

## АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С СИМПТОМАМИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

**Вступление.** В работе рассмотрены вопросы относительно использования секреторной жидкости ротовой полости в качестве объекта для прогноза и диагностики многих заболеваний и оценки эффективности терапии, интерес к чему обусловлен безопасностью и простотой его получения, что при широком распространении вирусных заболеваний имеет большое практическое значение. Ротовой секрет (смешанная слюна) с многокомпонентным биохимическим составом содержит разнообразные вещества белковой природы, в частности ферменты с разной специфичностью действия. Протеиназы играют определяющую роль в освобождении медиаторов воспалительных и аллергических реакций – гистамина и кининов, которые повышают проницаемость капилляров, вызывают зуд, отек, эритему, усиливают миграцию лейкоцитов. Особое значение в этих процессах имеют ингибиторы протеиназ, которые при воспалительных и аллергических реакциях выполняют защитную функцию.

**Цель исследования** – выяснить возможность использования биохимических показателей в качестве критериев прогноза и эффективности лечения пациентов с гриппом и другими острыми респираторными вирусными инфекциями на основе определения в ротовом секрете общей активности ферментов протеолиза, трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов, а также содержания белка.

**Методы исследования.** Было использовано биохимические и статистические методы исследования. Обследовано 67 лиц, из них 46 практически здоровых людей (контрольная группа) и 21 пациента с симптомами острых респираторных вирусных инфекций на 3–7 дни после начала заболевания. Их разбили на 3 возрастные группы.

**Результаты и обсуждение.** В ротовой жидкости практически здоровых людей в возрасте от 18 до 50 лет содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ было практически одинаковым и составило  $(29,30 \pm 1,98)$  ед./мл. У пациентов 3-й возрастной группы (с 51 года и старших) оно увеличилось до  $(32,15 \pm 2,31)$  ед./мл, а активность протеиназы снизилась до  $(0,012 \pm 0,001)$  ед./мл.

**Выводы.** У пациентов в возрасте от 18 до 30 лет с симптомами острых респираторных вирусных инфекций наблюдали увеличение содержания ингибитора трипсиноподобных протеиназ, в то время как в старшей возрастной группе (более 50 лет) его активность снижалась. Во 2-й возрастной группе (30–50 лет) активность трипсиноподобных протеиназ повышалась.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ротовая жидкость; ингибиторы трипсиноподобных протеиназ; грипп; острые респираторные вирусные инфекции.

**ВСТУПЛЕНИЕ.** Интерес к использованию секреторной жидкости ротовой полости в качестве объекта для прогноза и диагностики многих заболеваний и оценки эффективности терапии обусловлен безопасностью и простотой его получения, что при широком распространении вирусных заболеваний имеет большое практическое значение [1, 2].

Ротовой секрет (смешанная слюна) имеет многокомпонентный биохимический состав и содержит разнообразные вещества белковой природы, в частности ферменты с разной специфичностью действия. Среди них особенное

© Н. А. Мамедалиев, В. А. Дивоча, 2017.

внимание вызывают протеиназы (трипсиноподобные, пепсин, эластаза, калликреин и др.) [3–5]. Они участвуют в биохимической стадии расщепления белков как прямым, так и опосредованным путем через активацию ряда гидролитических ферментов. Протеиназы играют определяющую роль в освобождении медиаторов воспалительных и аллергических реакций – гистамина и кининов, которые повышают проницаемость капилляров, вызывают зуд, отек, эритему, усиливают миграцию лейкоцитов [6]. Особое значение в этих процессах имеют ингибиторы протеиназ, которые при воспалительных и аллергических реакциях выполняют защитную функцию [7].

Большой интерес вызывают исследования протеолитических ферментов при вирусных заболеваниях верхних дыхательных путей, особенно при гриппе и других острых респираторных вирусных инфекциях (ОРВИ), поскольку слизистая оболочка полости носа первой контактирует с вирусами и другими факторами внешней среды.

Цель исследования – выяснить возможность использования биохимических показателей в качестве критериев прогноза и эффективности лечения пациентов с гриппом и другими ОРВИ на основе определения в ротовом секрете общей активности ферментов протеолиза, трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов, а также содержания белка.

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Было обследовано 67 лиц, из них 46 практически здоровых людей (контрольная группа) и 21 пациента с симптомами ОРВИ на 3–7 дни после начала заболевания. Средний возраст пациентов составил 35 лет, из них 21 мужчина и 46 женщин.

