



## Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar

Марченко В.А.<sup>1</sup>, Барашкова С.В.<sup>2</sup>, Зелинская И.А.<sup>2</sup>, Торопова Я.Г.<sup>2</sup>, Сорокин Е.В.<sup>1</sup>, Жилинская И.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время установлено, что кровеносные сосуды являются мишенью для вируса гриппа, однако механизм его воздействия на сердечно-сосудистую систему неизвестен.

**Цель** исследования – адаптация штамма вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) к половозрелым крысам стока Wistar, так как эти животные являются основной экспериментальной моделью при изучении патологии сердечно-сосудистой системы.

**Материал и методы.** Для исследования использовали 33 крысы стока Wistar, составивших 11 групп, включая контрольную. В каждой группе было по 3 животных. Вирус гриппа А (ВГА) пассировали в 10–12-дневных куриных эмбрионах. Инокуляцию вирусосодержащего материала проводили интраназально в объеме 0,2 мл. Через 24 ч после инфицирования животных подвергали наркотизации и некропии с целью получения лёгочного гомогената. Титр ВГА в гомогенатах лёгких крыс определяли в куриных эмбрионах. На последних пассажах выявляли гистологические изменения в тканях и сосудах лёгких, а также проводили иммуногистохимическое исследование для идентификации ВГА.

**Результаты.** Инфекционный титр вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) в гомогенатах лёгких инфицированных крыс стока Wistar на последнем этапе адаптации составил 7,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Гистологические исследования выявили выраженные изменения со стороны респираторного тракта (спазм бронхиол, отёк подслизистого слоя, слушивание реснитчатых эпителиальных клеток бронхиол) и лёгочных сосудов (спазм, десквамацию и набухание эндотелиоцитов, разволокнение и набухание эластической мембраны и меди). С целью идентификации ВГА в кровеносных сосудах и тканях лёгких выполняли иммуногистохимическое исследование с использованием моноклональных антител к NP-антигену ВГА.

**Заключение.** Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что штамм вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) был адаптирован к половозрелым крысам стока Wistar с сохранением вирулентных свойств. Инфекционный титр вируса на последнем этапе адаптации составил 7,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Идентификация ВГА подтверждена иммуногистохимическим исследованием.

**Ключевые слова:** вирус гриппа; крысы; кровеносные сосуды; лёгкие; иммуногистохимия; гистология.

**Для цитирования:** Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Сорокин Е.В., Жилинская И.Н. Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(3): 159-166. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166>

**Для корреспонденции:** Марченко Владимир Александрович, аспирант очной формы обучения, лаборант-исследователь лаборатории системной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург. E-mail: [vmarcenco@mail.ru](mailto:vmarcenco@mail.ru)

**Участие авторов:** Марченко В.А. – культивирование вируса гриппа, адаптация вируса на крысах, статистическая обработка данных, подбор данных литературы; Барашкова С.В. – иммуногистохимическое и морфометрические исследования; Зелинская И.А. – проводка материала для последующего иммуногистохимического исследования; Торопова Я.Г. – фиксация материала для последующего иммуногистохимического исследования; Сорокин Е.В. – получение моноклональных антител к NP-антигену вируса гриппа А; Жилинская И.Н. – написание научной статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.05.2020

Принята в печать 16.05.2020

### Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats

Vladimir A. Marchenko<sup>1</sup>, Svetlana V. Barashkova<sup>2</sup>, Irina A. Zelinskaya<sup>2</sup>, Yana G. Toropova<sup>2</sup>, Evgeniy V. Sorokin<sup>1</sup>, Irina N. Zhilinskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, 197376, Russia;

<sup>2</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, 197341, Russia

It has now been established that blood vessels are target for influenza, but the mechanism by which the influenza virus affects the cardiovascular system is unknown.

**The aim** – adaptation of influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) to mature Wistar rats, as these animals are the main experimental model for studying the pathology of the cardiovascular system.

**Material and methods.** Passage of influenza A virus (IAV) in embryonated chicken eggs, intranasal inoculation of rats with virus-containing material s, production of pulmonary homogenate, determination of IAV titer in embryonated chicken eggs, detection of histological changes in lung and pulmonary vessels.

**Results.** The article presents the results of the adaptation of influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) to mature Wistar rats. The infectious titer of the virus in the homogenates of infected rats lungs at the last stage of adaptation was 7.0 lg EID<sub>50</sub>/ml. Histological studies revealed pronounced changes in the respiratory tract (spasm of bronchioles, submucosal edema, desquamation of ciliated epithelium of bronchioles) and pulmonary vessels (spasm, desquamation and swelling of endotheliocytes, dissociation and swelling of the elastic membrane and media). In order to identify IAV in blood vessels and lung tissues, an immunohistochemical study was performed using monoclonal antibodies to NP antigen of IAV.

**Conclusion.** The data obtained allow us to conclude that the strain of influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) was adapted to mature Wistar rats maintaining virulent properties. The infectious titer of the virus at the last stage of adaptation was 7.0 lg EID<sub>50</sub>/ml. IAV identification is confirmed by immunohistochemical examination.

