
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Фомина Н.В., Фомина М.А., 2014
УДК: 616.147.3-008.9:577.152

**ОЦЕНКА СВЯЗИ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ
ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ
С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

Н.В. Фомина, М.А. Фомина

Рязанский государственный медицинский университет им. акад.И.П. Павлова,
г. Рязань

**ASSESSMENT OF COMMUNICATION ACTIVITY OF LYSOSOMAL
CYSTEIN PROTEASES IN PLASMA AND INDICATORS
OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS
WITH DISEASES OF LOWER LIMBS VEINS**

N.V. FOMINA, M.A. FOMINA

Ryazan State I.P. Pavlov University, Ryazan

Изучение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей выявило, что данные нозологии сопровождаются повышением активности катепсинов L и H в плазме крови. Степень повышения активности изучаемых катепсинов при варикозном расширении вен оказалась выше, чем при остром венозном тромбозе. Варикозное расширение вен нижних конечностей и острый венозный тромбоз сопровождаются увеличением синтеза продуктов деградации монооксида азота. Степень повышения продуктов деградации монооксида азота выше у пациентов с острым венозным тромбозом, чем у пациентов с варикозом. Обнаружена отрицательная корреляционная связь слабой степени между активностью катепсинов L и H и концентрацией конечных метаболитов оксида азота в плазме крови пациентов с острым венозным тромбозом.

Ключевые слова: катепсины L и H, варикозное расширение вен нижних конечностей, острый венозный тромбоз, эндотелиальная дисфункция, метаболиты оксида азота.

The study of the activity of lysosomal cysteine proteases in patients with diseases of the veins of the lower limbs revealed that these nosologies accompanied by increased activity of cathepsins H and L in plasma. The rate of increase of cathepsins L and H for varicose veins is higher than in venous thrombosis.

Varicose veins of the lower limbs and acute venous thrombosis accompanied by an increase in the synthesis of nitric oxide degradation products. Increasing degree of degradation products of nitric oxide is higher in patients with acute venous thrombosis than in patients with varicose veins. A negative correlation between the activity of cathepsins L and H and the concentration of nitric oxide metabolites in the blood plasma of patients with acute venous thrombosis was increased.

Keywords: cathepsins L and H, varicose of the lower limb veins, venous thrombosis, endothelial dysfunction, nitric oxide metabolites.

Введение

Лизосомальные цистеиновые протеиназы (ЛЦП) были открыты более 50 лет назад и с тех пор накоплены многочисленные данные об участии данных ферментов в различных физиологических и патологических процессах организма. В последние два десятилетия в результате многочисленных исследований было установлено, что ЛЦП принимают участие в регуляции апоптоза [10], в процессах иммунного ответа [11], в метаболизме коллагена при моделировании кости и хряща [8], процессинге нейропептидов и гормонов [12], адгезии и миграции моноцитов и макрофагов [15], в процессах неоангиогенеза [16].

Актуальность заболеваний вен нижних конечностей на сегодняшний день не вызывает сомнений. Венозные тромбозы относятся к числу распространённых и социально значимых заболеваний в индустриально развитых странах. Известно, что наряду с «классическими» факторами риска известен ряд генетических причин, ассоциированных с повышенной склонностью к развитию тромбозов, частота обнаружения которых не превышает 50 %, а около 30% венозных тромбозов возникает в отсутствие известных причин, что делает перспективным дальнейшее изучение молекулярных механизмов развития данного заболевания [4].

Варикозное расширение вен нижних конечностей является заболеванием, которое присуще только человеку. По данным ряда авторов, в нашей стране ВБНК по самым приблизительным оценкам имеет место у 30 миллионов человек, в последние годы отмечается рост числа осложнённых форм и формирование стойкой нетрудоспособности [1].

В настоящее время в патогенезе варикозного расширения вен отводится роль ряду факторов, таких, как замедление тока крови, напряжение силы сдвига, гипоксия и застой [14]. В результате исследований последних лет были выявлены новые механизмы первичного повреждения вены, ключевая роль среди которых отводится эндотелиальной дисфункции, развивающейся в результате гипоксии эндотелия, вследствие чего эндотелий выделяет молекулы адгезии, повышается проницаемость сосудистой стенки для тучных клеток, моноцитов, макрофагов, Т-лимфоцитов [7].

В настоящее время доказано, что заболевания вен нижних конечностей протекают на фоне эндотелиальной дисфункции (ЭД)[5].

Нарушение метаболизма оксида азота (NO) играет главную роль в дисфункции эндотелия и является неотъемлемой составляющей патогенеза различных заболеваний сердечно-сосудистой системы. Определение конечных метаболитов – нитратов и

нитритов, рассматривающихся, как конечные продукты NO, получило широкое распространение в экспериментальных и клинических работах для оценки общего синтеза NO[2].

Цель исследования

Оценка взаимосвязи активности катепсиновL и H в плазме крови с концентрацией конечных метаболитов монооксида азота у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей.

Материалы и методы

Материалом для настоящего исследования послужили результаты обследования 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 с 2011 по 2012 гг.

Группу контроля составили клинически здоровые доноры отделения переливания крови Рязанской ОКБ, сопоставимые с пациентами исследуемых групп по возрасту и полу.

Забор крови у пациентов производился утром в одно и то же время из локтевой вены натощак. В качестве антикоагулянта использовали раствор ЭДТА.

Активность катепсиновL и H изучали спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke [6].

Определение активности катепсина L

Принцип метода – количественное определение 7-амидо-4-метилкумарина, высвобождающегося в результате энзиматического гидролиза пептидной связи из N-карбобензоксип-L-фенилаланил-аргинин-7-амидо-4-метилкумарина (N-CBZ-Phe-Arg-7-амидо-4-метилкумарин, «Sigma», USA).

Определение активности катепсина H

Принцип метода – количественное определение 7 – амидо – 4 – метилкумарина, высвобождающегося в результате энзиматического гидролиза пептидной связи из субстрата аргинин – 7 – амидо – 4 – метилкумарина (Arg – 7 – амидо – 4 – метилкумарин, «Sigma», USA). Полученные результаты выражали в нмоль/чхл.

Для определения концентрации стабильных метаболитов NO (нитритов и нитратов) был использован метод в модификации В.А. Метельской [3].

Принцип метода: метод определения суммы ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- = \text{NO}_x$) стабильных метаболитов оксида азота в биологическом материале основан на восстановлении NO_3^- до NO_2^- хлоридом ванадия (III) с последующим определением нитрата с помощью реактива Грисса. Полученные результаты выражали в мкмоль/л.

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

Результаты и их обсуждение

Определение активности катепсина L и H в плазме крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей и острым венозным тромбозом показало её достоверное увеличение в обеих группах пациентов, что может свидетельствовать об участии изучаемых ЛЦП в патогенезе данных заболеваний (табл. 1). Причём, необходимо отметить, что степень повышения активности ЛЦП при варикозном расширении вен оказалась более выраженной, чем при остром венозном тромбозе. Отмечалась более высокая степень повышения активности катепсина H, чем катепсина L, у пациентов с варикозом. Возможно, более высокое повышение активности исследуемых катепсинов у пациентов с варикозом связано с более длительным течением и сопровождающей его хронической венозной недостаточностью.

Для изучения степени выраженности эндотелиальной дисфункции было проведено определение концентрации стабильных продуктов деградации NO ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) в сыворотке крови (табл. 2).

Таблица 1

Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в сыворотке и лейкоцитах крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей и острым венозным тромбозом, нмоль/чхл ($M \pm S$)

	Контрольная группа	Пациенты с варикозным расширением вен нижних конечностей	Пациенты с острым венозным тромбозом
	n=40	n=25	n=40
Активность катепсина L в плазме, нмоль/чхл	4,19 ± 2,33	9,18 ± 5,9*	5,79 ± 2,38*
Активность катепсина H в плазме, нмоль/чхл	3,87 ± 3,17	9,44 ± 8,76*	4,44 ± 2,64*

Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$).

Отмечалась более высокая концентрация NO_2/NO_3 в плазме крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей по сравнению с показателями контрольной группы, но данные отличия не явились статистически значимыми. В плазме крови пациентов с острым венозным тромбозом в активную стадию процесса концентрация NO_2/NO_3 статистически значимо отличалось как от показателей контрольной группы (была выше на 31%), так и от значений пациентов с варикозом.

Таким образом, при изучаемой нами венозной патологии наблюдается увеличение синтеза продуктов деградации монооксида азота. Этот факт может подтвердить развитие ЭД, которая в большей степени выражена у пациентов с острым венозным тромбозом.

Рядом работ зарубежных авторов была показана способность NO нитрозилировать тиольные остатки в активном центре каспаз, и тем самым ингибировать их активность [13]. Имеются данные, что NO способен ингибировать активность катепсина В, папаина и калпаина через S-нитрозилирование остатков цистеина в активном центре протеаз [9]. Вполне возможно, что NO может ингибировать активность катепсинов L и H вследствие того, что активный центр данных ферментов также содержит остаток цистеина. Это предположение согласуется с нашими данными, которые демонстрируют более высокое содержание продуктов монооксида азота и более низкую активность катепсинов L и H в плазме крови больных острым венозным тромбозом по сравнению с пациентами с варикозным расширением вен.

Таблица 2

Концентрация стабильных продуктов деградации монооксида азота, мкмоль/л, (M±S)

	Контрольная группа	Пациенты с варикозным расширением вен нижних конечностей	Пациенты с острым венозным тромбозом
	n=40	n=25	n=40
Концентрация NO ₂ /NO ₃ , мкмоль/л	49,68 ± 15,38	55,32 ± 20,49	72,08± 18,92****

Примечание: *– статистически значимые отличия от контрольной группы; **– статистически значимые отличия от группы пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей (p<0,05).

При оценке корреляционных связей между активностью изучаемых ферментов и концентрацией конечных метаболитов оксида азота была выявлена отрицательная корреляция слабой степени между активностью катепсина L и концентрацией конечных метаболитов оксида азота (r=– 0,40) и активностью катепсина H и изучаемыми показателями ЭД (r=– 0,34) у пациентов с венозным тромбозом. Данный факт также может подтверждать участие оксида азота в регуляции активности ЛЦП при остром венозном тромбозе.

Выводы

1. Заболевания вен нижних конечностей, в частности, варикозное расширение вен и острый венозный тромбоз, сопровождаются повышением активности лизосомальных цистеиновых протеиназ-катепсинов L и H в плазме крови. Степень повышения активности изучаемых катепсинов при

варикозном расширении вен выше, чем при остром венозном тромбозе.

2. Варикозное расширение вен нижних конечностей и острый венозный тромбоз сопровождаются увеличением синтеза продуктов деградации монооксида азота. Степень повышения продуктов деградации монооксида азота выше у пациентов с острым венозным тромбозом, чем у пациентов с варикозом.

3. Обнаружена отрицательная корреляционная связь слабой степени между активностью катепсинов L и H и концентрацией продуктов деградации монооксида азота в плазме крови пациентов с острым венозным тромбозом.

4. Наиболее вероятной причиной обнаруженных изменений может явиться участие лизосомальных цистеиновых протеиназ в повреждении эндотелия при заболеваниях вен нижних конечностей и ингибирование активности ЛЦП оксидом азота.

Литература

1. Горелик С. Г. Варикозная болезнь нижних конечностей, особенности у лиц старших возрастных групп / С. Г. Горелик, А.В. Литынский, П.И. Поляков // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 5. – С. 276-280.
2. Значение определения нитритов-нитратов как маркёров дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистой патологии / Л.А. Лапшина [и др.] // *Укр. часопис. 6* (74). – XI/XII. – 2009. – С. 49-53.
3. Метельская В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке [Текст] / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2005. – № 6. – С. 15-18.
4. Молекулярные механизмы эндотелиальной дисфункции при венозном тромбозе: современные представления и перспективы дальнейшего изучения / А.П. Полякова [и др.] // *Трансфузиология*. – 2 декабря 2011. – Т. 12.
5. Стойко Ю.М. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе венозной трансформации / Ю.М. Стойко, В.Г. Гудымович // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2008. – Т. 14, №1. – С. 15-20.
6. Barrett A.J. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L / A.J. Barrett., H. Kirschke // *Methods in Enzymol.* – 1981. – Vol. 80. – P. 535-561.
7. Boisseau M.R. Leukocyte involvement in the signs and symptoms of chronic venous disease. Perspectives for therapy // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2007; 37(3): 277-90.
8. Deal C. Potential new drug targets for osteoporosis // *Nat Clin Pract Rheumatol.* – 2009; 5(1): 20-27.
9. Koh T. J. Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells / T. Koh, J. G. Tidball // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* – 2000. – 279. – С. 806-812.
10. Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin d-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183 / H. Appelqvist [et al.] // *Annals of Clinical and Laboratory Science.* – 2012. – Vol. 42, Issue 3. – P. 231-242.
11. Magister S. Cystatins in immune system (Review) / S. Magister, J. Kos // *Journal of Cancer.* – 2013. – Vol. 4, Issue 1. – P. 45-56.
12. Major role of cathepsin L for producing the peptide hormones ACTH, beta-endorphin, and alpha-MSH, illustrated by protease gene knockout and expression / L. Funkelstein [et al.] // *J Biol Chem.* – 2008; 283(51): 35652-35659.
13. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo / Rossig L. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – 274. – P. 6823-6826.
14. Pathogenic mechanisms in varicose vein disease: the role of hypoxia and inflammation / S.M. Ghaderian [et al.] // *Pathology.* – 2010; 42(5): 446-53.

15. Three-dimensional invasion of macrophages is mediated by cysteine cathepsins in protrusive podosomes / Z. Jevnikar [et al.] // European Journal of Immunology. – December 2012. – Vol. 42, Issue 12. – P. 3429-3441.

16. Zhou G.-H. Inhibitory effect of cathepsin B-RNAi-lentivirus on mouse retinal neovascularization / G.-H. Zhou, L. Kong // Zhonghua Shiyan Yan-ke Zazhi / Chinese Journal of Experimental Ophthalmology. – May 2013. – Vol. 31, Issue 5. – P. 452-455.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Фомина Наталья Васильевна – ассистент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.
E-mail: fominataly@rambler.ru.

Фомина Мария Алексеевна – к.м.н., доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.