Исследования проводили в цельном ротовом секрете, в котором по гидролизу протамина сульфата определяли активность трипсиноподобных протеиназ, выраженную в микромолях аргинина, за 1 мин инкубации в 1 мл ротовой жидкости. Содержание ингибитора трипсина определяли казеиновым методом А. П. Левицкого [8] и оценивали по торможению гидролиза

казеина кристаллическим трипсином, 1 единица ингибитора соответствовала 1 мкг кристаллического трипсина в 1 мл ротового секрета. Содержание белка в ротовом секрете определяли общепринятым методом О. Н. Lowry [9].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Результаты исследований, представленные в таблице 1, показали, что в ротовой жидкости (смешанной слюне) практически здоровых людей содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ составило в среднем  $(29,76 \pm 2,11)$  ед./мл. Разброс показателей ингибитора трипсина колебался от 15,04 до 56,06 ед./мл.

Активность трипсиноподобных протеиназ была незначительной и составляла от 0,0001 до 0,040 ед./мл, в среднем –  $(0,019 \pm 0,0016)$  ед./мл (1 микромоль аргинина за 1 мин инкубации в 1 мл ротовой жидкости). Содержание белка в ротовой жидкости в среднем составило  $(3,35 \pm 0,24)$  мг/мл.

Содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ в ротовой жидкости больных с острыми респираторными вирусными инфекциями увеличилось и составило в среднем  $(35,11 \pm 2,87)$  ед./мл (табл. 2). Разброс содержания составлял от 16,27 до 62,60 ед./мл. Активность трипсиноподобных протеиназ у больных повысилась и составила в среднем  $(0,033 \pm 0,0027)$  ед./мл. Ее колебания составляли от 0,003 до 0,126 ед./мл. Отбор ротовой жидкос-

Таблица 1 – Активность трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора в ротовой жидкости здоровых людей (распределение по возрасту)

Группа	Возраст, лет	Условно-здоровые		
		белок, мг/мл	ИТ, ед./мл*	АП, ед./мл**
1-я	18–30	$3,47 \pm 0,25$ (n=38)	$29,30 \pm 1,98$ (n=25)	$0,028 \pm 0,0023$ (n=4)
2-я	31–50	$2,92 \pm 0,27$ (n=8)	$29,92 \pm 2,15$ (n=8)	$0,024 \pm 0,0019$ (n=9)
3-я	>51	$3,82 \pm 0,26$ (n=3)	$32,15 \pm 2,31$ (n=3)	$0,012 \pm 0,0010$ (n=8)

Примечания. Тут и в таблицах 2–4:

1. ИТ – содержание ингибитора трипсина в пробе, ед./мл. \* – 1 ед. ингибитора соответствует 1 мкг кристаллического трипсина.

2. АП – активность фермента – трипсиноподобной протеиназы, ед./мл. \*\* – за 1 ед. активности принимают количество фермента, вызывающее образование 1 микромоля аргинина за 1 мин инкубации.

Таблица 2 – Активность трипсиноподобной протеиназы, содержание ингибитора и белка в ротовой жидкости пациентов с симптомами острых респираторных вирусных инфекций (распределение по возрасту)

Группа	Возраст, лет	Больные		
		белок, мг/мл	ИТ, ед./мл*	АП, ед./мл**
1-я	18–30	$2,79 \pm 0,22$ (n=6)	$41,00 \pm 3,51$ (n=6)	$0,020 \pm 0,0017$ (n=3)
2-я	31–50	$3,73 \pm 0,23$ (n=13)	$32,45 \pm 2,32$ (n=12)	$0,037 \pm 0,0028$ (n=13)
3-я	>51	$4,67 \pm 0,34$ (n=3)	$26,44 \pm 1,87$ (n=1)	$0,023 \pm 0,0019$ (n=3)

ти (смешанной слюны) у пациентов с ОРВИ проводили на 3–7 сутки после начала заболевания. Можно предположить, что происходило увеличение активности ингибитора трипсиноподобных протеиназ, связанное с развитием воспалительного процесса, вызванного вирусом. Необходимо было определить содержание ингибитора трипсина в ротовой жидкости в первые 24 ч после начала заболевания, что являлось затруднительным, т. к. больные обращались в поликлинику через 3–5 дней после начала болезни, когда сами не могли справиться с симптомами ОРВИ (высокая температура тела, насморк, кашель и др.). Содержание белка у пациентов с ОРВИ в среднем составило  $(3,57 \pm 0,29)$  мг/мл и незначительно отличалось от показателя контрольной группы.

Пациентов разбили на 3 возрастные группы. Результаты исследования показали, что в ротовой жидкости практически здоровых людей в возрасте от 18 до 50 лет содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ практически одинаковое и составило  $(29,30 \pm 1,98)$  ед./мл. В группе пациентов 3-й возрастной группы (с 51 года и старших) содержание ингибитора увеличилось до  $(32,15 \pm 2,31)$  ед./мл, а активность протеиназы снизилась до  $(0,012 \pm 0,001)$  ед./мл.

У пациентов с признаками ОРВИ в 1-й возрастной группе (от 18 до 30 лет) содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ увеличилось в 1,5 раза и составило  $(41,0 \pm 3,51)$  ед./мл,

в то время как в 3-й возрастной группе оно уменьшилось до  $(26,44 \pm 1,87)$  ед./мл. Во 2-й возрастной группе (31–50 лет) наблюдали повышение активности трипсиноподобной протеиназы до  $(0,037 \pm 0,0028)$  ед./мл. В 1-й и 3-й группах она практически не изменилась –  $0,020$ – $0,023$  ед./мл.

На следующем этапе исследования мы провели анализ наличия протеолитических ферментов и их ингибиторов в ротовой жидкости пациентов, разделенных по половому признаку.

Результаты исследования показали, что у практически здоровых женщин и мужчин (табл. 3) содержание ингибитора трипсина в ротовой жидкости отличалось незначительно.

В таблице 4 представлены отличия содержания ингибитора трипсиноподобной протеиназы и ее активности у мужчин и женщин с симптомами ОРВИ. У больных мужчин количество ингибитора трипсиноподобной протеиназы было выше, чем у женщин.

Таким образом, в ротовой жидкости практически здоровых людей содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ в 1,5 тыс. раз превышало их активность. У пациентов в возрасте от 18 до 30 лет с симптомами ОРВИ наблюдали увеличение содержания ингибитора трипсиноподобных протеиназ, в то время как в старшей возрастной группе (более 50 лет) его активность снижалась. Во 2-й возрастной группе (30–50 лет) активность трипсиноподобных протеиназ повышалась.

Таблица 3 – Активность трипсиноподобной протеиназы, содержание ингибитора и белка в ротовой жидкости здоровых людей (распределение по половому признаку)

Пол	Условно-здоровые		
	белок, мг/мл	ИТ, ед./мл*	АП, ед./мл**
Мужчины	$3,95 \pm 0,38$ (n=12)	$27,91 \pm 1,19$ (n=11)	$0,020 \pm 0,0017$ (n=6)
Женщины	$3,10 \pm 0,19$ (n=28)	$30,54 \pm 2,38$ (n=26)	$0,018 \pm 0,0015$ (n=17)

Таблица 4 – Активность трипсиноподобной протеиназы, содержание ингибитора и белка в ротовой жидкости пациентов с симптомами острых респираторных вирусных инфекций (распределение по половому признаку)

Пол	Больные		
	белок, мг/мл	ИТ, ед./мл*	АП, ед./мл**
Мужчины	$3,33 \pm 0,20$ (n=8)	$35,69 \pm 2,78$ (n=7)	$0,033 \pm 0,0029$ (n=7)
Женщины	$3,72 \pm 0,33$ (n=8)	$33,73 \pm 2,21$ (n=11)	$0,037 \pm 0,0031$ (n=10)

**Выводы.** 1. В ротовой жидкости (смешанной слюне) практически здоровых людей содержание ингибитора трипсиноподобных протеиназ составило в среднем  $(29,76 \pm 2,11)$  ед./мл, в то время как у пациентов с симптомами ОРВИ оно увеличилось в среднем до  $(35,11 \pm 2,87)$  ед./мл.

2. Активность трипсиноподобных протеиназ у здоровых людей была низкой и составила в среднем  $(0,019 \pm 0,0016)$  ед./мл, у пациентов с симптомами ОРВИ она увеличилась в среднем до  $(0,033 \pm 0,0027)$  ед./мл.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. Григорьев И. В. Слюна как предмет лабораторной диагностики / И. В. Григорьев, А. А. Чиркин // Мед. новости. – 1998. – № 4. – С. 9–12.
2. Показники локальної реактивності в слині хворих з патологією верхніх шляхів. Повідомлення 2. Аналіз імунно-біохімічних показників ротоглоткового секрету хворих на алергічний риніт / О. Ф. Мельников, С. В. Тимченко, О. Й. Кизим [та ін.] // Ринологія. – 2013. – № 1. – С. 16–23.
3. Жадько С. И. Фибринолитическая активность слизистой оболочки полости рта и слюны в норме и при патологии / С. И. Жадько // Лікар. справа. – 1994. – № 7–8. – С. 128–130.
4. Слюнные железы: биохимия, физиология, клинические аспекты / [Л. М. Тарасенко, Г. А. Суханова, З. П. Мищенко и др.]. – Томск : НТЛ, 2002. – 124 с.
5. Веремєєнко К. Н. Біохімія ротового секрету та його дослідження в клініці / К. Н. Веремєєнко, О. Й. Кизим // Лаб. діагностика. – 2005. – № 2. – С. 9–13.
6. Веремєєнко К. Н. Кининовая система / К. Н. Веремєєнко. – К. : Здоров'я, 1977. – 184 с.
7. Веремєєнко К. Н. Ферменты в отоларингологии / К. Н. Веремєєнко. – К. : Здоров'я, 1980. – 182 с.
8. Левицкий А. П. Методы определения ингибиторов трипсина / А. П. Левицкий // Биохимические методы исследования селекционного материала : сб. науч. работ. – Одесса, 1979. – Вып. XV. – С. 68–73.
9. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – **193** (1). – P. 265–275.