**Keywords:** influenza virus; rats; blood vessels; lungs; immunohistochemistry; histology.

**For citation:** Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya.G., Sorokin E.V., Zhilinskaya I.N. Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(3): 159-166. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166>

**For correspondence:** Vladimir A. Marchenko, graduate student, research assistant of Laboratory of systemic virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russia. E-mail: vmarcenco@mail.ru

#### Information about the authors:

Marchenko V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6870-3157>  
Barashkova S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5618-4510>  
Zelinskaya I.A., <https://orcid.org/0000-0002-1971-3444>  
Toropova Ya.G., <https://orcid.org/0000-0003-1629-7868>  
Sorokin E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1732-1727>  
Zhilinskaya I.N., <https://orcid.org/0000-0002-0084-1323>

**Contribution:** Marchenko V.A. – cultivation of influenza virus, virus adaptation in Wistar rats, statistical data analysis, literature search; Barashkova S.V. – immunohistochemistry assay, morphometric assay; Zelinskaya I.A. – tissue preparation for IHC assay; Toropova Ya.G. – fixation of material for IHC assay; Sorokin E.V. – production of monoclonal antibodies for NP antigen of influenza virus A; Zhilinskaya I.N. – writing of the scientific article.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 05 May 2020  
Accepted 16 May 2020

## Введение

В настоящее время установлено, что система гемостаза и эндотелий кровеносных сосудов являются новыми мишенями для гриппа. Это открывает новые аспекты патогенеза вирусной инфекции и, соответственно, новые подходы к лечению. Особенно тяжёлая клиническая картина наблюдалась у больных гриппом во время эпидемий 1918–1920, 2009 и 2015–2016 гг.: носовые кровотечения, геморрагии на коже и слизистых, микрогематурия, острый респираторный дистресс-синдром и синдром диссеминированного внутрисосудистого свёртывания [1–4]. Кроме того, для гриппа характерна высокая частота осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы, прежде всего у больных с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями [5–8]. Все эти данные указывают на необходимость выяснения механизмов воздействия вируса гриппа на сердечно-сосудистую систему. Для решения проблемы следует смоделировать гриппозную инфекцию на крысах, так как эти животные являются основной экспериментальной моделью при изучении механизмов патологии сердечно-сосудистой системы [9–11]. Крысы в качестве модели для экспериментальной гриппозной инфекции

не так широко используются как мыши, хорьки и другие лабораторные животные, поскольку у них грипп не вызывает летального исхода. Кроме того, наиболее чувствительны к гриппу новорождённые и 60-дневные крысы (линии F-344 и Sprague-Dawley) [12].

**Цель** исследования – моделирование гриппозной инфекции на половозрелых самцах крыс стока Wistar, так как именно на них разработаны релевантные модели сердечно-сосудистой патологии.

## Материал и методы

**Лабораторные животные.** Для исследований использовали 33 самцов крыс стока Wistar в возрасте от 3 до 5 мес, массой тела 230–250 г. Животных поделили случайным отбором по массе тела так, чтобы индивидуальный показатель входил в диапазон вариации  $\pm 10\%$  от среднего значения. Поскольку для процесса адаптации требуется в среднем 10–12 пассажей вируса, в исследовании было использовано 10 групп, в каждой по 3 животных (на каждый пассаж вируса приходилось по одной группе). В качестве контроля использовали группу, состоящую также из 3 животных. Крыс держали в отдельном боксе (с целью исключения контакта с другими лабо-

раторными животными), на полном пищевом рационе, соответствующем 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 (через 24 ч после инфицирования).

*Вирус.* Для адаптации вируса гриппа к крысам был выбран штамм А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09), полученный из лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Выбор данного изолята был основан на клинических исследованиях вируса H1N1(pdm09), вызывавшего вирусные геморрагические пневмонии [13]. Перед адаптацией вирус был трижды пассирован через куриные эмбрионы для повышения титра инфекционной активности (до  $9 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ ). Инфекционную активность вируса гриппа во время адаптации определяли на куриных эмбрионах, начиная с 4-го пассажа. Для этого готовили 10-кратные разведения вируса в 4,5 мл фосфатно-солевого буфера, а затем вводили по 0,2 мл вирусосодержащей жидкости из разведений от  $10^{-3}$  до  $10^{-8}$ , используя на каждое разведение по 5 эмбрионов. Куриные эмбрионы инкубировали при  $35^\circ\text{C}$  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% суспензии куриных эритроцитов. Через 30–40 мин контакта при комнатной температуре, после оседания эритроцитов в контроле, проводили учёт гемагглютинации.

*Адаптация вируса гриппа в лёгких крыс.* Адаптацию вируса гриппа проводили путём серии из 10 пассажей через лёгкие животных. Крысам 1-й группы ( $n = 3$ ) интраназально инокулировали 0,2 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Спустя 24 ч после инфицирования проводили эвтаназию изофлураном. В стерильных условиях крыс вскрывали и выделяли лёгкие, после чего делали 10% гомогенат лёгких в культуральной среде alpha-MEM. Гомогенат центрифугировали при относительном центробежном ускорении  $1000g$  в течение 10 мин для осаждения клеточного дебриса, затем супернатант аликвотировали и хранили при  $-80^\circ\text{C}$ . Аликвоты с гомогенатами, которые имели наибольшие титры инфекционной активности вируса, были выбраны для следующих пассажей.

*Гистологическое исследование.* Для исследования гистопатологических изменений в тканях и кровеносных сосудах лёгких были выбраны 9-й и 10-й пас-

сажи. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 ч 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 гематоксилином и 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 контрольной группы за 24 ч до вскрытия интраназально инокулировали 0,2 мл культуральной среды alpha-MEM.

