

УДК 612.12: 616.72-007: 616-053

Е. С. Ярыгина, С. Я. Жанаева, А. В. Богатырева

КАТЕПСИН L-ПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ АРТРИТАХ У ДЕТЕЙ

Лаборатория клеточной биохимии и физиологии ГУ НИИ физиологии СО РАМН

Кафедра детских болезней лечебного факультета НГМА МЗ РФ

Городской детский кардиоревматологический центр Новосибирска (1МДКБ) МЗ РФ

В данной работе представлены результаты исследования катепсин L подобной активности, определяемой в сыворотке крови и синовиальной жидкости детей с различными типами воспалительных инфекционных артритов.

Ключевые слова: катепсин L, артриты, деструкция хряща

Рост костно-суставной патологии отмечается во всем мире. В связи с этим, как известно, текущая декада с 2000 по 2010 г. объявлена ВОЗ Всемирной декадой костно-суставных заболеваний [4]. В структуре этой патологии одним из наиболее распространенных и важных в прогностическом плане является ревматоидный артрит (РА). Подсчитано, что во всем мире РА страдают приблизительно 58 млн человек [15]; его распространенность во взрослой популяции составляет около 1%, а в детской – 0,05–0,6% [1]. Прогностическая важность данного заболевания складывается из высокой вероятности развития деструктивных анатомических изменений, таких, как разрушение кости и хряща, подвывихи и т. д., которые через 15–20 лет могут приводить к глубокой инвалидизации пациента, несмотря на субъективное и объективное улучшение, отмечавшееся после курсов базисной терапии [2, 5].

В настоящее время считается, что в деструкции суставов наибольшее значение принадлежит катепсинам и металлопротеиназам. В литературе представлено большое количество данных о высокой активности катепсина L (KL) в синовиальной жидкости взрослых больных ревматоидным артритом [8, 10, 12], и преимущественной иммулокализации KL в синовиальных клетках, прилежащих к очагам ревматоидной деструкции кости и хряща [13]. Имеются данные о торможении дегградации кости после селективной инактивации цистеиновых протеиназ, в число которых входит и KL [9], являющийся секретируемой цистеиновой протеиназой (семейство тиоловых протеаз, или папаина) [3], присутствующей в лизосомах всех клеток, принимающих участие в неспецифической дегградации белков внеклеточного матрикса: лейкоцитов, макрофагов, фибробластов, активированных хондроцитов и остеокластов [14]. Субстратами для

воздействия KL является коллаген, в том числе II, IX и XI типов, специфичных для гиалинового хряща мелких суставов [11], протеогликаны, компоненты базальных мембран и эластин [4]. В экспериментальной модели артритов наиболее высокая активность KL отмечается на пике воспалительного ответа [7].

Роль KL при ювенильном ревматоидном артрите, а также других типах воспалительных неинфекционных артритов у детей, остается невыясненной. Настоящее исследование направлено на выявление закономерностей изменения KL-подобной активности при этих артритах для возможной их дифференциальной диагностики на ранних стадиях, когда еще отсутствуют деструктивные изменения в суставах, отличающие ревматоидный процесс, и имеется возможность управления болезнью.

Методика. Обследовано 44 ребенка (22 девочки и 22 мальчика) в возрасте от 1 года 10 мес. до 17 лет с воспалительными неинфекционными артритами. Артриты, удовлетворяющие критериям Американской ассоциации ревматологов и имеющие не менее 8 признаков по восточно-европейским критериям, расценивались как ювенильные ревматоидные артриты (ЮРА) – 15 детей. При соответствии американским критериям, но наличии менее 8 признаков по восточно-европейским критериям, артриты расценивались как ювенильные хронические артриты (ЮХА) – 12 детей. Артриты, соответствующие критериям Amor et al., расценивались как ювенильные анкилозирующие спондилоартриты (ЮАСА) – 2 ребенка. Постинфекционные артриты длительностью не более 3 мес. расценивались как реактивные (РеА) – 17 детей.

У всех 44 детей путем венепункции локтевой вены была натощак взята кровь для получения сыворотки; у 8 детей (1 ребенок с РеА, 1 – с ЮХА, 1 – с

ЮАСА, 5 – с ЮРА) при проведении терапевтической пункции коленных суставов была получена синовиальная жидкость. Кровь для получения сыворотки и синовиальную жидкость забирали пластиковыми шприцами. Синовиальная жидкость стабилизировалась гепарином (250 ЕД/3 мл). Центрифугирование сыворотки крови и синовиальной жидкости проводили в стеклянных пробирках при 5000 об/мин в течение 20 мин с последующим замораживанием сыворотки крови и бесклеточного супернатанта синовиальной жидкости в полиэтиленовых эпипендорфах и хранением при температуре 12 °С не более 1 мес.

KL-подобную активность (KLA) определяли по методу Barrett A.J., Kirschke H., 1981 [6] с использованием в качестве субстрата L-Phe-Arg-MCA (НПО "Вектор", Кольцово, Новосибирская обл.). KLA сопоставлялась с активностью щелочной фосфатазы (определяли кинетическим оптимизированным тестом "Fluitest ALP" с использованием наборов фирмы Bioson, Германия) и активностью катепсина В (определяли по методу Barrett A.J., Kirschke H., 1981 [6] с использованием в качестве субстрата L-Arg-Arg-MCA (НПО "Вектор", Кольцово, Новосибирская обл.) и в качестве селективного ингибитора CA-074 (любезно предоставленный проф. N. Katunuma, Япония).

Результаты. KLA регистрировалась во всех полученных образцах биологических жидкостей обследуемых детей и в сыворотке крови была выше, чем в синовиальной жидкости. KLA в сыворотке крови изменялась в пределах 0,30–7,14 нмоль МСА /мл/час (МЕ); в синовиальной жидкости – в пределах 0,09–1,53 МЕ (рис.1).

Из 8 детей, имевших выпот в полость коленного сустава, было 6 мальчиков, 4 из которых являлись носителями локуса HLA-B27 (1 ребенок с РеА, 1 – с ЮАСА, 2 – с ЮРА) и демонстрировали высокую KLA в синовиальной жидкости (рис.1). Из этих детей наименьшая KLA наблюдалась у мальчика с синдромом Рейтера, имевшего наименьшую длительность заболевания. Из HLA-B27+ братьев-близнецов, страдающих ЮРА, у второго из двойни, заболевшего раньше и имевшего большую тяжесть поражения, наблюдалась большая KLA как в синовиальной жидкости, так и в сыворотке крови (рис. 1: столбцы ЮРА 2, ЮРА 3).

Дети, длительно получавшие локальную терапию глюкокортикоидами, несмотря на длительность и рецидивирование суставного синдрома, имели низкие показатели KLA в синовиальной жидкости, но достаточно высокие – в сыворотке крови (рис. 1: столбцы ЮРА 1, ЮРА 4, ЮРА 5). В среднем в группе детей, страдающих ЮРА, наблюдалась тенденция к наибольшей KLA сыворотки крови; в группе детей, страдающих РеА, – к наименьшей (рис. 2). В зависимости от степени активности артрита KLA сыворотки крови возрастала, составляя в среднем $1,86 \pm 0,13$ МЕ при I степени

активности (max при ЮРА – $2,28 \pm 0,28$ МЕ и min – при РеА – $1,5 \pm 0,11$ МЕ), $2,33 \pm 0,40$ МЕ – при II степени активности (max при ЮРА – $2,79 \pm 0,48$ МЕ и min – при РеА – $2,54 \pm 1,96$ МЕ), и $3,09 \pm 1,12$ при III степени активности артрита (рис. 3).

При исследовании в динамике через 2–3 недели от момента забора отмечалось увеличение KLA и в сыворотке крови, и в синовиальной жидкости, несмотря на проводимое лечение НПВС и, в некоторых случаях, глюкокортикоидами. При этом наблюдалась слабая прямая корреляция с изменением активности щелочной фосфатазы ($r=0,2$), также нарастающей с увеличением срока заболевания, и слабая обратная корреляция с активностью катепсина В ($r=0,3$), чья активность уменьшается под воздействием проводимого лечения.

Заключение. Несмотря на преобладание лиц женского пола среди больных РА, наши наблюдения показывают, что именно мальчики, и особенно HLA-B27+, имеют большую склонность к образованию выпота в полость сустава и более высокие показатели активности такого фермента дест-

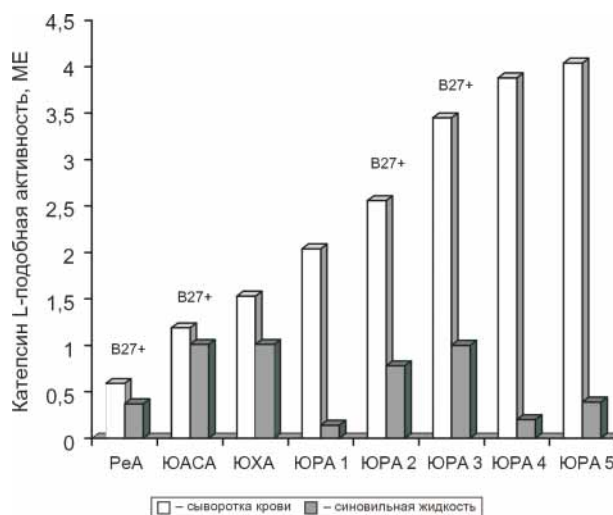


Рис. 1. Соотношение катепсин L-подобной активности сыворотки крови и синовиальной жидкости детей с разными типами артритов

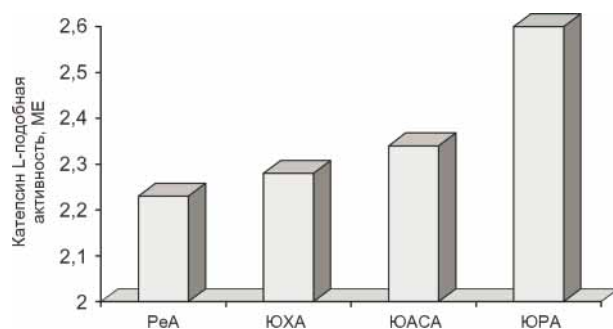


Рис. 2. Средние показатели катепсин L-подобной активности сыворотки крови в группах детей с разными типами артритов

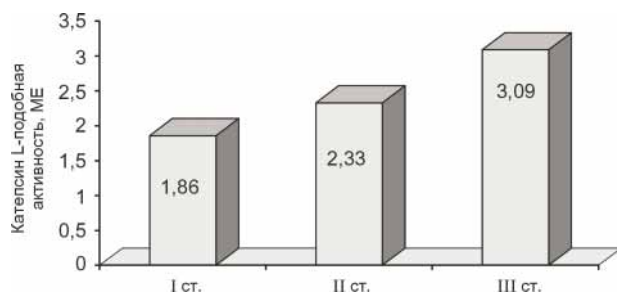


Рис. 3. Средние показатели катепсин L-подобной активности сыворотки крови в группах детей с разными степенями активности артритов

рукции, как KL. Однако следует иметь в виду, что низкая KLA в синовиальной жидкости, обнаруживаемая у детей с рецидивирующим течением заболевания, получающих локально стероиды, имеющих неоспоримо позитивное влияние на течение суставного процесса, не является гарантией контроля над заболеванием при высоких показателях в сыворотке крови. В целом KLA сыворотки крови может отражать активность суставного процесса. Отсутствие достоверных различий KLA сыворотки крови среди групп с разными типами артритов может объясняться такой особенностью ревматических болезней детского возраста, как длительность периода оформления болезни, в течение которого возможна трансформация РеА и ЮХА в ЮРА, и, возможно, более длительное наблюдение сможет внести достоверность в это наблюдение.

Выражаем величайшую признательность научным руководителям данной работы – д-ру мед. наук, проф. Короленко Т.А. – заведующей лабораторией клеточной биохимии и физиологии ГУ НИИ физиологии СО РАМН и д-ру мед. наук, проф. Соболевой М.К. – заведующей кафедрой детских болезней лечебного факультета НГМА МЗ РФ, главному специалисту Новосибирска по ревматическим болезням у детей.

CATHEPSIN L-LIKE ACTIVITY IN SERUM AND SYNOVIAL FLUID OF CHILDREN WITH ARTHRITISES

E.S. Yarygina, S.Y. Zhanaeva, A.V. Bogatyreva

Destruction of joint in is the main problem of rheumatology. Elucidation of the joint destructive mechanisms has scientific and practical interest. It is proved, that cathepsin L (CL) in cooperation with other enzymes take part in joint destruction, where it destroy collagen, including II, IX and XI types, which are specific for hyaline cartilage of small joints, proteoglycans and base membrane components. In this study we present the data of cathepsin L-like activity (CLA) determined by use L-Phe-Arg-MCA as substrate in sera and synovial fluid of children with the different types of inflammatory noninfected arthritises. It has been estimated, that in investigated fluids CLA has been registered in all types of arthritis, and in serum was higher than in synovial fluid. Low CLA in synovial fluid of children treated with steroids is not to be a guarantee of disease control, if in the serum observed high indices of CLA, where it reflect arthritis activity and has a tendency to more higher indices in juvenile rheumatoid arthritis, which is maximal dangerous for destruction. CLLA increasing in investigated material was parallel with alkaline phosphatase activity and felt in cathepsin B activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Детская ревматология. Руководство для врачей / Под ред. Баранова А.А., Баженовой Л.Н. М., 2002.
2. Крикунов В.П., Головизнин М.В. // Российская ревматология. 1999. № 5. С. 8–14.
3. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы воспаления. СПб., 2001.
4. Насонова В.А. // Русский мед. журнал. 2000. № 2. С. 369–372.
5. Насонова В.А., Сигидин Я.А. // Терапевтический архив. 1996. № 5. С. 5–8.
6. Barrett A.J., Kirschke H. // Meth Enzymol. 1981. Vol. 80. P. 536–541.
7. Etherington D.J., Taylor M.A., Henderson B. // Br J Exp Pathol. 1988. Vol. 69. P. 281–289.
8. Gabriejicic D., Annan-Prah A., Rodic B. et al. // J Chem Clin Biochem. 1990. Vol. 28. P. 149–153.
9. Hill P.A., Buttle D.J., Jones S.J. // J Cell Biochem. 1994. Vol. 56. P. 118–130.
10. Huet G., Flipo R.M., Richet C. et al. // Clin Chem. 1992. Vol. 38. P. 1694–1697.
11. Lemaire R., Huet G., Zerimech F. et al. // British Journal of Rheumatology. 1997. Vol. 36. P. 735–743.
12. Maciewicz R.A., Wotton S.F., Etherington D.J., Duance V.C. // FEBS Lett. 1990. Vol. 269. P. 189–193.
13. Trabandt A., Aicher W., Gay R.E. et al. // Matrix. 1990. Vol. 10. 349–361.
14. Turk B., Turk V., Turk D. // Biol. Chem. 1997. Vol. 378. P. 141–150.
15. Wenblatt M.E., Gravalles E.M. // Русский мед. журнал. 1997. № 13. С. 820–828.