

УДК 577.11 + 615.22

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНОВ L, H И СТЕПЕНИ ИХ СЕКРЕЦИИ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ ПРИ ВЫРАЖЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Ильичева А.С., Фомина М.А.

*ГОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Рязань, e-mail: sergan52006@rambler.ru, marya.fom@yandex.ru*

Изучена активность лизосомальных цистеиновых протеаз (катепсинов L, H) и кислой фосфатазы сердечной мышцы крыс в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии выраженной степени. Обнаружено значительное увеличение общей активности катепсина H за счет как лизосомальной, так и внелизосомальной фракций. Данные изменения наблюдались в сочетании с нарастанием доли секреторной активности фермента на фоне общего повышения проницаемости лизосомальной мембраны. Активность катепсина L в лизосомальной и нелизосомальной фракциях оставалась без изменений. Выявлено статистически значимое нарастание активности кислой фосфатазы в цитоплазматической фракции без односторонних изменений общей активности, что позволяет говорить о наличии феномена лабилизации лизосомальных мембран сердечной мышцы при выраженной гипергомоцистеинемии. Показано косвенное распределение лизосомальных цистеиновых протеиназ (катепсинов L, H) между первичными и вторичными лизосомами.

Ключевые слова: катепсин L, H, кислая фосфатаза, сердечная мышца, гипергомоцистеинемия, проницаемость лизосомальной мембраны

VALUING OF CATHEPSINS L, H AND DEGREE OF THEIR SECRETION IN HEART MUSCLE WITH PRONOUNCED HYPERHOMOCYSTEINEMIA

Ilicheva A.S., Fomina M.A.

*Ryazan State Medical University n.a. I.P. Pavlov, Ryazan,
e-mail: sergan52006@rambler.ru, marya.fom@yandex.ru*

The activity of lysosomal cysteine proteases (cathepsins L, H) and acid phosphatase of cardiac muscle of rats in experiment was learned in the state of hyperhomocysteinemia. The increase of general activity of cathepsin H as a result of lysosomal and extra-lysosomal fraction was found in connection with increasing of part of secretory enzyme activity on the background of increasing lysosomal membrane permeability. Cathepsins L activity in lysosomal and unlysosomal fractions remained unchanged. We detected, that activity of acid phosphatase increases in cytoplasmic fraction without model changes of general action. This discovery enable us to speak about availability of phenomenon labilization of lysosomal membrane of cardiac muscle in the state of hyperhomocysteinemia. The indirect distribution of lysosomal cysteine proteases (cathepsins L, H) between primary and secondary lysosoms is recommended.

Keywords: cathepsin L, H, acid phosphatase, cardiac muscle, hyperhomocysteinemia, lysosomal membrane permeability

Гомоцистеин является естественным метаболитом незаменимой аминокислоты метионина. Скорость и эффективность метаболизма гомоцистеина зависит от активности ряда ферментов, объема поступающего с пищей метионина, содержания фолиевой кислоты, витаминов B₆ и B₁₂, а также от количества в клетках универсального донатора метильных групп S-аденозилметионина [5]. Накопление гомоцистеина в клетках приводит к повышению его концентрации в крови, что влечет за собой развитие тромбоваскулярных осложнений [2], провокации коронарного и церебрального атеросклероза и ассоциированных с ним инфаркта миокарда и мозговых инсультов [6]. В патогенезе указанных патологий в настоящее время существенная роль отводится лизосомальным цистеиновым протеиназам [11].

Лизосомальные цистеиновые протеиназы (катепсины) представляют собой семейство папиноподобных протеиназ. К функциям катепсинов относятся создание биологически активных пептидов путем ограниченного протеолиза белковых предшественников; разрушение состарившихся и аномальных белков; участие в фагоцитозе и делении клетки, апоптозе [1]. На сегодняшний день описана их роль в развитии воспаления, опухолевого роста, метастазирования, атеросклероза, ревматоидного артрита и других заболеваний [1]. Одной из важнейших особенностей группы лизосомальных цистеиновых протеиназ является их способность к секреции [13], позволяющая осуществлять протеолиз компонентов внеклеточного матрикса.

Таким образом, актуальным представляется изучение изменений активности

и способности к секреции лизосомальных цистеиновых катепсинов L и H в сердечной мышце на фоне выраженной гипергомоцистеинемии.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 12 белых конвенциональных крысах-самцах линии Wistar массой 280–320 г, содержащихся в стандартных условиях вивария и разделенных на две группы – контрольную ($n = 6$) и экспериментальную ($n = 6$).

Экспериментальную гипергомоцистеинемию моделировали введением раствора метионина в Твин 80 *per os* в дозе 3 г/кг в течение 21 суток с дополнительным добавлением метионина в питьевую воду [7]. В качестве группы сравнения использовались лабораторные животные, сопоставленные с экспериментальной группой по полу и массе, которым в течение 21 дня осуществляли введение Твин 80 *per os*. Содержание и выведение животных из опыта выполняли согласно правилам, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной диагностики». Немедленно после выведения животного из эксперимента точную навеску сердечной мышцы помещали в холодный 0,25 М раствор сахарозы в соотношении 1/100 и гомогенизировали в течение 60 секунд при 1500 об/мин в гомогенизаторе Potter S, при температуре не выше 4 °С. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Для удаления митохондрий надосадочную жидкость центрифугировали в течение 15 мин при 14000 g. После полученный супернатант центрифугировали дополнительно при 20000 g в течение 30 минут для получения чистой цитоплазматической неседиментируемой фракции. Седиментируемую фракцию (осадок грубой фракции лизосом) ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1%. Активность катепсинов L, H определяли спектрофлуориметрическим методом по A.J. Baget и H. Kirshke [10] отдельно в седиментируемой и неседиментируемой фракциях и обозначали как седиментируемую и неседиментируемую активность (СА и НСА) соответственно.

Для оценки стабильности лизосомальной мембраны использовали коэффициент лабильности ($K_{\text{лаб}}$), рассчитываемый как процентное соотношение активности лизосомального фермента во внелизосомальной (неседиментируемой) фракции к общей активности (ОА), представляющей собой сумму НСА и СА для данного фермента [8]. Коэффициент лабильности показывает проницаемость мембраны лизосомы и характеризует, хоть и косвенно, распределение катепсинов L и H между первичными и вторичными лизосомами.

В качестве признанного основного маркера лабильности лизосомальных мембран использовали активность кислой фосфатазы (КФ) [12]. Общую активность фермента измеряли унифицированным методом по «конечной точке», используя коммерческий набор «Витал Диагностика СПб». Для оценки степени секреции лизосомальных катепсинов использовали показатель доли секреторируемой активности лизосомальных цистеиновых протеиназ W_{secr} [3], рассчитываемый на основе сопоставления коэф-

фициентов лабильности кислой фосфатазы и соответствующего катепсина. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора компании Axis Shield, США.

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel и программы Statistika 10. Для каждой выборки рассчитывали медиану (Me), верхний и нижний квартили [Q1; Q3]. Статистическую значимость отличий показателей экспериментальной группы от группы сравнения оценивали по U-критерию Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

При сопоставлении содержания гомоцистеина в сыворотке крови обнаружено выраженное статистически значимое нарастание показателя у животных экспериментальной группы относительно контрольной (293,1 [273,1; 318,2] мкмоль/л против 5,9 [5,5; 6,7] мкмоль/л соответственно, $p < 0,05$).

При анализе изменений активности катепсинов L и H выявлены следующие тенденции (табл. 1). Активность катепсина L как лизосомальной, так и цитоплазматической фракции сердечной мышцы при выраженной гипергомоцистеинемии не претерпела статистически значимых изменений относительно контроля. Одновременно, активность катепсина H в экспериментальной группе оказалась статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой; указанные изменения касались как лизосомальной, так и внелизосомальной фракции гомогената сердечной мышцы. Следует отметить, что изменения показателей удельной активности, рассчитанных на грамм ткани, оказались однотипными. Так, показатель общей активности катепсина H в экспериментальной группе составил 0,582 [0,581; 0,617] нмоль/схг ткани против 0,142 [0,101; 0,204] нмоль/схг в контрольной группе ($p < 0,05$), общей активности катепсина L – 0,122 [0,115; 0,152] и 0,115 [0,090; 0,140] соответственно ($p > 0,05$).

Нарастание активности лизосомального фермента в цитоплазматической фракции может быть вызвано как общей лабильзацией лизосомальной мембраны, так и селективным выходом конкретного фермента в цитозоль по механизму секреции. Для дифференцировки указанных явлений нами был предпринят анализ показателей коэффициента лабильности ($K_{\text{лаб}}\%$) и доли секреторной активности катепсина (W_{secr}). Показатель $K_{\text{лаб}}\%$ нарастал в экспериментальной группе относительно контроля как для изучаемых катепсинов, так и для маркерного фермента лизосом – кислой

фосфатазы (табл. 1, 2), однако только для катепсина Н эти изменения оказались статистически значимыми. Тем не менее обнаружение на этом фоне в экспериментальной группе статистически значимого нарастания активности кислой фосфатазы в цитоплазматической фракции без однотипных изменений общей активности (табл. 2) позволяет говорить о наличии феномена лабилизации

лизосомальных мембран сердечной мышцы при выраженной гипергомоцистеинемии. Одновременно нами обнаружено статистически значимое нарастание показателя W_{secr} для катепсина Н, позволяющее сделать предположение, что гипергомоцистеинемия вызывает не только повышение активности фермента, но и увеличение степени его секреции сквозь лизосомальную мембрану [9].

Таблица 1

Активность катепсинов L, Н в сердечной мышце при выраженной гипергомоцистеинемии (Ме[Q1; Q3])

		Катепсин L, нмоль/схг белка	Катепсин Н, нмоль/схг белка
Контроль $n = 6$	НСА	0,011 [0,007; 0,015]	0,016 [0,013; 0,019]
	СА	1,730 [0,980; 2,000]	1,276 [1,096; 1,858]
	ОА	1,700 [1,000; 2,010]	1,289 [1,113; 1,880]
	Клаб%	0,73 [0,36; 1,17]	1,18 [1,06; 1,29]
	W_{secr}	-2,17 [-4,35; -1,31]	-2,59 [-4,13; -2,41]
Гипергомоцистеинемия $n = 6$	НСА	0,021 [0,019; 0,026]	0,111 [0,106; 0,118]*
	СА	1,064 [0,840; 1,370]	3,633 [3,248; 3,987]*
	ОА	1,100 [0,860; 1,380]	3,751 [3,409; 4,094]*
	Клаб%	2,54 [1,77; 3,30]	3,15 [2,68; 3,47]*
	W_{secr}	-20,24 [-35,44; 6,46]	-1,73 [-1,96; -1,69]*

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

Таблица 2

Изменение активности кислой фосфатазы при выраженной гипергомоцистеинемии (Ме[Q1; Q3])

		Кислая фосфатаза, нмоль/схг белка
Контрольная группа $n = 6$	НСА	3,397 [2,853; 3,701]
	СА	98,996 [57,332; 140,183]
	ОА	102,119 [60,466; 143,765]
	Клаб%	3,277 [2,593; 5,274]
Гипергомоцистеинемия $n = 6$	НСА	6,982 [6,012; 7,64]*
	СА	79,77 [67,13; 83,98]
	ОА	86,75 [71,62; 89,99]
	Клаб%	8,04 [6,68; 8,21]

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

Выводы

1. Выраженная гипергомоцистеинемия сопровождается статистически значимым повышением активности катепсина Н как в лизосомальной, так и в цитоплазматической фракциях без изменений активности катепсина L.

2. Нарастание значений коэффициентов лабильности и статистически значимое повышение активности кислой фосфатазы

в цитоплазматической фракции свидетельствуют о наличии феномена лабилизации лизосомальных мембран.

3. Статистически значимое повышение активности катепсина Н в цитоплазматической фракции при выраженной гипергомоцистеинемии вызывается не только повышением общей проницаемости лизосомальной мембраны, но и возрастанием доли секреции указанного фермента.

Список литературы

1. Васильева О.С. Комплексное участие цистеиновых катепсинов в раковой прогрессии; Ин-т им. И. Стефана (Любляна, Словения) // Электронный научный журнал «Исследовано в России». – Режим доступа: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2009/055.pdf> – С. 677–685.
2. Гипергомоцистеинемия в клинической практике / В.С. Ефимов и др. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 80 с.
3. Заявка 2013 125 639 (037767) РФ, МПКG01N 33/68. Способ оценки степени секреции лизосомальных цистеиновых протеиназ / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина; ГБОУ ВПО РязГМУ им. акад. И.П. Павлова. – Заявл. 03.06.2013.
4. Исследование механизмов торможения лизосомального протеолиза при протеинурии / А.А. Жлоба и др. // Третья конф. нефрологов Северо-Запада РСФСР (17-18 окт. 1991 г.): тез. докл. – Новгород, 1991. – С. 163.
5. Костюченко Г.И. Гипергомоцистеинемия: клиническое значение, возрастные особенности, диагностика и коррекция // Клинич. геронтология. – 2007. – Т. 13, № 4. – С. 32–40.
6. Маслов А.П. Гипергомоцистеинемия и повышенный риск сердечно – сосудистых осложнений у больных ИБС с атерогенной гиперхолестеринемией / А.П. Маслов, А.Т. Тепляков, А.В. Кузнецова // Сиб.мед.журн. – 2009. – № 4, вып. 9. – С. 25–30.
7. Медведев Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, М.А. Фомина // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2014. – № 4. – С. 42–46.
8. Покровский А.А., Тутельян В.А. Лизосомы. – М.: Наука, 1976. – 378 с.
9. Пупышев А.Б. Пермеабилзация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 4. – С. 313–324.
10. Barret A.J. Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L / A.J. Barret, H. Kirshke // Methods in Enzymol. – 1981. – Vol. 80. – P. 535–561.
11. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease / S.P.M. Lutgens et al. // The FASEB Journal. – 2007. – Vol. 21. – P. 3029–3041.
12. Lysosomal Labilization / A. Terman et al. // IUBMB Life. – 2006. – Vol. 58, № 9. – P. 531–539.
13. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII / U. Felbor et al. // EMBO J. – 2000. – Vol. 19, № 6. – P. 1187–1194.

References

1. Vasileva O.S., Journal of Computer- Issledovano v Ros-sii, 2009, 055.pdf – pp. 677–685.
2. Efimov V.S., Ozolinya L.A., Kashezheva A.Z., Makarov A.Z. Gipergomotsisteinemiya v klinicheskoy praktike. Moscow, GEOTAR Media, 2013. 80 p.
3. Fomina M.A., Abalenikhina YU.V. The method of evaluating the degree of secretion of lysosomal cysteine proteinases. SBEU HPE The Academy of Pavlov I.P. 03.06.2013ю
4. Ghloba A.A. Investigation of the mechanisms of inhibition of lysosomal proteolysis in proteinuria / The third conference. Nephrologists North – West of Russia (17–18 Oct. 1991), pp. 63.
5. Kostyuchenko G. I. The clinical herontology, 2007, Vol. 13, no 4, pp. 32–40.
6. Maslov A. P., Teplyakov A.T., Kuznetsova A.V. Siberian medical journal, 2009, no 9, Vol. 4, pp. 25–30.
7. Medvedev D.V., Zvyagina V.I., Fomina M.A. Russian medical – biological messenger named after I.P. Pavlova, 2014, no.4, pp. 42–46.
8. Pokrovsky A. A., Tutelian V.A. Lysosomes. Moscow, Nauka, 1976. 378 p.
9. Pupyshv A.B. Tsitologiya, 2011, Vol. 53, no.4, pp. 313–324.
10. Barret A.J. Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L / A.J. Barret, H. Kirshke // Methods in Enzymol. 1981. Vol. 80. pp. 535–561.
11. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease / S.P.M. Lutgens et al. // The FASEB Journal. 2007. Vol. 21. pp. 3029–3041.
12. Lysosomal Labilization / A. Terman et al. // IUBMB Life. 2006. Vol. 58, no. 9. pp. 531–539.
13. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII / U. Felbor et al. // EMBO J. 2000. Vol. 19, no. 6. pp. 1187–1194.

Рецензенты:

Варфоломеев В.Н., д.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель группы свободнорадикальных процессов в биосистемах, Институт проблем химической физики РАН, г. Черноголовка;

Шатохина С.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФУВ ГБУЗ МО «МОНКИ им. М.Ф. Владимирского», г. Москва.

Работа поступила в редакцию 29.12.2014.