

Панкреотоксический эффект вируса гриппа А/Н1N1-Калифорния у мышей на фоне гипергликемии, вызванной введением стрептозотоцина

О.П. Молодых, Н.А. Пальчикова, В.Г. Селятицкая, А.В. Глущенко, О.Г. Курская

ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Резюме

Особое внимание в изучении коморбидных состояний уделяется вирусным заболеваниям, в частности, вызванных вирусом пандемического гриппа типа А субтипа Н1N1, как одним из самых патогенных и контагиозных. Изучение влияния этого вируса при развитии сахарного диабета позволит с большей эффективностью осуществлять доклинические исследования по поиску наиболее эффективных методов лечения вирусной инфекции на фоне предсуществующей соматической патологии. Цель настоящей работы – оценить панкреотоксический эффект воздействия вируса гриппа А/Н1N1-Калифорния при развитии стрептозотоцинового диабета у мышей линий DBA/2 и BALB/c. **Материал и методы.** Формировали группы мышей DBA/2 ($n = 36$) и BALB/c ($n = 58$): инфицированных вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния (в разных дозах); с введением раствора стрептозотоцина в дозе 150 мг/кг; при сочетанном применении агентов. Оценивали продолжительность жизни, содержание в крови глюкозы и инсулина, патоморфологические изменения поджелудочной железы (ПЖ). **Результаты и их обсуждение.** Гибель животных наблюдали только у мышей линии DBA/2: при введении стрептозотоцина – 12,5 %, при интраназальном заражении вирусом (в дозе 5,7 lg TCID₅₀) – 80 %, при сочетанном воздействии – 78 %. Сравнительное исследование мышей линий DBA/2 и BALB/c показало возможность использования мышей обеих линий для изучения сочетанного воздействия вируса гриппа А/Н1N1 и экспериментального диабета с учетом дозы инфицирования. Заражение мышей BALB/c вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния обусловило формирование морфологических изменений только в экзокринной части ПЖ. У мышей обеих линий после введения стрептозотоцина сформировалась стойкая гипергликемия, а патоморфологические изменения ПЖ регистрировались преимущественно в эндокринной части. Аналогичные изменения ПЖ, но более тяжелые, с вовлечением экзокринной зоны, были найдены при последующем инфицировании: у мышей линии DBA/2 – в виде очагового нарушения ацинарного строения с дегенерацией ациноцитов и компенсаторной регенераторной реакцией клеток в неповрежденных участках, у мышей линии BALB/c – в виде более значительного, чем у DBA/2, повреждения протоковой системы с формированием мощных перидуктального фиброза и мононуклеарных инфильтратов. **Заключение.** Сравнительное исследование показало, что у мышей DBA/2 наблюдались более выраженные изменения как экзокринного, так и эндокринного аппарата ПЖ при инфицировании вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния и моделировании сахарного диабета.

Ключевые слова: экспериментальный диабет, стрептозоточин, вирус гриппа А/Н1N1-Калифорния, поджелудочная железа, глюкоза, инсулин, морфология, морфометрия.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России по Государственному заданию.

Автор для переписки: Молодых О.П., e-mail: opmolodykh@frcftm.ru

Для цитирования: Молодых О.П., Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г., Глущенко А.В., Курская О.Г. Панкреотоксический эффект вируса гриппа А/Н1N1-Калифорния у мышей на фоне гипергликемии, вызванной введением стрептозотоцина. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(1):47–58. doi: 10.18699/SSMJ20230105

Pancreatic toxicity of influenza A/H1N1-California virus infection in mice at the background of hyperglycemia induced by streptozotocin administration

O.P. Molodykh, N.A. Palchikova, V.G. Selyatitskaya, A.V. Glushchenko, O.G. Kurskaya

Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakova str., 2

Abstract

Particular attention in the study of comorbid conditions is paid to viral diseases, in particular, those caused by the pandemic influenza virus type A subtype H1N1, as one of the most pathogenic and contagious. Investigation of the effect of this virus in the development of diabetes mellitus will make it possible to more effectively carry out preclinical studies to find the most effective methods of treating a viral infection against the background of a pre-existing somatic pathology. Purpose of the study was to evaluate the pancreatic toxicity effect of exposure to influenza A/H1N1-California virus in the development of streptozotocin diabetes in DBA/2 and BALB/c mice. **Material and methods.** Groups of mice DBA/2 ($n = 36$) and BALB/c ($n = 58$) were formed: infected with influenza A/H1N1-California virus (at different doses); with the introduction of a solution of streptozotocin at a dose of 150 mg / kg; with the combined use of agents. Life expectancy, blood glucose and insulin level, pathomorphological changes in the pancreas were assessed. **Results and discussion.** The death of animals was observed only in mice of the DBA/2 line: with the introduction of streptozotocin – 12.5 %, with intranasal infection with the virus (at a dose of 5.7 lg TCID₅₀) – 80 %, with combined exposure – 78 %. A comparative study of mice of the DBA/2 and BALB/c lines showed the possibility of using mice of both lines to study the combined effect of influenza A/H1N1 virus and experimental diabetes, taking into account the dose of infection. Infection of BALB/c mice caused the formation of morphological changes only in the exocrine part of the pancreas. In mice of both lines, after the administration of streptozotocin, persistent hyperglycemia was formed, and pathomorphological changes in the pancreas were recorded mainly in the endocrine part. Similar changes in the pancreas, but more severe, involving the exocrine zone, were found during subsequent infection: in mice of the DBA/2 line in the form of a focal disorder of the acinar structure with degeneration of acinocytes and a compensatory regenerative reaction of cells in intact areas; in mice of the BALB/c line in the form of more significant damage to the ductal system than in DBA/2 with the formation of powerful periductal fibrosis and mononuclear infiltrates. **Conclusions.** A comparative study showed that DBA/2 mice had more pronounced changes in both the exocrine and endocrine apparatus of the pancreas when infected with influenza A/H1N1-California virus and experimental diabetes mellitus.

Key words: experimental diabetes, streptozotocin, influenza A/H1N1-California virus, pancreas, glucose, insulin, morphology, morphometry.

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

Acknowledgements. The work was performed using the equipment of the Center for Collective Use «Proteomic Analysis», supported by funding from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation under the State Assignment.

