УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9

ПРОТЕЇНАЗНО-ІНГІБІТОРНА ТЕОРІЯ ПАТОГЕНЕЗУ ГРИПУ: ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ТА НАУКОВІ ПЕРСПЕКТИВИ

В.П. ДІВОЧА, Т.М. КОБРИН, В.М. МИХАЛЬЧУК, А.І. ГОЖЕНКО

Український НДІ медицини транспорту, Одеса

Предложена новая теория патогенеза гриппа с участием протеиназно-ингибиторной системы. При инфицировании животных вирусом гриппа происходило нарушение ферментно-ингибиторного равновесия, особенно в первые часы после инфицирования. Из легких здоровых мышей выделено шесть изоформ трипсиноподобной протеиназы, к которым получены антипротеиназные иммунные сыворотки и проведено лечение ими животных. Выделенный нгибитор трипсиноподобных протеиназ, защитил животных от смерти на 80% и является перспективным антигриппозным препаратом.

Ключевые слова: *Грипп, трипсиноподобные протеиназы, ингибиторы протеиназ.*

***

UDC: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9

PROTEINASE-INHIBITORY THEORY OF PATHOGENESIS OF INFLUENZA: PRACTICAL IMPORTANCE AND SCIENTIFIC PERSPECTIVES

V.A. DIVOCHA, T.M. KOBRIN, V.N. MIKHALCHUK, A.I. GOZHENKO

Ukranian Scientific Research Institute Medicine of trasport, Odessa

They have offered a new theory of influenza pathogenesis with participation of system. At the experimental animals, infecting with the virus of influenza 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. Obtained from the lungs of white mice, an inhibitor of trypsin-like proteases, protected animals from death by 80% and is a promising perspective anti-influenza drug.

Keywords: *influenza, trypsin-like proteinase, inhibitor of proteinase.*

***

ВСТУП

Протягом останніх 10 років суттєво змінилося уявлення про роль протеолітичних ферментів в організмі. Стало очевидним, що протеоліз є особливою формою біологічного контролю [1]. Аналіз великого матеріалу показав, що обмежений протеоліз служить пусковим механізмом багатьох біологічних процесів і забезпечує швидку фізіологічну відповідь організму на мінливі умови або на сигнал, що надходить ззовні [2].

З біологією збудників вірусних захворювань пов'язані труднощі в направленому створенні препаратів виборчої противірусної дії. Досягнення біохімії і молекулярної біології останніх років, що розкривають особливості репродукції вірусів, забезпечують створення нових підходів спрямованого втручання в цикл вірусної репродукції [3,4].

Протеолітична активація широко поширена серед вірусів різних таксономічних груп. У пікорна і тогавірусов розщеплення білка-попередника є основним механізмом, що призводить до утворення функціональних білків. Протеолітична активація є у більшості інших вірусів і стосується, в основному, вірусних глікопротеїдів, що здійснюють функції адсорбції і злиття. В результаті обмеженого протеолізу білкова молекула розщеплюється на дві суб одиниці, як, наприклад, гемаглютинін вірусу грипу, або від неї відщеплюється невеликий фрагмент, в обох глікопротеїдів параміксовірусів, HN та F [5,6].

Протеолітична активація є високо специфічним процесом, який здійснюється певними протеїназами клітинного або вірусного походження [7,8]. Так, протеолітичну активацію вірусів грипу та параміксовірусів здійснюють трипсиноподібні протеїнази клітини, які гідролізують пептидний зв'язок між аргініном і лізином. Хімотрипсин і гемолізин розщеплює білок-попередник зі зрушенням на 3 та 1 амінокислоту відповідно, і при цьому протеолітична активація та злиття віріону з клітиною

не відбуваються [9]. Білки злиття вірусів грипу та параміксовірусів активізуються багатьма протеїназами. Ті та інші протеїнази знаходяться в хоріоналлантоісній рідини курячого ембріона, але при її фракціонуванні можуть бути розділені [10]. Для максимального розщеплення гемаглютиніну вірусу грипу і F-білка вірусу Сендай in vitro було потрібно близько 4 годин інкубації при t +37 °С. Протеолітична активація є важливою подією в інфекційному циклі вірусів. При її порушенні збірка вірусних часток буде відбуватися, проте утворювані віріони будуть неінфекційними, оскільки в їх складі відсутні активні білки злиття, що забезпечують проникнення вірусу в здорові клітини. Тому протеолітична активація обумовлює інфекційну активність вірусу і здатність його до генералізації інфекції. Мабуть, властивості вірусу вражати певні тканини організму визначаються наявністю в органах і тканинах ферментів, необхідних для протеолітичної активації вірусного потомства.

Значення протеолітичної активації в інфекційному процесі, її універсальність для інгібіторів протеолізу є передумовою для використання її в якості мішені з метою лікування вірусної інфекції. Такий підхід до терапії вірусних захворювань відкриває перспективу для створення препаратів широкого антивірусного спектру дії, оскільки для певних вірусів можна підібрати специфічні інгібітори протеолізу, які ефективно блокують протеолітичний процесінг. Зараз протеолітичними ферментами цікавляться практично в усіх областях медицини. Це пов'язано з тим, що на даний час відомий цілий ряд захворювань, у патогенезі яких задіяні протеїнази.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Вивчити стан і роль антіпротеїназних систем вірусу і реципієнта у розвитку грипозної інфекції для отримання і використання принципово нових лікувальних препаратів на основі інгібіторів трипсиноподібних протеїназ.

МАТЕРІАЛИ МЕТОДИ

1. Штами вірусу грипу: A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/USSR/90/77 (H1N1), A (Екстра X-31), A/WSN/33 (H1N1), A/Philippines/2/82 (H3N2), AO/32 (H0N1), вирощені на 9-ти денних курячих ембріонах; B штам PR-109, отриманий рекомбінацією вірусів B/Lee/40 і B / USSR / 100/83; та клітини МДСК (MDCK) отримані в НДІ вірусології ім. І.Д. Іванівського АМН Росії і штам AO/32 (H0N1) - з НДІ грипу Санкт-Петербурга, Росія.
2. Білі миші лінії BALB/c та безпородні.
3. Курячі ембріони.
4. Перещеплювана культура клітин МДСК.
5. Білі щури лінії Wistar.
6. Залишки промислового отримання гамма-глобуліну та альбуміну.
7. Вітчизняні комерційні лікарські препарати: інтерферон, імуноглобулін людський; герпетична, гонококова і туляремійная вакцини.
8. Зарубіжні лікарські препарати: Інфлувак, Флюарикс, Ваксигрип, Аваксим, Фраксипарин, Солкосерил.

Біохімічні методи. Хроматографічні для виділення і очищення інгібітору з відходів сироваткової промисловості, визначення вмісту білка проводили за методом O. Lowry, визначення активності інгібітору трипсину по гідролізу казеїну за методом К.М. Веремеєнко у модифікації А.П. Левицького. Електрофоретичної аналіз проводили за методом Laemli.

