

К.М. ВЕРЕМСЕНКО, О.П. ГОЛОБОРОДЬКО, О.Й. КИЗИМ,
Г.Ф. КАРПЕНКО, Т.В. СМАГІНА

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ НЕЙТРАЛЬНИХ ПРОТЕЇНАЗ ЗАГАЛЬНОЇ ТА СПЕЦИФІЧНОЇ ДІЇ, α_1 -ІНГІБІТОРА ПРОТЕЇНАЗ, ЛІЗОЦИМУ І КАТАЛАЗИ В РОТОВОМУ СЕКРЕТІ У ПАЦІЄНТІВ З АЛЕРГІЧНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

*Лаб. біохімії (зав. – докт. біол. наук С.В. Верьовка) і від-ня запальних
захворювань ЛОР-органів (зав. – чл.-кор. АМНУ, проф. Д.І. Заболотний)
Ин-ту отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України
(дир. – чл.-кор. АМНУ, проф. Д.І. Заболотний)*

Інтерес до використання секрету з ротової порожнини як об'єкта для діагностики і прогнозу перебігу багатьох захворювань та оцінки ефективності терапії обумовлений безпечністю і простотою його отримання, що при широкому розповсюдженні СНІДу та інших вірусних хвороб має велике значення (И.В. Григорьев, А.А. Чиркин, 1998).

Ротовий секрет (змішана слина) має багатокомпонентний біохімічний склад і містить, в числі інших, різноманітні речовини білкової природи, зокрема ферменти різної специфічності дії. Серед них особливу увагу привертають протеїнази (трипсиноподібні, пепсин, еластаза, калікреїн та ін.) (С.И. Жадько, 1994; Л.М. Тарасенко и соавт, 2002; К.М. Веремєнко та співавт., 2005). Вони, як відомо, беруть участь в біохімічній стадії алергічної реакції як прямим, так і опосередкованим шляхом через активацію низки гідролітичних ферментів. Протеїнази відіграють вирішальну роль у вивільненні медіаторів алергічних реакцій – гістаміна і кінінів, котрі підвищують проникність капілярів, викликають свербіння, набряк, еритему, посилюють еміграцію лейкоцитів (К.Н. Веремєнко, 1977). Особлива роль в цих процесах належить інгібіторам протеїназ, які при запальних та алергічних реакціях виконують захисну функцію (К.Н. Веремєнко, 1980). Виражені захисні властивості притаманні також лізоциму і каталази, котрі забезпечу-

ють регуляцію неспецифічної резистентності організму (О.И. Сукманский, 1991).

Великий інтерес викликають дослідження протеолітичних ферментів при алергічних захворюваннях верхніх дихальних шляхів, особливо при алергічному риніті, оскільки слизова оболонка порожнини носа першою контактує з різноманітними алергенами зовнішнього середовища. Мета даної роботи полягала у з'ясуванні можливості використання біохімічних показників як критеріїв прогнозу та ефективності лікування хворих на алергічний риніт на основі вивчення у них в ротовому секреті загальної активності ферментів протеолізу, протеїназ з вузькою специфічністю – еластази та калікреїну, вмісту α_1 -інгібітора протеїназ, а також лізоциму і каталази.

Було обстежено 41 хворого на алергічний риніт: 11 з них перебували в стадії загострення сезонного алергічного риніту, 13 – мали хронічний цілорічний алергічний риніт, 5 – поєднання сезонного та цілорічного хронічного алергічного риніту і 12 – сполучення алергічних і запальних захворювань, в основному, органів лімфонодального кільця. Контрольна група складалась з 26 практично здорових осіб.

Дослідження проводились в цільному ротовому секреті та його рідкій частині, яку одержували з нього шляхом центрифугування при 1500 g протягом 20 хв.

В цільному ротовому секреті визначалась активність еластази за швидкістю розщеплення хромогенного субстрату Сукц-Алаз-пара-нітроаніліду і вміст α_1 -інгібітора протеїназ за здатністю гальмувати ротовим секретом гідроліз трипсином N-бензоїл-DL-аргінін-пара-нітроаніліду (К.Н. Веремеєнко, 1988; К.Н. Веремеєнко и соавт., 1991). Виразалися ці показники, відповідно, в нмоль пара-нітроаніліну за 1 год в розрахунку на 1 мг білка та в мкг інактивованого трипсину на 1 мг білка ротового секрету.

В рідкій частині ротового секрету вивчалась загальна активність нейтральних протеїназ за гідролізом ротовим секретом протамінсульфату, яка виразалась в нмоль аргініну, що відщеплювався від субстрату за 1 хв в розрахунку на 1 мг білка ротового секрету (К.Н. Веремеєнко и соавт., 1979); активність калікреїну – за гідролізом хромогенного субстрату НД-Вал-Лей-Арг-пара-нітроаніліду – в мкмоль паранітроаніліну за 1 год на 1 мг білка ротового секрету (Jenzano et al., 1987); активність кінінази – за кількістю гіпурової кислоти, яка вивільнялась після взаємодії ротового секрету з гіпурил-І-лізином, ця активність виразалась в мкмоль гіпурової кислоти за 1 год на 1 мг білка ротового секрету (К.Н. Веремеєнко, 1977); вміст лізоциму – нефелометричним методом з використанням ліофілізованого препарату *Micrococcus lysodeiacticus* – в мкг фермента в 1 мг білка ротового секрету (Zuker et al., 1970); активність каталази – йодометричним методом – в мг H_2O_2 за 1 хв на 1 мг білка ротового секрету (Г.А. Бабенко, М.Н. Гойнацкий, 1976).

Хромогенні субстрати були синтезовані старшим науковим співробітником Інституту молекулярної біології і генетики НАН А.Г. Терентьевим, проведено аналіз на чистоту і досліджені їх фізико-хімічні властивості.

Вміст білка в цільному і центрифугованому ротовому секреті визначався за методом Lowry та співавторів (1951).

Достовірність різниці біохімічних показників розраховувалась за t-критерієм Ст'юдента.

Результати дослідження активності нейтральних протеїназ і еластази та рівня α_1 -інгібітора протеїназ в ротовому секреті у

пацієнтів з алергічними захворюваннями верхніх дихальних шляхів підсумовані в табл. 1. Згідно з отриманими даними, активність нейтральних протеїназ підвищувалась у хворих порівняно з такою в контрольній групі, за винятком групи пацієнтів з сезонним алергічним ринітом. Однак статистично достовірне зростання цього показника відмічалось лише у осіб з цілорічним хронічним алергічним ринітом та при поєднанні алергічних і запальних захворювань верхніх дихальних шляхів. В першому випадку середнє значення активності нейтральних протеїназ перевищувало показник норми у 2,3 рази, а в другому – у 7,5.

Аналіз індивідуальних даних у хворих на цілорічний хронічний алергічний риніт показав, що суттєво вища активність нейтральних протеїназ порівняно з контролем була виявлена у 8 з 13 обстежених, а при сполученні алергічних і запальних захворювань – у 8 з 12.

Дослідження активності еластази – протеїнази, яка здатна розщеплювати білки сполучної тканини – колаген та еластин, а також брати участь в утворенні колагенази, показало (табл. 1), що середні її величини були статистично достовірно вищими в ротовому секреті у хворих, ніж у практично здорових людей. Суттєві зміни виявлялися і при визначенні вмісту α_1 -інгібітора протеїназ, який був знижений в ротовому секреті у всіх пацієнтів порівняно з контролем. Як свідчать отримані дані, зміни цих показників були найбільш вираженими у обстежуваних, у яких алергічні захворювання поєднувались із запальними процесами у верхніх дихальних шляхах.

В біохімічній стадії алергічної реакції важливу роль відіграють протеолітичні ферменти – калікреїн та кініназа, які беруть участь в утворенні і інактивації медіаторів алергічних реакцій – кінінів. Результати досліджень цих компонентів кінінової системи в ротовому секреті у пацієнтів з алергічними захворюваннями верхніх дихальних шляхів представлені в табл. 2. З неї видно, що активність калікреїну в середньому статистично достовірно вища у хворих всіх груп, ніж у практично здорових осіб. При сезонному та цілорічному хронічному алергічному риніті ферментативна активність

збільшується, відповідно, в 1,55 та 1,62 рази, при поєднанні сезонного і цілорічного хронічного алергічного риніту чи алергічних і запальних захворювань – в 1,89 та 1,84 рази. Активність кінінази в групах обстежуваних з сезонним алергічним ринітом, а також з цілорічним хронічним алергічним ринітом не відрізнялась від такої в контролі. В

той же час при поєднанні алергічних і запальних захворювань вона мала тенденцію до збільшення, а при одночасній наявності сезонного і хронічного цілорічного алергічного риніту значно перевищувала середній нормальний її показник, але ця зміна активності не була достовірною через розбіжності у невеликій кількості даних в цій групі.

Таблиця 1

Активність нейтральних протеїназ і еластази та рівень α_1 -інгібітора протеїназ в ротовому секреті у пацієнтів з алергічними захворюваннями верхніх дихальних шляхів

Групи обстежених	Активність нейтральних протеїназ, нмоль аргініну/ (хв·мг білка)	Активність еластази, нмоль пара-нітроаніліну / (год·мг білка)	Вміст α_1 -інгібітора протеїназ, мкг/мг білка
	M±m		
Хворі на алергічний риніт:			
цілорічний хронічний	61,0±12,5 P<0,05	21,0±5,2 P<0,05	3,1±0,6 P<0,05
сезонний	22,0±4,9	24,0±4,6 P<0,01	2,3±0,6 P<0,01
поєднання цілорічного хронічного та сезонного	35,0±8,5	28,0±4,6 P<0,05	-
Пацієнти із сполученням алергічних та запальних захворювань верхніх дихальних шляхів	197,0±54,0 P<0,05	30,0±8,3 P<0,05	1,0±0,3 P<0,01
Практично здорові люди	26,0±3,0	8,8±1,8	5,4±0,7

Примітка: P – достовірність різниці між відповідними показниками у хворих і здорових людей

Таблиця 2

Активність калікреїну і кінінази в ротовому секреті у пацієнтів з алергічними захворюваннями верхніх дихальних шляхів

Групи обстежених	Активність (M±m)	
	калікреїну, мкмоль пара-нітроаніліну/ (год·мг білка)	кінінази, мкмоль гіпурової кислоти / (год·мг білка)
Хворі на алергічний риніт:		
сезонний	1,43±0,14 P<0,002	0,68±0,11
цілорічний хронічний	1,49±0,24 P<0,05	0,70±0,10
поєднання сезонного та цілорічного хронічного	1,74±0,15 P<0,001	1,62±0,73
Пацієнти із сполученням алергічних і запальних захворювань ЛОР-органів	1,69±0,28 P<0,01	0,88±0,12 P>0,1
Практично здорові особи	0,92±0,07	0,68±0,07

Примітка: P – достовірність різниці між відповідними показниками у практично здорових осіб та у хворих

При визначенні в ротовому секреті у пацієнтів з алергічними захворюваннями верхніх дихальних шляхів лізоциму і каталази, які відіграють важливу роль в неспецифічному захисті організму від шкідливих факторів зовнішнього середовища, було отримано наступні результати (табл. 3). Середній рівень лізоциму у хворих обох груп був достовірно нижчим, ніж в контролі,

причому у обстежуваних із сполученням алергічних і запальних захворювань ЛОР-органів зменшення активності фермента було більш вираженим, ніж при цілорічному хронічному алергічному риніті (відповідно, в 2,2 та 1,4 рази). Активність каталази у хворих перевищувала таку в контролі, особливо при сполученні алергічних і запальних захворювань (в 3,0 рази).

Таблиця 3

Активність лізоциму і каталази в ротовому секреті у пацієнтів з алергічними захворюваннями верхніх дихальних шляхів

Групи обстежених	Активність (M±m)	
	лізоциму, мкг/мг білка	каталази, мг H ₂ O ₂ / (хв· мг білка)
Хворі на цілорічний хронічний алергічний риніт	8,4±1,1 P<0,05	1,40±0,25 P>0,05
Пацієнти із сполученням алергічних та запальних захворювань ЛОР-органів	5,4±1,0 P<0,01	2,80±0,18 P<0,01
Контрольна група	12,0±1,1	0,93±0,08

Примітка: P – достовірність різниці між відповідними даними в контрольній групі і у хворих

Отже, в ротовому секреті у пацієнтів з цілорічним хронічним алергічним ринітом і зі сполученням алергічних і запальних захворювань верхніх дихальних шляхів активність нейтральних протеїназ значно підвищувалась порівняно з контролем; активність еластази в ротовому секреті була вищою, ніж в нормі, а вміст α_1 -інгібітора протеїназ – суттєво знижений у всіх обстежених хворих. Активність кінінотворюючого фермента калікреїна в ротовому секреті підвищувалась як при гострій, так і при хронічній формі алергічних захворювань верхніх дихальних шляхів, при цьому спостерігається також зниження активності лізоциму і підвищення рівня каталази.

Виявлені зміни біохімічних показників в ротовому секреті – збільшення активності нейтральних протеїназ, еластази, калікреїну і каталази та зменшення активності лізоциму і вмісту α_1 -інгібітора протеїназ в більшій мірі притаманні пацієнтам, у котрих алергічна патологія обтяжується наявністю осередків запалення в ЛОР-органах.

Отримані нами дані щодо більш низьких показників активності нейтральних

протеїназ і вмісту α_1 -інгібітора протеолітичних ферментів при сезонному алергічному риніті, ніж при цілорічному хронічному алергічному риніті, співпадають зі спостереженнями К.М. Веремєєнка та співавторів (1980), котрі визначили подібну закономірність при дослідженні носового секрету в хворих з такою ж патологією. Встановлений факт можна пояснити менш тривалим контактом організму обстежуваних з алергенами при сезонному алергічному риніті і більш легким його перебігом.

Підсумовуючи результати роботи, можна зробити висновок, що у пацієнтів з алергічними захворюваннями верхніх дихальних шляхів в рото глотковому секреті спостерігається порушення балансу протеїнази – інгібітори в напрямку посилення процесів протеолізу. На підставі отриманих даних можна вважати, що клінічні ознаки цих захворювань – гіперемія, набряк слизової оболонки, посилення ексудації залоз та ін. можуть бути обумовлені, окрім інших причин, активацією протеолітичних ферментів на тлі зниження рівня їх інгібіторів.

1. Бабенко Г.А. Гойнацкий М.Н. Определение активности каталазы в эритроцитах и сыворотке йодометрическим методом // Лаб. дело. – 1976. – №3. – С. 157-158.
2. Веремеенко К.Н. Кининовая система. – Киев: Здоров'я, 1977. – 184 с.
3. Веремеенко К.Н. (ред.). Ферменты в оториноларингологии. – Киев: Здоров'я, 1980. – 182 с.
4. Веремеенко К.М., Кизим О.Й. Біохімія ротового секрету та його дослідження в клініці // Лаб. діагностика. – 2005. – №2. – С. 9-13.
5. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. - Киев: Здоров'я, 1988. – 200 с.
6. Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Терентьев А.Г. Определение активности эластазы и ее ингибиторов в сыворотке крови с помощью хромогенных субстратов // Клин. лаб. диагностика. – 1991. – №5-6. – С. 59-61.
7. Веремеенко К.Н., Волохонская Л.И., Голобородько О.П., Кизим А.И. и соавт. Методы определения ферментов слюны: Метод. рекомендации. – Киев, 1979. – С. 4-6.
8. Григорьев И.В., Чиркин А.А. Слюна как предмет лабораторной диагностики // Мед. новости. – 1998. - №4. – С. 9-12.
9. Жадько С.И. Фибринолитическая активность слизистой оболочки полости рта и слюны в норме и при патологии // Лікарська справа. – 1994. - №7-8. – С. 128-130.
10. Сукманский О.И. Биологически активные вещества слюнных желез. – Киев: Здоров'я, 1991. – 112 с.
11. Тарасенко Л.М., Суханова Г.А., Мищенко З.П., Непорада К.С. Слюнные железы (биохимия, физиология, клинические аспекты). Томск: Изд-во. НТЛ. – 2002. – 124 с.
12. Jenzano J.W., Brown C.K., Mauriello S.M. Temporal variations of glandular kallikrein, protein and amylase in mixed human saliva // Arch Oral. Biol. – 1987. – Vol. 32, N10. – P. 757-759.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J.Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, N1. – P. 265-275.
14. Zuker S., Hausis G.J., Volger W.K. Plasma muromidase a study of methods and clinical applications // J. Lab. Clin. Med. – 1970. – N1. P. 83-86.

Надійшла до редакції 19.01.07.

© К.М. Веремеенко, О.П. Голобородько, О.Й. Кизим, Г.Ф. Карпенко, Т.В. Смагіна, 2007

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ
НЕЙТРАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ ОБЩЕГО И
СПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ, α_1 -ИНГИБИТОРА
ПРОТЕИНАЗ, ЛИЗОЦИМА И КАТАЛАЗЫ В
РОТОВОМ СЕКРЕТЕ У ПАЦИЕНТОВ С
АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И.,
Карпенко Г.Ф., Смагіна Т.В. (Киев)

Резюме

В ротовом секрете у 41 больного с различными формами аллергического ринита и их сочетанием с воспалительными процессами в верхних дыхательных путях изучена активность протеолитических ферментов с широкой и ограниченной субстратной специфичностью, а также содержание защитных белков – α_1 -ингибитора протеиназ, лизоцима и каталазы. Выявлено повышение суммарной активности нейтральных протеиназ, эластазы, калликрейна, каталазы и снижение уровня α_1 -ингибитора протеиназ, лизоцима у больных по сравнению со здоровыми людьми (26 человек). Отмеченные изменения зависели от формы заболевания: они были более выраженными при сочетании аллергического ринита с воспалительными процессами в верхних дыхательных путях.

**THE ACTIVITIES OF THE GENERAL AND
SPECIFIC PROTEINASES, α_1 -PROTEINASE
INHIBITOR, LYSOZYME AND CATALASE IN
MIXED SALIVA OF THE PATIENTS WITH
INFLAMMATORY DISEASES OF THE UPPER
RESPIRATORY TRACT**

Veremeenko K. N., Kizim A. I., Goloborodyko O. P.,
Karpenko G. F., Smagina T.V. (Kiev)

Summary

The activities of the general neutral proteinases, elastase, kallikrein, kininase, lysozyme, catalase and the α_1 -proteinase inhibitor level were studied in the mixed saliva of 41 patients with chronic inflammatory diseases of the upper respiratory tract and 26 healthy individuals (control group). It was shown that the neutral proteinases, elastase, kallikrein and catalase activities in mixed saliva of all patients were higher but the levels of α_1 -proteinase inhibitor and lysozyme were lower in comparison with healthy control subjects. The data indicate on the disbalance in the system proteinase – α_1 -proteinase inhibitor in side of proteolysis intensification and the decreasing of non-specific protective enzyme – lysozyme in oral cavity. The possible role of these alterations in pathogenesis of the tonsillitis, sinusitis, pharyngitis is discussed.