

Y.S. Derbak

Summary. *Article shows the results of examination of 92 patients with coronary heart disease (CHD), of which 62 patients had varying degrees of intestinal dysbiosis. As the results of the studies in patients with coronary artery disease with intestinal dysbiosis were found changes of immunological status as overproduction of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines depression, combined with the degree of violation of microbiological pattern dysbiosis.*

Key words: *coronary heart disease, intestinal dysbiosis, cytokines.*

УДК 613.22:517.156:576.858/8.0947

КЛЕТОЧНЫЕ КОМПОНЕНТЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВИРУСОМ ГРИППА

В.А. Дивоча, Т.М. Кобрин, А.И. Гоженко, В.Н. Михальчук

Резюме. *В данной статье обобщены литературные данные и собственные результаты исследований, подтверждающие наличие клеточных компонентов в составе вирусной частицы.*

Ключевые слова: *протеиназы, ингибиторы, вирусы, клетка.*

Большинство известных современных структурных моделей вируса гриппа основаны на молекулярно-биологических, электронно-микроскопических и других методах исследования и сводятся к описанию известных составных компонентов вирусной частицы, месту их локализации в вирионе и объяснению установленных или предполагаемых функций [1].

Однако, если основываться на описании представленных обобщенных современных моделей вируса гриппа, то мы легко не досчитываемся ряда весьма важных в структурном и в функциональном отношении компонентов вириона, которыми являются: дериват клеточной мембраны, групповой антиген, видоспецифический антиген, гетерологический антиген Форсмана, АТФ-аза, АДФ-аза, лецитиназа, трипсиноподобная протеиназа, карбоксипептидаза В, РНК-аза, липиды, углеводы, овальбумин, гемоллизин, большинство из которых являются клеточными компонентами вируса гриппа. Речь идет об антигенах, ферментах и других компонентах вируса гриппа, которые имеют клеточное происхождение, но обнаруживаются в составе вирусной частицы [2].

К настоящему времени в составе вирусной частицы обнаружено, по меньшей мере, 13 компонентов клеточной природы.

Прежде всего, речь идет об обязательной части вириона – двухслойной липидной мембране – деривате клеточной мембраны, которая в весовом отношении составляет 24% ко всем остальным частям вируса. Липидный компонент миксовирусов, по данным различных исследователей, составляет 18,5–37,5% общего веса вириона (Косяков П.К., 1970). Эти липиды представлены фосфолипидами, гликолипидами, протеолипидами, холестерином и нейтральными жирами и содержат сравнительно большое количество аргинина и метионина [3].

Laver W.G. и Webster R.G. [4] указывают, что «хотя первые описания антигена клетки-хозяина в вирусе гриппа были встречены с некоторым скептицизмом, в настоящее время их существование установлено твердо».

Первые серологические поиски антигенов клетки хозяина в составе вируса гриппа принадлежат Knight C.A. (1944), Cohen S.S. (1944) [5].

Эти исследования суммированы в монографии Косякова П.Н. и Ровновой З.И. и сейчас можно заключить, что в составе очищенного вируса гриппа давно обнаружены антигенные компоненты, общие с антигенами клетки хозяина: это гетерогенный антиген Форсмана, антиген, подобный группспецифическому антигену А человека, и антигены, несущие видовую специфичность тех клеток, на которых вирус размножается.

Позже эти же антигены были обнаружены и в других оболочечных вирусах: орто- и парамиксовирусах.

Общепринятым считается, что миксовирусы выходят из клетки постепенно путем почкования. Это характерно для вирусов: гриппа, парагриппа, птичьих лейкозов, саркомы Рауса, группы герпеса (герпес В и простой), некоторых арбовирусов (лошадиного энцефалита).

«Выпячивания» клеточной протоплазмы заключают в себе агрегаты вирионов, которые отпочковываются от клеток вместе с фрагментами клеточной оболочки, увлекая за собой участки клеточной цитоплазмы. В результате самого механизма освобождения вируса гриппа из клетки вирус постоянно обогащается составными клеточными компонентами.

В последнее время в препаратах оболочечных РНК-содержащих вирусов обнаружено большое количество разного рода ферментативных активностей: киназной, фосфатазной, полимеразной (нуклеиновых кислот) нуклеазной и некоторых других. Объяснить наличие активностей за счет загрязнения препаратов вирусов посторонними материалами, по крайней мере в некоторых случаях, было трудно, так как были получены данные, указывающие на внут-

ренную локализацию ферментов в вирусных частицах. Разнообразие активностей делает маловероятным и вирусное происхождение соответствующих ферментов.

Впервые эта активность была обнаружена в очищенных препаратах онкорна- и рабдовирусов Strand M. и August J.T. в 1971 г. Вскоре появились другие сообщения о фосфорилировании белков некоторых вирусов в клетках и бесклеточных системах (Sokol F., Clark H.F., 1973. и др.). Фундаментальное изучение вопроса было предпринято Imblum R.L. и Wagner R.R. в 1974 г.