Вірусологічні методи. Зараження і накопичення вірусу грипу A/PR/8/34 на курячих ембріонах. Адаптація вірусу грипу A / PR/8/34 до білих мишей. Отримання смертельної дози вірусу грипу на мишах. Вибір дози інгібіторів для лікування заражених мишей вірусом грипу отриманими інгібіторами трипсиноподібних протеїназ.

Статистичні методи. Результати проведених досліджень оброблялися за програмою "Microsoft Excel".

Для вивчення природи протеолітичної активності асоційованої з вірусом грипу використовували вірус грипу AO/32 (H0N1) з інфекційним титром 7 lg ЕІД50/0,2 та ГА-1: 256. Для отримання препаратів вірусу грипу використовували 10-11-добові курячі ембріони. Вірус накопичували шляхом зараження курячих ембріонів в обсязі 0,2 мл, розведеним до 10^{-3} інфекційним матеріалом. Заражені курячі ембріони інкубували 48 год. при температурі +36 °С. Потім охолоджували 18 год. при температурі +4 °С, після чого збирали рідину, що містила вірус.

Результати. На початку 80-х років, при очищенні і концентрації різних штамів вірусу грипу для отримання полівалентних протигрипозних вакцин ми вперше зіткнулися з тим, що не можемо

звільнити вірус грипу [11] від протеолітичної активності (рис 1.). Для вирішення даного питання ми вдосконалили методи очищення, однак звільнити вірус грипу від протеолітичної активності нам не вдалося.

Аналіз очищених препаратів вірусу грипу на наявність протеолітичної активності в наших дослідження показав, що очищення вірусу грипу методами ультрацентрифугування не звільняло вірус грипу від протеолітичної активності. У градієнті сахарози (15-60%) протеолітична активність [12] чітко розділилася на кілька ізоформ (табл. 1).

До всіх ізоформ були отримані антипротеїназні імунні сироватки, які нейтралізували протеїнази в зоні 35-45% сахарози, де локалізувався весь очищений вірус, а гемагглютинуюча активність збереглася. Отримані результати дозволили нам зробити висновок, що з вірусом грипу асоційована серинова протеїназа трипсиноподібного типу клітинного походження, яка має молекулярну гетерогенність. У зв'язку з тим, що ми не змогли звільнити вірус грипу від трипсиноподібної протеїнази, наступним етапом була перевірка зарубіжних протигрипозних вакцин на наявність у їх складі трипсиноподібної протеїнази та її інгібітору, тобто з'ясувати питання: — як вони очищають вірус грипу до гомогенного стану?

Вихідна аллантоїсна рідина, що містить вірус (ВМР)
↓
Центрифугування при 6000 хв.$^{-1}$ 30 хв. при при t + 4°С, (ЦВР -1)
↓ ↓
Надосадова рідина (НОР) Осад відкидається
↓
Центрифугування при 10000 хв. $^{-1}$, 20 хв. при t + 4°С, (ЦВР -1)
↓ ↓
Надосадова рідина (НОР) Осад відкидається
↓
Центрифугування при 20000 хв. $^{-1}$ 2 год. при t + 4°С, (ЦВР -1)
↓ ↓
Осад (вірус) НОР відкидається
↓
Осадження очищеного і концентрованого нативного аллантоїсного вірусу при 20000 хв. $^{-1}$, через 20%-ую сахарозу 2 год. t + 4°С, (ЦВР-1)
↓ ↓
Осад (вірус) НОР відкидається
↓
Очищення в градієнті щільності сахарози на ВАК - 602 при 28000 хв. $^{-1}$ 4 год.
↓
НОР відкидається
Концентрація фракцій при 20000 хв. $^{-1}$ 2 год. при t + 4°С на ЦВР —1 с. буфером NTE
↓
Осад /вірус/ розчиняється в мінімальній кількості буфера NTE НОР відкидається
↓
Ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози на ультрацентрифузі «Spinko», rotor - SV, при 33000 хв. $^{-1}$, 3 год.
↓
Осад /вірус/ розчиняється в мінімальній кількості буфера NTE
↓
Обробка вірусу 0,1%-ним розчином додецилсульфату Na при при t +20°С 20 хв.
↓
Очищення і розділення вірусних поліпептидів препаративним електрофорезом в поліакриламідному гелі
↓ ↓
1/2 блока на елюцію 1/2 блоку на забарвлення

Рис. 1. Схема очищення вірусу грипу

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.

Таблиця 1 Очищення вірусу грипу АО/32 у градієнті сахарози та ультрацентрифугуванні при 28000 хв$^{-1}$, 4 год.

Фракції сахарозного градієнта	Досліди											
	1 ВМР			2 ВМР			3 ВМР			4 НАР		
	% сахарози	РГА	протеїназа, мг/мл	% сахарози	РГА	протеїназа, мг/мл	% сахарози	РГА	протеїназа, мг/мл	% сахарози	РГА	протеїназа, 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

Примітки: РГА - реакція гемагглютинації;
ВМР – рідина, що містить вірус;
НАР – нормальна алантоїсна рідина.

Як показали дослідження, результати яких представлені в табл. 2, усі комерційні препарати, випущені зарубіжними фірмами, містили як інгібітор, так і трипсиноподібну протеїназу. Виходячи з вищевикладеного, можна зробити висновок, що зарубіжні препарати не очищені на 100% від білкових домішок, або неможливо відокремити вірусні білки від компонентів клітини. Вірусні білки міцно асоційовані з компонентами клітини, тому структуру вірусу грипу слід розглядати з урахуванням взаємодії з клітинними ферментами і їх інгібіторами.

Система протеїназ та інгібіторів представлена в організмі тварин великою групою білків. Інгібітори протеолітичних ферментів виконують роль постійного рівня відповідних ферментів в організмі, знаходяться з останніми в постійній динамічній рівновазі [13].

Таблиця 2 Наявність трипсиноподібної протеїнази та активність її інгібітору в комерційних імунобіологічних препаратах, які випускаються фірмами закордонних країн (n = 3)

№ п/п	Назва препарата	Фірма, країна	Вміст білка, г/л*	Активність протеїнази, ммоль/хв.×мг білка	Активність інгібітору (ІА), в у.о.**
1.	Інфлувак	Solvay, Нідерланди	16,34 ± 1,20	1,53 ± 0,14	180,86 ± 17,34
2.	Флюарікс	Сміт Клейн, Німеччина	9,60 ± 0,81	0,61 ± 0,054	96,52 ± 9,24
3.	Ваксігрип	Пастер, Франція	2,92± 0,30	0,31 ± 0,03	101,73 ± 9,01
4.	Аваксім	Пастер, Франція	14,73±1,32	0,24 ± 0,02	8,924 ± 0,77
5.	Фраксіпарин	Sanofi, Франція	4,81 ± ,042	0,28 ± 0,03	111,30 ± 10,24
6.	Солкосерил	Солко, Швейцарія	18,69± 1,70	0,26 ± 0,02	84,34 ± 8,27

Примітки: * - г білка на 1,0 л водної суспензії;
** у.о. - 1 умовна одиниця відповідає 1 мкг інактивованого кристалічного трипсину

Порушення між ферментами та інгібіторами має значення для розвитку патологічних процесів [14]. Проведені нами дослідження показали, що в легенях і сироватці крові незаражених тварин та курячих ембріонах рівень протеїназної активності та інгібуючої протеїназу активності перебувають у рівновазі, яка порушується при зараженні вірусом грипу А. В інфекційному процесі найбільш глибокі зміни відбуваються в перші години після зараження (рис. 2). Так, через 6 годин після зараження знижується кількість протеїнази в легенях і в сироватці заражених тварин і зростає інгібуюча активність [15]. Заражені вірусом грипу клітини індукують появу інгібітору як в легеневій тканині, так і в сироватці крові. Отже, інгібітори легень є як би першою лінією оборони органу при дії різних штамів вірусу грипу.

При вивченні динаміки протеїназної та інгібуючої активності в курячих ембріонах під дією великих і малих заражаючих доз вірусу грипу A/PR/8/34 встановлено, що в них відбувалися аналогічні зміни, як і в організмі білих мишей (рис. 3.) У період максимального накопичення

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.

інфекційної і гемаглютинуючої активності (24 год.) не виявлялася ні протеїназна, ні інгібуюча активність [16]. З легенів здорових мишей було виділено, методом іонообмінної хроматографії 6 ізоформ трипсиноподібної протеїнази, а з легких заражених мишей - 8 ізоформ, у яких питома протеолітична активність різко зростала порівняно з вихідним матеріалом (табл. 3). Отримані ізоформи протеїназ мали широку субстратну специфічність і були здатні гідролізувати субстрати як природного, так і синтетичного походження [17].

До всіх ізоформ трипсиноподібних протеїназ були отримані антипротеїназні гіперімунні сироватки щурів. При вивченні захисних властивостей антипротеїназних сироваток і нормальної сироватки щурів на білих мишах, заражених інтраназально, летальною дозою вірусу грипу A/PR/8/34 (IV пасаж), було встановлено, що 100% загибель контрольних мишей наступала на 4-5 добу (табл . 4). Тварини, яким шість разів закапували нормальну щурячу сироватку, гинули на 7-му добу. При лікуванні мишей пулами імунних сироваток I, II, IV, V і VI групи смертність тварин знижувалася і наступала істотно пізніше, ніж у контрольній групі, 20% тварин не загинуло, а видужало [18].

Найбільш ефективним виявився четвертий пул імунної сироватки до III-й ізоформи, у присутності якого вижило 60% заражених мишей, і на 14 день після зараження в сироватці крові і в легенях ми не виявляли ні гемаглютиніну, ні інфекційного вірусу

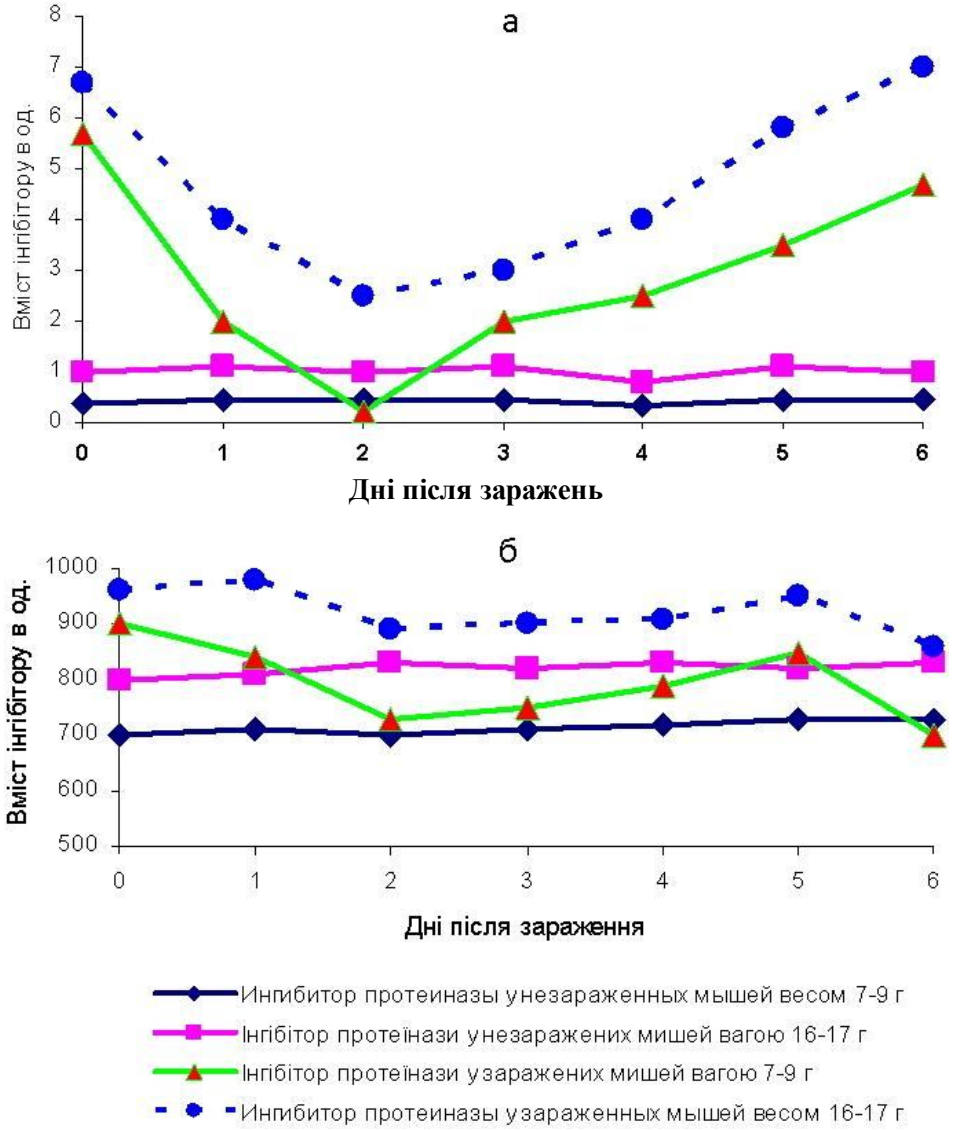
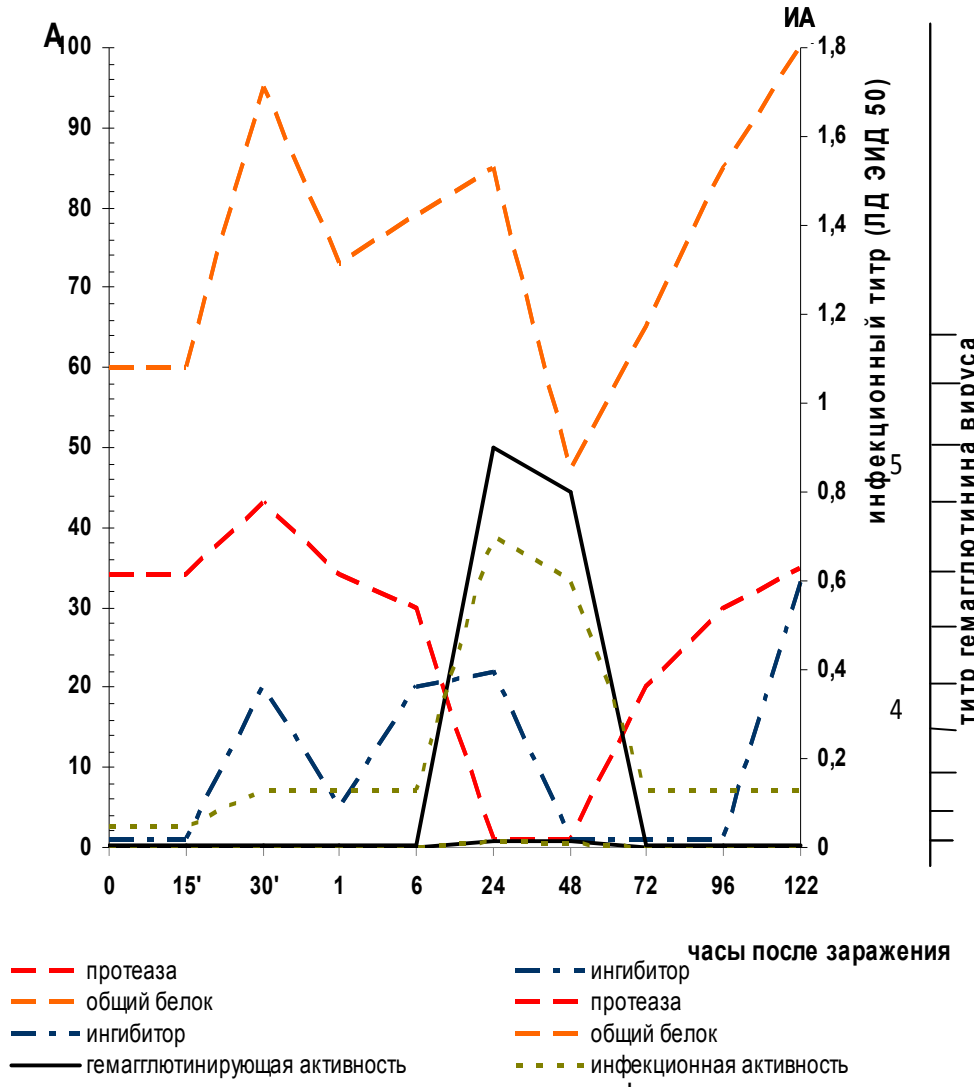


Рис. 2. (а, б). Інгібуюча активність трипсиноподібної протеїнази в легенях (а) і у сироватці крові (б) білих мишей, заражених вірусом грипу A/PR/8/34.

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.



IA – 1 од. дорівнює 1 мг кристалічного трипсину
A – 1 од. активності дорівнює 1 мкг аргініну/хв.

Рис. 3. Зміна протеїназної та інгібуючої активності в курячих ембріонах при великій заражаючій дозі вірусу грипу A/PR/8/34.

Таблиця 3. Очищення на ДЕАЕ-целюлозі трипсиноподібної протеїнази з легенів незаражених мишей

Номери фракцій	Номери ізоформ	Питома протеолітична активність на мг білка	% виходу протеїнази	% очищення по білку
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

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.

Таблиця 4. Вплив антипротеїназних імунних сироваток на виживання мишей при зараженні летальною дозою вірусу грипу A/PR/8/34

№ групи	Ізоформи протеїназ	Група сироваток	Строк після зараження, доба												вижило	% виживання
			6 год.	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	Фіз. розчин		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	Вірус без сироватки						2/10	6/10							0	0
8	Нормальна сироватка щурів						2/10	3/10		5/10					0	0
9	Імунна сироватка IV гр. без вірусу токсичність		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

Примітки: 1. чисельник – кількість загиблих мишей;
2. знаменник – кількість мишей в експерименті.

Імунна сироватка до VI-й ізоформи взагалі не захищала мишей від загибелі, хоча III-я ізоформа від VI-й відрізнялася лише одним білком, з молекулярної масою 32 кДа [19].

З легких здорових мишей нами був виділений інгібітор трипсиноподібних протеїназ з молекулярною масою 47,5 кДа, з високим ступенем чистоти і незначною кількістю домішок. Розроблена і запатентована методика отримання та очищення інгібітору трипсиноподібних протеїназ [20]. Виділений інгібітор схожий на α_1-інгібітор протеїназ сироватки крові людини (м.м. 48-55 кДа) і інгібітор трипсину з яєчного білка (м.м. 49 кДа), але не схожий на інгібітор трипсину, виділений з легенів великої рогатої худоби (інгібітор типу Кунітца-Нортропа), який мав молекулярну масу 65 кДа. При вивченні його дії на протеолітичну активність ізоформ трипсиноподібних протеїназ пробірковим методом, з'ясувалося, що він пригнічував активність майже всіх ізоформ, за винятком четвертої (41,8%) і восьмиї (28,3%).

У наших дослідженнях [21] при використанні клітинного інгібітору для пригнічення розвитку вірусу грипу в курячих ембріонах встановлено, що він пригнічував розвиток інфекційної і гемаглютинуючої активності та загального білка. У той же час, інгібітор трипсиноподібних протеїназ, виділений з легенів мишей, попередньо заражених вірусом грипу, не володів даною здатністю. У подальших дослідженнях [22] для лікування грипозної інфекції у тварин ми використовували інгібітор, який виділяли з легенів здорових мишей. Введення цього інгібітору мишам, попередньо заражених летальною дозою вірусу грипу, знижувало відсоток загибелі від цієї хвороби внаслідок гальмування розщеплення ГА при репродукції вірусу в легенях, недопущення генералізації процесу, а також в результаті запобігання підвищення протеолізу в легенях, попередження аерогематичного бар'єру і посилення деяких реакцій місцевого захисту (табл. 5).

Для отримання противірусного препарату, який би володів найменшою алергеністю для людини, ми використовували відходи донорської крові, що йдуть для отримання гамма-глобуліну та альбуміну (рис. 4).

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.

Таблиця 5. Дія клітинного інгібітору трипсиноподібних протеїназ на виживання мишей, заражених летальною дозою вірусу грипу A/PR/8/34

№ п/п	назва групи	Кіл-ть мишей в групі	Доза вірусу в групі	Доза інгібітору на мишь по білку	Кількість мишей		% захищенності від вірусу мишей
					загинуло	вижило	
1.	Вірус грипу	40	10^{-3}	-	40	-	0
2.	Вірус грипу+трипсин кристалічний	40	10^{-3}	18 мкг	40	-	0
3.	Вірус грипу + інгібітор з здорових легенів	40	10^{-3}	18 мкг	7	33	82,5
4.	Клітинний інгібітор	40	10^{-3}	18 мкг	-	40	100
5.	Трипсин кристалічний	10	-	18 мкг	-	10	100
6.	Фосфатний буфер	10	-	0,2 мл	-	10	100

На першому етапі отримання гамма-глобуліну та альбуміну з фракції II + III за методом Е.Дж. Кону осаджується фібриноген, який утилізується. За нашими дослідженнями відходи містили 481,11 мг інгібітору трипсиноподібних протеїназ на кілограм ваги. У цьому центрифугаті знаходиться α_1 - антитрипсин, який є основним інгібітором серинових протеїназ плазми крові людини. На його частку в нормі припадає 90% антитрипсинової активності плазми крові людини [23]. На II-й стадії отримання гамма-глобуліну на утилізацію йде осад, який містить протромбін, α-і β-глобуліни і ліпоїдами. У цьому осаді, за нашими результатами [24], міститься 469,87мг інгібітору трипсиноподібних протеїназ на кілограм ваги. У цей осад входить антитромбін-3 (АТ-3) або фактор гепарину - регулятор системи згортання крові. За даними О.А. Маркова та співавт. [25], в нормі вміст АТ-3 у донорів варіювало від 160 до 250 мкг/мл. У зону α-глобулінів входить також α_1-антитрипсин і α_2-макроглобулін [25,26].

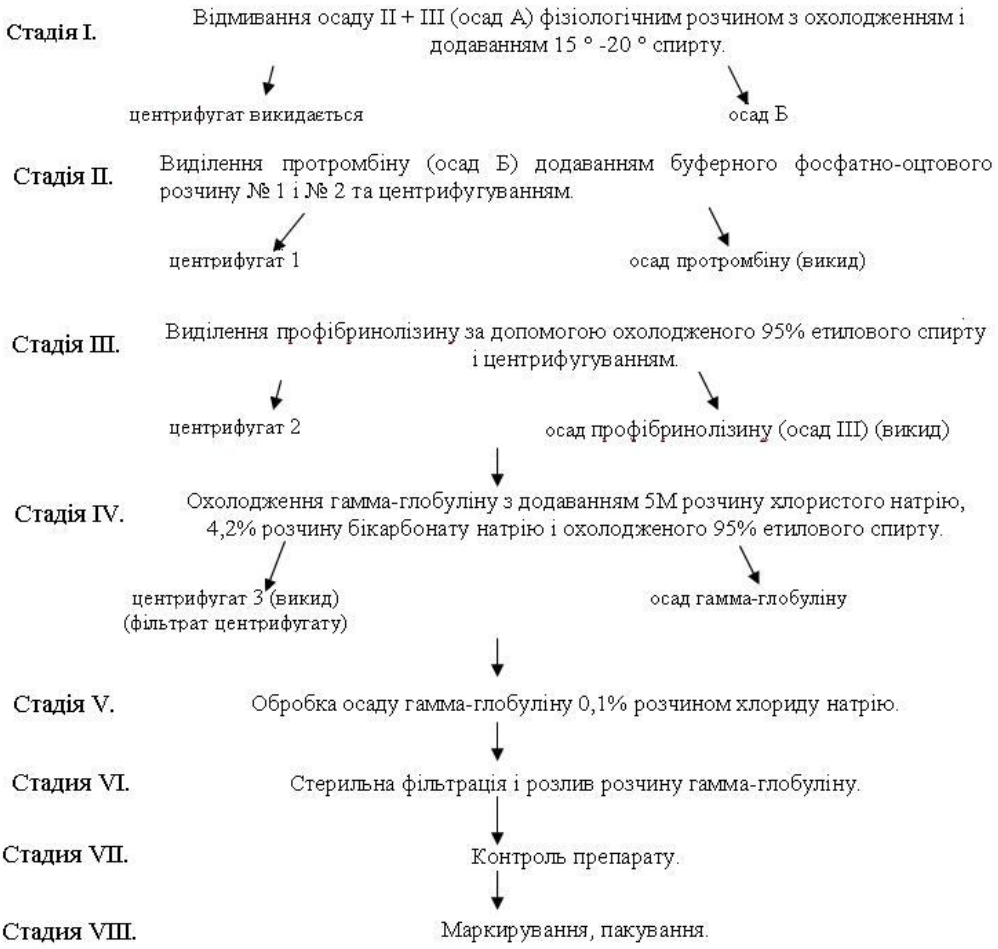


Рис. 4. Схема технологічного процесу виділення гамма-глобуліну з донорської крові людини методом Е.Дж. Кона.

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.

На третій стадії отримання гамма-глобуліну у відходи йде осад, який містить профібринолізин (плазміноген). У відходах цієї стадії, за нашими даними, вміст інгібітору трипсиноподібних протеїназ становить 137,40 мг на кілограм ваги. На четвертій стадії при осадженні гамма-глобуліну на утилізацію йде центрифугат № 3. За нашими даними, в матеріалі центрифугату № 3 міститься 166,37 мг інгібітору трипсиноподібних протеїназ.

Таким чином, сировиною для отримання інгібітору трипсиноподібних протеїназ можуть служити відходи після першої та другої стадії технологічного процесу, при яких йде відмивання осаду II + III і виділення протромбіну. Ці відходи містили найбільшу кількість інгібітору трипсиноподібних протеїназ.

У нашій роботі для виділення інгібітору трипсиноподібних протеїназ використовували відходи I-й стадії (II + III) отримання гамма-глобуліну з донорської крові людини, які, як показано раніше, містили значну кількість даного інгібітору. З центрифугату (відходи) фракції (II + III) першій стадії отримання гамма-глобуліну методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-53 целюлозі (фірма Watman, США) ми виділяли інгібітор трипсиноподібних протеїназ.

Розробка способу отримання інгібітору в очищеному вигляді включала наступні етапи: екстракцію ферменту, ультразвукову дезінтеграцію клітин, іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-целюлозі, діаліз, ліофільне сушіння (рис. 5.)

Іонообмінну хроматографію проводили в 0,1 М фосфатному буфері, pH 7,5. Лінійний градієнт створювали в інтервалі 0-1,0М NaCl на цьому ж буфері. Даний спосіб дозволив отримати 5 ізоформ, що володіли інгібуючою активністю (рис. 6.). Перші дві ізоформи, в яких було зареєстровано високий вміст інгібітору трипсиноподібних протеїназ, елюювали з іонообмінної колонки 0,1 М фосфатним буфером, pH 7,5. Наступні три ізоформи, що містили інгібітор трипсиноподібних протеїназ, елюювали ступінчастим градієнтом NaCl різної молярності: третя ізоформа - 0,1 М NaCl, четверта ізоформа - 0,2 М NaCl, п'ята ізоформа - 0, 5 М NaCl. Обсяги елюатів ізоформ були відповідно: I-й - 35 мл, II-й-195мл, III-й - 340 мл, IV-й - 440 мл, V-й - 605мл.

Найбільший вміст інгібітору трипсиноподібних протеїназ був зареєстрований у фракції V-ї ізоформи, яка останньою елюювалась з колонки 0,5 М NaCl, а найменшою - в IV-ої та III-ої ізоформах, які елюювались з колонки 0,2 і 0,1 М NaCl, відповідно.

Найбільший вміст білка (до 60% всього нанесеного на колонку білка) було встановлено у II-й ізоформ, яка елюіровалась з колонки 0,1 М фосфатним буфером pH 7,5 і в I-й ізоформи (до 30% всього нанесеного на колонку білка), яка елюювалась також фосфатним буфером.

У зв'язку з цим питома активність інгібітору трипсиноподібних протеїназ цих двох ізоформ була значно нижчою, ніж в інших трьох ізоформах, в яких вміст білка був незначним (сумарно до 10,0% всього нанесеного на колонку білка). Найбільша питома активність інгібітору трипсиноподібних протеїназ була зареєстрована в V-й ізоформі, яка елюювалась з колонки 0,5 М NaCl.

Отримані результати свідчать про те, що у відходах I-й стадії отримання гамма-глобуліну містилось принаймні 5 фракцій інгібітору трипсиноподібних протеїназ, які відрізнялись між собою як по заряду, так і за солірозчинністю. Ці відмінності можуть бути обумовлені відмінностями в амінокислотному складі множинних форм даного інгібітору (рис. 6.).

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.

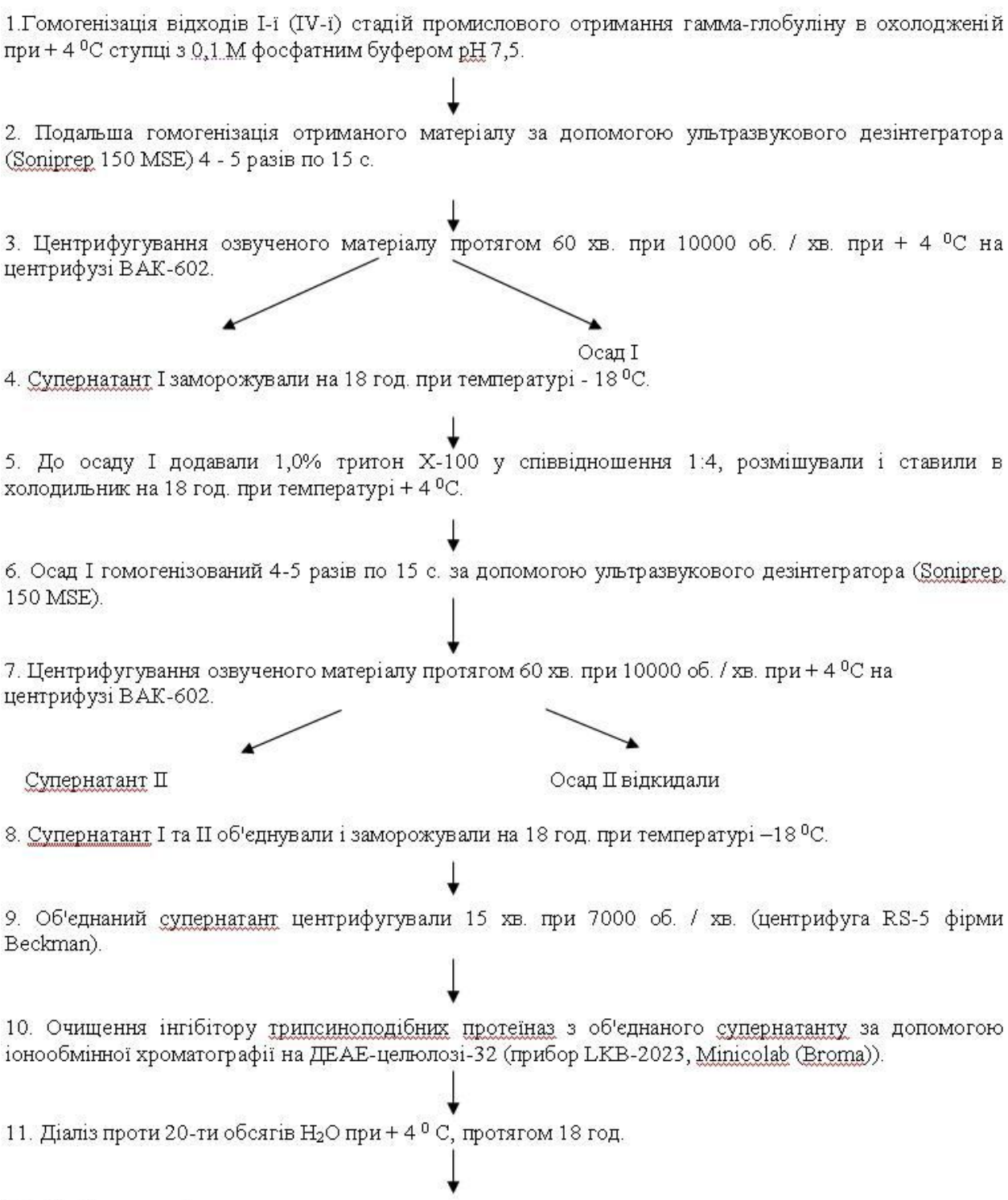


Рис. 5. Схема отримання інгібітору трипсиноподібних протеїназ з відходів промислового виділення гамма-глобуліну.

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.

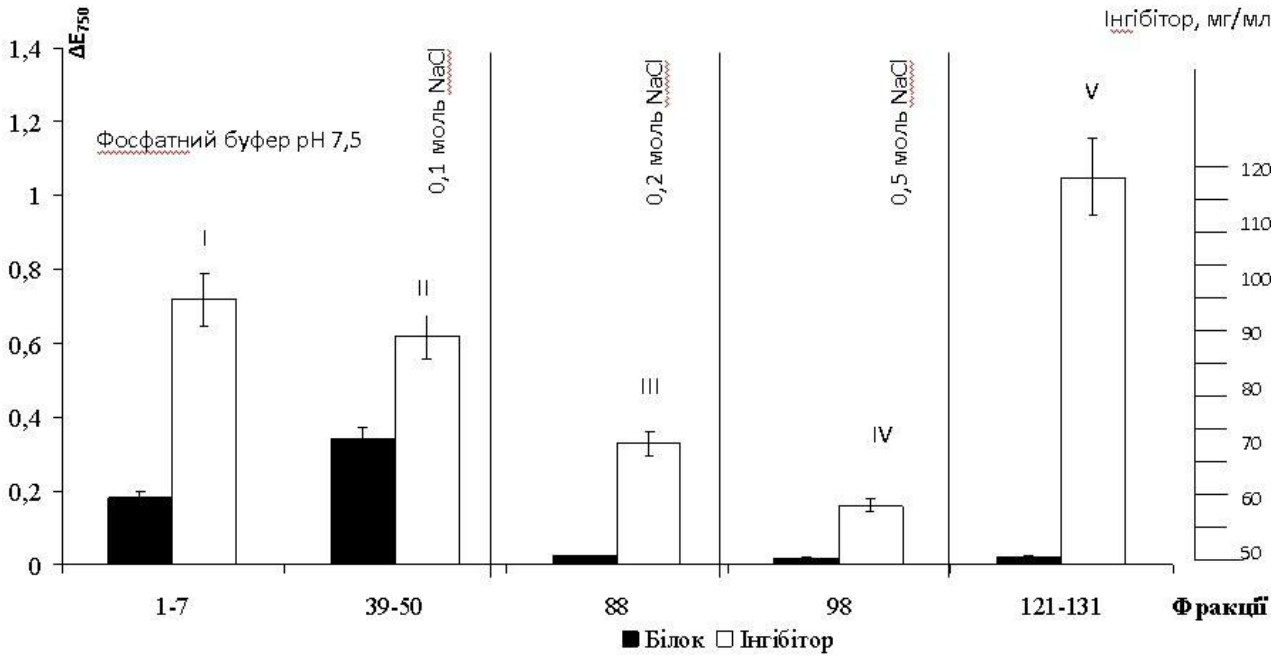


Рис. 6. Виділення та очистка інгібітору трипсиноподібних протеїназ з відходів I-й стадії (II + III) промислового способу отримання гамма-глобуліну.

П'яту ізоформу, яка мала високу інгібуючу активність, в подальшому використовували для вивчення терапевтичних властивостей виділених препаратів інгібітору трипсиноподібних протеїназ при експериментальній грипозної інфекції у мишей.

Перевірка терапевтичних можливостей отриманого інгібітору була проведена на наступному етапі роботи. Для вивчення захисної дії інгібітору трипсиноподібних протеїназ на виживання мишей, заражених смертельною дозою вірусу грипу A/PR/8/34, було взято 90 білих мишей лінії «Balb/c» вагою 16-18 гр. I п'ята ізоформа інгібітору протеїназ, виділена з відходів першої стадії отримання гамма-глобуліну. Вибір був обумовлений тим, що ця ізоформа мала найвищі показники активності інгібітору (132,52 у.о.) і низьку активність трипсиноподібної протеїнази (0,0027 мкмоль/хв. у пробі), останнє додатково підтверджувало роль інгібітору в регуляції протеїназної активності.

Миші були розділені на 7 груп, чотири дослідні по 15 шт. та в контрольних групах по 10 шт. (табл. 6.). Тварини першої групи отримували смертельну дозу вірусу (контроль вірусу). Вірус вводили інтраназально в обсязі 0,05 мл під Рауш-наркозом. Друга група мишей одержувала аналогічну дозу вірусу, але одночасно піддавалися впливу кристалічним трипсином (контроль лікувальних властивостей кристалічного трипсину) у тих дозах і термінах, що і тварини третьої групи.

Третя група тварин була заражена тією ж дозою вірусу і піддавалася лікуванню інгібітором трипсиноподібних протеїназ, отриманим з відходів виробництва гамма-глобуліну. Четверта група тварин отримувала тільки інгібітор трипсиноподібних протеїназ з відходів (контроль інгібітору на токсичність). П'ятій групі тварин вводили тільки трипсин кристалічний (контроль дії трипсину), шостій - фосфатний буфер, на якому розводили вірус, інгібітор і трипсин (контроль реактивів). Сьома група - контроль інтактних тварин (не одержували ніяких препаратів).

Інгібітор і трипсин вводили кожній мишці інтраназально під легким ефірним наркозом протягом семи діб. Кожна миша отримала в цілому по 140 мкг інгібітору за курс лікування.

Як показали результати досліджень, тварини I-й і II-ї груп загинули на 3-8 добу після зараження. Відзначається істотна різниця в термінах загибелі і клінічній картині у мишей цих груп - миші II-ї групи починали гинути значно раніше (на 3-ю добу після зараження). Можна зробити висновок, що додаткове введення трипсину прискорює перебіг грипу після введення смертельної дози вірусу, тому що загибель мишей настає дещо раніше. У третій групі вижило 12 білих мишей (80%), вони залишалися живими і на 14 добу після зараження (загальний термін спостереження). Отже, інгібітор, блокуючи трипсиноподібную протеїназу, в значній мірі пригнічує інфекційний процес, який індукує вірус грипу.

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.

Таблиця 6. Дія п'ятої ізоформи інгібітору трипсиноподібних протеїназ на виживання мишей, заражених смертельною дозою ($2,5^{-2}$ $ЛД_{50}$) вірусу грипу A/PR/8/34

№ п/п	Номер назви групи	Кіл-ть мишей в групі	Доза вірусу	Доза інгібітору на мишь мкг білка	Кількість мишей		% мишей, що вижили
					загинуло	вижило	
1.	Вірус грипу	15	10^{-1}	—	15	—	0
2.	Вірус грипу+ трипсин крист.	15	10^{-1}	20 мкг	15	—	0
3.	Вірус грипу + інгібітор з відходів	15	10^{-1}	20 мкг	3	12	80
4.	Інгібітор з відходів (токсичність)	15	-	20 мкг	-	15	100
5.	Трипсин крист. (контроль)	10	-	20 мкг	-	10	100
6.	Фосфатний буфер (контроль)	10	-	0,2 мл	-	10	100
7.	Контроль тварин	10	-	-	-	10	100

ВИСНОВКИ

Нами запропонована нова теорія патогенезу грипу за участю протеїназно-інгібіторної системи [5,27]:

1. Очищення і концентрація вірусу грипу методом центрифугування в градієнті сахарози не звільняла вірус грипу від білків з протеїназною активністю;

2. Протеиназа, асоційована з вірусом грипу, є клітинним ферментом;

3. При зараженні тварин (білих мишей) вірусом грипу А відбувалося порушення ферментно-інгібіторної рівноваги. Найглибші зміни відбувалися в перші години після зараження;

4. З легких незаражених мишей виділено шість, а із заражених вірусом грипу - вісім ізоформ, які мали високу протеолітичну активність;

5. Отримано антипротеїназні імунні сироватки до всіх ізоформ трипсиноподібних протеїназ та встановлено зниження летальності мишей, заражених смертельною дозою вірусу грипу на 60% лише за дії антисироваток до третьої ізоформи, виділеної з легенів здорових мишей;

6. З легенів здорових мишей виділений інгібітор трипсиноподібних протеїназ, який блокував розвиток грипозної інфекції у білих мишей в загальній дозі 0,126 мкг/мишу;

7. З відходів гамма-глобулінового виробництва виділено інгібітор трипсиноподібних протеїназ, який захистив від смерті 80 % дослідних мишей, заражених смертельною дозою вірусу грипу A/PR/8/34 (H1N1).

ЛІТЕРАТУРА

1. Дівоча В.П., Гоженко А.І., Михальчук В.Н., Кобрін Т.М., Протеолітична теорія патогенезу грипу та удосконалення його лікування // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2011. – Т. 6, № 4. - С.47-62.

2. Жанг Х., Чанг З. Протеиназа человека HtrA2: температурная зависимость протеиназной активности и структурные свойства // Биохимия.- 2004. - Т. 69. № 6. -С. 843-850.

3. Бурцева Е.Н., Шевченко Е.С., Ленева И.А. и др. Чувствительность к ремантадину и арбидолу вирусов гриппа, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в России в сезоне 2004-2005 г.г. // Вопр. вирусол. - 2007. - Т. 52. № 2. - С. 24-29.

4. Савинова О.В., Павлова Н.И., Бореко Е.И. Индивидуальное и совместное применение новых производных бетулина и ремантадина для ингибирования репродукции вируса гриппа / Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. тр. Вып. 1. - Минск: Белпринт, 2008. - С. 137-141.

5. Дивоча В.А., Михальчук В.Н., Гоженко А.И. и др. Трипсиноподобная протеиназа и ее ингибиторы в вакцинах и иммунобиологических препаратах крови // Журнал АМН України. - 2009. - Т. 15. № 3. - С. 609-625.

6. Zhirnov O.P. Intracellular cleavage of human influenza a virus hemagglutinin end its inhibition / O.P. Zhirnov, H.D. Klenk // Virology. -2003. - V. 313. - P. 198-212.

7. Krauslich H.- G., Wimmer E. Kard viral protienases // Ann. Rev. Biochem. - 1988. V. 57. P. 701-754.

8. Ying C. Tian, Ding S. Shin Cleavage of a viral polyprotein by a cellular proteolytic activity // J. Virol. - 1986. - V 32. - P. 547-551.

9. The structure of the hemagglutinin a determinant for the pathogenicity of influenza viruses / F. Bosch, M. Orlich, H.D. Klenk, R. Rott // Virology. - 1979. - V. 95. - P. 197-207.

10. Жирнов О.П. Сырцев В.В., Воробьева И.В., Klenk H.D., Направленная модификация участков каспазного распределения в белках вируса гриппа // Вопросы вирусологии. – 2008. - № 6. - С.16-20.

11. Дивоча В. А., Дегтяренко В.И., Зеваков В.Ф. Клеточная протеаза вируса гриппа // Тезисы докладов 2-го съезда инфекционистов УССР / Тезисы докладов 2-го съезда инфекционистов УССР. - Киев., 1983. - С. 36-38.

12. Дівоча В.О. Вивчення протеолітичної активності у процесі очищення вірусу грипу шляхом центрифугування // Одеський медичний журнал. -2003. - № 1. - С. 16-19.

13. Жданов В. М., Гайдамович С. Я. Семейство Orthomyxoviridae / Частная вирусология: руководство, Т. 2. - М.,1982.- С. 139-185.

14. Зорин Н.А., Зорина В.Н. Роль белков семейства макроглобулинов в механизмах инфицирования // ЖМЭИ. - 2004. - Т. 3. - С. 105-112.

15. Деребин П.Г., Каплина Э.Н., Носик Д.Н. и др. Противовирусная активность препаратов Ферровир и Деринап в отношении инфекции, вызванной патогенным вариантом вируса гриппа А птиц (H5N1) // Мед. каф. - 2006. - № 1. - С. 62-65.

16. Дівоча В.О. Зміни у курячому ембріоні під дією вірусу грипу // Одеський медичний журнал. - 2000. - № 2. - С. 100-105.

17. Дівоча В.О., Сова Ю.Г., Михальчук В.М. Виділення та очищення трипсиноподібної протеази з легенів білих мишей // Медична хімія. 2001. - Т. 3, № 3. - С. 73-77.

УДК: 616.24 – 002 – 022.6 – 085.272.9 ***В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин, В.М. Михальчук, А.І. Гоженко***
Протеїназно-інгібіторна теорія патогенезу грипу: практичне значення та наукові перспективи.

18.Дивоча В.А., Сова Ю.Г., Микелашвили М.Т. Защитная роль антипротеазных иммунных сывороток при экспериментальном гриппе / Идеи И. И. Мечникова и развитие современного естествознания : науч. конф., 28-30 ноября 1995 г. : сб. науч. работ. Харьков, 1995.- С. 102-103.

19.Дівоча В.О., Сова Ю.Г., Михальчук В.М. Вивчення фізико-хімічних властивостей ізоферментів трипсиноподібних протеаз // Медична хімія. - 2001. - Т. 3, № 4. - С. 31-34.

20.Дівоча В.А. Спосіб одержання інгібітору трипсіноподібних протеаз // Пат. 23548 А Україна, МПК[6] А 61 К 35/00. / заявник та патентодержатель Дівоча В. А. № 97052520; заявл. 30.05.97; опубл. 02.06.98.

21.Дівоча В.О., Мікелашвілі М.Т., Михальчук В.М. Дія інгібітора трипсиноподібних протеаз на грипозну інфекцію в експерименті // Інфекційні хвороби.- 2001.- № 2. - С. 35-39.

22.Дівоча В.А. Інгібітор трипсіноподібних протеаз як антивірусний засіб // Пат. 37324 А Україна, МПК[6] А 61 К 31/14. / опубл. 15.05.2001, Бюл. № 4.

23. Bin Goton, Tomohiko Ogasawara, Tetsuya Tojoda et al. An endoprotease homologons to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryon // J. EMBO. - 1990. - V. 9, № 12. - P. 4189-4195.

24.Михальчук В.Н., Дівоча В.П., Гоженко А.І. Наявність трипсиноподібної протеази та її інгібіторів у відходах отримання гамма-глобуліну // Медична хімія. - 2006. - Т. 8. № 1. - С. 60-63.

25.Розенфельд М.А., Леонова В.Б., Бирюнова М.И. и др. / Иммуналатексный діагностикум для определения антитромбина 3 в плазме крови человека // Научно-практ. журнал / Тромбоз, Гемостаз, Реология - 2006. - № 3. - С. 40.

26.Подярене С.М., Лецкене М.Н., Маурицае М.М. и др. Иммуноаффинная очистка a_1 – ингибитора протеаз из плазмы крови человека // Вопр. вирусол. - 1989. - № 5. - С. 96-99.

27.Дивоча В. А., Михальчук В. Н., Гоженко А.И. Молекулярно-биологическое обоснование антипротеиназной терапии гриппа // Журнал АМН України. - 2009. - Т. 15. № 1. - С. 19-21.

ВІДПОВІДНІСТЬ ЕТИЧНИМ СТАНДАРТАМ

Експерименти на тваринах проведені відповідно до положень Гельсінкської Декларації 1975 року, переглянутої та доповненої в 2002 році, директив Національних Комітетів з етики наукових досліджень.

Проведення експериментів схвалено Комітетом з етики. Дотримано сучасні правила утримання і використання лабораторних тварин, що відповідають принципам Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, котрі використовуються для наукових експериментів і потреб (Страсбург, 1985).

У всіх авторів відсутній будь-який конфлікт інтересів.

Дата поступлення: 27.03.2013