

УДК 577.1.616.988.616.921.5

БИОХИМИКО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ АНТИПРОТЕАЗНОЙ ТЕРАПИИ ГРИППА

Михальчук В.Н., Дивоча В.А., Гоженко А.И.

УкрНИИ медицины транспорта, г. Одесса

Разработка эффективных мер борьбы против вирусных инфекций остается одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения. Успехи фундаментальных исследований позволили глубоко проникнуть в механизмы вирусной репродукции, структурной организации и функции отдельных вирусных структур, но пока ещё не обеспечили надежных и эффективных способов борьбы с подавляющим большинством возбудителей массовых острых вирусных заболеваний человека и животных [1]. Решение этой проблемы нуждается в привлечении новых идей и подходов, в поиске новой методологии исследований в области фундаментальной и практической вирусологии, в комплексном анализе взаимодействия двух систем — паразита и хозяина. Это взаимодействие является единым целым, представляющее совокупность сложных внутренних отношений двух противоположных начал. Конечный результат этого взаимодействия генетически определен хозяином и возбудителем и зависит от уровня регуляции, как процесса вирусной репродукции, так и защитных сил организма. Баланс между этими процессами определяет исход взаимодействия, которое может привести к гибели хозяина, к его полному выздоровлению или к формированию хронической формы инфекции [2].

Впервые в начале 80-х годов при очистке и концентрации разных штаммов вируса гриппа, для получения поливалентных противогриппозных вакцин мы столкнулись с тем, что не можем освободить вирус гриппа от протеолитической актив-

ности [3]. Для решения данного вопроса мы усовершенствовали методы очистки. Но какой бы метод очистки мы не использовали, освободить вирус гриппа от протеолитической активности нам не удалось. Эту связь не может разрушить ни воздействие 0,1 % раствора додецисульфата натрия, ни силы электрофоретической подвижности заряженных отрицательно молекул, ни центробежные силы. На основании этого можно говорить о мощном гидрофобном взаимодействии вирусных и клеточных молекул. В связи с этим, определение протеолитической активности в очищенных и концентрированных препаратах вируса гриппа может служить маркером качества очистки вируса [4].

Следует отметить, что протеолитическая активность обнаружена также в составе вируса Сендай [5], ящура [6] и гепатита В [7]. Наши результаты и данные литературы послужили основанием для изучения нами ассоциированной с вирусами протеазы.

Для изучения природы вирусассоциированной протеазы мы получили специфичные иммунные крысиные сыворотки к нормальным хорионаллантоисным оболочкам куриного эмбриона и с их помощью нейтрализовали протеазу, ассоциированную с вирусом гриппа, что дало основание сделать вывод, что протеаза имеет клеточное происхождение.

Еще в начале 60-х годов XX века наличие в вирусных препаратах антигенных компонентов, источником происхождения которых является клетка хозяина,

было подтверждено рядом исследователей [8, 9]. Так, в составе очищенных частиц вируса гриппа, парагриппозного вируса Сендай и вируса болезни Ньюкасла обнаружены гетерогенный антиген типа Форсмана; антиген, подобный группоспецифическому антигену А человека, и антиген, несущий видовую специфичность тех клеток, на которых вирус размножается [10].

В настоящее время «неоальбуминовый» антиген (ОА) – единственный антиген хозяина, нормируемый и контролируемый при изготовлении гриппозных вакцин.

Анализ очищенных препаратов вируса гриппа на наличие протеолитической активности в наших исследованиях показал, что очистка вируса гриппа методами ультрацентрифугирования не освобождает вирус гриппа от протеолитической активности. Причем, в градиенте сахарозы (15-60 %) протеолитическая активность четко разделилась на несколько изоферментов.

Доочистка в электрофорезе полиакриламидного геля приводила также к четкому разделению протеазы трипсиноподобного типа на 7-9 фракций, обладающих высокой протеолитической активностью.

