

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.13/.14-005.4-008.9
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12053>
ISSN – 2073-8137

КАТЕПСИНЫ КАК ВОЗМОЖНЫЙ СПОСОБ АДАПТАЦИИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ

Р. Е. Калинин, А. С. Пшенников, Ю. В. Абаленихина, И. А. Сучков,
Н. Д. Мжаванадзе, С. А. Исаков

Рязанский государственный медицинский университет, Россия

CATHEPSIN AS A POSSIBLE WAY OF ADAPTATION OF VASCULAR WALL TO OXIDATIVE STRESS IN CONDITIONS OF ISCHEMIA AND REPERPHY

Kalinin R. E., Pshennikov A. S., Abalenikhina Yu. V., Suchkov I. A.,
Mzhavanadze N. D., Isakov S. A.

Ryazan State Medical University, Russia

Сосудистые хирурги ежедневно сталкиваются с явлением ишемического и реперфузионного повреждения тканей, которые очень сходны с процессом воспаления, то есть приводят к повышению продукции активных форм кислорода и медиаторов воспаления.

Целью работы является оценка и сравнение окислительного стресса в артериальной стенке в условиях ишемии и реперфузии.

На лабораторных животных (крысах линии Wistar) создана модель ишемии и реперфузии с последующим определением активности лизосомальных протеиназ и уровня окислительно-модифицированных белков в гомогенатах стенки сосудов и в интактной стенке, выделенной дистальнее операционного вмешательства, в сроки 1, 3, 5, 7 суток соответственно в обеих группах.

Полученные результаты демонстрируют развитие окислительного стресса при ишемии-реперфузии с 1 по 7 сутки, а при ишемии – на 3 и 5 сутки. При ишемии и ишемии-реперфузии наблюдается истощение резервно-адаптационного потенциала, однако при ишемии преобладают первичные маркеры, а при реперфузии – вторичные. Доказана положительная корреляционная связь между окислительным карбонилированием белков и активностью катепсинов В и L в стенке сосуда.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, сосудистая стенка, лизосомальные протеиназы, окислительно-модифицированные белки

Vascular surgeons routinely deal with ischemia and reperfusion injury, a process similar to inflammation, i.e. leading to increased production of active forms of oxygen and inflammatory mediators.

The objective of this research is evaluation and comparison of oxidative stress in arterial wall in ischemia-reperfusion injury.

In laboratory animals (rats of the Wistar line) a model of ischemia and reperfusion was developed, followed by the determination of the activity of lysosomal proteinases and the level of oxidation-modified proteins in the vascular wall homogenates and in an intact wall more distal to the surgical intervention, at the time 1, 3, 5, 7 days in both groups, respectively.

The obtained results demonstrate the development of oxidative stress in ischemia-reperfusion from 1 to 7 days, and in ischemia – on days 3 and 5. With ischemia and ischemia-reperfusion, the reserve-adaptive potential is depleted, however, primary markers predominate in ischemia, and the secondary – in reperfusion. A positive correlation was proved between the oxidative carbonylation of proteins and the activity of cathepsins B and L in the wall of the vessel.

Keywords: ischemia, reperfusion, vascular wall, lysosomal proteases, oxidation-modified proteins

В повседневной практике сосудистые хирурги ежедневно сталкиваются с явлением ишемического и реперфузионного повреждения тканей [3, 6, 8]. Реперфузия ткани, находящейся ранее в состоянии ишемии, хотя и является необходимой для предотвращения необратимых повреждений, вызывает реакцию в микрососудах, сходную с процессом воспаления, то есть приводит к повышению продукции активных форм кислорода и медиаторов воспаления [1, 4, 5, 13].

Окислительная модификация белков (ОМБ) является надежным критерием оценки окислительного стресса в

сосудистой системе [1, 7, 14]. Протеолиз признается одним из возможных механизмов защиты от накопления ОМБ и совершенным регулятором протеинового обмена [1, 9]. Таким образом лизосомы обеспечивают защитную функцию в условиях окислительного стресса.

Целью работы является оценка и сравнение окислительного стресса в артериальной стенке в условиях ишемии и реперфузии.

Материал и методы. Исследование выполнено на 90 лабораторных животных (крысах линии Wistar массой тела 250–300 г). Животные содержались в стандартных условиях вивария, получали стандарт-

ный рацион питания и воду ad libitum. в соответствии с этическими нормами, изложенными в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и в приказе Минздрава России «Об утверждении правил лабораторной практики» (2003).

Создавались две модели ишемии и реперфузии путем пережатия брюшного отдела аорты (первая группа) с последующим кондиционированием (вторая группа). Все операции осуществлялись под наркозом с использованием препаратов «Ксило» 1 мг/кг и «Золетил 50» 15 мг/кг. Умерщвление животных проводили передозировкой золетила («Virbac Sante Animale», Франция), вводимого внутримышечно в дозе 50 мг/кг.

Активность лизосомальных протеиназ и уровень окислительно-модифицированных белков определяли в гомогенатах стенки сосудов и в интактной стенке, выделенной дистальнее операционного вмешательства, в сроки 1, 3, 5, 7 суток соответственно в обеих экспериментальных группах. В качестве контроля изучали артериальную стенку интактного животного.

Для оценки окислительной модификации белков использовали определение уровня карбонильных производных по R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой [2]. Активность катепсинов В, L изучалась спектрофлуориметрическим методом по А. J. Barrett и Н. Kirschke [10].

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием программы «Statistica 10.0». Для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали критерий Манна – Уитни (U-тест).

Результаты и обсуждение. Полученные значения площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков артериальной

стенки свидетельствуют о развитии окислительного стресса на 3 и 5 сутки при моделировании ишемии и 3, 5 и 7 сутки при моделировании ишемии-реперфузии.

При моделировании ишемии доля первичных маркеров нарастала относительно показателей контрольной группы на 3 и 5 сутки, а при моделировании ишемии-реперфузии первичные маркеры преобладали на 1 и 7 сутки, а вторичные маркеры – на 3 и 5 сутки (табл.).

Для оценки устойчивости белков к повреждающему воздействию используется реакция Фентона, применяемая как источник гидроксильных радикалов. Из анализа полученных результатов следует, что значение резервно-адаптационного потенциала при экспериментальном моделировании ишемии и ишемии-реперфузии снижается на 3 и 5 сутки (рис. 1).

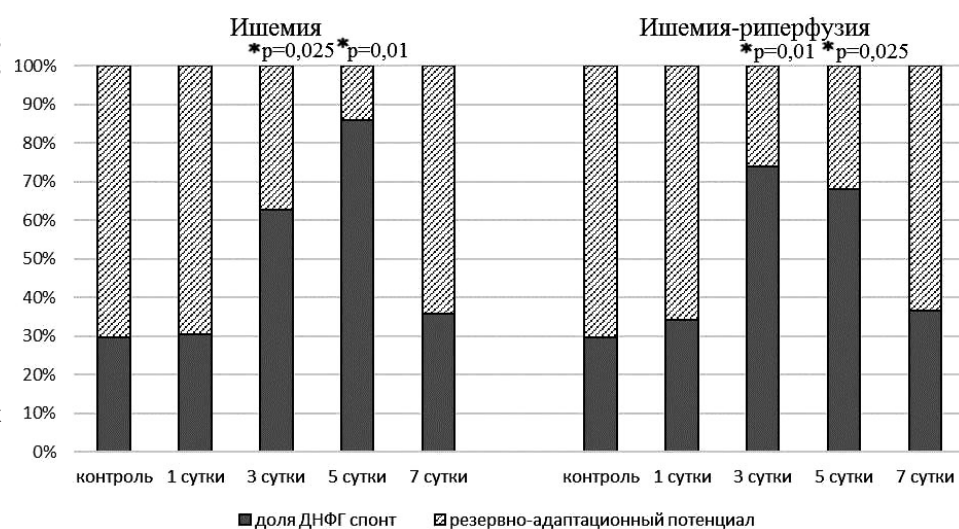


Рис. 1. Состояние резервно-адаптационного потенциала динитрофенилгидразонов артериальной стенки при экспериментальной ишемии и ишемии-реперфузии.

Примечание: здесь и далее * – статистически значимые отличия от контрольной группы

Активность катепсинов В и L артериальной стенки при ишемии возрастает на 5 и 7 сутки (рис. 2), при ишемии-реперфузии активность катепсинов нарастает в условиях окислительного стресса на 3, 5 и 7 сутки (рис. 3).

Формирование карбонилированных производных белков представляет собой один из мощных элемен-

Таблица

Значения доли первичных и вторичных маркеров (%) окислительного стресса при ишемии и ишемии-реперфузии в артериальной стенке

Период	Ишемия		Ишемия-реперфузия	
	Первичные маркеры (АДФГ)	Вторичные маркеры (КДФГ)	Первичные маркеры (АДФГ)	Вторичные маркеры (КДФГ)
Контроль	69,5 [57,6; 74,2]	30,5 [25,3; 34,7]	69,5 [57,6; 74,2]	30,5 [25,3; 34,7]
1 сутки	77,5 [72,1; 81,2]	22,5 [27,5; 32,9]	74,5 [70,9; 85,9]* p=0,03	25,5 [21,2; 31,4]* p=0,03
3 сутки	81,9 [78,4; 85,6]* p=0,002	18,1 [15,4; 20,1]* p=0,002	31,8 [25,6; 35,7]* p=0,001	68,2 [61,4; 72,9]* p=0,001
5 сутки	90 [84,2; 92,7]* p=0,001	10 [8,1; 13,6]* p=0,001	33,2 [21,4; 36,9]* p=0,001	66,8 [59,9; 72,7]* p=0,001
7 сутки	61,8 [52,4; 65,9]	38,2 [23,7; 42,9]	87,6 [75,8; 90,9]* p=0,031	12,4 [10,3; 15,8]* p=0,03

Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы; АДФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны; КДФГ – кетон-динитрофенилгидразоны.

тов клеточной сигнализации и является надежным маркером повреждения [11, 12], так как позволяет оценить модификацию протеинов под прямым воздействием активных форм кислорода и/или азота, а также при косвенном взаимодействии со вторичными побочными продуктами окисления, что позволяет использовать показатель модификации белков для характеристики окислительного стресса. Баланс между прооксидантами и антиоксидантами в клетке является ключевым моментом в ее нормальном функционировании, смещение равновесия в сторону прооксидантов провоцирует окислительный стресс. Постоянное окисление белковых молекул приводит к разрушению их структуры и ослаблению функциональной активности.

Полученные данные свидетельствуют, что развитие окислительного стресса в условиях ишемии является следствием гипоксии, в условиях ко-

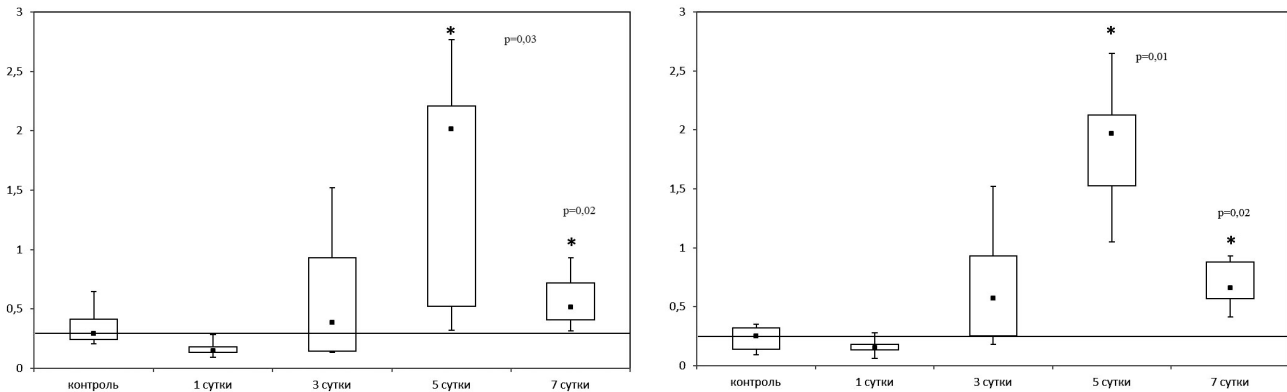


Рис. 2. Активность катепсина В (слева) и катепсина L (справа) артериальной стенки при ишемии

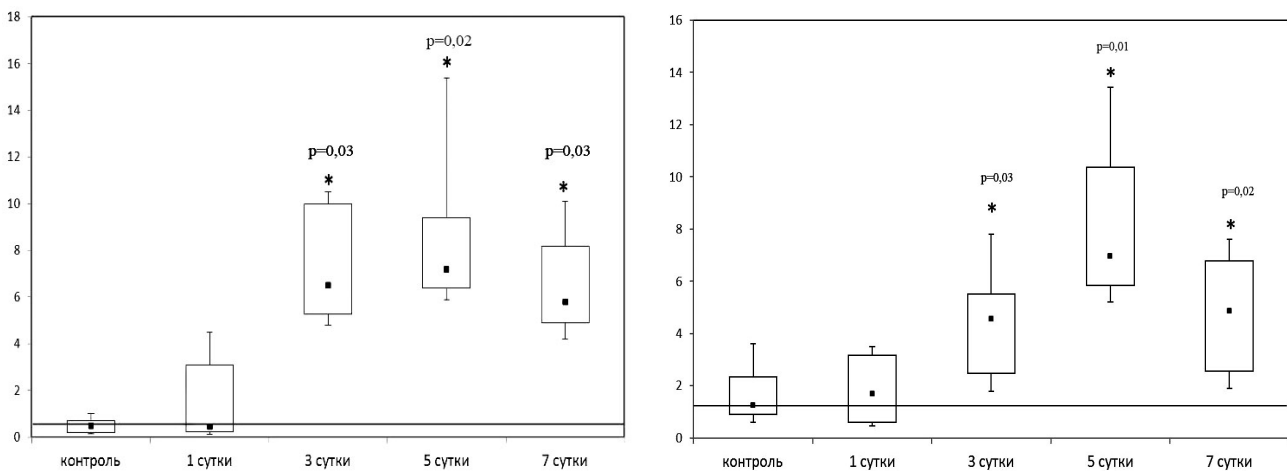


Рис. 3. Активность катепсина В (слева) и катепсина L (справа) артериальной стенки при ишемии-реперфузии

торой происходит дополнительная генерация радикальных продуктов, повышается интенсивность окислительной деструкции белков, что в итоге может приводить к нарушению структуры и функции клеточных мембран и клеток в целом. При ишемии-реперфузии активация свободно-радикальных процессов стимулируется напряжением кислорода, что приводит к развитию окислительного стресса на 3–5 сутки в сочетании с накоплением вторичных маркеров окислительного стресса.

Исследование соотношения первичных (АДФНГ) и вторичных (КДФНГ) маркеров окислительного стресса дает возможность оценить стадию и потенциальную обратимость окислительного стресса [9]. Так, при экспериментальном моделировании ишемии на 3 и 5 сутки и при ишемии-реперфузии на 1 и 7 сутки отмечено обратимое окисление белков, что подтверждается преобладанием первичных маркеров окислительного стресса. Необратимое окисление белков, то есть преобладание вторичных маркеров, свидетельствует об усугублении окислительного стресса, переходе его в позднюю стадию и приводит к утрате биологических свойств протеинов, а в дальнейшем к их агрегации или деградации, что наблюдается при моделировании ишемии-реперфузии на 3 и 5 сутки.

Возможности антиоксидантной защиты могут косвенно характеризоваться резервно-адаптационным потенциалом. Нами обнаружено, что при моделировании ишемии и ишемии-реперфузии значение резервно-адаптационного потенциала снижается, что может не только свидетельствовать об истощении

антиоксидантных систем, но и демонстрировать доступность белков к повреждающему действию.

Внутриклеточный уровень окисленных белков отражает баланс между процессами формирования карбонильных белков и степенью их деградации протеолитическими системами. Возможно, что в условиях окислительного стресса активность лизосомальных протеиназ возрастает вследствие того, что модифицированные белки более чувствительны к протеолизу.

В последнее время лизосомальные протеиназы привлекают внимание исследователей как важные факторы развития сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе ассоциированных с воспалением. В экспериментальных исследованиях доказана повышенная экспрессия лизосомальных катепсинов в области атеросклеротического повреждения сосуда, кроме этого, катепсин В участвует в процессах формирования кровеносных сосудов [12]. Имеются данные, что катепсины обладают антитромботической активностью и участвуют в процессах рестеноза, при этом механизм остается недостаточно изученным.

Заключение. Таким образом, при экспериментальном моделировании ишемии и ишемии-реперфузии в условиях развивающегося окислительного стресса катепсины участвуют не только в деградации поврежденных белковых молекул, но и – косвенно – в ремоделировании сосудов. Преобладание вторичных маркеров окислительного стресса во время стадии реперфузии свидетельствует о тяжести поражения сосудистой стенки в сравнении с ишемическим повреждением.

Литература

1. Губский, Ю. И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов [и др.] // *Современные проблемы токсикологии*. – 2005. – Т. 8, № 3. – С. 20–27.
2. Дубинина, Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов, И. Г. Порохов // *Вопросы медицинской химии*. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
3. Калинин, Р. Е. Динамика некоторых биохимических показателей у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в различные сроки после реконструктивных операций / Р. Е. Калинин, И. А. Сучков, А. С. Пшенников, А. А. Никифоров // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И. П. Павлова*. – 2012. – № 1. – С. 41–44.
4. Калинин, Р. Е. Лекарственная профилактика рестеноза после реконструктивных операций на артериях нижних конечностей / Р. Е. Калинин, И. А. Сучков, А. С. Пшенников, А. А. Слепнев // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 33–35.
5. Лушак, В. И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма / В. И. Лушак // *Биохимия*. – 2007. – Т. 72, № 8. – С. 995–1017.
6. Национальным рекомендациям по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей. – Москва, 2013. – 74 с.
7. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л. Е. Муравлева [и др.] //

References

1. Gubsky Yu. I., Belenichev I. F., Levitskiy E. V., Kovalenko S. I., Pavlov C. V., Gancheva O. V. *Sovremennye problemy toksikologii*. – *Modern issues in toxicology*. 2005;8(3): 20-27.
2. Dubinina E. E., Burmistrov S. O., Khodov D. A., Porotov I. G. *Voprosy meditsinskoj khimii*. – *Issues in modern chemistry*. 1995;41(1):24-26.
3. Kalinin R. E., Suchkov I. A., Pshennikov A. S., Nikiforov A. A. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik im. Acad. I. P. Pavlova*. – *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2012;1(1):41-44.
4. Kalinin R. E., Suchkov I. A., Pshennikov A. S., Slepnev A. A. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza*. – *Medical News of the North Caucasus*. 2013;8(1):33-35.
5. Luschkak V. I. *Biochimija*. – *Biochemistry*. 2007;72(8):995-1017.
6. *Natsionalnye rekomendatsii po vedeniyu patsientov s zabolevaniyami arteriy nizhnikh konechnostey*. Moscow, 2013.

8. Сучков, И. А. Профилактика рестенозов в реконструктивной хирургии магистральных артерий / И. А. Сучков, А. С. Пшенников, А. А. Герасимов [и др.] // *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. – 2013. – № 2. – С. 12–19.
9. Яровая, Г. А. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза / Г. А. Яровая, Е. А. Нешкова, Е. А. Мартынова, Т. Б. Блохина // *Лабораторная медицина*. – 2011. – № 11. – С. 39–52.
10. Barrett, A. J. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L / A. J. Barrett, H. Kirschke // *Methods in Enzymol.* – 1981. – Vol. 80. – P. 535–561.
11. Colak, E. New markers of oxidative damage to macromolecules / E. Colak // *JMB*. – 2008. – P. 1–16.
11. Im, E. Cathepsin B regulates the intrinsic angiogenic threshold of endothelial cells / E. Im, A. Venkatakrishnan, A. Kazlauskas // *Mol. Biol. Cell*. – 2005. – Vol. 16, № 8. – P. 3488–3500.
12. Protein modifications by electrophilic lipoxidation products: Adduct formation, chemical strategies and tandem mass spectrometry for their detection and identification / Y. V. Vasil'ev [et al.] // *Mass Spectrometry Rev.* – 2013. – Vol. 33, № 3. – P. 157–182.
13. Protein oxidation: Identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways / J. E. Plowman [et al.] // *Photoch. Photobiol. Sci.* – 2013. – Vol. 12, № 11. – P. 1960–1967.

7. Muravleva L. E., Molotov-Luchanskiy V. B., Kluyev D. A., Bakenova R. A., Kultanov B. Zh., Tankibaeva N. A., Koykov V. V., Omarova G. A. *Fundamentalnye issledovaniya*. – *Fundamental researches*. 2010;1:74-78.
8. Suchkov I. A., Pshennikov A. S., Gerasimov A. A., Agapov A. B., Kamaev A. A. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)*. – *The science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2013;2:12-19.
9. Yarovaya G. A., Neshkova E. A., Martynova E. A., Blokhina T. B. *Laboratornaya meditsina*. – *Laboratory medicine*. 2011;11:39-52.
10. Barrett A. J., Kirschke H. *Methods in Enzymol.* 1981;80:535-561.
11. Colak E. *JMB*. 2008;27:1-16.
11. Im E., Venkatakrishnan A., Kazlauskas A. *Mol. Biol. Cell*. 2005;16(8): 3488-3500.
12. Vasil'ev Y. V., Shin-Chen Tzeng, Lin Huang, Maier C. S. *Mass Spectrometry Reviews*. 2013;33(3):157-182.
13. Plowman J. E., Deb-Choudhury S., Grosvenor A. J., Dyer J. M. *Photoch. Photobiol. Sci.* 2013;12(11):1960-1967.

Сведения об авторах:

Калинин Роман Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии;
тел.: 89209754443; e-mail: kalinin-re@yandex.ru

Пшенников Александр Сергеевич, кандидат медицинских наук, доцент;
тел.: 89109009523; e-mail: Pshennikov1610@rambler.ru

Абаленихина Юлия Владимировна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики;
тел.: 89156249409; e-mail: abalenihiina88@mail.ru

Сучков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии;
тел.: 89038362417; e-mail: suchkov_med@mail.ru

Мжаванадзе Нина Джансуговна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры;
тел.: 89156061756; e-mail: nina_mzhavanadze@mail.ru

Исаков Сергей Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры дерматовенерологии;
тел.: (4912)460803; e-mail: nauka@rzgmu.ru