

УДК 613. 22:517. 156:576. 858/8.0947

ДИНАМИКА ИНГИБИТОРОВ И ПРОТЕИНАЗ НА ПЕРВОМ ЭТАПЕ ПОРАЖЕНИЯ ОРГАНИЗМА МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

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

Украинский НИИ медицины транспорта МЗУ, Одесса

В настоящем исследовании изучено действие экспериментальной гриппозной инфекции при заражении беспородных белых мышей вирусом гриппа А на изменение протеиназной активности в легочной ткани и сыворотке крови животных. Параллельно в этих материалах изучалась и активность ингибитора данных протеиназ.

Ключевые слова: вирус гриппа, трипсиноподобная протеиназа, ингибитор протеиназ

Актуальность темы

Взаимодействие вируса и клетки является собой единое целое, представляющее совокупность внутренних отношений двух противоположных начал. Конечный результат этого взаимодействия генетически определен и хозяином, и возбудителем и зависит от регуляции как процесса вирусной репродукции, так и от защитных сил организма. Баланс между этими процессами определяет исход взаимодействия, результатом которого может быть гибель хозяина, его полное выздоровление или формирование хронической формы инфекции [1-6].

Известно, что при репликации вируса гриппа синтезируется предшественник гемагглютинаина, расщепление которого на большую и малую субъединицу необходимо для приобретения вирусом инфекционной активности. Расщепление осуществляется клеточными трипсиноподобными протеиназами [7-11]. В ходе гриппозной инфекции происходит изменение специфических клеточных протеиназ, свидетельствующее о кооперативном взаимодействии вирусных белков с клеточными ферментами. По всей видимости, динамика изменения уровня протеиназ связана с репродукцией вируса и его протеолитической активацией этими же протеиназами.

Однако этот феномен мало изучен, имеются лишь сообщения [12] о снижении протеиназной активности в ранние сроки и увеличении ее в поздние сроки протекания инфекции после заражения куриных эмбрионов вирусами гриппа и Сендай [12].

Целью данной работы было изучение действия экспериментальной гриппозной инфекции у зараженных вирусами гриппа А белых мышей и куриных эмбрионов на динамику протеиназной и ингибирующей активности.

Методы исследования

В исследованиях использовали вирус гриппа А/PR/8/34(H1N1), адаптированный к легочной ткани белых мышей (вирус получен из лаборатории музейных штаммов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН). Инфекционный титр вируса составлял $7 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$. Кроме того, использовали белых беспородных мышей массой 7-9 и 16-17г. Инфицирование животных вирусом гриппа А/PR/8/34 проводили интраназально в объеме 0,05 мл под легким эфирным наркозом в разведении 10^{-2} , что соответствовало инфекционной дозе вируса 20 ЛД_{50} . Такая доза обеспечивала 100% гибель животных на 6-е сутки после заражения. Животных (по 5 мышей в каждой группе) забивали, извлекали легкие и забирали кровь через 15, 30 мин., 1,

6 ч. и далее через 1-6 дней после заражения. Легкие промывали дважды в холодном фосфатном буфере pH 7,5 и растирали в ступке, суспендировали в фосфатном буфере (1 мл на 1 легкое), гомогенизировали ультразвуком в режиме 7 на приборе High Intensity Ultrasonic Procession, Chicago, «Cole Parmel» (США), центрифугировали при 10000 об/мин. на центрифуге RC5c, фирмы «Sorvall Instruments», ротор SS-34, в течение 1 часа, при температуре +4 °С. Супернатант и сыворотку крови использовали для определения инфекционной, протеиназной и ингибирующей протеиназу активности. Активность трипсиноподобной протеиназы определяли по методу К.М. Веремеенко [13] в модификации С.В. Вовчук [14]. Определение активности ингибиторов протеиназ в гомогенатах легких и в сыворотке крови проводили казеиновым методом, предложенным А.П. Левицким [15]. Инфекционный титр вируса в легких инфицированных мышей определяли путем заражения 9-10-дневных куриных эмбрионов и выражали в Ig ЭИД₅₀/0,2мл. Реакцию гемагглютинации ставили по общепринятой методике.