Сходный ферментный профиль был обнаружен и в препаратах нормальной хорионаллантоисной жидкости и хорионаллантоисных оболочках куриного эмбриона. Разница была в том, что протеолитическая активность в них была значительно ниже и протеаза быстрее генерировалась из элюатов. Антисыворотки к хорионаллантоисным оболочкам нейтрализовали протеолитическую активность, ассоциированную с вирусом гриппа [11].

Полученные результаты позволили нам сделать вывод, что с вирусом гриппа ассоциирована серинсодержащая протеаза трипсиноподобного типа клеточного происхождения, которая к тому же имеет молекулярную гетерогенность. Эта протеаза прочно адсорбируется как на поверхностных, так и на глубоко рас-

положенных полипептидах вириона, о чем свидетельствуют наши исследования по удалению его поверхностных гликопротеинов гемагглютинаина и нейраминидазы с помощью твина-90 и эфира.

Основная масса протеолитической активности была сосредоточена во фракции РНП.

Наличие клеточных элементов в составе очищенного вируса гриппа констатировали многие авторы [12], но никто до нас не изучал наличие протеолитических ферментов в составе очищенного вируса гриппа. Как показали наши исследования, очищенный вирус гриппа всегда содержал белок с протеолитической активностью. В то же время при выделении V – антигена, который представляет комплекс гемагглютинаина и нейраминидазы, не обнаружено протеазной активности. В препаратах РНП мы обнаруживали протеазную активность. На этом основании мы предположили, что протеаза играет «цементирующую» роль для белков вируса гриппа, который, созревая в клетке-хозяине, использует для своего строения ферменты клетки.

Мы предположили, что этот фермент играет важную роль в морфогенезе вируса гриппа и в значительной мере определяет его патогенные и вирулентные свойства.

Система протеиназ и ингибиторов представлена в организме большой группой белков. Известно, что ингибиторы протеолитических ферментов выполняют роль постоянного регулятора уровня соответствующих ферментов в организме, находятся с последними в постоянном динамическом равновесии. Нарушение равновесия между ферментами и ингибиторами имеет значение для развития патологических процессов.

Проведенные нами исследования показывают, что в легких и сыворотке крови незараженных животных и куриных эмбрионах уровень протеазной и ингибирующей протеазу активности находятся в равновесии, которое нарушается при

заражении вирусом гриппа А.

В инфекционном процессе можно выделить несколько периодов, которые характеризуются разной степенью размножения вируса, и разным уровнем протеазной и ингибирующей протеазу активности.

Наиболее глубокие изменения происходят в первые часы после заражения. Через 6 часов после заражения снижается количество протеазы как в легких, так и в сыворотке зараженных животных и возрастает ингибирующая активность. Аналогичное явление было отмечено и для вирусов ньюкаслской болезни и болезни Ауески [13].

Таким образом, можно предположить, что в первые минуты после заражения наблюдаемые изменения ферментно-ингибиторного баланса в организме животных, по-видимому связаны с тем, что используемые вирусы гриппа содержат и ферменты и их ингибиторы. В дальнейшем уменьшение протеолитической активности связано с соответствующим накоплением ингибитора протеазы в зараженном организме. По-видимому, зараженные вирусом гриппа клетки индуцируют появление ингибитора, как в легочной ткани, так и в сыворотке крови. Таким образом, ингибиторы легочной ткани являются как бы первой линией обороны органа при действии различных штаммов вируса гриппа.

В период наибольшего накопления инфекционного вируса (вторые сутки после заражения для вируса гриппа А) протеолитическая активность также снижается, однако это снижение сопровождается уже уменьшением ингибиторной активности. Это позволяет предположить, что повторное снижение протеазной активности вызвано другими причинами. Возможно, одной из причин является использование клеточных трипсидных протеаз для протеолитической активации вируса в легких зараженных мышей и истощением пула в организме зараженных мышей. В работах М.Е.

Ewasyshin и Z.R. Sabina (1986) было показано, что в процессе репликации различных штаммов вирусов гриппа в куриных эмбрионах наблюдается отчетливое подавление протеазной активности в аллантоисной жидкости, когда выход инфекционного вируса приближается к своему максимуму [14].

Третий период накопления протеазной активности совпадает с повторным увеличением инфекционного потомства вируса и, по-видимому, связан с последствиями вирусной инфекции и наслоением бактериальной инфекции. Так было показано, что протеаза стафилококка вызывает протеолитическую активацию вирусов гриппа .

Таким образом, для изучения трипсинаподобной протеазы, выделенной из легких мышей, зараженных вирусом гриппа А, следует брать мышей через 72 часа после заражения, а протеазу лучше всего выделять из легких незараженных мышей. В своих исследованиях мы обнаружили ингибиторы протеаз с различными свойствами и функциями. Первая изоформа ингибиторов, которые блокируют протеазу, выполняет роль защитных факторов организма, т.к. в этот период не отмечается образование инфекционного вируса. Вторая изоформа ингибитора протеаз, выделяемых из легких мышей, зараженных малой дозой вируса гриппа, не подавляет протеазную активность и выполняет какие-то иные функции, т.к. в этот период происходит повышение и протеазной и инфекционной активности. В сыворотке крови не обнаруживается первая изоформа ингибитора, а вторая изоформа подавляет протеазную активность, которая предшествует достижению максимальных уровней инфекционного вируса и гемагглютина.

Третья изоформа ингибитора образуется в процессе развития инфекционного процесса, и по-видимому, является результатом некроза ткани легкого.

О неоднородности ингибиторов сериновых протеаз, индуцируемых вируса-

ми гриппа, утверждают и другие авторы. Так, ингибитор аллантаоисной жидкости отличался от ингибиторов трипсина 17-дневной амниотической жидкости и овомукоида в белке куриного эмбриона. Ингибитор протеазы аллантаоисной жидкости имел свойства, сходные со свойствами ингибиторов субтилизина, которые описаны для овоингибиторов и овомакроглобулина куриных эмбрионов, семян черных бобов и фильтрата культуры *Streptomyces Subtilisin inhibitor*.

Ингибиторы протеазы в цикле репродукции аденовирусов, вируса везикулярного стоматита и вируса герпеса простого типа 2 являются вирусоспецифическими ингибиторами, блокирующими критические этапы метаболизма инфицированных клеток.

Наши исследования позволяют нам предположить, что вирусиндуцированные ингибиторы, обнаруженные в первые часы после заражения, блокируют активность протеазы клеток-хозяев, в результате чего белки вируса гриппа защищены от протеолитического гидролиза. Когда ингибиторы иссякают, протеаза начинает расщеплять гемагглютинин и происходит возрастание титра вируса. Поэтому, целесообразно через 6 часов после заражения дополнительно вводить ингибитор для блокировки протеазной активности.

При изучении изменений протеазной и ингибирующей активности в куриных эмбрионах под действием больших и малых заражающих доз вируса гриппа А/РР/8/34 установлено, что в них происходили изменения, аналогичные тем, которые наблюдались в организме белых мышей. В первые 30 минут после заражения, отмечалась увеличение протеазной и ингибирующей активности. Под действием большой заражающей дозы, начиная с 6 часов после заражения, происходило угнетение протеазной и ингибирующей активности. В это время шло накопление инфекционной и гемагглютинирующей активности, которое достигало своего максимума к 24 часам. В этот

период уже не обнаруживалась ни протеазная, ни ингибирующая активность. В работе M.S. Ewasyshin и Z.R. Sabina (1986) было также показано, что в процессе репликации различных штаммов вирусов гриппа наблюдается отчетливое подавление протеазной активности аллантаоисной жидкости в период, когда выход инфекционного вируса приближается к своему максимуму. Через 72 часа происходил подъем протеазной активности, который достигал к 122 часам исходных цифр.

Полное подавление ингибирующей активности запаздывало на сутки и происходило к 48 часам, держалось до 96 часов и к 122 часам достигало исходных величин. В период блокады ингибитора (48-96 часов) протеазная активность быстро возрастала. Это говорит о том, что мы имеем разные ингибиторы. Первая изоформа ингибитора выполняет роль защитной функции организма на внедрение инфекции. Вторая изоформа ингибитора подавлялась незначительно, хотя в этот период инфекционный вирус достигал своего максимума, а при малой дозе заражения вторая изоформа вообще не подвергалась изменениям. Третья изоформа резко угнеталась большой дозой и мало изменялась при действии малой дозой. Если основная роль третьей изоформы ингибитора состоит в сохранении инфекционного вируса за счет его защиты от протеолитической деградации, то интерференция с синтезом ингибитора может иметь важное терапевтическое значение.

Поэтому целью дальнейших наших исследований было получение ингибитора трипсиноподобных протеаз из легких здоровых и инфицированных вирусом гриппа А мышей.

Нами впервые выделен ингибитор трипсиноподобных протеаз из легких здоровых мышей. Он характеризовался высокой степенью чистоты и содержал незначительное количество примесей. Ингибитор имел молекулярную массу 47500 Да. Разработана методика получения и очистки ингибитора трипсиноподобных протеаз.

добных протеаз и на нее получен патент. Выделенный ингибитор похож на альфа-1-ингибитор протеаз сыворотки крови человека (м.м. 48000-55000 Да) и ингибитор трипсина из яичного белка (м.м. 49000 Да), но не похож на ингибитор трипсина выделенный из легких крупного рогатого скота (ингибитор типа Кунитца-Нортропа), который имел молекулярную массу 65000 Да. При изучении его действия на протеолитическую активность изоформ трипсиноподобных протеаз пробирочным методом выяснилось, что он подавлял активность почти всех изоформ, за исключением 4 (41,8 %) и 7 (28,3 %).

В проведенных исследованиях при использовании выделенного нами клеточного ингибитора для подавления развития вируса гриппа в куриных эмбрионах установлено, что он подавлял развитие инфекционной и гемагглютинирующей активности и образование общего белка. В тоже время ингибитор трипсиноподобных протеаз, выделенный из легких мышей, предварительно зараженных вирусом гриппа, не обладал данной способностью. Поэтому в дальнейших исследованиях для лечения гриппозной инфекции у животных мы использовали ингибитор, который выделяли из легких здоровых мышей. При лечении этим препаратом белых мышей, предварительно зараженных летальной дозой вируса гриппа, 80% животных выздоравливали и оставались живы до 14 суток после заражения. Введение ингибитора мышам снижало их гибель от гриппа вследствие торможения расщепления НА при репродукции вируса в легких и недопущения генерализации процесса, а также в результате предотвращения повышения протеолиза в легких и предупреждения аэрогематического барьера, усиления некоторых реакций местной защиты.

Выводы

1. Очистка и концентрация вируса гриппа методами центрифугирования не освобождали вирус гриппа от белков с протеазной активностью.

Первоначально ассоциированная с вирусом гриппа протеаза в градиенте сахарозы разделилась на четыре изоформы, а нормальных хорионлантоисных оболочек – на три изоформы, которые в 345 раз были ниже, чем вирусассоциированные.

2. Протеаза, ассоциированная с вирусом гриппа, является клеточным ферментом, так как иммунные сыворотки к нормальным хорионлантоисным оболочкам куриного эмбриона нейтрализовали протеазу в зоне 35-45% сахарозы, где локализовался очищенный вирус гриппа, а гемагглютинирующая активность сохранилась.
3. При заражении животных (белых мышей) вирусом гриппа А происходит нарушение ферментно-ингибирующего баланса. Наиболее глубокие изменения происходят в первые часы после заражения. Снижение протеазной активности в первые часы после заражения объясняются увеличением ингибирующей протеазу активности.
4. Вирусиндуцированный клеточный ингибитор в первые часы после заражения играет важную роль в блокировке протеазы, после его истощения главную роль в развитии патологии берут на себя трипсиноподобные протеазы, которые начинают нарезать гемагглютинин и происходит возрастание инфекционного титра.
5. Из лёгких здоровых мышей выделен ингибитор трипсиноподобных протеаз с молекулярной массой 47500 Да, который обладал способностью подавлять развитие инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса гриппа на куриных эмбрионах и блокировал развитие гриппозной инфекции у белых мышей в общей дозе 0,126 мкг/мышь.

