

УДК 613. 22:517. 156:576. 858/8.0947

ПРОТЕИНАЗНО-ИНГИБИТОРНАЯ ТЕОРИЯ ПАТОГЕНЕЗА ГРИППА И ЕЕ РОЛЬ В УСОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ЕГО ЛЕЧЕНИЯ

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

Украинский НИИ медицины транспорта МЗ Украины, Одесса

Ключевые слова: грипп, трипсиноподобные протеиназы, ингибиторы протеиназ, очистка вируса, противовирусные препараты.

Введение

В течение последних 10 лет существенно изменилось представление о роли протеолитических ферментов в организме. Стало очевидным, что протеолиз является особой формой биологического контроля [25, 26, 29, 33, 45]. Анализ обширного материала показал, что ограниченный протеолиз служит пусковым механизмом многих биологических процессов и обеспечивает быстрый физиологический ответ организма на меняющиеся условия или поступающий извне сигнал [1-3, 19, 34].

С биологией возбудителей вирусных заболеваний связаны трудности в направленном создании препаратов избирательного противовирусного действия. Достижения биохимии и молекулярной биологии последних лет, раскрывающие особенности репродукции вирусов, обеспечивают создание новых подходов направленного вмешательства в цикл вирусной репродукции [5, 18, 32, 35].

Протеолитическая активация широко распространена среди вирусов разных таксономических групп. У пикорна и тогавирусов расщепление белка-предшественника является основным механизмом, приводящим к образованию функциональных белков. Протеолитическая активация есть у большинства других вирусов и касается, в основном, вирусных гликопротеидов, осуществляющих

функции адсорбции и слияния. В результате ограниченного протеолиза белковая молекула расщепляется на две субъединицы, как например гемагглютинин вируса гриппа, либо от нее отщепляется небольшой фрагмент, как, например, у обоих гликопротеидов парамиксовирусов, HN и F [14, 49, 21].

Протеолитическая активация является высоко специфическим процессом, осуществляемым определенными протеиназами клеточного или вирусного происхождения [40-44, 48]. Так, протеолитическую активацию вирусов гриппа и парамиксовирусов осуществляют трипсиноподобные протеиназы клетки, которые гидролизуют пептидную связь между аргинином и лизином. Химотрипсин и гемолизин расщепляет белок-предшественник со сдвигом на 3 и 1 аминокислоту соответственно, и при этом протеолитическая активация не происходит, и слияние вириона с клеткой не происходит [38, 39].

Белки слияния вирусов гриппа и парамиксовирусов активизируются многими протеиназами. И те, и другие протеиназы находятся в хорионлантаноисной жидкости куриного эмбриона, но при фракционировании ее могут быть разделены [22]. Для максимального расщепления гемагглютинина вируса гриппа и F-белка вируса Сендай *in vitro* требовалось около 4 часов инкубации при $t +37^{\circ}\text{C}$.

Протеолитическая активация явля-

ется важным событием в инфекционном цикле вирусов. 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. Повидимому, свойства вируса поражать определенные ткани организма определяются наличием в органах и тканях ферментов, необходимых для протеолитической активации вирусного потомства.

Значение протеолитической активации в инфекционном процессе, ее универсальность для ингибиторов протеолиза является предпосылкой для использования ее в качестве мишени с целью лечения вирусной инфекции. Такой подход к терапии вирусных заболеваний открывает перспективу для создания препаратов широкого противовирусного спектра действия, поскольку для определенных вирусов можно подобрать специфические ингибиторы протеолиза, эффективно блокирующие протеолитический процессинг. Сейчас протеолитическими ферментами интересуются практически во всех областях медицины. Это связано с тем, что в настоящее время известен целый ряд заболеваний, в патогенезе которых задействованы протеиназы.

Цель исследования – изучить состояние и роль антипротеиназных систем вируса и реципиента в развитии гриппозной инфекции для получения и использования принципиально новых лечебных препаратов на основе ингибиторов трипсиноподобных протеиназ.

Задачи исследования:

1. Очистить вирус гриппа до гомогенного состояния.
2. Изучить природу протеиназы, ассоциированной с вирусом гриппа.
3. Изучить роль протеиназ и их ингибиторов на разных, особенно ранних

стадиях развития гриппозной инфекции.

4. Выделить и очистить протеиназу и ее ингибитор из легких здоровых и зараженных вирусом гриппа мышей.
5. Получить специфические антитела к изоформам трипсиноподобной протеиназы и изучить их защитное действие при гриппе в эксперименте.
6. Изучить защитное действие клеточного ингибитора при заражении животных смертельной дозой вируса гриппа.
7. Определить биоматериал для получения ингибитора протеиназ, обладающего противовирусным свойством.
8. Изучить наличие трипсиноподобных протеиназ в промышленных отходах получения гамма-глобулина.
9. Выделить ингибитор трипсиноподобных протеиназ из отходов промышленного способа получения гамма-глобулина.
10. Изучение защитных свойств ингибиторов трипсиноподобных протеиназ, полученных из отходов сыровоточного производства.

В начале 80-х годов, при очистке и концентрации разных штаммов вируса гриппа для получения поливалентных противогриппозных вакцин мы впервые столкнулись с тем, что не можем освободить вирус гриппа от протеолитической активности (рис. 1.) [6]. Для решения данного вопроса мы усовершенствовали методы очистки, однако освободить вирус гриппа от протеолитической активности нам не удалось.

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. В градиенте сахарозы (15-60%) протеолитическая активность четко разделилась на несколько

изоформ (табл. 1) [7].

Полученные результаты позволили нам сделать вывод, что с вирусом гриппа ассоциирована серинсодержащая протеиназа трипсиноподобного типа клеточного происхождения, которая имеет молекулярную гетерогенность.

В связи с тем, что мы не смогли освободить вирус гриппа от трипсиноподобной протеиназы, следующим этапом была проверка зарубежных противогриппозных вакцин на наличие в их составе трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора, т.е. выяснить вопрос – как они очищают вирус гриппа до гомогенного состояния?

Как показали исследования, результаты которых представлены в таблице 2, все коммерческие препараты, выпущенные зарубежными фирмами, содержали как ингибитор, так и трипсиноподобную протеиназу.