Correspondence author: Molodykh O.P., e-mail: opmolodykh@frcftm.ru

Citation: Molodykh O.P., Palchikova N.A., Selyatitskaya V.G., Glushchenko A.V., Kurskaya O.G. Pancreatic toxicity of influenza A/H1N1-California virus infection in mice at the background of hyperglycemia induced by streptozotocin administration. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):47–58. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230105

Введение

Проблема коморбидных заболеваний смешанного этиопатогенеза особенно обострилась в связи с эпидемией COVID-19, когда было установлено, что сахарный диабет (СД) является фактором риска развития тяжелой пневмонии и септического течения этой инфекции, развития полиорганной недостаточности и повышения риска ос-

ложнений и смерти [1]. Имеются клинические и экспериментальные данные о взаимоухудшающем влиянии вирусных инфекций и СД на состояние организма. Так, острые респираторные вирусные инфекции усугубляют артериальную эндотелиальную дисфункцию у детей с СД 1 типа [2]; у пациентов с инфекционными заболеваниями СД ассоциирован с повышенным риском отдаленного летального исхода [3]; выживаемость мышей при

инфицировании вирусом гриппа H5N1 на фоне индуцированного стрептозотоцином диабета 1 типа снижена по сравнению с мышами без диабета [4]. Несомненно, что ряд вирусных инфекций может оказывать прямое влияние на морфофункциональную организацию поджелудочной железы (ПЖ): стойкая гипергликемия, повреждение β -клеток островков Лангерганса, уменьшение их численности вдвое обнаружены при различных формах герпетической инфекции человека [5]; у мышей изучен возможный механизм подавления вирусом Коксаки экспрессии гена белка PDX1, критичного для работы β -клеток ПЖ и развития диабета [6].

Особое внимание в исследованиях коморбидных состояний занимает вирус пандемического гриппа типа А субтипа H1N1 (А/Н1N1) (свиного гриппа) как один из самых распространенных, с выраженной патогенностью и контагиозностью, активно поражающий легкие, печень и сердце. Однако данные о прямом влиянии этого вируса на ПЖ разноплановы. Его антиген выявлен у мышей в клетках органов через 30 сут после инфицирования, что свидетельствовало об успешной репликации и пролонгированной персистенции вируса в организме; в то же время доказательств активной репликации в ПЖ, в частности, у хорьков, интраназально привитых вирусом гриппа H1N1 1918, не найдено; при ретроспективном анализе (пандемия 2009 г.) выявлено, что повышенный уровень глюкозы в плазме является независимым предиктором тяжести индуцированной H1N1 пневмонии, а не результатом прямого повреждения β -клеток ПЖ [7–9]. Тем не менее при создании 84 клонов мышиных моноклональных антител против H1N1 показано, что два клона специфически перекрестно реагировали с α -клетками панкреатических островков человека [10]; также обнаружено, что линия клеток ПЖ (инсулиномы) мыши может поддерживать репликацию вируса гриппа А/Н1N1/PR8 [11]. Ранее установлено, что штамм H1N1 A/California/2009 способен инфицировать клетки ПЖ млекопитающих и размножаться в них как *in vitro*, так и *in vivo*, не вызывая функциональных нарушений, характерных для диабета [12], однако другие исследователи выявили прямое патологическое действие этого вируса на ПЖ: коагуляционные инфаркты (ишемические) и выраженные поражения сосудов, приводившие к кровоизлияниям и тромбозам с последующей смертью пациентов [13]. Заражение вирусом А/Н1N1 увеличивало летальность при наличии предсуществующих не вирусных заболеваний, включая диабет [14, 15].

Изучение эффекта вируса гриппа H1N1 на состояние организма при СД у млекопитающих по-

зволяет с большей эффективностью осуществлять доклинические исследования по поиску наиболее эффективных методов лечения вирусной инфекции на фоне предсуществующей соматической патологии [16]. Цель настоящей работы – оценка панкреотоксического эффекта воздействия вируса гриппа А/Н1N1-Калифорния при развитии стрептозотоцинового диабета у широко используемых в экспериментах линий мышей DBA/2 и BALB/c, отличающихся как по показателям углеводно-жирового обмена [17], так и по чувствительности к инфекционным агентам [18].

Материал и методы

Исследование выполнено на половозрелых мышах-самцах линий DBA/2 ($n = 36$) и BALB/c ($n = 58$), полученных из питомника ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде. Эксперименты проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

В первом эксперименте мышей DBA/2 делили на 4 группы: животным группы 1 (контроль, $n = 5$) внутрибрюшинно однократно вводили 0,4 мл 0,01 М цитратного буфера; мышей группы 2 (ИНФ, $n = 5$) однократно интраназально инфицировали вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния в дозе 5,7 lg TCID₅₀, в объеме 50 мкл; животным группы 3 (стрептозотоциновый диабет – СтД, $n = 8$) однократно внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) в 0,4 мл 0,01 М цитратного буфера в дозе 150 мг/кг массы тела после 18-часового голодания; мышей группы 4 (СтД+ИНФ, $n = 18$) инфицировали интраназально вирусом H1N1-Калифорния аналогично группе 2 через 6 дней после введения стрептозотоцина. Животных групп 1 и 3 выводили из эксперимента декапитацией на 17-е сутки после введения им стрептозотоцина или буферного раствора, групп 2 и 4 – на 13-е сутки после инфицирования.

Во втором эксперименте использовали мышей линии BALB/c. Аналогично первому эксперименту, были сформированы 4 группы. Группу 1 составили контрольные животные ($n = 11$), группу 2 (ИНФ) – мыши, инфицированные вирусом H1N1-Калифорния ($n = 11$) в дозе 4,7 lg TCID₅₀ интраназально в объеме 50 мкл; группу 3 (СтД) – мыши со стрептозотоциновым диабетом ($n = 18$); группу 4 (СтД+ИНФ) – мыши с сочетанием стрептозотоцинового диабета и вирусной инфекции ($n = 18$). Мышей групп 1 и 3 выводили

из эксперимента декапитацией на 7-, 13-, 20- и 27-е сутки после введения им стрептозотоцина или буфера, групп 2 и 4 – на 13-е и 20-е сутки после инфицирования.

Оценивали продолжительность жизни животных, измеряли в крови, взятой из хвоста, содержание глюкозы с помощью глюкометра One Touch Select Simple (Johnson & Johnson, США), в сыворотке крови – содержание инсулина с использованием набора реагентов для иммуноферментного анализа Rat/Mouse insulin ELISA KIT (Millipore, Германия).

Для светоптического исследования образцы ПЖ обрабатывали по стандартной методике для получения парафиновых срезов. Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали с помощью микроскопа Axio-Imager A1 (Carl Zeiss, Германия), документировали с использованием фотокамеры AxioCam MRc и компьютерной программы AxioVision (rel. 4.8) (Carl Zeiss, Германия). Морфометрический анализ образцов ПЖ проводили для разрешения камеры 2584×1936 pixel при увеличении 400 и 1000 раз с помощью компьютерной программы для обработки цифровых изображений ImageJ: измеряли максимальный и минимальный диаметр, площадь ацинусов, площадь ациноцита, в том числе ядра, в не менее чем 10 цифровых снимках случайно выбранных полей зрения; среднюю площадь островков Лангерганса (ОЛ), концентрацию эндокриноцитов в ОЛ (ед./100 мкм²), среднюю площадь ядер эндокриноцитов для всех ОЛ на срезах.

