

УДК 582.284.5; 615.281; 578.832

РАЗРАБОТКА НОВОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА ПРИ ГРИППЕ

Дивоча В.А.

Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса; divocha09@ukr.net

В работе описан метод получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ из промышленных отходов получения гамма-глобулина донорской крови человека. Используя ионообменную хроматографию, было выделено 5 изоформ ингибитора трипсиноподобных протеиназ. Пятая изоформа обладала самой высокой ингибиторной активностью и низкой активностью трипсиноподобных протеиназ, которую использовали для изучения терапевтических свойств при экспериментальном гриппе. Наши исследования показали, что 5-ая изоформа ингибитора протеиназ на 80 % защитила животных, зараженных смертельной дозой вируса гриппа.

Ключевые слова: грипп, ингибиторы, протеазы, очистка фермента.

Введение

Грипп до настоящего времени остается одним из наиболее массовых заболеваний, которое приводит к госпитализации тысяч заболевших и высокой смертности.

Ежегодно в Украине заболевает от 10 до 14 млн. человек, что составляет 25-30 % общей заболеваемости населения. Заболеваемость остается высокой и причиняет большой ущерб. В настоящее время смертность от этих заболеваний и его осложнений не снижается, а, наоборот, отмечается стабилизация и увеличение этого показателя [1]. В 2010 г. от гриппа в Украине умерло 1127 человек, из которых 100 беременных женщин во 2-ом и 3-ем триместрах.

Актуальными остаются вопросы поиска препаратов для профилактики и лечения гриппа и ОРВИ, особенно на ранних стадиях заболевания, учитывая ограниченные возможности врачей-практиков в дифференциальной диагностике этих заболеваний на предгоспитальном этапе. Для получения противогриппозного препарата нами была использована «протеолитическая» гипотеза развития вируса гриппа в организме человека [2]. Особенную роль протеолиз играет в процессе воспале-

ния, который инициирует универсальный неспецифический каскадный механизм активации протеолитических ферментов на локальном и системном уровнях. Эволюция создала механизм регуляции протеолиза в виде ингибиторов протеолиза, который имеется даже у микроорганизмов [3].

По нашим данным отходы сывороточного производства являются перспективным исходным биоматериалом для получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ, обладающего противовирусными свойствами и наименьшей аллергенностью.

Цель работы – выделение ингибитора трипсиноподобных протеиназ из отходов 1-ой стадии промышленного способа получения гамма-глобулина донорской крови человека и изучение его защитных свойств при гриппе в эксперименте.

Материалы и методы

Вирус гриппа А/PR/8/34, белые мыши весом 16-18 г, промышленные отходы фракций (II+III) получения гамма-глобулина и альбумина донорской крови человека. Вирусы гриппа штаммы А/PR/8/34 (H1N1), адаптированный к белым мышам. Проведено IV пассажа. В работу брали белых беспородных мышей массой 16-18 грамм. Инфици-

рование животных вирусами гриппа А проводили под легким эфирным наркозом интраназально в объеме 0,05 мл, в разведении 10^{-1} (для штамма А, что соответствовало инфекционной дозе вируса $2,5 \cdot 10^2$ ЛД₅₀). Такие дозы обеспечивали 100 % гибель животных на 6-е сутки после заражения. У животных забирали легкие и кровь. Удаленные легкие белых мышей промывали дважды в холодном 0,01 М фосфатном буфере рН 7,5, растирали в холодной ступке, суспендировали в фосфатном буфере (1 мл на 1 легкое), гомогенизировали ультразвуком в режиме 7 на приборе High Intensity Ultrasonic Procession, Chicago Cole Parmel (USA), центрифугировали при 10^4 об/мин на центрифуге RS-5 фирмы Sorvall Instrumens, Rotor SS-34, в течение 1 ч, при температуре +4 °С.

Колоночную хроматографию белков проводили используя методы гелехроматографии, ионообменной и аффинной хроматографии. Хроматографическое разделение белковых смесей проводили, используя шкаф низких температур (Combicoldrac 11), перистальтический насос (Microperplex) и коллектор фракций FCC-60 (Чехословакия). Обработку сефадексов и ионообменных смол осуществляли по стандартным методикам [4].

