

*О.П. ГОЛОБОРОДЬКО, О.Й. КИЗИМ, Г.Ф. КАРПЕНКО, Д.Д. ЗАБОЛОТНА,
В.І. НЕСТЕРЧУК, Т.В. СМАГІНА, О.Г. РИЛЬСЬКА*

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ І α_1 -ІНГІБІТОРА ПРОТЕЇНАЗ В РОТОГЛОТКОВОМУ СЕКРЕТІ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЗАПАЛЬНИМИ ТА АЛЕРГІЧНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

*Лаб. біохімії (зав. – д-р біол. наук С.В. Верьовка) і від-ня запальн. захв.
ЛОР-органів (зав. – чл.-кор. АМНУ, проф. Д.І. Заболотний) ДУ «Інститут
отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України»
(дир. – чл.-кор. АМНУ, проф. Д.І. Заболотний)*

В останнє десятиріччя особливу увагу дослідників привертає можливість використання біоактивних речовин ротоглоткового секрету (РС) для діагностики, прогнозу та оцінки ефективності лікування хворих з різними патологічними станами організму (И.В. Григорьев, А.А. Чиркин, 1998; Л.М.Тарасенко и соавт., 2002; К.М. Веремеєнко, О.Й. Кизим, 2005). Важливим компонентом РС є білки і, зокрема, протеолітичні ферменти та їх інгібітори, які відіграють ключову роль в запальних і алергічних реакціях організму (К.Н. Веремеєнко, 1977).

В літературі є поодинокі роботи, спрямовані на вивчення ролі протеїназ РС в патогенезі запальних і алергічних захворювань різних органів (К.Н. Веремеєнко, 1980; С.И. Жадько, 1994; С.В. Волкова, 2003; Hernandez et al., 1998).

Мета даного дослідження полягала у з'ясуванні інформативності показників активності протеолітичних ферментів загальної та специфічної дії і вмісту α_1 -інгібітора протеїназ (α_1 ІІІ) в РС у осіб із запальними і алергічними захворюваннями верхніх дихальних шляхів для оцінки їх перебігу та ефективності терапії.

Нами було обстежено 77 хворих до і після лікування. З них у 14 та 11, відповідно, діагностована стадія загострення хронічного фарингіту та сезонного алергічного риніту, у 23 і 17 – період ремісії хронічного тонзиліту та цілорічного алергічного риніту

і у 12 спостерігалось поєднання запальних і алергічних захворювань. В контрольну групу увійшло 27 практично здорових людей.

Об'єктом дослідження слугував як цільний РС (змішана слина), так і рідка фракція, яку одержували центрифугуванням його при 1500 г протягом 20 хв (надосадова рідина).

Цільний РС використовувався для визначення активності еластази – серинової протеїнази з колагенолітичними властивостями (К.Н. Веремеєнко и соавт., 1991) та вмісту її інгібітора- α_1 ІІІ (К.Н. Веремеєнко, 1988). Активність калікреїну і кінінази – ферментів, в результаті дії яких утворюються і розщеплюються вазоактивні поліпептиди кініни, вимірювалася в рідкій частині РС, відповідно, за методами Jenzano та співавторів (1987) і К.М. Веремеєнко (1977). Надосадову рідину використовували також для дослідження сумарної активності нейтральних протеїназ з трипсиноподібною дією (ІІРА) за гідролізом білка протамінасульфату (К.Н. Веремеєнко и соавт., 1979) та рівня лізоциму – гуморального фактора неспецифічного захисту організму (Zucker et al., 1970). Вміст білка в РС визначався за допомогою методу Lowry і співавторів (1951).

Для дослідження активності еластази, калікреїну та вмісту α_1 ІІІ науковим співробітником А.Г. Терентьєвим були синтезовані специфічні хромогенні субстрати Сукц – Ала₃ – п – нітроанлід, Д – Вал – Лей

– Арг – п – нітроанлід та N-бенз – L – аргінін – п – нітроанлід. Одержані препарати проаналізовані на чистоту, вивчені їх фізико-хімічні властивості і визначена їх ідентичність комерційним препаратам, які випускаються фірмою «Merk» (Німеччина).

Математичну обробку даних ми проводили за програмою Sigma Plot 5.0 Excel 97. Достовірність різниці середніх величин розраховувалася за t-критерієм Ст'юдента (Е.В. Гублер, 1978).

Результати виконаних біохімічних досліджень підсумовані в табл. 1. Вони свідчать про наступне.

В РС при всіх захворюваннях, за винятком сезонного алергічного риніту, ПРА перевищувала таку в контрольній групі: в найбільшій мірі (в 7,5 рази) у пацієнтів з поєднанням запальних і алергічних захворювань, в найменшій – при хронічному фарингіті (в 1,4 рази, на рівні тенденції). З одержаних даних також видно, що цей показник в РС у хворих на сезонний алергічний риніт був нижчим, ніж у осіб з цілорічним алергічним ринітом, що співпадає з даними К.М. Веремєєнка і В.М. Лосицької (1980), які виявили аналогічну закономірність для ПРА в носовому секреті при цих захворюваннях. Поясненням виявленого факту може бути менш тривалий контакт організму пацієнтів з алергеном при сезонному алергічному риніті і більш легкий його перебіг. Після проведеного лікування у обстежених, окрім хворих на сезонний алергічний риніт, спостерігалось статистично достовірне зниження протеолітичної активності до нормальних значень. В той же час при сезонному алергічному риніті вихідна ПРА практично не відрізнялась від контролю, а в кінці періоду лікування відбувалось її падіння до величини, нижчої за норму.

В усіх групах хворих активність еластази достовірно перевищувала контрольний показник в 2,4-3,5 рази, після лікування вона незначно змінювалась, але не нормалізувалась.

З таблиці також витікає, що активність калікреїну в РС в середньому статистично достовірно підвищена в 1,4-1,6 рази у всіх пацієнтів.

По закінченні курсу терапії активність цього кінінотворюючого фермента досягала

контрольної величини тільки у хворих на сезонний алергічний риніт, в усіх інших групах вона практично не відрізнялась від відповідних вихідних даних.

Аналіз результатів дослідження активності кінінази в РС показав, що у хворих на сезонний алергічний риніт вона дорівнювала такій в контрольній групі, мала тенденцію до підвищення в 1,2 рази при хронічному тонзиліті, в 1,3 рази – при цілорічному алергічному риніті і при змішаній патології. При хронічному фарингіті кініназна активність була статистично достовірно нижчою (в 1,6 рази), ніж в нормі. В кінці лікування активність фермента у хворих на сезонний алергічний риніт залишалась на рівні нормального значення, при хронічному фарингіті дещо збільшувалась, але не досягала норми, при хронічному тонзиліті та поєднанні запальної і алергічної патології спостерігалась тенденція до її зменшення, а при цілорічному алергічному риніті зниження було статистично значущим у порівнянні з вихідним показником (майже в 1,9 рази) і на рівні тенденції – відносно контрольної величини кініназної активності (в 1,4 рази).

Вміст α_1 ІІ був суттєво меншим (в 1,7-5,4 рази) при всіх запальних і алергічних захворюваннях верхніх дихальних шляхів, ніж у практично здорових людей. Проведене лікування не сприяло нормалізації цього показника: в усіх групах пацієнтів він залишався ще на досить низькому рівні.

Отримані результати також свідчать про те, що рівень лізоциму в РС у хворих на цілорічний алергічний риніт та зі змішаною патологією верхніх дихальних шляхів був достовірно нижчим, відповідно, в 1,4 та 2,2 рази, ніж в групі здорових осіб. Після лікування активність цього ферменту дещо підвищувалась (на рівні тенденції) у порівнянні з відповідними вихідними даними, але не досягала свого нормального значення.

Таким чином, результати наших досліджень показали, що загальною закономірністю для запальних і алергічних захворювань верхніх дихальних шляхів в РС до початку лікування є підвищення як сумарної активності протеїназ, так і окремих ферментів протеолізу – еластази та калікреїну, а також зменшення рівня інактиватора еластази – α_1 ІІ. Одночасне зростання еластазної

активності і послаблення дії її основного регуляторного білка свідчать про наявність дизбалансу в системі фермент-інгібітор в бік активації цього ензиму, котрому притаманна здатність руйнувати колаген, еластин та сприяти утворенню активної колагенази, що може бути причиною деструктивних процесів в слизовій оболонці ЛОР-органів. Крім того, еластаза, яку продукують деякі патогенні мікроорганізми, здатна розщеплювати пептидний зв'язок в молекулі секреторного IgA з втратою його біологічної активності, що спричиняє зменшення захисної дії секретів слизової оболонки (К.Н. Веремеєнко, 1980; О.Ф. Мельников, Д.И. Заболотный, 2003). Одержані нами дані дають також підставу вважати, що клінічні ознаки алергічних і запальних захворювань верхніх дихальних шляхів – гіперемія, набряк слизової оболонки, посилення ексудації залоз та ін. можуть бути обумовлені, серед інших причин, активацією ферменту калікреїна, що призводить до утворення підвищеної кількості вазоактивних кінінів – медіаторів запальних та алергічних реакцій. Найбільшою мірою активація калікреїн-кінінової системи виражена у хворих на хронічний фарингіт, коли на тлі підвищеної активності калікреїна спостерігається зменшення активності кінінази – ферменту, який гідролізує кініни, котрі утворюються після дії калікреїна на відповідний субстрат. При алергічних захворюваннях ЛОР-органів визначається зниження в РС вмісту лізоциму, що є ознакою послаблення механізмів неспецифічного гуморального захисту організму, яке більш виражене у пацієнтів при поєднанні алергічних захворювань із запальними.

Позитивні клінічні результати супроводжувались наступними змінами досліджуваних показників. Відразу після закінчення лікування ПРА знижувались до нор-

мальних значень в усіх групах хворих, за винятком пацієнтів з сезонним алергічним ринітом, у котрих вона ставала навіть нижчою за норму. При цьому захворюванні відмічалась також нормалізація активності калікреїна, тоді як у обстежуваних інших груп вона залишалась високою, практично на рівні відповідних вихідних показників. При всіх патологічних станах деяке зменшення активності еластази в порівнянні з даними до лікування відбувалось на рівні тенденції, а вміст її інгібітора був в основному низьким і практично не відрізнявся від такого до початку терапії, тобто залишався дизбаланс в системі еластаза – α_1 PI, що свідчить про збереження її активного стану. Активність кінінази в більшості випадків була нижчою від даних контролю, і тільки у хворих на цілорічний алергічний риніт на тлі підвищеної активності калікреїна після закінчення лікування спостерігалось значне її зниження, що є свідченням активації калікреїн-кінінової системи. Лікування пацієнтів з алергічними захворюваннями верхніх дихальних шляхів не призвело до нормалізації рівня лізоциму, тобто неспецифічна резистентність організму залишалась ще зниженою.

На основі отриманих даних можна вважати, що відповідні терапевтичні заходи, які призводили до покращання клінічного стану хворих, відразу після закінчення курсу лікування не спричиняли нормалізації більшості біохімічних показників, що в подальшому могло сприяти переходу запальних і алергічних процесів у верхніх дихальних шляхів в хронічні. Отже, дослідження біоактивних компонентів у РС таких пацієнтів можна вважати цінним неінвазивним способом оцінки їх стану і ефективності проведеного лікування.

Активність протеолітичних ферментів, вміст α_1 ІІІ та лізоциму в ротоглотковому секреті у пацієнтів із запальними та алергічними захворюваннями до і після лікування

Захворювання	Досліджувані показники (M \pm m)					α_1 -інгібітор протеїназ, мкг/мг білка	лізоцим, мкг/мг білка
	ПРА, нмоль аргініну / (хв · мг білка)	еластаза, нмоль п-нітроаніліну / (год·мг білка)	капкреїн, мкмоль п-нітроаніліну / (год· мг білка)	кініназа, мкмоль гіпурової кислоти / (год · мг білка)			
Хронічний тонзиліт в стадії ремісії	$53,0 \pm 7,2$ $32,0 \pm 4,0$ P<0,001 P ₂ <0,02	$31,0 \pm 5,7$ $17,0 \pm 3,5$ P<0,001 P ₁ <0,05 P ₂ <0,05	$1,44 \pm 0,11$ $1,56 \pm 0,33$ P>0,01 P ₁ >0,1	$0,80 \pm 0,14$ $0,58 \pm 0,15$ P<0,2 P ₂ >0,2		$1,0 \pm 0,3$ $1,4 \pm 0,5$ P<0,001 P ₁ <0,001	-
Хронічний фарингіт в стадії загострення	$37,0 \pm 7,6$ $17,3 \pm 4,1$ P>0,1 P ₂ <0,05	$25,0 \pm 3,9$ $14,6 \pm 5,3$ P<0,01 P ₁ >0,2 P ₂ >0,2	$1,43 \pm 0,12$ $1,30 \pm 0,16$ P<0,02 P ₁ >0,1	$0,42 \pm 0,05$ $0,52 \pm 0,10$ P<0,02 P ₂ >0,2		$2,0 \pm 0,6$ $2,0 \pm 0,5$ P<0,001 P ₁ <0,001	-
Сезонний алергічний риніт в стадії загострення	$22,0 \pm 4,9$ $10,0 \pm 3,8$ P>0,2 P ₁ <0,05 P ₂ >0,05	$24,0 \pm 4,6$ $18,6 \pm 3,6$ P<0,01 P ₁ <0,05 P ₂ >0,2	$1,43 \pm 0,14$ $0,97 \pm 0,12$ P<0,05 P ₂ <0,05	$0,68 \pm 0,11$ $0,66 \pm 0,12$		$2,3 \pm 0,6$ $1,0 \pm 0,4$ P<0,001 P ₁ <0,001 P ₂ >0,05	-
Цілорічний алергічний риніт в стадії ремісії	$61,0 \pm 12,5$ $21,5 \pm 9,0$ P<0,01 P ₂ <0,05	$21,0 \pm 5,2$ $16,6 \pm 6,0$ P<0,05 P ₁ >0,2 P ₂ >0,5	$1,56 \pm 0,18$ $1,39 \pm 0,08$ P<0,02 P ₁ <0,01	$0,88 \pm 0,18$ $0,47 \pm 0,07$ P>0,2 P ₂ <0,05		$3,1 \pm 0,6$ $2,1 \pm 0,4$ P<0,02 P ₁ <0,001 P ₂ >0,1	$8,4 \pm 1,1$ $9,2 \pm 0,5$ P<0,05
Послання алергічних та запальних захворювань	$197,0 \pm 54,0$ $26,0 \pm 6,8$ P<0,01 P ₂ <0,01	$30,0 \pm 8,3$ $26,0 \pm 10,3$ P<0,02 P ₁ >0,1	$1,74 \pm 0,30$ $1,56 \pm 0,19$ P<0,05 P ₁ <0,02	$0,88 \pm 0,12$ $0,58 \pm 0,18$ P>0,1 P ₂ >0,1		$1,0 \pm 0,3$ $2,2 \pm 0,3$ P<0,001 P ₁ <0,001 P ₂ <0,02	$5,4 \pm 1,0$ $6,3 \pm 1,3$ P<0,01
Практично здорові люди	$26,0 \pm 3,0$	$8,8 \pm 1,8$	$1,06 \pm 0,08$	$0,67 \pm 0,08$		$5,4 \pm 0,7$	$12,0 \pm 1,1$

Примітки:

1. Чисельник - дані до лікування, знаменник – після лікування.
2. P – достовірність різниці між даними контрольної групи та у хворих до лікування.
3. P₁ – достовірність різниці між контрольними показниками і даними у хворих після лікування.
4. P₂ – достовірність різниці між відповідними даними у хворих до і після лікування.

1. Веремеенко К.Н. Кининовая система. – Киев: Здоров'я, 1977. – 182 с.
2. Веремеенко К.Н. (ред.). Ферменты в оториноларингологии. – Киев: Здоров'я, 1980. – 181 с.
3. 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.
4. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. – Киев: Здоров'я, 1988. – 198 с.
5. Веремеенко К.М., Кизим О.Й. Біохімія ротового секрету та його дослідження в клініці // Лаб. діагностика. – 2005. – №2. – С. 9-12.
6. Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Терентьев А.Г. Определение активности эластазы и ее ингибиторов в сыворотке крови с помощью хромогенных субстратов // Клини. лаб. диагностика. – 1991. – №5-6. – С. 59-61.
7. Волкова С.В. Вивчення специфічних протеїназ та їх інгібіторів у змішаній слині дітей з різним ступенем тяжкості хронічного катарального гігнівіту // Лаб. діагностика. – 2003. – №4. – С. 11-14.
8. Григорьев И.В., Чиркин А.А. Роль биохимического исследования слюны в диагностике заболеланий // Клини. лаб. диагностика. – 1998. – №6. – С. 18-20.
9. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – М.: Медицина, 1978. – 296 с.
10. Жадько С.И. Фибринолитическая активность слизистой оболочки полости рта и слюны в норме и при патологии // Лікарська справа. – 1994. – №7-8. – С. 128-130.
11. Мельников О.Ф., Заболотный Д.И. Диагностика иммунодефицитов при патологии слизистой оболочки на основе определения иммуноглобулинов в секретах. – 2003. – 30 с.
12. Тарасенко Л.М., Суханова Г.А., Мищенко В.П., Непорада К.С. Слюнные железы. Биохимия, физиология, клинические аспекты. – Томск: Изд. НТЛ, 2002. – 124 с.
13. Hernandez C.C., Donadi E.A., Reis M.L. Kininogen-kallikrein system in plasma and saliva of patients with Sjogren's syndrome // J. Rheumatol. – 1998. – Vol. 25, N 2. – P. 2381-2384.
14. 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, N 10. – P. 757-759.
15. 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, N 1. – P. 263-275.
16. Zucker S., Hauses G.J., Volger W.K. Plasma muromidase a study of methods and clinical applications // J. Lab. Clin. Med. – 1970. – N 1. – P. 83-86.

Надійшла до редакції 30.01.09.

© О.П. Голобородько, О.Й. Кизим, Г.Ф. Карпенко, Д.Д. Заболотна, В.І. Нестерчук, Т.В. Смагіна, О.Г. Рильська, 2009

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И
 α_1 -ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗ В
РОТОГЛОТОЧНОМ СЕКРЕТЕ ПАЦИЕНТОВ С
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ И АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ
ПУТЕЙ**

*Голобородько О.П., Кизим А.И., Карпенко Г.Ф.,
Заболотная Д.Д., Нестерчук В.И., Смагина Т.В.,
Рильская О.Г. (Киев)*

Резюме

В ротоглоточном секрете у лиц с воспалительными и аллергическими заболеваниями верхних дыхательных путей как в стадии обострения, так и в периоде ремиссии выявлена активация системы протеолиза и снижение уровня лизоцима. Сразу после окончания лечения нормализации большинства исследуемых показателей не наблюдалось. Обсуждается возможность использования биохимических компонентов ротоглоточного секрета для характеристики состояния больных и оценки эффективности их лечения.

**THE INVESTIGATION OF THE PROTEOLYTIC
ENZYME ACTIVITY AND α_1 -PROTEINASE
INHIBITOR LEVEL IN OROPHARYNGEAL
SECRET OF THE PATIENTS WITH
INFLAMMATORY AND ALLERGIC DISEASES
OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT**

*Goloborod'ko O.P., Kyzym A.I., Karpenko G.F.,
Zabolotnaya D.D., Nesterchuk V.I.,
Smagina T.V., Rylskaya O.G. (Kiev)*

Summary

Proteolysis system activation and lysozyme level decrease take place in oropharyngeal secret both in the acute stage and remission of the inflammatory and allergic upper airways diseases. The normalization of the most investigated ingredients in the early period after treatments were not observed. The possibility of the using of saliva biochemical components for the characteristic diseases course and effectiveness of therapy is discussed.