Нельзя не отметить, что вопрос о включении белков хозяина в состав крупных РНК-содержащих вирусов имеет довольно давнюю историю. Она началась с обнаружения в препаратах вирусов антигенных детерминант хозяина. Иногда такие результаты трактовались как указание на наличие белков хозяина в вирусных частицах. Эта точка зрения подвергалась критике по крайней мере по трем причинам. Во-первых, понятие антиген и белок не идентичны. Во-вторых, один из вариантов происхождения антигенов хозяина казался очевидным: использование клеточных гликозилтрансфераз для гликозилирования белков спайков могло приводить к образованию олигосахаридных блоков молекул белков HN и F, несущих клеточную антигенную специфичность. В-третьих, существовало мнение, что присутствие клеточных белков в препарате вируса является следствием либо недостаточной очистки, либо безразличной для вируса сорбции клеточных белков на поверхности вириона. Было опубликовано несколько работ A.-D. Klenk et al. в 1980 г., результаты которых согласовывали с этим мнением [6].

Теперь есть основание полагать, что клеточные белки все же могут поступать в вирусные частицы. Поскольку клеточные белки содержатся в сравнительно невысоких концентрациях, для их обнаружения требуется применение специальных методов (идентификация по ферментной активности, коэлектрофорез клеточных и вирусных белков, меченных разными изотопами). Однако следует заметить, что включение белков хозяина как антигенов (этот вопрос многократно дискутировался) может иметь ограниченное значение. Имеющиеся в настоящее время данные говорят о внутренней локализации клеточных белков в вирионе. Маловероятно, чтобы внутренние белки могли узнаваться или не узнаваться системами иммунитета, так как в вирусной частице они надежно экранированы липидами и их демаскирование возможно лишь внутри зараженных клеток, где возможности для их распознавания резко ограничены. Иное дело белки хозяина, локализующиеся на поверхности вириона.

Наиболее интересной и многообещающей областью изучения вируса гриппа, было бурно развивающейся и расширяющейся в последнее десятилетие и

которая во многом определила прогресс наших знаний в объяснении таких биологических функций вируса гриппа, как инфекционность, патогенность, вирулентность и другие, является изучение роли системы клеточных протеиназ и их ингибиторов при гриппе.

В составе очищенного вируса гриппа протеолитические ферменты впервые были обнаружены Д.Дж. Холландом и соавт. в 1972 году. Указанные авторы обнаружили связанные с вирусом гриппа протеиназы, но не могли решить вопрос об источнике их происхождения и в равной мере предполагали возможность их вирусного и клеточного происхождения.

В 1971 году отечественными учеными Архангельским Е.В., Косяковым П.Н., Бочаровым А.В. (1971) и Миловидовой Н.И. (1974) [7] были начаты исследования роли протеиназ и их ингибиторов при гриппе, в результате которых было установлено наличие связанной с очищенным вирусом гриппа трипсиноподобной протеиназы, которая была сходной с такой же трипсиноподобной протеиназой плазматических мембран клеток легких белых мышей.

Анализ методической части выполненных работ свидетельствует о том, что большинство из проведенных в данном направлении исследований выполнены на препаратах вируса, многократно очищенных хроматографически, повторной адсорбцией и элюцией на эритроцитах, повторным ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы [8]. Более того, появились отдельные работы, которые подтверждают, что произвести отделение хозяйских компонентов хозяина от полипептидов вируса гриппа невозможно практически даже при условии применения мощных детергентов – твина-80 и эфира, 8-октилглюкозида, додецилсульфата натрия, тритона X-100 и ряда других [9].

Нами давно обращено внимание на то, что концентрация и очистка вируса гриппа приводит к повышению протеолитической активности в препаратах очищенного и концентрированного вируса гриппа, в результате чего удельная протеолитическая активность в расчете на 1 мг белка резко возрастает [10]. Сходное явление обнаружено Жирновым О.П. и Букринской А.Г. в очищенных препаратах вируса Сендай. Установлено также, что активация протеолиза наблюдается в препаратах очищенного вируса ящура [11]. Авторы предположили, что в процессе очистки удаляются ингибиторы протеиназ, что служит причиной повышения протеолитической активности в препаратах очищенного вируса ящура [12]. Резкая активация протеолиза в результате прямого контакта препаратов очищенного вируса гриппа с очищенными скоростным центрифугированием плазматическими мембранами чувствительных к вирусу гриппа клеток легких белых мышей была обнаружена Дегтяренко В.И. и Лозицким В.А. в 1977 г.

В настоящее время отсутствуют полные сведения о перечне клеточных антигенов хозяина в составе вируса гриппа, об их количестве и функциональной биологической активности. Трудности в их изучении, кроме указанных нами выше, обусловлены также малым количественным содержанием их в составе вирусной частицы. Однако малое количественное содержание еще ни о чем не говорит, особенно, если речь идет о белках хозяина, выполняющих высокоспецифические ферментные функции.

