

Шевченко Ю. А.,
викладач кафедри біохімії, медичної та фармацевтичної хімії
ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпропетровськ, Україна

Лянна О. Л.,
к. б. н., доцент, ДЗ «Дніпропетровська медична
академія МОЗ України», м. Дніпропетровськ, Україна

Бразалук О. З.,
д. б. н., професор, ДЗ «Дніпропетровська медична
академія МОЗ України», м. Дніпропетровськ, Україна

Боренко О. Ю.,
лікар-біохімік, КЗ «Дніпропетровська обласна
дитяча клінічна лікарня», м. Дніпропетровськ, Україна

Хворостенко Ю. М.,
к. мед. н., асистент кафедри онкології та медичної радіології,
Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І. І. Мечникова, м. Дніпропетровськ, Україна

Хворостенко М. І.,
д. мед. н., професор, Дніпропетровська обласна
клінічна лікарня ім. І. І. Мечникова, м. Дніпропетровськ, Україна

АКТИВНІСТЬ ЛІЗОСОМНИХ ЦИСТЕЇНОВИХ КАТЕПСИНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ДІТЕЙ ЗА НАЯВНОСТІ ГОСТРОГО НЕСПЕЦИФІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ

У статті представлено результати досліджень активності лізосомних цистеїнових протеїназ – катепсинів В та L – у сироватці крові дітей з неспецифічним гострим лімфаденітом та взаємозв'язок протеолітичної активності досліджуваних ферментів з показниками гемограми. Показано, що активність катепсинів В та L у сироватці крові дітей із лімфаденітами має різноспрямований характер. Встановлено, що визначені зміни активності протеаз відбуваються на фоні змін показників гемограми дітей та свідчать на користь залучення лізосомно-вакуолярного апарату клітин у формуванні адаптивної відповіді вродженої системи імунітету організму дитини на наявність запального процесу.

Ключові слова: лізосомні цистеїнові катепсини; запалення; діти.

Вступ. Запалення у дитячому віці всебічно привертає увагу як лікарів, так і науковців [1; 2]. Незважаючи на те, що локальні молекулярні механізми цього типового патологічного процесу, досить добре вивчено [3], тим не менш кількість дітей, які мають запальні захворювання або такі, що супроводжуються запаленням, не зменшується. Запалення лімфатичних вузлів, викликане патогенними мікроорганізмами – неспецифічний лімфаденіт – захворювання, з яким часто доводиться зустрічатись, особливо в дітей раннього віку, як педіатрам, так і дитячим хірургам. Разом із тим, етіологічне розшифрування патогенезу у більшості випадків не проводиться, для лікування назначаються антибіотики, що у багатьох випадках має низький позитивний ефект та вимагає додаткового обстеження і перегляду тактики ведення пацієнтів. Нераціональне застосування антибактеріальних препаратів супроводжується розвитком побічних ефектів, таких як алергічні

реакції, поява антибіотико-резистентної мікрофлори, пригнічення імунітету [4], тому пошук простих, надійних та безпечних засобів оцінки характеру лімфаденіту залишається актуальним питанням біохімічної оцінки тактики лікування, оскільки більшість з відомих індикаторів запального процесу (лихоманка, лейкоцитоз, зміна у формулі білої крові, швидкості осадку еритроцитів, рівень С-реактивного білка) є неспецифічними показниками, і мають низький рівень надійності та інформативності, що часто спричиняє неправильну діагностику характеру лімфаденіту. На особливу увагу заслуговують ферменти протеолітичного апарату клітин тканин організму. Новітні дослідження останніх років свідчать на користь системи протеолізу як особливої форми біологічного контролю, яка займає центральне місце в реалізації чисельних біохімічних реакцій [5]. Протеїнази виконують значну кількість різноманітних функцій та контролюють практично всі сторони біологічних

