УДК 616-092.4

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНОВ ВО ВНУТРЕННИХ ОРГАНАХ КРЫС, КАК ИСТОЧНИКАХ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОК ХРЯЩЕВОЙ И КОСТНОЙ ТКАНЕЙ

Воропаева А.А.[1], Голубинская П.А.[2], Садовой М.А.[1], Русова Т.В.[1]

[1]ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: venediktovaa@bk.ru;
[2] ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, e-mail: polinapigeon@gmail.com

Моделирование патологических процессов на клетках является важным этапом изучения механизмов, приводящим к тем или иным нарушениям в соединительной ткани, где внеклеточный матрикс и лизосомальные протеазы играют существенную роль в межклеточных взаимодействиях. Использование катепсинов в исследованиях на клетках in vitro, продуцирующих большое количество внеклеточного матрикса, представляется перспективным для моделирования некоторых звеньев патологических процессов, происходящих в хрящевой и костной тканях. Сравнительное исследование активности этих ферментов в разных органах животных – необходимый этап в выборе источника выделения данных ферментов. Показано, что наибольшая активность катепсина B выявляется в селезенке крыс, а катепсинов L, S и D – в почке, поэтому при использовании более чем 2-х крыс, источником для выделения соответствующих ферментов могут быть селезенка и почка. Наименьшая активность всех исследуемых цистеиновых протеаз выявлена в печени и составляет 10–30 % активности от наибольшей активности, выявляемых в почке или селезенке. При использовании одного животного печень крыс из-за существенно большей массы по сравнению с другими органами больше подходит для экстракции ферментов, чем селезенка и почка.

Ключевые слова: катепсин B, катепсин L, катепсин S, катепсин D, печень, почки, селезенка, активность ферментов, крысы Wistar, лизосомальные протеазы, дефекты кости, дефекты хряща, применение протеаз.

COMPARATIVE STUDY OF CATHEPSIN ACTIVITY IN INTERNAL ORGANS OF RATS AS A SOURCE OF LYSOSOMAL PROTEASE FOR CARTILAGE AND BONE CELL RESEARCH

Voropaeva A.A.[1], Golubinskaya P.A.[2], Sadovoy M.A.[1], Rusova T.V.[1]

[1]Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, e-mail: venediktovaa@bk.ru;
[2]Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia, Tomsk, e-mail: polinapigeon@gmail.com

Simulation of pathological processes in the cell culture is an important step in the study of the mechanisms that lead to certain disturbances in the connective tissue where the extracellular matrix and lysosomal proteases play an essential role in cell-cell interactions. Use for cathepsins in in vitro studies of cells producing large amounts of extracellular matrix seems promising for some simulation units pathological processes. A comparative study of the activity of these enzymes in different organs of animals is a necessary stage in the selection of source separation of these enzymes. It is shown that the highest activity of cathepsin B is detected in the spleens of rats and cathepsins L, S, D – in the kidney, therefore, when using more than 2 rats source for the isolation of the corresponding enzymes may be spleen and kidney. The lowest activity of examined cysteine proteases found in the liver, and10-30% of the activity of the highest activity detectable in the kidney or spleen. When using one animal, because a significantly higher rat liver mass is more suitable for the extraction of enzymes.

Keywords: cathepsin B, cathepsin L, cathepsin S, cathepsin D, liver, kidney, spleen, enzyme activity, Wistar rats, lysosomal protease, defects in bone, cartilage defects, the use of proteases.

Моделирование патологических процессов in vitro, происходящих при повреждении хрящевой и костной тканей, является важным этапом в выявлении и понимании патогенетических механизмов заболеваний, приводящих к формированию костных и хрящевых дефектов. Внеклеточный матрикс кости и хряща играет значительную роль в функционировании резидентных клеток. Установлено, что его компоненты влияют на клетки

как прямо, так и опосредовано. Так, молекулы проколлагена II типа, синтезируемые клетками первичного регенерата в месте дефекта костной ткани, являются центрами кристаллизации, поскольку адсорбируют кальций на своих пропептидах, а также инициируют прорастание сосудов в зону дефекта, способствуя замещению первичного регенерата костным [5]. Не исключено, что отщепление пропептидов коллагена протеазами и элиминация их из матрикса может изменять скорость ангиогенеза и кальцификации в регенерате.

