

УДК 613. 22:517. 156:576. 858/8.0947

РОЛЬ ПРОТЕИНАЗНО-ИНГИБИТОРНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ В УСОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ЛЕЧЕНИЯ ГРИППА

(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ, ЧАСТЬ 2)

Дивоча В.А.

Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса

Протеиназно-ингибиторная система здоровой клетки организма играет значительную роль в проникновении вируса гриппа в клетку, в размножении вируса и выходе новой вирусной частицы из пораженной клетки. С вирусом гриппа ассоциированная трипсиноподобная протеиназа клетки, которую невозможно отделить от вируса. Она прочно адсорбируется как на поверхностных, так и на расположенных глубоко внутри полипептидах вириона. В организме животных существует гетерогенная количество изоформ трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов. В наших исследованиях антипротеиназные иммунные сыворотки (в III-й изоформе) блокировали активность протеиназ, и вирус гриппа не размножался, предусматривающий получение антипротеиназных вакцин к гриппу. Выделенный нами ингибитор трипсиноподобных протеиназ из легких здоровых мышей блокировал развитие гриппозной инфекции у животных, зараженных смертельной дозой вируса гриппа А, является перспективной основой для совершенствования лечения гриппа путем модуляции состояния протеиназно-ингибиторной системы организма и управлением инфекционного процесса.

Ключевые слова: ингибиторы, протеиназа.

Несмотря на несомненные успехи вирусологии, эпидемиологии, химиотерапии, вакцинологии, грипп и ОРВИ остаются самыми массовыми заболеваниями человека в мире, в том числе и в Украине, где их доля в общей структуре инфекционной заболеваемости превышает 90 % [1, 2].

Разработка эффективных мер борьбы против вирусных инфекций остается одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения [3-5].

Вирусы являются внутриклеточными инфекционными агентами. Весь репликативный цикл вируса осуществляется с использованием метаболических и генетических ресурсов клеток. Поэтому патогенез вирусных инфекций, в первую очередь, следует рассматривать на молекулярном и клеточном уровнях (В.И. Покровский, О.И. Киселев, 2002). Вместе с тем, инфекционный процесс, вызванный вирусами, развивается в пределах того или иного органа или ткани, так как большинство вирусов

обладают достаточно высокой органной или тканевой тропностью.

Поэтому характер развития внутриклеточных процессов при вирусных инфекциях, с одной стороны, определяется, как правило, цитопатическим действием вируса на клетки данной ткани и органа, а с другой стороны, реакцией внутритканевых и органных систем защиты от вирусной инфекции.

Проникновение вируса в клетки — одна из ключевых стадий патогенеза инфекционного процесса. Для большинства вирусов степень цитопатического действия вируса прямо зависит от множественности заражения. В естественных условиях инфицирование клеток вирусами не происходит обычно с высокой множественностью. Исключение составляют респираторные вирусы, которые передаются воздушно-капельным путем с высокой инфицирующей дозой.

Для проникновения вируса в клетку, необходимо: высокое сродство к вирусос-

пецифическому рецептору; множественность рецепторов; эффективность слияния вируса с клетками при инфицировании; способность к образованию синцития, к образованию гигантских синпластов, состоящих из множества слившихся клеток, в которых вирусный нуклеопротеид без эндцитоза беспрепятственно переходит от одной зараженной клетки к множеству других через цитоплазму.

Такими свойствами из респираторных вирусов обладает грипп и респираторно-синцитиальный вирус, а среди ретровирусов – вирус иммунодефицита человека.

Одним из важнейших факторов патогенности вирусов является их репликативный потенциал: чем активнее происходит репликация, тем сильнее цитопатическое действие вирусов на клетки и пораженную ткань (орган).

Это обстоятельство позволяет, проводит рациональную симптоматическую терапию, направленную на защиту данной ткани или органа и ориентировать противовирусные средства в данный орган, например, легкие.

Возбудители гриппа относятся к семейству ортомиксовирусов (*Orthomyxoviridae*) и являются пневмотропными вирусами.

Одновременно циркулируют и имеют эпидемическое распространение 2 подтипа вируса гриппа А H3N2 и H1N1. На сегодняшний день во всем мире доминирует вариант А/Н1N1/Калифорния/09, А/Сидней/05/97, А/Берн/07/95 и А/Пекин/262/95. Характерной чертой современных вирусов гриппа А (H3N2) является изменение ряда их биологических свойств: тяжело размножаются в куриных эмбрионах, не агглютинируют эритроциты кур, взаимодействуют только с эритроцитами человека или морской свинки, имеют низкую иммуногенную активность.

