех сроках, начиная с 3-х суток (Рис. 2). В местах инфильтрации в бронхах и бронхиолах отмечается частичный некробиоз и десквамация (слущивание) некротизированного эпителия на ранних сроках инфекции. Однако на 11-е сутки после заражения у мышей этой группы значительные участки легких без заметных морфологических изменений (Рис. 3). Лишь в местах инфильтрации, занимающих значительную площадь, можно отметить гиперемиию и стаз в сосудах разного калибра. Состояние эпителия кровеносных сосудов в пределах нормы, отсутствовали отек, некробиоз и деструкция тканей.

На ранних сроках гриппозной инфекции в легких мышей 2-ой группы, не получавших Имунорикс[®], по сравнению с первой, воспаление в виде лимфоидных инфильтратов слабо выражено. Наблюдается не только сосудистая реакция в виде гиперемии и стаза, но и более глубокие морфологические изменения в бронхах и бронхиолах. Мерцательный эпителий претерпевает дегенеративные изменения, формируя оксифильные тельца, содержащие частицы вируса, с последующим отторжением в полость бронха (оксифильный некробиоз). Встречаются очаги с частичным некрозом стенки бронхиол, небольшие очаги отека и кровоизлияний в просвет альвеол (Рис. 4а).

На более поздних сроках инфекционного процесса патология в легких выражена сильнее и на большей площади: частичный или полный некроз стенки сосудов и бронхиол сопровождается появлением массивных очагов отека и кровоизлияний (Рис. 4б).

Морфологическая картина патологических изменений в легких мышей при гриппозной инфекции может быть определена как бронхопневмония с геморрагическим отеком, поскольку возникали обширные некротические поражения эпителия в сосудах, мелких бронхах

и бронхиолах, чему сопутствовало развитие разлитого геморрагического отека легких.

Селезенка. В контрольной группе (IV) видимых патогистологических изменений в селезенке не выявлено. В основной группе (I) при гриппозной инфекции с ежедневным введением Имунорикса^R в селезенке наблюдается диффузная лимфоидная гиперплазия в фолликулах, белой и красной пульпах. Образование большого количества макрофагов. Перикапиллярный отек и диффузная эритроцитарная гиперплазия в красной пульпе (Рис. 5 а, б).

При гриппозной инфекции без введения Имунорикса^R (группа II) в селезенке происходит разрежение и отек лимфоидной ткани в белой пульпе, дистрофические изменения эндотелия артерий, кровоизлияния. Очаги некробиоза в красной пульпе: некроз капилляров и макрофагов (идет разрушение капиллярной сети вместе с макрофагами), дисконфлексация ткани и отек в красной пульпе селезенки (Рис.6 а, б). То есть, происходит усиленный распад клеточных элементов лимфоидной ткани в селезенке.

Таким образом, в результате проведенных исследований гриппозной инфекции у мышей, зараженных вирусом гриппа А(Н1N1), были получены данные, свидетельствующие о том, что ежедневное введение иммуномодулятора Имунорикс^R не исключает полностью возможности проникновения вируса в клетки легкого. Однако, проникший вирус в клетки бронхов и бронхиол стимулирует усиленную защитную реакцию в виде массивных перибронхиальных и периваскулярных лимфоидных инфильтратов. Возможно, что эти изменения являются отображением иммунологических сдвигов при гриппозной инфекции с ежедневным введением препарата.

Имунорикс^R оказывал положительное действие на всех сроках гриппозной инфекции, особенно на поздних сроках инфекции, когда

патологический процесс затихал и наступала стадия регенерации тканей легкого и селезенки. Значительные участки этих органов были без заметных морфологических изменений: отсутствовали отеки, некробиоз и деструкция тканей.

В других органах (тимус, печень, почки) патоморфологические изменения были не так ярко выражены и не имели значительных отличий от контрольных образцов на всех сроках наблюдения.

