



УДК 613.22:517.156:576.858/8.0947

© 2011

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

## **Роль протеиназ крови и их ингибиторов в механизмах противовирусной защиты**

*(Представлено академиком НАН Украины В. В. Гончаруком)*

*Досліджено наявність трипсиноподібних протеїназ та їх інгібіторів у донорській крові людини, промислових відходах одержання гаммаглобуліну, комерційних вітчизняних препаратах (імуноглобулін, інтерферон, герпетична та туляремійна вакцини), у закордонних препаратах (протигрипозні вакцини — “Інфлувак”, “Ваксігріп”, “Флюарікс”, вакцина проти гепатиту А — “Аваксім”; препарати з крові — “Фраксіпарин” і “Солкосерил”). З промислових відходів одержання гаммаглобуліну людини виділено ізоформу інгібітора трипсиноподібних протеїназ, що має захисну дію при зараженні експериментальних тварин смертельною дозою вірусу грипу А/PR/8/34 (А/Н1N1).*

Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются глобальной проблемой, они занимают первое место по частоте и количеству случаев в мире и составляют 95% всех инфекционных заболеваний [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), каждый год является годом гриппа, а пандемии происходят раз в 10–40 лет [2]. 2009 г. был объявлен годом пандемии гриппа. В Украине в течение 2009 г. умерло от пневмонии 1127 человек, из них 100 беременных женщин. За медицинской помощью по поводу ОРВИ и гриппа к врачам обратилось около 5 млн человек [3]. На лечение гриппа и его осложнений ежегодно в мире расходуется почти 15 млрд долларов США, а в Украине убыток от каждого случая гриппа в среднем составляет 800–1200 грн.

Ведущая роль в профилактике и лечении гриппа принадлежит вакцинации. Кроме вакцин существует большой выбор лекарственных средств: “Амантадин”, “Ремантадин”, “Антигрипин” I, II, III, “Арбидол”, “Лаферон”, “Кагоцел”, “Ингаверин”, “Амиксин”, “Интерферон” и др. [4, 5]. В последнее время используются два новых препарата — “Занамивир” (Relenza) и “Озельтамивир” (Тамуфлу), которые являются ингибиторами нейраминидазы вируса гриппа и получены путем генной инженерии и кристаллографии [6].

Отечественные ученые, используя эффект расщепления гемагглютинина вируса гриппа трипсиноподобными протеиназами клеток эпителия респираторного тракта на две субъ-

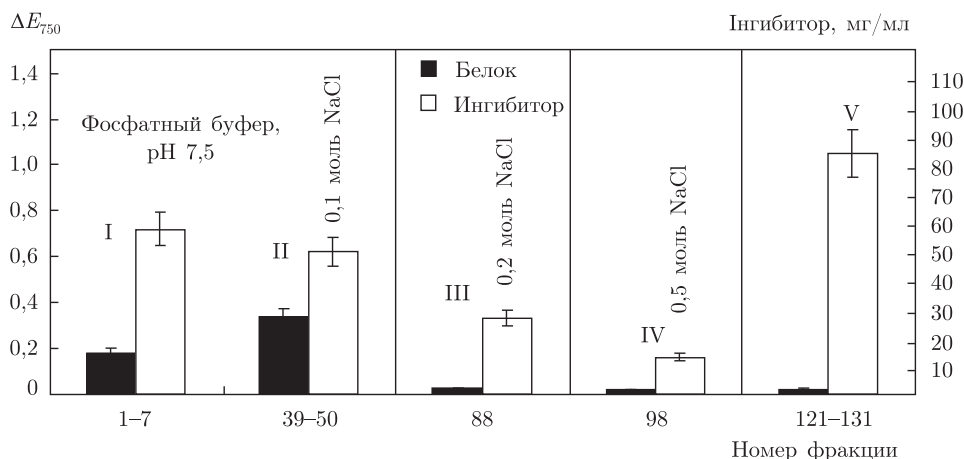


Рис. 1. Выделение и очистка ингибитора трипсиноподобных протеиназ из отходов I стадии (II + III) промышленного получения гаммаглобулина. Высота колонки — 19,0 см, диаметр — 2,5 см, объем фракций — 10,0 мл, скорость — 40,0 мл/ч. Элюирование 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,5, и ступенчатым градиентом NaCl. Нанесено 9,2 мг белка

диницы (HA<sub>1</sub>, HA<sub>2</sub>), получили ингибитор трипсиноподобных протеиназ из клеток здоровых легких мышей, который блокировал развитие гриппа у белых мышей, зараженных смертельной дозой вируса, вследствие чего 60% животных остались живы. Итогом стало создание ингибиторно-протеиназной теории гриппа [7].

Целью нашего исследования было обоснование и разработка биотехнологии получения противовирусного препарата для человека по результатам анализа взаимодействия ферментной системы клетки с вирусом гриппа на основе ингибиторно-протеиназной теории.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) изучить наличие трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов в донорской крови человека в отдельных фракциях плазмы крови; 2) проанализировать наличие протеиназ и ингибиторов трипсиноподобных протеиназ в вакцинах и препаратах аптечной сети, полученных с крови человека; 3) изучить наличие содержания ингибиторов и протеиназ на всех этапах получения гаммаглобулина промышленным способом и из отходов гаммаглобулинового производства; 4) получить и очистить ингибиторы сериновых протеиназ из отходов гаммаглобулинового производства; 5) исследовать защитные свойства ингибиторов трипсиноподобных протеиназ, полученных из отходов гаммаглобулинового производства; 6) обосновать и разработать биотехнологию получения противовирусного препарата для человека.

**Материалы и методы исследований.** Вирусы гриппа A/PR/8/34 (A/H1N1) и B, штамм PR-109, полученный рекомбинацией вирусов B/Lee/40 и B/СССР/100/83, которые были выращены на девятидневных куриных эмбрионах. Штаммы вирусов гриппа получены в НИИ вирусологии им. И. Д. Ивановского АМН России. В исследованиях использовали беспородных белых мышей и мышей линии "Balb<sub>c</sub>", куриные эмбрионы, донорскую кровь 30 человек в возрасте от 18 до 24 лет, донорскую плазму четырех групп крови, эритроцитарную массу, сыворотку крови человека, отходы промышленного получения гаммаглобулина и альбумина, отечественные препараты: интерферон, иммуноглобулин человеческий, герпетическую, туляремийную и гонококковую вакцины.

Консервированная эритроцитарная масса тридцати доноров получена из отделения реанимации второй городской клинической больницы г. Одесса, эритроцитарная масса с про-

сроченным сроком годности (после 21 сут хранения) — на областной станции переливания крови г. Одесса. Интерферон лейкоцитарный человеческий, иммуноглобулин человеческий плацентарный и донорский 10% (Киев, “Биофарма”), вакцина герпетическая (Одесса, “Завод бакпрепаратов”) были закуплены в аптеках г. Одесса. Плазма крови человека четырех групп крови и отходы после выделения гаммаглобулина и альбумина получены на областной станции переливания крови г. Одесса. Препараты “Инфлувак”, “Аваксим”, “Флюарикс”, “Фраксипарин”, “Ваксигрип” и “Солкосерил” изучались до окончания срока их годности.

В работе использовали вирусологические и биохимические методы исследования.

**Результаты и их обсуждение.** По результатам изучения донорской крови человека и отдельных фракций крови на наличие в них трипсиноподобных протеиназ было установлено, что донорская кровь человека содержит как трипсиноподобную протеиназу, так и ее эндогенный ингибитор (табл. 1).