Для множественных сравнений применяли критерий Краскела – Уоллиса, при парных

сравнениях – критерий Манна – Уитни. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – стандартная ошибка. Уровень статистической значимости принимали соответствующим $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Строение ПЖ мышей DBA/2 контрольной группы (группа 1) соответствовало норме: экзокринная зона имела типичное ацинарное строение; ацинусы были сформированы округлыми клетками с округлыми светлыми ядрами с 1–3 крупными ядрышками, соотношение гомогенной и зернистой частей цитоплазмы составляло 1,7:1 (рис. 1, а; табл. 1). В просвете выводных протоков содержалось оксифильное вещество в незначительном количестве; венозные сосуды и капилляры были умеренно полнокровны. ОЛ были представлены компактными округлыми скоплениями светлых эндокринных клеток с округлыми/овальными ядрами и равномерно окрашенной зернистой цитоплазмой, отделенными от ацинусов тонкой соединительно-тканной прослойкой, визуализировались кровеносные капилляры с единичными эритроцитами; размеры ОЛ варьировали от 3277 до 37610 мкм². Концентрация глюкозы в крови у животных составила $8,4 \pm 0,3$ ммоль/л.

Инфицирование вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния (группа 2, ИНФ) привело к гибели на 10–12-е сутки 80 % животных (4 из 5). Концентрация глюкозы в крови у выжившей мыши была снижена в 3,5 раза по сравнению с контрольными (2,4 ммоль/л). В ее ПЖ выявлен ряд патоморфологических изменений: умеренная дистрофия

Таблица 1. Структурные изменения ПЖ мышей линии DBA/2 из разных экспериментальных групп

Table 1. Structural changes in the pancreas of DBA/2 mice from different experimental groups

Параметр	Группа 1, контроль	Группа 3, СтД	Группа 4, СтД+ИНФ
		17 сут	19 сут+13 сут
Экзокринная зона			
Диаметр ацинуса, мкм:			
максимальный	47,69 ± 1,17	46,88 ± 2,65	51,22 ± 3,33
минимальный	35,16 ± 1,38	32,18 ± 2,24	29,96 ± 0,69
Площадь ацинуса, мкм²	1365,12 ± 117,77	1286,53 ± 134,42	1240,32 ± 17,37
Площадь ациноцита, мкм², в том числе площадь ядра	338,18 ± 72,21 36,18 ± 5,95	363,76 ± 33,39 29,93 ± 2,06	272,38 ± 14,13 26,22 ± 0,84
Отношение гомогенной и зернистой зон ациноцита	1,73 ± 0,54	2,05 ± 0,35	1,93 ± 0,41
ОЛ (эндокринная зона)			
Площадь ОЛ, мкм²	9067,56 ± 2413,30	9773,20 ± 2017,84	16042,07 ± 3193,57
Концентрация эндокриноцитов в ОЛ, ед./100 мкм²	0,64 ± 0,10	0,78 ± 0,09	0,62 ± 0,08
Площадь ядра эндокриноцита, мкм²	27,79 ± 2,81	23,97 ± 2,62	32,43 ± 3,72

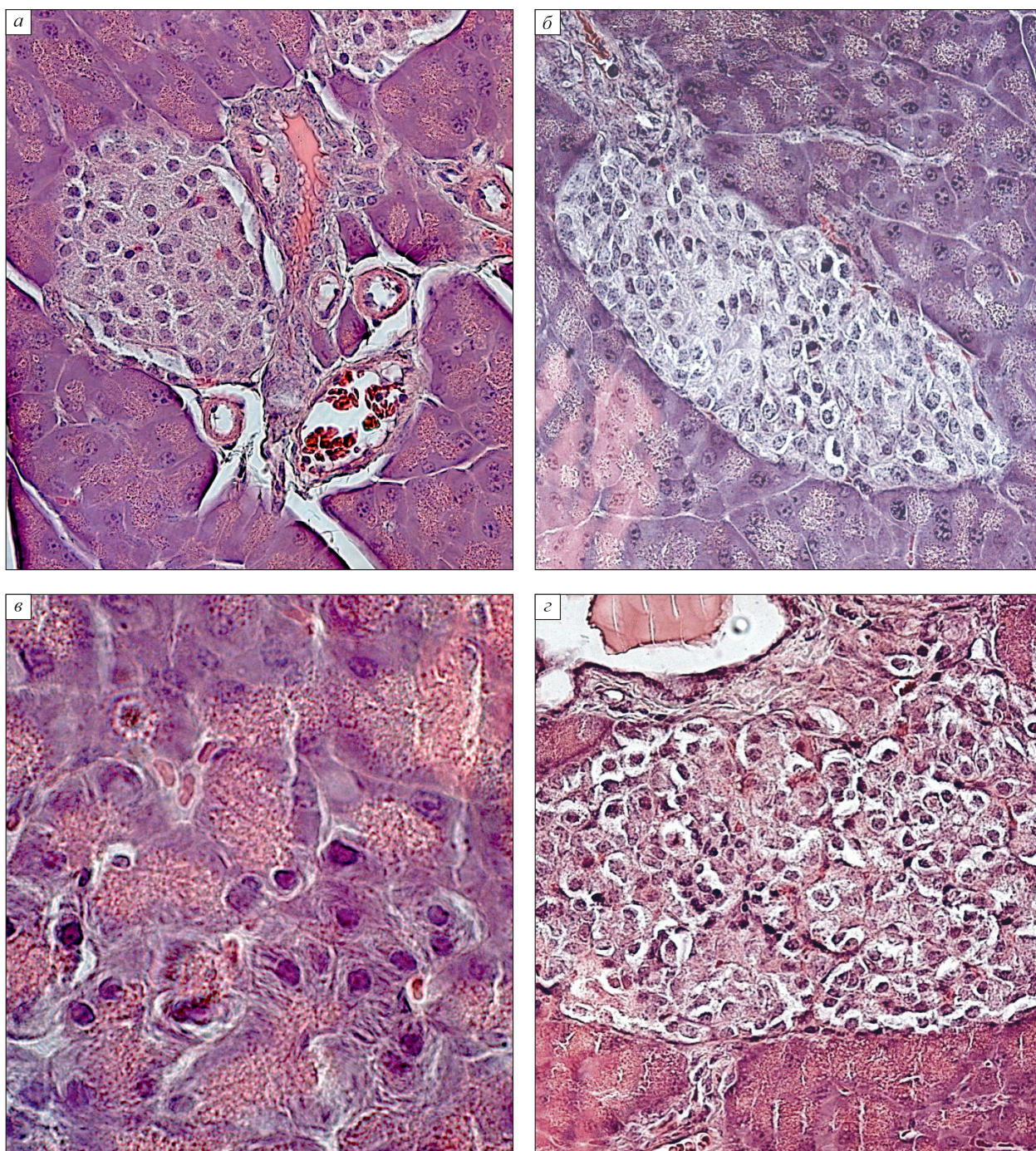


Рис. 1. Мыши линии DBA/2. ПЖ. Окраска гематоксилином и эозином. а, б, г – $\times 400$; в – $\times 1000$.

а – контроль; б – СтД. Дистрофические изменения эндокриноцитов ОЛ – пикноз ядер, опустошенность цитоплазмы; в, г – СтД+ИНФ: в – дегенеративные изменения экзокриноцитов – пикноз ядер, исчезновение гранул, формирование псевдолокнистой структуры цитоплазмы; г – гипертрофированный ОЛ с дегенеративно измененными эндокриноцитами. Выводной проток с плотным эозинофильным секретом в просвете

Fig. 1. DBA/2 mice. Pancreas. Stained with hematoxylin and eosin. а, б, г – $\times 400$; в – $\times 1000$.