Список литературы

1. Яковлев А. А. Три эпидемических сезона гриппа 2009-2013 годов / А. А. Яковлев, С. И. Котлярова, В. Б. Мусатов // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – №2. – С. 35-39.
2. Influenza / R. C. Brady // *Adolesc Med State Art Rev.* – 2010. – Iss. 21(2). – P. 236-50.
3. Avian influenza and human health / I. Capua, D. J. Alexander // *Acta Trop.* – 2002. – Vol. 83, Iss. 1. – P. 1-6.
4. The factors of virulence of influenza a virus / T. Fislová, F. Kostolanský // *Acta Virol.* – 2005. – Vol. 49, Iss. 3. – P. 147-157.
5. Influenza vaccines: what do we want and how can we get it? / F. Geeraedts, A. Huckriede // *Adv Exp Med Biol.* – 2011. – Vol. 780. – P. 161-174.
6. Characteristics of human infection with avian influenza viruses and development of new antiviral agents / D. Y. Liu, Z. Q. Yang // *Acta Pharmacol Sin.* – 2013. – Vol. 34, Iss. 10. – P.1257-1269.
7. Population interactions in biological system: influenza virus A — wild and domestic animals — human; reasons and consequences of introduction high pathogenic influenza virus A/H5N1 on Russian territory / D. K. L'vov // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* – 2006. – Vol. 3. – P. 96-100.

8. The risk of seasonal and pandemic influenza: prospects for control / A. S. Monto // *Clin Infect Dis.* – 2009. – Vol. 48. – P. 445-448.

9. Influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors / A. Nitsch-Osuch, L. B. Brydak // *Acta Biochim Pol.* – 2014. – Vol. 61, Iss. 3. – P. 505-508.

10. The use of antiviral agents during an (impending) influenza pandemic / W. Opstelten, J. E. van Steenberg, G. A. van Essen, M. A. Van der Sande // *Ned Tijdschr Geneesk.* – 2007. – Vol. 151, Iss. 18. – P. 1008-1012.

11. Viral vaccines under development: a third generation / J. E. Osborn // *Adv Exp Med Biol.* – 1979. – Vol. 118. – P. 61-82.

12. Pandemic influenza: human rights, ethics and duty to treat / I. Pahlman, H. Tohmo, H. Gylling // *Acta Anaesthesiol Scand.* – 2010. – Vol. 54, Iss. 1. – P. 9-15.

13. Registered nurses and influenza vaccination. An integrative review / C. E. Toronto, S. M. Mullaney // *AAOHN J.* – 2010. – Vol. 58, Iss.11. – P. 463-471.

14. Influenza A viruses of avian origin circulating in pigs and other mammals / K. Urbaniak, A. Kowalczyk, I. Markowska-Daniel // *Acta Biochim Pol.* – 2014. – Vol. 61, Iss. 3. – P. 433-439.

15. Severe influenza A(H1N1)2009 infection: a single centre experience and review of the literature / S. H. Van Ierssel, M. Leven, P. G. Jorens // *Acta Clin Belg.* – 2012. – Vol. 67, Iss. 1. – P. 1-6.

Ответственный за переписку:

