

Дементьева Н.А., Боренко О.Ю., Лянная О.Л.

АКТИВНОСТЬ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ У ДЕТЕЙ С ГЕМАНГИОМАМИ

Коммунальное учреждение «Днепропетровская областная детская клиническая больница» Днепропетровского областного совета», Украина;

Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская академия» Министерства здравоохранения Украины, Украина

Dementieva N.A., Borenko O.U., Lyanna O.L.

CYSTEINE PROTEINASE ACTIVITY IN CHILDREN WITH HEMANGIOMA

ME «Regional Children Hospital of Dnipropetrovsk»; SE «Dnipropetrovsk Medical Academy» of the Ministry of Health of Ukraine

Резюме

Цель исследования – изучение активности цистеиновых протеиназ – катепсинов В, L, H, их эндогенного ингибитора цистатина С, фактора роста эндотелия сосудов в ткани опухоли, коже и сыворотке крови детей с гемангиомами. Исследован материал 39 пациентов (42 гемангиомы), а также 24 условно-здоровых детей. Выяснено, что уровень исследуемых показателей в сыворотке крови и коже здоровых детей не зависит от возраста ребенка, а их активность в сыворотке крови, коже, опухолевой ткани пациентов с гемангиомами достоверно выше таковой в сыворотке крови и коже здоровых детей. Очень большой коэффициент вариации для всех показателей во всех исследуемых биологических субстратах не позволяет использовать их в качестве диагностических маркеров.

Ключевые слова: дети, гемангиомы, катепсины, цистатин С

Abstract

Objective – study of activity of cysteine proteases – cathepsins B, L, H, and their endogenous inhibitor cystatin C, vascular endothelial growth factor in tumor tissue, skin and blood serum of children with hemangiomas. Material was obtained from 39 patients (42 hemangiomas) and 24 healthy children. It was found that the level of the studied parameters in serum and skin of healthy children regardless of the age of the child. Their activity in blood serum, skin, tumor tissue of patients with hemangiomas significantly higher than that in serum of healthy skin and children. A very large coefficient of variation for all parameters in all the studied biological substrates is not possible to use them as diagnostic markers.

Key words: children, hemangiomas, cathepsins, cystatin C

Введение

Механизм возникновения и дальнейшей трансформации гемангиом, одной из наиболее распространенных видов патологии детского возраста [8–10], до конца не выяснен [7, 19].

Пролиферирующая гемангиома по множеству признаков напоминает капиллярную пролиферацию, которая наблюдается при заживлении ран, а также неоваскуляризацию, ассоциированную с опухолевым ростом [13]. Повышенная эндотелиальная клеточная пролиферация может быть следствием нарушения равновесия стимулирующих факторов и их ингибиторов в тканях [5, 9, 11, 14, 15, 18]. Для некоторых опухолей показана корреляция активности и концентрации протеолитических ферментов лизосом и их ингибиторов с агрессив-

ностью их протекания [1, 4, 12]. Однако данные литературы по этому вопросу противоречивы, а относительно опухолей у детей чрезвычайно скудны. Не изучено состояние активности протеаз и их ингибиторов в сыворотке крови, в тканях гемангиом, их роли в ангио- и васкулогенезе [7, 17].

Цель исследования – изучение активности цистеиновых протеиназ – катепсинов В, L, H и их эндогенного ингибитора цистатина С, а также фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в ткани опухоли, коже и сыворотке крови детей с гемангиомами.

Материал и методы исследования

Дизайн исследования: одноцентровое открытое в параллельных группах, поперечные срезы. Исследование выполнено на базе Днепропетровской областной

детской клинической больницы, Украина. При отборе пациентов мы пользовались классификацией сосудистых аномалий ISSVA (международного научного общества по изучению сосудистых аномалий) [10,11].

Была изучена активность цистеиновых протеиназ – катепсинов В, L, Н, цистатина С, VEGF в ткани опухоли, прилежащей к ней коже и сыворотке крови 39 пациентов в возрасте 1–36 месяцев (25 девочек и 14 мальчиков), которые имели 42 гемангиомы (фокальные), а также в сыворотке крови и коже условно-здоровых детей.

Контрольную группу составили 24 условно-здоровых ребенка в возрасте 1–22 месяцев (18 мальчиков и 6 девочек) с мелкими пороками развития, не влияющими на гомеостаз, причем 8 из них подверглись хирургическому вмешательству.

Активность катепсина В исследовали по расщеплению р-нитроанилида N, α -бензоил-Д, L-аргинина (БАПА) «Fluka» (Швейцария) за 60 мин инкубации при 37 °С [4, 6].

Активность катепсина L определяли по отношению к 1%-ному азоказеину, денатурированному 3М мочевиной за 60 мин инкубации при 37 °С [6, 16].

Активность катепсина Н выявляли по гидролизу β -нафтиламида L-лейцина (Лей-НА) «Koch-Light Laboratories» (Англия) за 120 мин инкубации при 37 °С [4, 6].

Активность ферментов выражали в единицах активности при применении субстратов: БАПА – в мкмоль р-нитроанилина (р-НА) за 1 мин; Лей-НА – мкмоль β -нафтиламину за 1 мин; азоказеина – в условных единицах экстинции при 366 нм в 1 мин. Удельную активность – в единицах активности на 1 мг белка и определяли в 1,0 мл инкубационной смеси с 15-минутной преинкубацией ферментов в присутствии 0,002 М β -меркаптоэтанола и 0,001 М Na_2EDTO .

Количественное содержание VEGF определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-наборов (Orgenium Laboratories, Finland) и выражали в пг/мл; концентрации эндогенного ингибитора цистеиновых катепсинов – цистатинив С – методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием тест-наборов (BioVendor, USA) и выражали в нг/мл.

Статистическую обработку материалов исследования проводили с использованием методов биостатистики [2], реализованных в пакете программ STATISTICA v. 6.1® (Statsoft Inc., США). Проверка на соответствие нормальному закону распределения

концентраций исследуемых параметров (веществ) в сыворотке крови, коже и ткани сосудистых опухолей по критериям Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка показала наличие достоверных различий для подавляющего большинства показателей во всех группах наблюдения, в связи с чем использовались непараметрические характеристики и методы сравнения: медиана (*Me*), интерквартильный размах (25%; 75%), критерии Манна–Уитни и Крускала–Уоллиса.

Результаты исследования и их обсуждение

У здоровых детей концентрация цистатина С в сыворотке крови была в 3,8 раза больше, чем в коже, в то время как содержание VEGF, наоборот, в сыворотке крови было в 2,8 меньше по сравнению с кожей (табл. 1). Одновременно выявлена высокая вариабельность данных по содержанию цистатина С, а также катепсина L в сыворотке крови ($p=0,000$ и $p=0,007$ соответственно по критерию Левена).

По другим показателям различий не выявлено. Достоверно установлена положительная корреляция содержания в сыворотке крови катепсинов по парам: катепсин В – катепсин Н ($r=0,63$) и катепсин В – катепсин L ($r=0,54$). Парное сравнение возрастных подгрупп по непараметрическому критерию Манна–Уитни для независимых групп разницы не выявило.

При проведении сравнения содержания катепсинов В, L, Н, цистатина С и VEGF в сыворотке крови, коже, прилегающей к гемангиоме зоны, и ткани гемангиом без распределения на возрастные подгруппы (табл. 2) выявлено достоверно большее содержание катепсина L (в 2,4 раза) и VEGF (в 10,6 раза) в ткани опухоли (гемангиомы) по сравнению с содержанием их в сыворотке крови ($p=0,009$ и $p=0,000$ соответственно по критерию Манна–Уитни), большее содержание VEGF в опухоли по сравнению с кожей (в 2,4 раза, $p=0,006$) и в коже по сравнению с сывороткой в 4,5 раза ($p=0,027$). Напротив, содержание цистатина С было достоверно большим в сыворотке крови по сравнению с кожей (в 2 раза, $p=0,014$) и тканью гемангиомы (в 2,6 раза, $p=0,008$), в которой содержание его был наименьшим (табл. 2).

Между тем при сравнении показателей в биологических субстратах здоровых детей и пациентов с гемангиомами содержание цистатина С оказалось достоверно большим в гемангиомах и прилежащей к ним коже по сравнению с кожей здоровых детей.

Кроме того, активность катепсинов В, L, Н в сыворотке крови детей с гемангиомами была

Таблица 1. Содержание катепсинов, цистатина С и VEGF в коже и сыворотке крови здоровых детей (Ме [25%; 75%])

Показатель	Сыворотка крови (n=24)	Кожа (n=8)	p
Катепсин В, усл. ед. р-НА/мин мг белка	0,011 [0,004; 0,017]	0,014 [0,007; 0,023]	0,458
Катепсин L, усл. ед./мин мг белка	0,005 [0,002; 0,010]	0,006 [0,002; 0,022]	0,793
Катепсин Н, мкмоль 2-НА/мин мг белка	0,003 [0,001; 0,010]	0,005 [0,002; 0,023]	0,293
Цистатин С, нг/мл	942,0 [250,0; 1270,0]	250,7 [242,0; 254,0]	0,040*
VEGF, пг/мл	67,8 [42,5; 202,0]	191,4 [110,5; 266,5]	0,031*

Примечание: p – уровень значимости различий между субстратами (по критерию Манна–Уитни); * – p<0,05.

Таблица 2. Содержание катепсинов В, L, Н, цистатина С и VEGF в сыворотке крови, коже, прилежащей к гемангиоме зоне, и ткани гемангиом (Ме [25%; 75%])

Показатель	Сыворотка крови	Кожа	Ткань гемангиом	p между субстратами
Катепсин В, усл. ед. р-НА/мин мг белка (n=41)	0,026 *** [0,013; 0,045]	0,031 [0,011; 0,052]	0,026 [0,014; 0,062]	$p_c - p_k = 0,959$ $p_c - p_t = 0,810$ $p_k - p_t = 0,603$
Катепсин L, усл. ед. /мин мг белка (n=41)	0,014 *** [0,005; 0,028]	0,025 * [0,014; 0,046]	0,033 ** [0,019; 0,048]	$p_c - p_k = 0,063$ $p_c - p_t = 0,009$ $p_k - p_t = 0,387$
Катепсин Н, кмоль 2-НА/мин мг белка (n=41)	0,016 *** [0,005; 0,025]	0,014 [0,004; 0,043]	0,016 [0,006; 0,043]	$p_c - p_k = 0,698$ $p_c - p_t = 0,441$ $p_k - p_t = 0,574$
Цистатин С, нг/мл (n=24)	1080,0 [502,0; 1588,0]	549,0 *** [428,0; 747,0]	409,0 ** [313,5; 819,0]	$p_c - p_k = 0,014$ $p_c - p_t = 0,008$ $p_k - p_t = 0,297$
VEGF, пг/мл (n=24)	45,4 [27,0; 202,2]	202,2 [73,5; 393,8]	480,1 ** [237,9; 727,4]	$p_c - p_k = 0,027$ $p_c - p_t < 0,001$ $p_k - p_t = 0,006$

Примечания. p_c , p_k , p_t – уровень значимости различий между субстратами (с – сыворотка, к – кожа, т – ткань гемангиомы) по критерию Манна–Уитни; * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе (показателям в ткани гемангиомы соответствуют показатели в коже здоровых детей).

достоверно большей по сравнению с сывороткой крови здоровых детей, а для катепсина L она была больше и в гемангиомах, и в прилежащей к ним коже по сравнению с аналогичным показателем детей в контрольной группе.

В целом по группе выявлена достоверно положительная корреляция между содержанием всех катепсинов в пределах каждого исследуемого субстрата, а также между содержанием их в различных субстратах (r варьирует от 0,33 до 0,72). Корреляция содержания энзимов в опухоли и коже между собой, между содержанием их в опухоли и содержанием в коже более выражена по сравнению с корреляцией содержания их в сыворотке, а также между содержанием их в сыворотке крови и тканях (как в коже, так и в гемангиомах). Наибольшая корреляция обнаружена между активностью катепсина Н в гемангиоме и прилежащей к ней коже ($r=0,72$), а также в коже, прилежащей к гемангиомам, по парам: катепсин Н – катепсин L ($r=0,70$) и катепсин В – катепсин L ($r=0,60$).

Необходимо отметить очень большой коэффициент вариации (С) для всех показателей во всех исследуемых биологических субстратах (колебания от 55,3 до 174%).

Выводы

1. Активность цистеиновых протеиназ катепсинов В, L, Н, их эндогенного ингибитора цистатина С и VEGF в сыворотке крови и коже здоровых детей не зависит от возраста ребенка.

2. Активность цистеиновых протеиназ – катепсинов В, L, Н и их эндогенного ингибитора цистатина С в сыворотке крови, коже, опухолевой ткани пациентов с гемангиомами достоверно выше таковой в сыворотке крови и коже здоровых детей.

3. Очень большой коэффициент вариации для всех показателей во всех исследуемых биологических субстратах не позволяет использовать их в качестве диагностических маркеров.

Список литературы

1. Вовчук И.Л. Прогностическое значение определения катепсина и его эндогенных ингибиторов при опухолевой патологии // Онкология. 2010. №2. С. 165–168.
2. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
3. Суринов Б.Г., Манойлов С.Е. Определение активности протеолитических ферментов с помощью азоказеина // Вопросы мед. химии. 1965. Т. 11, №5. С. 55–58.
4. Черная В.И., Рева А.Д. Активность катепсина Н в мозге и опухолях мозга человека // Укр. биохим. журн. 1989. Т. 61, №5. С. 47–50.
5. Чорна В.І., Лянна О.Л. Лізосомні цистеїнові протеази: молекулярна структура і функції: Монографія. – Харків: Екограф, 2013. – 296 с.
6. Barrett A., Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L // Methods Enzymol. 1981. Vol. 80. P. 535–561.
7. Boye E., Olsen B.R. Signaling mechanisms in infantile hemangioma // Curr. Opin. Hematol. 2009. Vol. 16, №3. P. 202–208.
8. Chang L.C., Haggstrom A.N., Drolet Beth A. et al. Growth characteristics of infantile hemangiomas: implications for management // Pediatrics. 2010. Vol. 126, №6. P. 1589–1593.
9. Chen T.S., Eichenfield L.F., Friedlander Sh. F. Infantile hemangiomas: an update on pathogenesis and therapy // Pediatrics. 2013. Vol. 131, №2. P. 99–108.
10. Cremer H. Hämangiome: klassifizierung und therapieempfehlungen // Pädiatrie hautnah. – 2009. – Bd. 21, №2. – S. 133–146.
11. Enjolras O., Wassef M., Chapot R. Color Atlas of Vascular Tumors and Vascular Malformations. – Cambridge University Press, 2007. – 310 p.
12. Gocheva V., Chen X., Peters Chr., Reinheckel Th., Joyce J.A. Deletion of cathepsin H perturbs angiogenic switching, vascularization and growth of tumors in a mouse model of pancreatic islet cell cancer // Biol. Chem. 2010. Vol. 391, №8. P. 937–945.
13. Mulliken J.B., Young A.E. Vascular birthmarks. Hemangiomas and malformations. – W.B. Saunders and Co., 1988. P. 39–65.
14. Przewratil P., Sitkiewicz A., Andrzejewska E. Local serum levels of vascular endothelial growth factor in infantile hemangioma: intriguing mechanism of endothelial growth // Cytokine. 2010. Vo. 49, №2. P. 141–147.
15. Rajewska J., Gawrych E., Fischer K., Walecka A., Brzosko M., Kwas A. Estimation of vascular endothelial growth factor and placental growth factor serum levels' in infant with hemangioma and population of healthy infants // Ann. Acad. Med. Stetin. 2012. Vol. 58, №2. P. 5–10.
16. Schwartz W.N., Barrett A.J. Human cathepsin H // Biochem. J. 1980. Vol. 191, №2. P. 487–497.
17. Veillard Fl., Saidi Ahl., Burden R.E., Scott Chr.J., Gillet L., Lecaille F., Lalmanach G. Cysteine Cathepsins S and L Modulate Antiangiogenic Activities of Human Endostatin // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. P. 37 158–37 167.
18. Zhong S., Yang G., Xia C., Duanlian Z., Shan S. Expression of matrix metalloproteinase and its tissue inhibitor in haemangioma // J. Huazhong Univ.Sci. Technolog. Med. Sci. 2009. Vol. 29. P. 614–619.
19. Zimmermann A.P., Wiegand S., Werner J.A., Eivazi B. Propranolol therapy for infantile haemangiomas: Review of the literature // Int.J. Pediatr. Otorhinolaryngology. 2010. Vol. 74. P. 338–342.

Авторы

Контактное лицо: Дементьева Наталья Анатольевна	Главный врач (по совместительству – детский хирург отделения реконструктивно-пластической хирургии с онкокойками) Коммунального учреждения «Днепропетровская областная детская клиническая больница» Днепропетровского областного совета» 49100, Украина, г. Днепропетровск, ул. Космическая, д. 13. Тел./факс: +38 (056) 713-71-00, +38 (050) 914-26-49 (моб.). E-mail: dementievana@ukr.net.
БОРЕНКО Ольга Юрьевна	Врач-биохимик клиничко-биохимической лаборатории Коммунального учреждения «Днепропетровская областная детская клиническая больница» Днепропетровского областного совета», 49100, Украина, г. Днепропетровск, ул. Космическая, д. 13. Тел./факс: +38 (056) 713-71-00. E-mail: borenko.olga@mail.ru.
ЛЯННАЯ Ольга Леонидовна	Доцент кафедры биоорганической химии Государственного учреждения «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины», канд. мед. наук, 49044, г. Днепропетровск, ул. Дзержинского, д. 9. Тел.: +38 (056) 713-52-57 (раб.). E-mail: olga_313@mail.ru.