а – control; б – streptozotocin diabetes. Dystrophic changes in endocrinocytes of islets of Langerhans – pyknosis of the nuclei, emptiness of the cytoplasm; в, г – streptozotocin diabetes + infection: в – degenerative changes in exocrinocytes – pyknosis of nuclei, disappearance of granules, formation of a pseudofibrous structure of the cytoplasm; г – hypertrophied islets of Langerhans with degenerative endocrinocytes. Excretory duct with dense eosinophilic secretion in the lumen

экзокриноцитов; атрофия эпителия выводных протоков, накопление плотного эозинофильного содержимого в их просвете; умеренная диффузная мононуклеарная инфильтрация по периферии ОЛ и периваскулярно.

После введения streptozotocin мышам DBA/2 (группа 3, СтД) летальность составила 12,5 % (на 9-е сутки погибло одно животное из 8). Через 17 сут после введения streptozotocin у выживших мышей концентрация глюкозы в крови увеличилась в 2,3 раза по сравнению с контрольными ($19,4 \pm 4,1$ ммоль/л, $p < 0,05$). Морфологическое исследование ПЖ показало, что как в экзокринной, так и в эндокринной части регистрировались выраженные изменения: появление зон с нарушением ацинарного строения и обширными дегенеративными повреждениями ациноцитов (пикноз ядер, исчезновение зернистой/гомогенной зон, образование «волокнуистой» перинуклеарной структуры). В зонах с ацинарным строением фиксировались крупные экзокриноциты с гигантскими ядрами и усилением ядрышковой активности; умеренная дилатация выводных протоков с образованием плотных оксифильных «пробок» и незначительной атрофией эпителия; выраженные дегенеративные изменения (опустошение и дегрануляция цитоплазмы, пикноз ядер) клеток ОЛ (рис. 1, б). Максимальный размер ОЛ (21759 мкм^2) был в 1,7 раза меньше, чем в контроле, хотя средний размер достоверно не отличался (см. табл. 1).

Летальность животных в группе 4 (СтД+ИНФ) составила 78 % – на 8–12-е сутки после инфицирования погибло 14 животных из 18; из них с уровнем глюкозы 8–10 ммоль/л – 8 особей, 20–30 ммоль/л – 6 особей. Содержание глюкозы в крови выживших мышей было в 1,8 раза больше, чем в контроле ($15,0 \pm 2,4$ ммоль/л, $p < 0,05$). При морфологическом исследовании ПЖ мышей группы 4 обнаружены аналогичные, но более выраженные повреждения, чем в группе 3: в экзокринной зоне – в виде формирования более обширных зон с нарушением ацинарного строения и дегенеративными изменениями экзокриноцитов (пикнозом ядер, исчезновением зернистой/гомогенной зон, формированием «волокнуистой» перинуклеарной структуры) (рис. 1, в); выраженной дилатацией выводных протоков с образованием в просвете крупных плотных эозинофильных «пробок» и значительной атрофией эпителия многих средних и крупных протоков; выраженным полнокровием капиллярного и венозного звена, часто со стазом и сладжем эритроцитов, обилием лимфоцитов в просвете сосудов. Регистрировалась интенсивная гипертрофия ОЛ – их средняя площадь была увеличена по сравнению с контролем и введени-

ем streptozotocin на 77 и 64 % соответственно; максимальный размер ОЛ был наибольшим из всех групп и составил 45330 мкм^2 , что на 20 и 108 % больше, чем в контроле и группе 3 соответственно. Дегенеративные изменения в ОЛ были более выраженными по сравнению с группой 3: клетки с пикнозом ядер и опустошенностью цитоплазмы наблюдались массово (рис. 1, з), часто в сопровождении с умеренной диффузной мононуклеарной инфильтрацией стромы.

Морфологическое исследование ПЖ мышей BALB/c контрольной группы показало соответствие экзокринной и эндокринной частей структуры норме, соотношение гомогенной и зернистой частей цитоплазмы ациноцитов составило 2,76:1; размеры ОЛ в среднем были в 1,5 раза больше, чем у животных линии DBA/2 (см. табл. 1, табл. 2), максимальный размер равнялся 53277 мкм^2 .

Гибели мышей BALB/c в группе 2 (ИНФ) отмечено не было. При морфологическом исследовании ПЖ выявлены выраженный полиморфизм ядер ациноцитов с появлением крупных форм с активным ядрышковым аппаратом (рис. 2, а), дилатация крупных протоков с атрофией их эпителия и накопление в просвете гомогенной оксифильной массы (рис. 2, б), формирование выраженного перидуктального фиброза, умеренная дилатация вен. Характерной особенностью, по сравнению с контрольными животными, было присутствие многочисленных мелких базофильных включений в эпителии выводных протоков. ОЛ, как и в контроле, были представлены в основном округлыми, сходных с контролем размеров (до 54583 мкм^2) скоплениями клеток.

В группе 3 (СтД) выжили все мыши BALB/c, сформировалась стойкая гипергликемия. Максимальные по сравнению с контролем увеличение концентрации глюкозы в крови в 4,3 раза и снижение содержания инсулина в сыворотке крови в 4,7 раза отмечены на 13-е сутки после введения диабетогенного агента (табл. 3). Ацинарное строение ПЖ сохранено, но с начала эксперимента стали выявляться небольшие участки экзокриноцитов с пикнотичными ядрами; к 27-м суткам нарушения нарастали – формировались выраженная дилатация выводных протоков с атрофическими изменениями эпителия и скоплениями в просвете протоков плотного оксифильного продукта; значительное полнокровие капиллярного и венозного русла с увеличением числа лимфоцитов в крови, иногда с формированием тромботических масс. Начиная с 7-х суток формировался выраженный перидуктальный фиброз крупных выводных протоков (рис. 2, в). ОЛ были сформированы в основном клетками с умеренными

Таблица 2. Структурные изменения ПЖ мышей линии BALB/c из разных экспериментальных групп

Table 2. Structural changes in the pancreas of BALB/c mice from different experimental groups