Артемкина Ирина Юрьевна, Тел./факс +7 (343) 261-99-47, e-mail:
virus@eniivi.ru

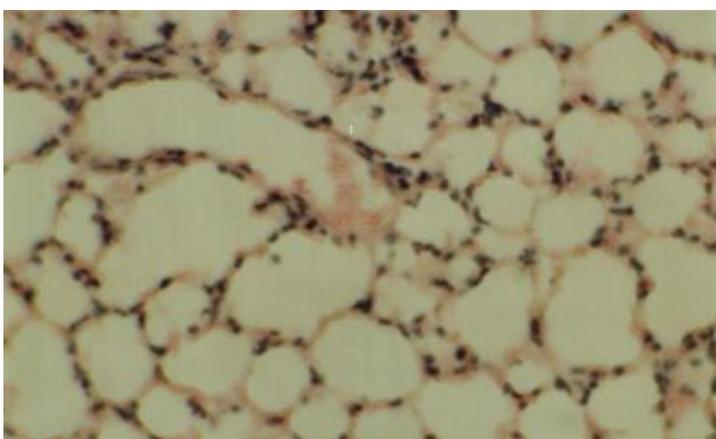
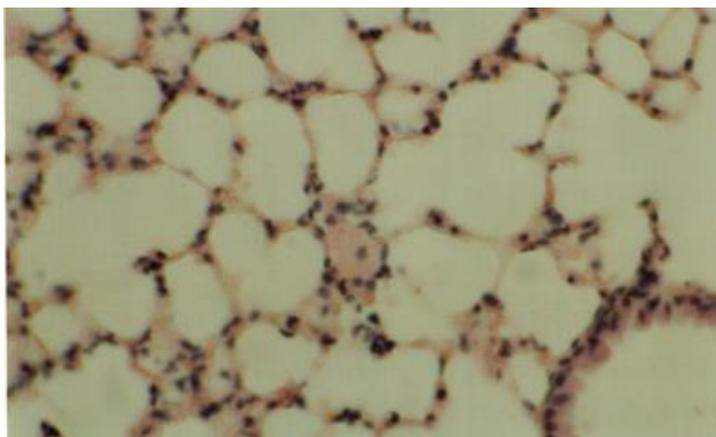


Рис. 1. Контроль легкого б/б мыши.
Сосуды, бронхиола и альвеолы в норме.
Окраска гематоксилином и эозином. х 200; х 200.

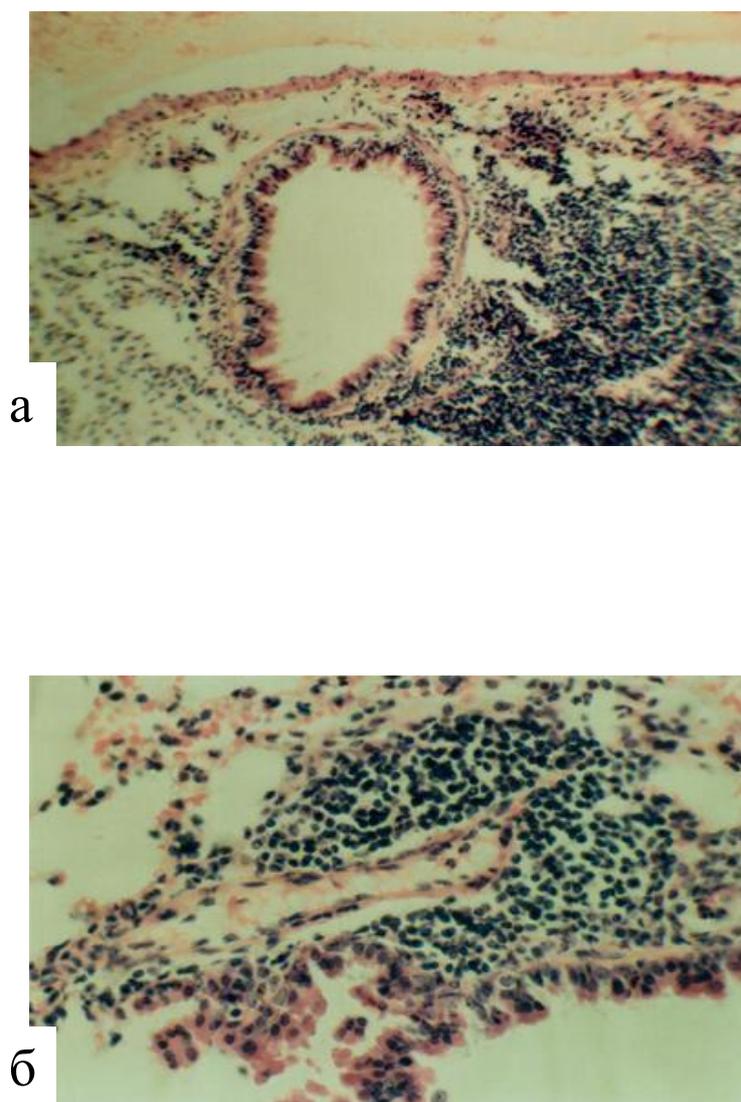


Рис. 2. Легкое мыши на 3-и сутки после заражения вирусом гриппа А(Н1N1) + ежедневно Имунорикс.

