

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Birutė

ZABLOCKIENĖ

Gripo virusinės pneumonijos
prevencija naudojant zanamivirą ir
priešprasminį oligonukleotidą prieš
indukuojamą azoto oksido sintazę

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Biomedicinos mokslai,
medicina 06 B

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2013–2018 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Arvydas Ambrozaitis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Mokslinis konsultantas:

prof. MD, MPH Stefan Gravenstein (Brown universitetas, JAV, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **prof. dr. Edvardas Danila** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Nariai:

prof. dr. Uga Dumpis (Latvijos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B);

prof. dr. Virginija Grabauskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B);

prof. dr. Arvydas Laurinavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B);

prof. habil. dr. Vytautas Usonis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2019 m. kovo mėn. 14 d. 15 val. Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Didžiojoje auditorijoje. Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21, 203, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 239 8700; el. paštas mf@mf.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendarius>

VILNIUS UNIVERSITY

Birutė
ZABLOCKIENĖ

Prevention of influenza viral
pneumonia using zanamivir and
antisense oligonucleotide against
inducible nitric oxide synthase

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Biomedical Sciences,
Medicine 06 B

VILNIUS 2019

This dissertation was written between 2013 and 2018 at Vilnius University.

Academic supervisor:

Prof. Habil. Dr. Arvydas Ambrozaitis (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B).

Academic consultant:

Prof. MD, MPH Stefan Gravenstein (Brown University, U.S.A., Biomedical sciences, Medicine – 06 B).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Edvardas Danila (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B).

Members:

Prof. Dr. Uga Dumpis (University of Latvia, Biomedical sciences, Medicine – 06 B);

Prof. Dr. Virginija Grabauskienė (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B);

Prof. Dr. Arvydas Laurinavičius (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B);

Prof. Habil. Dr. Vytautas Usonis (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 15:00 hour on 14th of March, 2019 in the Auditorium of Vilnius University Faculty of Medicine.

Address: M. K. Čiurlionio street 21, 203 Auditorium, Vilnius, Lithuania. Tel. +370 5 239 8700; e-mail: mf@mf.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the Vilnius University Library, as well as on the website of Vilnius University: <https://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

SANTRUMPOS

ANOVA	– vienfaktorinė dispersijos analizė
AT-PGR	– atvirkštinės transkripcijos - polimerazės grandininė reakcija
BAL	– bronchoalveolinis lavažas
CPE	– citopatogeninis efektas
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
FT	– fiziologinis tirpalas
IFN- γ	– interferonas gamma
iNOS	– indukuojama azoto oksido sintazė
iRNR	– informacinė ribonukleorūgštis
JAV	– Jungtinės Amerikos Valstijos
LKID ₅₀	– 50 proc. ląstelių kultūros infekcinė dozė
LSD testas	– mažiausiai reikšmingo skirtumo (angl. <i>least significant difference</i>) testas
MDCK	– Madin–Darby šuns inkstų ląstelės
NI	– neuraminidazės inhibitoriai
NO	– azoto oksidas
NO ₂ ⁻	– nitritai
O.T.	– optinis tankis
PO	– priešsprasminis oligonukleotidas
PSO	– Pasaulio sveikatos organizacija
RB	– rūgštinis baltymas
RNR	– ribonukleino rūgštis
SPSS	– socialinių mokslų statistinis paketas
SP	– standartinė paklaida
TNF- α	– tumoro nekrozės faktorius alfa

1. ĮVADAS

Gripo infekcija yra visame pasaulyje aktuali sveikatos problema dėl galimų komplikacijų ir mirties atvejų. Per kasmetines epidemijas pasaulyje 3–5 milijonai žmonių susserga sunkia gripo forma, iš jų 290 000–650 000 miršta (PSO, 2018).

Dauguma mirčių gripo metu būna susiję su viruso (Taubenberger, Morens, 2008; Kuiken, Taubenberger, 2008) ar bakterijų sukeltu plaučių pažeidimu (Morens ir kt., 2008; Klugman ir kt., 2009; Ruuskanen ir kt., 2011). Gripo viruso sukulto sunkaus plaučių uždegimo patogenezėje svarbus ne tik tiesioginis viruso citopatinis poveikis, bet ir pasigaminę uždegimo mediatoriai (de Jong ir kt., 2006; Kash ir kt., 2006).

Dėl gripo viruso sukulto imuninio atsako išskiriami uždegimo citokinai ir chemokinai („citokinų audra“), gausėja makrofagų ir neutrofilų plaučiuose (Van Reeth, 2000; Jayasekera ir kt., 2006; La Gruta ir kt., 2007; Kumar ir kt., 2014; Short ir kt., 2014). Citokinai, tokie kaip interferonas gama (IFN- γ) arba tumoro nekrozės faktorius alfa (TNF- α), skatina indukuojamos azoto oksido sintazės (iNOS) gamybą, dėl to gaminamas didelis azoto oksido (NO) kiekis (Short ir kt., 2014; Akaike ir kt., 1996; Suliman ir kt., 2001; Bosca ir kt., 2005). Yra žinoma, kad, sergant gripu, didesnė laisvųjų radikalų, pvz., NO ir reaktyviojo azoto radikalų gamyba sukelia plaučių pažeidimą (La Gruta ir kt., 2007; Short ir kt., 2014; Zaki ir kt., 2005).

Šiuo metu gripui gydyti skiriami neuraminidazės inhibitoriai (NI) slopina viruso replikaciją ir plitimą, taip padeda išvengti sunkių ligos formų ir mirties, ypač anksti pradėjus gydymą. Tačiau net ir ankstyvas gydymas neapsaugo nuo komplikacijų didelės rizikos ligonių ar užsikrėtusių paukščių gripo viruso potipiu A(H5N1) (Hayden, 2009; 2013). Daugėjant NI atsparių gripo virusų potipių, reikalingi nauji vaistai gripo prevencijai ir jam gydyti (Moscona, 2008; Barik, 2012; Han ir kt., 2016; Hussain ir kt., 2017).

Gyvūnų tyrimuose, kuriuose buvo slopinama iNOS funkcija ir NO gamyba, buvo mažesnis gripo sukeltas plaučių pažeidimas (Jayasekera ir kt., 2006; Akaike ir kt., 1996; 2003). NI, slopindami viruso plitimą, galėtų netiesiogiai mažinti ir iNOS raišką bei NO gamybą. NI slopino NO gamybą gripo virusu užkrėstuose ir IFN- γ aktyvintuose RAW 264,7 makrofaguose *in vitro* (Kačergius ir kt., 2006). Tačiau nėra žinoma, ar NI geba slopinti NO gamybą ir taip mažinti plaučių pažeidimą gripo infekcijos metu *in vivo*.

Priešsprasminis iNOS oligonukleotidas, slopindamas iNOS geno raišką ir NO gamybą, galėtų būti nauja gripo gydymo galimybė. Šiame moksliniame darbe siekėme įvertinti, ar gripo A viruso sukeltą plaučių uždegimą pelėms slopina priešsprasminis oligonukleotidas prieš iNOS iRNR bei jo derinys su zanamiviru.

2. MOKSLINIO DARBO TIKSLAS

Įvertinti, ar zanamiviras ir(ar) priešsprasminis oligonukleotidas prieš iNOS slopina gripo sukeltą plaučių uždegimą.

3. MOKSLINIO DARBO UŽDAVINIAI

1. Įvertinti gripo viruso poveikį pelių plaučių gripo viruso RNR, citokinų IFN- γ ir TNF- α , iNOS iRNR santykiniam lygiui, nitritų kiekiui BAL skystyje, pelių svorio pokyčiui ir plaučių histologiniam pažeidimui.
2. Įvertinti gydymo zanamiviru poveikį pelių plaučių gripo viruso RNR, citokinų IFN- γ ir TNF- α , iNOS iRNR santykiniam lygiui, nitritų kiekiui BAL skystyje, pelių svorio pokyčiui bei plaučių histologiniam pažeidimui.
3. Įvertinti gydymo priešsprasminiu oligonukleotidu prieš iNOS poveikį pelių plaučių gripo viruso RNR, citokinų IFN- γ ir TNF- α , iNOS iRNR santykiniam lygiui, nitritų kiekiui BAL skystyje, pelių svorio pokyčiui ir plaučių histologiniam pažeidimui.

4. Įvertinti gydymo zanamiviro ir priešprasminio oligonukleotido prieš iNOS derinio poveikį pelių plaučių gripo viruso RNR, citokinų IFN- γ ir TNF- α , iNOS iRNR santykiniam lygiui, nitritų kiekiui BAL skystyje, pelių svorio pokyčiui ir plaučių histologiniam pažeidimui.

4. MOKSLINIO DARBO NAUJUMAS

Šiame moksliniame darbe pirmą kartą buvo vertintas zanamiviro gebėjimas sumažinti plaučių pažeidimą slopinant NO gamybą gripo infekcijos metu *in vivo*. Taip pat pirmą kartą tirtas pelių, užkrėtų gripo virusu, gydymo priešprasminiu oligonukleotidu prieš iNOS iRNR ar jo derinio su zanamiviru poveikis.

5. MOKSLINIO DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Šiuo metu gripui gydyti dažniausiai vartojami neuraminidazės inhibitoriai, tačiau jie gali būti nepakankamai efektyvūs sunkiai sergantiems, didelės rizikos ligoniams ar esant paukščių gripo viruso potipio A(H5N1) infekcijai. Daugėja gripo viruso potipių, atsparių priešvirusiniams vaistams. Todėl reikalingi nauji vaistai nuo gripo, veikiantys naujus taikinius ir kitais mechanizmais. Priešprasminis oligonukleotidas prieš iNOS, slopindamas gripo viruso sukeltą plaučių pažeidimą, derinyje su priešvirusiniais vaistais galėtų būti nauja gydymo galimybė.

6. GINAMIEJI DISERTACIJOS TEIGINIAI

1. Užkrėtus BALB/c peles A/PR/8/34 gripo virusu, sukeliamas plaučių audinio pažeidimas, kuris yra susijęs su pelių svorio mažėjimu, didesne citokinų bei iNOS iRNR raiška ir nitritų koncentracija plaučiuose.

2. Zanamiviras slopina plaučių pažeidimą mažindamas gripo viruso replikaciją ir plitimą, dėl to mažiau gaminama NO gripu užkrėstų pelių plaučiuose.
3. Priešprasminis oligonukleotidas prieš iNOS iRNR slopina gripu užkrėstų pelių plaučių uždegimą mažindamas NO gamybą.
4. Zanamiviro ir priešprasminio oligonukleotido prieš iNOS derinys mažina gripu užkrėstų pelių plaučių uždegimą slopindamas gripo viruso replikaciją ir NO gamybą.

7. MEDŽIAGOS IR METODAI

7.1 Gyvūnai

Moteriškos lyties, 6–12 savaičių amžiaus, 18–20 g svorio BALB/c pelių buvo įsigyta iš Charles River laboratorijos (Vilmingtonas, Masačusetso v., JAV). Pelės buvo laikomos atskiroje patalpoje mikroizoliaciniuose narvuose. Visos procedūros buvo atliekamos biosaugumo kabinete, turinčiame antrą biosaugumo lygį. Prieš kiekvieną procedūrą – užkrėtimą virusu, gydymą vaistais ir eutanaziją – pelėms buvo atliekama anestezija suleidžiant į pilvaplėvės ertmę ketamino (50 mg/kg) ir ksilazino (50 mg/kg) mišinio. Visi eksperimento protokolai buvo patvirtinti Rytų Virdžinijos aukštosios medicinos mokyklos Gyvūnų priežiūros ir naudojimo komitete, Norfolk'as, Virdžinijos v., JAV (etikos leidimo Nr. 07-003).

7.2 Gripo virusas ir jo infektyvumo titro nustatymas

Pelėms adaptuotas gripo A/Puerto Rico/8/34 [A/PR/8/34] (H1N1) virusas buvo gautas iš Floridos universiteto Medicinos koledžo [Gainesville'as, Floridos v., JAV] (dr. Bradley S. Bender dovana). Virusas buvo padaugintas 10 dienų amžiaus vištos kiaušinių embrionų alantojaus ertmėse pagal literatūroje aprašytą metodiką (Lennette, 1995). Kad būtų nustatytas gripo A/PR/8/34 viruso

infektyvumo titras, vientisi MDCK ląstelių (Amerikietiško tipo ląstelių kultūrų kolekcijos Nr. CCL-34, Manasas, Virdžinijos v., JAV) monosluoksniai buvo inokuliuoti su 10 kartų serijiniu būdu praskiestais viruso mėginiais. 50 proc. ląstelių kultūros infekcinė dozė (LKID₅₀) įvertinta pagal viruso citopatogeninio efekto (CPE) išplitimo dydį monosluoksnuose praėjus 96 val., o viruso infektyvumo titras buvo apskaičiuotas Kärber metodu (Lennette, 1995). Nustatyta gripo infektyvumo titro vertė buvo 10^{8,4} LKID₅₀/ml. Po to įvairiais serijiniu būdu praskiestais viruso mėginiais intranazaliai užkrėstos pelės, skiriant vienkartinę 20 μl viruso suspensijos dozę (po 10 μl į šnervę). Pelės stebėtos 5 dienas, kad būtų nustatytas viruso infektyvumo titras, kuris sukelia ryškius ligos simptomus, tačiau nėra letalus. Pagal pelių svorio sumažėjimą ir išgyvenamumą buvo nustatytas 10^{7,6} LKID₅₀/ml viruso infektyvumo titras, kuris ir buvo naudotas eksperimente.

7.3 Tiriamosios vaistinės medžiagos

Zanamiviras (5-(acetilamino)-4-((aminoiminometil)-amino)-2,6-anhidro-3,4,5-trideoksi -D-glicero-D-galacto-ne-2-enoinė rūgštis) buvo gautas iš „GlaxoSmithKline“ (Tyrimų trikampio parkas, Šiaurės Karolinos v., JAV) kaip Relenza™, susidedantis iš 5 mg zanamiviro ir 20 mg laktozės miltelių mišinio lizdinėje plokštelėje. Priešsprasminis oligonukleotidas (PO) prieš iNOS buvo sintezuotas „Sigma-Aldrich“ bendrovėje (St. Louis'as, Misūrio v., JAV) kaip nemodifikuotas oligodeoksiribonukleotidas su fosfodiesterinėmis tarpnukleotidinėms jungtimis, sudarytas iš 21 nukleotidų sekos: 5'-CAAGCCATG TCTGAGACTTTG-3', atitinkančios pelės iNOS iRNR translacijos iniciacijos vietą nuo 1 iki 21 bazės, kaip aprašyta Ding'o ir kt. (Ding ir kt., 1998). Laktozė buvo sintezuota „Sigma-Aldrich bendrovėje“ (St. Louis'as, Misūrio v., JAV). Vaistinės medžiagos buvo ištirpintos steriliame fiziologiniame tirpale, pH 7,4, ir 20 μl tirpalo intranazaliai (po 10 μl į kiekvieną šnervę) buvo skiriamas pelėms. Zanamiviro (2mg/kg) ir PO (5 mg/kg) dozės buvo

parinktos atsižvelgiant į literatūros duomenis (Ryan ir kt., 1994; Tarbet ir kt., 2014; Li ir kt., 2014; Ding ir kt., 1998; Templi ir kt., 2000). Laktozės (placebo) dozė buvo 8 g/kg. Vaistinės medžiagos pelėms buvo skiriama vieną kartą per dieną, kad būtų išvengta žalojančio kartotinės intervencijos poveikio.

7.4 Eksperimento planas

Po anestezijos pelės buvo užkrėstos intranazaliai 20 µl gripo A/PR/8/34 viruso suspensija su viruso $10^{7,6}$ LKID₅₀/ml infektyvumo titru. Praėjus 3 valandoms po užkrėtimo, pelės buvo pradėtos gydyti ir gydytos 3 arba 5 dienas zanamiviru (2 mg/kg, 3 d.: n = 5, 5 d.: n = 5), PO (5 mg/kg, 3 d.: n = 6, 5d.: n = 6) arba abiejų vaistų deriniu tomis pačiomis dozėmis (3 d.: n = 6, 5 d.: n = 6). Tiriamieji vaistai buvo skiriami kasdien su 20 µl fiziologinio tirpalo intranazaliai vieną kartą per dieną. Neigiamos kontrolinės grupės pelės gripu užkrėstos nebuvo, joms kasdien intranazaliai buvo skiriama arba 20 µl fiziologinio tirpalo (5 d.: n = 3), arba vaistinė medžiaga, ištirpinta 20 µl fiziologinio tirpalo: laktozė (3 d.: n = 3, 5 d.: n = 3), zanamiviras (3 d.: n = 3, 5 d.: n = 3), PO prieš iNOS (3 d.: n = 3, 5 d.: n = 3) arba zanamiviro ir PO prieš iNOS derinys (3 d.: n = 4, 5 d.: n = 4) tomis pačiomis dozėmis. Teigiamos kontrolinės grupės pelės buvo užkrėstos gripo virusu, paskui joms kasdien intranazaliai buvo skiriama 20 µl fiziologinio tirpalo (5 d.: n = 3), laktozė ištirpinta 20 µl fiziologinio tirpalo (3 d.: n = 4, 5 d.: n = 4) arba neskirta nieko (3 d.: n = 3, 5 d.: n = 3). Pelės kasdien buvo sveriamos, kad būtų įvertintas jų sergamumas. Po 3 arba 5 dienų visoms pelėms buvo atlikta eutanazija sukeliant terminalinį nukraujavimą. Paskui pelių plaučiai buvo išpjauti ir atliktas bronchoalveolinis lavažas (BAL). BAL buvo atliktas du kartus su 1 ml fiziologinio tirpalo pro į trachėją įkištą vamzdelį. Surinktas BAL skystis buvo centrifuguotas 735 × g 5 minutes, gautas supernatantas buvo užšaldytas –80 °C iki nitritų koncentracijos nustatymo. Tuoj po BAL procedūros pelių kairieji plaučiai buvo įdėti į 4 proc. paraformaldehido tirpalą (Thermo Fisher

Scientific, Waltham'as, Masačusetso valstija, JAV) ir laikomi 4 °C iki histologinių tyrimų. Dešinieji plaučiai buvo įmerkti į TRIzol™ reagentą (Thermo Fisher Scientific, Waltham'as, Masačusetso valstija, JAV) ir homogenizuoti ant sauso ledo naudojant audinių smulkintuvą (Dremel, Racin'as, Viskonsino valstija, JAV). Plaučių audinio homogenatai centrifuguoti 12 000 × g 5 minutes 4 °C temperatūroje, ir supernatantai buvo užšaldyti –80 °C. Vėliau jie buvo naudojami gripo viruso RNR bei iNOS, citokinų IFN-γ, TNF-α ir beta (β)-aktino iRNR nustatyti taikant dauginę tikrojo laiko kiekybinę atvirkštinės transkripcijos - polimerazės grandininę reakciją (AT-PGR).

7.5 RNR išskyrimas ir nustatymas dauginiu tikrojo laiko kiekybinu AT-PGR tyrimu

Visa RNR iš plaučių homogenatų buvo išskirta naudojant Trizol® reagentą pagal instrukcijas, suteiktas „Thermo Fisher Scientific“ (Waltham'as, Masačusetso v., JAV). Gripo viruso RNR (koduojanti gripo A viruso polimerazės rūgštinį baltymą (RB)), iNOS, IFN-γ, TNF-α ir beta (β)-aktino iRNR lygiai buvo nustatyti dauginiu tikrojo laiko kiekybinu AT-PGR tyrimu, naudojant SensiFAST®™ Probe No-ROX vienos pakopos rinkinį (Bioline Reagents Ltd, Londonas, Didžioji Britanija). Buvo naudojami šie pradmenys ir zondai (pagaminti Biolegio B.V., Nijmegen'as, Olandija): gripo A viruso RB tiesioginės krypties pradmuo 5'-TCTCAGCGGTCCAAATTC CTGC -3', gripo A viruso RB atvirkštinės krypties pradmuo 5'-GGTTTAAACAACATTGGGTTCTTC CAT-3', gripo A viruso RB zondas 5'-HEX-TGA GGACCCAAGTCATGAAGGAGAGGGA-BHQ1-3'; iNOS tiesioginės krypties pradmuo 5'-CTTGTGCTGTTCTCAGCCCAACAATA-3', iNOS atvirkštinės krypties pradmuo 5'-TGGAACATT CTGTGCTGTCCCAG-3', iNOS zondas 5'-FAM-TGGCTCCCCGCAGCTCCTC-BHQ1-3'; IFN-γ tiesioginės krypties pradmuo 5'-GCCAAGTTT GAGGTCAACAACCC-3', atvirkštinės krypties pradmuo 5'-

TGGAACATTCTGTGCTGTCCCAG-3', zondas 5'-FAM-TCATCCGAGTGGTCCACCAGC TGT-BHQ1-3'; TNF- α tiesioginės krypties pradmuo 5'-CCAGACCCTCACACTCAGATCATC-3', atvirkštinės krypties pradmuo 5'-CTCCTCCACTTG GTGGTTTGCTAC-3', zondas 5'-HEX-TCGAGTGAC AAGCCTGTAGCCCACGT-BHQ1-3'; β -aktino tiesioginės krypties pradmuo 5'-GCACMATGA AGATCAAGATCATTGCTCC-3', β -aktino atvirkštinės krypties pradmuo 5'-TCRTACTCC TGCTTGCTGATCCAC-3' ir β -aktino zondas 5'-ROX-TCCTGGCCTCRCTGTCCACCTTCC-BHQ2-3'. Visos vienos pakopos reakcijos buvo atliktos 15 μ l reakcijos tūriuose su 1 μ l RNR iš kiekvieno mėginio, 200 nM koncentracijos pradmenimis ir 100 nM koncentracijos zondais. Dauginės vienos pakopos AT-PGR buvo atliktos tikrojo laiko termociklieriu Rotor-Gene Q 5plex su 1.7 versijos kompiuterių programa (Qiagen GmbH, Hilden'as, Vokietija) tokiomis sąlygomis: pirmoji komplementarios DNR grandinė buvo sintezuota 48 °C temperatūroje 10 min. (1 ciklas) ir paskui denatūruota 95 °C temperatūroje 2 min. (1 ciklas); o toliau buvo 50 ciklų DNR denatūracijos 95 °C temperatūroje 10 s ir prijungimo / pratęsimo 60 °C temperatūroje 1 min. β -aktino iRNR raiška buvo panaudota kaip vidinė kontrolė. $2^{-\Delta\Delta CT}$ algoritmas buvo naudojamas santykinio PGR amplifikacijos produkto kiekiui, atspindinčiam santykinę tikslinę RNR ir iRNR raišką (Livak ir kt., 2001), apskaičiuoti.

7.6 Nitritų nustatymas

Nitritų (NO_2^-) lygis, kaip ląstelių gaminamo NO žymuo, buvo nustatytas BAL skystyje panaudojant modifikuotą Griess reagentą, įsigytą iš „Sigma-Aldrich“ bendrovės (St. Louis'as, Misūrio v., JAV), pagal pateiktas gamintojo instrukcijas. Optinis tankis (O.T.) išmatuotas parinkus 540 nm bangos ilgį, PowerWave X 340 mikroplokštelių skaitytuvu-spektrofotometru (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski's, Vermonto v., JAV). Nitritų koncentracija buvo

apskaičiuota su KC4 statistinės programos 2.5 versija (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski's, Vermonto v., JAV) lyginant nitritų O.T. mėginiuose su standartinio praskiedimo natrio nitritų tirpalų O.T. Žemutinė NO_2^- nustatymo riba buvo 0,12 $\mu\text{mol/ml}$.

7.7 Histologinis tyrimas

Pelių plaučiai buvo įlieti į parafiną, supjaustyti 5 μm pjūviais ir nudažyti hematoksilinu ir eozinu naudojant standartinę techniką. Užkoduotus plaučių preparatus šviesaus lauko mikroskopija įvertino gydytojas patologas aklu metodu. Įvertinti šie plaučių histopatologijos parametrai: perivaskulinė limfocitų, peribronchinė limfocitų, židininė ir difuzinė leukocitų infiltracija; alveolių makrofagai; alveolių / bronchų epitelio pažeidimas; hiperemija; kapiliarų trombozė; bronchiolitas; pleuritas; alveolių hemoragija; atelektazė; fibrozė; edema ir hialininės membranos. Visi šie parametrai įvertinti subjektyviai skalėje nuo 0 (nėra patologiinių pakitimų) iki 3 (maksimalūs pakitimai). Kiekvienos pelės histologinę skalę sudarė minėtų parametrų įvertinimo balais suma.

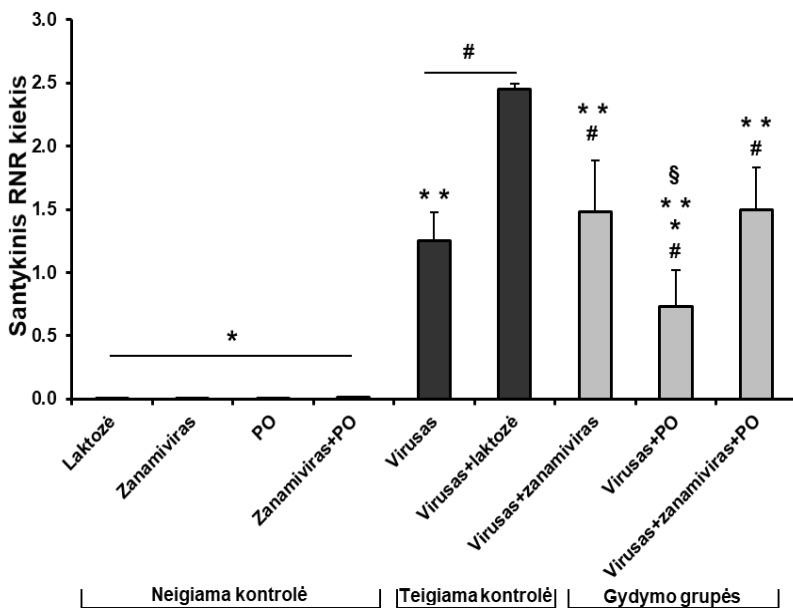
7.8 Statistinė analizė

Statistinis duomenų įvertinimas buvo atliktas Socialinių mokslų statistinio paketo (SPSS) kompiuterių programa (21.0 versija, IBM Corp., Armonk'as, Niujorko v., JAV). Eksperimentinių grupių vidurkiams palyginti naudota vienfaktorinė dispersijos analizė (ANOVA) su *post hoc* mažiausiai reikšmingo skirtumo (LSD) testu. Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm standartinė paklaida (SP). Kintamųjų koreliacijai įvertinti naudota Spirmano koreliacijos analizė. Mažesnė už 0,05 p vertė buvo vertinama kaip statistiškai reikšminga.

8. REZULTATAI

8.1 Santykinė gripo A viruso RNR raiška pelių plaučiuose

Trečią dieną po užkrėtimo AT-PGR metodu gripo viruso RB RNR nebuvo nustatyta neigiamos kontrolinės grupės pelių plaučiuose, bet RB RNR raiška buvo padidėjusi visų gripu užkrėstų pelių grupių plaučiuose (**1 paveikslas**).



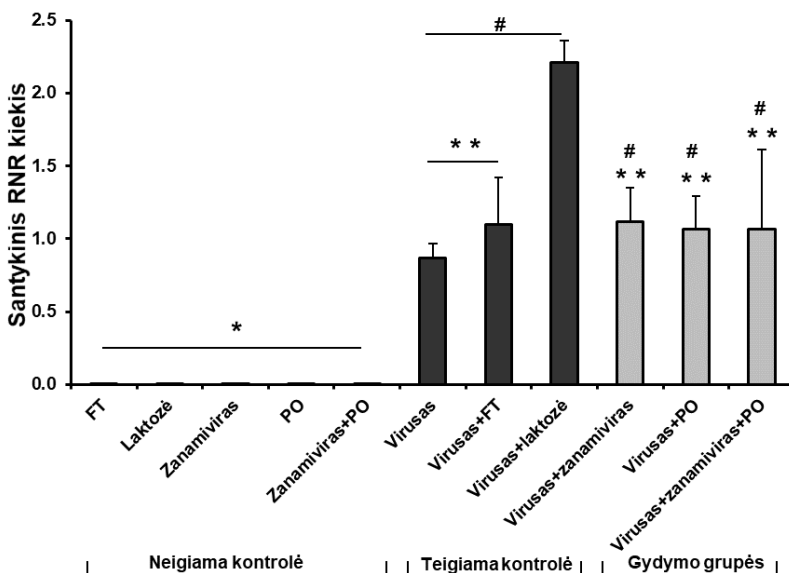
1 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių santykinė gripo viruso RP RNR raiška trečią dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) #vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 11$, *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 5$, **vs. gripu užkrėstos ir laktoze gydytos pelės, $n = 3$ ir §vs. gripu užkrėstos ir zanamiviro gydytos pelės, $n = 4$.

Gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 4$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 4$.

Teigiamos kontrolinės grupės virusu užkrėstų ir gydytų laktoze pelių plaučiuose santykinė gripo viruso RB RNR raiška buvo reikšmingai didesnė nei tik virusu užkrėstos pelių grupės ($p = 0,013$). Visų gripu užkrėstų gydymo grupių rasta reikšmingai mažesnė viruso RB RNR santykinė raiška, palyginti su gripu užkrėstomis ir laktoze gydytomis pelėmis. Virusu užkrėstų ir PO prieš iNOS gydytų pelių plaučiuose RB RNR santykinė raiška buvo mažesnė nei užkrėstų ir zanamiviru gydytų pelių plaučiuose ($p = 0,039$).

Penktą eksperimento dieną viruso RB RNR nebuvo nustatyta neigiamos kontrolinės grupės pelių plaučiuose, bet RB RNR raiška buvo padidėjusi visų grupių gripu užkrėstų pelių plaučiuose (**2 paveikslas**).



2 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių santykinė gripo viruso RB RNR raiška penktą dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) #vs. neigiama kontrolinė grupė, n = 15, *vs. teigiama kontrolinė grupė, n = 7, **vs. gripu užkrėstos ir laktoze gydytos pelės, n = 2.

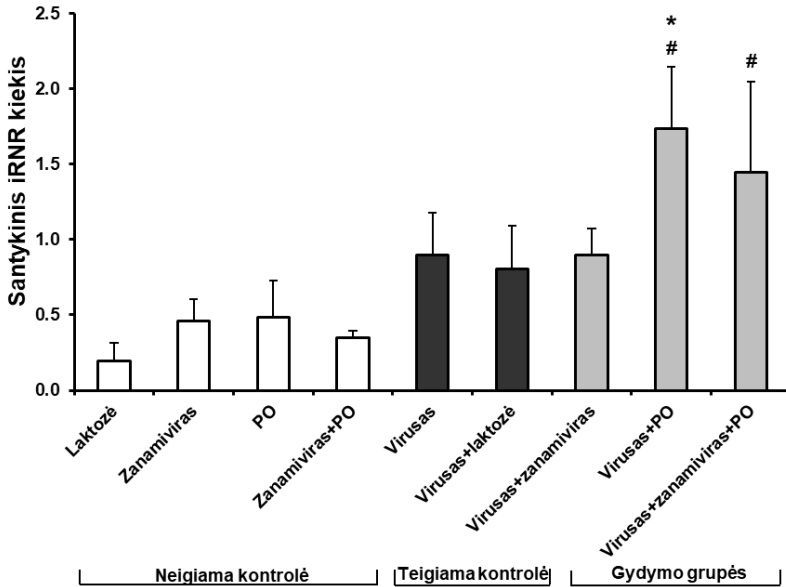
Gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, n = 4; gripu užkrėstos, PO gydytos, n = 4; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, n = 4.

Teigiamos kontrolinės grupės virusu užkrėstų ir gydytų laktoze pelių plaučiuose santykinė gripo viruso RB RNR raiška buvo reikšmingai didesnė nei tik virusu užkrėstos pelių grupės ($p = 0,012$) ar virusu užkrėstų ir fiziologiniu tirpalu (FT) gydytų pelių grupės ($p = 0,021$). Visų trijų gripu užkrėstų gydymo grupių pelių rasta reikšmingai mažesnė viruso RB RNR santykinė raiška, palyginti su gripu užkrėstomis ir laktoze gydytomis pelėmis ($p = 0,017$, palyginti su zanamiviro, $p = 0,013$, palyginti su PO, $p = 0,013$, palyginti su vaistų derinio gydymo grupe).

8.2 Santykinė IFN- γ iRNA raiška pelių plaučiuose

Santykinis IFN- γ iRNA kiekis buvo 55,1 proc. didesnis teigiamos (užkrėstos pelės) negu neigiamos (neužkrėstos pelės) kontrolinės grupės trečią eksperimento dieną, tačiau tai nebuvo statistiškai reikšminga (**3 paveikslas**). Užkrėstų ir zanamiviro gydytų pelių plaučiuose santykinis IFN- γ iRNR kiekis buvo panašus kaip ir kontrolinių grupių. Užkrėstų ir PO gydytų pelių grupės santykinis IFN- γ iRNR kiekis buvo reikšmingai didesnis nei abiejų kontrolinių grupių ($p = 0,001$ vs. neigiama kontrolė ir $p = 0,034$ vs. teigiama kontrolė), o vaistų derinio gydymo grupėje – vs. neigiama kontrolinė grupė ($p = 0,005$).

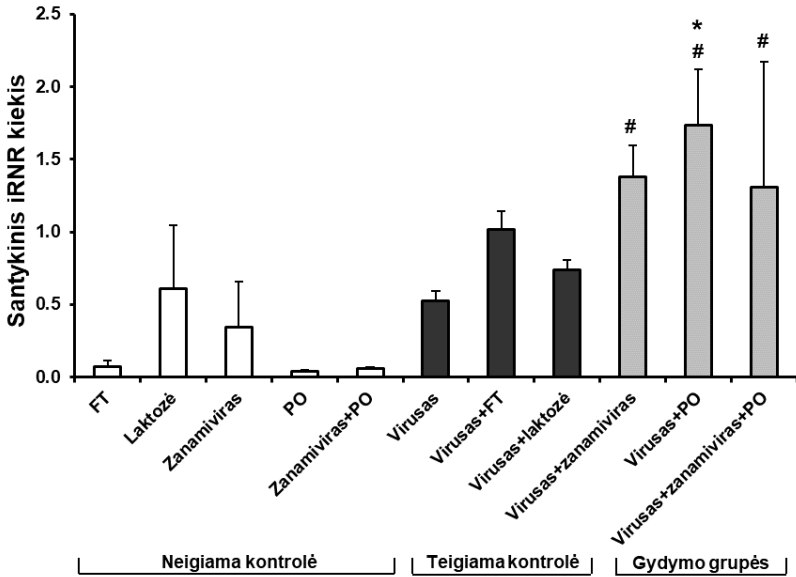
Penktą eksperimento dieną, panašiai kaip ir trečią, santykinis IFN- γ iRNR kiekis buvo 72,0 proc. didesnis teigiamos nei neigiamos kontrolinės grupės, tačiau tai nebuvo statistiškai reikšminga (**4 paveikslas**). Visų gydymo grupių IFN- γ iRNR santykinis kiekis buvo reikšmingai didesnis negu neigiamos kontrolinės grupės ($p = 0,006$, palyginti su užkrėstomis ir zanamiviro gydytomis, $p = 0,001$, palyginti su užkrėstomis ir PO gydytomis, ir $p = 0,01$ palyginti su užkrėstomis ir vaistų deriniu gydytomis pelėmis). Didžiausias santykinis IFN- γ iRNR kiekis buvo nustatytas užkrėstų ir PO gydytų pelių plaučiuose, jis buvo 20,7 proc. didesnis nei zanamiviro gydymo grupėje ir reikšmingai didesnis nei teigiamos kontrolinės grupės pelių plaučiuose ($p = 0,04$).



3 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių santykinė IFN- γ iRNR raiška trečią dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) #vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 11$, *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 5$.

Gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 4$; gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 4$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 4$.



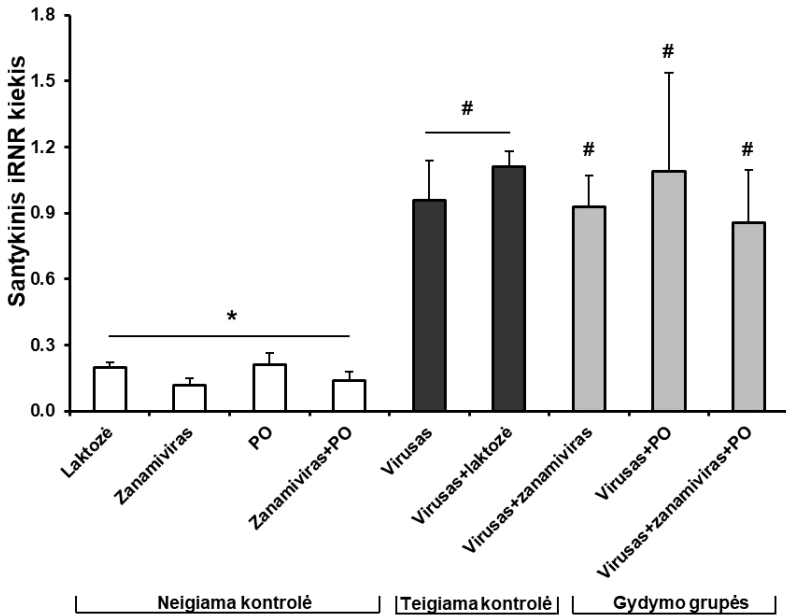
4 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių santykinė IFN- γ iRNR raiška penktą dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) #vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 15$, *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 7$.

Gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 4$; gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 4$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 4$.

8.3 Santykinė TNF- α iRNR raiška pelių plaučiuose

Santykinis TNF- α iRNR kiekis pelių plaučiuose trečią eksperimento dieną vaizduojamas **5 paveiksle**. TNF- α iRNR santykinė raiška buvo 84,2 proc. didesnė teigiamos negu neigiamos kontrolinės grupės ($p < 0,001$). Visų trijų užkrėstų pelių gydymo grupių santykinis TNF- α iRNR kiekis buvo panašus kaip ir teigiamos kontrolinės grupės, ir reikšmingai didesnis nei neigiamos kontrolinės grupės ($p = 0,003$, palyginti su zanamiviro, $p < 0,001$, palyginti su PO, $p = 0,006$, palyginti su vaistų derinio gydymo grupe).

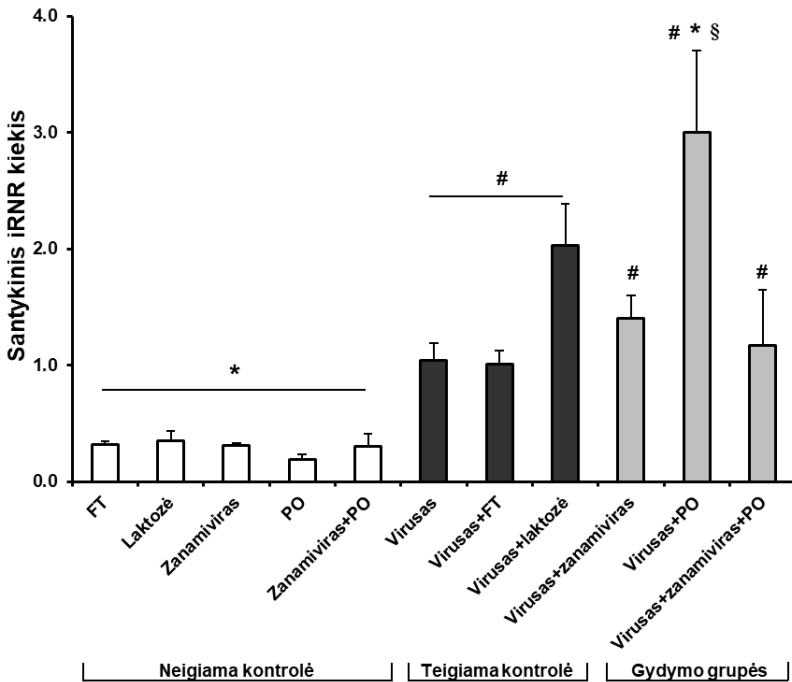


5 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių santykinė TNF- α iRNR raiška trečią dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) #vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 11$, *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 5$.

Gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 4$; gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 4$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 4$.

Penką eksperimento dieną santykinis TNF- α iRNR kiekis buvo 76,9 proc. didesnis teigiamos, palyginti su neigiamos kontrolinės grupės ($p = 0,001$). TNF- α iRNR santykinė raiška visų trijų gydymo grupių buvo didesnė nei neigiamos kontrolinės grupės ($p = 0,004$ užkrėstų ir zanamiviru gydytų, $p < 0,000$ užkrėstų ir PO gydytų ir $p = 0,019$ užkrėstų ir vaistų deriniu gydytų) pelių plaučiuose.



6 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių santykinė TNF- α iRNR raiška penktą dieną po užkrėtimo

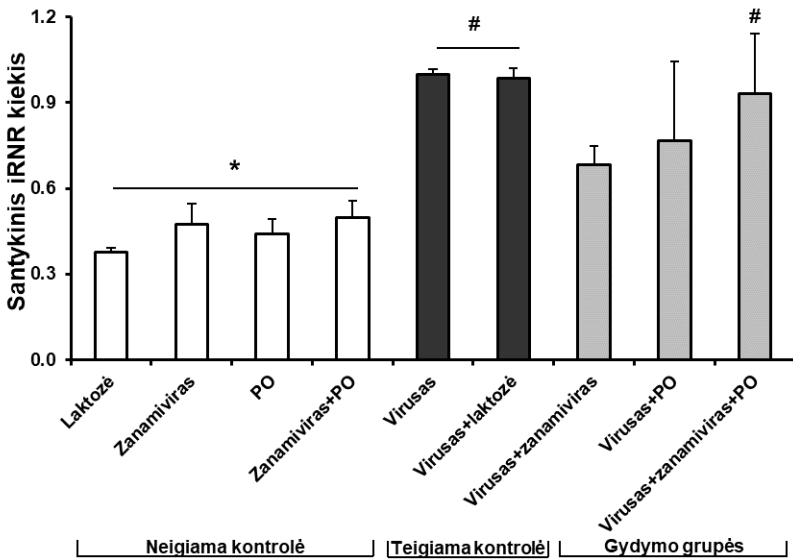
Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$)
[#]vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 15$, ^{*}vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 7$, [§]vs. gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 4$.

Gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 4$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 4$.

Didžiausias santykinis TNF- α iRNR kiekis buvo nustatytas užkrėstų ir PO gydytų pelių grupės plaučiuose: jis buvo 53,0 proc. didesnis nei užkrėstų ir zanamiviru gydytų pelių grupės ($p = 0,001$) bei didesnis nei teigiamos kontrolinės grupės pelių plaučiuose ($p < 0,001$). Užkrėstų ir vaistų deriniu gydytų pelių plaučiuose santykinis TNF- α iRNR kiekis buvo reikšmingai mažesnis ($p < 0,001$) nei užkrėstų ir PO gydytų pelių, ir 17,0 proc. mažesnis nei užkrėstų ir zanamiviru gydytų pelių plaučiuose (6 paveikslas).

8.4 Santykinė iNOS iRNR raiška pelių plaučiuose

Trečią eksperimento dieną iNOS iRNR santykinė raiška buvo reikšmingai didesnė teigiamos kontrolinės grupės (gripu užkrėstų) pelių plaučiuose negu neigiamos kontrolinės grupės (neužkrėstų pelių) (54,0 proc. padidėjimas, $p = 0,001$) (**7 paveikslas**). Tarp trijų gydymo grupių mažiausia santykinė iNOS iRNR raiška buvo užkrėstų ir zanamiviru gydytų pelių plaučiuose: 31,3 proc. mažesnė negu teigiamos kontrolinės grupės pelių ir panaši kaip neigiamos kontrolinės grupės pelių.



7 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių santykinė iNOS iRNR raiška trečią dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$)[#] vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 11$, *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 5$.

Gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 4$; gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 4$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 4$.

Užkrėstų ir PO gydytų pelių plaučiuose santykinis iNOS iRNR kiekis buvo 22,2 proc. mažesnis negu teigiamos kontrolinės grupės pelių ir taip pat panašus kaip neigiamos kontrolinės grupės pelių. Vaistų derinio gydymo grupės iNOS iRNR santykinė raiška buvo reikšmingai didesnė nei neigiamos kontrolinės grupės ($p = 0,005$).



8 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių santykinė iNOS iRNR raiška penktą dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) #vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 15$, *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 7$, §vs. gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 4$. Gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 4$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 4$.

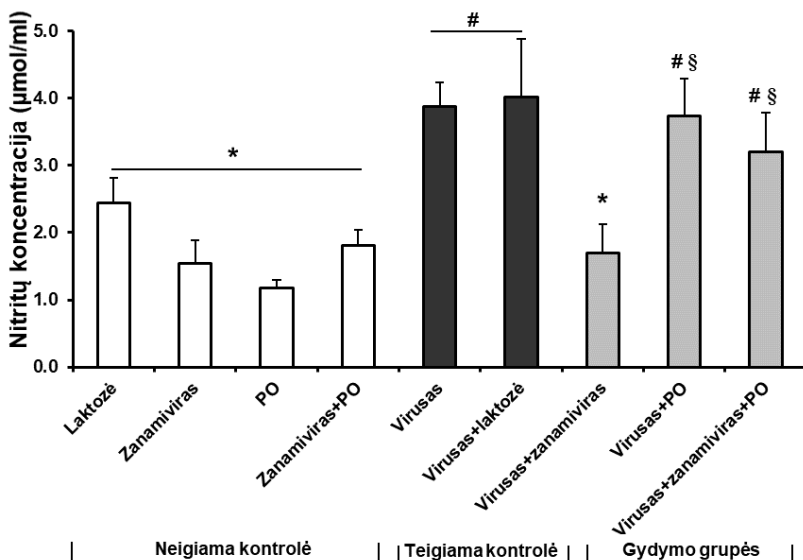
Penktą eksperimento dieną taip pat reikšmingai didesnis santykinis iNOS iRNR kiekis buvo nustatytas teigiamos nei neigiamos kontrolinės grupės pelių plaučiuose (87,8 proc. padidėjimas, $p < 0,001$) (8 paveikslas). Užkrėstų ir zanamiviro arba PO gydytų pelių plaučiuose rasta reikšmingai didesnė iNOS iRNR

raiška negu neigiamos kontrolinės grupės pelių plaučiuose ($p < 0,001$ ir $p = 0,002$ atitinkamai). Nors santykinis iNOS iRNR kiekis užkrėstų ir PO gydytų pelių plaučiuose buvo 8,5 proc. mažesnis negu teigiamos kontrolinės grupės, šis skirtumas nebuvo reikšmingas. Užkrėstų ir vaistų deriniu gydytų pelių plaučiuose santykinis iNOS iRNR kiekis nesiskyrė nuo neigiamos kontrolinės grupės. Tarp gydymo grupių didžiausias santykinis iNOS iRNR kiekis buvo nustatytas užkrėstų ir zanamiviru gydytų pelių plaučiuose. iNOS iRNR santykinis kiekis buvo 23,7 proc. mažesnis užkrėstų ir PO gydytų ir 57,2 proc. ($p = 0,027$) mažesnis užkrėstų ir vaistų deriniu gydytų pelių plaučiuose.

8.5 Nitritų koncentracija BAL skystyje

Trečią eksperimento dieną didesnė NO gamyba ($p < 0,001$) buvo nustatyta teigiamos kontrolės (gripu užkrėstų) pelių BAL skystyje, palyginti su neigiamos kontrolės (neužkrėstomis pelėmis) (**9 paveikslas**). Nitritų koncentracija buvo reikšmingai didesnė užkrėstų ir PO gydytų ($p = 0,001$) bei vaistų deriniu gydytų ($p = 0,007$) pelių grupių, palyginti su neigiama kontroline grupe. Užkrėstų ir zanamiviru gydytų pelių grupės nitritų koncentracija buvo reikšmingai mažesnė nei teigiamos kontrolinės grupės (57,5 proc. sumažėjimas, $p = 0,001$) ir nei užkrėstų ir PO gydytų (54,1 proc. sumažėjimas, $p = 0,005$) bei vaistų deriniu gydytų (46,9 proc. sumažėjimas, $p = 0,026$) pelių BAL skystyje.

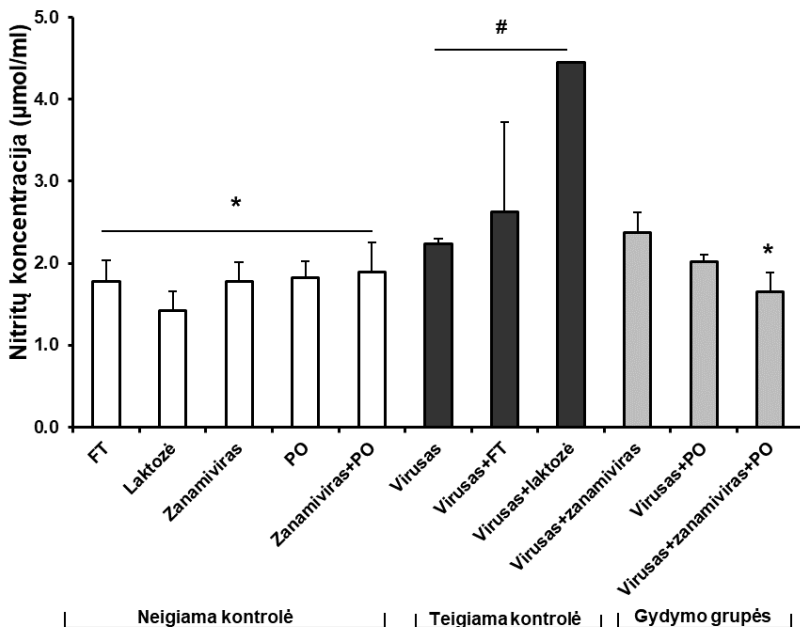
Nitritų koncentracija pelių BAL skystyje penktą dieną po užkrėtimo vaizduojama **10 paveiksle**. Panašiai kaip trečią eksperimento dieną, sustiprėjusi NO gamyba buvo rasta teigiamos kontrolinės grupės, palyginti su neigiama kontroline grupe ($p = 0,003$). Gripu užkrėstų ir vaistų deriniu gydytų pelių BAL skystyje buvo nustatyta reikšmingai mažesnė nitritų koncentracija, palyginti su teigiamos kontrolinės grupės pelių (39,3 proc. sumažėjimas, $p = 0,005$).



9 paveikslas. Nitritų (NO_2^-) koncentracija pelių bronchoalveoliniame skystyje trečią dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$)
[#]vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 13$, ^{*}vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 6$, [§]vs. gripu užkrėstos ir zanamiviro gydytos pelės, $n = 4$.

Gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 4$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 4$.



10 paveikslas. Nitritų (NO₂) koncentracija pelių bronchoalveoliniame skystyje penktą dieną po užkrėtimo

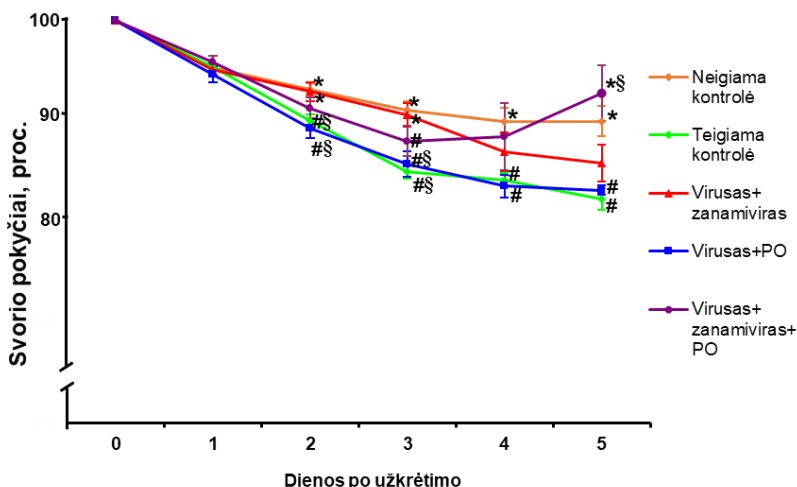
Duomenys pateikti kaip vidurkiai ± SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) #vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 11$, *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 5$.

Gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 4$; gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 3$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 5$.

8.6 Pelių svorio pokyčiai

Pelių svorio pokyčiai penkių dienų eksperimento laikotarpiu pateikiami **11 paveiksle**. Teigiamos kontrolinės grupės (užkrėstų) pelių svoris buvo reikšmingai mažesnis negu neigiamos kontrolinės (neužkrėstų) grupės pelių nuo antros eksperimento dienos. Užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės neteko mažiau svorio (9,4 proc.) negu teigiamos kontrolinės grupės pelės (15,0 proc., $p = 0,002$) ir negu

užkrėstos ir PO gydytos pelės (14,3 proc., $p = 0,009$) trečią eksperimento dieną; tačiau penktą dieną reikšmingų svorio netekimo skirtumų tarp šių grupių nenustatyta. Užkrėstos ir PO gydytos pelės neteko svorio reikšmingai daugiau nei neigiamos kontrolinės grupės pelės ir trečią dieną (svorio sumažėjimas 14,3 proc. ir 8,9 proc. atitinkamai, $p < 0,001$), ir penktą dieną (svorio sumažėjimas 16,9 proc. ir 10,0 proc. atitinkamai, $p = 0,02$). Užkrėstos ir vaistų deriniu gydytos pelės neteko 12,0 proc. svorio trečią dieną, tai buvo daugiau nei neigiamos kontrolinės grupės pelių, kurios neteko tik 8,9 proc. ($p = 0,037$).



11 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių svorio pokyčiai penkių dienų laikotarpiu po užkrėtimo

Svoris pavaizduotas procentais nuo pradinio svorio 0 dieną. Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) #vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 29$ trečią dieną, $n = 16$ penktą dieną; *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 16$ trečią dieną, $n = 8$ penktą dieną; §vs. gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 10$ trečią dieną, $n = 5$ penktą dieną.

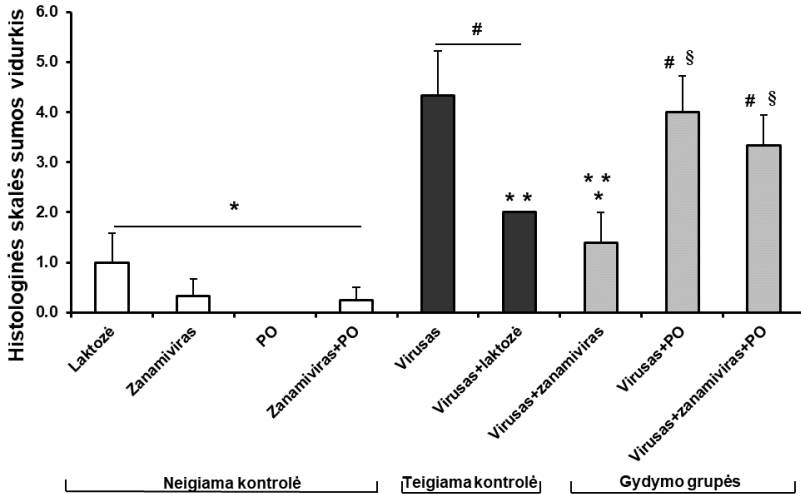
Gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 12$ trečią dieną, $n = 4$ penktą dieną; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 12$ trečią dieną, $n = 5$ penktą dieną.

Įdomu, kad užkrėstos pelės, gydytos vaistų deriniu, netgi pradėjo priaugti svorio, ir penktą dieną jų svoris buvo reikšmingai didesnis nei teigiamos kontrolinės grupės pelių ($p = 0,001$) ir užkrėstų zanamiviru gydytų pelių ($p = 0,036$).

8.7 Pelių plaučių histologiniai pokyčiai

Pelių kontrolinių ir gydymo grupių plaučių pažeidimo histologinės skalės sumos vidurkiai trečią dieną po užkrėtimo vaizduojami **12 paveiksle**. Teigiamos kontrolinės grupės histologinės skalės vidurkis buvo reikšmingai didesnis negu neigiamos kontrolinės grupės pelių ($p < 0,001$). Užkrėstų ir zanamiviru gydytų pelių skalės vidurkis buvo mažesnis nei teigiamos kontrolinės grupės ($p = 0,018$). Užkrėstų ir PO ar vaistų deriniu gydytų pelių plaučių pažeidimo histologinės skalės sumos vidurkiai buvo panašūs kaip teigiamos kontrolinės grupės ir reikšmingai didesni nei užkrėstų ir zanamiviru gydytų pelių.

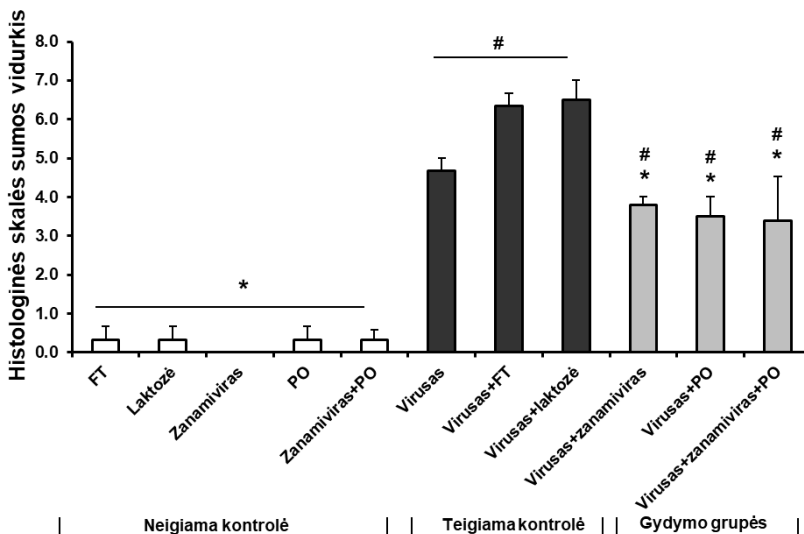
Penktą eksperimento dieną histologinės skalės vidurkis taip pat buvo reikšmingai didesnis teigiamos kontrolinės grupės negu neigiamos kontrolinės grupės ($p < 0,001$) (**13 paveikslas**). Visų užkrėstų pelių gydymo grupių histologinės skalės vidurkiai buvo reikšmingai mažesni nei teigiamos kontrolinės grupės pelių (užkrėstų zanamiviru gydytų pelių, $p = 0,006$; užkrėstų ir PO gydytų, $p = 0,003$ ir užkrėstų vaistų deriniu gydytų, $p = 0,001$).



12 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių plaučių pažeidimo histologinės skalės sumos vidurkiaai trečią dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiaai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$)
[#]vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 13$, *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 6$, **vs. gripu užkrėstos ir negydytos pelės, $n = 3$ ir [§]vs. gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 5$.

Gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 6$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 6$.

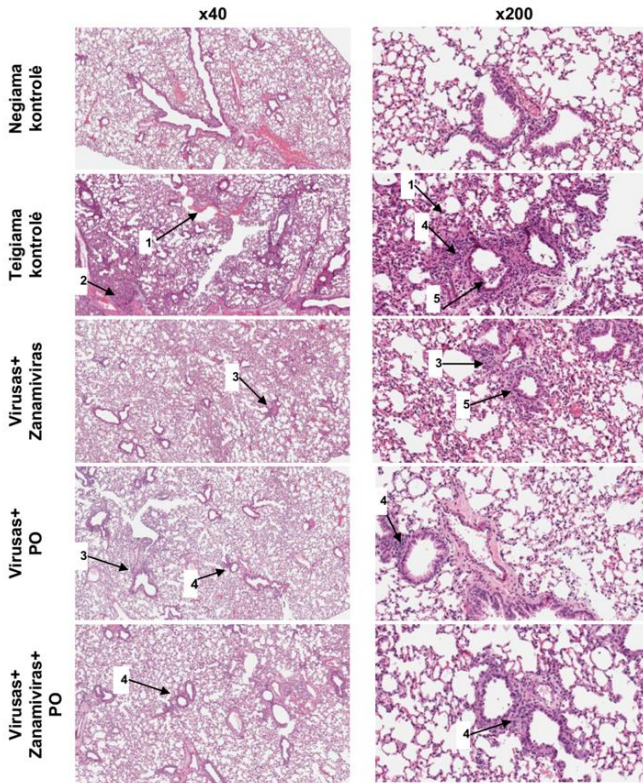


13 paveikslas. Kontrolinių ir gydymo grupių pelių plaučių pažeidimo histologinės skalės sumos vidurkiaai penktą dieną po užkrėtimo

Duomenys pateikti kaip vidurkiaai \pm SP. Statistiškai reikšminga ($p < 0,05$)
[#]vs. neigiama kontrolinė grupė, $n = 16$, *vs. teigiama kontrolinė grupė, $n = 8$, ir [§]vs. gripu užkrėstos ir zanamiviru gydytos pelės, $n = 5$.

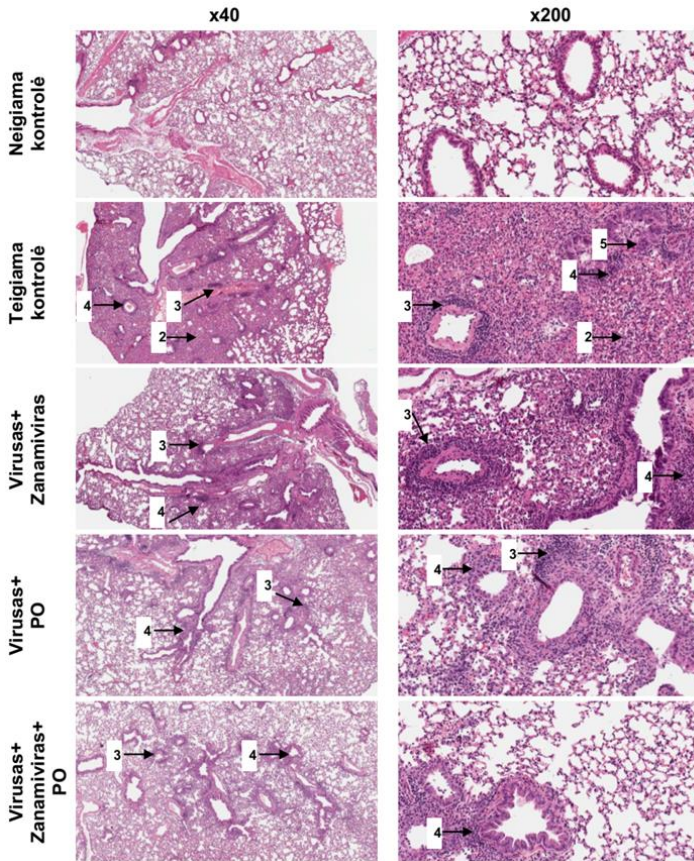
Gripu užkrėstos, PO gydytos, $n = 4$; gripu užkrėstos, zanamiviro ir PO deriniu gydytos, $n = 5$.

Trečios eksperimento dienos pelių plaučių histologinių preparatų nuotraukos pateikiamos **14 paveiksle**, o penktos eksperimento dienos – **15 paveiksle**.



14 paveikslas. Histologiniai BALB/c pelių plaučių preparatai, nudažyti hematoksilinu ir eozinu trečią dieną po užkrėtimo

Rodyklėmis pažymėta: (1) alveolių hemoragija, (2) židininė leukocitų infiltracija, (3) perivaskulinė limfocitų infiltracija, (4) peribronchinė limfocitų infiltracija, (5) bronchiolitas.



15 paveikslas. Histologiniai BALB/c pelių plaučių preparatai, nudažyti hematoksilinu ir eozinu penktą dieną po užkrėtimo

Rodyklėmis pažymėta: (1) alveolių hemoragija (nebuvo penktos dienos preparatų nuotraukose), (2) židininė leukocitų infiltracija, (3) perivaskulinė limfocitų infiltracija, (4) peribronchinė limfocitų infiltracija, (5) bronchiolitas.

8.8 Plaučių pažeidimo ir svorio pokyčio, nitritų koncentracijos, gripo viruso RNR, citokinų bei iNOS iRNR pelių plaučiuose koreliacija

Trečios eksperimento dienos pelių plaučių pažeidimo histologinės skalės sumos vidurkio ir svorio pokyčio, nitritų koncentracijos, gripo viruso RNR, citokinų bei iNOS iRNR pelių plaučiuose koreliacijos koeficientai pateikiami **1 lentelėje**, o penktos dienos – **2 lentelėje**.

1 lentelė. Plaučių pažeidimo histologinės skalės sumos vidurkio ir svorio pokyčio, nitritų koncentracijos, gripo viruso RNR, IFN- γ ir TNF- α bei iNOS iRNR pelių plaučiuose koreliacija trečią eksperimento dieną

Kintamasis	Histologinės skalės sumos vidurkis	
	<i>r</i>	<i>p</i> vertė
Svoris 3 dieną	-0,428*	0,009
Nitritai	0,546*	0,001
Gripo viruso RB RNR	0,595*	0,001
iNOS iRNR	0,428*	0,023
IFN- γ iRNR	0,476*	0,010
TNF- α iRNR	0,746*	<0,001

Naudota Spirmeno koreliacijos analizė: *r* – koreliacijos koeficientas. *P* vertė mažesnė nei 0,05 buvo vertinta kaip statistiškai reikšminga (*).

2 lentelė. Plaučių pažeidimo histologinės skalės sumos vidurkio ir svorio pokyčio, nitritų koncentracijos, gripo viruso RNR, IFN- γ ir TNF- α bei iNOS iRNR pelių plaučiuose koreliacija penktą eksperimento dieną

Kintamasis	Histologinės skalės sumos vidurkis	
	<i>r</i>	<i>p</i> vertė
Svoris 5 dieną	-0,495*	0,002
Nitritai	0,355	0,05
Gripo viruso RB RNR	0,822*	<0,001
iNOS iRNR	0,594*	<0,001
IFN- γ iRNR	0,571*	<0,001
TNF- α iRNR	0,690*	<0,001

Naudota Spirmeno koreliacijos analizė: *r* – koreliacijos koeficientas. *P* vertė mažesnė nei 0,05 buvo vertinta kaip statistiškai reikšminga (*).

9. IŠVADOS

1. Užkrėtus peles A/PR/8/34 gripo virusu, reikšmingai padidėjo TNF- α , iNOS irNR raiška plaučiuose, nitritų kiekis BAL skystyje, sumažėjo pelių svoris bei plaučių pažaida buvo didesnė nei neužkrėtų pelių.
2. Gydant zanamiviru gripo virusu užkrėstas peles ankstyvas gripo viruso replikacijos ir NO gamybos plaučiuose slopinimas lėmė mažesnę plaučių pažeidimą ir pelių svorio netekimą.
3. Gydant gripu užkrėstas peles priešprasminiu oligonukleotidu prieš iNOS, viruso replikacijos slopinimas buvo ankstyvas, bet apsauginis plaučių pažaidos poveikis vėlyvas ir nesusijęs su NO gamybos plaučiuose slopinimu. Padidėjusi citokinų raiška plaučiuose galimai buvo susijusi su reikšmingu pelių svorio mažėjimu.
4. Gydant gripu užkrėstas peles zanamiviro ir priešprasminio oligonukleotido prieš iNOS deriniu, viruso replikacijos slopinimas buvo ankstyvas, tačiau plaučių pažaidos apsauginis poveikis vėlyvas, susijęs su NO gamybos plaučiuose slopinimu. Mažesnė citokinų raiška galimai buvo susijusi su mažesniu pelių svorio netekimu.

10. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Tyrimė nustatė keletą naujienų. Pirma, gydant zanamiviru gripu užkrėstas peles, stebėjome ankstyvą NO gamybos slopinimą plaučiuose. Antra, gydant gripu užkrėstas peles priešprasminiu oligonukleotidu prieš iNOS irNR, plaučių pažeidimas buvo mažesnis, o jo derinys su zanamiviru lėmė mažesnę plaučių pažeidimą, NO gamybą ir pelių svorio netekimą, todėl tikimasi, kad šis gydymo derinys galėtų praversti ateityje gripui gydyti. Tačiau

lieka keletas neaiškių klausimų dėl vaistinių medžiagų veikimo mechanizmų, todėl ateityje būtų tikslinga atlikti išsamesnius tyrimus.

1. Kadangi vėlyvojo (penktos dienos) zanamiviro poveikio slopinti NO gamybą nebuvo nustatyta, reikėtų tolesnių tyrimų, kuriuose būtų naudojamos skirtingos zanamiviro dozės ir jų skyrimo schemas.
2. Priešprasminis oligonukleotidas prieš iNOS mūsų eksperimente turėjo ir priešvirusinį poveikį. Šio poveikio mechanizmas nėra aiškus, todėl reikėtų tęsti tyrimus.
3. Mūsų tyrime priešprasminis oligonukleotidas prieš iNOS reikšmingai NO sintezės neslopino, tačiau tikslingi ilgesnės trukmės tyrimai naudojant skirtingas šios vaistinės medžiagos dozes. Taip pat būtų tikslinga tirti ne tik iNOS iRNR raišką, bet ir iNOS baltymo koncentraciją pelių plaučiuose.
4. Nėra aiškus mechanizmas, kodėl priešprasminio oligonukleotido prieš iNOS gydymo grupėje buvo mažesnė uždegimo ląstelių infiltracija plaučiuose po užkrėtimo gripo virusu, todėl būtų naudingi tolesni patikslinamieji tyrimai.

PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Publikacijos recenzuojamuose žurnaluose

1. **Zablockienė B**, Ambrozaitis A, Kačergius T. Gripo gydymo galimybės ir ateities perspektyvos. *Vaikų pulmonologija ir alergologija*, 2017 (11); 1: 6208–6227.
2. **Zablockienė B**, Ambrozaitis A, Kačergius T, Žurauskas E, Bratchikov M, Gravenstein S. Gripo viruso sukelta azoto oksido gamyba pelių plaučiuose ir jos slopinimo metodas. *Vaikų pulmonologija ir alergologija*, 2017 (20); 2: 6306–6313.

3. **Zablockienė B**, Kacergius T, Ambrozaitis A, Zurauskas E, Bratchikov M, Jurgauskienė L, Zablockis R, Gravenstein S. Zanamivir Diminishes Lung Damage in Influenza A Virus-infected Mice by Inhibiting Nitric Oxide Production. *In Vivo* 2018; 32: 473–478.

Pranešimai vietiniuose ir tarptautiniuose mokslo renginiuose

Doktorantė mokslinio darbo tyrimų rezultatus pristatė:

1. Dviejuose vietiniuose moksliniuose renginiuose:
 - 1) **Zablockienė B**. Žodinis pranešimas „Gripo gydymas: naujos galimybės“ konferencijoje „Apsinuodijimų ir infekcinių susirgimų sąlyčio taškai“. 2017 m. vasario 9 d., Vilnius, Lietuva.
 - 2) **Zablockienė B**. Žodinis pranešimas „Gripo virusai ir jų sukeltos visuomenės sveikatos problemos“ konferencijoje „Individualus požiūris į visuomenės sveikatą šaltuoju metų sezonu“. 2017 m. spalio 7 d., Kaunas, Lietuva.
2. Keturiuose tarptautiniuose moksliniuose renginiuose:
 - 1) Ambrozaitis A, **Zablockiene B**, Kacergius T, Zurauskas E, Gravenstein S. Prevention of influenza-virus induced pulmonary histopathology in mice using antivirals and antisense oligonucleotides to inducible nitric oxide synthase. Santrauka ir stendinis pranešimas konferencijoje „11th Annual Conference of the Baltic Network Against Life-Threatening Viral Infections“. 2014 m. balandžio 24–27 d., Vilnius, Lietuva.
 - 2) **Zablockiene B**, Kacergius T, Ambrozaitis A, Zurauskas E, Bratchikov M, Gravenstein S. Treatment with zanamivir and antisense oligonucleotides to inducible nitric oxide synthase decreases influenza A virus-induced lung inflammation. Santrauka ir stendinis pranešimas konferencijoje „Nordic

Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2016“. 2016 m. rugsėjo 15–18 d., Rovaniemi, Suomija.

- 3) **Zablockienė B.** Žodinis pranešimas „New perspectives in the therapy of influenza“, konferencijoje „Baltic Young Infectologists Conference 2017“, 2017 m. kovo 24–25 d., Ryga, Latvija.
- 4) **Zablockienė B.**, Kacergius T, Ambrozaitis A, Zurauskas E, Bratchikov M, Gravenstein S. Zanamivir Reduces Lung Pathology by Inhibiting Nitric Oxide Production in Influenza A Virus-Infected Mice. Stendinis pranešimas konferencijoje „Life Science Baltics 2018“, 2018 m. rugsėjo 26–27 d., Vilnius, Lietuva.

PADEKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovui Infekcinių ligų ir dermatovenerologijos klinikos profesoriui habilituotam daktarui Arvydui Ambrozaičiui, padėjusiam susipažinti su medicinos mokslų tiriamąja veikla ir įsigilinti į gripo infekcijos subtilybes. Ačiū profesoriui už progą pradėti šį mokslinį darbą, pagalbą visuose disertacijos darbo etapuose, už sugaištą laiką, pateiktas vertingas pastabas ir pasiūlymus.

Širdingai dėkoju mokslinio darbo konsultantui Brauno universiteto, JAV, profesoriui Stefanui Gravenšteiniui. Jo dėka gimė disertacijos idėja. Esu labai dėkinga už profesionalias konsultacijas, komentarus ir pagalbą rengiant pranešimus, publikacijas ir disertaciją.

Nuoširdžiai dėkoju Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros docentui Tomui Kačergiui už galimybę tęsti docento pradėtus darbus gripo viruso infekcijos tema, praktinę pagalbą, nuoširdų bendradarbiavimą, palaikymą ir didžiulę paramą visu mokslinio darbo laikotarpiu.

Esu labai dėkinga Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Valstybinio patologijos centro docentui Edvardui Žurauskui už pagalbą atliekant ir įvertinant pelių plaučių histologinius tyrimus bei geranoriškas konsultacijas doktorantūros darbo metu.

Labai ačiū Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros daktarui Maksimui Bratčikovui už pagalbą atliekant ir interpretuojant PGR tyrimus.

Dėkoju visam Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Infekcinių ligų centro kolektyvui už pagalbą ir gerą darbo atmosferą.

Nuoširdžiai dėkoju šeimai už neišsenkamą kantrybę ir nuoširdų palaikymą visu disertacijos rengimo laikotarpiu. Taip pat dėkoju mane palaikiusiems draugams.

INFORMACIJA APIE AUTORE

Birutė Zablockienė gimė 1977 m. liepos 3 d. Vilniuje, Lietuvoje. Baigė studijas Vilniaus universiteto Medicinos fakultete 2001 m. ir įgijo medicinos gydytojo specialybę. 2006 m. Vilniaus universitete baigusi infekcinių ligų rezidentūrą įgijo infekcinių ligų gydytojo specialybę. Nuo 2013 m. iki 2018 m. – doktorantė Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Infekcinių ligų ir dermatovenerologijos klinikoje. Nuo 2002 m. dirbo Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Infekcinių ligų centro Priėmimo skyriuje, nuo 2012 m. dirba Antrajame infekcinių ligų skyriuje. Nuo 2003 m. iki 2011 m. dirbo Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Patologijos, teismo medicinos ir farmakologijos katedroje asistente. Nuo 2006 m. pradėjo dirbti lektore, o nuo 2018 m. asistente Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Infekcinių ligų ir dermatovenerologijos klinikoje. Tobulinosi Varšuvoje, Londone. Domėjimosi sritys: gripas, erkių platinamos infekcijos, ŽIV infekcija, virusiniai hepatitai. Nuo 2006 m. Birutė Zablockienė yra Lietuvos infektologų draugijos narė, o nuo 2018 m. – Lietuvos infektologų draugijos valdybos narė. Ji taip pat yra Lietuvos pulmonologų draugijos bei Europos klinikinės mikrobiologijos ir infekcinių ligų draugijos (ESCMID) narė.

