

УДК 577.152:616.14 – 005.6 – 092.9

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ПЛАЗМЫ И ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТРОМБОЗА У КРЫС

Фомина Н.В., Фомина М.А., Калинин Р.Е., Герасимов А.А., Новиков А.Н.

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Рязань, e-mail: fominataly@rambler.ru

Изучена активность лизосомальных цистеиновых протеиназ-катепсинов L, B и H в плазме и различных фракциях лейкоцитов крови у крыс в динамике экспериментального венозного тромбоза. Венозный тромбоз у крыс моделировали путём лигирования общей подвздошной вены. Активность катепсинов изучали на первые, третьи и пятые сутки эксперимента. Статистически значимым в плазме оказалось повышение активности катепсинов L и H во всех случаях, катепсина B на пятые сутки, в полиморфноядерных лейкоцитах повышение активности катепсинов L на первые сутки, H – на первые и пятые, B – на первые, третьи и пятые сутки и в моноядерных лейкоцитах повышение активности катепсинов H и B на первые, третьи и пятые сутки. Наиболее выраженным оказалось повышение активности катепсина B в полиморфноядерных лейкоцитах, а также катепсинов B и H в моноядерных лейкоцитах, что может свидетельствовать об активном участии данных ферментов в деструктивных процессах, приводящих к повреждению эндотелия сосудов и определяющих тяжесть клинического состояния.

Ключевые слова: лизосомальные цистеиновые протеиназы, полиморфноядерные лейкоциты, моноядерные лейкоциты, экспериментальный венозный тромбоз

ACTIVITY'S CHANGE OF LYSOSOMAL CYSTEIN PROTEINASES BLOOD PLASMA AND LEUKOCYTES IN THE DYNAMICS OF THE EXPERIMENTAL THROMBOSIS IN RATS

Fomina N.V., Fomina M.A., Kalinin R.E., Herasimov A.A., Novikov A.N.

Ryazan State Medical University n.a. I.P. Pavlov, Ryazan, e-mail: fominataly@rambler.ru

The activity of the lysosomal cystein proteinases L, B and H in plasma and the various fractions of white blood cells in rats in the dynamics of the experimental venous thrombosis was studied. Venous thrombosis in rats simulated by ligation of the lower iliac vein. Activity of cathepsins on the first, third and fifth days of the experiment was studied. Statistically significant activity of cathepsins L and H in all cases and cathepsin B on the fifth day in plasma was increased. Statistically significant activity of cathepsin L on the first day, H on the first and the fifth, B in the first, third and fifth day in polymorphonuclear leukocytes was increased. Change of activity cathepsins H and B in mononuclear leukocytes in the first, third and fifth day was statistically significant. The most pronounced was the increased activity of cathepsin B the polymorphonuclear leukocytes, as well as cathepsins B and H in mononuclear leukocytes. It may testify about active participation of these enzymes in the destructive processes, that lead to the damage of vascular endothelium and determine the severity of the clinical condition.

Keywords: lysosomal cystein proteinases, polymorphonuclear leucocytes, mononuclear leukocytes, experimental venous thrombosis

Тромбоз глубоких вен (ТГВ) и тромбоэмболия лёгочной артерии (ТЭЛА) занимает одно из лидирующих мест по общему количеству заболеваний, а также по уровню смертности, представляя серьёзную проблему современного здравоохранения и являясь одной из основных причин тяжёлой инвалидизации больных, а также летальности в большинстве развитых стран [1].

Основные причины развития тромбоза известны давно, ещё в 1859 году Р. Вирхов объединил их в триаду, включающую в себя замедление кровотока, гиперкоагуляцию и повреждение сосудистой стенки [15]. Известно, что вклад каждого из этих факторов в формирование тромбоза может быть различным.

Вместе с тем в результате ряда исследований, проведённых за последние несколько лет, были выявлены новые механизмы первичного повреждения сосудистой стенки, ключевую роль в которых играет эндотелиальная дисфункция, развивающаяся в результате гипоксии [13].

По данным ряда исследователей [2] стало понятным, что флебостаз и повышение венозного давления приводят к гипоксии эндотелия, что сопровождается экспрессией на его поверхности специфических адгезивных молекул с последующей активацией лейкоцитов и развёртыванием лейкоцитарно-эндотелиальной реакции. Основными этапами этого процесса служит фиксация к эндотелиоцитам активированных лейкоцитов и их дальнейший выход в паравазальное пространство.

Активированные нейтрофилы в свою очередь контактируют с эндотелием, секретируют множество биологически активных веществ, повреждающих его. Эндотелий перестаёт выполнять роль регулятора местного кровотока. В физиологическом состоянии эндотелий синтезирует разнообразные молекулы (NO, АТ III, протеин S, простаглицлин, гепариноподобные вещества), в норме регулирующие процессы свёртывания крови и препятствующие агре-

гации форменных элементов и поддерживающие оптимальный сосудистый тонус. Поэтому комплекс субстратов, выделяемых активированными нейтрофилами, влияет на перечисленные функции эндотелия.

Эндотелиальные клетки в больших количествах содержат Р-селектин, который при активировании клетки выделяется на её поверхность и это является одним из условий для миграции лейкоцитов в ткани через сосудистую стенку, что в конечном итоге приводит к асептическому воспалению в стенке тромбированной вены [12].

Известно, что во всех стадиях воспалительного процесса – альтерации, экссудации, пролиферации – принимают участие протеолитические ферменты [4]. Лизосомальные цистеиновые протеиназы (ЛЦП), или катепсины, являются также протеолитическими ферментами, локализованными главным образом в лизосомах клеток.

Способность ЛЦП к секреции и наличие данных об участии катепсинов В и L в деградации внеклеточных белков – ламинина, фибронектина, коллагена IV типа [10] – заставляет рассматривать данную группу ферментов в качестве одного из наиболее вероятных факторов развития патологии сосудистой стенки. В настоящее время доказано, что ЛЦП, а также дисбаланс между ЛЦП и их внутриклеточным ингибитором – цистатином С – играют одну из ведущих ролей в ремоделировании сосудистой стенки при патологии сосудов – атеросклерозе [11] и аневризме аорты [14].

Также имеются данные об участии лизосомальных сериновых и аспартильных протеиназ в развитии эндотелиальной дисфункции. Так, вследствие своего положительного заряда катепсин G взаимодействует с эндотелием сосудов и изменяет электрические поля его составляющих, что приводит к задержке натрия в сосудистой стенке, вызывая её отёк, что способствует развитию ГБ [8].

Тем не менее, участие лизосомальных ферментов в патологии венозной системы, и, в частности, участие катепсинов L, H и B в развитии венозного тромбоза остаётся практически не изученным.

Цель исследования – изучение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ – катепсинов L, H и B в плазме и лейкоцитах крови в динамике экспериментального тромбоза у крыс.

Материал и методы исследования

В экспериментальной части работы использованы 3–4-месячные конвекциональные половозрелые крысы-самки линии Wistar массой 200–400 г в количестве 40 штук, полученные из вивария Рязанского государственного медицинского университета.

Содержание и выведение животных из эксперимента осуществлялось в соответствии с «Санитарны-

ми правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993 и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

Животные содержались по 3–4 особи одного пола в металлических клетках площадью 24 дм² при естественном освещении, получали воду и полноценный сухой комбикорм для лабораторных животных «Чара» (производство ЗАО «Ассортимент – Агро», Московская область, Сергиев-Посадский район, д. Тураково).

Воспроизведение тромбоза у экспериментальных животных осуществляли путём лигирования общей подвздошной вены одной конечности [3] в специально оборудованной операционной вивария ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. Перед хирургическим вмешательством животных наркотизировали. Предварительно за 15 минут до подачи наркоза проводили премедикацию введением «Рометара» внутримышечно, наркоз осуществлялся введением препарата «Золетил» внутримышечно. В ходе операции определялась пульсация подвздошной артерии и в месте её проекции производили разрез кожи и подкожной клетчатки длиной 4–5 см. Тупо расслаивая мышцу, выделяли сосудисто-нервный пучок, определяли в нём общую подвздошную вену и перерезывали её.

Выведение из эксперимента осуществлялось на первые, третьи, пятые сутки после операции. За 12 часов до выведения животных лишали корма, забой производился в утренние часы (8–9 часов).

Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая из брюшной аорты под лёгким эфирным наркозом. 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, подсчитывали в камере Горяева и гомогенизировали пипетированием через иглу малого диаметра.

В качестве контроля использовалась кровь крыс, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями.

Активность катепсинов L, H и B измеряли спектрофлуориметрическим методом по Barrett & Kirschke [9] на первые, третьи и пятые сутки после проведённой операции.

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

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка изменений активности катепсинов L, H и B в плазме и лейкоцитах крови крыс в ходе экспериментального моделирования тромбоза с контрольной группой выявила следующие статистически значимые отличия (таблица).

Изменение активности катепсинов L, H и B плазмы и различных фракций лейкоцитов крови крыс при экспериментальном тромбозе, (M ± S)

Активность катепсинов, нмоль·10 ⁴ /чхл (в плазме); нмоль/ч·10 ⁶ клеток (в клетках)	Контроль, n = 6	1 сутки, n = 6	3 сутки, n = 6	5 сутки, n = 6
<i>Плазма крови</i>				
L	4,98 ± 0,56	6,93 ± 0,89*	8,98 ± 1,96*	10,37 ± 1,55*
H	1,1 ± 0,68	3,18 ± 0,46*	4,08 ± 0,9*	4,45 ± 0,52*
B	3,2 ± 0,33	4,35 ± 0,79	4,72 ± 1,01	5,3 ± 0,54*
<i>Полиморфноядерные лейкоциты</i>				
	Контроль	1 сутки	3 сутки	5 сутки
L	17,15 ± 4,47	29,27 ± 5,87*	22,62 ± 7,37	25,89 ± 7,64
H	5,37 ± 1,79	12,44 ± 2,46*	10,96 ± 4,59	11,08 ± 5,05*
B	0,84 ± 0,19	14,61 ± 4,36*	13,2 ± 4,92*	12,54 ± 2,94*
<i>Моноядерные лейкоциты</i>				
	Контроль	1 сутки	3 сутки	5 сутки
L	22,91 ± 5,66	27,95 ± 7,41	23,44 ± 5,24	19,53 ± 8,6
H	1,4 ± 0,29	12,31 ± 3,67*	10,36 ± 3,7*	5,74 ± 2,36*
B	1,26 ± 0,24	16,14 ± 5,05*	15,91 ± 6,27*	8,38 ± 3,0*

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

Активность катепсина L в плазме крови крыс повышалась статистически значимо у крыс на первые, третьи и пятые сутки. В полиморфноядерных лейкоцитах мы нашли статистически значимые отличия на первые сутки после моделирования венозного тромбоза. В моноядерных лейкоцитах активность катепсина L также повышалась, но эти отличия не явились статистически значимыми.

Активность катепсина H статистически значимо повышалась в ходе экспериментального тромбоза у крыс в плазме и моноядерных лейкоцитах крови на первые, третьи и пятые сутки после проведённой операции. Также активность катепсина H статистически значимо повышалась в полиморфноядерных лейкоцитах на первые и пятые сутки экспериментального тромбоза.

Активность катепсина B повышалась статистически значимо в плазме крови оперированных крыс на пятые сутки эксперимента, а также в моноядерных и полиморфноядерных лейкоцитах на первые, третьи и пятые сутки экспериментально моделированного венозного тромбоза.

Ранее проведённые исследования показали, что на первые сутки после моделирования венозного тромбоза происходят изменения как в стенке сосуда, так и в его просвете [6]. Во внутренней оболочке вены наблюдаются набухание эндотелиальных клеток и их ядер, а также отёк и разрых-

ление базальной мембраны. А в просвете отмечалось повышенное содержание форменных элементов и краевое стояние лейкоцитов без их миграции в стенку сосуда. Возможно, повышенная активность изучаемых катепсинов в плазме была связана с повышенным выходом катепсинов из активированных лейкоцитов в плазму.

Также ранее было изучено, что на третьи сутки экспериментального тромбоза наблюдается умеренная лейкоцитарная инфильтрация и выход лейкоцитов в окружающую сосуд соединительную ткань [5]. Возможно, некоторое снижение активности катепсинов L, H и B в полиморфноядерных лейкоцитах крыс на третьи сутки по сравнению с первыми мы наблюдали потому, что в этот период активированные лейкоциты устремляются в венозную стенку, а их количество в системном кровотоке снижается.

Известно, что лейкоциты и макрофаги при повреждении тканей и, в частности, при метаболическом инфаркте миокарда могут являться одними из основных источников таких воспалительных цитокинов, как ИЛ-1, ИЛ-6 и TNF-α, а также гистамина, серотонина, тромбоксана A2, под влиянием которых происходит дальнейшее повреждение эндотелия сосудов [7]. Возможно, и в развитии венозного тромбоза катепсины L, B и H лейкоцитов опосредованно повреждают эндотелий сосудов через активацию лейкоцитов и агрегированных тромбоцитов, а также продуктов их деятельности.

Выводы

1. Венозный тромбоз у крыс, проведённый в экспериментальных условиях путём лигирования общей подвздошной вены, сопровождается повышением активности лизосомальных цистеиновых протеиназ L, H и B в плазме, моноядерных и полиморфноядерных лейкоцитах крови на первые, третьи и пятые сутки.

2. Повышение активности катепсинов L, B и H в полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови крыс при экспериментальном тромбозе может подтверждать факт участия катепсинов, активированных лейкоцитов в патогенезе тромбоза.

3. Значительное повышение активности катепсина B в полиморфноядерных лейкоцитах и катепсинов B и H в моноядерных лейкоцитах крови крыс при экспериментальном тромбозе может свидетельствовать об активном участии катепсинов B и H лейкоцитов в деструктивных процессах, приводящих к повреждению эндотелия сосудов и определяющих тяжесть клинического состояния.

Список литературы

1. Баешко А.А. Послеоперационный тромбоз глубоких вен нижних конечностей и тромбоз эмболия легочной артерии. – М., 2000. – 136 с.
2. Об участии лейкоцитов в патогенезе первичных форм хронических заболеваний вен нижних конечностей / И.Ю. Богачёв, О.В. Голованова, Н.А. Сергеева, А.Н. Кузнецов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011 – Т. 17. – № 3. – С. 71–74.
3. Анти тромбогенная активность липовертина на модели венозного тромбоза у крыс / И.С. Иванов, А.В. Сидехменова, В.И. Смольякова, Н.А. Тюкавкина, М.Б. Плотников // www.MEDLINE.ru, Т. 11, Фармакология. – 2010. – С. 590–595.
4. Кирпиченко Л.Н. Значение компонентов системы протеолиза в регуляции воспалительных реакций. Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – Витебск, 2010. – № 2(4). – С. 15–23.
5. Маркауцан П.В. Структурная организация стенки вены при замедлении кровотока и тромбозе в эксперименте: автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата медицинских наук. – Минск, 2004.
6. Структурные изменения сосудистой стенки при экспериментальном моделировании венозного тромбоза / Ю.С. Небылицин, С.А. Сушков, И.В. Самсонова, О.Д. Мяделец, Л.И. Арчакова // Медицинский журнал. – 2007. – № 4. – С. 82–86.
7. Хидирова Л.Д., Маянская Н.Н. Особенности вовлечения нейтрофилов и лизосомальных ферментов в процесс развития метаболического инфаркта миокарда // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 4. – URL: www.science – education.ru/98 – 4774.
8. Цыганкова О.В., Ружаткина Л.А., Бондарева З.Г. Лизосомальные ферменты. Новый взгляд на фундаментальные материи с позиций кардиолога // Цитокины и воспаление. – 2009. – № 4. – С. 11–17.
9. Barrett A.J., Kirschke H., Cathepsin B., cathepsin H., Cathepsin L. // In Enzymol. – 1981. – Vol. 80. – P. 535–561.
10. Cheng X.W., Kuzuya M., Sasaki T., Arakawa K., Kanda S., Sumi D., Koike T., Maeda K., Tamaya-Mori N., Shi G.P. et al. Increased expression of elastolytic cysteine proteases, cathepsins S and K, in the neointima of balloon-injured rat carotid arteries // Am. J. Pathol. – 2004. – 164. – С. 243–251.
11. Liu J. Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes // J. Liu [et al.] // Atherosclerosis. – 2006. – 186. – P. 411–419.
12. Lopez J.A., Kearon C., Lee AYY. Deep Venous Thrombosis // Hematology. – 2004.
13. Schmid-Schonbein G.W., Granger D.N. Molecular Basis for Microcirculatory Disorders, Springer-Verlag, Paris. 2003, 640, ISBN:2 – 287 – 0503 – X.
14. Suzanne P.M. Lutgens. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease / P. M. Suzanne Lutgens [et al.] // The FASEB Journal. – October 2007. – Vol. 21. – P. 3029–3041.
15. Virchow R.L.K. Gessamelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin. – Frankfurt am Main: Von Meidinger & Sohn, 1856. P. 219–732 (English translation by A.C. Matzdorff and W.R. Bell. Thrombosis and Emboli. – Canton, Massachusetts, Science History Publications, 1998).

References

1. Baeshko A.A. *Posleoperacionnyj tromboz glubokih ven niznih konechnostej i tromboz embolija legochnoj arterii* [Post-operative thrombosis of the lower limbs deep veins and thromboembolia pulmonary artery]. Moscow, 2000.
2. Bogachjov I.Ju., Golovanova O.V., Sergeeva N.A., Kuznecov A.N. *Angiologija i sosudistaja hirurgija*. 2011, T. 17. no. 3. pp. 71–74.
3. Ivanov I.S., Sidehmenova A.V., Smol'jakova V.I., Tjukavkina N.A., Plotnikov M.B. *Journal Farmakologija 2010, T.11*, pp. 590–595, available at www. MEDLINE.ru.
4. Kirpichenok L.N. *Mediko – biologicheskie problemy zhiznedejatel'nosti*, 2010, no. 2(4), pp. 15–23.
5. Markaucan P.V. *Strukturnaja organizacija stenki veny pri zamedlenii krovotoka i tromboze v jeksperimente: avtoreferat dissertacii na soiskanie uchjonoj stepeni kandidata medicinskih nauk*. [The structural organization of the walls of veins with slowing of blood flow and thrombosis in the experiment: author's abstract of the dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of medical Sciences], Minsk, 2004.
6. Nebylicin Ju.S., Sushkov S.A., Samsonova I.V., Mjajelec O.D., Archakova L.I. *Medicinskij zhurnal*, 2007, no. 4, pp. 82–86.
7. Hidirova L.D., Majanskaja N.N. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*, 2011, no. 4; available at www.science – education.ru/98 – 4774.
8. Cygankova O.V., Rujatkina L.A., Bondareva Z.G. *Citokiny i vospalenie*, 2009, no. 4, pp. 11–17.
9. Barrett A.J., Kirschke H. *In Enzymol*, 1981, Vol. 80, pp. 535–561.
10. Cheng X.W., Kuzuya M., Sasaki T., Arakawa K., Kanda S., Sumi D., Koike T., Maeda K., Tamaya-Mori N., Shi G.P. *Am. J. Pathol.*, 2004, 164, 243–251.
11. Liu J., Ma L., Yang J., Ren A., Sun Z., et al. *Atherosclerosis*, 2006, 186, pp. 411–419.
12. Lopez J.A., Kearon C., Lee AYY. *Hematology*, 2004.
13. Schmid-Schonbein G.W., Granger D.N., *Springer-Verlag*, 2003, 640, ISBN:2 – 287 – 0503 – X.
14. Suzanne P.M. Lutgens, Kitty B.J.M. Cleutjens, Mat J. A.P. Daemen, and Sylvia Heeneman. *The FASEB Journal*, Vol. 21, October 2007, pp. 3029–3041.
15. Virchow R.L.K. Gessamelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin. – Frankfurt am Main: Von Meidinger & Sohn, 1856. P. 219–732 (English translation by A.C. Matzdorff and W.R. Bell. Thrombosis and Emboli. – Canton, Massachusetts, Science History Publications, 1998).

Рецензенты:

Демихов В.Г., д.м.н., профессор, заместитель директора по науке, Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, ФГУ, Рязанский филиал, 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.

Работа поступила в редакцию 18.01.2013.