Впервые в начале 80-х годов прошлого столетия при очистке и концентрировании разных штаммов вируса гриппа, для получения поливалентных противогриппозных вакцин возникла проблема очист-

ки вируса гриппа от ассоциированной с ним протеиназы [6]. Нами были усовершенствованы методы очистки, однако, ни применение 0,1 % раствора додецисульфата натрия, ни силы электрофоретической подвижности заряженных отрицательно молекул, ни центробежные силы не позволили получить препарат, очищенный в достаточной степени от протеиназы. Эти результаты могут свидетельствовать о достаточно сильном гидрофобном взаимодействии вирусных и клеточных молекул [7].

Анализ очищенных препаратов вируса гриппа на наличие протеолитической активности показал, что очистка вируса гриппа методами ультрацентрифугирования не освобождает вирус гриппа от протеолитической активности, а, в градиенте сахарозы (15-60 %) было идентифицировано несколько изоформ трипсиноподобной протеиназы [7].

Применение электрофоретических методов позволило получить 7-9 фракций, обладающих высокой трипсиноподобной 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 протеиназа быстрее генерировалась из элюатов. Антисыворотки к хорионаллантоисным оболочкам нейтрализовали активность протеиназы, ассоциированной с вирусом гриппа [8].

Полученные результаты позволили сделать вывод, что с вирусом гриппа ассоциирована серинсодержащая протеиназа трипсиноподобного типа клеточного происхождения, которая имеет молекулярную гетерогенность. Эта протеиназа прочно адсорбируется как на поверхностных, так и на глубоко расположенных полипептидах вириона, о чем свидетельствуют наши исследования по удалению его поверхностных гликопротеинов гемагглютинаина и нейраминидазы вириона 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 [9], однако никто не изучал наличие протеолитических ферментов в составе очищенного вируса гриппа. Как показали наши исследования, очищенный вирус гриппа всегда содержал белок, обладающий протеолитической активностью. В то же время при выделении V – антигена, который представляет комплекс гемагглютинаина и нейтраминидазы, не обнаружено протеиназной активности. В препаратах РНП обнаруживали протеиназную активность. На этом основании предположили, что протеиназа 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.

Наши исследования показали, что данный фермент трипсиноподобная протеиназа является гетерогенной, и только одна из изоформ протеиназы способна расщеплять гемагглютинин и тем самым вызывать увеличение инфекционной активности.

В последующих исследованиях удалось выделить ингибиторы протеиназ с различными свойствами и функциями. Первая изоформа ингибитора, блокируя протеиназу, выполняет роль защитных факторов организма, т.к. в этот период не отмечается накопление инфекционного вируса. Вторая изоформа ингибитора протеиназ, выделяемых из легких мышей, зараженных малой дозой вируса гриппа, не подавляет протеиназную активность т.к. в этот период происходит повышение и протеиназной и инфекционной активности. В сыворотке крови не обнаруживается первая изоформа ингибитора, а вторая изоформа подавляет протеиназную актив-

ность, которая предшествует достижению максимальных уровней инфекционного вируса и гемагглютинаина.

Третья изоформа ингибитора образуется при развитии инфекционного процесса и, по-видимому, является результатом некроза ткани легкого.

Наши исследования позволяют предположить, что вирусиндуцированные ингибиторы, обнаруженные в первые часы после заражения, блокируют активность протеиназы клеток-хозяев, в результате чего белки вируса гриппа защищены от протеолитического гидролиза. При нарушении протеиназно-ингибиторного равновесия, протеиназа начинает расщеплять гемагглютинин и происходит возрастание титра вируса. Поэтому, целесообразно через 6 часов после заражения дополнительно вводить ингибитор для блокировки протеиназной активности.

При изучении протеиназной и ингибирующей активности в куриных эмбрионах под действием больших и малых заражающих доз вируса гриппа A/PR/8/34 установлены изменения, аналогичные изменениям в организме белых мышей. В первые 30 минут после заражения, отмечалась увеличение как протеиназной, так и ингибирующей активности. Под действием большой заражающей дозы, начиная с 6 часов после заражения, происходило угнетение активности и протеиназы и ингибитора. Снижение активности протеиназы и ингибитора происходило на фоне накопления инфекционной и гемагглютинирующей активности, которые достигали своего максимума к 24 часам заражения. Следует отметить, что в максимум накопления инфекционной и гемагглютинирующей активности ни протеиназная, ни ингибирующая активность не регистрировались. В работе M.S. Ewasyshin и Z.R.Sabina (1986) было также показано, что в процессе репликации различных штаммов вирусов гриппа наблюдается отчетливое подавление протеиназной активности аллантоисной жидкости в период, когда выход инфекционного вируса приближается к своему максимуму [10]. Через 72 часа проис-

ходил подъем протеиназной 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) протеиназная активность быстро возрастала. Это свидетельствует о том, что существует несколько ингибиторов или изоформ ингибитора. Первая изоформа ингибитора выполняет защитную функцию организма на инфицирование. Хотя в этот период своего максимума инфекционного вируса активность второй изоформы ингибитора снижалась незначительно, а при малой дозе заражения активность этой изоформы не изменялась. Активность третьей изоформы значительно подавлялась большой дозой вируса ($2,5 \cdot 10^{-2}$) и мало изменялась при действии малой дозы. Если основная роль третьей изоформы ингибитора состоит в сохранении инфекционного вируса за счет его защиты от протеолитического расщепления, то интерференция с синтезом ингибитора может иметь важное терапевтическое значение.