Параметр	Группа 1, контроль	Группа 2, ИНФ	Группа 3, СтД			Группа 4, СтД+ИНФ
		13 сут	7 сут	20 сут	27 сут	21 сут + 13 сут
Экзокринная зона						
Диаметр ацинуса, мкм:						
максимальный	61,33 ± 0,22	54,79 ± 2,40	48,93 ± 2,98	54,17 ± 1,85	63,62 ± 2,31	59,94 ± 3,31
минимальный	38,21 ± 2,00	39,75 ± 2,86	36,60 ± 1,75	37,73 ± 1,48	41,12 ± 4,18	39,76 ± 2,56
Площадь ацинуса, мкм²	1870,1 ± 87,2	1774,4 ± 159,7	1300,9 ± 157,0	1664,3 ± 92,0	2259,9 ± 307,8	1938,1 ± 168,0
Площадь ациноцита, мкм²	312,73 ± 57,18	303,23 ± 8,52	262,71 ± 2,13	280,3 ± 2,97	365,10 ± 25,84	291,05 ± 41,21
в том числе площадь ядра	30,83 ± 2,11	34,14 ± 1,80	36,63 ± 6,16	26,35 ± 2,38	39,89 ± 5,31	32,17 ± 3,03
Отношение гомогенной и зимогенной зон ациноцита	2,76 ± 0,91	1,79 ± 0,11	2,08 ± 0,21	2,09 ± 0,23	1,88 ± 0,43	2,61 ± 0,89
ОЛ (эндокринная зона)						
Площадь ОЛ, мкм²	13889,8 ± 1297,5	12229,1 ± 4027,9	8273,7 ± 1358,6	7277,3 ± 2416,2	12564,5 ± 3447,8	13489,2 ± 2167,6
Концентрация эндокриноцитов в ОЛ, ед./100 мкм²	0,82 ± 0,03	0,61 ± 0,11	0,82 ± 0,04	0,94 ± 0,12	0,83 ± 0,04	0,92 ± 0,05
Площадь ядра эндокриноцита, мкм²	27,37 ± 1,14	28,53 ± 1,31	26,24 ± 0,73	26,35 ± 1,13	29,19 ± 0,99	28,18 ± 1,07

дегенеративными изменениями, варьировали по форме и размерам, максимальный размер был на 13 % меньше, чем в контроле (46105 мкм²). Средняя площадь ОЛ на 7-е и 20-е сутки была значительно снижена по сравнению с контролем (на 40 и 48 % соответственно).

Гибели мышей BALB/c в группе 4 (СтД+ИНФ) не было, уровень глюкозы в крови через 28 суток после введения стрептозотоцина был в 2 раза выше, чем у контрольных животных (см. табл. 2). При морфологическом исследовании ПЖ мышей из группы 4 по сравнению с животными из групп 2 и 3 обнаружен более выраженный полиморфизм ядер экзокриноцитов вплоть до появления гигантских ядерных структур (рис. 2, г) с множественными базофильными включениями, которые регистрировались и в эпителии выводных протоков (как при инфицировании) (рис. 2, д). Только в этой группе у некоторых особей выявлены не только дилатация, но и кистозные изменения крупных протоков, часто с атрофией эпителия, с накоплением в просвете некоторых протоков зернистого эозинофильного субстрата, формированием мощного перидуктального фиброза и обширных моноклеарных перидуктальных инфильтратов (рис. 2, е). В просвете дилатированных кровеносных сосудов увеличива-

лось содержание сегментоядерных нейтрофилов. ОЛ были представлены более разнообразными, чем в группах 2 и 3, по форме и размерам скоплениями клеток, часто узкими и протяженными, с умеренными дегенеративными изменениями и обильной лимфоцитарной инфильтрацией в основном по периферии ОЛ; максимальный и средний размер ОЛ не отличался от контроля и группы 2 (до 53277 мкм²).

Таким образом, установлено, что доза вируса, использованная в первом эксперименте для инфицирования мышей DBA/2, вызвала высокую летальность среди животных, поэтому она была снижена при заражении мышей линии BALB/c. Данные литературы о поражении ПЖ мышей при инфицировании вирусами гриппа неоднозначны: так, интраназальное введение вируса H1N1 самкам мышей BALB/c хотя и приводило к потере более 20 % массы тела через 5 дней и снижению концентрации глюкозы в крови более чем в 2 раза, но не сопровождалось повреждениями ПЖ [19], в другой же работе отмечены повреждения ПЖ у мышей BALB/c после инфицирования их тремя подтипами вируса гриппа [20]. В наших экспериментах у мышей BALB/c после инфицирования изменений в эндокринной зоне не выявлялось, а в экзокринной части регистрировалось усиление

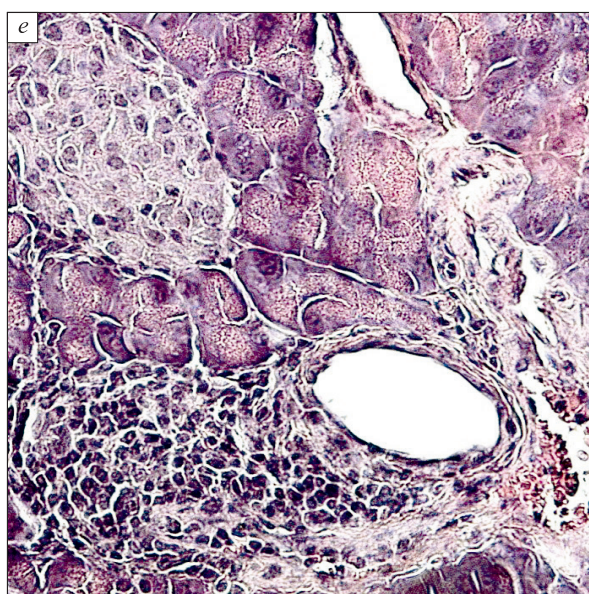
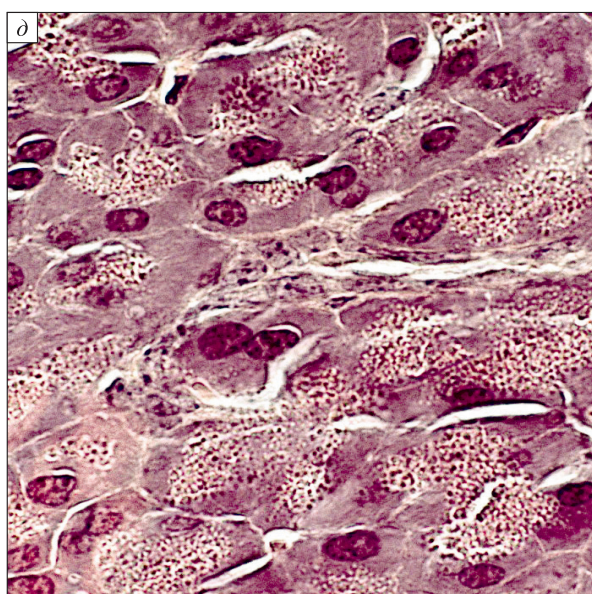
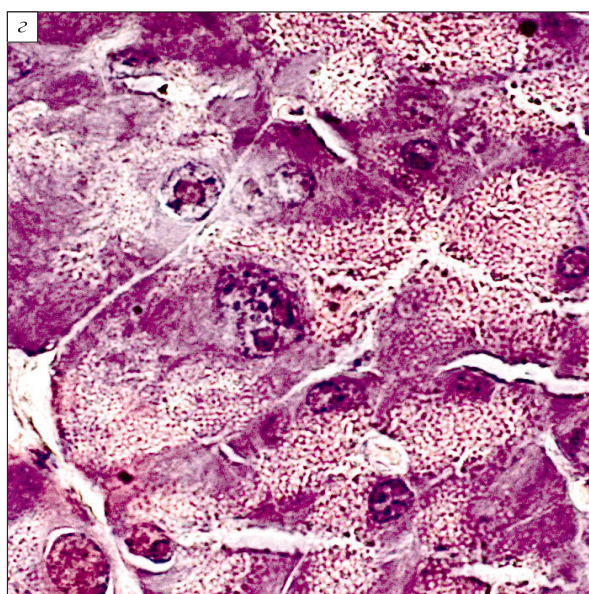
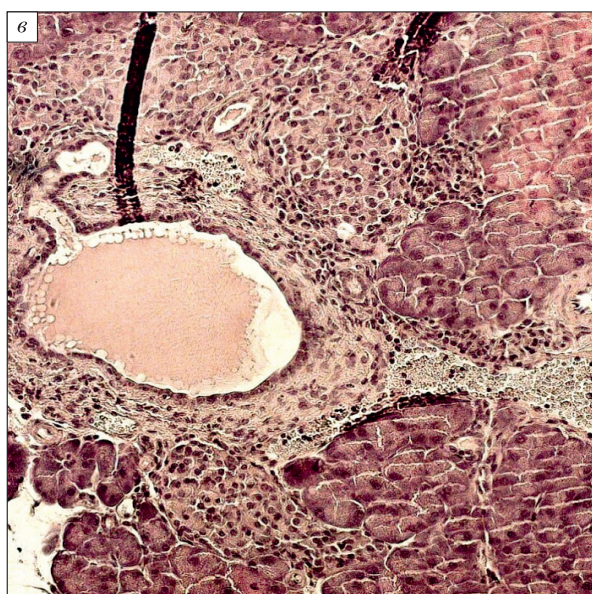
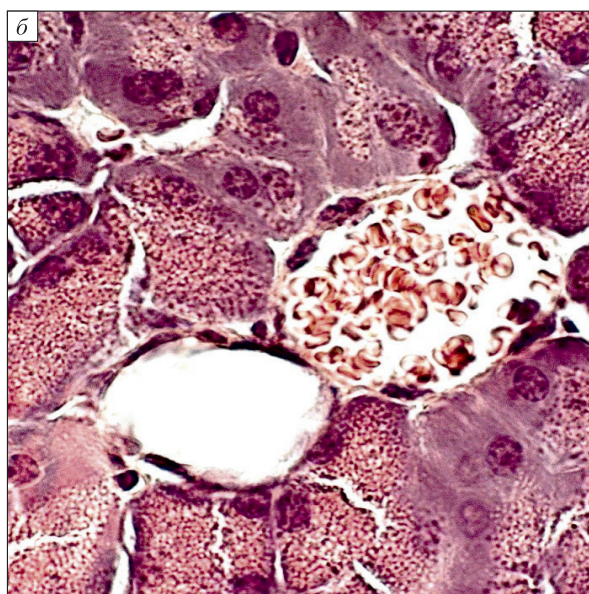
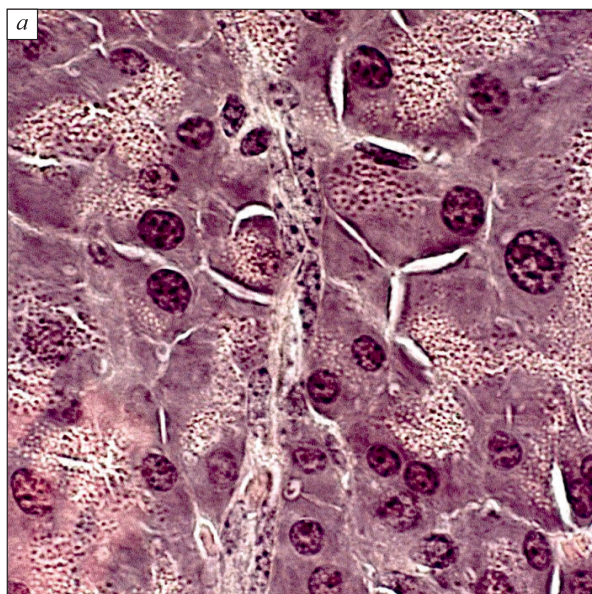


Рис. 2. Мыши линии BALB/c. ПЖ. Окраска гематоксилином и эозином.

а, б – ИНФ: а – выраженный полиморфизм ядер экзокриноцитов, множественные базофильные включения в эпителии протоков; б – дилатация протока, атрофия эпителия, дилатация вены, $\times 1000$.
в – СтД, 27 сут. Перидуктуальный фиброз, дилатация выводного протока, массивные скопления клеток, формирующих неоформленный ОЛ, $\times 200$.
г, д, е – СтД+ИНФ: г – формирование гигантских ядер в экзокриноцитах, $\times 1000$; д – множественные включения в эпителии выводных протоков, $\times 1000$; е – массивные перидуктальные инфильтраты. Дилатация протока, $\times 200$

Fig. 2. BALB/c mice. Pancreas. Stained with hematoxylin and eosin.

а, б – infected mice: а – pronounced polymorphism of exocrinocyte nuclei; multiple basophilic inclusions in the epithelium of the ducts; б – dilatation of the duct, atrophy of the epithelium, dilatation of the vein, $\times 1000$.
в – streptozotocin diabetes, 27 days. Periductal fibrosis, dilatation of the excretory duct; massive accumulations of cells forming an unformed OL, $\times 200$.
г, д, е – streptozotocin diabetes + infection: г – formation of giant nuclei in exocrinocytes, $\times 1000$; д – multiple inclusions in the epithelium of the excretory ducts, $\times 1000$; е – massive periductal infiltrates. Duct dilatation, $\times 200$

белоксинтезирующей функции некоторых ациноцитов (гипертрофия ядер, ядрышек), нарушение системы выводных протоков (дилатация крупных протоков с атрофией их эпителия, накопление в просвете гомогенной оксифильной массы, формирование выраженного перидуктального фиброза), обилие мелких базофильных включений в эпителии выводных протоков как характерная особенность этой группы.

Введение стрептозотоцина вызвало 12,5%-ю летальность особей линии DBA/2, гибели мышей BALB/c не было. У обеих линий сформировалась стойкая гипергликемия: у выживших мышей DBA/2 концентрация глюкозы в крови увеличилась в 2,3 раза, у BALB/c – в 4,3 раза по сравнению с контролем. Динамика показателей уровня глюкозы в крови и инсулина в сыворотке крови мышей BALB/c свидетельствует о том, что через 7 дней после введения стрептозотоцина у животных сформировалась стойкая гипергликемия: содержание глюкозы увеличилось в 1,5 раза, а концентрация инсулина снизилась в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Стрептозототин – цитотоксический аналог глюкозы, обладающий избирательной токсич-

ностью для β -клеток ПЖ. Обладая высоким сродством к β -клеткам ПЖ, он накапливается и вызывает их необратимые некрозы, что, в свою очередь, приводит к снижению синтеза и секреции инсулина, и у лабораторных животных развивается сахарный диабет [21]. Действительно, концентрация глюкозы в крови у мышей обеих линий после введения стрептозотоцина оставалась высокой до конца экспериментов. Морфологическое исследование показало, что как в экзокринной, так и в эндокринной части ПЖ у мышей обеих линий регистрировались выраженные изменения по сравнению с контролем, однако были очевидные различия: у мышей DBA/2 – очаговое нарушение ацинарного строения с выявлением в этих зонах массивных скоплений дегенеративно измененных ациноцитов с псевдоволокнистой цитоплазмой; в зонах с нормальным ацинарным строением – компенсаторная гипертрофия ядер экзокриноцитов и усилением ядрышковой активности; у мышей BALB/c ацинарное строение ПЖ сохранено полностью, но выявлены небольшие участки экзокриноцитов с пикнотичными ядрами. У мышей BALB/c также выявлены более серьезные нарушения протоковой системы в