а, б) Обширные перибронхиальные и периваскулярные лимфоидные инфильтраты. Частичный некроз эпителия бронхиол.

Окраска гематоксилином и эозином. x 80; x 200.

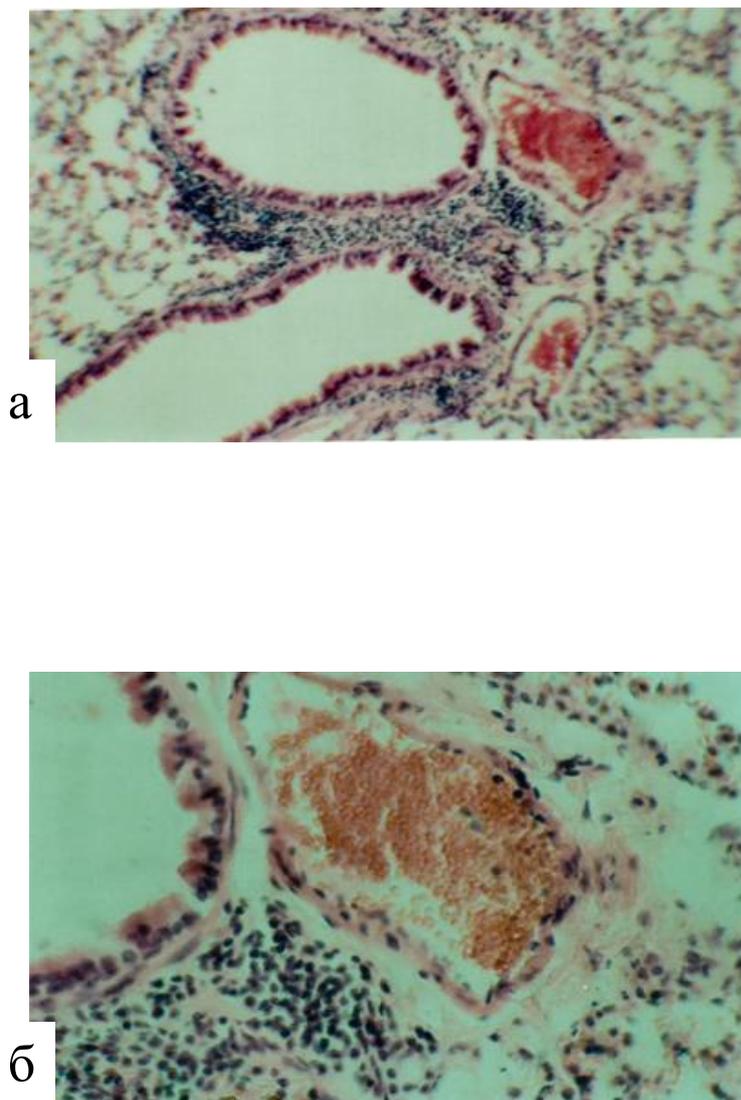


Рис. 3. Легкое мыши на 11-е сутки после заражения вирусом гриппа А(Н1N1) + Имунорикс.

- а) Очаговый периваскулярный и перибронхиальный лимфоидный инфильтрат. Полнокровие в сосудах. Эпителиальная стенка сосудов и бронхов в пределах нормы.
 - б) Фрагмент рис. 3а.
- Окраска гематоксилином и эозином. х 80; х 200.

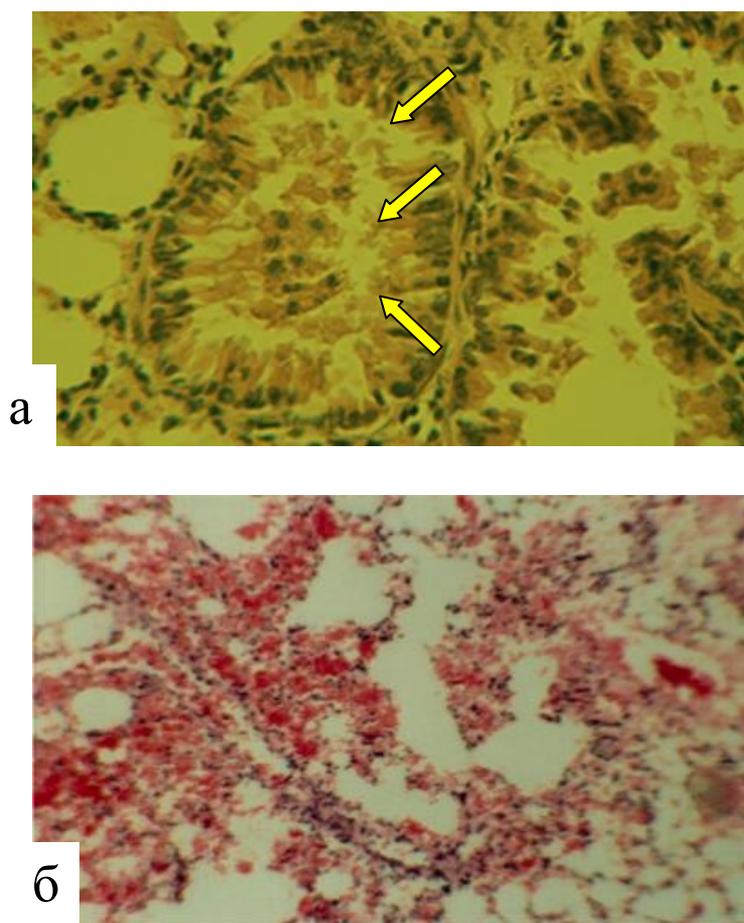


Рис. 4 . Легкое мыши на 3-е (а) и 8-е (б) сутки после заражения вирусом гриппа А (H1N1).

- а) Оксифильный некробиоз эпителия бронхиол: отторжение оксифильных телец и базофильных «микроколлоний вируса» (). Десквамация в просвет бронхиолы некротизированного эпителия.
б) Некроз стенки сосудов и бронхиол. Массивные очаги кровоизлияний в просвет альвеол.
Окраска гематоксилином и эозином. x400; x80.