процесів, які протікають на молекулярному, клітинному, тканинному та органному рівнях [6]. З позицій практичного значення та використання в клініці великого інтересу набувають дослідження лізосомних протеолітичних ферментів [7]. Серед широкого набору протеолітичних ферментів лізосом, особливу увагу привернули цистеїнові катепсини, оскільки дослідження останніх років змусили по-новому оцінити участь цих протеїназ у життєдіяльності клітини. Відповідно до новітніх наукових досліджень цистеїнові протеїнази вважаються вже не лише лізосомними медіаторами термінальної деградації протеїнів, але і те, що вони беруть участь у деградації та ремоделюванні білків екстрацелюлярного матриксу [8], відіграють суттєву роль у вікових змінах клітин організму [9], залучені до регуляції імунної відповіді [10], апоптозу [11], метастазування та пухлинної інвазії [12].

Метою статті є вивчення рівнів активності найактивніших та найпоширеніших лізосомних цистеїнових протеїназ – катепсинів В та L – у сироватці крові дітей з неспецифічним гострим лімфаденітом та встановлення їхнього взаємозв'язку з імунобіохімічними показниками (показників гемограми, концентрації С-реактивного білка).

Матеріали та методи досліджень. Дослідження активності лізосомних цистеїнових катепсинів В, L, та $\alpha 1$ -інгібітору протеїназ проводили в сироватці крові дітей віком від 1 до 16 років за наявності неспецифічного гострого лімфаденіту ($n = 31$). Контрольну групу становили 34 дитини, які знаходились на обстеженні КЗ «Дніпропетровська обласна дитяча клінічна лікарня», у яких повністю виключалась наявність гострих та запальних процесів. Усі діти поступали до приймального покою лікарні з різними діагнозами. Після огляду в дітей брали кров та центрифугували 15 хв при 3000 об/хв. Активність катепсинів В та L визначали в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15 хв преінкубацією ферменту в присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу (2МЕ) і 1 мМ Na_2EDTO [13], і виражали в умовних одиницях згідно з інтенсивністю екстинції за довжини хвилі 383 нм та 366 нм за 1 хв, відповідно. Концентрацію С-реактивного білку вимірювали турбодиметричним методом. Показники крові та лейкоцитарні формули визначали загальноприйнятими методами клінічної біохімії [14]. Активність катепсину В встановлювали відносно субстрату N, α -бензоїл-D,L-аргінін- ρ -нітроаніліду

(FluKa, Switzerland). Активність катепсину L визначали по відношенню до азоказеїну (1 %), денатурованого сечовиною (3,0 М) [15]. Визначення концентрації $\alpha 1$ -інгібітора протеїназ проводили за методом, який базується на здатності цього білка пригнічувати гідроліз трипсином субстрату N, α -бензоїл-D,L-аргінін- ρ -нітроаніліду (FluKa, Switzerland). Кількісне вимірювання вивільненого при гідролізі ρ -нітроаніліну проводили спектрофотометрично при довжині хвилі 383 нм [16]. Статистичну обробку результатів виконували з використанням комп'ютерної програми Excel згідно з t -критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Згідно з отриманими результатами, у дітей з лімфаденітами у сироватці крові лізосомні цистеїнові катепсини мають різноспрямований характер у прояві каталітичної активності щодо обраних субстратів (рис. 1). Встановлено, що активність катепсину В зменшена по відношенню до контрольних показників та практично не визначається, тоді як рівень активності катепсину L у 12,1 рази, вірогідно, перевищує контрольне значення. Така активація катепсину L свідчить на користь розвитку метаболічного ацидозу та формування відновлювальних умов у сироватці крові дітей, оскільки на відміну від катепсину В, цей фермент нестабільний у нейтральному та слабко лужному середовищі і проявляє потужну ендопептидазну активність саме за слабко кислих значень рН щодо білкових субстратів.

Як відомо, лізосоми завдяки своїй реактивності залучаються до процесів нейтралізації етіологічних факторів запалення, і саме з них починається вторинна альтерація. На сьогодні існує думка, що поява лізосомних цистеїнових катепсинів у сироватці крові зумовлена порушенням проникності як мембран лізосом з наступним вивільненням їх у цитозоль, так і перміабілізацією плазматичних мембран клітин різного типу. Крім того, відомо, що вивільнення катепсинів до цитозолу відбувається через наявність окиснених форм ліпідів низької щільності (ЛПНЩ), які пошкоджують лізосомні мембрани [17], утворення активних форм кисню, короткоживучих вільних радикалів [18]. Оскільки, за даними літератури, експресія цистеїнових катепсинів В та L відбувається всіма типами клітин організму [19], то сприятливі умови для лабілізації клітинних мембран під час запалення сприяють посиленню протеолізу у системі кругообігу дитячого організму.

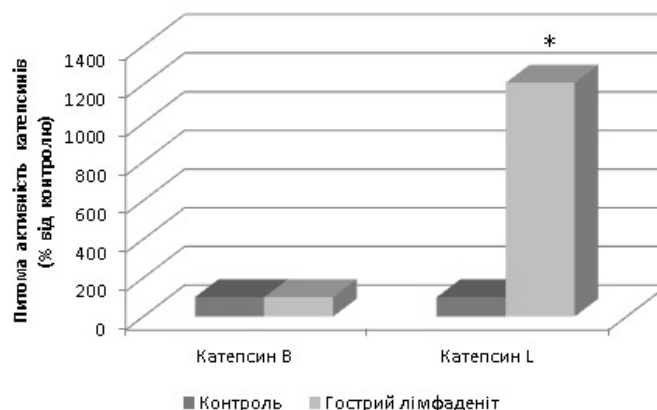


Рис. 1. Питома активність цистеїнових катепсинів В та L

у сироватці крові дітей за наявності гострого неспецифічного лімфаденіту, (M ± m)

Слід зазначити, що зміни функціональної активності протеолітичних ферментів у сироватці крові дітей за патогенезу неспецифічного запального

походження відбуваються на фоні певних коливань у характері окремих складових гемограми та лейкоцитарної формули крові (табл. 1).

Таблиця 1

Усредненні показники гемограми дітей, (M ± m)

Група	Лейкоцити, *10 ⁹ /л	Тромбоцити, *10 ⁹ /л	Еритроцити, *10 ¹² /л	Еозинофіли, %	Моноцити, %	Лімфоцити, %	Паличкоядерні нейтрофіли, %	Сегментоядерні нейтрофіли, %
Контроль (n=34)	7,2 ± 1,6	237,2 ± 22,3	4,2 ± 0,3	2,4 ± 1,3	5,0 ± 2,7	43,3 ± 7,0	3,0 ± 2,3	47,5 ± 8,1
Гострий лімфаденіт (n = 31)	9,4 ± 3,6*	228,6 ± 24,1	4,4 ± 0,6	3,2 ± 2,2	4,8 ± 2,5	34,3 ± 12,9*	2,8 ± 1,5	57,7 ± 11,4*

* p < 0,1 відповідно до контрольних показників

В аналізі крові за наявності неспецифічного гострого лімфаденіту дітей відмічається вірогідне зростання кількості лейкоцитів (у 1,3 рази) порівняно з контролем. Крім того, на 20,8 %, вірогідно, знижується кількість лімфоцитів крові дітей та на 21,5 % збільшується кількість сегментоядерних нейтрофілів. Наведені високі значення середніх відхилень у показниках гемограми можуть бути викликані широким віковим діапазоном дітей, які досліджувались, та пов'язані з морфологічною та функціональною незрілістю лімфатичного апарату дітей. Зменшення кількісного вмісту саме лімфоцитів, в асоціації зі збільшенням активності внутрішньоклітинних лізосомних протеолітичних ферментів,

може відбивати внесок дестабілізації мембран саме лімфоцитів та їхню наступну руйнацію з вивільненням лізосомних ферментів до цитозолу за наявності запального процесу. Окрім змін у стабільності мембран лізосом та плазматичних мембран, внесок у зміни активності лізосомних протеолітичних ферментів крові чинить стан ендogenousного інгібіторного потенціалу клітин.

Таким чином, все вищесказане свідчить на важливу роль цистеїнових катепсинів у формуванні ефективної відповіді організму дітей на наявність запального процесу та сприяють погляду на катепсини як на важливі модулятори відповіді вродженого імунітету.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зотин А. В. Обоснование тактики хирургического лечения острых лимфаденитов у детей на основе ультразвуковой диагностики : дис. ... канд. мед. наук / А. В. Зотин. – 2010. – 108 с.
2. Цуциева В. В. Оптимизация лечебно-диагностической тактики острых неспецифических лимфаденитов в детском возрасте : дис. ... канд. мед. наук / В. В. Цуциева. – 2011. – 125 с.
3. Серов В. В. Воспаление / В. В. Серов, В. С. Пауков. – М. : Медицина, 1995. – 640 с.
4. Пустыникова С. В. Клинико-иммунологические особенности и иммунокорректирующая терапия при стрептококковой инфекции у детей : дис. ... канд. мед. наук / С. В. Пустыникова. – 2008. – 107 с.
5. Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by Paracoccidioides brasiliensis infection / A. S. Nishikaku, L. C. Ribeiro, R. F. Molina, B. P. Albe, Cda S. Cunha, E. Burger // Int. J. Exp. Pathol. – 2009. – Vol. 90. – P. 527–537.
6. Чорна В. І. Лізосомні цистеїнові протеази: молекулярна структура і функції / В. І. Чорна, О. Л. Лянна. – Харків : Екограф, 2013. – 296 с.
7. Bohley P. Proteases and proteolysis in the lysosome / P. Bohley, P. O. Seglen // Experientia. – 1992. – Vol. 48, № 2. – P. 151–157.
8. Turk B. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers / B. Turk, D. Turk, V. Turk // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1477. – P. 98–111.
9. Cuervo A. M. How do intracellular proteolytic systems change with age? / A. M. Cuervo, J. F. Dice // Frontiers in Bioscience. – 1998. – Vol. 3. – P. 25–43.
10. Proteases involved in MHC class II antigen presentation / J. A. Villadangos, R. A. Bryant, J. Deussing et al. // Immunol Rev. – 1999. – Vol. 172. – P. 109–120.
11. Stoka V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis / V. Stoka, B. Turk, V. Turk // IUBMB Life. – 2005. – Vol. 57, № 4/5. – P. 347–353.
12. Jedeszko C. Cysteine cathepsins in human cancer / C. Jedeszko, B. F. Sloane // Biol. Chem. – 2004. – Vol. 385. – P. 1017–1027.
13. Kominami E. The selective role of cathepsins B and D in the lysosomal degradation of endogenous and exogenous proteins / E. Kominami, T. Yeno, D. Muno, N. Katanuma // FEBS. – 1991. – Vol. 287, № 1/2. – P. 189–192.
14. Горячковский А. М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике / А. М. Горячковский. – Одесса : Экология, 2005. – 616 с.
15. Черная В. И. Изучение активности катепсина В в опухолях головного мозга человека / В. И. Черная // Доповіді Національної академії наук України. – 1999. – № 2. – С. 172–176.
16. Веремеенко К. Н. Протеолиз в норме и при патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. – К. : Здоровье, 1988. – 200 с.

17. Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation / M. Li, X. M. Yuan, A. G. Olsson, U. T. Brunk // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1998. – Vol. 18. – P. 177–184.
18. Пупышев А. Б. Пермеабиллизация лизосомных мембран как апоптогенный фактор / А. Б. Пупышев // *Цитология.* – 2011. – Т. 53, № 4. – С. 313–324.
19. Cathepsins cysteine proteases in cardiovascular disease / S. P. M. Lutgens, K. B. J. Cleutjens, M. J. A. P. Daeman, S. Heeneman // *The FASEB Journal.* – 2007. – Vol. 21. – P. 3029–3041.

Ю. А. Шевченко, О. Л. Лянная, А. З. Бразалук,

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск, Украина

О. Ю. Боренко,

КУ «Днепропетровска областная детская клиническая больница», г. Днепропетровск, Украина

Ю. М. Хворостенко, М. И. Хворостенко,

Днепропетровская областная клиническая больница им. И. И. Мечникова, г. Днепропетровск, Украина

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДЕТЕЙ ПРИ НАЛИЧИИ ОСТРОГО НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

В статье представлены результаты исследования активности лизосомных цистеиновых протеиназ – катепсинов В и L – в сыворотке крови детей с неспецифическим острым лимфаденитом и взаимосвязь протеолитической активности исследуемых ферментов с показателями гемограммы. Показано, что активность катепсинов В и L в сыворотке крови детей с лимфаденитами имеет разнонаправленный характер. Установлено, что выявленные изменения активности протеаз происходят на фоне изменений показателей гемограммы детей и свидетельствуют о вовлечении лизосомно-вакуолярного аппарата клеток в формирование адаптационного ответа врожденной иммунной системы организма ребенка на наличие воспалительного процесса.

Ключевые слова: лизосомные цистеиновые катепсины; воспаление; дети.

Yu. A. Shevchenko, O. L. Lyanna, O. Z. Brazaluk,

SE «Dnipropetrovsk medical academy of Ministry of Health of Ukraine», Dnipropetrovsk, Ukraine

O. Yu. Borenko,

CM «Dnipropetrovsk regional children clinical hospital», Dnipropetrovsk, Ukraine

Yu. M. Khvorostenko, M. I. Khvorostenko,

Dnipropetrovsk regional clinic hospital after I. I. Mechnikov, Dnipropetrovsk, Ukraine

THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL CYSTEINE CATHEPSINS IN BLOOD SERUM OF CHILDREN WITH NONSPECIFIC ACUTE INFLAMMATION

Cysteine cathepsins B, L are endosomal/lysosomal proteases that participate in numerous physiological systems. Extracellular matrix remodeling by cathepsins play an important role in many conditions associated with inflammation. The aim of this study was to research the effect of inflammation on circulating levels of human cathepsin B and L. Blood sampling was carried out at CM «Dnipropetrovsk regional children clinical hospital». Two patient groups were included: (1) children without acute and/or chronic inflammation (n = 31) – control group and (2) patients with acute nonspecific lymphadenitis (n = 34). Serum cathepsin B and L activity levels were measured using spectrophotometric methods with both N, α -benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide and azocasein as substrates. The results of lysosomal cysteine proteases activity in blood serum of children with nonspecific acute lymphadenitis were presented in the work. It was shown that cathepsins B and L activities had opposite direction in character. Serum cathepsin B activity level showed lower value in comparison with control group but serum cathepsin L activity level was significantly (12,1 times) higher than control value. The dependence of the data observed on some hemogram indices were studied. The hemogram had increased leucocytes and decreased level of lymphocytes. Besides segmented neutrophils number was found higher on 21 % in accordance with control group values. It was established that inflammation has different effects on circulating levels of cathepsin B and L, and these proteases' activity alterations take place in accordance with changes of children hemogram indices. The data observed testify to involvement of cellular lysosomal-endosomal apparatus into adaptive innate immune response of children organism against nonspecific inflammation

Keywords: lysosomal cysteine cathepsins; inflammation; children.

Рецензенти: **Чорна В. І.**, д. б. н., професор;

Большот Ю. К., д. мед. н., професор.

© Шевченко Ю. А., Лянная О. Л., Бразалук О. З.,
Боренко О. Ю., Хворостенко Ю. М.,
Хворостенко М. І., 2014

Дата надходження статті до редколегії 23.11.2014