

Фомина Н. В., ассистент
Фомина М. А., канд. мед.
наук, доцент
Рязанский
государственный
медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова,
Россия

Участники конференции,
Национального первенства
по научной аналитике,
Открытого Европейско-
Азиатского первенства
по научной аналитике

ОЦЕНКА СВЯЗИ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ПЛАЗМЫ И ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ С БИОХИМИЧЕСКИМИ МАРКЁРАМИ ВОСПАЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТРОМБОФЛЕБИТОМ

Обнаружена средняя положительная корреляция между активностью катепсина L и концентрацией сиаловых кислот в плазме, а также низкая положительная корреляция между активностью катепсина H и концентрацией СРБ в полиморфноядерных лейкоцитах больных тромбозом вен нижних конечностей.

В моноядерных лейкоцитах наблюдалась высокая корреляция между активностью катепсина H и концентрацией С-реактивного белка, а также слабая корреляция между активностью катепсина H и концентрацией сиаловых кислот в плазме.

Ключевые слова: лизосомальные цистеиновые протеиназы, лейкоциты, С-реактивный белок, сиаловые кислоты, тромбоз вен.

A positive correlation between the average activity of cathepsin L and the concentration of sialic acids in plasma is found, and low positive correlation between the activity of cathepsin H and the concentration of CRP in the polymorphonuclear leukocytes of patients with thrombophlebitis of the leg veins is found. A high correlation between the activity of cathepsin H and the concentration of C-reactive protein, and a weak correlation between the activity of cathepsin H and sialic acid concentration in plasma in the mononuclear leukocytes were observed.

Keywords: lysosomal cysteine proteinases, leukocytes, C-reactive protein, sialic acid, thrombophlebitis.

Протеолиз – в высокой степени контролируемый сложный процесс, который имеет место практически во всех тканях и компартментах клетки [5]. Активация протеолиза является важнейшим биохимическим механизмом фундаментального патологического процесса – воспаления. Изменение реакции среды в очаге воспаления в кислую сторону приводит к дестабилизации мембран лизосом, выходу в цитоплазму лизосомальных ферментов, их активации и дальнейшей деструкции вовлечённой в процесс прилегающей к очагу воспаления ткани [8]. Протеолитические ферменты синтезируются различными иммунокомпетентными клетками организма и играют одну из ведущих ролей в развитии воспалительного процесса. Лизосомальные цистеиновые протеиназы (ЛЦП) относятся к семейству папаиноподобных протеолитических ферментов, локализованных в основном в лизосомах и поздних эндосомах клетки. ЛЦП в настоящее время активно изучаются, поскольку они принимают участие во множестве физиологических и патологических процессов: в регуляции апоптоза и внутриклеточного метаболизма, посттрансляционных изменениях белков,

клеточной дифференциации, активации и инактивации гормонов [12], а также в процессах иммунного ответа и в развитии таких заболеваний, как рак, артриты [13], болезнь Альцгеймера [10], рассеянный склероз, панкреатит, заболевания печени, легких [4], мышечная дистрофия, атеросклероз [11].

ЛЦП способны секретироваться во внеклеточную среду. Выход лизосомальных ферментов потенцирует избирательный протеолиз, который в норме и при патологии может приводить к активации плазменных проферментов систем свёртывания и фибринолиза, системы комплемента и калликреин-кининовой системы [3]. В результате этого процесса в крови накапливаются биологически активные пептиды и происходит потребление факторов гемокоагуляции, фибринолиза и калликреин-кининового каскада [1].

Активность ЛЦП подвержена мультифакторной регуляции и может меняться в связи с изменением синтеза самого фермента, в связи с наличием аутокатализа, характерного для данной группы ферментов, а также в связи с окислительной модификацией белков при оксидативном стрессе.

Одной из довольно распространённых воспалительных патологий, протекающих на фоне окислительного стресса, на сегодняшний день является тромбоз вен нижних конечностей. Проблеме тромбоза посвящено большое количество научных исследований, но до сих пор она не теряет своей актуальности [7]. Тромбоз вен нижних конечностей является самой частой причиной венозной сосудистой патологии, требующей госпитализации. Специфика восходящего тромбоза, не зависимо от того, возникает ли он на почве варикозной болезни или в повреждённых венах, заключается в непрогнозируемости его течения [8]. Восходящие формы тромбоза реально угрожают распространением тромбоза на глубокие вены и развитием тромбоэмболии лёгочной артерии (ТЭЛА). Поэтому достаточно актуальным является вопрос дальнейшего изучения патогенеза тромбоза, и, в частности, участия в нём лизосомальных цистеиновых протеиназ с целью возможного прогнозирования его динамики.