Исследования клеточных антипротеиназных иммуноглобулинов, блокирующих развитие гриппозной инфекции, проведены впервые [11]. Для выделения нескольких фракций изоформ трипсиноподобной протеиназы из легких незараженных 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 стадию инфекции, которая предшествует стадии транскрипции вирусного генома. Ингибиторы протеолитических ферментов подавляют репродукцию вируса гриппа на более 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 известно, что вирусные частицы гриппа А, В и С типов, парамиксовирусов, ротавирусов приобретали инфекционность лишь после обработки трипсином, либо трипсиноподобными протеиназами, тогда как химотрипсиновые протеиназы, индуцируя расщепление поверхностных белков, не активировали инфекционность эмбрионов. В наших исследованиях антипротеиназные иммунные сыворотки (особенно 4 группы), блокировали активность трипсина, и вирус гриппа не размножался в перевиваемой культуре клеток МДСК.

В последнее десятилетие установлен значительный лечебный противогриппозный эффект ингибиторов протеолиза. Они тормозят репродукцию вируса в культуре ткани [12] и легких мышей, уменьшают их смертность при летальной форме гриппа, значительно облегчают течение гриппа и ОРЗ у детей и взрослых. Однако используемые ингибиторы протеолиза имеют химическое происхождение и из-за своей токсичности мало используются в терапевтической практике.

Поэтому целесообразным явилось получение ингибитора трипсиноподобных протеиназ из легких здоровых и инфицированных вирусом гриппа А мышей. Трипсиноподобная протеиназа играет ключевую роль в развитии патологического процесса в организме. Она расщепляет наружный белок вируса гриппа – гемагглютинин на две субъединицы HA1 и HA2. Только после расщепления вирус проникает в клетку и начинает размножаться. Учет данного обстоятельства открывает новый подход к лечению гриппа: блокирование протеолитической активации вируса ингибиторами протеиназ. Такой подход в настоящее время считается самым перспективным. Механизм противовирусного эффекта ингибиторов связан с подавлением протеолитической активности [13].

Впервые выделен ингибитор трипсиноподобных протеиназ из легких здоровых

мышей. Он характеризовался высокой степенью чистоты и содержал незначительное количество примесей. Ингибитор имел молекулярную массу 47,5 кДа. Разработана методика получения и очистки ингибитора трипсиноподобных протеиназ и на нее получен патент [14]. Выделенный ингибитор похож на альфа-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 *in vitro* установлено, что он подавлял активность почти всех изоформ, за исключением IV-й (41,8 %) и VII-й (28,3 %).

В исследованиях по влиянию выделенного препарата клеточного ингибитора на развитие вируса гриппа в куриных эмбрионах установлено, что он подавлял развитие инфекционной и гемагглютинирующей активности и снижал содержание белка. В тоже время ингибитор трипсиноподобных протеиназ, 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.

В этом плане предложенная и обоснованная протеиназно-ингибиторная те-

ория патогенеза гриппа является не только углублением существующих представлений о механизмах взаимодействия вирусов с организмом человека, но и перспективной основой для совершенствования лечения гриппа, а, возможно, и ряда других заболеваний вирусной природы путем модуляции состояния протеиназно-ингибиторных систем организма, а значит и управления инфекционным процессом.

Литература

1. Шульдьяков А.А., Кузнецов В.И., Е.П. Ляпина и др. Современные подходы к химиотерапии ОРВИ и гриппа – некоторые аспекты проблемы // Трудный пациент. – Т. 8, № 12. – С. 3-6.
2. Петров В.А., Горелов А.В., Медведева Т.О. Клинико-экономическая оценка применения лекарственных препаратов для профилактики и лечения ОРВИ у детей / Детские инфекции. – 2012. – № 3. – С. 2 -7.
3. Кареткина Г.Н. Грипп и ОРВИ: рациональная профилактика и лечение / Поликлиника. – 2011. – № 4. – С. 49-50.
4. Веревищников В.К., Борзунов В.М., Шемякина Е.К. Оптимизация этиопатогенетической терапии гриппа и ОРВИ у взрослых при применении эргоферона / Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – № 56. – С. 9-10.
5. Кареткина Г.Н. Применение индукторов интерферонов для лечения и профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций // Лечащий врач. – 2009. – № 10. – С. 1-4.
6. Дивоча В.А., Дегтяренко В.И., Зеваков В.Ф. Клеточная протеаза вируса гриппа // Тез. докл. 2-го съезда инфекционистов УССР. – К., 1983. – С. 36-38.
7. Дівоча В.О. Вивчення протеолітичної активності у процесі очищення вірусу грипу шляхом центрифугування // Одеський медич. журн. — 2003. — № 1. — С. 16-19.
8. Дівоча В.О. Вірус грипу і ферменти клітини // Експериментальна і клінічна

