

УДК 577.112.083

**ИЗУЧЕНИЕ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ ИНГИБИТОРОВ
ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ
ОТХОДОВ СЫВОРОТОЧНОГО ПРОИЗВОДСТВА****Дивоча В.А.***Украинский НИИ медицины транспорта, г. Одесса**Ключевые слова: грипп, протеиназа, ингибитор.*

Трипсиноподобная протеиназа играет ключевую роль в развитии многих патологических процессов в организме человека и животных. В исследуемых нами механизмах патогенеза вирусного гриппа она расщепляет наружный белок вируса гриппа – гемагглютинин на две субъединицы: HA_1 и HA_2 [1, 2]. Только после расщепления гемагглютинина этой протеиназой вирус проникает в клетку и начинает размножаться [3-5]. Ингибиторы трипсиноподобных протеиназ блокируют процесс расщепления вирусных белков путем подавления активности клеточных энзимов [6-11]. В присутствии ингибиторов клеточных трипсиноподобных протеиназ после одного цикла репродукции исходного вируса с расщепленными белками образуется вирусное потомство с нерасщепленными, функционально не активными вирусными белками. Таким образом, дочерние вирионы не способны инициировать инфекционный процесс в связи с блоком ранних стадий цикла репродукции – адсорбции и проникновения вируса в клетки [12, 13].

Цель наших исследований – изучить защитное действие ингибитора трипсиноподобных протеиназ на выживаемость мышей, зараженных смертельной дозой вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1).

Для изучения защитного действия ингибитора трипсиноподобных протеиназ на выживаемость мышей, зараженных смертельной дозой вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), было взято 90 белых

мышей линии «Balb_c» весом 16-18 гр. и пятая изоформа ингибитора протеиназ, выделенная из отходов TM-й стадии получения гамма-глобулина. Выбор был обусловлен тем, что эта изоформа имела самые высокие показатели активности ингибитора трипсиноподобных протеиназ (132,52 у.е. – 1 условная единица соответствует 1 мг инактивированного кристаллического трипсина) и низкую активность трипсиноподобной протеиназы (0,0027 мкмоль аргинина/мин. в пробе), последнее как раз дополнительно подтверждало роль ингибитора в регуляции протеиназной активности.

Мыши были разделены на 7 групп, четыре опытные по 15 шт. и в контрольных группах по 10 шт. (табл.). Животные первой группы получали смертельную дозу вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) (контроль вируса). Вирус вводили интраназально в объеме 0,05 мл под рауш-наркозом. Вторая группа мышей получала аналогичную дозу вируса, но одновременно подвергались воздействию кристаллическим трипсином (контроль лечебных свойств кристаллического трипсина) в тех же дозах и сроках, что и животные третьей группы. Третья группа животных была заражена той же дозой вируса и подвергалась лечению ингибитором трипсиноподобных протеиназ, полученным из отходов производства гамма-глобулина. Четвертая группа животных получала только ингибитор трипсиноподобных протеиназ из отходов

Таблица 140 мкг ингибитора за курс лечения.

Действие пятой изоформы ингибитора трипсиноподобных протеиназ на выживаемость мышей, зараженных смертельной дозой ($2,5^{-2}$ ЛД₅₀) вируса гриппа A/PR/8/34

№ п/п	Номер названия группы	Кол-во животных в группе	Доза вируса	Доза ингибитора на мыш, мкг белка	Кол-во животных		% выживших животных
					пало	выжило	
1.	Вирус гриппа	15	10^{-1}	-	15	-	0
2.	Вирус гриппа + трипсин крист.	15	10^{-1}	20 мкг	15	-	0
3.	Вирус гриппа + ингибитор из отходов	15	10^{-1}	20 мкг	3	12	80
4.	Ингибитор из отходов (токсичность)	15	-	20 мкг	-	15	100
5.	Трипсин крист. (контроль)	10	-	20 мкг	-	10	100
6.	Фосфатный буфер (контроль)	10	-	0,2 мл	-	10	100
7.	Контроль животных	10	-	-	-	10	100

(контроль ингибитора на токсичность). Пятой группе животных вводили только трипсин кристаллический (контроль действия трипсина), шестой – фосфатный буфер, на котором разводили вирус, ингибитор и трипсин (контроль реактивов). Седьмая группа - контроль интактных животных (не получали никаких препаратов). Ингибитор и трипсин вводили каждой мышке интраназально под легким эфирным наркозом на протяжении семи суток. Каждая мышь получила в целом по

сутки после заражения). Можно делать вывод, что дополнительное введение трипсина ускоряет течение гриппа после введения смертельной дозы вируса, так как гибель мышей наступает несколько раньше. В третьей группе выжило 12 белых мышей (80 %), они оставались живы и на 14 сутки после заражения (общий срок наблюдения). Следовательно, ингибитор, блокируя трипсиноподобную протеиназу, в значительной степени подавляет инфекционный процесс, который индуцирует вирус гриппа.