Таблица 3. Содержание глюкозы в крови и инсулина в сыворотке крови мышей линии BALB/c из разных экспериментальных групп

Table 3. Blood glucose and insulin levels in blood serum of BALB/c mice from different experimental groups

Показатель	Группа 1, контроль	Группа 2, ИНФ		Группа 3, СтД				Группа 4, СтД+ИНФ	
		13 сут	20 сут	7 сут	13 сут	20 сут	27 сут	21 сут + 13 сут	28 сут + 20 сут
Содержание глюкозы, ммоль/л	7,6 $\pm$ 0,6	8,3 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,4	11,7 $\pm$ 1,5*	33,0 $\pm$ 0,01*	15,2 $\pm$ 2,5*	21,9 $\pm$ 3,9*	13,1 $\pm$ 2,6	15,3 $\pm$ 2,8*
Содержание инсулина, нг/мл	4,35 $\pm$ 1,32	1,57 $\pm$ 0,35	3,01 $\pm$ 0,64	2,77 $\pm$ 0,51	0,64 $\pm$ 0,34*	3,89 $\pm$ 0,75	3,56 $\pm$ 0,90	3,44 $\pm$ 0,92	3,12 $\pm$ 1,03

* Отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при $p < 0,05$.

виде выраженной дилатации выводных протоков с атрофическими изменениями эпителия и скоплениями в просвете протоков плотного оксифильного продукта; значительное полнокровие капиллярного и венозного русла с увеличением числа лимфоцитов в крови, иногда с формированием тромботических масс; выраженный перидуктальный фиброз крупных выводных протоков. Повреждения ОЛ наблюдались у мышей обеих линий: выраженные дегенеративные изменения эндокриноцитов, снижение максимального размера ОЛ (более значительно у DBA/2).

Сочетанное воздействие стрептозотоцина с последующим инфицированием обусловило высокую летальность особей DBA/2 (78 %, с уровнем глюкозы от 8 до 30 ммоль/л), гибели мышей BALB/c не было. У обеих линий формировалась стойкая гипергликемия: содержание глюкозы в крови мышей BALB/c и выживших мышей DBA/2 было сходно повышено (в 1,8–2 раза по сравнению с контролем). Меньшая выживаемость, более тяжелые патологические повреждения ПЖ, чем у мышей без предсуществующего диабета, показаны ранее на модели сочетанного воздействия стрептозотоцина с последующим инфицированием вирусом гриппа А [20]. В нашем исследовании у мышей DBA/2 выявлены более тяжелые повреждения по сравнению с изолированным введением стрептозотоцина: в экзокринной зоне – формирование более обширных зон с нарушением ацинарного строения и дегенеративными изменениями эндокриноцитов, повреждениями протоковой системы, выраженным полнокровием капиллярного и венозного звена. Строение ПЖ у мышей BALB/c, как и у особей с только изолированным стрептозотоцином, было сохранено, однако наблюдалась более выраженная активация ядерного и ядрышкового аппарата ряда эндокриноцитов с появлением гигантских клеток с множественными базофильными включениями, которые регистрировались и в эпителии выводных протоков (как при инфицировании); прогрессирование повреждения протоковой системы в виде дилатации, кистозных изменений, формирования мощного перидуктального фиброза и обширных моноклеарных перидуктальных инфильтратов. Повреждения ОЛ были более значительными у мышей линии DBA/2 – выраженная гипертрофия ОЛ при множественных дегенеративных изменениях эндокриноцитов.

Заключение

Сравнительное исследование мышей линий DBA/2 и BALB/c показало возможность использования животных обеих линий для изучения со-

четанного воздействия вируса гриппа А/H1N1 и экспериментального диабета с учетом дозы инфицирования.

Инфицирование мышей линии BALB/c вирусом гриппа А/H1N1 в меньшей дозе, чем животных линии DBA/2, позволило избежать их гибели и обусловило формирование морфологических изменений только в экзокринной части ПЖ (усиление синтетической активности в виде гипертрофии ядер и ядрышек отдельных ациноцитов), нарушений в протоковой системе в виде дилатации и перидуктального фиброза. У мышей обеих линий после введения стрептозотоцина сформировалась стойкая гипергликемия, но у BALB/c не было летальности. При введении стрептозотоцина у мышей обеих линий патоморфологические изменения ПЖ формировались преимущественно в эндокринной части в виде значительных повреждений клеток ОЛ. Аналогичные изменения, но более тяжелые, с вовлечением экзокринной зоны, были найдены при последующем инфицировании. В экзокринной части ПЖ особенностью мышей линии DBA/2 являлось очаговое нарушение ацинарного строения с дегенерацией ациноцитов и компенсаторным усилением белоксинтетической активности в неповрежденных участках экзокринной зоны; мышей линии BALB/c – более значительное, чем у DBA/2, повреждение протоковой системы с формированием мощных перидуктальных фиброза и моноклеарных инфильтратов.

Список литературы / References

1. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 16. М.: Минобрнауки России, 2022. 249 с. Режим доступа: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/BMP_COVID-19_V16.pdf
2. Temporary guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of novel coronavirus infection (COVID-19). Version 16. Moscow: Ministry of Education and Science of Russia, 2022. 249 p. [In Russian]. Available at: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/BMP_COVID-19_V16.pdf
3. Aburawi E., Liuba P., Pesonen E., Ylä-Herttuala S., Sjöblad S. Acute respiratory viral infections aggravate arterial endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(11):2733–2735. doi: 10.2337/diacare.27.11.2733
4. Akirov A., Diker-Cohen T., Masri-Iraqi H., Duskin-Bitan H., Shimon I., Gorshtein A. Outcomes of hyperglycemia in patients with and without diabetes hospitalized for infectious diseases. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2018;34(7):e3027. doi: 10.1002/dmrr.3027