SUMMARY

Introduction. Influenza remains a serious public health problem that causes severe illness and death in high risk populations. The various studies associate severe disease with the development of influenza viral pneumonia (Taubenberger, Morens, 2008; Kuiken, Taubenberger, 2008) with or without secondary bacterial pneumonia (Morens et al., 2008; Klugman et al., 2009; Ruuskanen et al., 2011). Some of the pulmonary abnormalities of fatal influenza viral pneumonia might be induced by the release of host inflammatory mediators, rather than by a direct viral cytopathic effect (de Jong et al., 2006; Kash et al., 2006).

Influenza infection induces a cascade of host immune responses that involves production of proinflammatory cytokines and recruitment of inflammatory cells in infected lungs (Van Reeth, 2000; Jayasekera et al., 2006; La Gruta et al., 2007; Kumar et al., 2014; Short et al., 2014). Cytokines such as interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) stimulate the production of inducible nitric oxide synthase (iNOS) leading to high-output synthesis of nitric oxide (NO), predominantly in macrophages (Short et al., 2014; Akaike et al., 1996; Suliman et al., 2001; Bosca et al., 2005). In turn, the NO and excessive amounts of reactive nitrogen intermediates can lead to significant lung immunopathology (La Gruta et al., 2007; Short et al., 2014; Zaki et al., 2005). Reducing or preventing infection or NO production could prevent such immunopathology.

Animal experiments that affect iNOS function and NO production in host cells show therapeutic promise for the control of lung inflammation and damage from influenza (Jayasekera et al., 2006; Akaike et al., 1996; 2003). Suppression of virus spread within the respiratory tract by NIs could indirectly cause a reduction in iNOS expression and NO synthesis. NIs reduced NO generation in influenza virus-infected and IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophage cell line *in vitro* (Kacergius et al., 2006). However, it is

unknown whether NIs have the capacity to suppress net NO production during influenza virus infection and, in this way, reduce lung tissue damage under *in vivo* conditions.

A relatively new approach to inhibit iNOS activity involves antisense-mediated gene knock-down. In the present study the hypothesis that influenza A virus (IAV) induced lung inflammation in mice can be reduced using antisense oligodeoxynucleotide targeting iNOS mRNA or its combination with NI zanamivir was investigated.

Aim of the study

To evaluate if zanamivir and/or antisense oligonucleotide against inducible nitric oxide synthase prevents influenza viral pneumonia.

Objectives of the study

1. To evaluate the effect of A/PR/8/34 influenza virus infection of BALB/c mice on IAV RNA, IFN- γ , TNF- α and iNOS mRNA relative levels in lungs, nitrite concentration in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, weight changes and lung histological damage.
2. To evaluate the zanamivir's treatment effects on IAV RNA, IFN- γ , TNF- α and iNOS mRNA relative levels in lungs, nitrite concentration in BAL fluid, weight changes and lung histological damage with A/PR/8/34 influenza virus infection.
3. To assess the antisense oligonucleotide against inducible nitric oxide synthase treatment effects on IAV RNA, IFN- γ , TNF- α and iNOS mRNA relative levels in lungs, nitrite concentration in BAL fluid, weight changes and lung histological damage during A/PR/8/34 influenza virus infection.
4. To evaluate the combination of Zanamivir and antisense oligonucleotide against inducible nitric oxide synthase treatment effects on IAV RNA, IFN- γ , TNF- α and iNOS mRNA relative levels in lungs, nitrite concentration in BAL fluid, weight changes

and lung histological damage during A/PR/8/34 influenza virus infection.

Scientific novelty of the study

Several scientific novelties are presented in the dissertation. First, the capacity of zanamivir to suppress net NO production during influenza virus infection and, in this way, to reduce lung tissue damage under *in vivo* conditions, was analysed for the first time. Second, the effect of antisense oligodeoxynucleotide to iNOS mRNA or its combination with zanamivir treatment of influenza infected mice has not been previously evaluated.

Practical value of the study

The neuraminidase inhibitors are currently the only option in most clinical settings, however they may be insufficient for seriously ill, high-risk patients or in influenza A(H5N1) disease. An increasing number of drug resistant viruses have been discovered recently. Thus there is a continuing need for new influenza therapies using novel targets and creative strategies. As treatment with antisense oligodeoxynucleotide to iNOS mRNA can reduce lung inflammation caused by influenza virus infection in mice, this more targeted approach, in combination with antiviral strategies, could be a potential new option in the treatment of influenza virus infection.

Defended statements of the dissertation

1. Infection of BALB/c mice with A/PR/8/34 influenza virus induces lung histological damage, which is associated with weight loss, higher expression of cytokines, iNOS mRNA and nitrite concentration in lungs.
2. Zanamivir reduces lung damage by suppressing IAV replication, with a result of less NO production in influenza infected mice.
3. Antisense oligodeoxynucleotide to iNOS mRNA reduces lung inflammation caused by influenza virus infection in mice by inhibiting NO production.

4. Zanamivir and antisense oligodeoxynucleotide to iNOS mRNA combination treatment diminishes lung inflammation by suppressing IAV replication and inhibiting NO production in influenza infected mice.

Materials and methods

Animals. Female BALB/c mice (6–12 weeks of age) weighing 18–20 g were obtained from the Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, USA. The mice were housed within microisolator cages in an isolation room, and all experimental procedures were performed in a biosafety cabinet using biosafety level 2 containment. The animals were anesthetized by intraperitoneal injection a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (50 mg/kg) before every procedure. All protocols involving experiments with mice were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Eastern Virginia Medical School, Norfolk, VA, USA (permit no. 07-003).

Influenza virus infectivity. The mouse-adapted influenza A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34) (H1N1) virus was propagated in the allantoic cavities of 10-day-old embryonated chicken eggs as previously described (Lennette, 1995). For the determination of influenza A/PR/8/34 virus infectivity titer, confluent monolayers of Madin-Darby canine kidney cells (American Type Culture Collection No. CCL-34, Manassas, VA, USA) were inoculated with the virus stock of serial 10-fold dilutions. The 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) was evaluated according to the extent of viral cytopathic effect in monolayers after 96 h. The virus infectivity titer was calculated using Kärber method, and it was determined as 10^{8.4} TCID₅₀/mL (Lennette, 1995). Afterwards, different serial dilutions of the virus stock were tested on mice by challenging them with a single 20 µL dose of the virus suspension (10 µL/nostril) for five days in order to determine the virus infectivity titer that produces a significant infection without causing death. According to

the body weight loss and survival rate of mice, the virus infectivity titer of $10^{7.6}$ TCID₅₀/mL was determined and selected for further experiments.

Compounds. Zanamivir (5-(acetylamino)-4-((aminoimino-methyl)-amino)-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galactonon-2-enonic acid) was obtained from GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC, USA as drug Relenza™ consisting of a powder mixture of 5 mg of zanamivir and 20 mg of lactose per blister. The antisense oligonucleotide to iNOS was synthesized as an unmodified oligodeoxyribonucleotide (ODN) with phosphodiester internucleotide linkages at Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. The antisense ODN sequence comprised of 21 nucleotides: 5'-CAAGCCATGTCTGAGACTTTG-3', corresponding to bases 1 through 21 of the translation initiation site of mouse iNOS mRNA, as reported by Ding et al. (Ding et al., 1998). Lactose was obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. The compounds were prepared in sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, for intranasal administration of 20 µL (10 µL/nostril) to the mice. The dosage of zanamivir (2 mg/kg) and antisense ODN (5 mg/kg) for the mice was based on therapeutic dose ranges of these compounds provided in the literature (Ryan et al., 1994; Tarbet et al., 2014; Li et al., 2014; Ding et al., 1998; Templi et al., 2000). In this regard, the doses of zanamivir and antisense ODN for the local delivery to target tissues are in the ranges of 0.3–12.5 mg/kg and 5–20 mg/kg, respectively. The dose of lactose (placebo) was 8 mg/kg. The compounds were administered in a single-dose regimen to minimize the animal distress caused by the treatment procedures.

Experimental design. The anesthetized mice were inoculated intranasally with 20 µL of influenza A/PR/8/34 virus suspension containing infectivity titer of $10^{7.6}$ TCID₅₀/mL. At 3 h post-infection, mice were treated daily with 2 mg/kg dose of zanamivir, 5 mg/kg dose of antisense ODN or a combination of zanamivir (2 mg/kg) plus antisense ODN (5 mg/kg) for 3 or 5 days. These doses of zanamivir

and antisense ODN were administered to the anesthetized mice in 20 μL of PBS using a single-dose regimen. The negative controls were uninfected mice treated with either 20 μL of PBS, lactose, zanamivir, antisense ODN or combination of zanamivir and antisense ODN in the same dosages. The positive control groups consisted of influenza infected only, infected and 20 μL of PBS or lactose treated mice in the same dosages. Mice were monitored daily for morbidity, as measured by weight loss. After 3 or 5 days, mice were euthanized by axillary bleeding (terminal exsanguination), and then the lungs of mice were excised and subjected to bronchoalveolar lavage (BAL). For the BAL procedure, the trachea was cannulated and the lavage of lungs was performed twice with 1 mL of PBS. The collected BAL fluids were centrifuged at $735 \times g$ for 5 min, and the supernatants were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until determination of nitrite levels. Immediately after the BAL procedure, the left lung was placed in 4% paraformaldehyde (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until processing for histological examination. The right lung was immersed in the TRIzolTM reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and homogenized on dry ice by using a Tissue Tearor (Dremel, Racine, WI, USA). The lung tissue homogenates were centrifuged at $12\ 000 \times g$ for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the supernatants were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Afterwards, they were used for isolation of RNA followed by determination of the levels of viral RNA, iNOS and cytokine (*i.e.*, IFN- γ , TNF- α) mRNA applying a multiplex real-time quantitative reverse transcription (qRT)-PCR.

Nitrite determination. The levels of nitrite (NO_2^-), an indicator of NO synthesis in biological systems, were determined in BAL fluids using a modified Griess reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as directed by the manufacturer. A microplate-reader spectrophotometer PowerWave X 340 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) was employed to measure the optical density (OD) of BAL fluid samples at a wavelength of 540 nm. Nitrite concentrations were calculated using the KC4 software, version 2.5

(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), by comparison OD of the samples containing formed NO_2^- to a standard curve of sodium nitrite (NaNO_2). The lower limit of NO_2^- detection was 0.12 $\mu\text{mol/mL}$, and the upper limit of NO_2^- detection was 15.63 $\mu\text{mol/mL}$.

Histological examination. The harvested lung tissues were embedded in paraffin, cut into 5 μm sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Coded lung samples were examined using light microscopy by a pathologist in the blinded approach. The following indicative parameters of pulmonary histopathology were evaluated: perivascular lymphocytic, peribronchial lymphocytic, focal and diffuse leucocytic infiltrations; praesense of alveolar macrophages; damage of alveolar/bronchial epithelium; hyperemia; capillary thromboses; bronchiolitis; pleuritis; alveolar hemorrhage, collapse, fibrosis, edema and hyaline membranes. Each of these parameters was graded subjectively by scoring on a scale from 0 (absence of pathological changes) to 3 (maximum extent of pathological changes), and the sum of scores comprised the histological score for each mouse.

RNA isolation and multiplex real-time quantitative reverse transcription (qRT)-PCR. Total RNA was isolated from lung homogenates using TRIzol™ reagent according to the instructions provided by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. The levels of viral RNA (encoding influenza A virus (IAV) polymerase acidic (PA) protein), iNOS, IFN- γ , TNF- α and beta (β)-actin mRNA were determined by the multiplex real-time qRT-PCR using SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step Kit (Bioline Reagents Ltd, London, UK). Primers and hydrolysis probes were synthesized by Biologie B.V., Nijmegen, Netherlands. Primer and probe sequences used in the multiplex real-time quantitative reverse transcription (qRT)-PCR were: IAV PA forward primer 5'-TCTCAGCGGTCCAAATTCCTGC-3', reverse primer 5'-GGTTAACAACATTGGGTTCCCTCCAT-3', probe

TGAGGACCCAAGTCATGAAGGAGAGGGA -BHQ1-3', amplicon size 146 bp; iNOS sequences were: forward primer 5'-CTTGTGCTGTTC TCAGCCCAACAATA-3', reverse primer 5'-TGGAACATTCTGTGCTGTCCCAG-3', probe 5'-FAM-TGGCTCCCCGCAGCTCCTC-BHQ1-3', amplicon size 95 bp; IFN- γ forward primer 5'-GCCAAGTTTGAGGTCAACAACCC-3', reverse primer 5'-TGGAACATTCTGTGCTGTCCCAG-3', probe 5'-FAM-TCATCCGAGTGGTCCACCAGCTGT -BHQ1-3', amplicon size 101 bp; TNF- α forward primer 5'-CCAGACCCTCACACTCAGATCATC-3', reverse primer 5'-CTCCTCCACTTG GTGGTTTGCTAC-3', probe 5'-HEX-TCGAGTGAC AAGCCTGTAGCCCACGT-BHQ1-3', amplicon size 85 bp; β -actin forward primer 5'-GCACMATGAAGATCAAGATCATTGCTCC-3', reverse primer 5'-TCRTACTCC TGCTTGCTGATCCAC-3', probe 5'-ROX-TCCTGGCCTCRCTGTCCACCTTCC-BHQ2-3', amplicon size 118 bp. All multiplex one-step reactions were carried out in a total volume of 15 μ L using 1 μ L of the isolated RNA sample and primers at a concentration of 200 nM each, and probes at a concentration of 100 nM each. The multiplex one-step qRT-PCR assays were performed employing a real-time thermocycler Rotor-Gene Q 5plex model with software version 1.7 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) under the following conditions: first strand cDNA was synthesized at 48 °C for 10 min and then denatured at 95 °C for 2 min; followed by 50 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s and annealing/extension at 60 °C for 1 min. The expression of β -actin mRNA was used as an internal standard for normalization of the viral PA RNA and target mRNA levels between different samples. The $2^{-\Delta\Delta C_T}$ algorithm was applied for calculation of the relative quantities of PCR amplification product reflecting the relative levels of viral PA RNA and target mRNA (Livak et al., 2001).

Statistical analysis. Data were analyzed using the Statistical Package for Social Science (SPSS) software version 21.0 for

Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Differences between the experimental groups were evaluated applying one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post hoc* least significant difference (LSD) test for multiple comparisons. Data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Spearman's correlation analysis was used for evaluation of correlation between the variables. A *p* value less than 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Relative influenza A viral RNA levels in mouse lungs. IAV PA RNA was not detected in negative control mice whilst increased viral loads were present in the lungs of all groups of IAV-infected mice as quantified by multiplex one-step RT-qPCR assay on day 3 *p.i.* Between the two infected (positive) control groups, the infected group treated with lactose had significantly ($p=0.013$) higher IAV PA RNA level compared with the group that was infected without any treatment. All non-control treatment groups showed significantly less relative IAV PA RNA level vs. IAV infected lactose treated mouse group ($p=0.016$, $p<0.001$, $p=0.017$ respectively). IAV infected and zanamivir or zanamivir + ODN treated mouse viral loads were similar, however IAV infected and ODN treated mice relative IAV PA RNA levels were significantly smaller vs. IAV + zanamivir treatment group ($p=0.039$).

On day 5, viral PA RNA was not detected in negative mouse control group and increased viral loads were present in the lungs of all groups of IAV-infected mice. Of the positive control group, the infected group treated with lactose had significantly higher IAV PA RNA level compared with infected-only ($p=0.012$) or infected and PBS treated ($p=0.021$) mouse groups. All treatment groups showed similar IAV PA RNA levels and were significantly less vs. the IAV infected and lactose treated mouse group ($p=0.017$, $p=0.013$, $p=0.013$ respectively).

Relative IFN- γ mRNA levels in mouse lungs. The relative IFN- γ mRNA level was 55.1% higher in positive (infected) versus negative (uninfected) control groups on day 3, however this difference did not reach significance. In infected and zanamivir treated mouse lungs IFN- γ mRNA level did not differ significantly from control groups. However, virus + ODN treatment group had the significantly more IFN- γ mRNA expression vs. both control groups ($p=0.001$ vs. negative control and $p=0.034$ vs. positive control), and virus + Zanamivir + ODN treatment group - vs. negative control group ($p=0.005$).

Like on the 3rd day, the relative IFN- γ mRNA level was 72.0% higher in positive versus negative control groups on day 5, but this difference did not reach the significance. In all treatment groups significantly higher IFN- γ mRNA expressions vs. negative control were found ($p=0.006$ in infected and zanamivir treated, $p=0.001$ in infected and ODN treated and $p=0.01$ in infected and zanamivir + ODN treated mouse lungs). The highest relative level of IFN- γ mRNA was found in Virus + ODN treated mouse lungs, it was 20.7% higher than in Virus + Zanamivir treatment group and significantly higher vs. positive control group ($p=0.04$) mouse lungs.

Relative TNF- α mRNA level in mouse lungs. The expression of TNF- α mRNA was 84.2% greater in positive than in negative control groups ($p<0.001$). Mouse lung TNF- α mRNA expression was similar in all IAV infected treatment groups and the infected control group ($p=NS$), but significantly higher than in the negative non-infected control groups ($p=0.003$, $p<0.001$, $p=0.006$ for infected treatment of zanamivir, ODN and zanamivir + ODN combination, respectively).

On the 5th day of the experiment, the relative TNF- α mRNA level was 76.9% higher in positive than in negative control groups ($p=0.001$). TNF- α mRNA expression was higher in all IAV infected treatment groups vs. negative control, ($p=0.004$ in infected and zanamivir treated, $p<0.000$ in infected and ODN treated, and $p=0.019$ in infected and zanamivir + ODN treated mouse lungs). However, the highest relative level of TNF- α mRNA was found in Virus + ODN treatment group mouse lungs: it was 53.0% higher

than in Virus + Zanamivir treatment group ($p=0.001$) and higher vs. positive control group ($p<0.001$) mouse lungs. The level of TNF- α mRNA in combination treatment group was significantly smaller ($p<0.001$) than in IAV+ODN and had a tendency to lessen (17.0% decrease) compared to IAV+Zanamivir treatment groups.

Relative iNOS mRNA level in mouse lungs. IAV infection caused significant up-regulation of the iNOS gene by day 3, resulting in 54.0% higher mRNA levels in mice from the positive control group vs. the negative control group ($p=0.001$). The greatest effect in reducing iNOS mRNA level between the treatment groups was observed in the IAV+Zanamivir treatment group (31.3% smaller vs. positive control group) and was similar to that found in the negative control group. In the IAV+ODN treatment group, iNOS mRNA level was 22.2% lower as compared to the positive control group and also was similar to the negative control group. The iNOS mRNA expression in IAV infected and zanamivir + ODN was similar to the positive control group and significantly higher than that found in the negative control group mouse lungs ($p=0.005$).

Significantly higher relative levels of iNOS mRNA were detected in the positive vs. the negative control group on the 5th day of the experiment (87.8%, $p<0.001$). IAV-infected and zanamivir or ODN treated mice showed significantly higher iNOS mRNA expression vs. negative control group ($p<0.001$ and $p=0.002$ respectively). Although the relative levels of iNOS RNA were less in the Virus+ODN mouse group on the 5th day (8.5% decrease) compared to the positive control group, it did not reach significance. The infected and zanamivir + ODN treated mouse groups there were similar to the negative control group. Between the treatment groups, the highest relative iNOS mRNA level was found in the zanamivir treatment group. The level was 23.7% less in the Virus+ODN treatment group, and 57.2% ($p=0.027$) in the Virus+Zanamivir+ODN treatment group vs. the Virus+Zanamivir treatment group.

Nitrite concentration in BAL fluid. The enhanced NO synthesis in the lungs was observed in influenza infected (positive control) mice vs. uninfected (negative control) on day 3 ($p<0.001$). NO concentration was significantly higher in influenza infected and ODN ($p=0.001$) or Zanamivir+ODN ($p=0.007$) treatment groups compared to negative control group. In the group of influenza infected and zanamivir treated mice the concentration of NO was significantly smaller vs. positive control group (57.5%, $p=0.001$), and vs. treatment groups with ODN (54.1%, $p=0.005$) or Zanamivir+ODN (46.9%, $p=0.026$).

Similarly to day 3, on day 5 the enhanced NO synthesis was observed in influenza infected (positive control) mice vs. uninfected (negative control) ($p=0.003$). In influenza infected and Zanamivir+ODN treatment group mouse lungs had significantly lower nitrite concentrations as compared to those in the positive control group (39.3%, $p=0.005$).

Body weight changes. The positive mouse control group (influenza infected) lost significantly more weight vs. negative mouse control group (uninfected) starting from day 2. The infected and zanamivir treated mouse weight loss (9.4%) was smaller than for the positive control group (15.0%, $p=0.002$) and the influenza+ODN treatment group (14.3%, $p=0.009$) on day 3; there was no significant difference by day 5 (14.2%, $p=0.22$). The infected and ODN treated mice lost weight similarly to the positive mouse control group, and differed significantly from the negative mouse control group on days 3 (14.3% and 8.9%, $p<0.001$) and 5 (16.9% and 10%, $p=0.02$). The infected and zanamivir + ODN combination treated mouse group on day 3 lost 12.0% of their weight, more than the negative mouse control group, which lost only 8.9%, ($p=0.037$). Interestingly, mice in the combination treatment group started to gain weight, and by day 5 their weight loss was only 7.2%, significantly more than the positive mouse control group (7.7%, $p=0.001$) and the Zanamivir treatment group mice (14.2%, $p=0.036$).

Mouse lung histopathology. The histological score was significantly greater in the positive control vs. the negative control mouse group lungs ($p<0.001$). There histological score was essentially unaffected in the negative control group, however inside the positive control group, the IAV-infected and the untreated mouse group had histological lung damage scores larger than that of the IAV-infected and lactose treated mice ($p=0.007$). The score in IAV-infected and zanamivir treated mice was significantly smaller ($p=0.018$), but there were no differences in the IAV-infected and ODN or zanamivir plus ODN treated mice vs. the positive control mouse group.

On the 5th day, the histological score was significantly higher in the positive control vs. the negative control mouse group lungs ($p<0.001$). There were no differences within either the negative (non-infected) or the positive (infected) control groups. All treatment groups' (IAV-infected and zanamivir treated, $p=0.006$; IAV-infected and ODN treated, $p=0.003$, and IAV-infected and zanamivir plus ODN treated, $p=0.001$) mean cumulative histological scores were significantly smaller than that of the positive control mouse group.

The correlation between lung damage and analysed parameters. A strongly positive correlation was found between lung damage score and TNF- α mRNA relative levels in mouse lungs. In addition, the mean cumulative histological score was found to be moderately positively correlated with relative nitrite concentration in BAL fluid, IAV PA RNA, iNOS mRNA and IFN- γ mRNA levels in mouse lungs and negatively correlated with mouse weight on day 3.

Strongly positive correlations were found between the lung damage score and the relative IAV PA RNA and TNF- α mRNA levels in mouse lungs. The mean cumulative histological score was found to be moderately positively correlated with iNOS mRNA and IFN- γ mRNA relative levels in mouse lungs and moderately negatively correlated with mouse weight on day 5.

Conclusions

1. Infection of mice with A/Puerto Rico/8/34 influenza virus induced lung inflammation, which was associated with significantly greater TNF- α mRNA, iNOS mRNA expression in lungs, higher NO concentration in BAL fluid, and more mouse weight loss.
2. Treatment of influenza infected mice with zanamivir caused the early suppression of viral replication and NO synthesis, and it was associated with less lung damage and weight loss.
3. The suppression of viral replication was early, but the protective lung damage effect was late and not associated with inhibition of NO synthesis in lungs in the treatment of influenza infected mice with antisense oligodeoxynucleotide to iNOS group. The increased expression of TNF- α mRNA was associated with significant mouse weight loss.
4. Treatment of influenza infected mice with the combination of zanamivir and antisense oligodeoxynucleotide to iNOS resulted in early suppression of viral replication, but the protective lung damage effect was late and associated with inhibition of NO synthesis in lungs. The lower expression TNF- α mRNA could explain reduced weight loss.

Practical recommendations

The study demonstrated several new findings. First, that treatment with zanamivir possesses the early capacity to suppress NO synthesis in mouse lungs after influenza infection. Second, that treatment with antisense oligodeoxynucleotide to iNOS mRNA can reduce lung inflammation caused by influenza virus infection in mice, and its combination with zanamivir has clinical benefit; thus, this treatment approach could be a potential new option in the treatment of influenza virus infection. However, there are several unresolved

questions to fully understand the mechanisms of action of medications and additional studies should may be worthwhile.

1. As the later effect (on day 5) of zanamivir's capacity to suppress NO synthesis was not observed, further experiments with different doses and schemes of administration of zanamivir are needed.
2. The observed antiviral mechanism of antisense ODN to iNOS in our experiment is not fully clear and should be evaluated in further studies.
3. We found no significant effect of antisense ODN to iNOS in suppressing NO synthesis, but different doses of medication and treatment and testing for additional days should be studied. Detection of not only iNOS mRNA level, but the iNOS protein concentration in mouse lungs should also help our understanding.
4. The exact mechanisms of the antisense ODN to iNOS-dependent potential to reduce inflammatory cells accumulation in mouse lungs post-influenza infection are unknown and should be evaluated in further studies.

Vilniaus universiteto leidykla
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 40 egz.