Животные четвертой, пятой, шестой и седьмой групп оставались живы на протяжении всего срока наблюдения. Кроме того, вновь полученный ингибитор трипсиноподобных протеиназ, не вызывал токсичности, так как белые мышья четвертой группы оставались живы и на 14 день после введения ингибитора.

Таким образом, результаты ис-

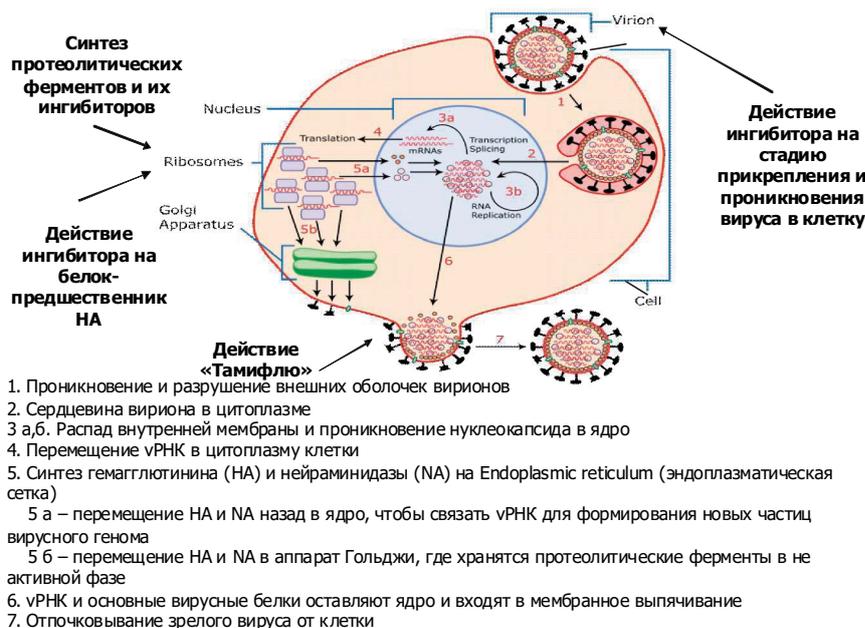


Рис. Проникновение и репликация вируса гриппа в клетке

следований свидетельствуют о том, что полученный из отходов первой стадии получения гамма-глобулина препарат ингибитора трипсиноподобных протеиназ обладал отчетливым противовирусным свойством. Полученные результаты являются убедительным экспериментальным обоснованием использования выделенного ингибитора трипсиноподобных протеиназ для лечения вирусного гриппа (рис.). Вместе с тем, не исключено, что ингибитор может быть использован не только при вирусном гриппе, но и при других вирусных инфекциях, при которых расщепление белка-предшественника вирусов производится клеточными трипсиноподобными протеиназами [14].

В целом, ингибиторную терапию вирусного гриппа следует считать новым перспективным направлением в лечении этого заболевания и его осложнений. В связи с тем, что это направление лечения основано на общем для многих вирусов механизме депротеинизации, следует предположить, что лечение многих вирусных заболеваний, можно также основывать на модуляции системы трипсиноподобная сериновая протеиназа/ингибитор: вирусные гепатиты, СПИД и многие другие. При этом, наряду с главным способом угнетения протеиназ путем введения ингибиторов, перспективными могут быть стимуляция синтеза ингибиторов протеиназ, а также их активация.

Безусловно, что этот патогенетический способ терапии вирусных заболеваний должен быть всесторонне проанализирован, как одно из перспективных общебиологических направлений, регулирующих взаимоотношение вирусов и организма человека.

Вывод

Пятая изоформа ингибитора трипсиноподобных протеиназ, выделенная из отходов I-й стадии промышленного получения гамма-глобулина, проявляла выраженный защитный эффект (80%) относительно белых мышей, зараженных смертельной дозой вируса гриппа A/PR/8/34.

