

## На пути к новым антигриппозным препаратам

**В.А. ДИВОЧА, А.И. ГОЖЕНКО,  
В.Н. МИХАЛЬЧУК, О.В. ЛАГОДА**

*Предложена новая теория патогенеза гриппа при участии протеиназно-ингибиторной системы. Установлено, что очистка и концентрация вируса гриппа разными методами не освобождало вирус от клеточных ферментов. При инфицировании животных вирусом гриппа происходило нарушение ферментно-ингибиторного равновесия, особенно в первые часы после инфицирования. Из отходов промышленного получения гамма-глобулина выделен ингибитор трипсиноподобных протеиназ, который защищал белых мышей от смерти на 80%. Эндогенные ингибиторы протеиназ крови человека являются перспективными антигриппозными препаратами для людей.*

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

В патогенезе вирусных заболеваний взаимодействие вируса с клеткой недостаточно изучено. Главным моментом является проникновение вируса в здоровую клетку с обязательной депротеинизацией вируса. Однако депротеинизация вирусов изучена недостаточно. В первую очередь это относится к механизмам внедрения вируса гриппа в клетки млекопитающих, в том числе и человека. В связи с этим нами в 1983 году предложена новая теория патогенеза гриппа с участием протеиназно-ингибиторной системы [1, 2].

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, позволяют создать новое поколение противовирусных препаратов [3-6].

**Цель исследования** – изучить состояние и роль антипротеиназных систем вируса и реципиента в развитии гриппозной инфекции для получения 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.

### **Материалы и методы исследования**

Материалами для исследования служили:

1. штаммы вируса гриппа: А/PR/8/34 (H1N1), А/Aichi/2/68 (H3N2), А/USSR/90/77 (H1N1), А (Экстра Х-31), А/WSN/33 (H1N1), А/Philippines/2/82 (H3N2), АО/32 (HON1), выращенные на 9-ти дневных куриных эмбрионах; В штамм PR-109, полученный рекомбинацией вирусов В/Lee/40 и В/USSR/100/83; и клетки МДСК (МДСК) получены в НИИ вирусологии им. И.Д. Ивановского АМН России и штамм АО/32 (HON1) – из НИИ гриппа Санкт-Петербурга, Россия.

2. Белые мыши – 2358 шт.: мыши линии BALB/с и беспородные.

3. Куриные эмбрионы – 3052 шт. 4. Перевиваемая культура клеток МДСК – 1612 пробирок. 5. Белые крысы – 140 шт. линии Wistar.

В работе использованы методики: вирусологические, биохимические, иммунологические, молекулярно-биологические, радиоизотопные.

### **Результаты исследований и их обсуждение**

Для изучения природы протеолитической активности ассоциированной с вирусом гриппа использовали вирус гриппа АО/32(HON1) с инфекционным титром  $7 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2$  (EID) и ГА-1:256. Для получения препаратов вируса гриппа использовали 10–11-суточные куриные эмбрионы. Вирус накапливали путём заражения куриных эмбрионов в объёме 0,2 мл, разведенным до  $10^3$  инфекционным материалом. Зараженные куриные эмбрионы инкубировали 48 часов при температуре  $+36^\circ\text{C}$ . Затем охлаждали 18 часов при температуре  $+4^\circ\text{C}$ , после чего собирали вирусосодержащую жидкость.

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 [7]. 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) [8].

**Очистка вируса гриппа АО/32 в градиенте сахарозы и ультрацентрифугировании при 28000 мин<sup>-1</sup>, 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 гемагглютинации;  
 ВСЖ – вирусодержащая жидкость;  
 НАЖ – нормальная аллантоисная жидкость.

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 (Инфлувак, Флюарикс, Ваксигрип) на наличие в их составе трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора, т.е. выяснить вопрос – как они очищают вирус гриппа до гомогенного состояния?

Как показали результаты исследования, вышеперечисленные вакцины, 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.

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 [9-12]. Нарушение между ферментами и ингибиторами имеет значение для развития патологических процессов [13].

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, которое нарушается при заражении вирусом гриппа А.

В инфекционном процессе наиболее глубокие изменения происходят в первые часы после заражения. Так, через 6 часов после заражения снижается количество протеиназы в легких и в сыворотке зараженных животных и возрастает ингибирующая активность [14]. 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.

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 [15]. Выделенный ингибитор похож на  $\alpha_1$ -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-Норттропа (Kunitz-Northrop), 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%). 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 расщепления 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.

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

Для выделения ингибитора трипсиноподобных протеиназ использовали отходы I-ой стадии (II+III) получения  $\gamma$ -глобулина из донорской крови человека, которые содержали значительное количество данного ингибитора. Из центрифугата (отходы) фракции (II+III) первой стадии получения  $\gamma$ -глобулина методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-53 целлюлозе (DEAE-cellulose) (фирма Watman, США) мы выделяли ингибитор трипсиноподобных протеиназ.

Данный способ позволил получить 5 изоформ, обладающих ингибиторной активностью. 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 элюатов изоформ были соответственно: I-й – 35 мл, II-й – 195 мл, III-й – 340 мл, IV-й – 440 мл, V-й – 605 мл. Наибольшее содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ было зарегистрировано во фракции V-й изоформы, которая последней 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.

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  $\gamma$ -глобулина, так как она имела самые высокие показатели активности ингибитора (132,52 г/л) и низкие показатели трипсиноподобной протеиназы (0,0027 мкмоль в пробе).

Мыши были разделены на 7 групп по 15 шт., в контрольных группах по 10 шт. (табл. 2). Животные первой группы получали смертельную дозу вируса (контроль вируса). Вирус вводили интраназально в объеме 0,05 мл под рауш-наркозом (raush-narkose). 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.

**Действие клеточного ингибитора трипсиноподобных протеиназ на выживаемость мышей, зараженных летальной дозой вируса гриппа А/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

Ингибитор и трипсин вводили интраназально под легким эфирным наркозом на протяжении семи суток. Каждая мышь получила по 140 мкг ингибитора за курс лечения.

Как показали результаты исследований, животные первой и второй группы погибли на 6-7 сутки после заражения. В третьей группе выжило 12 белых мышей (80%). Они оставались живы и на 14 сутки после заражения (срок наблюдения). Животные четвертой, пятой, шестой и седьмой групп оставались живы на протяжении всего срока наблюдения. Кроме того, вновь полученный ингибитор трипсиноподобных протеиназ, не вызывал 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 гамма-глобулина 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 [16].

### Выводы

Одной из важнейших стадий развития многих вирусов в организме хозяина является их внедрение в клетку после предварительной депротеинизации. Регуляция этого развития вируса является одним из фундаменталь-

ных принципов их репродукции. Индукция или введение ингибитора протеолитической активации вируса является одним из перспективных путей терапии вирусных заболеваний, в том числе гриппа.

### Литература

1. Дивоча В.А. Молекулярно–биологическое обоснование антипротеиназной терапии гриппа / В.А. Дивоча, В.Н. Михальчук, А.И. Гоженко // Журнал АМН України. – 2009. – Т. 15, № 1. – С. 19–21.
2. Трипсиноподобная протеиназа и ее ингибиторы в вакцинах и иммунобиологических препаратах крови / В.А. Дивоча, В.Н. Михальчук, А.И. Гоженко [и др.] // Журнал АМН України. – 2009. – Т. 15, № 3. – С. 609–625.
3. Чувствительность к ремантадину и арбидолу вирусов гриппа, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в России в сезоне 2004–2005 гг. / Е.Н. Бурцева, Е.С. Шевченко, И.А. Ленева [и др.] // Вопр. Вирусологии. – 2007. – Т. 52, № 2. – С. 24–29.
4. Противовирусная активность препаратов Ферровир и Деринап в отношении инфекции, вызванной патогенным вариантом вируса гриппа А птиц (H5N1) / П.Г. Деревин, Э.Н. Каплина, Д.Н. Носик [и др.] // Мед. каф. – 2006. – № 1. – С. 62–65.
5. Савинова О.В. Индивидуальное и совместное применение новых производных бетулина и ремантадина для ингибирования репродукции вируса гриппа / О.В. Савинова, Н.И. Павлова, Е.И. Бореко // Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. тр. – Минск: Белпринт, 2008. – Вып. 1. – С. 137–141.
6. Специфические противогриппозные химиопрепараты, обоснование их применения для профилактики и лечения в России / Е.С. Шевченко, Е.Н. Бурцева, И.А. Иванова [и др.] // Конгр. «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики у детей», Москва, 13–14 дек. 2007 г.: Тез. докл. – М., 2007. – С. 191.
7. Дивоча В.А. Клеточная протеаза вируса гриппа / В.А. Дивоча, В.И. Дегтяренко, В.Ф. Зеваков // 2–го съезд инфекционистов УССР: Тез. докл. – К., 1983. – С. 36–38.
8. Дівоча В.О. Вивчення протеолітичної активності у процесі очищення вірусу грипу шляхом центрифугування / В.О. Дівоча // Одеський медичний журнал. – 2003. – № 1. – С. 16–19.
9. Жданов В.М. Семейство Orthomyxoviridae / В.М. Жданов, С.Я. Гайдамович // Частная вирусология [руководство]. – М., 1982. – Т. 2. – С. 139–185.
10. Антигены хозяина в очищенных препаратах вируса гриппа / А.Б. Жебрун, Н.Ю. Полянская, Ф.С. Носов [и др.] // Этиология и специфическая профилактика гриппа. – Л., 1982. – С. 70–81.
11. Полянская Н.Ю. Аллантоисные неоальбуминовые компоненты цельновирионных гриппозных вакцин / Н.Ю. Полянская, А.Б. Жебрун // Хроматография в биологии и медицине : тезисы докл. науч. конф., 1983 г. – М., 1983. – С. 249–250.
12. Webster R.Q. Antigenic variations of influenza viruses / R.Q. Webster, W.Q. Zaver // The influenza viruses and influenza [E. D. Kilbourneed]. – New–York: Academic Res., 1975. – P. 209–314.

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

14. Дівоча В.О. Клітинні компоненти, асоційовані з вірусом грипу / В.О. Дівоча // Одеський медичний журнал. – 1998. – № 2 (46). – С. 8–10.

15. Спосіб одержання інгібітору трипсіноподібних протеаз / В.А. Дівоча // Патент № 23548 А Україна, МПК<sup>6</sup> А 61 К 35/00, 30.05.1997 р.

16. Інгібітор трипсіноподібних протеаз як антивірусний засіб / В.А. Дівоча // Патент № 37324 А Україна, МПК<sup>6</sup> А 61 К 31/14, 15.05.2001 р.

### **На шляху до нових антигрипозних препаратів**

**В.П. ДІВОЧА, В.М. МИХАЛЬЧУК,  
А.І. ГОЖЕНКО, О.В. ЛАГОДА**

*Запропонована нова теорія патогенеза грипу за участю протеїназно-інгібіторної системи. Встановлено, що очищення та концентрація вірусу грипу різними методами не звільняло вірус від клітинних ферментів. При інфікуванні тварин вірусом грипу відбувалось порушення ферментно-інгібіторної рівноваги, особливо у перші години після інфікування. З відходів промислового одержання гама-глобуліну виділено інгібітор трипсиноподібних протеїназ, який захистив білих мишей від смерті на 80%. Ендогенні інгібітори протеїназ крові людини є перспективними антигрипозними препаратами для людини.*

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

### **On the way to new anti-viral preparations**

**V. DIVOCHA, A. GOZHENKO,  
V. MIKHALCHUK, O. LAGODA**

*They have offered a new theory of grippе pathogenesis with participation of proteinase-inhibitory system. It has been established that purification and concentration of grippе viruses by different methods did not release the virus from cellular enzymes. At the experimental animals infecting with the virus of grippе disturbance of enzyme-inhibitory balance took place, especially during first hours after the animals being infected. It 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:** grippе, trypsin-like proteinase, inhibitor of proteinase, virus' purification, anti-viral preparations