*Иммуногистохимическое исследование.* С парафиновых блоков лёгких крыс, инфицированных исследуемым вирусом 9-го и 10-го пассажей, изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм и помещали их на предметные стёкла с поли-L-лизинным покрытием (Thermo Scientific, США). Для обнаружения вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах лёгких 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 ч при комнатной температуре во влажной камере. Для детекции NP-антигена в аутопсийном материале использовали систему визуализации фирмы Novocastra (Германия), включающую реакцию с DAB-хромогеном.

Для количественной оценки интенсивности экспрессии NP-антигена вируса гриппа проводили морфометрические исследования, в ходе которых выполняли микрофотографирование микропрепаратов, обработанных моноклональными антителами к NP-антигену и выявленных с помощью иммуногистохимического метода, на микроскопе Nikon Eclipse E200 с цифровой камерой Nikon DS-Fi1 и программным обеспечением Nis-Elements F3.2 с постоянными параметрами: разрешение Fast (Focus) –  $1280 \times 960$  пикселей, Quality (Capture) –  $2560 \times 1920$  пикселей; Exposure 30 мс (объектив  $\times 40$ ); Gain 1,70 $\times$ ; Contrast Enhanced; Advanced – Hemotoxilin, Red 1,05, Green 0,82, Blue 1,90 [14]. Предварительно калибровали объектив Nikon E Plan 40 $\times$ /0,65 WD 0,65 с использованием объект-микрометра 0–1 мм / 100 (Nikon).

Фотосъёмку кровеносных сосудов лёгких крыс проводили на шести произвольно выбранных полях зрения с увеличением  $\times 40$ . Поля зрения с артериальными изменениями и дефектами окрашивания исключали при фотосъёмке. Морфоме-

трическую обработку полученных снимков осуществляли в программе Nis-Elements BR 4,40 (Nikon) при постоянных настройках с использованием бинаризации по синему каналу в автоматическом режиме с постоянными значениями порога (11–100), затем вручную удаляли ненужные объекты [14]. Среднюю интенсивность сигнала вычисляли как среднюю арифметическую интенсивности каждого пикселя (I) в RGB-модели (кодировка цвета с помощью трёх основных цветов: красного (R), зеленого (G) и синего (B)) по формуле:

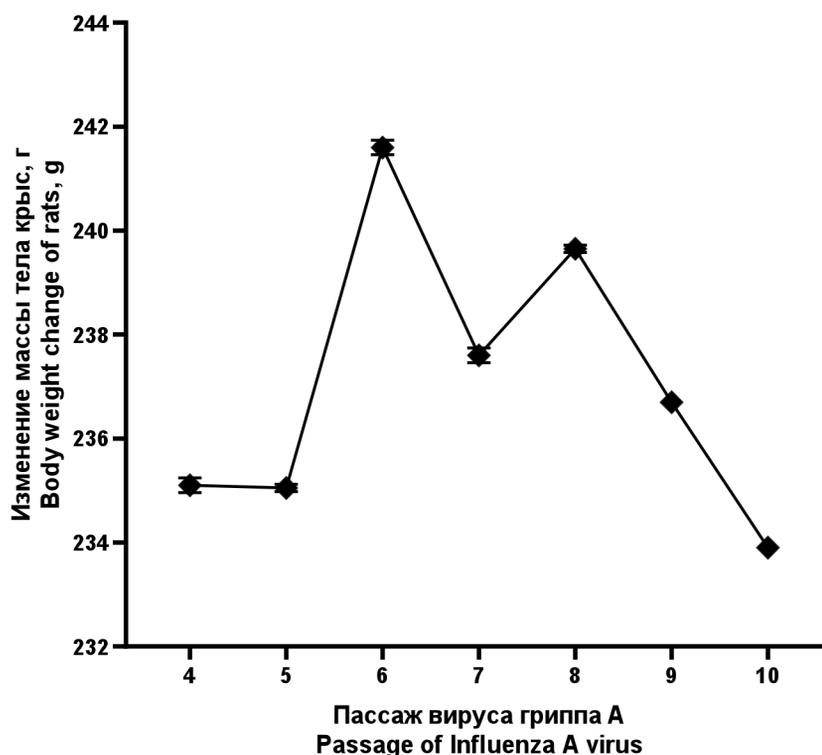
$$I = 1/3 (R + G + B).$$

Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента, непараметрического критерия Фридмана (ANOVA) и Манна–Уитни с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2016 и Statistica 8.0. Различия считали статистически значимыми для значений  $p < 0,05$ . Для представления полученных данных использовали показатели описательной статистики: среднеарифметическое значение и стандартное отклонение.

### Результаты

**Клинические симптомы, изменение массы тела.** В периоде адаптации у инфицированных крыс стока Wistar клинических симптомов не наблюдалось. Изменение массы тела крыс через 1 сут после инфицирования представлено на **рис. 1**.

**Инфекционная активность вируса.** Полученные результаты указывают на активную репродукцию вируса гриппа в лёгких половозрелых крыс стока Wistar (см. **таблицу**). Для дальнейшего исследования бы-



**Рис. 1.** Изменение массы тела крыс на разных пассажах вируса А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) через 24 ч после инфицирования. Показаны стандартные отклонения по трём повторам ( $p < 0,05$ ). Статистически значимых отличий не выявлено.