Литература

1. Laver W. G. Separation of two polypeptide chains from the hemagglutinin subunits of influenza virus / W. G. Laver // *Virology*. – 1971. — V. 45. — P. 275-288.
2. Geo Brooks F. Orthomyxoviruses (Influenza viruses) / Geo Brooks F., Janet S. Butel, Stephen A. Morse // *Med Microbiol*. – 2004. - V. 39, Chapter 39. – P. 536-5473.
3. Bosch F. The structure of the hemagglutinin a determinant for the pathogenicity of influenza viruses / F. Bosch, M. Orlich, H.-D. Klenk, R. Rott / *Virology*. - 1979. - V. 95. - P. 197-207.
4. Rott R. Cleavability of hemagglutinin determines spread of avian influenza viruses in the chorioallantoic membrane of chicken embryo / R. Rott, M. Reinacher, H.-D. Klenk // *Arch. Virol*. – 1980. - № 65. – P. 123-133.
5. Vallbraht A. Recombination of influenza strains with Forval plague virus can change pneumotropism for mice to a generalized infection with involvement of the central nervous system / A. Vallbraht, C. Schaltissek, B. Fleming, H.-S. Gerth // *Virology*. - 1980. – № 107. - P. 542-560.
6. Жирнов О. П. Новый подход к лечению гриппа: блокирование протеолитической активации вируса / О. П. Жирнов, А. В. Овчаренко // *Вопросы вирусологии*. - 1985. - № 4. – С. 450-456.
7. Букринская А. Г. Подавление репродукции ротавируса SA-11 ингибиторами протеаз в культуре клеток / А. Г. Букринская, В. Я. Кицак, С.А. Мойснадиди, С. А. Архелов // *Вопр. вирусологии*. - 1987. - № 1. – С. 71-74.
8. Участие системы протеолиза в реализации вирулентности вируса гриппа и развитии инфекционного процесса: противовирусное действие ингибиторов протеаз / В. П. Лозицкий, А. С. Федчук, Л. С. Пузис, В. П. Буйко [и др.] // *Вопросы вирусологии*.

- сології. - 1987. - № 4. - С. 413-419.
9. Противірусна дія офіційних препаратів Е-амінокапронової кислоти та унітолу щодо вірусу грипу птахів / В. П. Лозицький, Т. Л. Грідіна, А. С. Федчук [та ін.] // Одеський медичний журнал. – 2006. - № 3 (95). – С. 4-8.
 10. Lozitsky V. P. Anti-infections actions of proteolysis inhibitor E-aminocaproic acid (E-ACA) / V. P. Lozitsky // Вісник Вінниць. нац. мед. ун-ту. – 2004. - № 8(2). – С. 434-437.
 11. Бореко Е. И. Лаборатория доклинического изучения специфической активности ингибиторов вирусов – основные итоги деятельности / Е. И. Бореко // Современные проблемы инфекционной патологии : сб. науч. тр. - Минск, 2009. - Вып. 2. – С. 206-209.
 12. Cao Tin M. A protamine — line domain in basic adenovirus core protein / Cao Tin M., Sung Michael T. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. - 1988. – V. 108, № 3. - P. 1061-1066.
 13. Scheid A. Activation of cell fusion and infectivity by proteolytic cleavage of a Sendai virus glycoprotein / A. Scheid, P. W. Choppin // In "Proteolysis and Biological Control" (E. Reich, R. D. Ritkin and E. Shaw, eds.). Cold Spring Harbor. - 1975. – № 4. – P. 645-659.
 14. Деклараційний патент 37324 А Україна, МПК6 А 61 К 31/14. Інгібітор трипсиноподібних протеаз як антивірусний засіб / Дівоча В. А.; заявник та патентодержатель Дівоча В. А. - № 97115416; заявл. 12.11.1997; опубл. 15.05.2001, Бюл. № 4.

Резюме

ВИВЧЕННЯ ЗАХИСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ІНГІБІТОРІВ ТРИПСИНОПОДІБНИХ ПРОТЕЇНАЗ, ОТРИМАНИХ З ВІДХОДІВ СІРОВАТОЧНОГО ВИРОБНИЦТВА

Дівоча В.П.

Метою дослідження було – вивчити захисну дію інгібітору трипсиноподібних протеїназ на виживання мишей, заражених смертельною дозою вірусу грипу А/PR/8/34. Результати наших досліджень показали, що п'ята ізоформа інгібітору трипсиноподібних протеїназ, яка одержана з відходів першої стадії отримання гама-глобуліну, зачистила від смерті білих мишей.

Ключові слова: грип, протеїназа, інгібітор

Summary

PROTECTIVE PROPERTIES OF INHIBITORS OF TRYPSIN-LIKE PROTEINASES GOT FROM THE WASTES OF SERUM PRODUCTION

Divocha V.A.

The aim of the work presented is to learn protective properties of trypsin-like proteinase inhibitor on the survival rate of mice infected with lethal dose of the flu A/PR/8/34. The results obtained prove that the 5th isoform of trypsin-like proteinase inhibitor got from the wastes of the 1st stage of γ -globulin production may protect the white mice from the fatality.

Keywords: flu, proteinase, inhibitor.

Впервые поступила в редакцию 26.07.2010 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования