

## **Estimation of epidemic situation in relation to hydrophobia in Ivano-Franciv'sk region**

**B.N. DIKIY, T.O. NIKIFOROVA, N.V. VASCOUL,  
M.A. BOYCO, L.I. MIRON**

*The analysis of epizootic and epidemic processes in relation to hydrophobia in the Ivano-Frankovsk region showed, that the character of epid situation is unsteady. Growth of common quantity of cases of hydrophobia of animals is exposed in an of many years dynamics, especially among animals which are close to the man. Permanent cells were formed, present threatening social and natural terms for distribution of hydrophobia among animals and people.*

**Keywords:** *hydrophobia, epizootic, epidanalises, Ivano-Frankovsk region, antirabic help*

УДК 613.22:517.156:576.858/8.0947

## **Содержание и активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ в крови человека**

**В.А. ДИВОЧА, В.Н. МИХАЛЬЧУК,  
А.И. ГОЖЕНКО, О.В. ЛАГОДА**

*г. Одесса*

*Наибольшая активность трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора наблюдалась в свежей донорской крови человека. Сыворотка крови имела большую активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ по сравнению с плазмой и эритроцитарной массой. Донорская кровь человека (с просроченным сроком хранения) может использоваться для получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ.*

**Ключевые слова:** *кровь человека, ингибиторы, трипсиноподобные протеиназы*

Трипсиноподобная протеиназа играет ключевую роль в развитии патологического процесса в организме. Она расщепляет наружный белок вируса гриппа – гемагглютинин на две субъединицы НА<sub>1</sub> и НА<sub>2</sub>. Только после расщепления НА трипсиноподобными протеиназами вирус проникает в клетку и начинает размножаться. В наших предыдущих исследованиях экспериментально установлено, что клеточный ингибитор трипсиноподобных протеиназ блокировал протеиназу, и экспериментальная вирусная инфекция у животных не развивалась – животные оставались живы даже после введения им смертельной дозы вируса гриппа [1, 2]. Важно, что при этом в процессе противoinфекционной защиты не участвовали другие системы, в первую очередь, иммунитет.

Эти данные послужили экспериментальным обоснованием перспективности поиска нового противовирусного препарата на основе эндогенного ингибитора крови человека. Причем, можно постулировать, что такие препараты могут быть использованы как до заражения человека вирусом гриппа, т.е. с профилактической целью, так и при уже развившемся инфекционном процессе, т.е. как препараты патогенетической терапии.

Поиск материала, из которого можно получить препарат, обладающий высокой противовирусной активностью (ингибитор трипсиноподобных протеиназ), и одновременно, обладающий наименьшей аллергенностью для человека, обратил наше внимание и заставил нас провести исследования крови человека

**Целью** данного исследования было изучение наличия трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора в донорской крови человека, во фракциях крови (сыворотка, плазма, эритроцитарная масса) и в разные сроки хранения.

### **Материалы и методы**

Консервированную эритроцитарную массу донорской крови получали из реанимационного отделения второй городской клинической больницы г.Одессы. Эритроцитарную массу с просроченным сроком годности (более 21 суток), человеческую плазму крови четырех групп крови получали из Одесской областной станции переливания крови.

В работе использовались биохимические методы исследования: белок определяли по методу Лоури, активность трипсиноподобной протеиназы по методу К.Н. Веремеенко в модификации С.В. Вовчук, активность ингибитора – по методу К.Н. Веремеенко в модификации А.В. Левицкого.

### **Полученные результаты**

В результате исследований было установлено, что донорская кровь человека содержит как трипсиноподобные (сериновые) протеиназы, так и их эндогенный ингибитор (табл.).

При этом отмечается достаточно большой разброс показателей: для активности протеиназы от 5,31 ммоль арг/мин на мг белка до 29,45 ммоль арг/мин на мг белка, еще больше он был для активности ингибитора от 4,0 у.е. до 186,83 у. е.

Следовательно, диапазон колебаний для протеиназы был в пределах 5, а ингибитора более чем в 25 раз. Такая вариабельность указывает на достаточно высокую чувствительность системы протеиназа/ингибитор, а также ее зависимость от многих факторов.