В предыдущих работах нами было показано, что активность катепсина L и H повышается в плазме крови

больных тромбозом [6]. В связи с этим, можно предположить, что причиной данного повышения может являться системная воспалительная реакция. На основании вышеизложенного представляется актуальным изучить изменение активности ЛЦП в плазме и различных фракциях лейкоцитов больных тромбозом, сопоставив данные с выраженностью воспалительной реакции.

Цель работы состояла в оценке связи активности лизосомальных цистеиновых катепсинов L и H в плазме крови и различных фракциях лейкоцитов при тромбозе вен нижних конечностей в зависимости от степени выраженности воспалительной реакции. Показателями воспалительной реакции явились С-реактивный белок и сиаловые кислоты.

Материалы и методы. В работе представлены результаты обследования 30 пациентов с диагнозом «тромбоз вен нижних конечностей», находившихся на стационарном лечении в Рязанском областном клиническом кардиологическом диспансере. Для исследования использовали кровь, взятую из локтевой вены утром натощак, в которую предварительно добавляли ЭДТА. Для выделения различных фракций лейкоцитов эритроциты осаждали 6% раствором декстрана, после чего плазму со взвешенными в ней лейкоцитами подвергали изопикническому центрифугированию на градиенте плотности урографин – полиглюкин. При этом получали две фракции лейкоцитов: интерфазный слой содержал моноядерные лейкоциты, представленные лимфоцитами и моноцитами, осадок – полиморфноядерные гранулоциты. Клетки отмывали 0,15 М раствором хлорида натрия, пропускали через капроновый фильтр и подсчитывали в камере Горяева. Активность катепсинов L и H изучали спектрофлуориметрическим методом по Barrett & Kirschke [9]. Степень выраженности воспалительной реакции оценивали по содержанию в плазме крови СРБ и сиаловых кислот.

СРБ измеряли иммунотурбидиметрическим методом по конечной точке путём фотометрического измерения реакции антиген – антитело между антителами к человеческому СРБ и присутствующем в образце СРБ.

Определение проводили с помощью наборов CRP FS (DiaSys Diagnostic Systems GmbH).

Сиаловые кислоты определяли с помощью наборов «Сиалотест – 80» (ООО НПП «Реакхим»). Метод основан на реакции сиаловой кислоты с индикатором. В результате реакции при нагревании образуется окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации ацетилглицероаминовой кислоты.

Статистическая значимость отличий полученных результатов от контрольной группы и группы сравнения оценивалась с использованием U-критерия Манна - Уитни.

Результаты и обсуждения. При оценке связи активности лизосомальных цистеиновых катепсинов L и H в плазме и различных фракциях лейкоцитов при тромбозе вен нижних конечностей в зависимости от степени выраженности воспалительной реакции мы обнаружили следующие тенденции. Активность катепсина L в полиморфноядерных лейкоцитах больных тромбозом составила $15,5 \pm 12,4$ нмоль/ч· 10^6 клеток, активность катепсина H – $5,1 \pm 4,1$ нмоль/ч· 10^6 клеток (см. рис. 1). Таким образом, активность катепсина L в полиморфноядерных лейкоцитах превысила активность катепсина H в 3 раза.

Активность катепсина L в моноядерных лейкоцитах периферической крови больных тромбозом составила $31,2 \pm 27,6$ нмоль/ч· 10^6 клеток, активность катепсина H – $16,6 \pm 14,4$ нмоль/ч· 10^6 клеток соответственно (см. рис. 2). То есть активность катепсина L также превысила активность катепсина H, но в меньшей степени – в 1,8 раза.

При сравнении активности катепсинов в различных фракциях лейкоцитов, мы обнаружили, что более высокая активность катепсина L наблюдалась в моноядерных лейкоцитах (выше в 2 раза по сравнению с активностью фермента в гранулоцитах). Данные отличия оказались статистически не достоверными ($p > 0,05$). Более высокая активность катепсина H наблюдалась также в моноядерных лейкоцитах (выше в 3,3 раза по сравнению с активностью фермента в гранулоцитах). Данные отличия

оказались статистически значимыми ($p < 0,05$).

Средняя концентрация С-реактивного белка в плазме крови больных тромбозом составила $31,1 \pm 30,0$ мг/л. Среднее значение сиаловых кислот в плазме крови больных тромбозом составило $0,85 \pm 0,4$ ммоль/л.

При подсчёте коэффициентов корреляции между активностью изучаемых ферментов в полиморфноядерных лейкоцитах и показателями воспалительной реакции мы обнаружили положительную корреляцию между активностью катепсина L и концентрацией сиаловых кислот в плазме крови ($r = 0,49$) (см. рис. 3), и положительную корреляцию между активностью катепсина H и концентрацией СРБ ($r = 0,15$).

Активность катепсинов L и H в плазме крови больных тромбозом составила $6,08 \pm 2,4$ и $4,8 \pm 2,7$ нмоль/ч·л.

При определении коэффициента корреляции между активностью изучаемых нами ферментов и концентрациями сиаловых кислот и С-реактивного белка в плазме крови больных тромбозом мы обнаружили слабopоложительную корреляцию между активностью катепсина L и концентрацией сиаловых кислот в плазме ($r = 0,08$).

В моноядерных лейкоцитах наблюдалась положительная корреляция между активностью катепсина H и концентрацией С-реактивного белка ($r = 0,79$) (см. рис. 3), а также слабая корреляция между активностью изучаемых катепсинов и концентрацией сиаловых кислот в плазме: для катепсина L $r = 0,28$; для катепсина H $r = 0,14$.

Вывод. Таким образом, мы можем предположить, что изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ L и H в плазме и различных фракциях лейкоцитов крови больных тромбозом не имеет чёткой статистической связи с биохимическими показателями воспалительной реакции. Возможно, на изменение активности ферментов в первую очередь оказывает влияние не воспалительная реакция, а другие факторы, например, окислительный стресс.

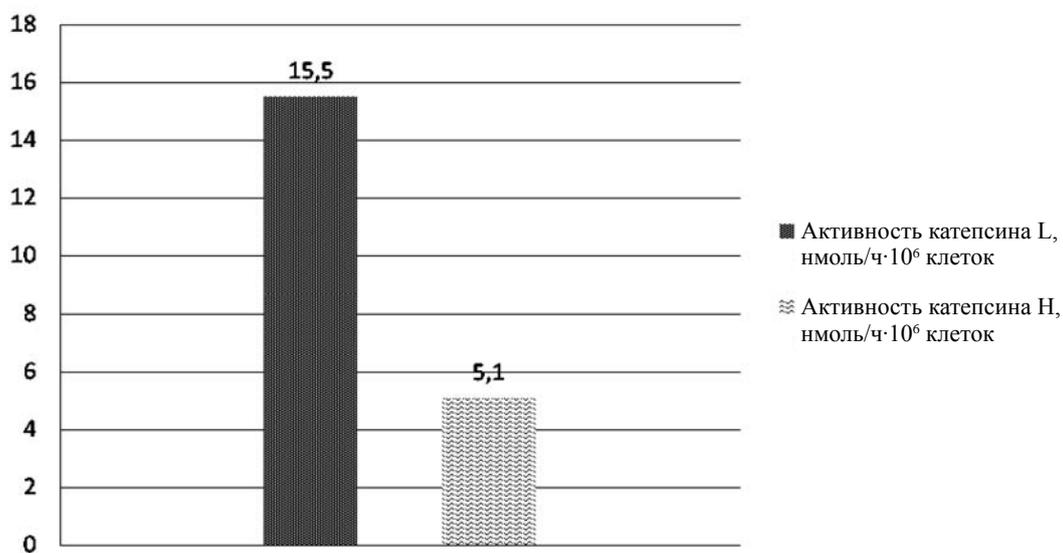


Рис. 1. Активность катепсинов L и H в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови больных тромбозом, нмоль/ч·10⁶ клеток

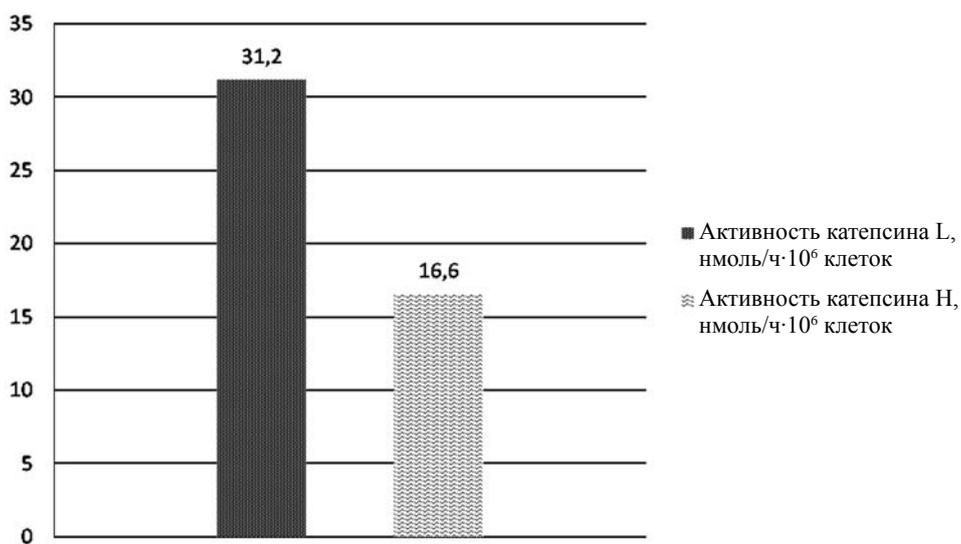


Рис. 2. Активность катепсинов L и H в моноядерных лейкоцитах периферической крови больных тромбозом, нмоль/ч·10⁶ клеток.

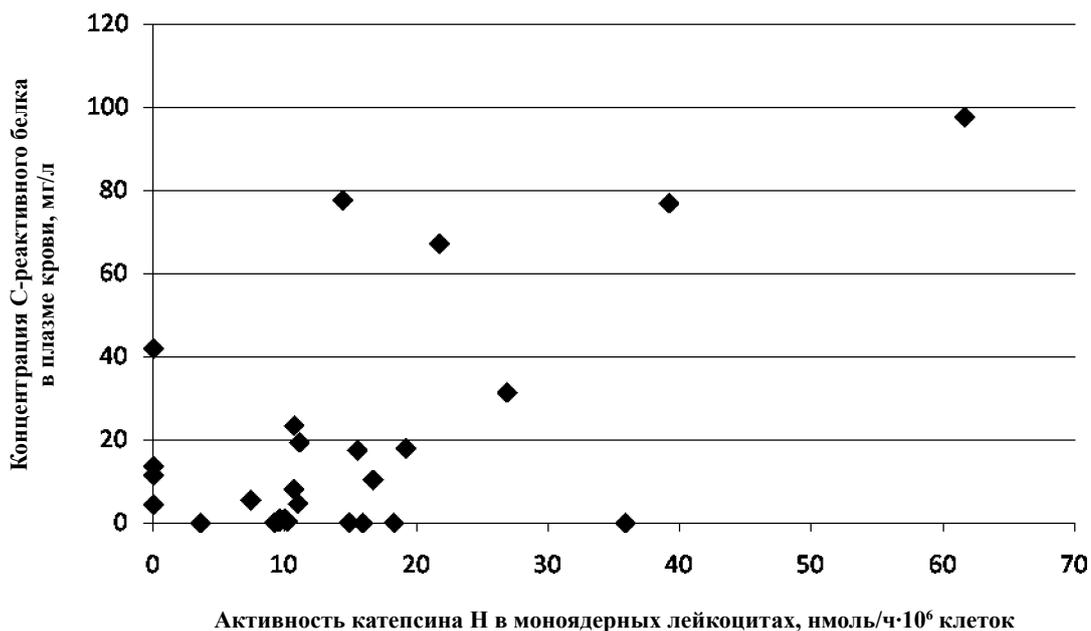


Рис. 3. Корреляция активности катепсина H в моноядерных лейкоцитах с концентрацией С-реактивного белка в плазме крови больных тромбозом

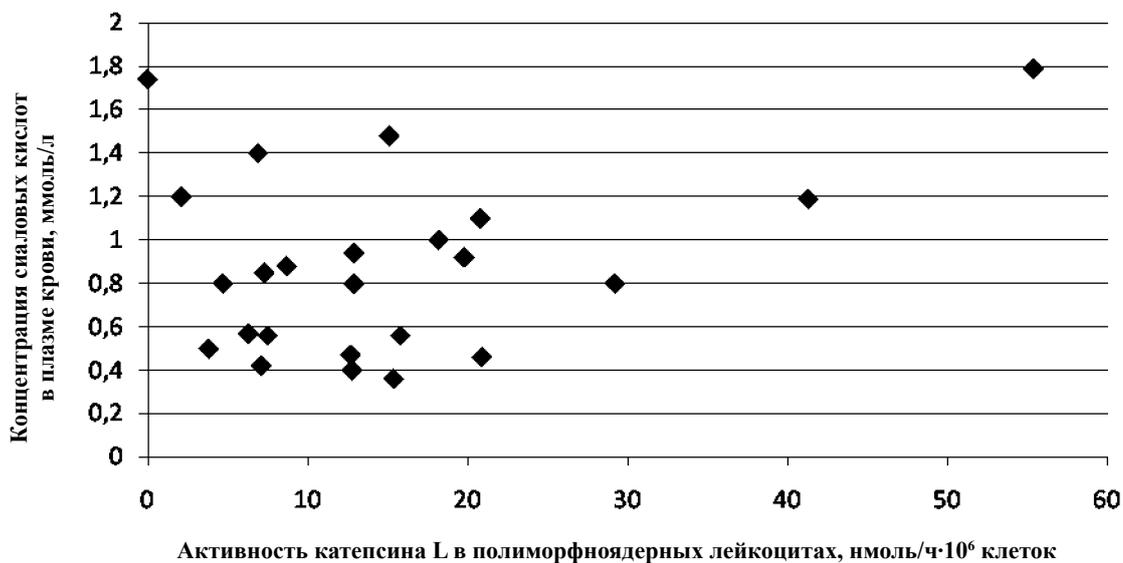


Рис. 4. Корреляция активности катепсина L в полиморфноядерных лейкоцитах с концентрацией сиаловых кислот в плазме крови больных тромбозом

Литература:

1. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии. – К.: Здоровье, 1988.

2. Кириенко А.И., Матюшенко А.А., Андрияшкин В.В.//Острый тромбоз. К. – Москва, 2006.

3. Кирпиченко Л.Н. Значение компонентов системы протеолиза в регуляции воспалительных реакций // Витебск, 2010.

4. Перцева Т.А., Лихолат Е.А., Гуржий Е.В. Оценка состояния мукоцилиарного клиренса у пациентов с хроническими обструктивными заболеваниями лёгких // Украинский пульмонологический журнал. 2007. – № 3. – С.16 – 18.

5. Строев Е.А., Матвеева И.В., Борискина М.А. Протеолитические ферменты лизосом: структура, регуляция и функции // Методические указания по биологической химии для студентов и преподавателей. Рязань. – 1998.

6. Фомина Н.В., Фомина М.А., Калинин Р.Е. Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ сыворотки крови больных тромбозом // Астраханский медицинский журнал 2011. – Т. – 6. № 2. – С. 235 – 236.

7. Шаталов А.В. Острый варикотромбоз: диагностика и хирургическое лечение // Автореферат дис. д.м.н. Волгоград. – 2006.

8. Швальб П.Г. Системный подход к патогенезу хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. 2002. – Т.8, №3. – С. 30 – 35.

9. Barrett A.J., Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L // In Enzymol. – 1981. – Vol. 80. – P.535-561

10. Cataldo A.M. Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain / A.M. Cataldo, R.A. Nixon // PNAS. – 1990. – V. 87. – P. 3861 – 3865.

11. Chen J. Chen, J. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis / J. Chen, C.H. Tung, U. Mahmood et al. // Circulation. 2002. - Vol. 105, №23. - P. 2766-2771.

12. Golet B., Baruch A., Moon N.S. et al. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor // Mol. Cell. 2004. V.14. № 2. P. 207 – 219.

13. Knop M., Schiffer H.H., Rupp S. et al. Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. // Curr. Opin. Cell. Biol. – 1993. – Vol.5, №6. – P. 990 – 996.

13. Maciewicz R.A., Wotton S.F., Etherington D.J., Duance V.C. Susceptibility of the cartilage collagens types II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L // FEBS Lett. 1990. – Vol.269. – P. 189 – 193.