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

Таблица 1

Очистка вируса гриппа АО/32 в градиенте сахарозы и ультрацентрифугировании при 28000 мин⁻¹, 4 часа

| Фракции сахарозного градиента | Опыты | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------|--------|-------------------|------------|--------|-------------------|------------|---------|-------------------|------------|-----|-------------------|
| | 1 ВСЖ | | | 2 ВСЖ | | | 3 ВСЖ | | | 4 НАЖ | | |
| | % сахарозы | РГА | протеиназа, мг/мл | % сахарозы | РГА | протеиназа, мг/мл | % сахарозы | РГА | протеиназа, мг/мл | % сахарозы | РГА | протеиназа, мг/мл |
| 1 | 5 | 0 | 1,6 | 3 | 0 | 1,5 | 6 | 0 | 2,6 | 6 | 0 | 0,58 |
| 2 | 15 | 1:8 | 36 | 11 | 1:2 | 13,6 | 15 | 1:8 | 41,3 | 17 | 0 | 1,01 |
| 3 | 32 | 1:16 | 9,6 | 24 | 1:16 | 8,2 | 23 | 1:16 | 0,45 | 27 | 0 | 0,37 |
| 4 | 42 | 1:2048 | 33,6 | 24 | 1:16 | 10,2 | 30 | 1:64 | 0,9 | 29 | 0 | 0,59 |
| 5 | 49 | 1:2048 | 4,4 | 38 | 1:512 | 25,4 | 37 | 1:512 | 13,8 | 37 | 0 | 0,80 |
| 6 | 52 | 1:64 | 37 | 41,5 | 1:1024 | 26,2 | 44 | 1:16000 | 38 | 41 | 0 | 1,43 |
| 7 | 55 | 1:64 | 37,4 | 46,5 | 1:512 | 12,2 | 47 | 1:16000 | 3,29 | 49 | 0 | 0,64 |
| 8 | 57 | 1:62 | 6,8 | 53 | 1:16 | 7,9 | 51 | 1:256 | 0,3 | 53,5 | 0 | 1,28 |
| 9 | | | | | | | 57 | 1:512 | | 56 | 0 | 1,08 |

Примечание: РГА - реакция гемпгглютинации;
 ВСЖ – вирус содержащая жидкость;
 НАЖ – нормальная аллантаиновая жидкость

Таблица 2

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

| № п/п | Наименование препарата | Фирма, страна | Белок, г/л | Протеиназа, мкмоль аргинина/мл за 1 мин. | Ингибитор, г/л |
|-------|------------------------|-----------------------|----------------|--|----------------|
| 1. | Инфлувак | Solvay, Нидерланды | 163,4 ± 12,02 | 1,53 ± 0,14 | 180,86 ± 17,34 |
| 2. | Флюарикс | Смит, Клейн, Германия | 96,00 ± 8,09 | 0,61 ± 0,054 | 96,52 ± 9,24 |
| 3. | Ваксигрип | Пастер, Франция | 29,20 ± 3,02 | 0,31 ± 0,03 | 101,73 ± 9,01 |
| 4. | Аваксим | Пастер, Франция | 147,31 ± 13,21 | 0,24 ± 0,02 | 8,924 ± 0,77 |
| 5. | Фраксипарин | Sanoft, Франция | 48,17 ± 4,18 | 0,28 ± 0,03 | 111,30 ± 10,24 |
| 6. | Солкосерил | Солко, Швейцария | 4569 ± 412,26 | 0,26 ± 0,02 | 84,34 ± 8,27 |

Система протеиназ и ингибиторов представлена в организме большой группой белков. Ингибиторы протеолитических ферментов выполняют роль постоянного уровня соответствующих ферментов в организме, находятся с последними в постоянном динамическом равновесии [20, 23, 31, 47]. Нарушение между ферментами и ингибиторами имеет значение для развития патологических процессов [24].

Проведенные нами исследования показывают, что в легких и сыворотке крови незараженных животных и куриных эмбрионах уровень протеиназной активности и ингибирующей протеиназу активности находятся в равновесии, ко-

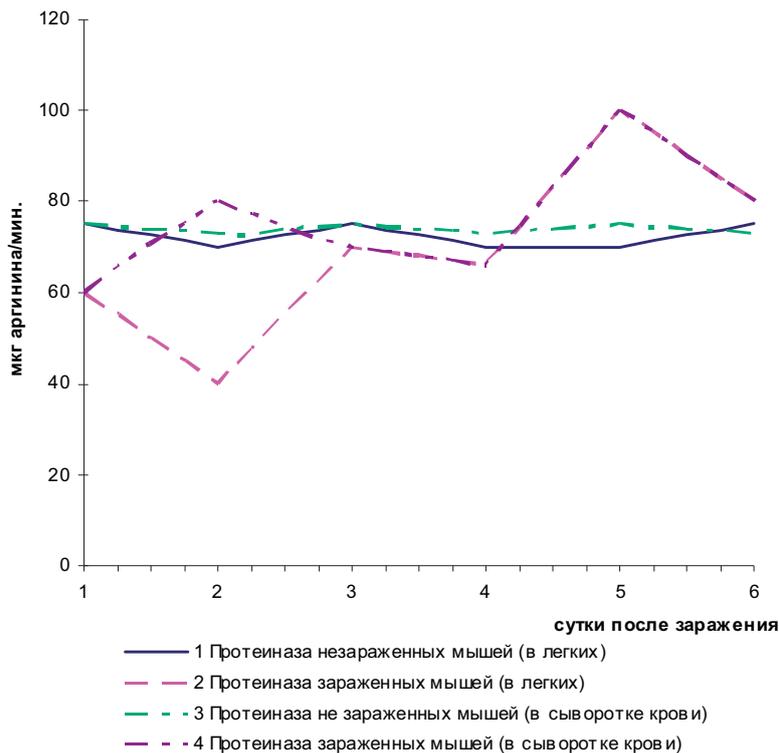


Рис. 1. Динамика изменения протеиназной активности в легких и сыворотке крови белых мышей, зараженных вирусом гриппа A/PR/8/34 в течении 6 суток (представлены суммарные данные опытов с мышами массой 6-9 г и 16-17 г).

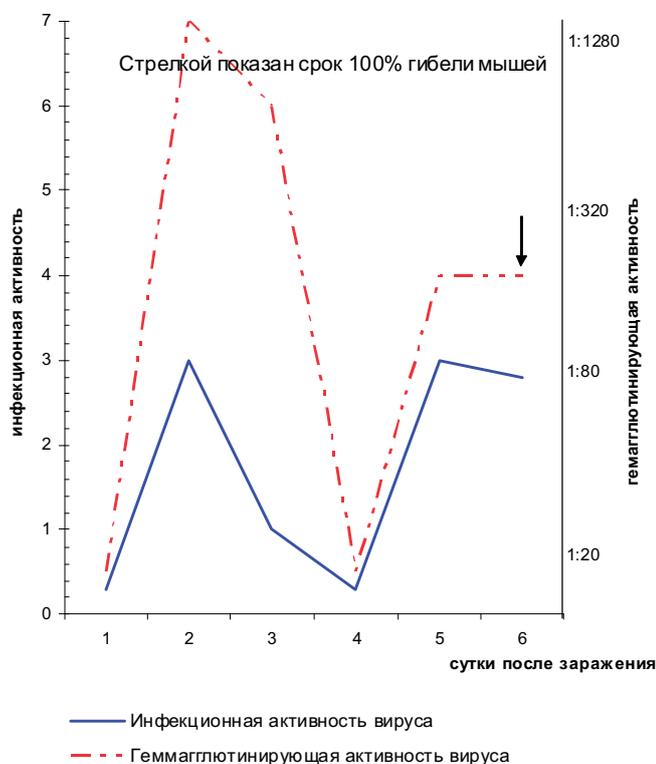


Рис. 2. Инфекционная и гемагглютинирующая активность гомогената легких белых мышей, зараженных вирусом гриппа A/PR/8/34 в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов.

торое нарушается при заражении вирусом гриппа А.

В инфекционном процессе наиболее глубокие изменения происходят в первые часы после заражения (рис. 2). Так, через 6 часов после заражения снижается количество протеиназы в легких и в сыворотке зараженных животных и возрастает ингибирующая активность [18]. Зараженные вирусом гриппа клетки индуцируют появление ингибитора как в легочной ткани, так и в сыворотке крови. Следовательно, ингибиторы легких являются как бы первой линией обороны органа при действии различных штаммов вируса гриппа.

При изучении динамики протеиназной и ингибирующей активности в куриных эмбрионах под действием больших и малых заражающих доз вируса гриппа A/PR/8/34 установлено, что в них происходили аналогичные изменения, как и в организме белых мышей (рис 3.) В период максимального накопления инфекционной и гемагглютинирующей активности (24 часа) не обнаруживалась ни протеиназная, ни ингибирующая активность [9].

Из легких здоровых мышей было выде-

Таблица 3 летальной дозой вируса гриппа А/PR/8/34 (IV пассаж), было установлено, что 100% гибель контрольных мышей наступала на 4-5 сутки (табл. 4). Животные, которым шесть раз закапывали нормальную крысиную сыворотку, погибли на 7-е сутки. При ле-

Очистка на ДЭАЭ -целлюлозе трипсиноподобной протеиназы из легких незараженных мышей

| Номера фракций | Номера изоформ | Удельная протеолитическая активность на мг белка | % выхода протеиназы | % очистки по белку |
|----------------|----------------|--|---------------------|--------------------|
| 33 | I | 4,285 | 2,09 | 96,8 |
| 53 | II | 83,75 | 5,84 | 99,07 |
| 65 | III | 22,42 | 2,703 | 98,38 |
| 75 | IV | 40,00 | 6,279 | 97,92 |
| 121-130 | V | 32,6 | 136,74 | 99,98 |
| 161-189 | VI | 0,787 | 421,74 | 64,90 |

лено, методом ионообменной хроматографии 6 изоформ трипсиноподобной протеиназы, а из легких зараженных мышей – 8 изоформ, у которых удельная протеолитическая активность резко возрас- тала по сравнению с исходным мате- риалом (табл. 3). Полученные изоформы протеиназ обладали широкой субстрат- ной специфичностью и были способны гидролизовать субстраты как природно- го, так и синтетического происхождения [15].

Ко всем изоформам трипсинопо- добных протеиназ были получены анти- протеиназные гипериммунные крысиные сыворотки. При изучении защитных свойств антипротеиназных сывороток и нормальной крысиной сыворотки на бе- лых мышях, зараженных интраназально,

в лечении мышей пулами иммунных сыворо- ток I, II, IV, V и VI группы смертность жи- вотных снижалась и наступала суще- ственно позже, чем в контрольной груп- пе, 20% животных не погибло, а выздо- равливало [16].

Наиболее эффективным явился чет- вертый пул иммунной сыворотки к III-й изоформе, в присутствии которого вы- живало 60% зараженных мышей, и на 14 день после заражения в сыворотке кро- ви и в легких мы не обнаруживали ни ге- магглютина, ни инфекционного вируса.

Иммунная сыворотка к VI-й изофор- ме вообще не защищала мышей от гibe- ли, хотя III-я изоформа от VI-й отличалась только одним белком, с молекулярной массой 32 кДа [17].

Таблица 4

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

| № гр. | Изоформы протеиназ | Группа сы- вороток | Срок после заражения (сутки) | | | | | | | | | | | | оста- лись живы | % вы- живае мости | |
|-------|--|--------------------|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------|-------------------|-----|
| | | | 6 ч | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 14 | | | |
| 1 | I | I | | | | | | 2/10 | | | 2/10 | 2/10 | 2/10 | | | 2 | 20 |
| 2 | I | II | 2/10 | 2/10 | | 4/10 | | | | | | | | | | 2 | 20 |
| 3 | II | III | | | 2/10 | | | 2/10 | | 2/10 | | | 2/10 | | | 2 | 20 |
| 4 | III | IV | | | | | | 2/10 | | | | 2/10 | | | | 6 | 60 |
| 5 | IV | V | | | 2/10 | | 2/10 | 2/14 | | | | | | | | 2 | 20 |
| 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 без сыво- ротки | | | | | | 2/10 | 6/10 | | | | | | | | 0 | 0 |
| 8 | Нормальная кры- синая сыворотка | | | | | | 2/10 | 3/10 | | 5/10 | | | | | | 0 | 0 |
| 9 | Иммунная сыво- ротка IV гр. без вируса (токсич- ность) | | 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.

Из легких здоровых мышей нами был выделен ингибитор трипсиноподобных протеиназ с молекулярной массой 47,5 кДа, с высокой степенью чистоты и незначительным количеством примесей. Разработана и запатентована методика получения и очистки ингибитора трипсиноподобных протеиназ [10]. Выделенный ингибитор похож на α_1 -ингибитор протеиназ сыворотки крови человека (м.м. 48-55 кДа) и ингибитор трипсина из яичного белка (м.м. 49 кДа), но не похож на ингибитор трипсина выделенный из легких крупного рогатого скота (ингибитор типа Кунитца-Нортропа), который имел молекулярную массу 65 кДа. При изучении его действия на протеолитическую активность изоформ трипсиноподобных протеиназ пробирочным методом, выяснилось, что он подавлял активность почти всех изоформ, за исключением четвертой (41,8 %) и восьмой (28,3 %).

В наших исследованиях [12] при использовании 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 протеиназ, выделенный из легких мышей, предварительно зараженных вирусом гриппа, не обладал данной способностью. В дальнейших исследованиях [11] для лечения гриппозной инфекции у животных мы использовали ингибитор, который выделяли из легких здоровых мышей. Введение этого ингибитора мышам, предварительно зараженных летальной дозой вируса гриппа, снижало процент гибели от этой болезни вследствие торможения рас-

Действие клеточного ингибитора трипсиноподобных протеиназ на выживаемость мышей, зараженных летальной дозой вируса гриппа A/PR/8/34

| № Название группы | Кол-во животных в группе | Доза вируса в группе | Доза ингибитора на мышь по белку | Количество животных | | % защищенных от вируса животных |
|--|--------------------------|----------------------|----------------------------------|---------------------|--------|---------------------------------|
| | | | | пало | выжило | |
| 1. Вирус гриппа | 40 | 10^{-3} | - | 40 | - | 0 |
| 2. Вирус гриппа + трипсин кристаллический | 40 | 10^{-3} | 18 мкг | 40 | - | 0 |
| 3. Вирус гриппа + ингибитор из здоровых легких | 40 | 10^{-3} | 18 мкг | 7 | 33 | 82,5 |
| 4. Клеточный ингибитор | 40 | 10^{-3} | 18 мкг | - | 40 | 100 |
| 5. Трипсин кристаллический | 10 | - | 18 мкг | - | 10 | 100 |
| 6. Фосфатный буфер | 10 | - | 0,2 мл | - | 10 | 100 |

щепления НА при репродукции вируса в легких, недопущения генерализации процесса, а также в результате предотвращения повышения протеолиза в легких, предупреждения аэрогематического барьера и усиления некоторых реакций местной защиты (табл. 5).

Для получения противовирусного препарата, который бы обладал наименьшей аллергенностью для человека, мы использовали отходы донорской крови, идущие для выделения гамма-глобулина и альбумина (рис. 4).

На первом этапе получения гамма-глобулина и альбумина из фракции II+III по Кону осаждается фибриноген, который утилизируется. По нашим исследованиям отходы содержат 481,11 мг ингибитора трипсиноподобных протеиназ на килограмм веса. В этом центрифугате находится α_1 – антитрипсин, который является основным ингибитором сериновых протеиназ плазмы крови человека.

На его долю в норме приходится 90% антитрипсиновой активности плазмы крови человека [36].

На II-й стадии получения гамма-глобулина на утилизацию идет осадок содержащий протромбин, α - и γ -глобулины и липоиды. В этом осадке, по нашим результатам [28], содержится 469,87 мг

Таблица 5

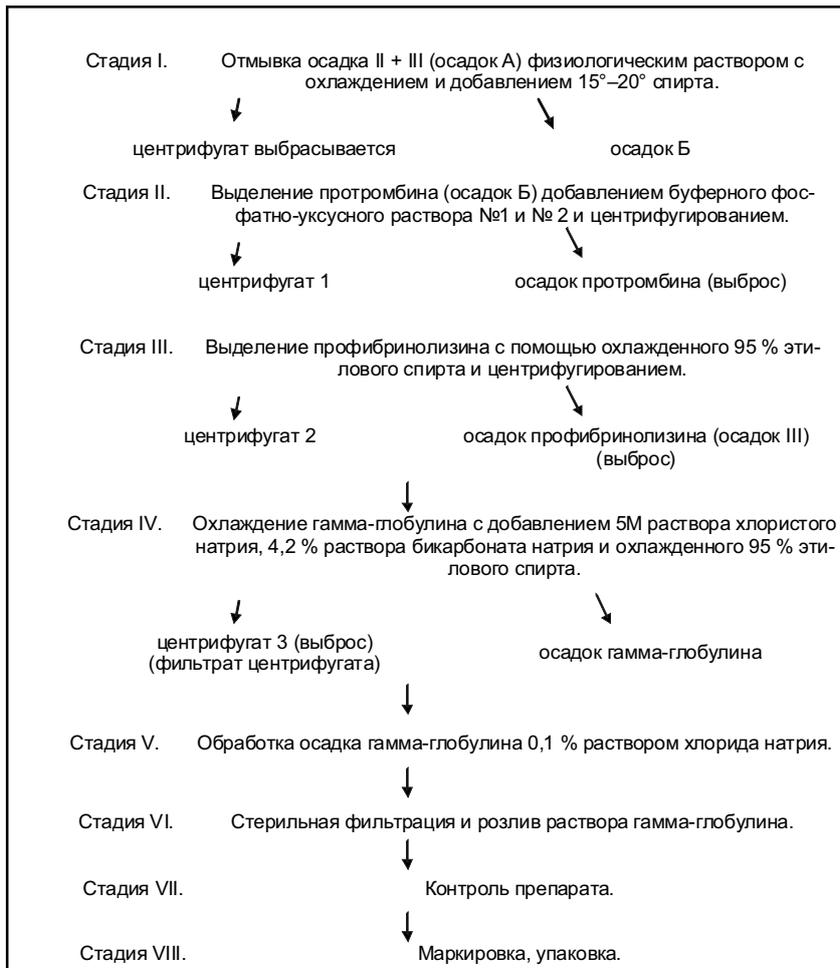


Рис. 4. Схема технологического процесса выделения гамма-глобулина из донорской крови человека методом Кона.

ингибитора трипсиноподобных протеиназ на килограмм массы. В этот осадок входит антитромбин-3 (АТ-3) или фактор гепарина – регулятор свертывающей системы крови. По данным О. А. Маркова и соавт. [27], в норме содержание АТ-3 у доноров варьировало от 160 до 250 мкг/мл. В зону α -глобулинов входит также α_1 -антитрипсин и α_2 -макроглобулин [27, 30].

На третьей стадии получения гамма-глобулина в отходы идет осадок содержащий профибринолизин (плазминоген). В отходах этой стадии, по нашим данным, содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ составляет 137,40 мг на килограмм массы.

На четвертой стадии при осаждении гамма-глобулина на утилизацию идет центрифугат №3. По нашим данным, в

материале центрифугата № 3 содержится 166,37 мг ингибитора трипсиноподобных протеиназ.

Таким образом, сырьем для получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ могут служить отходы после первой и второй стадии технологического процесса, при которых идет отмывка осадка II+III и выделение протромбина. Эти отходы содержат самое большое количество ингибитора трипсиноподобных протеиназ.

Для выделения ингибитора трипсиноподобных протеиназ использовали отходы I-й стадии (II+III) получения гаммаглобулина из донорской крови человека, которые содержали значительное количество

данного ингибитора. Из центрифугата (отходы) фракции (II+III) первой стадии получения гаммаглобулина методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-53 целлюлозе (фирма Watman, США) мы выделяли ингибитор трипсиноподобных протеиназ (рис 5.)

Данный способ позволил получить 5 изоформ, обладающих ингибиторной активностью (рис. 6). Первые две изоформы, в которых было зарегистрировано высокое содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ, элюировали с ионообменной колонки 0,1 М фосфатным буфером pH 7,5. Следующие три изоформы, содержащие ингибитор трипсиноподобных протеиназ, элюировали ступенчатым градиентом NaCl разной молярности: третья изоформа – 0,1 М NaCl, четвертая изоформа – 0,2 М NaCl, пятая изоформа – 0,5 М NaCl. Объемы

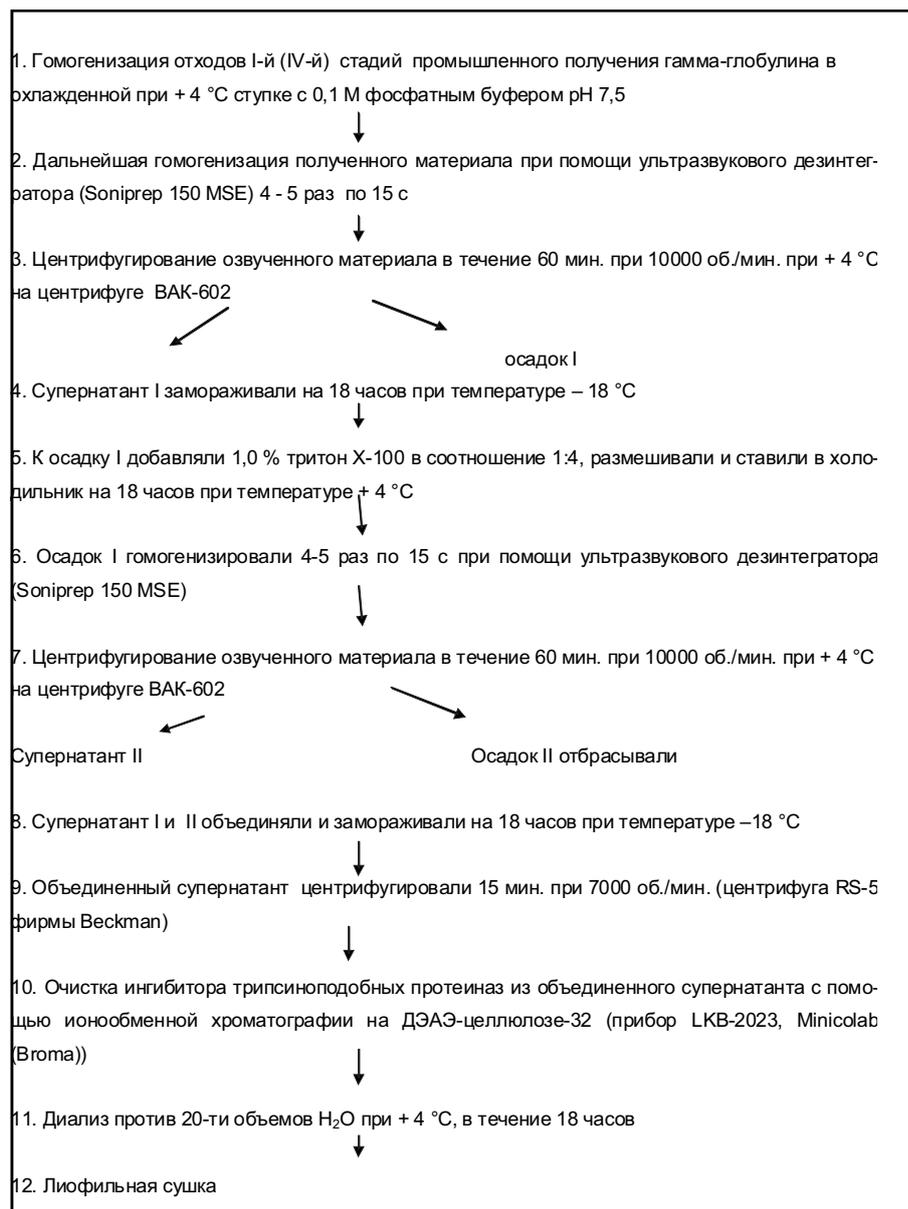


Рис. 5. Схема получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ из отходов промышленного выделения гамма-глобулина.

элюатов изоформ были соответственно: I-й – 35 мл, II-й – 195мл, III-й – 340 мл, IV-й – 440 мл, V-й – 605мл.

Наибольшее содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ было зарегистрировано во фракции V-й изоформы, которая последним элюировалась с колонки 0,5 М NaCl, а наименьшее – в IV-й и III-й изоформах, которые элюировались с колонки 0,2 и 0,1 М NaCl, соответственно.

Трипсиноподобная протеиназа играет ключевую роль в развитии патологического процесса в организме (рис 7).

Она расщепляет наружный белок вируса гриппа – гемагглютинин на две субъединицы: HA₁ и HA₂. Только после расщепления гемагглютинина этой протеиназой, вирус проникает в клетку и начинает размножаться. Ингибиторы блокируют процесс расщепления вирусных белков путем подавления активности клеточных энзимов.

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. Дочерние вирионы не способны инициировать инфекционный процесс в связи с бло-

ком ранних стадий цикла репродукции – адсорбции и проникновения вируса [37, 46].

Для изучения защитного действия ингибитора трипсиноподобных протеиназ на выживаемость мышей, зараженных смертельной дозой вируса гриппа A/PR/8/34, было взято 90 белых мышей линии «Balb_c» весом 16-18 гр. и пятая изоформа ингибитора протеиназ, выделенная из отходов первой стадии получения гамма-глобулина, так как она имела самые высокие показатели активности ингибитора (132,52 г/л) и низкие по-

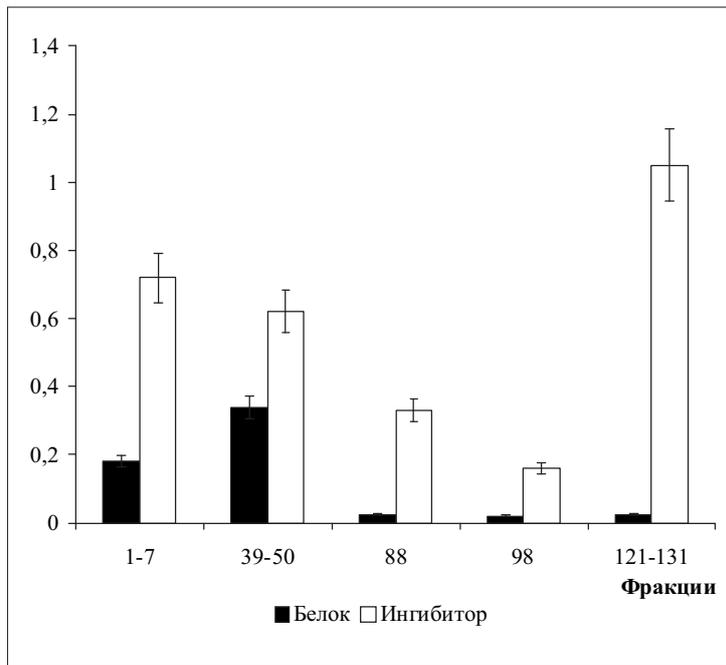


Рис. 6. Выделение и очистка ингибитора трипсиноподобных протеиназ из отходов I-й стадии (II+III) промышленного способа получения гамма-глобулина

казатели трипсиноподобной протеиназы (0,0027 мкмоль в пробе).

Мыши были разделены на 7 групп по 15 шт., в контрольных группах по 10 шт. (табл. 6.). Животные первой группы получали смертельную дозу вируса (контроль вируса). Вирус вводили интраназально в объеме 0,05 мл под рауш-нар-

козом. Вторая группа – аналогичную дозу вируса, но подвергались лечению 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 гамма-глобулина. Четвертая группа животных получала только ингибитор протеиназ из отходов (контроль ингибитора на токсичность). Пятой группе животных вводили только трипсин кристаллический (контроль трипсина), шестой – фосфатный буфер, на котором разводили вирус, ингибитор и трипсин. Седьмая группа – контроль интактных животных. Ингибитор и трипсин вводили интраназально под легким эфирным наркозом на протяжении семи суток. Каждая мышь получила по 140 мкг ингибитора за курс лечения.

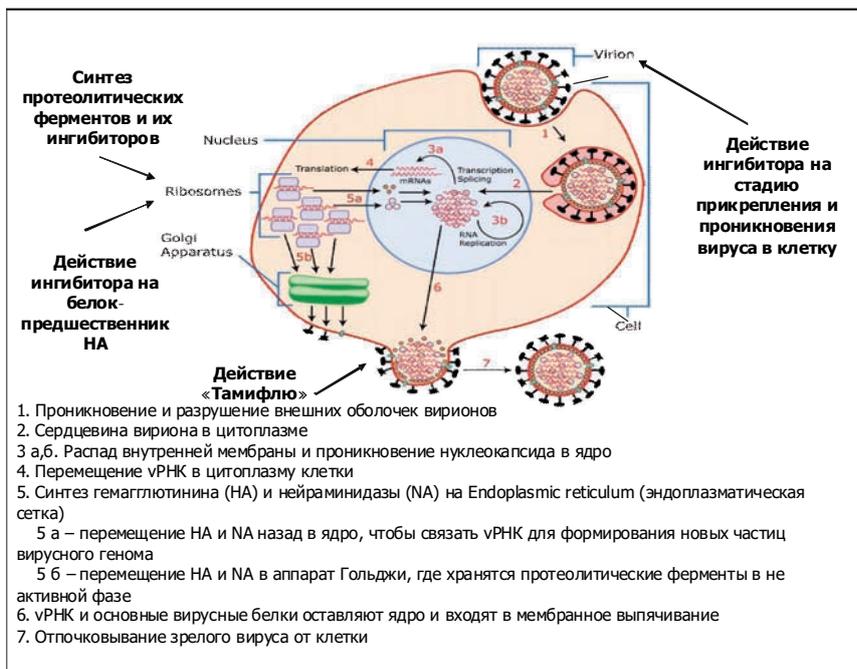


Рис. 7. Проникновение и расщепление вируса гриппа в клетке.