**Fig. 1.** Comparison of the change in body weight of rats at different passages of the influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) after 24 hours post infection. A standard deviation for 3 repetitions is shown ( $p < 0,05$ ). No statistically significant differences were found.

ли выбраны вирусы, прошедшие 9-й и 10-й пассажи в лёгких крыс. Выбор этих пассажей согласовывался с данными об инфекционной активности вирусов гриппа у новорождённых и 60-дневных крыс [12, 15].

**Гистологическое исследование.** Для гистопатологических исследований были выбраны кровеносные сосуды и ткани лёгких крыс, инфицированных вирусом гриппа на 9-м и 10-м пассажах. На **рис. 2** показано, как в артериоле среднего калибра в 9-м пассаже по сравнению с контролем наблюдали выраженное разволокнение и набухание меди артериолы, десквамацию эндотелия (по типу «частокола»), нити фибрина в просвете артериолы. На **рис. 3** представлены гистопатологические изменения со стороны артериолы мелкого калибра в 9-м пассаже: выраженный спазм, набухшие эндотелиоциты, местами набухание ядер, эластической мембраны и меди. На **рис. 4** представлены гистопатологические изменения со стороны мерцательного эпителия респираторного тракта в 9-м пассаже: слущивание мерцательного эпителия бронхиол и отёк подслизистого слоя бронхиол. В лёгких крыс контрольной группы патологических изменений не отмечено (**рис. 5**). На **рис. 6** и **7** показаны гистопатологические изменения со стороны сосудов и лёгочной паренхимы в 10-м пассаже: невыраженный спазм артериолы

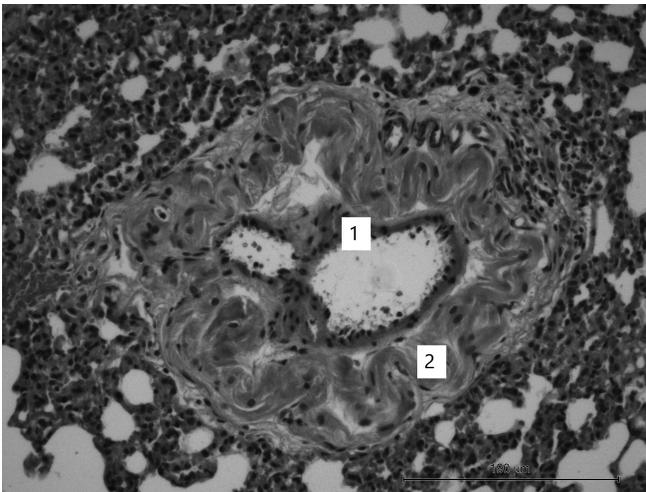
Результаты титрования вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) на куриных эмбрионах\*

The results of titration of the influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) in embryonated chicken eggs\*

Пассаж, № Number of passage	Инфекционная активность вируса гриппа, lg ЭИД <sub>50</sub> /мл Virus titer, lg EID <sub>50</sub> /ml
4	6,0 ± 0
5	5,2 ± 0,3
6	6,2 ± 0,3
7	6,2 ± 0,3
8	6,2 ± 0,3
9	6,6 ± 0,2
10	7,0 ± 0

**Примечание.** \* Данные представлены как lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Показаны стандартные отклонения по пяти повторам ( $p < 0,05$ ).

**Note.** \* Data expressed as lg EID<sub>50</sub>/ml. A standard deviation for 5 repetitions is shown ( $p < 0.05$ ).

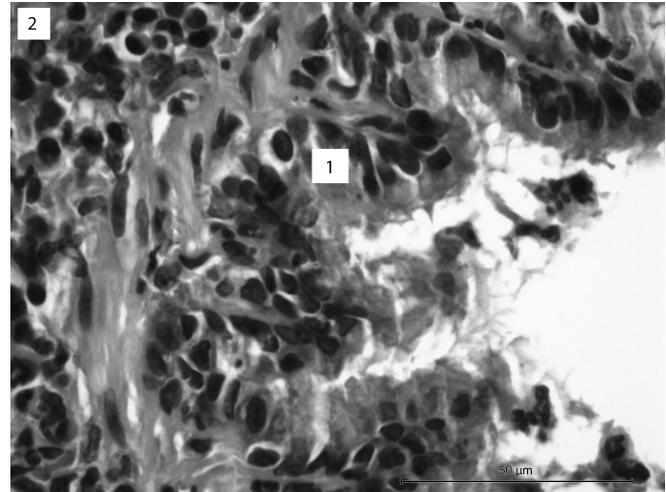


**Рис. 2.** Гистопатологические изменения в артериоле среднего калибра в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 100$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

**Fig. 2.** Histopathological changes in medium caliber arteriole; 9<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 100$ ; haematoxylin and eosin staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.

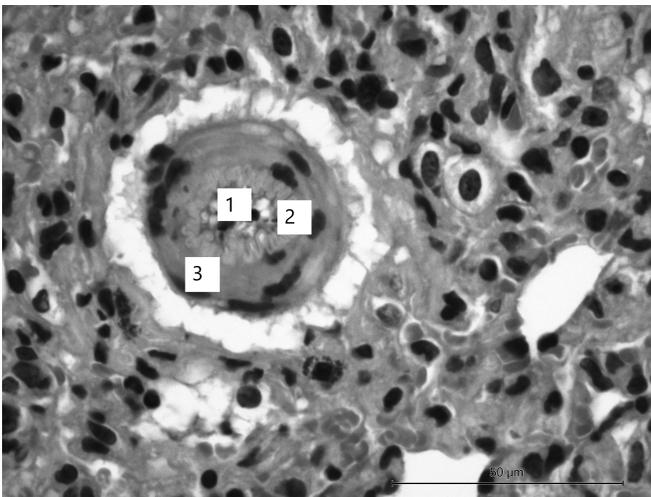


**Рис. 4.** Гистопатологические изменения в мерцательном эпителии в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – мерцательный эпителий; 2 – подслизистый слой бронхиол.

**Fig. 4.** Histopathological changes in ciliated epithelium; 9<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 40$ ; haematoxylin and eosin staining).

1 – ciliated epithelium; 2 – submucosa of bronchioles.

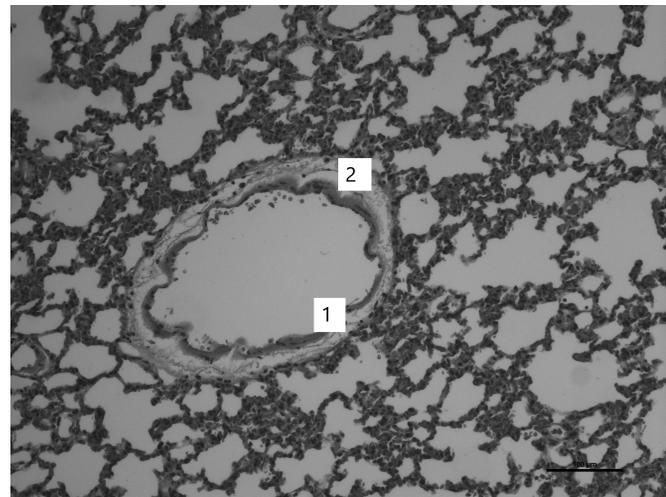


**Рис. 3.** Гистопатологические изменения в артериоле малого калибра в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда, 3 – мерцательный эпителий.

**Fig. 3.** Histopathological changes in small caliber arteriole; 9<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 40$ ; haematoxylin and eosin staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media, 3 – ciliated epithelium.



**Рис. 5.** Контрольный срез ткани и кровеносного сосуда лёгких у неинфицированной крысы (ув.  $\times 100$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

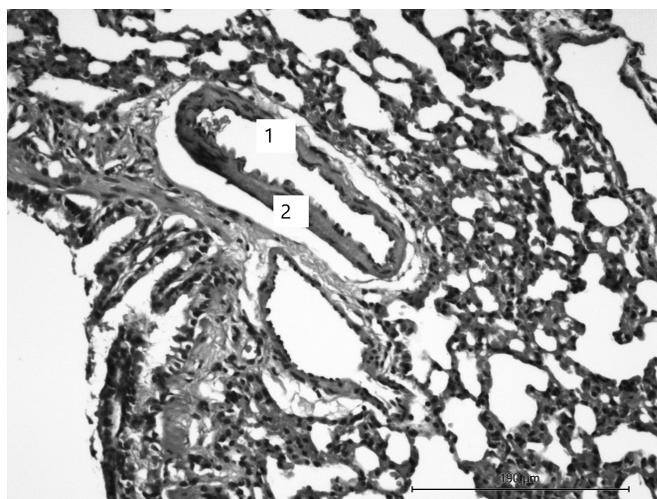
**Fig. 5.** Control of tissue section of lungs and pulmonary blood vessel in uninfected rat (Magnification  $\times 100$ ; haematoxylin and eosin staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.

и дистрофические явления в мерцательном эпителии респираторного тракта, слушивание мерцательного эпителии бронхиол, отёк и спазм.

**Иммуногистохимическое исследование.** Иммуногистохимическим методом определяли NP-белок вируса гриппа в 9-м и 10-м пассажах. На **рис. 8** по-

казана умеренная экспрессия NP-антигена в гладкомышечном слое и незначительная – в интерстиции и эндотелии сосуда. На **рис. 9** в том же пассаже удалось выявить умеренную экспрессию антигена в мерцательном эпителии и выраженную – в антиген-презентирующих клетках. В 10-м пас-

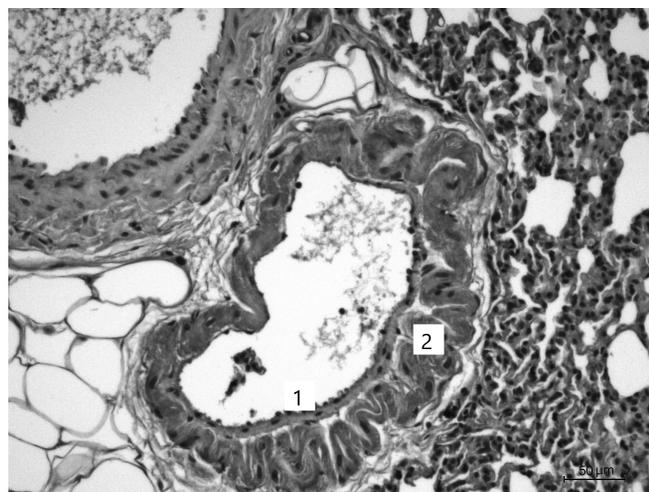


**Рис. 6.** Гистопатологические изменения в артериоле среднего калибра в 10-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 100$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

**Fig. 6.** Histopathological changes in medium caliber arteriole; 10<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 100$ ; haemotoxylin and eosin staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.

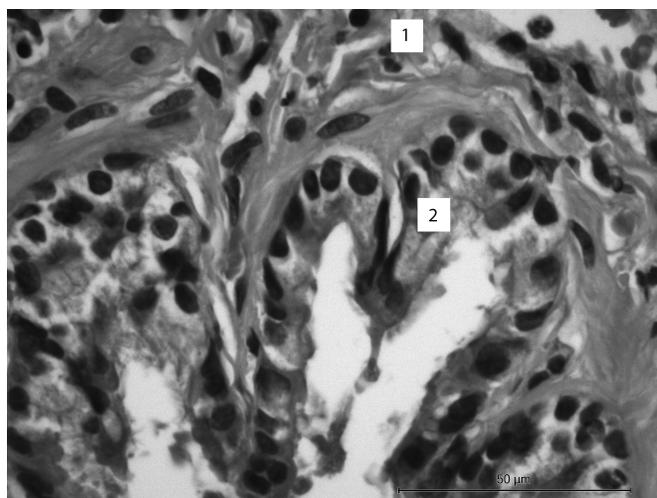


**Рис. 8.** Иммуногистохимический анализ локализации NP-антигена вируса гриппа в артериоле крупного калибра в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание DAB-хромогеном).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

**Fig. 8.** Immunohistochemical analysis of localization of the NP-antigen of influenza virus in large caliber arteriole; 9<sup>th</sup> passage of the influenza virus (magnification  $\times 40$ ; DAB chromogen staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.

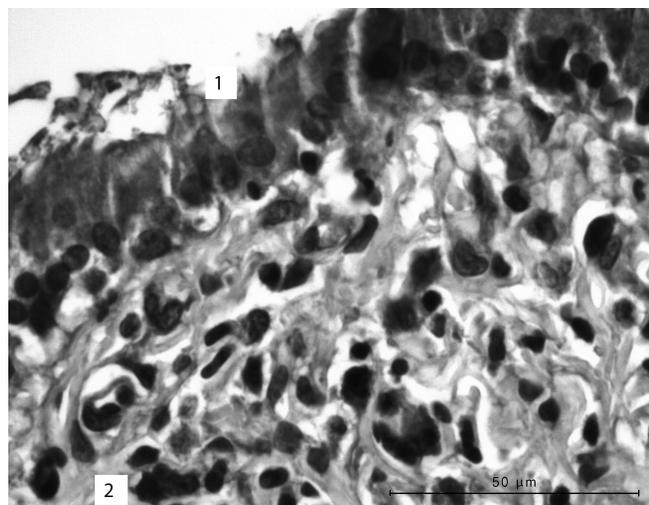


**Рис. 7.** Гистопатологические изменения в мерцательном эпителии в 10-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – мерцательный эпителий; 2 – подслизистый слой бронхиол.

**Fig. 7.** Histopathological changes in ciliated epithelium; 10<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 40$ ; haemotoxylin and eosin staining).

1 – ciliated epithelium; 2 – submucosa of bronchioles.



**Рис. 9.** Иммуногистохимический анализ локализации NP антигена вируса гриппа в мерцательном эпителии в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание тканей DAB-хромогеном).

1 – мерцательный эпителий; 2 – тканевой макрофаг.

**Fig. 9.** Immunohistochemical analysis of localization of the NP antigen of influenza virus in ciliated epithelium; 9<sup>th</sup> passage of the influenza virus (magnification  $\times 40$ ; DAB chromogen staining).

1 – ciliated epithelium; 2 – tissue-resident macrophage.

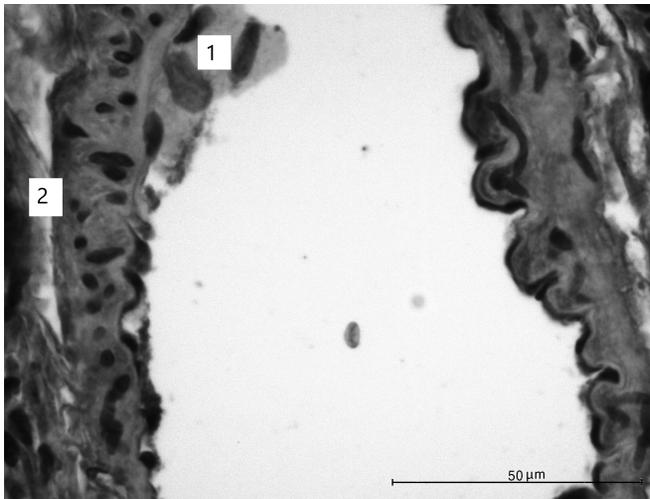
саже обнаруживалась незначительная экспрессия NP-антигена в эндотелии и слабая в меди сосуда (рис. 10). Иммуногистохимическое исследование не выявило присутствия NP-антигена вируса гриппа А в контрольных срезах сосудов и тканях лёгких крыс (рис. 11).