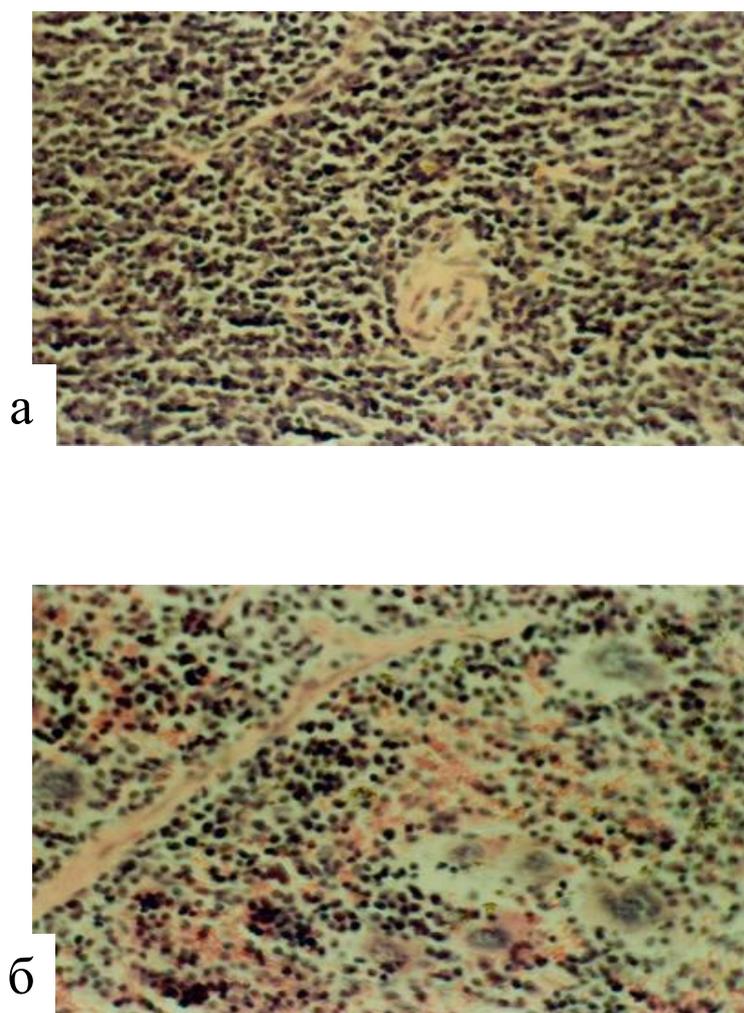


Рис. 5. Селезенка мыши на 5-е сутки после заражения вирусом гриппа А(Н1N1) + Имунорикс.

- а) Диффузная лимфоидная гиперплазия в белой пульпе.
 - б) Диффузная эритроцитарная гиперплазия в красной пульпе. Перикапиллярный отек.
- Окраска гематоксилином и эозином. х 200; х 200.

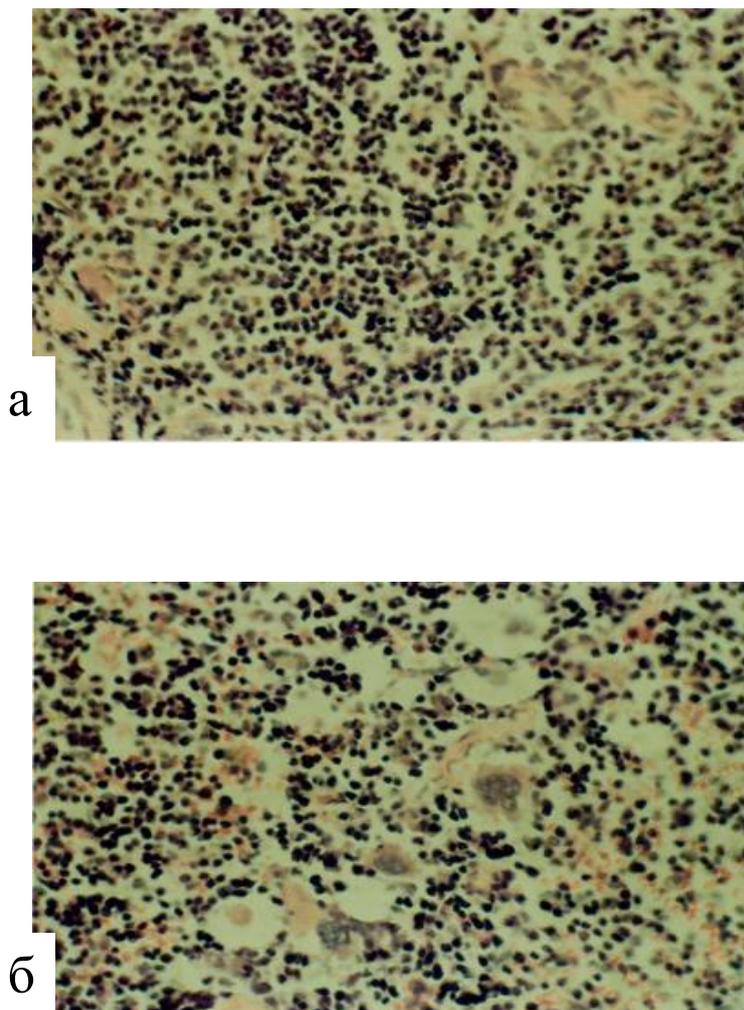


Рис. 6. Селезенка мыши на 11-е сутки после заражения вирусом гриппа А(Н1N1).

- а) Разрежение и отек лимфоидной ткани белой пульпы.
 - б) Дисконкомплексация ткани и отек красной пульпы. Некроз капилляров и макрофагов.
- Окраска гематоксилином и эозином. х 200; х 200.