**Активность трипсиноподобной протеиназы и ее ингибитора  
в донорской крови человека**

№ п/п	Группа крови	Объем крови, мл	Активность протеиназы, ммоль арг/мин на мг белка	Содержание белка, г/мл	Активность ингибитора (ИА), в у.е.**
1	2	3	4	5	6
1	0/I	250,0	14,92	3,97	37,36
2		250,0	25,83	3,42	186,83
3		125,0	5,31	4,71	81,52
4		125,0	16,24	5,89	57,75
5		150,0	22,72	4,54	52,47
6		150,0	25,15	4,40	9,26
7		150,0	18,56	4,62	64,81
8		125,0	13,62	4,66	30,86
9		125,0	19,27	4,59	154,32
10		115,0	25,07	4,79	141,18
11		115,0	21,43	4,33	108,02
12		140,0	13,82	2,24	50,26
13		150,0	26,73	1,92	50,26
14		125,0	29,14	1,60	17,48
15		5,0	29,45	2,81	8,74
0/I группа крови M±m			20,47±1,89	3,90±0,34	70,07±6,80
17		2,0	20,43	2,52	122,26
18		150,0	18,71	5,95	40,76
19		140,0	17,44	4,91	71,33
20		150,0	19,82	5,15	30,57
21		125,0	20,47	4,70	10,19
22		125,0	26,52	4,45	20,38
23		125,0	26,74	1,88	43,71
24		125,0	27,00	1,77	98,34
25		150,0	22,43	1,64	122,34
26		125,0	26,51	4,45	20,38
27		150,0	23,88	2,13	21,85
A/II группа крови M±m			22,85±2,06	3,59±0,32*	51,59±5,06*
28		250,0	21,04	3,77	4,00
29		1	23,23	4,61	185,19
30		1	17,73	4,89	21,60
AB/IV группа крови M±m			20,67±1,84	4,42±0,41	70,26±8,11
В среднем M±m			21,40±1,96	3,83±0,28	62,70±7,31

**Примечание:** \* – достоверное снижение показателя, по отношению к показателям AB/IV группы крови;

\*\* ИА – активность ингибитора трипсина в условных единицах (1 усл. ед. соответствует 1 мг инактивированного кристаллического трипсина).

В среднем, вне зависимости от групп крови, активность трипсиноподобной протеиназы и содержание ее ингибитора составляли  $21,4 \pm 1,96$  ммоль арг/мин на мг белка и  $62,7 \pm 7,31$  у.е., соответственно. Следует отметить, что наибольшая активность фермента установлена в донорской крови II-й группы крови ( $22,85 \pm 2,06$  ммоль арг/мин на мг белка). Активность фермента в донорской крови I-й и IV-й групп крови была практически одинаковой и составляла  $20,47 \pm 1,89$  ммоль арг/мин на мг белка и  $20,67 \pm 1,84$  ммоль арг/мин на мг белка, соответственно. Активность ингибитора трипсиноподобной протеиназы была наиболее высокой и практически одинаковой в донорской крови I-й и в IV-й групп крови и составляла  $70,07 \pm 6,80$  у.е и  $70,07 \pm 6,80$  у.е, соответственно. В донорской крови II-й группы крови активность ингибитора была наименьшей –  $51,59 \pm 5,06$  у.е., в то время как активность трипсиноподобной протеиназы – наиболее высокой среди исследованных групп крови. Этот дисбаланс может быть объяснен дефицитом синтеза эндогенного ингибитора трипсиноподобной протеиназы. Нельзя исключить и наличие наследственно обусловленных причин такого дисбаланса. Кроме того, необходимо подчеркнуть, что регуляторным влияниям и иным воздействиям, видимо, в большей мере подвержено содержание ингибитора, а, следовательно, влияние на эту систему возможно также через изменение его содержания.

Однако, из полученных результатов не ясно в каком компоненте находится трипсиноподобная протеиназа: клеточном или плазме крови.

Как показали наши дальнейшие исследования, сыворотка донорской крови также обладала достаточно высокой активностью трипсиноподобной протеиназы.. Наиболее высокой активностью трипсиноподобной протеиназы обладала IV-я группа крови на фоне высокого содержания белка.

На следующем этапе работы нами была изучена эритроцитарная масса. В эритроцитарной массе донорской крови, в среднем, активность трипсиноподобной протеиназы была в 1,5 раза выше, чем в сыворотке крови.

Активность трипсиноподобной протеиназы в эритроцитарной массе донорской крови IV-й группы крови была в 2,0 раза выше, чем в сыворотке крови доноров этой же группы крови. Содержание белка в эритроцитарной массе донорской крови всех групп крови был в 2,0 раза выше, чем в сыворотке крови доноров этих же групп крови.

Исходя из того, что трипсиноподобная протеиназа могла быть либо связана с клеточной мембраной, либо находится в цитоплазме, выполнен следующий этап работы. Для увеличения выхода фермента был применен метод гемолиза эритроцитов. Для этого одну часть эритроцитарной массы донорской крови подвергали 2-х кратному замораживанию и оттаиванию, а вторую часть эритроцитарной массы оставляли без изменений.

Как показали результаты исследований, 2-х кратное замораживание и оттаивание не влияло на выход фермента. Эти данные позволяют предположить, что трипсиноподобная протеиназа скорее всего фиксирована на мембране эритроцитов, а не находится в их цитоплазме.

Нами проанализировано распределение протеиназы в плазме крови. Высокая активность фермента была установлена также в плазме крови, в то время как содержание белка в сыворотке крови и в плазме крови было практически одинаковым.

Представлял также интерес вопрос о том, является ли отличия по группам крови типичными для всего распределения ферментативной активности в крови? В плазме крови, также как и в случае сыворотки крови и в эритроцитарной массе донорской крови, наибольшая активность трипсиноподобной протеиназы установлена для IV-й группы крови.

Исходя из того, что участие трипсиноподобной протеиназы в физиологических и патологических реакциях зависит в значительной мере от соотношения с активностью ее ингибитора. В последующем для характеристики этой системы регуляции нами проведено определение ингибитора.

По результатам наших исследований свежая консервированная донорская кровь содержит большое количество не только трипсиноподобной протеиназы, но и ингибитора трипсиноподобных протеиназ.

В плазме крови доноров активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ было недостоверно выше у доноров со II-й группой крови. Следовательно, групповые особенности крови характерны и для содержания ингибитора. Последующие исследования были направлены на изучение распределения ингибиторной активности в компонентах крови.

Так, в эритроцитарной массе активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ было достоверно выше у доноров с IV-й группой крови и достоверно ниже – у доноров со II-й группой крови.

Активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ была наиболее высокой и практически одинаковой в донорской крови I-й и в IV-й группах крови. Предположительно, что люди с этими группами крови наиболее устойчивы к вирусным заболеваниям. Эти данные получены впервые и они позволяют нам по-новому подойти к известной различной устойчивости людей к инфекционным заболеваниям и к вирусному гриппу в частности. Дальнейшие исследования в этом направлении для практической медицины могут представлять интерес, так как могут позволить даже дополнить группы риска по отношению к заболеванию гриппом, а возможно и другими инфекционными заболеваниями, что может служить обоснованием приоритетности в проведении вакцинирования этой группы населения. С другой стороны, особенности выработки ингибиторов могут учитывать при прогнозировании тяжести развития патологических процессов при инфекционной патологии.

Причем, активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ была больше в сыворотке крови, чем в эритроцитарной массе. Через год после хранения при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  ингибиторная активность сохранялась, но активность становилась значительно ниже, чем в свежей крови (от 450 у.е. до 70 у.е.). Эти результаты необходимо учитывать при производстве ингибиторов. В донорской крови человека активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ не зависела от активности протеиназы. Этот диссонанс необходимо учитывать, определяя именно ингибиторную активность, а не протеиназную, для оценки исходного сырья при производстве. В тоже время в крови белых мышей имелось соответствие между протеиназами и их ингибиторами. Это можно объяснить большей однородностью используемой популяции мышей, хотя не исключены и видовые особенности. Несоответствие протеиназы и ингибитора в крови человека, по-видимому, связано с тем, что человек перенес какое-то инфекционное заболевание или страдает хроническими инфекциями, однако в литературе сведений по этому вопросу недостаточно, хотя динамика системы протеиназа/ингибитор чрезвычайно интересна.

В литературе установлено, что сыворотка крови также является важным источником различных ингибиторов протеиназ. К изученным в настоящее время ингибиторам относятся:  $\alpha_2$ -антиплазмин,  $\alpha_2$ -макроглобулин,  $\alpha_1$ -антитрипсин, антитромбин III,  $\text{C}_1$ -активатор,  $\alpha_1$ -антихимотрипсин, интер- $\alpha$ -ингибитор трипсина и др. [3]. Хотя, вполне можно постулировать, что этим перечнем не исчерпывается количество и разнообразие ингибиторов протеиназ плазмы крови человека. Тем более, что из поврежденных клеток различных органов в кровь могут поступать компоненты протеиназно/ингибиторных систем внутриклеточного происхождения. Функциональная роль отдельных ингибиторов весьма многообразна. Так, альфа-2-антиплазмин относится к семейству ингибиторов сериновых протеиназ и имеет молекулярную массу 67–70 кДа. Этот ингибитор образует функциональный комплекс только с плазмином и трипсином [4].

Особый интерес в плазме крови представляет  $\alpha_1$ -ингибитор протеиназ, который первоначально называли  $\alpha_1$ -антитрипсином. Этот ингибитор является быстродействующим ингибитором трипсина. Альфа-1-антитрипсин обладает поливалентностью, так как он защищает организм от эндогенных и экзогенных (бактериальных, грибковых) протеиназ. При инфекционных процессах он обеспечивает до 92% анитриптической активности [5], ингибирует также химотрипсин, плазмин, тромбин, эластазу, протеолитические ферменты лейкоцитов, бактериальные протеиназы, но почти не влияет на калликреин плазмы.

Антитромбин III (АТ-III) является одним из основных компонентов противосвертывающей системы. Этот ингибитор содержится в крови в

концентрації 150–180 мкг/мл. Его молекулярний вес становить 58 кДа. Установлено, що він інгібує всі протеїнази зсвертывання (за виключенням фактора VII), а також трипсин і плазмин.

### **Выводы**

Найбільша активність трипсиноподібної протеїнази і її інгібітора містилась в свіжій донорській крові людини. Сироватка крові мала більше активність інгібітора трипсиноподібних протеїназ порівняно з плазмою і еритроцитарною масою. Донорська кров людини з терміном зберігання який закінчився може використовуватися для отримання інгібітора трипсиноподібних протеїназ.

### **Литература**

1. Дівоча В.П. Біолого-вірусологічне обґрунтування антипротеазної терапії грипу: автореф. дис. ... доктора мед. наук / В. П. Дівоча. – К., 2009. – 41 с.
2. Дівоча В.А. Молекулярно-біологічне обґрунтування антипротеазної терапії грипу [обзор літератури і власних досліджень] // В.А. Дівоча, В.Н. Михальчук, А.І. Гоженко // Журнал АМН України. – 2009. – Т. 15, № 1. – С. 19–32.
3. Веремеєнко К.Н. Протеоліз в нормі і при патології / К.Н. Веремеєнко, О.П. Голобородько, А.І. Кизим. – К.: Здоров'я, 1988. – 200 с.
4. Зорин Н.А. Роль білків сімейства макроглобулінів в механізмах інфікування / Н.А. Зорин, В.Н. Зорина // ЖМЭИ. – 2004. – Т. 3. – С. 105–112.
5. Веремеєнко К.Н. Ферменти протеолізу і їх інгібітори в медичній практиці / К.Н. Веремеєнко. – К.: Здоров'я, 1971. – 286 с.

### **Вміст та активність інгібітора трипсиноподібних протеїназ у крові людини**

**В.А. ДІВОЧА, В.М. МИХАЛЬЧУК,  
А.І. ГОЖЕНКО, О.В. ЛАГОДА**

*Найбільша активність трипсиноподібної протеїнази та її інгібітора спостерігалась у свіжій донорській крові людини. Сироватка крові мала більшу активність інгібітора трипсиноподібних протеїназ у порівнянні з плазмою та еритроцитарною масою. Донорська кров людини (з терміном зберігання який закінчився) може використовуватися для отримання інгібітора трипсиноподібних протеїназ.*

**Ключові слова:** кров людини, інгібітори, трипсиноподібні протеїнази

### **Content and activity of trypsin-like proteinases inhibitor in a human's blood**

**V.A. DIVOCHA, V.N. MIKHALCHUCK,  
A.I. GOZHENKO, O.V. LAGODA**

*The top activity of trypsin-like proteinases' activity and its inhibitor is in a fresh humans' donor blood. Blood serum has the higher activity of trypsin-like proteinases inhibitor in comparison with plasma and erythrocytes mass. Human's donor blood with over-valid term of preserving may be used for getting inhibitor of trypsin-like proteinases.*

**Key words:** human's blood, inhibitors, trypsin-like proteinases