токсичности, так как белые мыши четвертой группы оставались живы и на 14 день после введения ингибитора.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что полученный из отходов первой стадии получения гаммаглобулина препарат ингибитора трипсиноподобных протеиназ обладал противовирусным свойством. Не исключено, что он может быть использован не только при гриппе, но и при других вирусных инфекциях, при которых расщепление белка-предшественника вирусов производится клеточными трипсиноподобными протеиназами [11].

Заключение

Нами предложена новая теория патогенеза гриппа с участием протеиназно-ингибиторной системы [13, 14].

1. Очистка и концентрация вируса гриппа методами центрифугирования, электрофореза в ПААГе и в градиенте сахарозы не освобождала вирус гриппа от белков с протеиназной активностью.
2. Протеиназа, ассоциированная с вирусом гриппа, является клеточным ферментом.
3. При заражении животных (белых мышей) вирусом гриппа А происходило нарушение ферментно-ингибиторного равновесия. Самые глубокие изменения происходили в первые часы после заражения.
4. Из легких незараженных мышей выделено шесть, а из зараженных вирусом гриппа – восемь изоформ, которые имели высокую протеолитическую активность.
5. Получены антипротеиназные иммунные сыворотки ко всем изоформам трипсиноподобных протеиназ и установлено снижение летальности мышей, зараженных смертельной дозой вируса гриппа, на 60 % только при действии антисывороток к третьей изоформе, выделенной из легких здоровых мышей.
6. Из легких здоровых мышей выделен ингибитор трипсиноподобных протеиназ, который блокировал развитие гриппозной инфекции у белых мышей в общей дозе 0,126 мкг/мышь.
7. Биоматериалом для получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ в качестве противовирусного препарата для человека могут быть промышленные отходы сывороточного производства.
8. Все отходы промышленного получения гамма-глобулина и альбумина содержали в своем составе большое количество ингибитора трипсиноподобных протеиназ, особенно в отходах после первой и второй стадий получения гамма-глобулина.
9. Из отходов первой стадии получения гамма-глобулина выделено несколько изоформ ингибитора трипсиноподобных протеиназ, из которых пятая изоформа ингибитора защитила белых мышей от смерти на 80 %.
10. Эндогенные ингибиторы протеиназ крови человека являются перспективными антигриппозными препаратами.

Литература

1. *Андреенко Г.В.* // М.: МГУ, 1979. 351 с.
2. *Антоняк Г. А., Бабич Н. О., Сологуб Л.И., Снітинський В.В.* // Укр. біохімі. журнал. 2000. Т. 72. № 6. С. 5-14.
3. *Антоняк Г.Л.* // Успехи совр. биологии. 1999. Т. 119. № 5. С. 475-485.
4. *Букринская А.Г.* // Сб. науч. тр. НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР. Ч. 1. М., 1983. С. 7-20.
5. *Бурцева Е.Н., Шевченко Е.С., Ленева И.А. и др.* // Вопр. вирусол. – 2007. Т. 52. № 2. С. 24-29.
6. *Дівоча В. А., Дегтяренко В.И., Зеваков В.Ф.* // Тезисы докладов 2-го съезда инфекционистов УССР. К., 1983. С. 36-38.
7. *Дівоча В.О.* // Одеський медичний журнал. 2003. № 1. С. 16-19.
8. *Дівоча В.О.* // Одеський медичний

- журнал. 1998. № 2 (46). С. 8-10.
9. *Дівоча В.О.* // Одеський медичний журнал. 2000. № 2. С. 100-105.
 10. *Дівоча В.А.* Спосіб одержання інгібітору трипсіноподібних протеаз // Пат. 23548 А Україна, МПК⁶ А 61 К 35/00. / заявник та патентодержатель Дівоча В. А. - № 97052520; заявл. 30.05.97; опубл. 02.06.98.
 11. *Дівоча В.А.* Інгібітор трипсіноподібних протеаз як антивірусний засіб // Пат. 37324 А Україна, МПК⁶ А 61 К 31/14. / опубл. 15.05.2001, Бюл. № 4.
 12. *Дівоча В.О., Мікелашвілі М.Т., Михальчук В.М.* // Інфекційні хвороби. 2001. № 2. С. 35-39.
 13. *Дівоча В. А., Михальчук В. Н., Гоженко А.И.* // Журнал АМН України. 2009. Т. 15. № 1. С. 19-21.
 14. *Дівоча В.А., Михальчук В.Н., Гоженко А.И. и др.* // Журнал АМН України. 2009. Т. 15. № 3. С. 609-625.
 15. *Дівоча В.О., Сова Ю.Г., Михальчук В.М.* // Медична хімія. 2001. Т. 3. № 3. С. 73-77.
 16. *Дівоча В.А., Сова Ю.Г., Мікелашвілі М.Т.* // Идеи И. И. Мечникова и развитие современного естествознания : науч. конф., 28-30 ноября 1995 г. : сб. науч. работ. Харьков, 1995. С. 102-103.
 17. *Дівоча В.О., Сова Ю.Г., Михальчук В.М.* // Медична хімія. 2001. Т. 3. № 4. С. 31-34.
 18. *Деребин П.Г., Каплина Э.Н., Носик Д.Н. и др.* // Мед. каф. 2006. № 1. С. 62-65.
 19. *Жанг Х., Чанг З.* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 6. С. 843-850.
 20. *Жданов В. М., Гайдамович С. Я.* // Частная вирусология: руководство, Т. 2. М., 1982. С. 139-185.
 21. *Жирнов О.П.* // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 1986. № 8. С. 3-8.
 22. *Жирнов О.П.* // Вопр. вирусол. 1980. № 5. С. 546-552.
 23. *Жебрун А. Б., Полянская Н. Ю., Носов Ф.С. и др.* // Этиология и специфическая профилактика гриппа. Л., 1982. С. 70-81.
 24. *Зорин Н.А., Зорина В.Н.* // ЖМЭИ. 2004. Т. 3. С. 105-112.
 25. *Локшина Л. А.* // Молекуляр. биология. 1979. Т. 3. № 6. С. 1205-1229.
 26. *Локшина Л.А. Соловьева Н.И., Орехович В.Н.* // Вопр. мед. химии. - 1987. № 38. С. 38-42.
 27. *Маркова О.А., Калашникова В.В., Хватова В.Б.* // Вопр. медицинской химии. 1989. № 5. С. 127-130.
 28. *Михальчук В.Н., Дівоча В.П., Гоженко А.И.* // Медична хімія. 2006. Т. 8. № 1. С. 60-63.
 29. *Мосолов В.В.* // 36-е ежегодное Баховское чтение. М.: Наука, 1983. С. 41.
 30. *Подярене С.М., Лецкене М.Н., Маурицае М.М. и др.* // Вопр. вирусол. 1989. № 5. С. 96-99.
 31. *Полянская Н.Ю., Жебрун А.Б.* // Хроматография в биологии и медицине: науч. конф., 1983 г. : тезисы докл. М., 1983. С. 249-250.
 32. *Савинова О.В., Павлова Н.И., Бореко Е.И.* // Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. тр. Вып. 1. Минск: Белпринт, 2008. С. 137-141.
 33. *Сологуб Л.И. Пашковская И.С., Антоняк Г.Л. К.*: Наукова думка, 1992. 194 с.
 34. *Сологуб Л.И., Пашковская И.С., Сухорская А.И., Антоняк Г.Л.* // Вопр. мед. химии. 1993. Т. 39. № 1. С. 2-9.
 35. *Шевченко Е.С., Бурцева Е.Н., Иванова и др.* // Тез. докл. конгр. «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики у детей» (Москва, 13-14 дек. 2007 г.). М., 2007. С. 191.
 36. *Bin Goton, Tomohiko Ogasawara, Tetsuya Tojoda et al.* // J. EMBO. 1990. V. 9. № 12. P. 4189-4195.
 37. *Cao Tin M., Sung Michael T.* // Biochem. & Biophys. Res. Commun. 1988. V. 108.

- № 3. P. 1061-1066.
38. Garten W., Bosch F.X., Linder D., Rott B. [et al.] // J. Virol. 1981. V. 115. P. 361-374.
 39. Garten W., Klenk H.-D., Rott R. // J. Virol. 1981. V. 113. P. 725-735.
 40. Korant B.D. // J. Virol. 1972. V. 10. P. 751-759.
 41. Korant B.D. // J. Virol. 1973. V. 12. P. 556.
 42. Klenk H.-D., Rott R., Orlich M. // J. Gen. Virol. 1977. V. 36. P. 151-161.
 43. Krauslich H.-G., Wimmer E. // Ann. Rev. Biochem. 1988. V. 57. P. 701-754.
 44. Nakamura K., Compan R.W. // J. Virol. 1979. V. 95. P. 8-23.
 45. Reits E. A. J., Benham A., Plongastel B.D. // EMBOJ. 1997. V. 16. № 20. P. 6087-6094.
 46. Scheid A., Choppin P. W. // In "Proteasins and Biological Control" (E. Reich, R. D. Ritkin and E. Shaw, eds.). Cold Spring Harbor. 1975. № 4. P. 645-659.
 47. Webster R. Q., Zaver W.Q. // The influenza viruses and influenza (E. D. Kilbourne ed.). // Academic Res. New-York, 1975. P. 209-314.
 48. Ying C. Tian, Ding S. Shin // J. Virol. 1986. V. 32. P. 547-551.
 49. Zhirnov O.P. // J. Gen. Virol. 1982. V. 63. P. 469-474.

Резюме

ПРОТЕІНАЗНО-ІНГІБІТОРНА ТЕОРІЯ ПАТОГЕНЕЗУ ГРИПУ І ЇЇ РОЛЬ В УДОСКОНАЛЕННІ ЙОГО ЛІКУВАННЯ

*Дівоча В.А., Міхальчук В.Н.,
Гоженко А.І.*

Запропонована нова теорія патогенезу грипу за участю протеїназно-інгібіторної системи. Встановлено, що очищення і концентрація вірусу грипу різними методами не звільняло вірус від клітинних ферментів. При інфікуванні тварин вірусом грипу відбувалося порушення ферментно-інгібіторної рівноваги, особливо в першу годину після інфікування. З легких здорових мишей отримано шість ізоформ трипсиноподібної протеїнази, до яких отримані антипротеїназні

імунні сироватки і проведено лікування ними тварин. Тільки антисироватка до третьої ізоформи захистила тварин від смерті. З промислових відходів отримана гамма-глобуліну виділено інгібітор трипсиноподібних протеїназ, який захистив білих мишей від смерті на 80%. Ендogenous інгібітори протеїназ крові людини є перспективними антигрипозними препаратами для людини.

Ключові слова: *Грип, трипсиноподібні протеїнази, інгібітори протеїназ, очищення вірусу, противірусні препарати.*

Summary

PROTEINASE-INHIBITORY THEORY OF GRIPPE PATHOGENESIS AND ITS ROLE IN IMPROVED TREATMENT

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

They have offered a new theory of gripe pathogenesis with participation of proteinase-inhibitory system. It has been established that purification and concentration of gripe viruses by different methods did not release the virus from cellular enzymes. At the experimental animals, infecting with the virus of gripe disturbance of enzyme-inhibitory balance took place, especially during first hours after the animals being infected. From the lungs of healthy mice, they have got six isoforms of trypsin-like proteinases. To all of them they got antiproteinase immune sera and have treated the experimental animals. It was antiserum to the third isoform that has prevented the experimental animals fatality. From the industrial wastes of gamma-globins manufacture they have extracted inhibitor of protein-like proteinases which prevented white mice's fatalities in 80% of cases. Endogenous inhibitors of a human blood proteinases are perspective anti-influenza drugs for a human being.

Key words: *gripe, trypsin-like proteinase, inhibitor of proteinase, virus' purification, anti-viral preparation*

*Вперше поступила в редакцію 14.03.2011 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*