4. Wu J., Zhang F., Fang F., Chang H., Wang F., Yang Z., Sun B., Chen Z. Efficacy of inactivated vaccine against H5N1 influenza virus infection in mice with type 1 diabetes. *Vaccine*. 2010;28:2775–2781. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.01.037
5. Зубрицкий М.Г., Недзведь М.К. Морфологические изменения в поджелудочной железе при герпетической инфекции. *Здравоохранение (Минск)*. 2014;(2):15–20.
- Zubritsky M.G., Nedzved M.K. Morphological changes in the pancreas in herpetic infection. *Zdravooohranenie (Minsk) = Healthcare (Minsk)*. 2014;(2):15–20. [In Russian].
6. Bernard H., Teijeiro A., Chaves-Pérez A., Perna C., Satish B., Novials A., Wang J.P., Djouder N. Cocksackievirus B type 4 infection in β cells downregulates the chaperone prefoldin URI to induce a MODY4-like diabetes via Pdx1 silencing. *Cell Rep. Med*. 2020;1(7):100125. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100125
7. Potapova O.V., Kovner A.V., Anikina A.G., Cherdantseva L.A., Sharkova T.V., Shkurupy V.A., Vasil'eva E.V., Shestopalov A.M. Studies of Influenza A/H1N1 A/Tomsk/13/2010 Virus Topology during Development of Infectious Process in Mammals. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2016;160:683–686. doi: 10.1007/s10517-016-3249-x
8. Wang W., Chen H., Li Q., Qiu B., Wang J., Sun X., Xiang Y., Zhang J. Fasting plasma glucose is an independent predictor for severity of H1N1 pneumonia. *BMC Infect. Dis*. 2011;11:104. doi: 10.1186/1471-2334-11-104
9. de Wit E., Siegers J.Y., Cronin J.M., Weatherman S., van den Brand J.M., Leijten L.M., van Run P., Begeman L., van den Ham H.J., Andeweg A.C., ... van Riel D. 1918 H1N1 influenza virus replicates and induces proinflammatory cytokine responses in extrarespiratory tissues of ferrets. *J. Infect. Dis*. 2018;217(8):1237–1246. doi: 10.1093/infdis/jiy003
10. Qi Z., Hu H., Wang Z., Wang G., Li Y., Zhao X., Feng Y., Huo X., Sun J., Feng Q., ... Hu J. Antibodies against H1N1 influenza virus cross-react with α -cells of pancreatic islets. *J Diabetes Investig*. 2018;9(2):265–269. doi: 10.1111/jdi.12690
11. Sadeghi K., Salimi V., Rezaei F., Jalilian F.A., Ghavami N., Azad T.M. Potential of H1N1 influenza A virus as an air borne pathogen to induce infectivity in pancreas: a mouse model study. *J. Environ. Health Sci. Eng*. 2020;18(1):303–310. doi: 10.1007/s40201-020-00468-x
12. Capua I., Mercalli A., Romero-Tejeda A., Pizzuto M.S., Kasloff S., Sordi V., Marzinotto I., Lampasona V., Vicenzi E., de Battisti C., ... Piemonti L. Study of 2009 H1N1 pandemic influenza virus as a possible causative agent of diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2018;103(12):4343–4356. doi: 10.1210/je.2018-00862
13. Calore E.E., Uip D.E., Perez N.M. Pathology of the swine-origin influenza A (H1N1) flu. *Pathol. Res. Pract*. 2011;207(2):86–90. doi: 10.1016/j.prp.2010.11.003
14. Малышев Н.А., Базарова М.В., Кареткина Г.Н., Кардонова Е.В., Келли Е.И., Пашенин М.А. Особенности пандемического гриппа А (H1N1) PDM09. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2013;2(3):12–18.
- Malyshev N.A., Bazarova M.V., Karetkina G.N., Kardonova E.V., Kelly E.I., Pashenin M.A. Features of pandemic influenza A (H1N1) PDM09. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye = Infectious Diseases: News, Opinion, Education*. 2013;2(3):12–18. [In Russian].
15. Аникина А.Г., Потапова О.В., Ковнер А.В., Черданцева Л.А., Шаркова Т.В., Шкурупий В.А., Иванов Г.Я. Иммуноморфологические особенности постинфекционного пневмофиброза у человека при гриппе А/Н1N1. *Фундам. исслед*. 2014;(10-1):18–23.
- Anikina A.G., Potapova O.V., Kovner A.V., Cherdantseva L.A., Sharkova T.V., Shkurupiy V.A., Ivanov G.Ya. Immunomorphological features of postinfectious pulmonary fibrosis in humans infected with influenza A/H1N1 virus. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*. 2014;(10-1):18–23. [In Russian].
16. Гушин Я.И., Шедько В.В., Мужикян А.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Сравнительная морфология поджелудочной железы экспериментальных животных и человека. *Лаб. живот. для науч. исслед*. 2018;(3):33–48. doi: 10.29296/2618723X-2018-03-04
- Gushchin Ya.I., Shedko V.V., Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Comparative morphology of the pancreas of experimental animals and humans. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science*. 2018;(3):33–48. [In Russian]. doi:10.29296/2618723X-2018-03-04
17. Ковшик Г.Г., Храпова М.В., Душкин М.И. Метаболические особенности мышей инбредных линий: поиск предрасположенности к метаболическому синдрому. *Вестн. НГУ. Сер. Биол., клин. мед*. 2012;10(1):27–32.
- Kovshik G.G., Khrapova M.V., Dushkin M.I. Metabolic phenotypes of inbred mouse strains: searching for metabolic syndrome susceptibility. *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina = Journal of the Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine*. 2012;10(1):27–32. [In Russian].
18. Каркищенко В.Н., Брайцева Е.В. Новые биомодели для оценки высоковирулентных штаммов чумы *Yersinia pestis*. *Биомедицина*. 2005;1(1):67–75.
- Karkishchenko V.N., Braitseva E.V. New biomodels for the evaluation of highly virulent *Yersinia pestis* plague strains. *Biomeditsina = Biomedicine*. 2005;1(1):67–75. [In Russian].

19. Xiang L., Hu X., Zhang J., She J., Li M., Zhou T. Immunodepression induced by influenza A virus (H1N1) in lymphoid organs functions as a pathogenic mechanism. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2020; 47(10):1664–1673. doi: 10.1111/1440-1681.13358
20. Huo C., Zhang S., Zhang S., Wang M., Qi P., Xiao J., Hu Y., Dong H. Mice with type 1 diabetes exhibit increased susceptibility to influenza A virus. *Microb. Pathog.* 2017;113:233–241. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.026
21. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat. *Physiol. Res.* 2001;50(6):537–546.

Сведения об авторах:

Ольга Павловна Молодых, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0002-1001-3310, e-mail: opmolodykh@frcftm.ru
Наталья Александровна Пальчикова, д.б.н., e-mail: labend@centercem.ru
Вера Георгиевна Селятицкая, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0003-4534-7289, e-mail: ccem@centercem.ru
Александра Владимировна Глушенко, e-mail: rimmaaltai2017@gmail.com
Ольга Григорьевна Курская, к.м.н., ORCID: 0000-0002-1931-2026, e-mail: kurskaya_og@mail.ru

Information about the authors:

Olga P. Molodykh, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0002-1001-3310, e-mail: opmolodykh@frcftm.ru
Natalya A. Palchikova, doctor of biological sciences, e-mail: labend@centercem.ru
Vera G. Selyatitskaya, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0003-4534-7289, e-mail: ccem@centercem.ru
Alexandra V. Glushchenko, e-mail: rimmaaltai2017@gmail.com
Olga G. Kurskaya, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1931-2026, e-mail: kurskaya_og@mail.ru

Поступила в редакцию 24.11.2022
Принята к публикации 11.01.2023

Received 24.11.2022
Accepted 11.01.2023