Литература

1. Klenk H.-D., and Rott R. The molecular basis of influenza virus pathogenicity. /

- /Adv. Virus Res. – 1988. -V.34. -P.247-281.
2. Букринская А.Г. Молекулярные механизмы раннего взаимодействия вируса гриппа с клетками. //Молекулярная биология вирусов. Ч.1.- М., 1985. -С.4-20.
 3. Дивоча В. А., Дегтяренко В. И., Зеваков В. Ф. Клеточная протеаза вируса гриппа // Тезисы докладов 2-го съезда инфекционистов УССР.- К., 1983. – С. 36-38.
 4. Дивоча В.А. Клеточная трипсиноподобная протеаза – маркер качества очистки вируса гриппа. //Актуальные вопросы медицинской биотехнологии. –Харьков, 1991. – С. 30-31.
 5. Жирнов О.П., Букринская А.Г. Изучение белков вируса Сендай: Протеолитическая активность в составе вирусных частиц. //Вопросы вирусологии. – 1977. - №5. – С.571-577.
 6. Grubman Marvin J. Fur ther characterization of a proteinkinase from foot-and-morith disease virus //J. Virol. – 1982. -vol. 44. -№3. -P.1102-1105.
 7. Qerlich Wolfram H., Addmann Udo, Muller Rainer, Stibbe Werner, Wolff Wilhelm. Specificity and localization of the hepatitis B virus associated protein kinase. //J.Virol. -1982. –V.42. -№3. – P.761-766.
 8. Груздева Н.М., Косяков Г.Н. О действии гомологичных и гетерологичных иммунных сывороток на развитие вирусной инфекции. //Вопросы вирусологии. -1963. -№2. -С.163-167.
 9. Ровнова З.И., Косяков П.Н. Исследование свойств антигенов хозяина в структуре миксовирусов. //Вопросы вирусологии. -1966. -№4. -С.413-418.
 10. Платонова А.Л., Рогачева Г.А., Исаева С.И., Ровнова З.Н. Выявление и идентификация антигена клетки хозяина в составе вируса гриппа В. // Вопросы вирусологии. -1987. -№3. -С.159-163.
 11. Дівоча В.О. Вірус грипу і ферменти клітини. //Ж. Експериментальна і клінічна медицина.- Харків,1999. – С.100-105
 12. Дивоча В.А., Григорьева И.Г., Букринская А.Г. Изменение протеазной активности в легких мышей, зараженных вирусом гриппа А. //Вопросы вирусологии. -1999. -№5. -С.370-377.
 13. Логинов А.С., Амиров Н.Ш., ЧерноярOVA О.Д. Ингибиторы протеолитических ферментов поджелудочной железы. //Вестник АМН СССР. -1989. -№1. -С.53-61.
 14. Ewasyshyn M.E., Sabina L.R. Влияние репродукции вируса гриппа на нейтральную протеолитическую активность в жидкостях куриных эмбрионов. //Acta virol. -1983. -№27. -P. 193-199.

Резюме

БІОХІМІКО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ОБГРУНТОВУВАННЯ АНТИПРОТЕАЗНОЇ ТЕРАПІЇ ГРИПУ

*Михальчук В.Н., Дивоча В.А.,
Гоженко А.І.*

Проведені дослідження дозволяють припустити, що вірус індуцировані інгібітори, знайдені в перші години після зараження, блокують активність протеази кліток-господарів, внаслідок чого білки вірусу грипу захищені від протеолітичного гідролізу. Коли інгібітори вичерпуються, протеаза починає розщеплювати гемаглютинін і відбувається зростання титру вірусу. Тому, доцільно через 6 годин після зараження додатково вводити інгібітор для блокування протеазної активності.

З легких здорових мишей виділений інгібітор трипсиноподібних протеаз з молекулярною масою 47500 Да, який володів здатністю пригнічувати розвиток інфекційної і гемаглютинуючої активності вірусу грипу на курячих ембріонах і блокував розвиток гриппозної інфекції у білих мишей в загальній дозі 0,126 мкг/мишу.

Summary

**BIOCHEMICAL AND VIROLOGIC
SUBSTANTIATION OF THE FLU
ANTIPROTEASAL THERAPY**

*Mihalchuk V.N., Divocha V.A.,
Gozhenko A.I.*

Our researches allow us to assume, that the viral induced ingibitors, found out in the first hours after infection, block activity of owner cells proteases. Therefore flu virus proteins are protected from protheolytic hydrolysis. When the ingibitors run low, the protease starts to split the hemagglutinine and there is an increase of a virus titre. Therefore, it is expedient in 6 hours after

infection in addition to enter ingibitor for blocking the protease activity.

From the lungs of healthy mices it is allocated an ingibitor of trypsin like proteases with molecular weight of 47500 Da which had ability to suppress development infectious and hemagglutinine activity of a flu virus on chicken embryos and blocked development of an influenzal infection in white mice in the common doze of 0,126 mkg/mouse.

*Впервые поступила в редакцию 29.01.2008 г.
Рекомендована к печати на заседании ученого
совета НИИ медицины транспорта
(протокол № 3 от 29.05.2008 г.).*

УДК 616.33 – 002.2 – 07: 579. 835. 12

**К ВОПРОСУ О ЛОКАЛИЗАЦИИ И ЧИСЛЕННОСТИ ЯЗВЕННЫХ
ДЕФЕКТОВ, КОТОРЫЕ ОБРАЗУЮТСЯ У БОЛЬНЫХ
ХРОНИЧЕСКИМ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗОМ И ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ НА КРЫСАХ**

Авраменко А.А., Гоженко А.И., Гойдык В.С.

*Проблемная лаборатория по вопросам хеликобактериоза, г. Николаев
Украинский НИИ медицины транспорта, г. Одесса
Одесский государственный медицинский университет*

124

Несмотря на более чем 150-ти летнее научно обоснованное изучение язвенной болезни (ЯБ) многие вопросы этиологии и патогенеза данной патологии остаются неразрешёнными [6]. Открытие в 1983 году лауреатами Нобелевской премии Б.Маршаллом и Дж. Уорреном хеликобактерной инфекции (НР) - доказанным этиологическим фактором хронического гастрита (ХГ) типа В и ЯБ - стало революцией в гастроэнтерологии [4]. Однако многое остаётся неясным, и, в первую очередь, различие по локализации и численности язвенных дефектов гастродуоденальной зоны при ЯБ по сравнению с дефектами, получаемыми при моделировании данного патологического процесса на животных. Проведение исследований по уточнению данных различий и стало поводом для нашей работы.

Материалы и методы

Было комплексно обследовано 109 больных хроническим гастритом типа В с язвенными поражениями гастродуоденальной зоны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) различной локализации в активной фазе (мужчин - 68, женщин - 41 человек; возраст - от 15 до 56 лет; стаж заболевания - от 3-х до 21-го года; срок обострения патологического процесса – от 5-ти до 14-ти дней), которое включало проведение внутрижелудочной пошаговой рН-метрии (прибор ИКЖ-2, СКБ «МЭТ», г. Каменец-Подольский, Украина) по методике Чернобрового В.Н. [7], эзофагогастродуоденоскопии (панэндоскоп «Z – 1», фирма «Фуджинон», Япония), двойного тестирования на НР: тест на уреазную активность и микроскопирование окрашенных по Гимза мазков-отпечатков, материал для которого брался из 5-ти топографических зон: из 12-ти перст-