

О.П.Жирнов<sup>1</sup>, С.В.Поляков<sup>1</sup>, Н.А.Малышев<sup>2</sup>

## Антивирусные и противовоспалительные мишени аprotинина: перспективы нового использования

1 – НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

2 – Инфекционная клиническая больница № 1: 125367, Москва, Волоколамское ш., 63

*O.P.Zhirnov, S.V.Poyarkov, N.A.Malyshev*

## Antiviral and antiinflammatory targets for aprotinin: perspectives of novel implementation

**Key words:** respiratory infections, pathogenesis, aprotinin aerosol, influenza virus.

**Ключевые слова:** респираторные инфекции, патогенез, аэрозоль аprotинина, вирус гриппа.

### Протеолиз белков в репродукции вирусов и мишени аprotинина

Специфический протеолиз играет важную роль в регуляции функции многих структурных белков и ферментов. Этот тип протеолиза, т. н. ограниченный протеолиз, характеризуется разрезанием молекул белков в строго определенных местах (протеолитических сайтах) под действием протеаз, имеющих протеолитическую специфичность, адекватную структуре сайта. В результате белковая молекула распадается на субъединицы с измененной конформацией и новыми концевыми пептидами, что приводит к высвобождению внутримолекулярных функциональных доменов и появлению новых свойств у расщепленных белков. Очень часто результатом специфического протеолиза становится активация самих белков и соответствующих биологических процессов, и этот феномен получил название протеолитической активации.

Регуляция протеолитической активации зависит в основном от 2 факторов: наличия в молекуле-мишени характерных протеолитических сайтов и присутствия адекватных протеаз, способных распознавать и расщеплять соответствующие сайты. Протеолитические сайты расположены обычно на поверхности белковых молекул и имеют характерную последовательность аминокислот. В этой последовательности наиболее важны 2 аминокислоты, между которыми происходит разрыв, и 3–4 аминокислоты с NH<sub>2</sub>, расположенные по обе стороны от этой пары. Все известные протеазы подразделяются на 4 биохимических класса — сериновые, цистеиновые, аспартатные и металлопротеазы, которые различаются структурой каталитического сайта и механизмами гидролитического действия [1]. Адекватное взаимодействие протеолитического сайта и эффекторной протеазы лежит в основе специфичности протеолиза и активации белков-предшественников, выполняющих регуляторную роль во многих биологических процессах в организме.

В репродукции подавляющего большинства вирусов человека и животных протеолиз вирусных белков выполняет регуляторную роль. Существуют 2 основных типа вирусного протеолиза. Для 1-го из них характерно многоступенчатое расщепление (каскадный протеолиз) вирусных полипротеинов-предшественников на индивидуальные зрелые белки под действием протеаз, закодированных в геноме самих вирусов (вирусные протеазы). Каскадный протеолиз выявлен у вирусов ВИЧ, вирусов полиомиелита, риновирусов, вирусов ряда геморрагических лихорадок, опухолеродных ретровирусов и др. Второй тип протеолиза, точечный, характерен, как правило, для оболочечных вирусов (имеющих наружную липидную оболочку), у которых один из белков (расположенный обычно в липидной оболочке на поверхности вириона) подвергается протеолизу под действием специфической протеазы организма-хозяина. Точечный протеолиз выявлен у всех вирусов гриппа и парагриппа, кори и паротита, тяжелого острого респираторного синдрома, ВИЧ, вируса Эбола, респираторно-синцитиального вируса и др. Его результатом является активация вирионов, которые из неактивных (неспособных заражать клетки-мишени) трансформируются в полностью активные (инфекционные). Этот феномен, называемый протеолитической активацией вирусов, лежит в основе патогенеза вирусного заболевания и патогенных свойств многих оболочечных вирусов.

В репродукции вирусов гриппа точечному протеолитическому расщеплению подвергается поверхностный гликопротеид (гемагглютинин HA), отвечающий за внедрение вируса в клетку-мишень. Нерасщепленный белок-предшественник (HA0; м. м. 75 кД) нарезается на 2 субъединицы HA1 (50 кД) и HA2 (25 кД). Неинфекционный вирус с белком HA0 становится способным заражать клетки после расщепления HA0 на HA1 и HA2 [2, 3]. Расщепление вирусного HA0 на HA1 и HA2 осуществляется 2 типами протеаз организма-хозяина. У 1-й группы, которая охватывает все эпидемические вирусы гриппа

человека, протеолитический сайт HA0 локализован в наружной конформационной петле и содержит единственный остаток Arg, по которому происходит протеолиз [4]. В качестве эффекторных протеаз у вирусов гриппа человека рассматриваются трипсиноподобные протеазы серинового класса: триптаза Клара, секретрируемая респираторными клетками Клара [5], миниплазмин [6] и TMPRSS2 [7]. Протеолиз HA0 у таких вирусов происходит в зоне плазматической мембраны эпителиальных клеток респираторного тракта [8] либо экстрацеллюлярно в секреторной слизи респираторного тракта [9].

У 2-й группы вирусов гриппа протеолитический сайт белка HA0 содержит несколько остатков Arg и Lys (т. н. полиаргининовый сайт) и его расщепление осуществляется сериновыми фуриноподобными протеазами [10] внутриклеточно в зоне транс-Гольджи [11, 12]. Эти вирусы активируются уже в ходе синтеза и выходят из инфицированной клетки в активированной форме, что определяет их высокий патогенетический потенциал. К ним относятся вирусы гриппа птиц субтипов H5 и H7 и недавний вирус птичьего гриппа человека субтипа H5N1. Пока такие опасные вирусы гриппа представляют лишь гипотетическую масштабную угрозу для людей, поскольку в силу своей природы и адаптации к организму птиц они не способны передаваться от человека к человеку и вызывать вспышки (или эпидемии) среди людей.