Обработку полученных данных проводили при помощи программы «Microsoft®Excel».

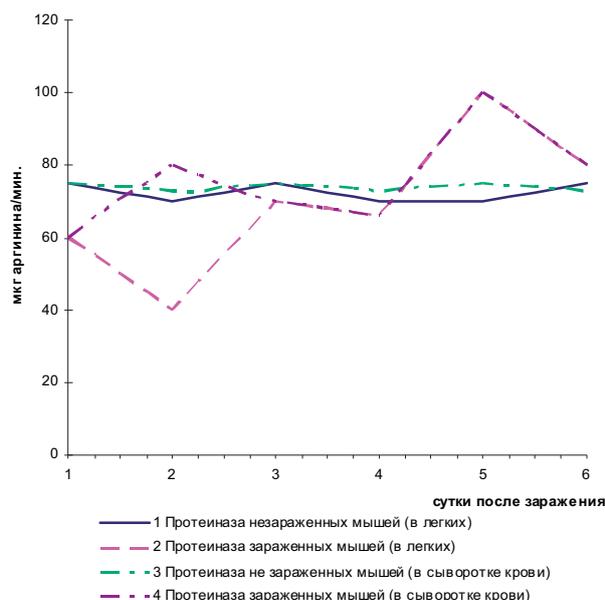


Рис. 1. Динамика изменения протеиназной активности в легких и сыворотке крови белых мышей, зараженных вирусом гриппа A/PR/8/34 в течение 6 суток (представлены суммарные данные опытов с мышами массой 6-9 г и 16-17 г).

Результаты и их обсуждения

В легких и сыворотке крови незараженных животных уровень трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора не подвергался значительным изменениям в течение периода наблюдения (6 суток) и находился в равновесии.

При интраназальном заражении мышей вирусом гриппа штаммом A/PR/8/34(H1N1) было обнаружено, что уже начиная с 15 минут и до 6 часов после заражения протеиназная активность в легких и сыворотке крови снижалась, а активность ингибитора, наоборот, повышалась, особенно в легких (рис. 1). Гемагглютинирующая и инфекционная активность в первые 6 часов после заражения не определялись.

В течение последующего периода протеиназная активность возрастала, и к 3-м суткам достигала контрольного уровня. В этот период резко увеличивалась гемагглютинирующая и инфекционная активности достигали своего максимального значения (рис. 2). К 48 часам после заражения инфекционная и гемагглютинирующая активности достигали своего максимального значения (рис. 2). К 96 часам после заражения инфекционная и гемагглютинирующая активности резко падали и начинался падеж зараженных животных. У зараженных животных, которые оставались живы к 4-м суткам после заражения отмечалось повторное увеличение протеиназной активности к 5-6-м суткам, при этом повторно увеличивалась и инфекционная и гемагглютинирующая активности. К 6-м суткам контрольные для вируса гриппа животные погибали.

Таким образом, в легких зараженных мышей имелось соответствие между накоплением инфекционного вируса и наступающим снижением протеиназной активности через 2-е суток после заражения. В то же время увеличение титра вируса на 5-е сутки в легочной ткани и сыворотке крови зараженных животных совпадало и с повышением протеиназной активности.