Ионообменную хроматографию проводили на ДЭАЭ-целлюлозе-32 целлюлозе (фирма Watman, США). Высота колонки составляла 19,0 см, диаметр – 2,5 см, объем фракций 10,0 мл, скорость 40,0 мл в час. Элюирование проводили 0,1 М фосфатным буфером рН 7,5 и ступенчатым градиентом NaCl 0,01 – 0,1 и 0,1 – 1,0. Было нанесено 9,3 мг белка.

Оценку активности трипсиноподобной протеиназы проводили по ме-

тоду К.Н. Веремеенко [5], модифицированным С.В. Вовчук [6].

Инфекционный титр вируса в крови инфицированных мышей и аллантоисной жидкости определяли путем заражения 9-10-дневных куриных эмбрионов и выражали в Ig ЭИД 50/0,2 мл. Реакцию гемагглютинации ставили по общепринятой методике. Определение белка проводили по методу W.J. Lowry [7]. Определение ингибиторов протеиназ в гомогенате легких, сыворотке крови и аллантоисной жидкости проводили казеиновым методом, предложенным А.П. Левицким [8, 9].

Результаты

На 1-ой стадии промышленного гамма-глобулина (по методу Кона), центрифугат утилизируют. Однако, по нашим данным, в этом центрифугате содержится 481,11 г ингибитора трипсиноподобных протеиназ на 1,0 кг исходного сырья (табл. 1).

Таблица 1

Содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ в отходах I-ой стадии (фракции II+III) промышленного получения гамма-глобулина из свежеполученного биоматериала (n = 5)

№	Образец	Белок, мг/мл	Ингибитор, г/кг
1.	Супернатант	19,36 ± 1,64	0,481 ± 0,046
2.	Осадок	11,07 ± 1,01	0,058 ± 0,004

Содержание ингибитора в супернатанте превышало в 8,0 раз его содержания в осадке. В связи с этим супернатант мы использовали для выделения и очистки ингибитора трипсиноподобных протеиназ методом ионообменной хроматографии. Разработка способа получения ингибитора в очищенном виде включала этапы: экстракцию фермента, ультразвуковую дезинтеграцию, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе 52, диализ, лиофильную сушку (патент Украины № 89778) [10]. Ионообменную хроматографию проводили в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,5. Линейный градиент создавали в интервале 0,0 - 1,0 М NaCl на этом же буфере. Данный способ

позволил получить 5 изоформ, обладающих ингибиторной активностью (рис. 1). Первые две изоформы, в которых содержался ингибитор трипсиноподобных протеиназ, элюировали с ионообменной колонки 0,1 М фосфатным буфером pH 7,5. Следующие 3 изоформы, содержащие ингибитор трипсиноподобных протеиназ, элюировали ступенчатым градиентом NaCl разной молярности: 3-я изоформа – 0,1 М NaCl, 4-я изоформа – 0,2 М NaCl, 5-я изоформа – 0,5 М NaCl. Объемы элюатов изоформ были соответственно: 35 мл, 195 мл, 340 мл, 440 мл, 605 мл. Наибольшее содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ было зарегистрировано во фракции 5-й изоформы, которая последней элюировалась с колонки 0,5 М NaCl, а наименьшее – в 4-й и 3-й изоформах, которые элюировались с колонки 0,2 и 0,1 М NaCl соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в промышленных отходах I-ой стадии получения гамма-глобулина, содержалось 5 фракций ингибитора трипсиноподобных протеиназ, которые отличались между собой как по заряду, так и по солерастворимости.

Эти отличия могут быть обусловлены различиями в аминокислотном составе множественных форм данного

ингибитора.

Пятую изоформу, обладающую высокой ингибиторной активностью (132 у.е.) и низкой активностью трипсиноподобных протеиназ (0,0027 мкмоль/мин в пробе) использовали для изучения терапевтических свойств при экспериментальном гриппе у белых мышей.

Мыши были разделены на 7 групп, 4 опытные по 15 шт. и в контрольных группах по 10 шт. (табл. 2). Животные 1-ой группы получали смертельную дозу вируса (контроль вируса). Вирус вводили интраназально в объеме 0,05 мл под рауш-наркозом. 2-ая 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 3-ей группы.

Третья группа животных была заражена той же дозой вируса и подвергалась лечению ингибитором трипсиноподобных протеиназ, полученным из отходов производства гамма-глобулина. 4-ая группа животных получала только ингибитор трипсиноподобных протеиназ из отходов (контроль ингибитора на токсичность). 5-ой группе животных вводили только трипсин кристаллический (контроль действия трипсина), шестой – фосфатный буфер, на котором разводили вирус, ингибитор и трипсин (контроль реактивов). 7-ая группа – контроль интактных животных (не получали никаких препаратов).

Ингибитор и трипсин вводили каждой мышке инт-

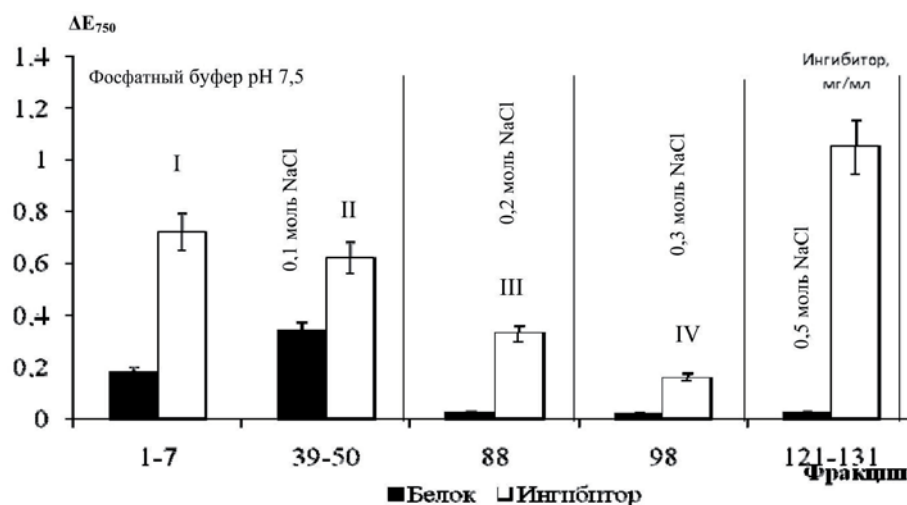


Рис. 1. Выделение и очистка ингибитора трипсиноподобных протеиназ из отходов I-ой стадии (II+III) промышленного способа получения гамма-глобулина

раназально под легким эфирным наркозом на протяжении семи суток. Каждая мышь получила в целом по 140 мкг ингибитора за курс лечения.

Как показали результаты исследований, животные 1-ой и 2-ой групп погибли на 3-8 сутки после заражения. Отмечается существенная разница в сроках гибели и клинической картине у мышей этих групп – мыши 2-ой группы начинали гибнуть значительно раньше (на 3-и сутки после заражения). Можно делать вывод, что дополнительное введение трипсина ускорило течение гриппа после введения смертельной дозы вируса, так как гибель мышей наступила несколько раньше. В 3-ей группе выжило 12 белых мышей (80 %), они оставались живы и на 14-е сутки после заражения (общий срок наблюдения). Следовательно, ингибитор, блокируя трипсиноподобную протеиназу, в значительной степени подавлял инфекционный процесс, который индуцирует вирус гриппа.

Животные 4-ой, 5-ой, 6-ой и 7-ой групп оставались живы на протяжении всего срока наблюдения. Кроме того, вновь полученный ингибитор трипсиноподобных протеиназ, не вызывал токсичности, так как белые мыши 4-й группы оставались живы и на 14-й день после введения ингибитора.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что полученный из отходов I-ой стадии получения гамма-глобулина препарат ингибитора трипсиноподобных протеиназ, обладал отчетливым противовирусным свойством. Полученные результаты являются убедительным экспериментальным обоснованием ис-

Таблица 2
 Действие 5-ой изоформы ингибитора трипсиноподобных протеиназа на выживаемость мышей, зараженных смертельной дозой ($2,5^2$ ЛД₅₀) вируса гриппа A/PR/8/34

Название группы	Количество животных в группе	Доза вируса	Доза ингибитора на мышь мкг белка	Кол-во животных		% выживших животных
				пало	выжило	
Вирус гриппа А	15	10^{-1}	-	15	-	0
Вирус гриппа А + трипсин крист.	15	10^{-1}	20 мкг	15	-	0
Вирус гриппа А + ингибитор из отходов	15	10^{-1}	20 мкг	3	12	80
Ингибитор из отходов (токсичность)	15	-	20 мкг	-	15	100
Трипсин крист. (контроль)	10	-	20 мкг	-	10	100
Фосфатный буфер (контроль)	10	-	0,2 мл	-	10	100
Контроль животных	10	-	-	-	10	100

пользования выделенного ингибитора трипсиноподобных протеиназ для лечения вирусного гриппа. 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. К последним относится достаточно большая группа заболеваний от вирусного гепатита до СПИДа.

Обсуждение

Проблемы терапии по-прежнему актуальны, поскольку методы специфической профилактики и иммунотерапии гриппа недостаточно эффективны из-за выраженной вариабельности вирусов гриппа [11]. В силу вышесказанного, профилактическое значение вакцин хотя и весьма велико, но они не обеспечивают полной защиты популяции от заболеваний вирусным гриппом, даже в случае своевременного применения высокоспецифичных вакцин.

Гриппозные вакцины не исключают возможности аллергических реакций на белки сыворотки или белки куриных эмбрионов, что существенно ограничивает возможности их применения. Это особенно реально при изготовлении живой гриппозной вакцины, которая практически не проходит специальной очистки от белков куриных эмбрионов [12].

Поиск материала, из которого можно получить препарат, обладающий высокой противовирусной активностью (ингибитор трипсиноподобных протеиназ), и одновременно, обладающий наименьшей аллергенностью для человека, обратил наше внимание и заставил нас провести исследования крови человека, а также отходов сыровоточного производства на наличие в них сериновых протеиназ и их ингибиторов.

В литературе установлено, что сыrovотка крови является важным источником различных ингибиторов протеиназ. К изученным в настоящее время ингибиторам относятся: альфа₂-антиплазмин, альфа₂-макроглобулин, альфа₁-антитрипсин, антитромбин III, C₁-активатор, альфа₁-антихимотрипсин, интер-альфа-ингибитор трипсина и др. [3]. Хотя, вполне можно постулировать, что этим перечнем не исчерпывается количество и разнообразие ингибиторов протеиназ плазмы крови человека. Из поврежденных клеток различных органов в кровь могут поступать компоненты протеиназно/ингибиторных систем внутриклеточного происхождения.

Учитывая, что получение ингибитора из ткани легких мышей не может иметь промышленного значения, мы его видоизменили и разработали свой новый способ получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ из промышленных отходов сыровоточного производства донорской крови человека для апробации его в качестве лечебного препарата [13].

Согласно предложенной методике, для выделения ингибитора трипсиноподобных протеиназ использовали отходы I-й стадии (II+III) промышленного получения гамма-глобулина из донорской крови человека, которые содержали значительное количество данного ингибитора [14, 15]. Данный способ позволил получить 5 изоформ, обладающих ингибиторной активностью.

Все полученные ингибиторы были исследованы по их активности. Наибольшая ингибиторная активность трипсиноподобных протеиназ была зарегистрирована во фракции V-й изоформы. Мы усовершенствовали методику выделения ингибитора трипсиноподобных протеиназ и получили патент Украины № 21599 от 15.03.2007 г. [13].

Мы изучили защитное действие V-й изоформы ингибитора трипсиноподобных протеиназ, выделенной из промышленных отходов I-й стадии. Как показали наши исследования, V-я изоформа ингибитора трипсиноподобных протеиназ на 80 % защищала животных, зараженных смертельной дозой вируса гриппа.

Введение V-й изоформы ингибитора трипсиноподобных протеиназ, свое защитное действие могло проявлять не только путем их блокады и угнетения инфекционного процесса, но и благодаря параллельному угнетению тканевых протеиназ, участвующих в реакциях иммунного воспаления, которое усугубляет вирусное повреждение легких.

Получение противовирусных препаратов из отходов донорской крови человека позволит полнее использовать белки крови, повысить экономическую целесообразность фракционирования, увеличить номенклатуру препаратов крови, что ведет к снижению себестоимости их производства.

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 депро-теинизации, следует предположить, что лечение многих вирусных заболеваний, можно также основывать на модуляции системы трипсиноподобная сериновая протеиназа/ингибитор: вирусные гепатиты, СПИД и многие дру-

гие. Наряду с главным способом угнетения протеиназ путем введения ингибиторов, перспективными могут быть стимуляция синтеза ингибиторов протеиназ, а также их активация. Данный патогенетический способ терапии вирусных заболеваний должен быть всесторонне проанализирован, как одно из перспективных общебиологических направлений, регулирующих взаимоотношение вирусов и организма человека.

Литература

- Mitamura K., Sugaya N. Diagnosis and Treatment of influenza-clinical investigation on viral shedding in children with influenza // *Uirusu*. — 2006. — V. 56, N 1. — P. 109-116.
- Веремеенко К.Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы, новые области применения в клинике // *Врачебное дело*. — 1994. — N 1. — С. 8-13.
- Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии — Киев: Здоровье, 1988. — 200 с.
- Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высшая школа, 1971. — 352 с.
- Веремеенко К.Н. Ферменты в отоларингологии. — К.: Здоровье, 1980. — 147 с.
- Вовчук С.В. Определение активности протеолитических ферментов в зерне злаковых культур // *Биохимические методы исследования селекционного материала: сб. науч. работ.* — Одесса, 1979. — Вып. XV — С. 69-74.
- Lowry W.J., Baker F. Protein measurement with the Folin reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193. — P. 265-275.
- Левицкий А.П. Пищеварительные ферменты слюнных желез: автореф. дис. на соискание уч. степени доктора мед. наук. — Одесса, 1974. — 54 с.
- Левицкий А.П. Методы определения ингибиторов трипсина // *Биохимические методы исследования селекционного материала: сб. науч. работ.* — Одесса, 1979. — Вып. XV — С. 68-73.
- Патент Україна № 89778. Спосіб виділення інгібітору трипсиноподібних протеаз із відходів одержання гамаглобуліну та альбуміну донорської крові людини / заявник та патентодержатель Дівоча В.А.; опубл. 10.03.2010, Бюл. № 5.
- Гендон Ю. И. Проблемы профилактики гриппа у беременных женщин и новорожденных детей // *Вопр. вирусол.* — 2009. — № 4. — С. 4-10.
- Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Анопова И.И. [и др.] Дальнейшая разработка культуральной (МДСК) живой холодоадаптированной гриппозной вакцины: культивирование вакцины штаммов в производственных ферментах // *Вопр. вирусологии.* — 2005. — № 2. — С. 4-9.
- Патент № 21599 Україна, МПК (2006), А 61 К 36/00. Спосіб виділення інгібітора трипсиноподібних протеаз із відходів одержання гамаглобуліну та альбуміну донорської крові людини / Дівоча В. П., Михальчук В. М., Гоженко А. І — № u 2006 11233; заявл. 25.10.2006; опубл. 15.03.2007, Бюл. № 3.
- Дівоча В.П., Михальчук В.Н., Гоженко А.І. Наявність трипсиноподібної протеази та її інгібіторів у відходах отримання гамаглобуліну // *Медична хімія*. — 2006. — Т. 8, № 1. — С. 60-63.
- Дівоча В.А., Микелашвили М.Т. Наличие ингибитора трипсиноподобных протеаз в донорской крови человека и в отходах сыровоточного производства // *Естествознание на рубеже столетий: междунар. конф., Сочи, 8-10 октября 2001г.: тезисы докл.* — Москва, 2001. — Т. 3.- С. 63.

References

- Mitamura K., Sugaya N. Diagnosis and Treatment of influenza-clinical investigation on viral shedding in children with influenza // *Viruses*. — 2006. — V. 56, N 1. — P. 109-116.
- Veremeyenko K.N. Proteolytic enzymes and their inhibitors, new applications in the clinic // *Vrachebnoye Delo*. — 1994. — N 1. — P. 8-13.
- Veremeyenko K.N., Goloborodko O.P., Kizim A.I. Proteolysis in normal and pathological conditions — Kiev: Health, 1988. — 200 p.
- Kochetov G.A. A Practical guide to enzymology. — M.: Higher School, 1971. — 352 p.
- Veremeyenko K.N. Enzymes in

- otolaryngology. — K.: Health, 1980. — 147 с.
6. Vovchuk S.V. Determination of the activity of proteolytic enzymes in the grain cereals // Biochemical research methods of breeding material: Sat. scientific. works. — Odessa, 1979. — V. 15 — С. 69-74.
 7. Lowry W.J., Baker F. Protein measurment with the Folin reagent // J. Biol Chem. — 1951. — V. 193. — P. 265-275.
 8. Levitsky A.P. Digestive enzymes of the salivary glands: author. dis. on competition uch. degree of doctor of honey. Sciences. — Odessa, 1974. — 54 p.
 9. Levitsky A.P. Methods for determination of trypsin inhibitors // Biochemical research methods of breeding material: Sat. scientific. works. — Odessa, 1979. — V. 15. — С. 68-73.
 10. Patent Ukraine № 89778. Method trypsin protease inhibitor allocation of waste reception gamma globulin albumin and blood person / applicant and patentee Divocha V.A.; publ. 10.03.2010, Bull. N 5.
 11. Hendon Y.I. Problems prevention influenza in pregnant women and newborn children // Vopr. virusol. — 2009. — N 4. — P. 4-10.
 12. Hendon Y.Z., Markushin S.G., Anopova I.I. [et al.] Further development of the culture (MDCK) live cold-adapted influenza vaccine: the vaccine strains in the cultivation of industrial enzymes // Problems virology. — 2005. — N 2. — P. 4-9.
 13. Patent number 21599 Ukraine, IPC (2006), A 61 K 36/00. The method of selection of protease inhibitor trypsin of waste reception gamma globulin and albumin human blood / Divocha V.P., Mykhalchuk V.M., Gozhenko A.I. — № u 2006 11233; appl. 25.10.2006; publ. 15.03.2007, Bull. N 3.
 14. Divocha V.P., Mykhalchuk V.N., Gozhenko A.I. Availability trypsin protease and its inhibitor in the waste receiving gamma globulin // Medical Chemistry. — 2006 — V. 8, № 1. — P. 60-63.
 15. Divocha V.A. Mikelashvyly M.T. The presence of protease inhibitors trypsin donorskoy blood in humans and in waste handling sera production of natural science at the turn stolety: Internat. Conf., Sochi, 8-10 October 2001. Abstracts. — Moscow,

2001. — V. 3. — P. 63.

Резюме

РОЗРОБКА НОВОГО ПРОТИВІРУСНОГО ПРЕПАРАТУ ПРИ ГРИПІ

Дівоча В.П.

У роботі описаний метод отримання інгібітору трипсиноподібних протеїназ з промислових відходів отримання гамма-глобуліну донорської крові людини. За допомогою іонообмінної хроматографії було виділено 5 ізоформ інгібітору трипсиноподібних протеїназ. П'ята ізоформа володіла найвищою інгібуючою активністю та низькою активністю трипсиноподібних протеїназ, яку використовували для вивчення терапевтичних властивостей при експериментальному грипі. Як показали наші дослідження 5-та ізоформа інгібітору протеїназ на 80 % захистила тварин, заражених смертельною дозою вірусу грипу А.

Ключові слова: грип, інгібітори, протеази, очищення ферменту.

Summary

DEVELOPMENT OF A NEW ANTIVIRAL MEDICATION FOR THE GRIPPE

Divocha V.A.

The paper presents a method for obtaining an inhibitor of trypsin-like proteases from industrial waste producing gamma globulin donated human blood. Using ion exchange chromatography was allocated 5 isoforms of trypsin proteinase inhibitor. The fifth isoform had the highest inhibitory activity and low protease activity of trypsin which was used to study the therapeutic properties in experimental influenza. Our investigations have shown 5 isoform proteinase inhibitor by 80 % protection of animals infected with a fatal dose of influenza virus.

Keywords: influenza, inhibitors, protease enzyme purification.

*Впервые поступила в редакцию 02.03.2015 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*