Средняя интенсивность экспрессии NP-антигена

в кровеносных сосудах в 9-м и 10-м пассажах варьировала в пределах 101,24–126,61.

### Обсуждение

Проведённые исследования показали, что уже через 1 сут после инфицирования половозрелых самцов крыс стока Wistar вирусом гриппа развивалась грип-

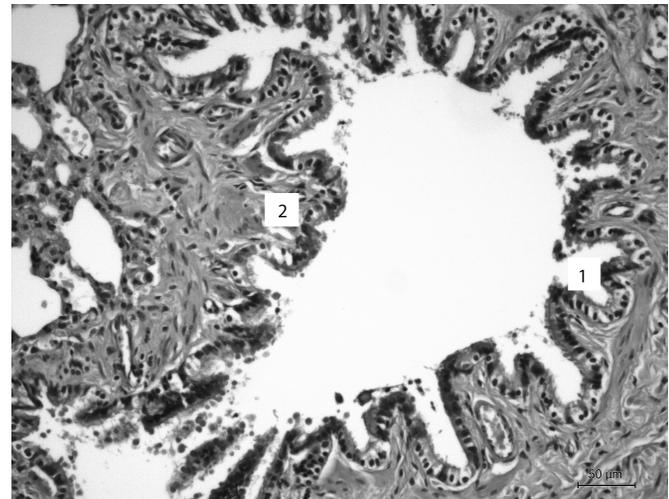


**Рис. 10.** Иммуногистохимический анализ локализации NP-антигена вируса гриппа в артериоле крупного калибра в 10-м пассаже (ув.  $\times 40$ ; окрашивание DAB-хромогеном).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

**Fig. 10.** Immunohistochemical analysis of localization of the NP antigen of influenza virus in large caliber arteriole; 10<sup>th</sup> passage of the influenza virus (magnification  $\times 40$ ; DAB chromogen staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.



**Рис. 11.** Иммуногистохимический анализ локализации NP-антигена вируса гриппа в ткани лёгких у крыс, не заражённых вирусом гриппа (ув.  $\times 100$ ; окрашивание тканей DAB-хромогеном).

1 – мерцательный эпителий; 2 – подслизистый слой бронхиол.

**Fig. 11.** Immunohistochemical analysis of localization of the NP antigen of influenza virus in lung tissue of uninfected rats (magnification  $\times 100$ ; DAB chromogen staining).

1 – ciliated epithelium; 2 – submucosa of bronchioles.

позная нелетальная инфекция, как и в случае инфицирования новорождённых и 60-дневных крыс линий Sprague-Dawley и Fischer-344. При этом в процессе адаптации вируса гриппа масса тела заражённых крыс не снижалась. Это согласуется с данными, полученными на крысах Sprague-Dawley и Fischer-344 [8]. Кроме того, инфекционная активность вируса гриппа с 4-го до 10-го пассажа включительно (от 6,0 до 7,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл) указывает на интенсивную репродукцию вируса в лёгких. Репродукция вируса гриппа была также подтверждена детекцией NP-антигена вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах (артериях и венах) лёгких. В процессе репродукции исследуемого вируса были выявлены гистопатологические изменения как в кровеносных сосудах, так и в тканях лёгких крыс (геморрагический экссудат в просвете бронхов, спазм и отёк бронхиол, слущивание мерцательного эпителия бронхиол, неравномерная воздушность и мелкие очаги с экссудатом в лёгочной ткани, инфильтрация мононуклеарных клеток, присутствие апоптотных телец), что соответствует гистопатологическим изменениям, которые были зарегистрированы в аутопсийном материале у взрослых пациентов, умерших в 2009 г. от вируса гриппа А/(H1N1)pdm09 [13]. На основании полученных гистопатологических и иммуногистохимических данных был сделан вывод о том, что для дальнейших исследований целесообразно использовать вирус гриппа, прошедший 9 пассажей через лёгкие крыс стока Wistar.

### Заключение

В ходе данного исследования установлено, что штамм вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 способен вызывать продуктивную

инфекцию у половозрелых крыс стока Wistar. Это подтверждено относительно высокой инфекционной активностью вируса в гомогенатах лёгких инфицированных крыс на последних пассажах (6,6–7,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл). Репродукция вируса гриппа подтверждена детекцией NP-антигена вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах лёгких иммуногистохимическим методом. Кроме того, в процессе адаптации исследуемого вируса были выявлены гистопатологические изменения как в кровеносных сосудах, так и в тканях лёгких крыс. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что половозрелые крысы стока Wistar могут служить экспериментальной моделью при изучении воздействия гриппозной инфекции на сердечно-сосудистую систему.