Протеогликаны (ПГ) в силу своих физико-химических свойств способны адсорбировать факторы роста, регулируя биосинтетическую или митотическую активность клеток [3], поэтому их производные, полученные в ходе ограниченного протеолиза, могут изменять их функциональные свойства. Существенному усилению скорости деградации белков катепсинами B, L и S способствуют гликозаминогликаны (ГАГ), которые наряду с коллагеном в составе ПГ составляют основу матрикса хряща и которые высвобождаются после расщепления белкового компонента ПГ протеазами в матриксе [11]. Было установлено, что при связывании с такими ГАГ, как гепарин, дерматансульфат, хондроитинсульфат C и гиалуронан, усиливается активность катепсина S против коллагена IV типа [13], входящего в состав перицеллюлярного матрикса хондроцитов. Кроме того, гепарин и гепарансульфат стабилизируют структуру катепсина B, увеличивая период его активности в нейтральной и щелочной среде в 5 раз.

Существенную роль в ограниченном протеолизе, приводящему к изменению свойств молекул внеклеточного матрикса, отводят металлопротеазам. Однако протеазы лизосом помимо основной своей функции – деградации белков, участвуют в процессинге сигнальных молекул, таких, как факторы роста и цитокины [1, 4], осуществляя свою регуляторную роль в матриксе ткани. Кроме того, показано, что катепсин D обладает самостоятельным митогенным эффектом, не связанным с его протеолитическими свойствами [2]. Не исключено, что эффектами сигнальных молекул также обладают комплексы цистеиновых протеаз с их специфическими ингибиторами – цистатинами.

Известно, что катепсин B наряду с сериновыми протеазами, расщепляя гликопротеины гликокаликса клеток, приводит к нарушению прикрепления клеток матриксу, к потере гиалуронана вследствие расщепления связывающих его белков [6], что может быть весьма критичным для насыщенной гиалуронаном хрящевой ткани. Изменение передачи сигналов от молекул матрикса к клетке из-за расщепления ее рецепторов является дополнительным эффектом действия катепсина B. Показано, что катепсин B способен инициировать апоптоз клеток [4, 10].

Катепсин L способен расщеплять многие белки матрикса, включая коллаген I типа, однако, с меньшей скоростью, чем катепсин K [1]. Его регуляторная роль показана на примере участия катепсина L в ангиогенезе при опухолевом росте, заключающаяся в альтернативном процессинге эндостатина [13]. Микроциркуляция является лимитирующим фактором в консолидации краев дефекта кости, поэтому не исключено, что катепсин L может принимать участие в этом процессе за счет стимуляции ангиогенеза.

Таким образом, лизосомальные протеазы представляют область повышенного интереса в патологии хрящевой и костной тканей. Получение этих протеаз из различных органов и тканей могло бы стать полезным при исследовании клеток хондроцитов и остеобластов invitro. Выделение катепсинов из лизосом составляет более простую задачу, чем выделение металлопротеаз, поскольку вклад лизосомального протеолиза в общий катаболизм белка составляет 70 % [2]. Однако для выбора источника выделения лизосомальных протеаз необходимо исследовать активность данных ферментов в различных органах. Крысы широко применяются в лабораторных исследованиях, имеют существенную массу, и поэтому их органы могут быть использованы как источники лизосомальных ферментов.

В соответствии с изложенным выше, целью работы явилась оценка активности катепсинов B, L, D и S в различных внутренних органах крыс, как источниках лизосомальных протеолитических ферментов для исследования их влияния на клетки хрящевой и костной тканей.

Материалы и методы

Работа выполнена на 10-ти самках крыс Wistar в возрасте 3,5 месяцев массой 280–350 г. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Извлеченные печень, почку и селезенку промывали 0.25 М сахарозой с 1 мМ ЭДТА, pH 7.3. Кусочки органов гомогенизировали тефлоновым пестиком с помощью механического гомогенизатора с электрическим приводом в холодной сахарозе в соотношении 1:9 (w/v). Гомогенаты хранили при -20 °С не более 4-х недель. Перед определением активности гомогенаты разводили 0,2 % тритоном Х-100 в соотношении 1:1 (v/v).

Активность протеаз и концентрацию белка определяли согласно [2].

Активность катепсина B определяли в 0.1М фосфатном буфере, pH 6.0 с помощью 10 мкМ флуоресцентного субстрата Z-Arg-Arg-NMCA (НПО «Вектор», Россия).

Активность катепсина L определяли в 0.1М ацетатном буфере, pH 5.5 против 10 мкМ субстрата Z-Phe-Arg-NMCA (НПО «Вектор», Россия) в присутствии 1 нМ селективного ингибитора катепсина B CA-074 (любезно предоставлен профессором Кутунума, Япония).

Активность катепсина S определяли в 0.1 М фосфатном буфере, pH 6.5 с помощью 10 мкМ субстрата Z-Val-Val-Arg-MCA (Sigma, США) с добавлением 1 нМ CA-074и 1

мМфенилметилсульфонилфторида (Sigma, США) согласно. Реакционные смеси инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением раствора 0.1 М монохлоруксусной кислоты в 0.1 М ацетатном буфере pH 4.3. Флюоресцирующие продукты реакции измеряли при λ 355нм (возбуждение) и λ 460 нм (эмиссия) на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 (Япония). Удельную активность цистеиновых протеаз выражали в мкмольметилкумарилламида (МСА)/мин. на мг белка.

Активность катепсина D определяли в 0.1 М ацетатном буфере, pH 5.0 с добавлением 2 % азоказеина в 6 М мочевине равного объема, согласно. Реакцию останавливали 10 % раствором трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугировали в течение 10 мин, при 6000 об./мин определяли оптическую плотность супернатанта на спектрофотометре «Spekol 20» (KarlZeiss, Германия) при λ 366 нм. Активность катепсина D выражали в условных лабораторных единицах в расчете на мг белка (Е 366 /час на мг белка).

Проверка нормальности распределения исследуемых признаков производилась по критерию Шапиро – Уилка. В целях установления значимости различий показателей между независимыми группами, данные которых не подчиняются нормальному закону, была проведена статистическая обработка с помощью критерия Крускала – Уолиса с учётом поправки Бонферони для трёх групп.

Результаты и обсуждение

Активность катепсинов зависела от органов, в которых она определялась (табл. 1).

Таблица 1

Активность протеаз в органах крыс, выраженная в ед. активности на 1 мг белка

Орган	Активность цистеиновых протеаз, мкМ МСА/мин. на 1 мг белка			Активность катепсина D, усл. лаб. ед./час на1 мг белка	Содержание белка, мг/г ткани	Масса органа, г
	Катепсин B	Катепсин L	Катепсин S			
Печень	0,207* (0,177-0,261)	0,306** (0,270-0,375)	0,568** (0,474-0,667)	0,280** (0,238-0,361)	220** (200-236)	13 ** (12,39-13,6)
Селезенка	1,999* (1,750-2,273)	0,455** (0,432-0,503)	2,127** (1,907-2,366)	0,312** (0,085-0,152)	317,85** (308,1-327,6)	0,915** (0,72-1,01)
Почка	0,707* (0,564-0,741)	0,642** (0,539-0,719)	5,678** (5,210-6,246)	0,484** (0,385-0,733)	263,25** (257,4-284,7)	1,28** (1,2-1,31)

Данные представлены как медиана (межквартильный размах)

*p<0.01, **p<0.001 по сравнению с другими органами.

Наибольшая активность катепсина B в расчете на 1 мг белка была зарегистрирована в селезенке, превышающая активность фермента в почке более чем в 2 раза, а в печени – в 10 раз (табл. 1). Полученные данные о более высокой активности катепсина B в селезенке крыс, по сравнению с печенью, совпадают с данными других исследователей [9], изучавшими каталитическую активность ферментов, и данными коллектива [8], показавшим наибольшую экспрессию мРНКкатепсина B в селезенке и почках по сравнению с печенью. Однако это не

является универсальной закономерностью даже среди животных одного вида: известно, что у мышей линии CBA активность катепсина B в печени превышает активность в селезенке 2 раза, при одинаковом содержании катепсина B, выявляемом с помощью иммуно-ферментного анализа [4]. Не исключено, что это может быть связано с большим количеством его ингибитора – стефина A в селезенке [4].

Активность катепсина L достигала наибольших значений в расчете на 1 мг белка в ткани почки, превышая активность в селезенке в 1.4, а в печени – в 2 раза.

Как и в случае с активностью катепсина L, наибольшие значения активности катепсина S наблюдали в почке. При этом в селезенке активность катепсина S относительно почки была ниже в 2.8 раз, а в печени – в 10 раз.

Вероятно, такие различия в активности ферментов в разных органах связаны с их специальными функциями: предполагают, что катепсины B, L и S в почках являются ключевыми ферментами в гетерофагоцитозе белков из ультрафильтрата [9, 14], в то время как функция катепсинов L и S в селезенке связана с процессингом антигенов [15]. Кроме того, катепсин L принимает значительное участие в деградации внеклеточного матрикса в лимфоидных органах, опосредуя, таким образом, миграцию лимфоцитов [4]. С этими фактами может быть связана более высокая активность катепсинов L и S в селезенке по сравнению с печенью.

Наибольшую активность катепсина D в расчете на 1 мг белка наблюдали в ткани почки, в которой она превышала активность катепсина D в селезенке в 1.5 раза, а в печени в 1.7 раз, несмотря на одинаковый уровень экспрессии катепсина D в изучаемых органах, согласно данным [7].

Таким образом, активность лизосомальных протеаз в печени в расчете на 1 мг белка была ниже, чем в других органах. Это может быть связано с тем, что печень состоит из функционально разных клеток, одни из которых – Купферовские клетки печени, являясь резидентными макрофагами, экспрессируют большее по сравнению с гепатоцитами количество лизосомальных протеаз [1], другие – гепатоциты, осуществляющую пластическую функцию, синтезируют один из важнейших ингибиторов протеаз широкого спектра действия – α_2-макроклобулина [1]. Вероятно, это вносит свой вклад в инактивацию протеаз печени при приготовлении гомогената этого органа.

Известно, что активность катепсина D и исследуемых цистеиновых протеаз усиливается в опухолевой ткани за счет увеличения экспрессии. Однако данные о гетерогенности популяции опухолевых и часто наблюдающихся в геноме опухолевых клеток мутациях [4, 10] ставят перспективу получения протеаз из опухолевой ткани под сомнение, поскольку не

исключено, что такие изменения могут затронуть и гены протеаз, а также отрицательно влиять на воспроизводимость выделения ферментов.

В исследуемых органах крыс количество белка также различалось, но в меньшей степени, чем активность протеаз: наименьшее содержание белка обнаруживалось в печени, в селезенке его количество было выше на 44 %, а в почке – на 19 % (Табл. 1).

При пересчете активности на 1 грамм органа оказалось, что различия в активности протеаз между органами стали более выраженными (Табл. 2). Это дало основание предполагать, что наилучший выход катепсина B можно ожидать из селезенки, катепсинов L, S и D – из почек.

Таблица 2

Активность протеаз в разных органах крыс, выраженная в ед. активности на 1 грамм органа

Орган	Активность цистеиновых протеаз, мкМ МСА/мин. на 1 г органа			Активность катепсина D, усл. лаб. ед./час на 1 г органа
	Катепсин B	Катепсин L	Катепсин S	
Печень	48 (43-52)*	65 (64-78)**	122 (103-144)*	64 (54-76)*
Селезенка	609 (572-709)*	141 (131-165)**	668 (590-775)**	43 (27-48)*
Почка	187 (158-209)*	182 (148-190)**	1542 (1459-1766)**	135 (108-194)*

Данные представлены как медиана (межквартильный размах)

*p<0.01, **p<0.001 по сравнению с другими органами.

Тем не менее, согласно данным (табл. 1), печень у крыс имеет наибольшую массу и поэтому при пересчете активности ферментов на целый орган оказалось, что при использовании органов от одного животного катепсины L и B предпочтительнее выделять из печени (табл. 3), а катепсин S – из почек. Из этих же соображений наиболее подходящим источником катепсина D также может служить печень. При отсутствии ограничений по количеству животных, имея возможность использовать более 2-х крыс, катепсины Lи S целесообразнее выделять из их почек, а катепсин B – из селезенки.

Таблица 3

Активность протеаз в разных органах крыс, выраженная в ед. активности на орган

Орган	Активность цистеиновых протеаз, мкМ МСА/мин. на орган			Активность катепсина D, усл. лаб. ед./час на орган
	Катепсин B	Катепсин L	Катепсин S	
Печень	630 (542-674) **	867 (738-1006)**	156 (134-180) **	810 (698-934)*
Селезенка	568 (513-653) **	123 (107-161)**	568 (458-706) **	34 (26-43)*
Почка	242 (185-295) **	212 (180-279) **	181 (162-249) **	165 (125-233)*

Данные представлены как медиана (межквартильный размах)

*p<0.01, **p<0.001 по сравнению с другими органами.

Заключение

Внеклеточный матрикс и лизосомальные протеазы играют существенную роль в межклеточных взаимодействиях. Использование катепсинов в исследованиях на клетках invitro, продуцирующих большое количество внеклеточного матрикса, представляется перспективным для моделирования некоторых звеньев патологических процессов.

Ткани и органы лабораторных животных доступны для исследователей, в этом ключе использование в качестве источника лизосомальных протеаз органов крыс является оптимальным. Кроме того, биоматериал, полученный от лабораторных животных, является более качественным, что связано со стандартизацией содержания и быстрой пробоподготовкой, отсутствием у крыс профилактической антибиотикотерапии, которая, безусловно, влияет на экспрессию протеаз. Поскольку масса печени превышает массу селезенки и почки в 14 и 10 раз соответственно (Табл. 1), то печень интактных крыс может служить источником выделения всех исследуемых катепсинов в случае использования для этого одного животного. В случае использования органов от группы животных из более чем 2-х особей ожидается, что выход катепсина B может оказаться лучшим при использовании в качестве источника выделения селезенки крыс, а выход катепсина Lи S – при использовании в качестве источника выделения почек.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-6370.2015.7.

Список литературы

1. Венедиктова А.А. Роль протеаз различных классов в развитии остеопороза у крыс: автореф. дис. … канд. биол. наук. – Новосибирск, 2009. – 24 с.
2. Изменение активности катепсинов B, L и D в печени у крыс Wistar и преждевременно стареющих крыс OXYS разного возраста /А.А. Венедиктова, О.В. Фаламеева, Н.Г. Колосова и др. // Сибирский научный медицинский журнал. – 2007. – Т. 27, № 3. – С. 127-132.
3. Особенности метаболизма протеогликанов из разных топографических зон коленного сустава у больных остеоартрозом: вариабельность фенотипа хондроцитов /Т.В. Русова, Е.Л. Строкова, А.А. Воропаева, Е.И. Щелкунова // Сибирский научный медицинский журнал. – 2013. – Т. 33, № 5. – С. 78-86.
4. Фаламеева О.В. Роль протеиназ лизосом и их эндогенных ингибиторов при росте и химиотерапии опухолей у мышей: автореф. дис. … канд. мед. наук. – Новосибирск, 2002. – 28 с.
5. Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage Matrix / A.R. Poole, Y. Matsui, A. Hinek, E.R. Lee // The anatomical record. – 1989. – Vol. 224. – P. 167-179.

6. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases / B.F. Becker, M. Jacob, S. Leipert et al. // Br. J.Clin. Pharmacol. – 2015. – Vol. 80(3). – P. 389-402.

7. Differences in cathepsin B mRNA levels in rat tissues suggest specialized functions / B.San Segundo, S.J.Chan, D.F. Steiner et al. // FEBS Lett. – 1986. – Vol. 201(2). – P. 251-256.

8. Distribution of basement membrane molecules, laminin and collagen Type IV, in normal and degenerated cartilage tissue / C. Bindzus, W.S. Toh, A.H. Gomoll et al. // Cartilage. – 2014. – Vol. 5(2). – P. 123–132.

9. Distribution of cathepsins B and H in rat tissues and peripheral blood cells /E. Kominami, T.Tsukahara, Y.Bando, N. Katunuma // J. Biochem. – 1985. – Vol. 98 (1). – P. 87-93.

10. Mason S.D., Joyce J.A. Proteolytic networks in cancer // Trends Cell. Biol. – 2011. – Vol. 21 (4). – P. 228-237.

11. Novinec M., Lenari B., Turk B. Cysteine Cathepsin Activity Regulation by glycosaminoglycans // BioMed. Research International. – 2014. – 9 p.

12. Olbricht C.J. Distribution of cathepsins B and L in the kidney and their role in tubular protein absorption // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1992. – Vol. 30 (10). – P. 675-81.

13. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII / U. Felbor, L. Dreier, R.A.R. Bryant et al. // EMBO J. – 2000. – Vol. 19(6). – P. 1187–1194.

14. Specific catalytic activity of cathepsin S in comparison to cathepsins B and L along the rat nephron / H. Schmid, M. Koop, S. Utermannet al. // Biol Chem. – 1997. – Vol. 378 (2). – P. 61-69.

15. Splenic cathepsin L is maturated from the proform by interferon-gamma after immunization with exogenous antigens / T. Zhang, Y. Maekawa, T. Sakai et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – Vol. 283 (2). – P. 499-506.