В свете изложенных данных литературы, а также наших собственных, модель функционирующего вируса гриппа может быть построена с учетом всех известных компонентов вириона и поэтому должна содержать известный перечень «хозяйских» клеточных белков, углеводов, липидов, которые вирус гриппа получает от клетки-хозяина в процессе отпочковывания от поверхности плазматической мембраны и без которых невозможно себе даже представить нормальную физиологию вируса гриппа.

По результатам наших исследований трипсиноподобная протеиназа и ее ингибитор ассоциированы с вирусом гриппа, т.к. очистка и концентрация вируса гриппа методами ультрацентрифугирования не освобождали вирус гриппа от белков с протеиназной и ингибирующей активностью [13, 14]. Элюция и адсорбция вируса гриппа на формализованных эритроцитах показали, что протеолитическая активность связана с РНП. Протеиназа, ассоциированная с вирусом гриппа, является клеточным ферментом, поскольку иммунные сыворотки к нормальным хорионаллантоисным оболочкам нейтрализовали протеиназу в зоне 35–45% сахарозы, где локализовался очищенный вирус гриппа, а гемагглютинирующая активность сохранялась [15].

Выводы

В состав вирусной частицы входят клеточные компоненты, и с ними следует считаться при приготовлении вакцин, и противовирусных препаратов.

Литература

1. Дзюблик І.В. Віруси грипу людини та грип: сучасний погляд на етіологію та патогенез / І.В. Дзюблик, В.П. Ширококов, С.І. Клименюк // Інфекційні хвороби. – 2009. – № 4. – С. 82–95.
2. Дивоча В.А. Биологическое обоснование антипротеиназной терапии гриппа / В.А. Дивоча, А.И. Гоженко, В.Н. Михальчук – Одесса : ART-V, 2011. – 315 с.
3. Косяков П.Н. Антигенные компоненты хозяина в структуре вируса / П.Н. Косяков, З.И. Ровнова // Вопросы вирусологии. – 1965. – № 1, – С. 17–23.
4. Laver W.G. Separation of two polypeptide chains from the hemagglutination subunits of influenza virus / W.G. Laver // Virology. – 1977. – V. 45. – P. 275–280.
5. Knight C.A. A sedimentable component of allantoic fluid and its relationship to influenza viruses / C.A. Knight // J. Exp. Med. – 1944. – V. 80. – P. 83–99.

6. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2, determines proteolytic cleability and pathogenicity of avian influenza viruses / F.X. Bosh, W. Garten, H.-D. Klenk, R. Rott // *Virology*. – 1981. – V. 113. – P. 725–735.

7. Миловидова Н.И. Антигенная и иммуногенная активность компонентов вириона вируса гриппа / Н.И. Миловидова // *Вопросы вирусологии*. – 1974. – № 6. – С. 683–688.

8. Березин В.Э. Получение очищенных гликопротеидов вируса гриппа и исследование их антигенной и иммуногенной активности / В.Э. Березин, Е.С. Исаева, А.Ф. Артамонов [и др.] // *ЖМЭИ*. – 1983. – № 6. – С. 81–88.

9. Зеваков В.Ф. Клеточная протеаза вируса гриппа / В.Ф. Зеваков, В.И. Дегтяренко, В.А. Дівоча // 2-ой съезд инфекционистов УССР, 1983 г. : тезисы докл. – Донецк, 1983. – С. 36–38.

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

11. Dool T.R. Observations and implications of proteolysis in preparation of foot and mouth disease virus / T.R. Dool, T. Colen // *Develop. Bio. Stend*. – 1981. – V. 50. – P. 261–266.

12. Жирнов О.П. Расщепление гемагглютинина вируса гриппа под действиям сывроточного плазминогена в культуре клеток МДСК / О.П. Жирнов, А.Г. Букринская, А.В. Овчаренко // *Вопросы вирусологии*. – 1981. – № 6. – С. 677–687.

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

14. Дівоча В.О. Вірус грипу і ферменти клітини / В.О. Дівоча // *Експериментальна і клінічна медицина*. – 1999. – № 2. – С. 100–105.

15. Дівоча В.О. Зв'язок V-антигену і РНП вірусу грипу з протеазою / В.О. Дівоча, В.М. Михальчук // *Інфекційні хвороби*. – 2003. – № 2. – С. 27–30.

КЛІТИННІ КОМПОНЕНТИ, АСОЦІЙОВАНІ З ВІРУСОМ ГРИПУ

В.П. Дівоча, Т.М. Кобрин,
А.І. Гоженко, В.М. Михальчук

Резюме. В роботі узагальнені літературні дані та власні результати дослідження, які підтверджують наявність клітинних компонентів у складі вірусів.

Ключові слова: протеїнази, інгібітори, віруси, клітина.

CELLULAR COMPONENTS ASSOCIATED WITH THE INFLUENZA VIRUS

V.A. Divocha, T.M. Kobrin,
A.I. Gozhenko, V.N. Mikhachuk

Summary. This article summarizes the literature data and our own findings, confirming the presence of cell components in the virus particle.

Key words: proteinases, inhibitors, viruses, cell.