### ЛИТЕРАТУРА

- Opie E.L. The pathologic anatomy of influenza based chiefly on American and British sources. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1928; 5(2): 285-303.
- Lobo S.M., Watanabe A.S.A., Salomão M.L.M., Queiroz F., Gandolfi J.V., de Oliveira N.E., et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness. *J. Clin. Virol.* 2019; 116: 62-8. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.003>
- Fukunaga S., Ishida C., Nakaoka A., Ito T. A case of acute kidney injury and disseminated intravascular coagulation associated with influenza B viral infection. *CEN Case Rep.* 2014; 4(1): 95-100. DOI: <http://doi.org/10.1007/s13730-014-0147-9>
- Watanabe T., Yoshikawa H., Abe Y., Yamazaki S., Uehara Y., Abe T. Renal involvement in children with influenza A virus infection. *Pediatr. Nephrol.* 2003; 18(6): 541-4. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00467-003-1143-z>
- Sellers S.A., Hagan R.S., Hayden F.G., Fischer W.A. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2017; 11(5): 372-93. DOI: <http://doi.org/10.1111/irv.12470>

6. Vardeny O., Solomon S.D. Influenza and hearth failure: a catchy co-morbid combination. *JACC: Hearth Fail.* 2018; 7(2): 118-20. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.11.008>
7. Pearce D.C., McCaw J.M., McVernon J., Mathews J.D. Influenza as a trigger for cardiovascular disease: An investigation of serotype, subtype and geographic location. *Environ. Res.* 2017; 156: 688-96. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.024>
8. Mamas M.A., Fraser D., Neyses L. Cardiovascular manifestations associated with influenza virus infection. *Int. J. Cardiol.* 2008; 130(3): 304-9.
9. Vivaldi M.T., Kloner R.A., Schoen F.J. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am. J. Pathol.* 1985; 121(3): 522-30.
10. Bianchi G., Fox U., Imbaschiati E. Development of a strain of spontaneously hypertensive rat. *Life Sciences.* 1974; 14(2): 339-47.
11. Doggrel S.A., Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research.* 1998; 39(1): 89-105. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00076-5](http://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00076-5)
12. Daniels M.J., Selgrade M.K., Doerfler D., Gilmour M.I. Kinetic profile of influenza virus infection in three rat strains. *Comp. Med.* 2003; 53(3): 293-8.
13. Цинзерлинг В.А., Воробьев С.Л., Зарубаев В.В., Дедов В.А., Беляевская С.В., Эсауленко Е.В. и др. Патогенетические аспекты гриппа в период эпидемии, вызванной вирусом А/Н1N1v в 2009-2010 гг., по аутопсии. *Архив патологии.* 2011; 73(6): 21-5.
14. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology.* 2006; 49(4): 411-24. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>
15. Ibanes J.D., Morgan K.T., Burlison G.R. Histopathological changes in the upper respiratory tract of F344 rats following infection with a rat-adapted influenza virus. *Vet. Pathol.* 1996; 33(4): 412-8. DOI: <http://doi.org/10.1177/030098589603300407>
3. Fukunaga S., Ishida C., Nakaoka A., Ito T. A case of acute kidney injury and disseminated intravascular coagulation associated with influenza B viral infection. *CEN Case Rep.* 2014; 4(1): 95-100. DOI: <http://doi.org/10.1007/s13730-014-0147-9>
4. Watanabe T., Yoshikawa H., Abe Y., Yamazaki S., Uehara Y., Abe T. Renal involvement in children with influenza A virus infection. *Pediatr. Nephrol.* 2003; 18(6): 541-4. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00467-003-1143-z>
5. Sellers S.A., Hagan R.S., Hayden F.G., Fischer W.A. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2017; 11(5): 372-93. DOI: <http://doi.org/10.1111/irv.12470>
6. Vardeny O., Solomon S.D. Influenza and hearth failure: a catchy co-morbid combination. *JACC: Hearth Fail.* 2018; 7(2): 118-20. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.11.008>
7. Pearce D.C., McCaw J.M., McVernon J., Mathews J.D. Influenza as a trigger for cardiovascular disease: An investigation of serotype, subtype and geographic location. *Environ. Res.* 2017; 156: 688-96. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.024>
8. Mamas M.A., Fraser D., Neyses L. Cardiovascular manifestations associated with influenza virus infection. *Int. J. Cardiol.* 2008; 130(3): 304-9.
9. Vivaldi M.T., Kloner R.A., Schoen F.J. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am. J. Pathol.* 1985; 121(3): 522-30.
10. Bianchi G., Fox U., Imbaschiati E. Development of a strain of spontaneously hypertensive rat. *Life Sciences.* 1974; 14(2): 339-47.
11. Doggrel S.A., Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research.* 1998; 39(1): 89-105. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00076-5](http://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00076-5)
12. Daniels M.J., Selgrade M.K., Doerfler D., Gilmour M.I. Kinetic profile of influenza virus infection in three rat strains. *Comp. Med.* 2003; 53(3): 293-8.
13. Tsinzerling V.A., Vorob'ev S.L., Zarubaev V.V., Dedov V.A., Belyaevskaya S.V., Esaulenko E.V., et al. Pathogenic aspects of influenza during the epidemics caused by H1N1v virus in 2009-2010. *Архив патологии.* 2011; 73(6): 21-5. (in Russian)
14. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology.* 2006; 49(4): 411-24. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>
15. Ibanes J.D., Morgan K.T., Burlison G.R. Histopathological changes in the upper respiratory tract of F344 rats following infection with a rat-adapted influenza virus. *Vet. Pathol.* 1996; 33(4): 412-8. DOI: <http://doi.org/10.1177/030098589603300407>

#### REFERENCES

1. Opie E.L. The pathologic anatomy of influenza based chiefly on American and British sources. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1928; 5(2): 285-303.
2. Lobo S.M., Watanabe A.S.A., Salomão M.L.M., Queiroz F., Gandolfi J.V., de Oliveira N.E., et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness. *J. Clin. Virol.* 2019; 116: 62-8. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.003>