## REFERENCES

1. Grigoryev, I.V. & Chirkin, A.A. (1998). Slyuna kak predmet laboratornoy diagnostiki [Saliva as an object of laboratory diagnosis]. *Med. novosti – Medical News*, 4, 9-12 [in Russian].
2. Melnykov, O.F., Tymchenko, S.V., & Kyzym, O.Y. (2013). Pokaznyky lokalnoi reaktivnosti v slyni khvorykh z patolohiieiu verkhnikh shliakhiv. Povidomlennia 2. Analiz imuno-biokhimichnykh pokaznykiv roto hlotkovoho sekretu khvorykh na alerhichnyi rynit [Indicators of local reactivity in the saliva of patients with pathology of the upper pathways. Message 2. Analysis of immunobiochemical indicators of oral pharyngeal secretion in patients with allergic rhinitis]. *Rynolohiia – Rhinology*, 1, 16-23 [in Ukrainian].
3. Zhadko, S.I. (1994). Fibrinoliticheskaya aktivnost slizistoy obolochki polosti rta i slyuny v norme i pri patologii [Fibrinolytic activity of the mucous membrane of the oral cavity and saliva in normal and pathological conditions]. *Likarska sprava – Doctor's Business*, (7-8), 128-130 [in Russian].
4. Tarasenko, L.M. Sukhanova, G.A. & Mishchenko, Z.P. (2002). *Slyunnyye zhelezy: biokhimiya, fiziologiya, klinicheskiye aspekty [Salivary glands: biochemistry, physiology, clinical aspects]*. Tomsk: NTL [in Russian].
5. Veremieienko, K.N. & Kyzym, O.Y. (2005). Biokhimiia rotovoho sekretu ta yoho doslidzhennia v klinitsi [Biochemistry of oral secretion and its research in the clinic]. *Laboratorna diahnostyka – Laboratory Diagnostics*, (2), 9-13 [in Ukrainian].
6. Veremeyenko, K.N. (1977). *Kininovaya sistema [Kinin system]*. Kiev: Zdorovya [in Russian].
7. Veremeyenko, K.N. (1980). *Fermenty v otoringologii [Enzymes in otolaryngology]*. Kiev: Zdorovya [in Russian].
8. Levitskiy, A.P. (1979). Metody opredeleniya ingibitorov tripsina [Methods for the determination of trypsin inhibitors]. *Biokhimicheskiye metody issledovaniya selektsionnogo materiala – Biochemical Methods for Studying Breeding Material* (Iss. 15), (pp. 68-73). Odesa [in Russian].
9. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1), 265-275.

Н. А. Мамедалієв, В. П. Дівоча

УКРАЇНСЬКИЙ НДІ МЕДИЦИНИ ТРАНСПОРТУ МОЗ УКРАЇНИ, ОДЕСА

## АКТИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА ЇХ ІНГІБІТОРІВ У РОТОВІЙ РІДИНІ ЗДОРОВИХ ЛЮДЕЙ І ПАЦІЄНТІВ ІЗ СИМПТОМАМИ ГОСТРИХ РЕСПІРАТОРНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

### Резюме

**Вступ.** У роботі розглянуто питання щодо використання секреторної рідини ротової порожнини як об'єкта для прогнозу і діагностики багатьох захворювань та оцінки ефективності терапії, інтерес до чого зумовлений безпекою і простотою його отримання, що при значному поширенні вірусних захворювань має велике практичне значення. Ротовий секрет (змішана слина) з багатокomпонентним біохімічним



складом містить різноманітні речовини білкової природи, зокрема ферменти з різною специфічністю дії. Протеїнази відіграють визначальну роль у вивільненні медіаторів запальних і алергічних реакцій – гістаміну та кінінів, які підвищують проникність капілярів, викликають свербіж, набряк, еритему, підсилюють міграцію лейкоцитів. Особливе значення в цих процесах мають інгібітори протеїназ, які при запальних і алергічних реакціях виконують захисну функцію.