В поисках причин подавления протеиназной активности в 1-е сутки после

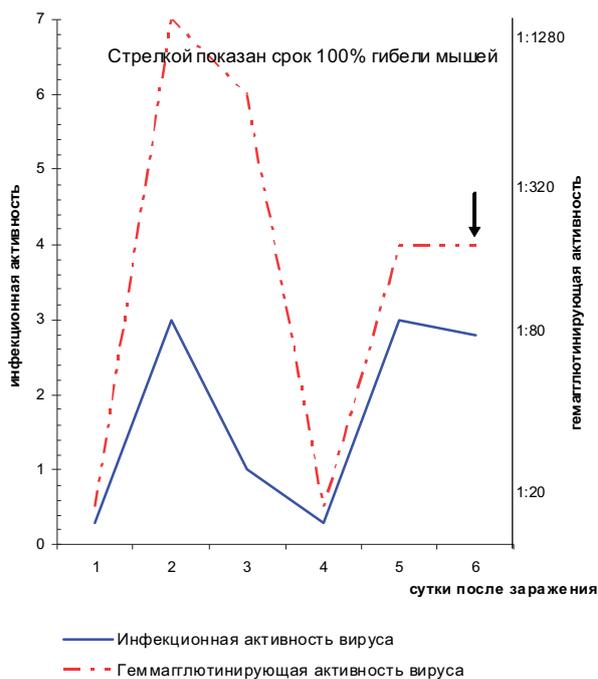


Рис. 2. Инфекционная и гемагглютинирующая активность гомогената легких белых мышей, зараженных вирусом гриппа A/PR/8/34 в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов.

заражения мы определяли ингибирующую протеиназу активность как в легочной ткани, так и в сыворотке крови белых мышей.

Как видно на рис. 3, у незараженных животных протеиназная активность и ингибирующая протеиназу активность в сыворотке крови находились на стабильном уровне. В легочной ткани ингибирующая протеиназу активность определялась в крайне незначительных количествах.

В легочной ткани и сыворотке крови зараженных животных ингибирующая протеиназу активность к 6 ч после заражения резко увеличивалась и ко 2-м суткам снижалась, а затем постепенно повышалась к 5-м суткам.

Таким образом, снижение протеиназной активности в первые часы после заражения можно объяснить увеличением ингибирующей протеиназу активности (особенно отчетливо это наблюдалось в легочной ткани зараженных мышей), а ее повышение ко 2-3-м суткам развития инфекции снижением ингибирующей активности. Однако повышение протеиназной и одновременно ингибирующей активности к 5-м суткам после заражения свидетельствует об иных причинах активации протеина-

зы в эти сроки развития инфекции.

Приведенные данные показывают, что в сыворотке крови незараженных животных уровень протеиназной активности и ингибирующей протеиназу активности находился в равновесии, которое нарушалось при заражении вирусом гриппа А. В инфекционном процессе можно выделить три периода, которые характеризуются разной степенью размножения вируса, уровнем протеиназной активности и уровнем ингибирующей протеиназу активности.

Наиболее глубокие изменения происходили в первые часы после заражения. Через 6 ч после заражения снижалось количество протеиназы как в легких, так и в сыворотке зараженных животных и возрастала ингибирующая протеиназу активность. Таким образом, можно предположить, что уменьшение протеолитической активности связано с соответствующим накоплением ингибитора протеиназы. По-видимому, зараженные вирусом гриппа клетки индуцируют появление ингибитора как в легочной ткани, так и в сыворотке крови.

Выводы

В период наибольшего накопления инфекционного вируса (2-е сутки после заражения) протеолитическая активность снижалась, однако это снижение сопровождалось уменьшением ингибиторной активности. Возможно, одной из причин является использование клеточных трипсиноподобных протеиназ для протеолитической активации вируса в легких зараженных мышей и истощением пула в организме зараженных животных. Повторное снижение протеиназной активности к 5-6 суткам вызвано другими причинами, по-видимому, присоединением бактериальной флоры.

Литература

1. Букринская А.Г., Григорьев В.Б., Кораблина Е.В. и др. // *Вопр. вирусологии*. 2010. № 1. С. 10-15.
2. Львов Д.К., Бурцева Е. И., Прилипов А. Г. и др. // *Вопр. вирусологии*. 2010. №