Ранее была высказана идея ингибирования вирусов гриппа посредством антипротеазных агентов, способных блокировать этап протеолитической активации вируса [13]. Из этой группы соединений был выбран апротинин – природный низкомолекулярный полипептид из 58 аминокислот, выделяемый из легких крупного рогатого скота [14]. Этот выбор определялся, во-первых, тем обстоятельством, что апротинин был официальным препаратом и уже применялся у людей для лечения панкреатитов и геморрагических состояний. Во-вторых, он способен ингибировать респираторные протеазы, участвующие в активации вирусов гриппа, и подавлять репродукцию всех 3 субтипов H1–H3 эпидемических вирусов гриппа А и вирусов гриппа типов В и С [15, 16]. В экспериментах, проведенных в клеточных культурах [17, 18], в куриных эмбрионах [19, 20], на животных [21] и людях [22, 23], была доказана антивирусная и терапевтическая эффективность апротинина. Апротинин сохранял терапевтическую активность в форме аэрозоля при ингаляционном применении [24] и не оказывал каких-либо побочных действий и токсических эффектов на реципиентный организм человека или животных [22, 23, 25]. В 1994 г. аэрозоль апротинина был разрешен для клинического применения у людей в качестве антивирусного средства для лечения инфекционных и воспалительных заболеваний дыхательных путей. Механизм терапевтического действия апротинина является бинарным, поскольку, с одной стороны, направлен на ингибирование размножения вирусов (антивирусное действие), а с другой – на подавление воспаления

(противовоспалительное действие). Противовоспалительный механизм апротинина был выявлен и изучен лишь в последние годы. Его бинарная активность значительно расширяет круг инфекционных и неинфекционных патологий, при которых целесообразно его применение.

Так, для подавления вирусов, активируемых посредством расщепления полиаргининового сайта в вирусных белках, требуются ингибиторы фуриновых протеаз – эффекторов этого расщепления. Апротинин, как известно, лишен способности напрямую ингибировать протеазы этого класса и поэтому не способен блокировать репродукцию таких вирусов, к которым относится и угрожающий вирус птичьего гриппа H5N1. Однако в силу мощного противовоспалительного действия препарат способен подавлять воспалительную патологию, вызванную вирусом. Важно подчеркнуть, что именно этот тип патологии в легких, т. н. "цитокиновый шторм", лежит в основе патогенеза и летальных случаев птичьего гриппа у людей [26]. Поэтому представляется рациональным применение аэрозольной формы апротинина при этом заболевании. Апротинин способен оказывать противовоспалительное действие и при таких вирусных инфекциях респираторного тракта, как аденовирусная, респираторно-синцитиальная, парагриппозная, и сопутствующих бактериальных инфекциях [23, 25].

### Механизмы вирусного воспаления в респираторном тракте и мишени апротинина

Известно, что инфицирование респираторного тракта вирусами гриппа, парагриппа, аденовирусами, респираторно-синцитиальным вирусом и др. вызывает повреждение бронхо-легочного эпителия, которое является пусковым элементом воспаления и очень часто провоцирует последующее развитие астматического синдрома [27, 28]. Размножение вирусов ведет к повреждению назо-фарингеального и бронхиального эпителия, которое провоцирует выделение множества медиаторов воспаления, таких как фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [29, 30], интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) [31, 32], хемоаттрактант эозинофилов (эотаксин) [33], интерферон (INF) [35], белки "клеточной опасности" (DAMPs, PAMPs) [34]. Выделение медиаторов определяет последующие стадии воспаления с вовлечением клеток воспаления и развитием биохимических реакций каскадного типа (рис. 1). Воспаление при вирусных инфекциях развивается в 2 стадии [36]. На 1-й стадии усиливается первичный цитокиновый ответ клеток эпителия и единичных тканевых клеток воспаления (тучных клеток, лейкоцитов, эозинофилов), что приводит к нарушению проницаемости капилляров и выходу белков плазмы (плазминогена, тромбиногена, фибриногена) и клеток воспаления (моноцитов, лимфоцитов, эозинофилов, нейтрофилов) из кровяного русла в ткани в очаге вирусного повреждения. Такой тканевой трансплазмоз и транцитоз опосредуют вторичную возвратную волну реакций каскадного

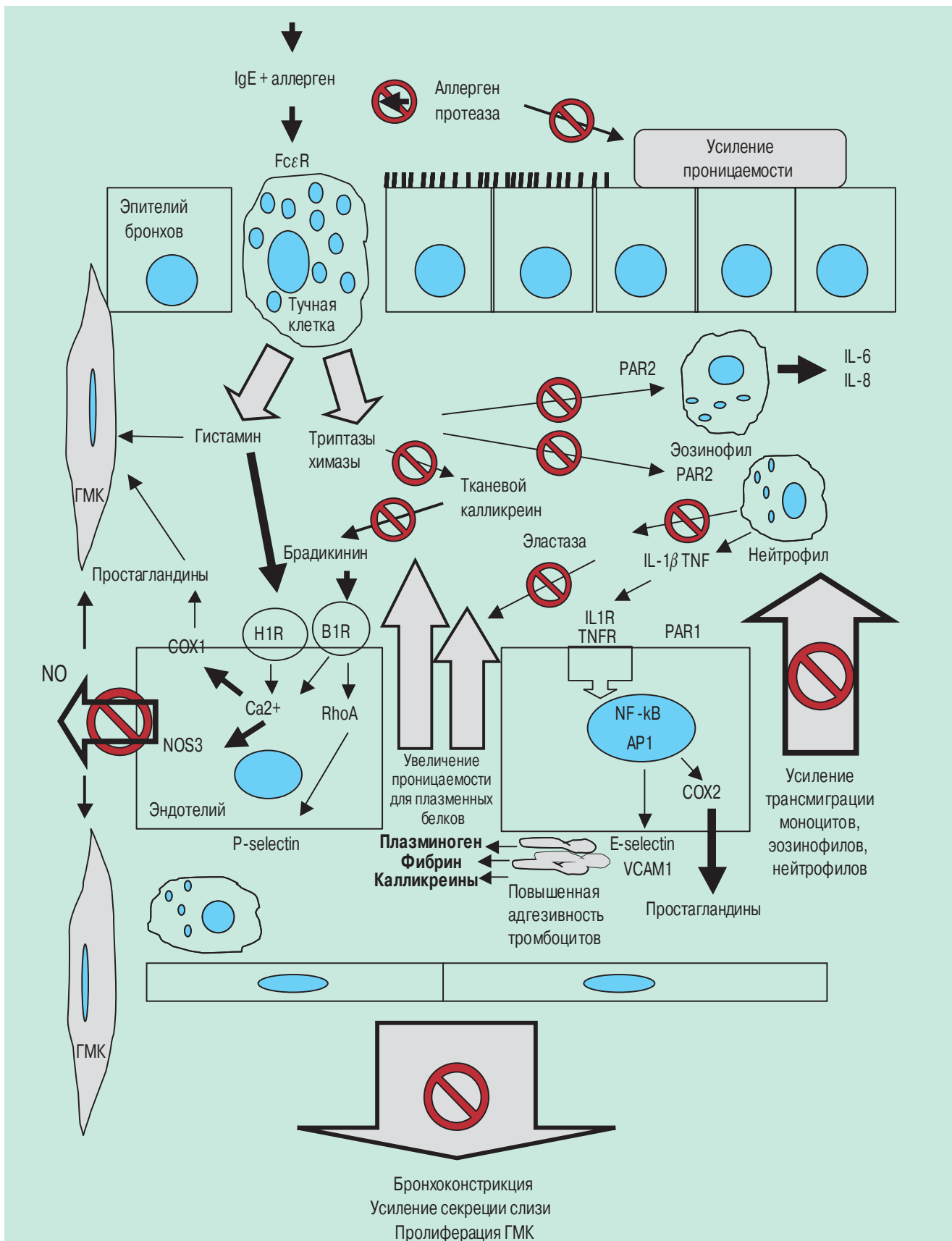


Рис. 1. Патогенетические этапы аллергического воспаления и мишени действия апротинина