- медицина. — 1999. — № 2. — С. 100-105.
9. Дивоча В.А., Григорьева И.Г., Букринская А.Г. Изменение протеазной активности в лёгких мышей, заражённых вирусом гриппа А // *Вопр. вирусол.* — 1990. — № 5. — С. 370-377.
 10. Ewasyshyn M.E., Sabina L.R. Активность протеазы аллантаической жидкости в процессе инфекции вирусом гриппа / *Acta virology.* 1986. — V. 30. — P. 109-118.
 11. Дівоча В.А. Захисна дія антипротеазних сироваток // *Одеський мед. журн.* — 2002. — № 3 (71). — С. 14-17.
 12. Webster R. Q., Zaver W.Q. Antigenic variations of influenza viruses // *The influenza viruses and influenza.* (E. D. Kilbourneed). Academic Press. — New-York, 1975. — P. 209-314.
 13. Веремеенко К.Н., Веревка В.С., Мегедь Н.Ф. Исследование прекалликреин-кининовой системы плазмы крови при остром панкреатите // *Клин. хирургия.* — 1976. — № 9. — С. 5-9.
 14. Дівоча В.А. Патент 23548 А Україна, МПК⁶ А 61 К 35/00. Спосіб одержання інгібітору трипсиноподібних протеаз. № 97052520; заявл. 30.05.97; опубл. 02.06.98.

Резюме

РОЛЬ ПРОТЕІНАЗНО-ІНГІБІТОРНОЇ СИСТЕМИ КЛІТИНИ В УДОСКОНАЛЕННІ ЛІКУВАННЯ ГРИПУ

Дівоча В.П.

Протеїназно-інгібіторна система здорової клітини організму відіграє значну роль у проникненні вірусу грипу в клітку, в розмноженні вірусу і виходу нової вірусної частки з ураженої клітини. З вірусом грипу асоційована трипсиноподібна протеїназа клітини, яку неможливо відокремити від вірусу. Вона міцно адсорбується як на поверхневих, так і на глибоко розташованих поліпептидах віріону. В організмі тварин існує гетерогенна кількість ізоформ трипсиноподібних протеїназ та їх інгібіторів. У наших дослідженнях антипротеїназні імунні сироватки (до III-ї ізоформи) блокували

активність протеїназ, і вірус грипу не розмножувався, що передбачає отримання антипротеїназних вакцин до грипу. Виділений нами інгібітор трипсиноподібних протеїназ з легенів здорових мишей блокував розвиток грипозної інфекції у тварин, заражених смертельною дозою вірусу грипу А, що є перспективною основою для вдосконалення лікування грипу шляхом модуляції стану протеїназно-інгібіторної системи організму та управлінням інфекційного процесу.

Ключові слова: інгібітори, протеїназа.

Summary

ROLE OF PROTEINASE-INGIBITORY SYSTEM OF A CELL IN THE IMPROVEMENT OF THE FLU TREATMENT *Divocha V.A.*

Proteinase-inhibitory system of a body healthy cell has a significant role in penetration of the flu virus into a cell, in reproduction of a virus and an exit of a new virus particle from the damaged cell. The trypsin-like proteinase of a cell is associated with the flu virus and can't be separated from the virus. It is strongly adsorbed both on superficial, and on deeply located polypeptides of viro. In the body of animals there is heterogeneous quantity of isoforms of trypsin-like proteinase and their inhibitors. In our researches antiproteinase immune serums (to the III-rd isoform) blocked activity of proteinases, and the flu virus didn't breed. This assumes the possibility to obtain antiproteinase vaccines to flu. The inhibitor of trypsin-like proteinases we have emitted from the lungs of healthy mice blocked the development of infection in the animals infected with a lethal dose of the flu A virus. This is a perspective basis for the improvement of flu treatment by modulation of proteinase-inhibitory system of a body modulation, and as a result management of the infectious process.

Keywords: inhibitors, proteinase.

Впервые поступила в редакцию 18.09.2013 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования