

УДК 616.921.5:615.371:615.076

## АНТИПРОТЕИНАЗНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРИ ГРИППЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**Дивоча В.А.**

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

Из легких здоровых мышей было выделено 6 изоформ трипсиноподобной протеиназы, обладающих высокой протеиназной активностью. Процент очистки их по белку составлял от 59,0 % до 99,94 %. При четырехкратной иммунизации крыс изоформами трипсиноподобной протеиназы в сыворотке крови отмечалось увеличение протеиназной активности, особенно к 3-ей изоформе. При лечении антипротеиназными иммунными сыворотками мышей, предварительно зараженных смертельной дозой вируса гриппа А, 60 % животных 4 группы, остались живы в течении всего периода наблюдения (14 суток). В контрольной группе (не проходивших лечение, но зараженных летальной дозой вируса гриппа А) 100 % гибель мышей наступала на 4-5 день после заражения.

**Ключевые слова:** вирус гриппа, протеазы, очистка вируса.

Протеолитическая активация является важным событием в инфекционном цикле вирусов [1]. При ее нарушении сборка вирусных частиц будет происходить, однако образующиеся вирионы будут неинфекционными, поскольку в их составе отсутствуют активные белки слияния, обеспечивающие проникновение вируса в здоровые клетки. Поэтому протеолитическая активация обуславливает инфекционную активность вируса и способность его к генерализации инфекции. По-видимому, свойства вируса поражать определенные ткани организма определяются наличием в органах и тканях ферментов, необходимых для протеолитической активации вирусного потомства [2].

В настоящее время протеолитическими ферментами интересуются практически во всех областях медицины. Уже известен целый ряд заболеваний, в патогенезе которых задействованы протеиназы.

**Цель работы** – выделить трипсиноподобную протеиназу из легких здоровых мышей и получить к ней гипериммунную сыворотку для лечения гриппа в эксперименте.

### Материалы и методы

Были использованы легкие 100 белых мышей для выделения трипсиноподобной протеиназы, вирус гриппа А/PR/8/34, белые крысы использованы для получения гипериммунных антипротеиназных сывороток для изучения их защитной функции в организме белых мышей, зараженных смертельной дозой вируса гриппа А.

Для выделения и очистки трипсиноподобных протеиназ из легких здоровых мышей использовали метод ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе-32, который включает в себя, гомогенизацию легких, экстракцию, дезинтеграцию ультразвуком, центрифугирование, диализ и градиентную элюцию.

### Получение гипериммунных сывороток

Для получения сывороток использовали крыс весом 170-200 гр. линии Wistar. Иммунизацию белых крыс проводили 4-хкратно 1 раз в неделю каждой изоформой трипсиноподобных протеиназ, выделенных из нормальных легких мышей, с полным адъювантом Фрейда. Каждая крыса получила 560 ед. белка и 890 ед. протеиназы. Тоталь-

ный забор крови гипериммунных сывороток был проведен на 7-е сутки после последней иммунизации. Активность трипсиноподобных протеиназ определяли методом К.Н. Веремеенко [3], содержание белка методом О. Лоури [4].

### Результаты

При очистке протеиназы из легких здоровых мышей было получено 6 изоформ, обладающих протеиназной активностью, которые были очищены от балластного белка на 60 — 99,98 % (табл. 1). Как видно из данных таблицы самой высокой удельной протеолитической активностью обладала 6-ая изоформа (33,54 у.е.), а самой низкой – 1-ая изоформа.

К 6-ти изоформам трипсиноподобной протеиназы было получено 7 групп иммунных сывороток. Первой изоформой иммунизировалось одновременно две группы животных (по 10 шт. белых крыс). Первая группа предварительно была использована в работе со стафилококком № 209. В полученных гипериммунных сыворотках было проверено содержание протеиназы. Как видно из данных табл. 2, происходило статистически достоверное увеличение активности эндогенной протеиназы в организме животных в ответ всех изоформ трипсиноподобной протеиназы, полученной из легких здоровых мышей. Самая высокая активность эндогенной протеазы сыворотки крови отмечалась в ответ на введение

экспериментальным животным 3-ей изоформы протеиназы, полученной из легких здоровых мышей. По сравнению с контрольными (30,646 мкг/арг/мл) она повышалась более чем в 2 раза (43,911 мкг/арг/0,1 мл). Это повышение протеиназы в организме белых крыс оказалось неспецифическим, т.к. через 8 месяцев хранения при температуре +4°C протеиназа в этих сыворотках не определялась, в то время как блокирующее действие сохранялось.

Изучая защитные свойства антипротеиназных сывороток и нормальной сыворотки крыс контроль на белых мышках, зараженных интраназально летальной дозой вируса гриппа А/PR/8/34 (IV пассаж; контрольная группа на вирус), было установлено, что контрольные мыши погибали на 4-5 сутки. Животные, которым 6 раз закапывали нормальную крысиную сыворотку, погибали на седьмые сутки. При лечении мышей иммунными сыворотками обращало на себя внимание, что быстрее всех начинали погибать мыши, которым вводили сыворотку 2-ой группы (табл. 3). Вероятно, в сыворотке 2-ой группы содержался фактор, повышающий диссоциацию гемагглютинаина и тем самым способствующий ускоренному накоплению инфекционного вируса. Меньше всех животных погибло при лечении иммунной сыворотки IV группы. Летальность мышей этой группы снижалась на 60 % и на 14 день после заражения в сыворотке крови и в лег-

Таблица 1

Очистка на ДЭАЭ-целлюлозе-32 трипсиноподобной протеиназы из легких незараженных белых мышей

№ фракции	Молярность	№ изоформ протеиназы	Удельная протеолитическая активность	% очистки по белку
78-88	0,01 NaCl	I	4,391	99,84
124-150	0,03 NaCl	II	11,926	99,94
204-224	0,06 NaCl	III	5,934	99,89
280-288	0,08 NaCl	IV	5,656	99,85
296-302	0,09 NaCl	V	5,116	58,92
315-334	0,1 NaCl	VI	33,543	89,90

Таблица 2

**Активность трипсиноподобных протеиназ в сыворотке крови белых крыс после 4-х кратной иммунизации к изоформам тропсиноподобной протеиназы, выделенных из легких здоровых мышей**

№ изоформ	Конт-роль	I изоформа		II изоформа	III изоформа	IV изоформа	V изоформа	VI изоформа
		17 мкг протеиназы в 0,1 мл (доза введения)						
№ групп		1	2	3	4	5	6	7
1	32,0	40,0	42,0	48,6	48,5	20,0	57,0	52,2
2	29,5	28,1	38,1	46,0	44,5	32,0	38,1	44,4
3	29,2	16,2	38,1	40,0	46,0	30,0	60,0	56,4
4	24,5	38,2	36,2	33,0	38,5	32,0	52,1	50,0
5	31,6	40,5	42,0	42,6	44,0	32,0	52,1	58,0
6	21,0	-	28,1	42,4	42,5	34,5	48,9	61,0
7	29,0	-	30,1	44,0	42,5	34,5	-	-
8	43,6	-	-	-	44,3	40,5	-	-
9	21,2	-	-	-	44,2	36,8	-	-
10	26,8	-	-	-	-	30,8	-	-
11	29,0	-	-	-	-	-	-	-
12	36,8	-	-	-	-	-	-	-
13	32,4	-	-	-	-	-	-	-
14	36,6	-	-	-	-	-	-	-
15	36,5	-	-	-	-	-	-	-
Статистическая обработка								
	$\delta = 5,60$	$\delta = 10,45$	$\delta = 3,90$	$\delta = 4,66$	$\delta = 2,73$	$\delta = 5,34$	$G = 6,57$	$G = 21,63$
	$n = 15$	$n = 5$	$n = 7$	$n = 7$	$n = 10$	$n = 10$	$n = 5$	$n = 5$
	$M = 30,65$	$M = 32,58$	$M = 36,37$	$M = 42,51$	$M = 43,91$	$M = 32,32$	$M = 50,20$	$M = 38,22$
	$m = 2,23$	$m = 5,22$	$m = 2,22$	$m = 1,90$	$m = 0,96$	$m = 1,78$	$m = 3,29$	$m = 10,82$
		$t = 1,88$	$t = 5,20$	$t = 7,67$	$t = 4,31$	$t = 9,83$	$t = 1,43$	$t = 5,87$
	$p > 0,1$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p > 0,1$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

86

ких мы не обнаруживали ни гемагглютинаина, ни инфекционного вируса. Группы иммунных сывороток к I, II изоформам также обладали, хотя и слабым, но защитным свойством, так как 30 % экспериментальных животных не погибало, а выздоравливало. В контрольной группе (вирус без сыворотки) наблюдалась 100 % гибель мышей на 5-е сутки после заражения.

Таким образом, при интраназальном заражении мышей летальной дозой вируса гриппа ( $2,5 \cdot 10^2$  LD<sub>50</sub>) в присутствии антипротеиназной иммунной сыворотки к III-ей изоформе 4-ой группы, 60 % животных остались живы в течение 14 суток (срок наблюдения). В контрольной группе 100 % гибель мышей наступала к 4-5-м суткам.

**Обсуждение**

Исследования клеточных антипро-

теиназных иммуноглобулинов, блокирующих развитие гриппозной инфекции, нами проведены впервые. Для выделения нескольких фракций изоформ трипсиноподобной протеиназы из незараженных легких мышей понадобилось использовать большое количество животных, что свидетельствует о том, что в здоровом организме протеиназы исчисляются крайне минимальным количеством, но при проникновении вируса играют огромную роль. Клеточные протеиназы участвуют, по-видимому, в «раздевании» вирионов гриппа. Такие известные противовирусные препараты, как ремантадин и бонафтан действуют на ионные каналы белка M2 HA, которые предшествуют стадии транскрипции вирусного генома. Ингибиторы протеолитических ферментов подавляют репродукцию вируса гриппа на бо-

Таблица 3

**Влияние антипротеиназных иммунных сывороток на выживаемость мышей при заражении летальной дозой вируса гриппа A/PR/8/34/H0N1**

№ гр	Изоформы протеиназ	Группа сыворотки	Срок после заражения (сутки)													Вы-жило	% ВЫЖИ-вае-МОСТИ
			6 час	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	14			
1	I	I						2/10		2/10	2/10	2/10			2	30	
2	I	II	2/10	2/10		4/10									2	30	
3	II	III			2/10			2/10		2/10			2/10		2	30	
4	III	IV						2/10			2/10			6	60		
5	IV	V			2/10		2/10	2/14						2	30		
6	V	VI			5/10	3/10	2/10									100	
7	VI	VII				7/10	1/10	1/10						1	10		
6	Физ. раствор		0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10	100	
7	Вирус гриппа А без сыворотки					2/10	2/10	6/10							0	0	
8	Нормальная крысиная сыворотка						2/10	3/10		5/10					0	0	
9	Иммунная сыворотка IV гр. без вируса гриппа (токсичность)		0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10	100	

Примечание: числитель – число погибших мышей; знаменатель – число мышей в опыте.

лее поздних стадиях. Однако с позиции организма более выгодным было бы предотвращение инфекции на более ранней стадии — стадии проникновения вирусных частиц в клетку.

По данным литературы, вирусы гриппа А, В и С типов, парамиксовирусы, ротавирусы приобретали инфекционность лишь после обработки трипсином, либо трипсиноподобными протеиназами, тогда как химотрипсиновые протеиназы, индуцируя расщепление поверхностных белков, их функцию и инфекционность по отношению к эмбрионам не активировали [5]. При моделировании гриппозной инфекции у мышей обнаружено существенное уменьшение их гибели при лечении антипротеиназной иммунной сывороткой, особенно полученной к III-ей изоформе. Происходит ли это за счет ингибирования молекулы гемагглютинаина или путем подавления активности клеточных энзимов, предстояло выяснить в дальнейших исследованиях.

Однако полученные данные свидетельствуют о том, что можно получить антивирусный препарат, который будет блокировать вирус гриппа в межклеточном пространстве, и приостано-

вит дальнейшее проникновение РНК вируса в здоровые клетки и прервет развитие патологического процесса.

### Выводы

Из легких здоровых мышей было выделено 6 изоформ трипсиноподобной протеиназы, обладающих высокой протеиназной активностью. Процент очистки их по белку составлял от 59 % до 99,94 %. При четырехкратной иммунизации белых крыс изоформами трипсиноподобной протеиназы в сыворотке крови отмечалось увеличение протеиназной активности, особенно к 3-ей изоформе. При лечении антипротеиназными иммунными сыворотками белых мышей, предварительно зараженных смертельной дозой вируса гриппа, 60 % животных 4 группы, остались живы в течении всего периода наблюдения (14 суток). В контрольной группе (не проходивших лечение, но зараженных летальной дозой вируса гриппа А) 100 % гибель мышей наступала на 4-5 день после заражения.

### Литература

1. Klenk H.-D., Rott R., Orlich M. Further studies on the activation of influenza virus by proteolytic cleavage of the hemagglutination // Journal of General

- Virology. — 1977. — V. 36. — P. 151-161.
2. Дивоча В.А., Гоженко А.И., Михальчук В.Н. Биологическое обоснование антипротеиназной терапии гриппа / Одесса: ART, 2011. — 215 с.
  3. Веремеенко К.Н. Ферменты в отоларингологии. — К.: Здоровье, 1980. — 147 с.
  4. Lowry W.J., Baker F. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol Chem. — 1951. — V. 193. — P. 265-275.
  5. Rott R., Klenk H.-D., Nagai J., Tachiro M. Influenza viruses, cell enzymes and pathogenicity // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 1995. -V. 152. — P. 516-519.

### References

1. Klenk H.-D., Rott R., Orlich M. Further studies on the activation of influenza virus by proteolytic cleavage of the hemagglutination // Journal of General Virology. — 1977. — V. 36. — P. 151-161.
2. Divocha V.A., Gozhenko A.I., Mikhal'chuk V.N. Biological basis antiproteases treatment of influenza / Odessa: ART, 2011. — 215 p.
3. Veremeyenko KN Enzymes in otolaryngology. — K.: Health, 1980. — 147 с.
4. Lowry W.J., Baker F. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol Chem. — 1951. — V. 193. — P. 265-275.
5. Rott R., Klenk H.-D., Nagai J., Tachiro M. Influenza viruses, cell enzymes and pathogenicity // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 1995. -V. 152. — P. 516-519.

### Резюме

#### АНТИПРОТЕЇНАЗНІ ВАКЦИНИ ПРИ ГРИПІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

*Дівоча В.П.*

З легенів здорових мишей було виділено 6 ізоформ трипсиноподібних протеїназ, що володіли високою протеїнажною активністю. Відсоток очищення їх по білку становив від 59,0 % до 99,94 %. При 4-ій імунізації білих щурів ізоформами трипсиноподібних

протеїназ в сироватці крові відзначалося збільшення протеїназної активності, особливо до третьої ізоформи. При лікуванні антипротеїназними імунними сироватками білих мишей, заражених смертельною дозою вірусу грипу А, 60 % тварин 4-ої групи, залишилися живі на протязі всього періоду спостереження (14 діб). У контрольній групі (не проходили лікування, але заражених летальною дозою вірусу грипу А) 100 % загибель мишей наступала на 4-5 день після зараження.

**Ключові слова:** вірус грипу, протеази, очищення вірусу.

### Summary

#### ANTIPROTEASES VACCINE THE FLU IN THE EXPERIMENT

*Divocha V.A.*

From the lungs of healthy mice were allocated 6 isoforms trypsin-like proteases that have high proteinase activity. Percentage of purification on protein ranged from 59.0 % to 99.94 %. In the 4th immunization rats isoforms trypsin-like proteases in serum showed an increase in proteinase activity, particularly in the third isoform. When treating antiproteases antiserum white mice infected with a lethal dose of influenza A virus, 60 % of the animals fourth group remained alive throughout the observation period (14 days). In the control group (not treated, but infected with a lethal dose of influenza virus A) 100 % killing mice advancing 4-5 days after infection.

**Keywords:** influenza virus, proteases, purification of the virus.

*Впервые поступила в редакцию 13.03.2015 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*