

ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ЦИСТЕИНОВЫЕ КАТЕПСИНЫ L И H ПЛАЗМЫ И ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ: ОБЩИЕ ТЕНДЕНЦИИ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ И ФАКТОРОВ РЕГУЛЯЦИИ

Короткова Н.В.¹, Фомина М.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет» им. И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Рязань, Россия (390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д.9), e-mail: fominataly@rambler.ru

Изучены активность лизосомальных цистеиновых протеиназ в плазме, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови и факторы её регуляции у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей и острым венозным тромбозом. Отмечено повышение активности катепсинов L и H в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах, снижение в моноядерных лейкоцитах. Отмечена более высокая степень изменения активности катепсинов у пациентов с варикозным расширением вен. Концентрация цистатина C снижалась в плазме и клетках крови у пациентов с варикозом, повышалась в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах крови, снижалась в моноядерных лейкоцитах у пациентов с тромбозом. Изменение коэффициента аутокаталитической активации демонстрировало полную активацию изучаемых катепсинов в плазме и лейкоцитах крови пациентов с варикозом, неполную активацию – у пациентов с острым венозным тромбозом.

Ключевые слова: лизосомальные цистеиновые протеиназы L и H, полиморфноядерные лейкоциты, моноядерные лейкоциты, аутокаталитический процессинг, цистатин C

LYSOSOMAL CYSTEINE CATHEPSINS L AND H BLOOD PLASMA AND LEUKOCYTES IN DISEASES OF THE VEINS OF THE LOWER EXTREMITIES: THE TRENDS IN ACTIVITY'S CHANGE AND REGULATORY FACTORS

Korotkova N.V.¹, Fomina M.A.¹

Ryazan State Medical University n.a. I.P. Pavlov, Ryazan, Russia (390026, Ryazan, street Visokovoltnaya, 9), e-mail: fominataly@rambler.ru

The activity of lysosomal cysteine proteases in plasma, polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes and its regulation factors in patients with varicose veins of the lower limbs and acute venous thrombosis were studied. An increased activity of cathepsin L and H in plasma and polymorphonuclear leukocytes decrease in mononuclear leukocytes was observed. The most pronounced were changes in the activity of cathepsins in patients with varicose veins. Cystatin C concentration was reduced in plasma and blood cells of patients with varicose veins; increased plasma and polymorphonuclear leucocytes, decreased in mononuclear leukocytes of patients with thrombosis. The change of the coefficient autocatalytic activation showed full activation of studied cathepsins in plasma and blood leukocytes of patients with varicose veins, incomplete activation - in patients with acute venous thrombosis.

Keywords: lysosomal cystein proteinases, polymorphonuclear leucocytes, mononuclear leukocytes, autocatalytic processing, cystatin C

Протеолиз является одним из универсальных процессов, протекающих в живой природе, на котором в значительной степени базируется поддержание здоровья организма. Протеолитические ферменты вносят свой вклад в процессы управляемого биосинтеза, созревания, функционирования и терминального распада белков, необратимо расщепляя пептидные связи. Для выполнения множества селективных и хорошо контролируемых протеолитических функций человеческий геном кодирует более 550 протеаз и более 200 эндогенных ингибиторов протеаз [4]. В системе лизосом деградацию белка осуществляют

примерно 50 известных гидролаз, среди которых наиболее изученными являются лизосомальные цистеиновые пептидазы (ЛЦП).

ЛЦП относят к клану СА семейства С1. Семейство С1 – папаиноподобные ферменты – проявляет свою протеолитическую активность в пищеварительных вакуолях простейших и лизосомальных системах эукариотических клеток. Наиболее изученными представителями являются катепсин В (С01.060), катепсин L (С01.032), катепсин S (С01.034), катепсин К (С01.036), катепсин Н (С01.040) и дипептидил-пептидазы (С01.070) [11].

Первоначально считалось, что ЛЦП выполняют в клетке функции неспецифического протеолиза, но в течение последних двух с половиной десятилетий получено много данных об их участии в выполнении специфических функций при различных физиологических и патологических процессах [14].

В результате многочисленных исследований было установлено, что цистеиновые протеиназы принимают участие в развитии таких заболеваний, как аневризма абдоминальной аорты [13], рак и неоваскуляризация [6], сердечно-сосудистые заболевания [12]. Участие катепсинов в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний обусловлено их действием на элементы соединительной ткани. Так, катепсины В и в большей степени L могут повреждать коллаген II, IX и XI типов в кислых значениях рН, оказывать эластолитическое, коллагенолитическое и протеогликанолитическое действие [8].

На сегодняшний день распространёнными патологиями венозной системы человека являются варикозная болезнь нижних конечностей (ВБНК) и острый венозный тромбоз. Обе они представляют серьёзную проблему современного здравоохранения, так как в конечном итоге тромбоз может привести к формированию посттромбофлебитической болезни [5], обе патологии снижают трудоспособность и качество жизни пациентов, и зачастую приводят к инвалидизации и смертности.

Но данные об участии ЛЦП в патологии венозной системы остаются немногочисленными. В настоящее время появились работы, посвящённые участию лизосомальных ферментов нейтрофилов в появлении и прогрессировании трофических язв на фоне хронической венозной недостаточности [10]. Немаловажная роль отводится так называемым «активированным» лейкоцитам и макрофагам, которые могут явиться основным фактором повреждения венозной стенки и клапанов, а также паравазальных тканей при первичных формах хронических заболеваний вен нижних конечностей [1].

Поэтому актуальным остаётся дальнейшее изучение молекулярных механизмов патогенеза данных заболеваний.

Цель исследования – изучение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ – катепсинов L и H в плазме и лейкоцитах крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей.

Материал и методы исследования

Объектом исследования явились 65 пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, в том числе 40 пациентов с диагнозом «острый венозный тромбоз» и 25 пациентов с диагнозом «варикозное расширение вен нижних конечностей», находившихся на стационарном лечении в отделении сосудистой хирургии ГБУ РО «Областной клинический кардиологический диспансер» г. Рязани в 2011-2013 гг.

Средний возраст пациентов с острым венозным тромбозом и варикозным расширением вен нижних конечностей составил $62,5 \pm 11,7$ и $47,6 \pm 13,7$ года соответственно. Группу контроля составили клинически здоровые доноры отделения переливания крови ГУЗ «Рязанская областная клиническая больница), сопоставимые с испытуемыми по возрасту и полу.

Материалом для исследования явились плазма и лейкоциты периферической крови. Забор крови у пациентов производился утром в одно и то же время из локтевой вены натощак в количестве 15 мл. В качестве антикоагулянта использовали 0,5 М раствор 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 (МЯЛ), представленные лимфоцитами и моноцитами, осадок – полиморфноядерные (ПМЯЛ) гранулоциты. Клетки отмывали 0,15 М раствором хлорида натрия, пропускали через капроновый фильтр, подсчитывали в камере Горяева и гомогенизировали пипетированием через иглу малого диаметра. Чистоту разделения лейкоцитов проверяли микроскопией окрашенных мазков из интерфазы и осадка (микроскоп бинокулярный Р-15 «Биолам»). Полученные описанным выше способом осадки отмытых лейкоцитов доводили до концентрации $10^6 - 10^7$ клеток/мл дистиллированной водой, содержащей 0,1% раствор тритона X – 100 и подвергали трёхкратному замораживанию – оттаиванию для окончательного разрушения плазматических и лизосомальных мембран. Гомогенизация производилась пипетированием через иглу малого диаметра. Нерастворимый материал осаждался центрифугированием (600 g, 10 минут). Супернатант использовался для определения активности ферментов.

Активность катепсинов L и H изучали спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke [3] с измерением флюоресцирующего продукта реакции – 7-амидо-4-

метилкумарина, образующегося при расщеплении специфических флюорогенных субстратов. Результаты представляли в нмоль/чхл и в нмоль/10⁶ клеток.

Оценка аутокаталитической активации проводилась путём преинкубирования биологического материала в реакционной смеси, не содержащей субстрат, в течение 15 минут при 37°C с последующим добавлением последнего [2]. Для сравнения степени аутокаталитической активации катепсинов подсчитывали коэффициент аутокаталитической активации (КАА): отношение значения активности ферментов после прекаталитической инкубации к значению активности, определённого без преинкубации.

Содержание цистатина С проводили с использованием наборов иммуноферментного анализа (ИФА) для определения цистатина С (ЦС) человека Bio Vendor (Чехия), содержащих специфичные для цистатина С человека антитела. Результаты представляли в нг/мл и нг/10⁶ клеток.

Для оценки статистической значимости межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении активности катепсинов L и H в сыворотке и лейкоцитах крови у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей были выявлены следующие тенденции (табл.1).

Таблица 1

Показатели активности катепсинов L и H в плазме (нмоль/чхл) и лейкоцитах (нмоль/чх10⁶ клеток) крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, M±s

		Контрольная группа	Группа 1 (пациенты с варикозным расширением вен)	Группа 2 (пациенты с острым венозным тромбозом)
		n=25	n=25	n=40
ПЛАЗМА	Активность катепсина L	4,19 ± 2,33	9,18 ± 5,9*	5,79 ± 2,35*
	Активность катепсина H	3,87 ± 3,17	9,44 ± 8,76*	4,44 ± 2,56*
ПМЯЛ	Активность катепсина L	13,07 ± 5,29	20,28 ± 10,17*	13,74 ± 9,96
	Активность катепсина H	3,65 ± 1,64	9,12 ± 5,27*	4,96 ± 3,90**

МЯЛ	Активность катепсина L	34,42 ± 14,70	16,42 ± 9,26*	32,46 ± 25,67**
	Активность катепсина H	25,09 ± 14,44	9,09 ± 8,89*	13,92 ± 12,60*
<p>Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05), ** – статистически значимые отличия от группы 1 (p<0,05).</p>				

Активность катепсинов L и H статистически значимо повышается в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах крови у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей по сравнению с аналогичными показателями здоровых доноров. Активность же изучаемых ферментов в моноядерных лейкоцитах имеет противоположную тенденцию – статистически значимо снижается у пациентов с варикозом по сравнению с группой контроля.

У пациентов с острым венозным тромбозом активность исследуемых катепсинов статистически значимо повышается в плазме крови, статистически незначимо повышается в ПМЯЛ, а также снижается в МЯЛ (статистически значимо – активность катепсина H, статистически незначимо – активность катепсина L).

Полученные данные позволяют предположить вовлечённость лизосомальных ферментов лейкоцитов в патологию вен нижних конечностей, что согласуется с данными литературы об участии лейкоцитов в данной патологии.

Из представленных данных видно, что изменение активности катепсинов L и H у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей имеет однонаправленную тенденцию: повышается активность катепсинов L и H в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах, снижается в моноядерных лейкоцитах. Степень изменения активности в плазме и лейкоцитах крови выше у пациентов с варикозным расширением вен.

При изучении содержания цистатина C в плазме и лейкоцитах крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей мы обнаружили следующее (табл. 2).

Таблица 2

Содержание цистатина C в плазме (нг/мл) и лейкоцитах крови (нг/10⁶) пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, M±s

	Контрольная группа	Группа 1 (пациенты с варикозным расширением вен)	Группа 2 (пациенты с острым венозным тромбозом)
--	--------------------	--	---

Плазма	1017,8 ± 114,30	636,31 ± 406,08	3600,38 ± 763,83***
ПМЯЛ	147,12 ± 91,99	139,38 ± 97,58	184,4 ± 109,62
МЯЛ	822,78 ± 213,56	305,44 ± 111,97*	492,67 ± 256,08***
Примечание: * – статистически значимые отличия (p<0,05), ** – статистически значимые отличия от группы 1 (p<0,05).			

Концентрация цистатина С в плазме крови здоровых доноров оказалась сопоставима с данными литературы [7]. Из представленных данных видно, что концентрация эндогенного ингибитора ЛЦП цистатина С снижается в плазме, ПМЯЛ и МЯЛ крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей. Причём снижение в МЯЛ является статистически значимым. Концентрация цистатина С повышается в плазме и ПМЯЛ крови, снижается в МЯЛ пациентов с острым венозным тромбозом. Необходимо отметить, что при более значительном повышении активности катепсинов (в 1,5-3 раза), что отмечалось в плазме и ПМЯЛ крови пациентов с варикозом, концентрация цистатина С снижалась. При незначительном повышении активности катепсинов (до 1,5 раз), что мы наблюдали в плазме и ПМЯЛ пациентов с острым венозным тромбозом, концентрация цистатина С повышалась, что позволяет подтвердить участие цистатина С как фактора регуляции активности изучаемых катепсинов при заболеваниях вен нижних конечностей. В моноядерных лейкоцитах крови как при варикозном расширении вен нижних конечностей, так и при остром венозном тромбозе отмечалась однонаправленная тенденция – снижение активности изучаемых катепсинов и концентрации их эндогенного ингибитора цистатина С.

Полученные данные согласуются с данными литературы о вовлечении лизосомального фермента L и его эндогенного ингибитора цистатина С в патогенез варикозной болезни нижних конечностей (ВБНК) [15].

При изучении аутокаталитического процессинга в плазме и лейкоцитах крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей были отмечены следующие тенденции (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительный анализ изменения коэффициента аутокаталитической активации в плазме и лейкоцитах крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, $M \pm s$

	Контрольная группа		Группа 1 (пациенты с варикозным расширением вен)		Группа 2 (пациенты с острым венозным тромбозом)	
	Катепсин L	Катепсин H	Катепсин L	Катепсин H	Катепсин L	Катепсин H
Плазма	1,18 ± 0,55	0,9 ± 0,40	0,78 ± 0,34*	0,69 ±	1,03 ± 0,32	1,17 ±

				0,25*		0,54***
ПМЯЛ	1,01 ± 0,15	0,99 ± 0,08	0,96 ± 0,14	0,79 ± 0,19*	1,12 ± 0,18	1,01 ± 0,17**
МЯЛ	1,04 ± 0,12	0,78 ± 0,13	0,93 ± 0,10*	0,67 ± 0,22	1,18 ± 0,47**	1,04 ± 0,13***
Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05), ** – статистически значимые отличия от группы 1 (p<0,05).						

У пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей катепсины L и H находятся в активированном состоянии, степень аутокаталитической активации меньше как для катепсина L, так и для катепсина H в плазме, ПМЯЛ, МЯЛ крови.

Острый венозный тромбоз сопровождается активацией незрелых форм катепсинов: катепсина L плазмы, ПМЯЛ, МЯЛ и катепсина H плазмы и МЯЛ крови. Причём наибольшие изменения активности после аутокатализа отмечаются для катепсина H в моноядерных лейкоцитах при тромбозе и для катепсина L в плазме при варикозе. Возможно, такие различия в аутокаталитическом процессинге связаны с хроническим течением при варикозе, что сопровождается полной активацией изучаемых ферментов.

Выводы

1. Изменение активности катепсинов L и H у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей имеет однонаправленную тенденцию: повышается активность катепсинов L и H в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах, снижается в моноядерных лейкоцитах. Степень изменения активности в плазме и лейкоцитах крови выше у пациентов с варикозным расширением вен.
2. Концентрация цистатина C снижается в плазме, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови пациентов с варикозным расширением вен. Концентрация цистатина C повышается в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах крови и снижается в моноядерных лейкоцитах пациентов с острым венозным тромбозом.
3. Изменения КАА позволяют предположить, что при остром венозном тромбозе в плазме и лейкоцитах крови катепсины L и H не полностью активированы, при варикозном расширении вен наблюдается их полная активация.

Список литературы

1. Богачёв В.Ю. Об участии лейкоцитов в патогенезе первичных форм хронических заболеваний вен нижних конечностей / В.Ю. Богачёв [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – № 3. – С. 71 – 75.

2. Борискина М.А. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у больных хроническими лейкозами в динамике заболевания. Дисс...канд. мед. наук. – Рязань. – 1996.
3. Barrett A.J. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L / A.J. Barrett., H. Kirschke // *Methods in Enzymol.* – 1981. –Vol. 80. – P. 535-561.
4. Barrett A.J., Rawlings N.D. ‘Species’ of peptidases. *Biol Chem.* 2007; 388(11):1151–1157.
5. Bouman A.C., Atalay, S., Ten Cate, H., Ten Wolde, M., Ten Cate-Hoek, A.J. Biomarkers for post-thrombotic syndrome (Review) // *Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders* Volume 2, Issue 1, January 2014, P. 79-88.
6. Bühler, A., Berger, S., Bengsch, F., Martin, G., Han, H., Vierkotten, S., Pielen, A., Boehringer, D., Schlunck, G., Fauser, S., Agostini, H.T., Reinheckel, T., Stahl, A. Cathepsin proteases promote angiogenic sprouting and laser-induced choroidal neovascularisation in mice // *Experimental Eye Research* Volume 115, October 2013, P. 73 – 78.
7. Ix J.H., Shlipak M.G., Chertow G.M., Whooley M.A. Association of Cystatin C With Mortality, Cardiovascular Events, and Incident Heart Failure Among Persons With Coronary Heart Disease: Data From the Heart and Soul Study // *Circulation*, 2007, vol. 115 №2,1 P. 73 – 179.
8. Lutgens S.P.M., Cleutjens K.B.J.M., Daemen M.J.A.P., Heeneman S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease // *The FASEB. J.* 2007; 21: 3029 – 3041.
9. Mazzolai, L. Hereditary Trombophilia and Venous Thromboembolism: Critical Evaluation of the Clinical Implications of Screening [Text] / L. Mazzolai, M.A. Duchosal // *Eur. J. Vasc. and Endovasc. Surgery.* — 2007. — 34 (4). — P. 483-488.
10. McDaniel J.C., Roy S., Wilgus T.A. Neutrophil activity in chronic venous leg ulcers--a target for therapy? // *Wound Repair Regen.* 2013 May-Jun;21(3):339-51.
11. MEROPS-the Peptidil Database. URL: [www.http://merops.sanger.ac.uk](http://merops.sanger.ac.uk).
12. Qin, Y., Shi, G.-P. Cysteinyll cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases // *Pharmacology and Therapeutics* Volume 131, Issue 3, September 2011, P. 338-350.
13. Qin Y., Cao X., Yang Y., Shi G.P. Cysteine protease cathepsins and matrix metalloproteinases in the development of abdominal aortic aneurysms // *Future Cardiol.* 2013 Jan;9 (1):89-103.
14. Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Miha Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers // *Biochimica et Biophysica Acta* 1824, 2012; 68–88.
15. Xu N., Zhang, Y.-Y., Lin Y., Bao B., Zheng L., Shi G.-P., Liu J. Increased levels of lysosomal cysteinyll cathepsins in human varicose veins: A histology study // *Thrombosis and Haemostasis*, Volume 111, Issue 2, 24 October 2013, P. 333-344.

Рецензенты:

Демихов В.Г., д.м.н., профессор, директор Рязанского филиала ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва», г. Рязань;

Емельянова А.С., д.б.н., профессор кафедры технологии производства и переработки продукции животноводства, ФГБОУ ВПО «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева», г. Рязань.