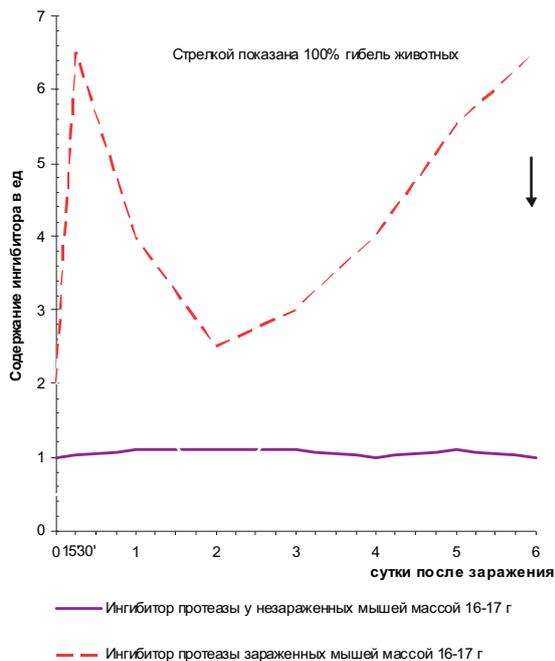


Рис. 3. Активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ в легких мышей, зараженных вирусом гриппа A/PR/8/34.

4. С. 4-8.

3. Horimoto T., Kawaoka Y. // Clin. Microbiol. Rev. 2001. Vol. 14. P. 129-149.

4. Klenk H.D., Garten W. // Trends Microbiol. 1994. Vol. 2. P. 39-43.

5. Steinhauer D.A. // J. Virology. 1999. Vol. 258. P. 1-20.

6. Zhirnov O.P., Ikizker M.R., Wright P.F. // J. Virology. 2002. Vol. 76. P. 8682-8689.

7. Zhirnov O.P., Klenk H.D. // J. Virology. 2003. Vol. 33. P. 198-212.

8. Suzuki Y. // Biol. Pharm. Bull. 2005. Vol. 28. P. 399-408.

9. Букринская А.Г. // Вопр. вирусологии. 2009. № 1. С. 4-6.

10. Chokki M., Yamamura S., Eguchi H. et al. // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2003. Vol. 30. P. 470-478.

11. Matsushima B.A., Takahashi A., Nakaya Y et al. // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 2006. Vol. 290. P. 385-395.

12. Жирнов О.П., Сырцев В.В., Воробьева И.В. и др. // Вопр. вирусологии. 2008. № 6. С. 16-20.

13. Веремеенко К.Н. // Ферменты в оториноларингологии. Киев, 1980. С. 147-149.

14. Вовчук С.В. // Биохимические методы исследования селекционного материала. Одесса, 1979. Вып. 15. С. 59-68.

15. Левицкий А.П. // Биохимические методы исследования селекционного материала. Одесса, 1979. Вып. 15. С. 68-73.

Резюме

ДИНАМІКА ІНГІБІТОРІВ І ПРОТЕІНАЗ НА ПЕРШОМУ ЕТАПІ УРАЖЕННЯ ОРГАНІЗМУ МИШЕЙ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГРИПОЗНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ
Дівоча В.А., Гоженко А.І., Михальчук В.Н.

У цьому дослідженні вивчено дію експериментальної грипозної інфекції при зараженні безпородних білих мишей вірусом грипу А на зміну протеїназної активності в легеневій тканині та сироватці крові тварин. Паралельно в цих матеріалах вивчалася активність інгібітора даних протеїназ.

Ключові слова: вірус грипу, трипсиноподібна протеїназа, інгібітор протеїназ

Summary

DYNAMICS OF INHIBITORS AND PROTEINASES ON THE FIRST STAGE OF MICE BODIES DAMAGE UNDER EXPERIMENTAL GRIPPE INFECTION

Divocha V.A., Gozhenko A.I., Mikhailchuk V.N.

In the study presented the action of experimental gripe infection at infecting of the white mice with gripe virus A and its influence on the change of proteinases' activity in the lung tissue and serum has been investigated. At the same time the activity of these proteinases activity in these materials has been studied.

Keywords: influenza virus, trypsin-like proteinases, proteinase inhibitor

Впервые поступила в редакцию 22.04.2011 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования