

## ПРОТЕАЗЫ И ИХ СЫВОРОТОЧНЫЕ ИНГИБИТОРЫ У ОВАРИЭКТОМИРОВАННЫХ САМОК КРЫС WISTAR ПРИ РАЗВИТИИ ОСТЕОПОРОЗА

Воропаева А.А.<sup>1</sup>, Фаламеева О.В.<sup>1</sup>, Садовой М.А.<sup>1</sup>, Щелкунова Е.И.<sup>1</sup>, Русова Т.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск Россия, e-mail: (630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17, ННИИТО), e-mail: venediktovaa@bk.ru

Изучена активность катепсина К, матричных металлопротеаз, активность  $\alpha_2$ -макроглобулина и  $\alpha_1$ -антитрипсина, а также и концентрация ММП-2 в сыворотке крови у овариэктомированных самок крыс Wistar на фоне снижения минеральной плотности скелета. Показано, что овариэктомия приводит к увеличению активности катепсина К и общей активности ММП, а также концентрации ММП-2 в сыворотке крови у крыс Wistar. При этом не изменяется активность сывороточных ингибиторов широкого спектра протеаз  $\alpha_2$ -макроглобулина и  $\alpha_1$ -антитрипсина. Снижение минеральной плотности скелета у овариэктомированных крыс не влияет на концентрацию кальция и фосфора в сыворотке крови, однако отражается на активности щелочной и тартрат-резистентной кислотой фосфатазы в сыворотке крови. Снижение активности щелочной фосфатазы говорит о снижении формирования костного матрикса. Снижение активности тартрат-резистентной кислотой фосфатазы на фоне увеличения концентрации ММП-2 в сыворотке крови овариэктомированных крыс косвенно может свидетельствовать о том, что резорбция костной ткани в этом случае осуществляется меньшим количеством более активных остеокластов.

Ключевые слова: матричные металлопротеазы, овариэктомированные крысы, ремоделирование костной ткани, остеопороз, катепсин К, щелочная фосфатаза, тартрат-резистентная кислотой фосфатаза.

## SERUM PROTEASES AND SERUM PROTEASES INHIBITORS IN OVARIECTOMISED RATS WISTAR DURING OSTEOPOROSIS DEVELOPMENT

Voropaeva A.A., Falameeva O.V., Sadovoy M.A., Schelkunova E.I., Rusova T.V.

FSBI «NIIITO n.a. Ya.L. Tsivyan» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, e-mail: venediktovaa@bk.ru

The activity of cathepsin K, matrix metalloproteinase, activity of  $\alpha_2$ -macroglobulin and  $\alpha_1$ -antitrypsin, and the concentration of MMP-2 in the serum of female ovariectomized Wistar rats was studied against decrease in mineral density of the skeleton. It was demonstrated that ovariectomy causes increase in the activity of cathepsin K and total MMP activity and MMP-2 concentration in the serum of Wistar rats. This does not change the activity of protease inhibitors of wide range of  $\alpha_2$ -macroglobulin and  $\alpha_1$ -antitrypsin. Reduced mineral density in ovariectomized rat skeleton does not affect the concentration of calcium and phosphorus in the blood serum, but affects the activity of alkaline and tartrate-resistant acid phosphatase in serum. Reduced activity alkaline phosphatase suggests reducing the formation of bone matrix. Reduced activity of tartrate-resistant acid phosphatase, with increased concentrations of MMP-2 in the serum of ovariectomized rats may indirectly indicate that bone resorption in this case was caused the less number the more active osteoclasts.

Keywords: matrix metalloproteases, ovariectomised rats, bone remodeling, osteoporosis, cathepsin K, alkaline phosphatase, tartrate-resistant acid phosphatase.

Остеопороз – системное заболевание скелета, сопровождающееся изменением микроархетиктоники, состава и как следствие – уменьшением прочности костной ткани [4].

Основную массу больных остеопорозом составляют лица женского пола, что зачастую связано с дисфункцией гонад [1]. В основе патогенеза данного заболевания лежит нарушение ремоделирования матрикса костной ткани, в норме представляющего сбалансированный процесс резорбции костной ткани остеокластами и биосинтеза компонентов матрикса костной ткани остеобластами [2, 3].

Резорбция костной ткани сопровождается высвобождением кальция, фосфора и тартрат-резистентной кислой фосфатазы (ТРКФ), в сыворотку крови. Эти показатели до сих пор используются для оценки состояния процессов резорбции костной ткани как показатели деятельности остеокластов, а активность ЩФ – как показатель активности остеобластов [5]. Эти простые и недорогие методы диагностики обладают рядом недостатков, главными из которых являются невысокая информативность, низкая специфичность, а также существующие противоречивые данные об их изменении при нарушении резорбции костной ткани [3].

При резорбции костной ткани после растворения гидроксиапатитов происходит расщепление органических компонентов костного матрикса с участием протеолитических ферментов остеокластов. Ключевая роль в этом процессе принадлежит цистеиновой протеазе катепсину К [8]. Предполагают, что он вовлечен в развитие остеопороза различного генеза, в том числе - сенильного и развивающегося у женщин в постменопаузальном периоде [8]. Также показано участие матриксных металлопротеаз (ММП) первого, второго, седьмого, девятого, тринадцатого типа в ремоделировании костной ткани, однако сведения об их участии в резорбции кости противоречивы. К настоящему времени не изучена степень вовлеченности катепсина К и ММП в патогенез разных вариантов остеопороза и не определена возможность использования сывороточной активности катепсина К и ММП в качестве прогностических маркеров.

Логично предположить, что заболевание, связанное с усилением активности протеаз может смещать баланс протеазы/ингибиторы в организме в сторону протеаз за счет выхода протеаз в кровяное русло. Изменение этого баланса создают условия для развития многих патологий [3, 7] и могут усугублять течение основного заболевания. Контроль за активностью протеаз, попавших в кровоток из различных органов и тканей осуществляется  $\alpha_2$ -макроглобулином и  $\alpha_1$ -антитрипсином.  $A_2$ -макроглобулин обладает свойством захватывать и ингибировать все известные классы пептидаз. Комплексы  $\alpha_2$ -макроглобулина с протеазами элиминируются из крови в течение 2 минут [6] поэтому активность  $\alpha_2$ -макроглобулина в сыворотке отражает ее ингибиторные возможности. Кроме того,  $\alpha_2$ -МГ осуществляет транспорт различных цитокинов, в том числе - трансформирующего фактора роста  $\beta$ , стимулирующего остеобласты и подавляющего активность остеокластов. Однако, после связывания с протеазами, комплексы цитокин-ингибитор-протеаза опознаются макрофагами печени как элементы, подлежащие деградации, поэтому происходит их захват и расщепление. Таким образом, цитокины могут не достигать клеток-мишеней [9].

Изменения активности  $\alpha_2$ -макроглобулина и  $\alpha_1$ -антитрипсина как резервов, способствующих адаптации организма при усилении резорбции костной ткани, а также

возможность частичной передачи функций инактивации протеаз от одного ингибитора другому при усилении резорбции костного матрикса не изучались.

В соответствии с изложенным выше, целью работы явилось исследование активности протеаз, принимающих участие в ремоделировании костной ткани и сывороточных ингибиторов у овариэктомированных самок крыс.

### **Материалы и методы**

Работа выполнена на 20-ти самках крыс Wistar. Десяти из них по достижению половозрелости, в возрасте 3 месяца, была проведена овариэктомия, 10 животных послужили контролем и поэтому оставались интактными. По прошествии 5 месяцев с овариэктомии, в момент регистрации снижения минеральной плотности костной ткани на остеоденситометре HOLOGIC (QDR, Discovery-A, США) у овариэктомированных крыс, обе группы животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом.

Активность катепсина К и ММП определяли в соответствии с [1], используя флуоресцентный субстрат Z-Gly-Pro-Arg-MCA (Sigma, США) и MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-DpA-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> (American Peptide Co, США) соответственно. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд.

Сыворотку крови получали центрифугированием при 900 g в течение 20 минут. Общую концентрацию ММП-2 в сыворотке крови определяли с помощью набора R&D (США) для иммуно-ферментного анализа в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию кальция, фосфора, активность ЩФ, и ТРКФ в сыворотке крови определяли колориметрическим методом с использованием наборов «Вектор-Бест» (Россия) в соответствии с протоколами производителя. Активность  $\alpha_2$ -макроглобулина и  $\alpha_1$ -антитрипсина определяли против бензоил-аргинин-этилового эфира, используемого в качестве субстрата, по методу Яровой в модификации [7].

Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для корреляционного анализа применен критерий Спирмена. Результаты считали статистически достоверными при  $p < 0.05$ .

### **Результаты и обсуждение**

Через 5 месяцев после овариэктомии у крыс было зарегистрировано снижение общей минеральной плотности скелета относительно контрольной группы (Табл. 1).

Таблица 1

Показатели ремоделирования у самок крыс Wistar в сыворотке крови

Изучаемый параметр	Контрольные крысы	Овариэктомированные крысы
Минеральная плотность скелета, г/см <sup>2</sup>	0,154±0,005	0,139±0,005*

Активность катепсина К, нмоль/мин на 1 мл	0,87±0,18	1,25±0,13*
Общая активность ММП, мкМ/мин на 1 мл	2,47±1,35	4,56±0,99***
Концентрация ММП-2, нг/мл	92,00±2,75	140,00±8,02**
Активность $\alpha_2$ -макроглобулина, мкмоль/мин на 1 мл	4,11±0,23	3,87±0,15
Активность $\alpha_1$ -антитрипсина, мкмоль/мин на 1 мл	32,59±3,24	33,10±1,79
Активность ТРКФ, мкМ/мин на 1 л	11,01±0,98	8,74±1,01**
Активность ЩФ, мкМ/мин на 1 мл	276,37±42,65	191,98±26,00*
Концентрация кальция, мМ/л	2,33±0,10	2,26±0,13
Концентрация фосфора, мМ/л	2,30±0,21	1,96±0,10

Данные представлены как  $M \pm m$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , по сравнению с группой контроля

Определение активности протеаз в сыворотке крови показало, что у овариэктомированных крыс по сравнению с группой контроля увеличивается активность протеазы, ответственной за резорбцию в наибольшей степени – активность катепсина К и общая активность ММП, а также концентрация ММП-2 (Табл. 1).

При этом активность сывороточных ингибиторов протеаз  $\alpha_2$ -макроглобулина и  $\alpha_1$ -антитрипсина у овариэктомированных крыс оставались на уровне крыс контрольной группы. Это свидетельствует о том, что общая протеазная нагрузка у овариэктомированных животных в эти сроки после овариэктомии не является избыточной настолько, чтобы стать сигналом к усилению экспрессии этих ингибиторов как это происходило в случае идиопатического остеопороза у преждевременно стареющих крыс OXYS [1] и, соответственно, - к увеличению их активности, а также не является острой, иначе бы наблюдалось снижение их активности в сыворотке. Возможно также, что активность катепсина К у овариэктомированных крыс в значительной степени подавляется цистатинами – специфичными ингибиторами цистеиновых протеаз, а активность ММП – тканевыми ингибиторами металлопротеаз до того, как они выйдут в кровяное русло.

Несмотря на усиление резорбции костной ткани у овариэктомированных крыс, концентрация кальция у животных всех трех групп была на одном уровне (Табл. 1), что свидетельствует о способности организма овариэктомированных животных поддерживать концентрацию кальция в пределах нормы за счет кальций-регулирующих гормонов.

Активность ЩФ и ТРКФ в сыворотке крови у животных после овариэктомии снижалась, что говорит о нарушении ремоделирования костной ткани, но судить о том, что при этом преобладает резорбция можно только по увеличению активности катепсина К и ММП в

сыворотке крови. Снижение активности ЩФ в сыворотке крови овариэктомированных крыс свидетельствует о снижении формирования костного матрикса.

В контрольной группе крыс выявлена положительная корреляция между общей концентрацией ММП-2 и активностью ТРКФ в сыворотке крови ( $r=0.90$ ,  $p<0.01$ ), что может свидетельствовать о принадлежности остеокластам значительной доли ММП-2 определяемой в сыворотке у самок контрольной группы. У овариэктомированных самок обнаружена отрицательная корреляционная связь между сывороточной активностью ММП и ТРКФ ( $r=-0.54$ ,  $p<0.05$ ). Поскольку ТРКФ является маркером количества остеокластов [10], то можно предположить, что резорбция костной ткани у контрольных животных происходит за счет большего количества умеренно активных остеокластов, в то время как у овариэктомированных, судя по сниженной активности ТРКФ и повышенной концентрации ММП-2 в сыворотке крови, резорбция осуществляется меньшим количеством более активных остеокластов.

### **Заключение**

Таким образом, показано, что овариэктомия существенно изменяет вовлеченность ММП в ремоделирование скелета. Полученные данные позволяют предполагать, что одним из механизмов его действия на ремоделирование костной ткани может являться снижение экспрессии металлопротеаз в остеокластах, отличных от ММП-2, таких, как, например, ММП-9, которая принимает значительное участие в резорбции [9].

Активность катепсина К в сыворотке крови может служить маркером резорбции костной ткани при остеопорозе, вызываемом дисфункцией гонад.

### **Список литературы**

1. Активность катепсина К и матриксных металлопротеаз в костной ткани у крыс OXYS при развитии остеопороза / Венедиктова А.А., Фаламеева О.В., Колосова Н.Г. и др.// Биомедицинская химия – 2010 – Т.56, №2 – С.274-282.
2. Беневоленская Л.И. Руководство по остеопорозу. М.: 2003. 524 с.
3. Венедиктова А.А. Роль протеаз различных классов в развитии остеопороза у крыс: автореферат дис. канд. биол. наук. – Новосибирск, 2009. – 24 с.
4. Гликозаминогликаны костного матрикса при развитии остеопороза у преждевременно стареющих крыс OXYS / Ершов К.И., Русова Т.В., Садовой М.А. и др.// Успехи геронтологии – 2009 – Т.22, №2. – С.285-291.
5. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: в 2 Т. Т1. – 2-е изд. – Мн.: Беларусь, 2002. 495 с.

6. Универсальный регулятор –  $\alpha_2$ -макроглобулина (обзор литературы) / Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М., Левченко В.Г. // Клиническая лабораторная диагностика – 2004. – №11 – С.18.
7. Ярыгина Е.С. Клинико-диагностическое значение активности матриксных металлопротеаз и лизосомальных ферментов при артритах у детей: дис. канд. мед. наук. – Новосибирск, 2005.
8. Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis /Buhlung F., Rocken C., Brasch F. et al. // Am. J. Pathol. – 2004. – Vol. 164. – P. 2203 – 2216.
9. Functional heterogeneity of osteoclasts: matrix metalloproteinases participate in osteoclastic resorption of calvarial bone but not in resorption of long bone. /Everts V., Korper W., Jansen D.C. et al. // FASEB J. – 1999 – Vol.13. – P. 1219 – 1230.
10. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption Halleen J. Tiitinen S.L., Ylipahkala H. et al. // Rev. Series. – 2006. – Vol. 3. – P. 1- 9.

**Рецензенты:**

Ларионов П.М., д.м.н., профессор, г.н.с. лабораторно-экспериментального отдела ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г.Новосибирск;

Матвеева Е.Л., д.б.н., в.н.с. лаборатории биохимии ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, г.Курган.