Примечание: FcεR – Fc-рецептор ε к Fc-участку IgE; PAR1 – клеточный протеазоактивируемый рецептор 1; PAR2 – клеточный протеазоактивируемый рецептор 2; ГМК – гладкомышечные клетки; IL-1R – клеточный IL-1β-рецептор; TNFR – мембранный рецептор клеток для TNF-α; COX1 – циклооксигеназа-1 (конститутивная); COX2 – циклооксигеназа-2 (индуцибельная); H1R – гистаминовый рецептор 1-го типа; B1R – брадикининовый рецептор 1; RhoA – малая гуанозинтрифосфатаза, участвующая в регуляции актинового цитоскелета; NOS3 – эндотелиальная NO-синтетаза; NF-κB – транскрипционный фактор NF-κB; AP-1 – транскрипционный фактор AP-1; P-selectin – селектин, молекула адгезии на эндотелии для нейтрофилов; E-selectin – E-селектин, адгезивная клеточная молекула на поверхности эндотелия; VCAM1 – васкулярная молекула адгезии 1 на поверхности эндотелия. Запрещающим знаком (перечеркнутый круг) обозначены этапы, которые ингибирует апротинин.

типа в очаге воспаления, которая синергично усиливает первичный цитокиновый ответ. Таким образом, формируется каскадная воспалительная реакция возвратного типа (рис. 1).

К настоящему времени воздействие апротинина на многие этапы воспалительной реакции в респираторном тракте изучено довольно подробно. На рис. 1 представлены мишени действия апротинина в развитии воспаления. Как видно, апротинин обладает многоцелевым действием и блокирует ряд ключевых патогенетических этапов воспаления. В частности, он ингибирует один из инициирующих факторов воспаления — триптазу(ы) тучных клеток [37, 38], а также тромбин-зависимую активацию рецептора типа 1 (PAR1), лежащую в основе активации воспаления эндотелиальных клеток. Апротинин тормозит трансмиграцию лейкоцитов, вызывающую воспалительную инфильтрацию тканей [39], снижает выброс TNF-опосредованного IL-8 в бронхолегочном эпителии и воспалительную аккумуляцию нейтрофилов [40], блокирует тромбин-активируемую секрецию IL-6 [41], уменьшает выброс TNF- $\alpha$  [42], снижает активацию цитокинов и иммунцитов [43, 44] и цитокин-стимулирующую продукцию токсичных радикалов в тканях легкого и бронхиального эпителия [45].

Таким образом, апротинин имеет бинарный эффект. Во-первых, он может блокировать протеазозависимую активацию ряда вирусов и предотвращать начало возникновения воспалительного каскада. Во-вторых, он воздействует на ключевые этапы воспаления. В ранней фазе воспаления апротинин блокирует триптазу тучных клеток, предотвращая сцепленные с ней биохимические пути, а также подавляет гистамин-опосредованный путь воспаления на этапе торможения выработки NO-радикалов. Наиболее мощное действие он способен оказывать в поздней фазе воспаления, когда в результате трансплазмоза и транцитоза и вовлечения воспалительных клеток 2-й волны и их медиаторов в патологический процесс формируются воспалительная экссудация и клеточная инфильтрация, стойкое сужение бронхов, утолщение стенок бронхов и сосудов и сосудистое протекание [36]. Здесь апротинин ингибирует основные пути воспаления: PAR-активируемый путь, калликреин-брадикининовый и плазминовый каскады.

Таким образом, с учетом перечисленных биохимических мишеней представляется вполне обоснованным применение аэрозоля апротинина в качестве противовоспалительного средства, направленного на купирование инфекционного воспаления в респираторном тракте, а также воспалительного бронхообструктивного синдрома, нередко сопровождающего респираторные вирусные и бактериальные инфекции.

### Биохимические пути аллергического воспаления и его купирование апротинином

В последнее время появились обширные сведения о роли протеолитических процессов в развитии аллергического воспаления. Более того, получены прямые

доказательства высокой эффективности апротинина в блокировании биохимических путей, лежащих в основе патогенеза аллергического воспаления, и сделан вывод о целесообразности применения ингибиторов протеаз, в т. ч. и апротинина, при бронхиальной астме (БА) [45, 46].

В общей схеме патогенеза БА и астматического синдрома можно выделить 2 клинические фазы: медленно-раннюю и позднюю, для каждой из которых характерны свои биохимические процессы и клеточные реакции [36]. В 1-й фазе (1-я волна реакций), которая начинается сразу после контакта с аллергеном и длится 1–2 ч, происходит активация тучных клеток и базофилов посредством специфического взаимодействия с комплексом аллерген–иммуноглобулин Е. В результате, эти клетки посредством механизма дегрануляции продуцируют накопленный в гранулах гистамин, активатор тромбоцитов, хемоаттрактант эозинофилов, протеазы (триптазы), которые активируют медиаторы 1-й волны — лейкотриены и через фосфолипазу и расщепление арахидоновой кислоты запускают простагландины, липооксигеназу и подъем оксидрадикалов NO. В этой фазе развиваются в основном реактивные симптомы, такие как чихание, зуд, отек и экссудация слизистой носа, одышка, кашель, покраснения и зуд кожи [36, 47]. Во 2-й фазе, которая развивается в течение 4–6 ч, доминируют клеточные реакции (2-я волна реакций), обусловленные усилением проницаемости сосудов и инфильтрацией бронхов и легких белками плазмы и клетками воспаления — эозинофилами, нейтрофилами, моноцитами, лимфоцитами. Эти клетки выделяют множество цитокинов и медиаторов воспаления, которые многократно усиливают клеточную инфильтрацию и экссудативное воспаление [48]. Данная фаза характеризуется усилением секреции бронхиального эпителия и набуханием стенки бронхов, бронхоконстрикцией, сокращением и гиперплазией мышц стенки бронхов, усилением проницаемости стенки сосудов, системными воспалительными инфильтратами в коже.

Процесс аллергического воспаления развивается посредством следующих ключевых патогенетических механизмов (рис. 2):

- 1) аллерген-зависимая активация тучных клеток и экскреция протеаз (триптазы тучных клеток), которые активируют плазмин, металлопротеазы клеточного матрикса, кинин-брадикининовый каскад [49, 50];
- 2) активация каскадного механизма свертывания крови через фактор Хагемана, который далее активирует тканевой калликреин и повышает выработку брадикининов [51–53];
- 3) брадикинин-зависимая активация фосфолипаз, кальмодулина; активация NO-синтетазы-3 [54, 55];
- 4) активация плазмينا через тканевые активаторы плазминогена и активация плазмином металлопротеаз [56, 57];
- 5) стимуляция продукции медиаторов воспаления, таких как гистамин, лейкотриены, простагландины, IL-4, IL-5, IL-8, оксид азота (NO), TNF- $\alpha$  [58, 59];

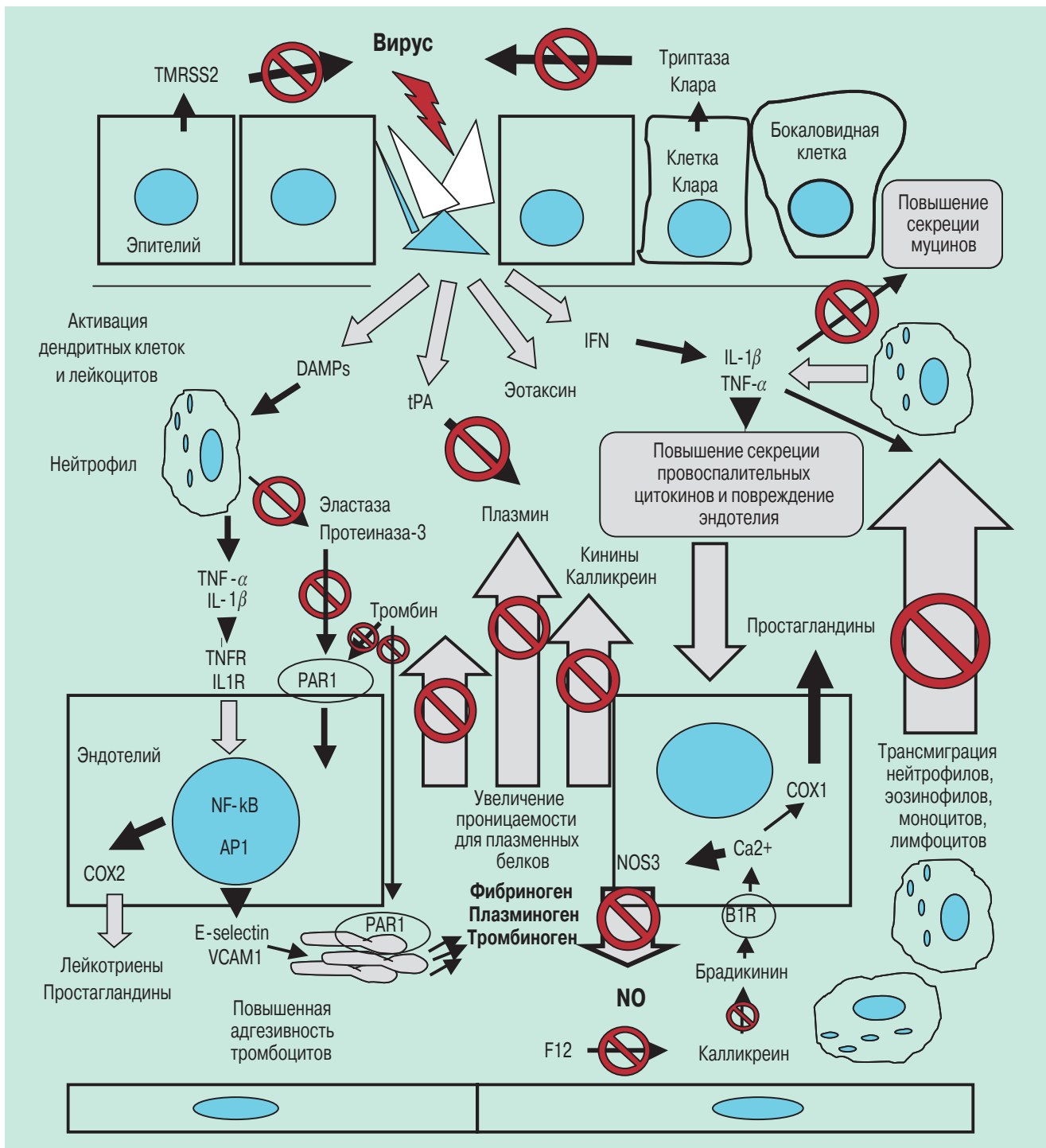


Рис. 2. Патогенетические этапы воспаления, вызванного вирусным повреждением респираторного эпителия, и мишени действия аprotинина

Примечание: DAMPs (*danger associated molecular pattern*) – молекулы опасности, секретируемые поврежденными клетками (аденозинтрифосфорная кислота, HMGB1); tPA – тканевый активатор плазминогена (протеаза); F12 – Фактор Хагемана (XII), протеаза плазматическая. Запрещающим знаком (перечеркнутый круг) обозначены этапы, которые ингибирует аprotинин.

- 6) усиление проницаемости эндотелиальных и эпителиальных клеток и отек тканей [60];
- 7) активация адгезивных свойств эндотелия для нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов через тромбин-активируемую активацию рецептора PAR1 [61, 62];
- 8) стимуляция воспалительной инфильтрации тканей эозинофилами, нейтрофилами, моноцитами, лимфоцитами [63].

Уже установлено, что аprotинин подавляет большинство перечисленных механизмов и имеет выраженный противовоспалительный эффект. Мишени противовоспалительного действия аprotинина при аллергическом воспалении показаны на рис. 2. На основании изученных мишеней было предложено использовать ингибиторы протеаз, включая аprotинин, для купирования различных типов аллергического воспаления респираторного тракта [45].



В последние годы был открыт новый механизм, показывающий, что экзогенные протеазы могут играть пусковую роль аллергенов в патогенезе аллергических реакций. Например, растительная пыльца содержит протеазы, которые способны изменять проницаемость эпителиального барьера, разрушая контакты между эпителиоцитами, и инициировать воспалительно-аллергическую реакцию [64]. В фекалиях тараканов также обнаруживаются аллергенные протеазы [65, 66]. Домашний пылевой клещ (*Dermatophagoides farinae*) выделяет протеазу, обладающую потенциалом мощного аллергена, который может провоцировать развитие астмы и аллергического синдрома [67, 68]. Также достоверно установлено, что ингибирование указанных аллергенных протеаз пыльцы и продуктов насекомых посредством апротинина предотвращает их астмогенный эффект и может купировать реинициацию аллергического приступа [69].

### Мишени апротинина в патогенезе A1AT-дефицитных состояний

Дефицит  $\alpha_1$ -антитрипсина (A1AT) является одной из причин хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) [70]. Эта патология обусловлена недостатком протеолитического ингибитора  $\alpha_1$ -антитрипсина (A1AT) и переизбытком протеаз в эпителии бронхального отдела респираторного тракта. A1AT — высокомолекулярный белок (молекулярный вес — 65 кД), способный ингибировать сериновые протеазы, такие как плазмин, трипсин, хомотрипсин, лейкоцитарная протеиназа-3 и др. [71]. Важно, что этот A1AT блокирует протеиназу-3, которая служит пусковым элементом патогенеза ХОБЛ.

Дисбаланс в физиологическом равновесии протеаз и антипротеаз ведет к активации лейкоцитарной эластазы (протеиназы-3), которая является ключевым фактором патогенеза A1AT-зависимой ХОБЛ. Основное направление в патогенетической терапии дефицита  $\alpha_1$ -антитрипсина — заместительное экзогенное (парентеральное внутривенное) введение препаратов A1AT, полученных из плазмы. Следует иметь в виду, что A1AT формирует основной пул (до 90 %) протеазоингибиторной активности в крови [72]. Однако в бронхиальной системе на долю сывороточных ингибиторов приходится только 30 %, а большую часть (~70 %) формируют ингибиторы, секретируемые слизистой оболочкой бронхов [73]. Чтобы восполнить ингибиторный дефицит в респираторном тракте, необходимо местное применение A1AT (или его аналогов) [74]. Но использование A1AT в лечении легочной патологии имеет ряд ограничений, обусловленных его структурными свойствами. Во-первых, плазменные препараты A1AT имеют низкий период активности и высокую скорость распада [75]; во-вторых, они отличаются высокой иммуногенностью и выраженным алергизирующим эффектом [76]; в-третьих, A1AT теряет активность и может агрегировать при переходе в аэрозольное состояние, приобретая нежелательную способность инициировать воспаление и эмфизему легких [70]. Поскольку ап-

ротинин лишен перечисленных недостатков, его использование в форме аэрозольных аппликаций при бронхолегочных патологиях, вызванных дефицитом A1AT, представляется более рациональным. Сообщение немецких исследователей об успешном применении ингаляций апротинина для лечения больных с ХОБЛ подтверждает это предположение [73].

Применение аэрозоля апротинина имеет ряд достоинств. Этот препарат отличается высокой структурной и функциональной стабильностью как в растворах, так и в аэрозольном состоянии. Он может доставляться в места воспаления в респираторном тракте посредством техники аэрозольных ингаляций [23, 25, 73]. Апротинин эффективно ингибирует протеазу нейтрофилов (лейкоцитарную эластазу) — ключевое звено в патогенезе ХОБЛ [77]. Благодаря своей противовоспалительной активности, он может снижать патологическую воспалительную реакцию, провоцируемую агрегированными формами A1AT, естественно возникающими при ХОБЛ [70]. Спектры протеаз, в отношении которых активны апротинин и A1AT, практически одинаковы: трипсин, хомотрипсин, плазмин, калликреин, лейкоцитарная эластаза (протеиназа-3), гранзим G, конвертаз комплемента C3 и C5 *conv* и др. [38,77], что позволяет заместить дефицит A1AT в терапии ХОБЛ апротинином. Обладая широким спектром ингибиторного действия в отношении брадикининового, плазминового, комплементного, TNF- $\alpha$ , IL-8 и других каскадов, этот препарат способен оказывать общее противовоспалительное действие в бронхах и легких (рис. 1).

Таким образом, перечисленные достоинства апротинина и его аэрозольной формы позволяют использовать его как препарат заместительного типа в лечении A1AT-дефицитной патологии респираторной системы.

### Патогенез муковисцидоза и мишени действия апротинина

Известно что мембраносвязанные протеазы регулируют ионный транспорт через протеолиз белков ионных каналов в клетках эпителия — CAP1, 2 и 3, регулирующих активность канала EnaC [78]. Повышенная активность этого канала при муковисцидозе обуславливает развитие основного патогенетического механизма — усиление секреции слизи эпителием бронхов. Ведущим механизмом здесь является повышение экспрессии мембраносвязанной протеазы простагина (синоним — PRSS8), регулирующей транспорт  $\text{Na}^+$ ; это ключевое звено в патогенезе муковисцидоза [79]. Апротинин может эффективно разорвать этот протеазозависимый путь развития муковисцидоза — доказано, что он надежно ингибирует действие простагина на ионные каналы клеток [80, 81]. Недавно было подтверждено, что применение ингаляций с A1AT значительно снижает интенсивность воспаления у больных муковисцидозом [82].

Другой механизм развития муковисцидоза — понижение вязкости слизи в бронхах. Он также регулируется мембраносвязанными протеазами через ба-

ланс соотношения  $\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$ , которое нарушается из-за мутантного муковисцидозного белка CFTR, изменяющего баланс  $\text{HCO}_3^- / \text{pH}$ , что в совокупности приводит к увеличению вязкости слизи [83]. Немаловажную роль в патогенезе муковисцидоза играют лейкоцитарные протеазы, такие как эластаза нейтрофилов и протеиназа-3, которые вследствие чрезмерной активности нарушают протеазно-антипротеазный баланс и усиливают воспалительную реакцию в бронхах. Лейкоцитарные, некоторые мембраносвязанные протеазы и простагландин, как известно, чувствительны к апротинину и являются его прямыми мишенями [84]. Применение препаратов из группы ингибиторов протеаз рекомендовано для лечения муковисцидоза [85, 86].

### Возможные побочные эффекты апротинина

Апротинин — это небольшой, состоящий из 58 аминокислот, природный полипептид, который выделяют из легких крупного рогатого скота [14]. Апротининоподобные полипептиды обнаружены во многих организмах, включая млекопитающих. У человека апротинин выявляется в качестве индивидуального домена (домен типа Куница) в составе ряда полипротеинов (белков, имеющих полидоменную структуру), таких как тканевый протеазный фактор I и II (*tissue factor pathway inhibitor I and II*), содержащий 3 апротининовых домена [87]. Ингибиторы типа апротинина у организмов разных видов, во-первых, имеют большое сходство, а, во-вторых, обладают слабой иммуногенностью. Апротинин быка и человека различаются только 2 аминокислотами в позициях 17–18 в зоне антипротеазного сайта [88]. Такое сходство объясняет низкий уровень аллергических реакций у людей — реципиентов больших доз бычьего апротинина (несколько миллионов единиц локально на операционное поле или системно в кровяное русло) при операциях на мозге и сосудах сердца [89]. По разным оценкам, уровень побочных иммунных реакций различного типа (в основном слабые реакции типа высыпаний или зуда) составлял 0,01–0,50 % [90]. Однако описаны единичные тяжелые случаи, когда реакция на апротинин протекала по анафилактическому типу с угрозой для жизни [91, 92].

В последние 5 лет обсуждается вопрос о возможных отдаленных негативных последствиях системного применения высоких доз апротинина [93]. Подобные опасения возникли после ретроспективного анализа, который выявил корреляцию с отдаленной почечной дисфункцией у больных, получавших такие дозы апротинина при операциях на сердце [94]. Однако многие авторы не поддерживают эту точку зрения, т. к. проведенные исследования не имели четких контрольных параметров по исключению фактора прогрессирования первичного заболевания сосудов. Большинство авторов склонны рассматривать возможные отдаленные почечные осложнения как следствие прогрессирования первичной сосудистой недостаточности самих почек [95]. Возможные осложнения со стороны почек могли быть свя-

заны с тем, что апротинин выводится из организма дистальными канальцами почек, и высокая концентрация экскретируемого ингибитора могла нарушать локальный протеолитический баланс в ослабленных почках. При лечении респираторной патологии ингаляциями аэрозоля апротинина такая опасность минимальна, поскольку ингаляционная дозировка апротинина более чем в 1 000 раз ниже таковой при системном применении.

*Исследование выполнено по грантам РФФИ и Немецкого научного общества DFG. Авторы выражают благодарность компании "ПЛАСТ" за поддержку данной работы.*

### Литература

1. Polgár L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol. Life Sci.* 2005; 62 (19–20): 2161–2172.
2. Klenk H.D., Rott R., Orlich M., Blödorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 1975; 68 (2): 426–439.
3. Choppin P.W., Scheid A., Mountcastle W.E. Proceedings: Paramyxoviruses, membranes, and persistent infections. *Neurology (Minneapolis)* 1975; 25 (5): 494.
4. Chen J., Lee K.H., Steinhauer D.A. et al. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 1998; 95 (3): 409–417.
5. Chen Y., Shiota M., Ohuchi M. et al. Mast cell tryptase from pig lungs triggers infection by pneumotropic Sendai and influenza A viruses. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267 (11): 3189–3197.
6. Murakami M., Towatari T., Ohuchi M. et al. Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268 (10): 2847–2855.
7. Böttcher E., Matrosovich T., Beyerle M. et al. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J. Virol.* 2006; 80 (19): 9896–9898.
8. Zhirnov O.P., Ikizler M.R., Wright P. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002; 76: 8682–8689.
9. Kido H., Chen Y., Murakami M. Cellular proteinases and viral infection: influenza virus, sendai virus, and HIV-1. In: *Proteases of infectious agents*. New York: Academic Press; 1999. 205–217.
10. Guo X.L., Li L., Wei D.Q. et al. Cleavage mechanism of the H5N1 hemagglutinin by trypsin and furin. *Amino Acids* 2008; 35 (2): 375–382.
11. Walker J.A., Sakaguchi T., Matsuda Y. et al. Location and character of the cellular enzyme that cleaves the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *Virology* 1992; 190 (1): 278–287.
12. Walker J.A., Molloy S.S., Thomas G. et al. Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *J. Virol.* 1994; 68 (2): 1213–1218.
13. Жирнов О.П., Овчаренко А.В., Букринская А.Г., Жданов В.М. Ингибиторы протеаз блокируют диссеминацию вируса гриппа в организме зараженных животных. Докл. АН СССР 1983; 270: 1483–1485.

14. Fritz H., Wunderer G. Biochemistry and application of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneimittel-Forsch. / Drug Res.* 1983; 33 (4): 479–494.
15. Goliando P.B., Ovcharenko A.V., Zhirnov O.P. Inhibition of the reproduction of the influenza B virus by aprotinin. *Vopr. Virusol.* 1992; 37 (3): 144–146.
16. Hosoya M., Matsuyama S., Baba M. et al. Effects of protease inhibitors on replication of various myxoviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36 (7): 1432–1436.
17. Жирнов О.П., Овчаренко А.В., Букринская А.Г. Расщепление гемагглютинина вируса гриппа под действием сыровоточного плазмينا в культуре клеток и ин vivo. *Вопр. вирусол.* 1981; 6: 677–687.
18. Zhirnov O.P., Ovcharenko A.V., Bukrinskaya A.G. Suppression of influenza virus replication in infected mice by protease inhibitors. *J. Gen. Virol.* 1984; 65: 191–196.
19. Жирнов О.П., Овчаренко А.В., Букринская А.Г. Подавление протеолитической активации миксовирусов в зараженных куриных эмбрионах с помощью аprotинина. *Вопр. вирусол.* 1985; 2: 204–214.
20. Zhirnov O.P., Ovcharenko A.V., Bukrinskaya A.G. Myxovirus replication in chicken embryos can be suppressed by aprotinin due to the blockage of viral glycoprotein cleavage. *J. Gen. Virol.* 1985; 66: 1633–1638.
21. Жирнов О.П., Овчаренко А.В., Букринская А.Г. Подавление ингибиторами протеаз репликации вируса гриппа в легких зараженных мышей. *Вопр. вирусол.* 1983; 3: 371–373.
22. Жирнов О.П., Киржнер Л.С., Овчаренко А.В., Малышев Н.А. Клиническая эффективность аэрозоля аprotинина при гриппе и парагриппе. *Вестн. РАМН* 1996; 5: 26–31.
23. Zhirnov O.P., Kirzhner L.S., Ovcharenko A.V., Malyshev N.A. Aerosolized aprotinin is an effective drug against viral respiratory illness. *Antiinfective Drug Chemother.* 1996; 14: 209–216.
24. Жирнов О.П., Овчаренко А.В., Голянд П.Б. и др. Антивирусный аэрозоль аprotинина: Изучение местнораздражающего и алергизирующего действия при ингаляционном введении. *Антибиотики и химиотер.* 1994; 39 (9–10): 54–59.
25. Жирнов О.П., Киржнер Л.С., Овчаренко А.В., Малышев Н.А. Патогенетическая терапия острых респираторных Заболеваний ингаляциями аprotинина. *Тер. арх.* 1995; 6: 38–42.
26. Cheung C.Y., Poon L.L., Lau A.S. et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 2002; 360 (9348): 1831–1837.
27. Atmar R.L., Guy E., Guntupalli K.K. et al. Respiratory tract viral infections in inner-city asthmatic adults. *Arch. Intern. Med.* 1998; 158 (22): 2453–2459.
28. Чучалин А.Г., Оспельникова Т.П., Осипова Г.Л. и др. Роль респираторных инфекций в обострениях бронхиальной астмы. *Пульмонология* 2007; 5: 9–15.
29. Seo S.H., Webster R.G. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells. *J. Virol.* 2002; 76 (3): 1071–1076.
30. Kiselev O.I., Vasil'eva I.A., Chepik E.B. Role of lymphokines in immune response in respiratory viral infections. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2002; 3: 84–92.
31. Schmitz N., Kurrer M., Bachmann M.F., Kopf M. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. *J. Virol.* 2005; 79 (10): 6441–6448.
32. Julkunen I., Melén K., Nyqvist M. et al. Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine* 2000; 19 (suppl. 1): S32–S37.
33. Kawaguchi M., Kokubu F., Kuga H. et al. Influenza virus A stimulates expression of eotaxin by nasal epithelial cells. *Clin. Exp. Allergy* 2001; 31 (6): 873–880.
34. Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81 (1): 1–5.
35. Ronni T., Matikainen S., Sareneva T. et al. Regulation of IFN-alpha / beta, MxA, 2',5'-oligoadenylate synthetase, and HLA gene expression in influenza A-infected human lung epithelial cells. *J. Immunol.* 1997; 158 (5): 2363–2374.
36. Jankowska R. Mechanisms of allergic inflammation in bronchial asthma. *Centr. Eur. J. Immunol.* 2003; 28 (1): 36–40.
37. He S.H., Chen H.Q., Zheng J. Inhibition of tryptase and chymase induced nucleated cell infiltration by proteinase inhibitors. *Acta Pharmacol. Sin.* 2004; 25 (12): 1677–1684.
38. Smith T.J., Houghland M.W., Johnson D.A. Human lung tryptase: purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 1984; 259 (17): 11046–11051.
39. Chakraborti S., Michael J.R., Chakraborti T. Role of an aprotinin-sensitive protease in protein kinase Calpha-mediated activation of cytosolic phospholipase A2 by calcium ionophore (A23187) in pulmonary endothelium. *Cell Signal.* 2004; 16 (6): 751–762.
40. Young R.E., Voisin M.B., Wang S. et al. Role of neutrophil elastase in LTB4-induced neutrophil transmigration in vivo assessed with a specific inhibitor and neutrophil elastase deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* 2007; 151 (5): 628–637.
41. Tüürkõz A., Cigli A., But K. et al. The effects of aprotinin and steroids on generation of cytokines during coronary artery surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2001; 15 (5): 603–610.
42. Churg A., Wang X., Wang R.D. et al. Alpha1-antitrypsin suppresses TNF-alpha and MMP-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007; 37 (2): 144–151.
43. Hill G.E., Pohorecki R., Alonso A. et al. Aprotinin reduces interleukin-8 production and lung neutrophil accumulation after cardiopulmonary bypass. *Anesth. Analg.* 1996; 83 (4): 696–700.
44. Asimakopoulos G., Thompson R., Nourshargh S. et al. An anti-inflammatory property of aprotinin detected at the level of leukocyte extravasation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2000; 120 (2): 361–369.
45. Bruda N.L., Hurlbert B.J., Hill G.E. Aprotinin reduces nitric oxide production in vitro and in vivo in a dose-dependent manner. *Clin. Sci. (Lond.)* 1998; 94 (5): 505–509.
46. Аверьянов А.В., Поливанова А.Е. Нейтрофильная эластаза и болезни органов дыхания. *Пульмонология* 2006; 5: 74–79.
47. Чучалин А.Г. (ред.). Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). М.: Изд-во "Атмосфера"; 2002.
48. Barnes P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8 (3): 183–192.
49. Pejler G., Abrink M., Ringvall M., Wernersson S. Mast cell proteases. *Adv. Immunol.* 2007; 95: 167–255.
50. Caughey G.H. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol. Rev.* 2007; 217: 141–154.
51. Kaplan A.P., Joseph K., Shibayama Y. et al. The intrinsic coagulation / kinin-forming cascade: assembly in plasma



- and cell surfaces in inflammation. *Adv. Immunol.* 1997; 66: 225–272.
52. *Renné T., Gailani D.* Role of factor XII in hemostasis and thrombosis: clinical implications. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2007; 5 (4): 733–741.
  53. *Schousboe I.* Pharmacological regulation of factor XII activation may be a new target to control pathological coagulation. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 75 (5): 1007–1013.
  54. *Bae S.W., Kim H.S., Cha Y.N. et al.* Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 306 (4): 981–987.
  55. *Venema R.C.* Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *Int. Immunopharmacol.* 2002; 2 (13–14): 1755–1762.
  56. *Myöhänen H., Vaheri A.* Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61 (22): 2840–2858.
  57. *Castellino F.J., Ploplis V.A.* Structure and function of the plasminogen / plasmin system. *Thromb. Haemost.* 2005; 93 (4): 647–654.
  58. *Takizawa H.* Bronchial epithelial cells in allergic reactions. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 2005; 4 (3): 305–311.
  59. *Mukhopadhyay S., Hoidal J.R., Mukherjee T.K.* Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir. Res.* 2006; 7: 125.
  60. *Komarova Y.A., Mehta D., Malik A.B.* Dual regulation of endothelial junctional permeability. *Sci. STKE.* 2007; 412: re8.
  61. *Hirano K.* The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27 (1): 27–36.
  62. *Landis R.C.* Protease activated receptors: clinical relevance to hemostasis and inflammation. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 2007; 21 (1): 103–113.
  63. *Kobayashi Y.* Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit. Rev. Immunol.* 2006; 26 (4): 307–316.
  64. *Hassim Z., Maronese S.E., Kumar R.K.* Injury to murine airway epithelial cells by pollen enzymes. *Thorax* 1998; 53 (5): 368–371.
  65. *Page K., Hughes V.S., Bennett G.W., Wong H.R.* German cockroach proteases regulate matrix metalloproteinase-9 in human bronchial epithelial cells. *Allergy* 2006; 61 (8): 988–995.
  66. *Lee K.E., Kim J.W., Jeong K.Y. et al.* Regulation of German cockroach extract-induced IL-8 expression in human airway epithelial cells. *Clin. Exp. Allergy* 2007; 37 (9): 1364–1373.
  67. *Platts-Mills T.A.* Allergen avoidance in the treatment of asthma and rhinitis. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349 (3): 207–208.
  68. *Pichavant M., Charbonnier A.S., Taront S. et al.* Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115 (4): 771–778.
  69. *Hughes V.S., Page K.* German cockroach frass proteases cleave pro-matrix metalloproteinase-9. *Exp. Lung Res.* 2007; 33 (3–4): 135–150.
  70. *Mulgrew A.T., Taggart C.C., McElvaney N.G.* Alpha-1-antitrypsin deficiency: current concepts. *Lung* 2007; 185 (4): 191–201.
  71. *Berninger R.W., Teixeira M.F.* Alpha 1-antitrypsin: the effect of anticoagulants on the trypsin inhibitory capacity, concentration and phenotype. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1985; 23 (5): 277–281.
  72. *Carrell R.W., Jeppsson J.O., Laurell C.B. et al.* Structure and variation of human alpha 1-antitrypsin. *Nature* 1982; 298 (5872): 329–334.
  73. *Rasche B., Marcic I., Ulmer W.T.* Effect of the protease inhibitor aprotinin on pulmonary function and on the inhibitory activity of sputum in patients with chronic obstructive bronchitis. *Arzneimittel Forsch. / Drug Research.* 1975; 25 (1): 110–116.
  74. *Stockley R.A.* Bronchiectasis – new therapeutic approaches based on pathogenesis. *Clin. Chest Med.* 1987; 8 (3): 481–494.
  75. *Vogelmeier C., Biedermann T., Maier K. et al.* Comparative loss of activity of recombinant secretory leukoprotease inhibitor and alpha 1-protease inhibitor caused by different forms of oxidative stress. *Eur. Respir. J.* 1997; 10 (9): 2114–2119.
  76. *Meyer F.J., Wencker M., Teschler H. et al.* Acute allergic reaction and demonstration of specific IgE antibodies against alpha-1-protease inhibitor. *Eur. Respir. J.* 1998; 12 (4): 996–997.
  77. *Ascenzi P., Bocedi A., Bolognesi M. et al.* The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2003; 4 (3): 231–251.
  78. *Planés C., Caughey G.H.* Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by peptidases. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2007; 78: 23–46.
  79. *Tong Z., Illek B., Bhagwandin V.J. et al.* Prostatic, a membrane-anchored serine peptidase, regulates sodium currents in JME/CF15 cells, a cystic fibrosis airway epithelial cell line. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004; 287 (5): L928–L935.
  80. *Iwashita K., Kitamura K., Narikiyo T. et al.* Inhibition of prostatic secretion by serine protease inhibitors in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14 (1): 11–16.
  81. *Shipway A., Danahay H., Williams J.A. et al.* Biochemical characterization of prostatic, a channel activating protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 324 (2): 953–963.
  82. *Griese M., Latzin P., Kappler M. et al.* Alpha-1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients. *Eur. Respir. J.* 2007; 29 (2): 240–250.
  83. *Chokki M., Yamamura S., Eguchi H. et al.* Human airway trypsin-like protease increases mucin gene expression in Airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; 30 (4): 470–478.
  84. *Voynow J.A., Fischer B.M., Zheng S.* Proteases and cystic fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008; 40 (6–7): 1238–1245.
  85. *Самсонова М.В., Черняева А.Л., Амелина Е.Л.* Патология легких при муковисцидозе. *Пульмонология* 2006; 5: 113–117.
  86. *Капранов Н.И.* Муковисцидоз – современное состояние проблемы. *Пульмонология* 2006; 5: 5–11.
  87. *Chand H.S., Foster D.C., Kisiel W.* Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thromb. Haemost.* 2005; 94 (6): 1122–1130.
  88. *Sun Z., Lu W., Jiang A. et al.* Expression, purification and characterization of aprotinin and human analogue of aprotinin. *Protein Express. Purificat.* 2009; 5: 34–40.
  89. *Sodha N.R., Boodhwani M., Bianchi C. et al.* Aprotinin in cardiac surgery. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2006; 4 (2): 151–160.
  90. *Mangano D.T., Tudor I.C., Dietzel C.* Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group; Ischemia Research and Education Foundation. The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354 (4): 353–365.

91. *Beierlein W., Scheule A.M., Ziemer G.* Anaphylactic aprotinin reaction. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69 (4):1298.
92. *Prieto García A., Villanueva A., Lain S., Baeza M.L.* Fatal intraoperative anaphylaxis after aprotinin administration. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 2008; 18 (2): 136.
93. *Hogue C.W., London M.J.* Aprotinin use during cardiac surgery: a new or continuing controversy? *Anesth. Analg.* 2006; 103 (5): 1067–1670.
94. *Székely A., Sági E., Breuer T. et al.* Aprotinin and renal dysfunction after pediatric cardiac surgery. *Paediatr. Anaesth.* 2008; 18 (2): 151–159.
95. *Furnary A.P., Wu Y., Hiratzka L.F. et al.* Aprotinin does not increase the risk of renal failure in cardiac surgery patients. *Circulation* 2007; 116 (suppl. II): II27–II33.

#### Информация об авторах

Жирнов Олег Петрович – акад. РАЕН, д. б. н., проф., руководитель лаборатории вирусного патогенеза НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН; тел.: (499) 190-30-49; e-mail: zhirnov@inbox.ru  
Поярков Станислав Владимирович – научный сотрудник лаборатории вирусного патогенеза НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН; тел.: (499) 190-30-49; e-mail: royarkov@inbox.ru  
Малышев Николай Александрович – д. м. н., проф., главный врач инфекционной клинической больницы № 1; тел.: (495) 490-14-14; e-mail: ikb\_1@mail.ru

Поступила 03.02.09  
© Коллектив авторов, 2009  
**УДК 615.281.07**