**Мета дослідження** – з'ясувати можливість використання біохімічних показників як критеріїв прогнозу й ефективності лікування пацієнтів із грипом та іншими гострими респіраторними вірусними інфекціями на основі визначення в ротовому секреті загальної активності ферментів протеолізу, трипсиноподібних протеїназ та їх інгібіторів, а також вмісту білка.

**Методи дослідження.** Було використано біохімічні й статистичні методи дослідження. Обстежено 67 осіб, з них 46 практично здорових людей (контрольна група) і 21 пацієнта із симптомами гострих респіраторних вірусних інфекцій на 3–7 дні від початку захворювання. Їх розбили на 3 вікові групи.

**Результати й обговорення.** У ротовій рідині практично здорових людей віком від 18 до 50 років вміст інгібітора трипсиноподібних протеїназ був практично однаковим і становив  $(29,30 \pm 1,98)$  од./мл. У пацієнтів 3-ї вікової групи (з 51 року і старших) він збільшився до  $(32,15 \pm 2,31)$  од./мл, а активність протеїнази знизилась до  $(0,012 \pm 0,001)$  од./мл.

**Висновки.** У пацієнтів віком від 18 до 30 років із симптомами гострих респіраторних вірусних інфекцій спостерігали збільшення вмісту інгібітора трипсиноподібних протеїназ, тоді як у старшій віковій групі (понад 50 років) його активність знижувалася. У 2-й віковій групі (30–50 років) активність трипсиноподібних протеїназ підвищувалася.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ротова рідина; інгібітори трипсиноподібних протеїназ; грип; гострі респіраторні вірусні інфекції.

N. A. Mamedaliev, V. A. Divocha

UKRAINIAN RESEARCH INSTITUTE OF TRANSPORT MEDICINE, ODESA

## THE ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND THEIR INHIBITORS IN THE ORAL MUCOSA OF HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH SYMPTOMS OF ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS

### Summary

**Introduction.** The paper considers the use of secretory fluid of the oral cavity as an object for the prognosis and diagnosis of many diseases, and the evaluation of the effectiveness of therapy due to security and the ease of its receipt, which, with the wide spread of viral diseases, is of great practical importance. The rotundous secret (mixed saliva) has a multicomponent biochemical composition and contains various substances of protein nature, in particular enzymes of different specificity of action. Proteinases play a decisive role in the release of mediators of inflammatory and allergic reactions – histamine and kinins, which increase the permeability of capillaries, cause itching, swelling, erythema, and enhance the migration of white blood cells. A special role in these processes belongs to proteinase inhibitors, which, when inflammatory and allergic reactions play a protective reaction.

**The aim of the study** – to use the biochemical parameters as prognostic criteria and the efficacy of treatment of influenza patients and other acute respiratory viral infections (ARIs) on the basis of determination in the oral secretion of the total activity of proteolytic enzymes, trypsin-like proteinases and their inhibitors, as well as protein content.

**Research Methods.** We used biochemical and statistical methods of research. 67 people were examined, 46 among them were practically healthy people (control group) and 21 people, with acute respiratory viral infections on the 3<sup>rd</sup>–7<sup>th</sup> day after the onset of the disease. Patients were divided into 3 age groups.

**Results and Discussion.** In the oral liquid of practically healthy people aged 18 to 50 years, the content of the trypsin-like proteinase inhibitor was almost identical and amounted to  $29.30 \pm 1.98$  units/ml. In the group of patients in the age group 3 (from 51 years of age and older), the inhibitor content increased to  $32.15 \pm 2.31$  units/ml and the proteinase activity decreased to  $0.012 \pm 0.001$  units/ml.

**Conclusions.** Patients with symptoms of acute respiratory viral infections showed an increase in the content of trypsin-like proteinase inhibitors aged 18 to 30 years, while in the older age group (over 50 years), the inhibitor activity decreased. There was an increase in the activity of trypsin-like proteinases in the age group 2 (30–50 years).

**KEY WORDS:** oral fluid; trypsin-like proteinase inhibitors; influenza; acute respiratory viral infections.

Получено 18.07.17

**Адресс для переписки:** Н. А. Мамедалиев, Украинский НИИ медицины транспорта МЗ Украины, ул. Канатная, 92, Одесса, 65039, Украина.