В среднем активность трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора составляли  $(21,4 \pm 1,96)$  ммоль/(мин · мг белка) и  $(62,7 \pm 7,31)$  у. е. (1 у. е. соответствует 1 мкг инактивированного кристаллического трипсина) соответственно. Наибольшая активность протеиназы выявлена в донорской крови II группы —  $(22,85 \pm 2,06)$  ммоль/(мин · мг белка). Активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ была самой высокой и практически одинаковой в донорской крови I и IV групп —  $(70,07 \pm 6,80)$  и  $(70,26 \pm 8,11)$  у. е. соответственно [8]. Во II группе крови активность ингибитора была наименьшей —  $(51,59 \pm 5,06)$  у. е. Этот дисбаланс во II группе крови можно объяснить дефицитом синтеза эндогенного ингибитора трипсиноподобной протеиназы.

В эритроцитарной массе донорской крови активность трипсиноподобной протеиназы была в 1,5 раза выше, чем в сыворотке крови. Активность протеиназы в эритроцитарной массе донорской крови IV группы была в 2,0 раза выше, чем в сыворотке крови доноров этой же группы. Для увеличения выхода фермента была использована методика гемолиза эритроцитов. Как показали исследования, двухкратное замораживание и оттаивание не влияло на выход фермента. При хранении донорской крови человека на протяжении года при  $-18^\circ\text{C}$  активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ уменьшалась в 5,0 раз.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что свежая донорская кровь содержит высокоактивную трипсиноподобную протеиназу и ее ингибитор. Активность ингибитора трипсина была больше в сыворотке, чем в эритроцитарной массе, и не зависела от активности протеиназы.

В исследованных коммерческих препаратах — человеческом иммуноглобулине, интерфероне лейкоцитарном, герпетической вакцине, выявлено наличие трипсиноподобной протеиназы и ингибитора трипсиноподобных протеиназ. Наибольшая активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ обнаружена в человеческом плацентарном иммуноглобулине — 60,185 у. е. (1 у. е. соответствует 1 мкг инактивированного трипсина). Ингибитор был выявлен в интерфероне (15,79 у. е.) и в герпетической вакцине (19,750 у. е.). Туляремиальная вакцина содержала только следы ингибитора (0,544 у. е.). В гоновакцине не было установлено ни протеиназной, ни ингибиторной активности. Активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ в иммуноглобулине была в 4,0 раза больше, чем в интерфероне [9].

Полученные результаты позволили нам предположить, что отечественные препараты недостаточно очищены от балластных белков. Поэтому в дальнейшем нами определялось наличие протеолитических ферментов и их ингибиторов в вакцинах и препаратах крови, которые выпускаются фирмами разных зарубежных стран.

Как показали исследования (табл. 2), все коммерческие препараты зарубежных стран содержали в себе как ингибитор, так и трипсиноподобную протеиназу. Наибольшая активность ингибитора установлена в противогриппозной вакцине “Инфлувак” — 180,86 у.е. водной суспензии (1 у.е. соответствует 1 мкг инактивированного трипсина), и в препарате “Фраксипарин” — 111,30 у.е. водной суспензии. Наименшая активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ наблюдалась в препарате “Аваксим” — инактивированная вакцина против гепатита А.

Противогриппозные вакцины: “Ваксигрип” и “Флюарикс” в своем составе содержали большое количество ингибитора и трипсиноподобную протеиназу. Среди исследуемых вак-

Таблица 1. Активность трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора в донорской крови человека

№ п/п	Группа крови	Объем крови, мл	Активность протеиназы, ммоль арг/(мин · мг белка)	Содержание белка, г/мл	Активность ингибитора (ИА), у.е.
1	0/I	250,0	14,92	3,97	37,36
2		250,0	25,83	3,42	186,83
3		125,0	5,31	4,71	81,52
4		125,0	16,24	5,89	57,75
5		150,0	22,72	4,54	52,47
6		150,0	25,15	4,40	9,26
7		150,0	18,56	4,62	64,81
8		125,0	13,62	4,66	30,86
9		125,0	19,27	4,59	154,32
10		115,0	25,07	4,79	141,18
11		115,0	21,43	4,33	108,02
12		140,0	13,82	2,24	50,26
13		150,0	26,73	1,92	50,26
14		125,0	29,14	1,60	17,48
15		5,0	29,45	2,81	8,74
0/I ( $M \pm m$ )			20,47 ± 1,89	3,90 ± 0,34	70,07 ± 6,80
16	A/II	2,0	24,32	3,47	16,98
17		2,0	20,43	2,52	122,26
18		150,0	18,71	5,95	40,76
19		140,0	17,44	4,91	71,33
20		150,0	19,82	5,15	30,57
21		125,0	20,47	4,70	10,19
22		125,0	26,52	4,45	20,38
23		125,0	26,74	1,88	43,71
24		125,0	27,00	1,77	98,34
25		150,0	22,43	1,64	122,34
26		125,0	26,51	4,45	20,38
27		150,0	23,88	2,13	21,85
A/II ( $M \pm m$ )			22,85±2,06	3,59 ± 0,32*	51,59 ± 5,06*
28	AB/IV	250,0	21,04	3,77	4,00
29		1	23,23	4,61	185,19
30		1	17,73	4,89	21,60
AB/IV ( $M \pm m$ )			20,67 ± 1,84	4,42 ± 0,41	70,26 ± 8,11
В среднем ( $M \pm m$ )			21,40 ± 1,96	3,83 ± 0,28	62,70 ± 7,31

Примечание. Здесь и в табл. 2 активность ингибитора трипсина, у.е. — 1 у.е. соответствует 1 мкг инактивированного кристаллического трипсина. \* Достоверное снижение показателя относительно показателей АВ/IV группы крови.

цин меньше всего трипсиноподобной протеиназы содержалось в препарате “Аваксим” — 0,24 ммоль/(мин · мг белка водной суспензии), в то же время в препарате “Инфлувак” была определена самая высокая активность трипсиноподобной протеиназы — 1,53 ммоль/(мин · мг белка водной суспензии). В составе препарата “Солкосерил” установлена активность ингибитора трипсина (84,34 у. е.), активность протеиназы (0,26 ммоль/(мин · мг белка)) и очень большое количество общего белка.

Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что зарубежные препараты не очищены на 100% от белковых примесей, или невозможно отделить вирусные белки от компонентов клетки. Вирусные белки крепко ассоциированы с компонентами клетки, поэтому структуру вируса гриппа необходимо рассматривать с учетом взаимодействия с клеточными ферментами и их ингибиторами.

В связи с тем, что высокая активность трипсиноподобной протеиназы была определена в препаратах из плазмы донорской крови, мы решили провести проверку отходов всех стадий получения гаммаглобулина на наличие в них трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора.

На I стадии выделения гаммаглобулина с человеческой донорской крови получают фракцию II + III, с которой затем выделяют гаммаглобулин и альбумин, а фракция фибриногена идет в отходы (утилизируется). Как показали результаты наших исследований (табл. 3), в супернатанте и в осадке содержались трипсиноподобная протеиназа и ингибитор трипсиноподобной протеиназы — 481,11 мг/кг (мг ингибитора на 1,0 кг отходов). Также в материале обнаружен  $\alpha_1$ -антитрипсин, или  $\alpha_2$ -ингибитор протеиназ, который является основным ингибитором сериновых протеиназ плазмы крови человека.

Таблица 2. Наличие трипсиноподобной протеиназы и активность ее ингибитора в коммерческих иммунобиологических препаратах, выпускаемых фирмами зарубежных стран ( $n = 3$ )

Название препарата	Фирма, страна	Содержание белка, г белка/л водной суспензии	Активность протеиназы, ммоль арг/(мин · мг белка)	Активность ингибитора (ИА), у. е.
“Инфлувак”	“Solvay”, Нидерланды	16,34 ± 1,20	1,53 ± 0,14	180,86 ± 17,34
“Флюарикс”	“Смит Клейн”, Германия	9,60 ± 0,81	0,61 ± 0,054	96,52 ± 9,24
“Ваксигрип”	“Пастер”, Франция	2,92 ± 0,30	0,31 ± 0,03	101,73 ± 9,01
“Аваксим”	“Пастер”, Франция	14,73 ± 1,32	0,24 ± 0,02	8,924 ± 0,77
“Фраксипарин”	“Sanofi”, Франция	4,81 ± 0,42	0,28 ± 0,03	111,30 ± 10,24
“Солкосерил”	“Солко”, Швейцария	18,69 ± 1,70	0,26 ± 0,02	84,34 ± 8,27

Таблица 3. Активность трипсиноподобной протеиназы и содержание ее эндогенного ингибитора во фракциях отходов получения гаммаглобулина промышленным способом

Фракция	Показатель		
	Активность протеиназы, $\Delta E_{508}$	Содержание белка, г белка/кг отходов	Содержание ингибитора, мг ингибитора/кг отходов
II+III-глобулины, центрифугат	0,210 ± 0,02	4,262 ± 0,38	481,0 ± 23,4
Осадок протромбина	0,210 ± 0,02	2,167 ± 0,19	436,0 ± 16,3
Осадок $\alpha$ , $\beta$ -глобулины и липоиды	0,250 ± 0,02	4,381 ± 0,42	469,0 ± 18,4
IV осадок (альбумин + другие белки)	0,157 ± 0,01	3,270 ± 0,31	137,0 ± 6,1
Фильтрат (альбумин)	0,120 ± 0,01	4,800 ± 0,45	166,0 ± 8,5

На его часть в норме приходится 90 % антитрипсиновой активности плазмы крови человека [10].

В отходах II стадии очистки гаммаглобулина содержалось большое количество  $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулинов и липоидов. Активность трипсиноподобной протеиназы в этих отходах была самой высокой. Содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ составляло 469,87 мг/кг. В данном материале выявлен протромбин 3 (АТ-3), он же фактор гепарина — регулятора свертывания системы крови. В зоне  $\alpha$ -глобулинов обнаружены также  $\alpha_1$ -антитрипсин и  $\alpha_2$ -макроглобулин, которые являются основными ингибиторами сериновых протеиназ крови человека.

На III стадии промышленного получения гаммаглобулина в отходы идет осадок, содержащий профибринолизин (плазминоген), из которого выделяют плазминоген, который является протеолитическим ферментом (трипсиноподобная протеиназа). Содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ в отходах этой стадии получения гаммаглобулина составляло 137,40 мг/кг, что в четыре раза меньше, чем после I и II стадий.

На IV стадии получения гаммаглобулина после фильтрации супернатанта № 3 (заводской номер) на бумажных фильтрах оставалось большое количество трипсиноподобной протеиназы и 166,37 мг/кг ингибитора.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что сырьем для получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ могут быть отходы I и II стадий технологического процесса промышленного выделения гаммаглобулина, которые содержали наибольшее количество этого ингибитора.

Разработка способа получения ингибитора в очищенном виде включала следующие этапы: экстракцию фермента, ультразвуковую дезинтеграцию отходов, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, диализ, аффинную хроматографию на трипсин-сефарозе 4В и лиофильное высушивание. Ионообменную хроматографию проводили в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,5). Линейный градиент создавали в интервале 0–0,1 М NaCl на этом же буфере.

Нами установлено, что в отходах I стадии промышленного получения гаммаглобулина содержалось пять изоформ ингибитора трипсиноподобных протеиназ, которые отличались между собой как зарядом, так солерастворимостью. Наибольшее количество ингибитора трипсиноподобной протеиназы содержалось в пятой изоформе, которая элюировалась с колонки 0,5 М NaCl, а наименьшее — в четвертой и третьей изоформах, которые элюировались с колонки 0,2 и 0,1 М NaCl [11]. Эти отличия могут быть обусловлены различием в аминокислотном составе и большим количеством форм данного ингибитора. Пятую изоформу, которая обладала самой высокой активностью ингибитора, в дальнейшем использовали для изучения терапевтических свойств при экспериментальном гриппе у белых мышей.

Кроме того, с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе из отходов IV стадии промышленного получения гаммаглобулина (метод Кона) в хроматографических фракциях выявлено девять изоформ, которые обладали ингибирующей активностью по отношению к трипсиноподобным протеиназам. Пять изоформ (I–V), которые обладали ингибирующей активностью, элюировались с колонки с основными белками 0,1 М NaCl фосфатным буфером, рН 7,5.

Четыре изоформы (VI–IX), которые обладали ингибирующей активностью по отношению к трипсиноподобным протеиназам, элюировались с колонки линейным градиентом — 0,01–1,0 М NaCl. Анализ ингибирующей активности показал, что наибольшей активностью

обладала пятая изоформа ингибитора (180,13 у.е.), а наименьшей — первая (83,3 у.е.). Наибольший выход белка установлен для шестой изоформы ингибитора, а наименьший — для пятой изоформы. Эти результаты свидетельствуют о том, что наибольшей удельной активностью обладала пятая изоформа ингибитора.

Методом ионообменной хроматографии ингибиторы трипсиноподобных протеиназ были очищены от балластных белков в среднем на 99,9%. Четыре изоформы ингибитора (V, VI, VII и IX), которые обладали максимально высокой ингибирующей активностью, в дальнейшем использовали для изучения терапевтических свойств при экспериментальной гриппозной инфекции у мышей.

Для изучения защитного действия ингибиторов трипсиноподобных протеиназ на выживаемость мышей, зараженных смертельной дозой вируса гриппа А/PR/8/34, были использованы белые мыши линии “Balb<sub>c</sub>” массой 16–18 г и пятая изоформа ингибитора, выделенного из отходов I стадии промышленного получения гаммаглобулина, потому что она имела самую высокую активность ингибитора (132,52 у.е.) и низкие показатели активности трипсиноподобной протеиназы (0,0027 ммоль/(мин · мг белка в пробе)). По результатам исследований (табл. 4), животные 1-й и 2-й групп погибли на 6–7-е сутки после инфицирования вирусом гриппа. В 3-й группе из 15 животных на 14-е сутки после заражения и лечения выжило 12 особей (80 %).

Животные 4, 5, 6 и 7-й групп оставались живыми в течение всего срока наблюдения. Кроме того, установлено, что пятая изоформа ингибитора не оказывала токсического действия, потому что белые мыши 4-й группы оставались живыми и на 15-е сутки после введения ингибитора.

Для изучения защитного действия ингибиторов трипсиноподобных протеиназ, выделенных из отходов IV стадии получения гаммаглобулина методом Кона, были изучены четыре фракции (№ 77, 107, 117, 166) после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, которые имели высокие показатели содержания ингибитора и в которых почти не определялась активность трипсиноподобной протеиназы. Белые мыши были разделены на шесть групп по пять особей в каждой. Животных заражали интраназально вирусом гриппа А/PR/8/34 в объеме 0,05 мл, в дозе 1 : 4 гемагглютинирующей активности. Как показа-

Таблица 4. Влияние пятой изоформы ингибитора трипсиноподобных протеиназ на выживаемость мышей, зараженных смертельной дозой ( $2,5^{-2}$  ЛД<sub>50</sub>) вируса гриппа А/PR/8/34

Группа	Количество животных в группе	Доза вируса	Доза ингибитора на мыш, мкг белка	Количество мышей		Количество животных, которые выжили, %
				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

ли результаты исследований, на 14-е сутки после инфицирования гемагглютинирующая активность отмечалась как в легких, так и в сыворотке крови всех животных, которых предварительно заражали вирусом гриппа А/PR/8/34.

Таким образом, ингибиторы трипсиноподобных протеиназ, которые были выделены из отходов IV стадии промышленного получения гаммаглобулина, не обладали защитным эффектом при экспериментальном гриппе. Пятая изоформа ингибитора трипсиноподобных протеиназ, выделенных из отходов I стадии промышленного получения гаммаглобулина, имела выраженные противовирусные свойства. Не исключено, что эта изоформа может быть использована не только для лечения гриппа, но и при других вирусных инфекциях, в которых расщепление белка-предшественника вирусов проводится клеточными трипсиноподобными протеиназами.

Следовательно, полученные данные подтверждают выдвинутую нами протеиназно-ингибиторную теорию патогенеза гриппа, причем дают основания для разработки новой методики лечения гриппа и профилактики его осложнений.

1. *Онищенко В. В., Зверев В. В., Катлинский А. В. и др.* Тетравакцина – новый принципиальный подход к предотвращению пандемии гриппа // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2007. – № 4. – С. 15–16.
2. *Грипп и другие вирусные респираторные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия* / Под ред. О. И. Киселева, А. А. Сомининой, И. Г. Маринича. – Москва: Боргес, 2003. – 244 с.
3. *Актуальні питання вакцинації в Україні: Постанова № 3 Засідання Вченої медичної ради МОЗ України від 24 листопада 2009 року.*
4. *Ленева И. А., Федякина И. Т., Гуськова Т. А. и др.* Чувствительность различных штаммов вируса к арбидолу. Изучение эффекта арбидола на репродукцию вируса гриппа А в комбинации с разными противовирусными препаратами // Терапевт. архив. – 2005. – № 8. – С. 84–88.
5. *Дивоча В. А., Михальчук В. М.* Традиційні та перспективні підходи до профілактики грипу // Вісн. наук. досліджень. – 2008. – № 3 (52). – С. 4–6.
6. *Ferraris O., Kessler N., Lina B.* Sensitivity of influenza viruses to Zanamivir and Oseltamivir: study performed on viruses circulating in France prior the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice // Antiviral Res. – 2005. – 68. – P. 43–48.
7. *Дивоча В. А., Михальчук В. М., Гоженко А. И.* Молекулярно-биологическое обоснование антипротеиназной терапии гриппа // Журн. АМН України. – 2009. – 15, № 1. – С. 19–21.
8. *Divocha V. P., Mikhalechuk V. M., Gozhenko A. I. et al.* Serynopodobne proteiny w niektórych procesach fizjologicznych // Biomedyczne aspekty turystyki i rekreacji. WWSTiZ, WSG. ORSE. – Poznac: Bydgoszcz, 2009. – С. 198–204.
9. *Дивоча В. А., Михальчук В. Н., Гоженко А. И. и др.* Трипсиноподобная протеиназа и ее ингибиторы в вакцинах и иммунологических препаратах крови // Журн. АМН України. – 2009. – 15, № 3. – С. 609–625.
10. *Михальчук В. Н., Дивоча В. А., Гоженко А. И.* Наявність трипсиноподібної протеази та її інгібіторів у відходах отримання гаммаглобуліну // Мед. хімія. – 2006. – 8, № 1. – С. 60–63.
11. *Дивоча В. А., Михальчук В. Н., Гоженко А. И.* Трипсиноподобные протеиназы – мишень для создания противовирусных препаратов // Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. работ. – Минск, 2008. – Вып. 1. – С. 123–126.



V. A. Divocha, A. I. Gozhenko, V. M. Mikhalchuck

**The role of proteinases of blood and their inhibitors in the mechanisms of anti-influenza defense**

*The presence of the trypsin-like proteinases and their inhibitors in the blood of human donors, in industrial wastes of gamma-globulin, in commercial domestic preparations (immunoglobulin, interferon, vaccine for herpes and tularemia), in foreign preparations (anti-influenza vaccine — Influvac, Vaxigrip, Fluarix, vaccines for hepatitis A — Avaxim; preparations from blood — Fraxiparine, Solcoseryl) is studied. From the industrial wastes of the gamma-globulin production, an isoform of trypsin-like proteinases with protective activity at infection of experimental animals with a lethal dose of A/PR/8/34 (A/H1N1) grippe is selected.*