

І.А. СРЕБНЯК, О.Й. КИЗИМ

**ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТЕПСИНУ В ВІОЛОГІЧНИХ
РІДИНАХ ТА ПЕРИФОКАЛЬНИХ ТКАНИНАХ СЕРЕДНЬОГО ВУХА
У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГНІЙНИЙ СЕРЕДНІЙ ОТИТ
З ХОЛЕСТЕАТОМОЮ**

Повідомлення 1

*Від. мікрохірургії вуха та отонейрохірургії (зав. – проф. Ю.О. Сушко),
лабораторія біохімії (зав. – докт. біол. наук С.В. Верьовка)
Ін-ту отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України
(дир. – чл.-кор. АМНУ, проф. Д.І. Заболотний)*

Характерною особливістю патологічного процесу при холестеатомі середнього вуха є ерозія слухових кісточок та підлеглої кісткової тканини в межах вискової кістки, механізм якої не повністю з'ясований. До однієї з теорій деградації кісткової тканини відноситься ферментативна (І.А. Сребняк, А.І. Кизим, 2002, 2004; Bernard, Hornebeck, 1995; Banerjee et al., 1998; Avidano et al., 1998; Chodynicky et al., 2002; Dickinson, 2002; Srebnyak et al., 2004). Серед ферментів привертають увагу протеолітичні, котрі здатні розщеплювати основний компонент кісток – колаген, який складає біля 90% від їх загального білка. Згідно з даними літератури, в цьому процесі задіяні фосфатази (І.А. Сребняк, А.І. Кизим, 2002; Srebnyak et al., 2004), еластази (І.А. Сребняк, А.І. Кизим, 2004; Bernard, Hornebeck, 1995), катепсини D, K, L (Banerjee et al., 1998; Schonemark et al., 1999; Hansen et al., 2001; Kusunoki et al., 2001) та інші ферменти (В.О. Шкорботун, Г.Ф. Карпенко., 1996; В.О. Шкорботун та співавт., 2004; Turk et al., 2001; Chodynicky et al., 2002).

Серед ферментів особливе місце займають цистеїнові протеїнази (ЦП), які відносяться до класу папаїноподібних протеїназ завдяки аналогічній з ними структурі, наявності в активному центрі молекул SH-груп цистеїну, локалізації в лізосомах і цитозолі (Turk et al., 2001). До цих ферментів належать ендо- і екзопептидази – катепсини B, K, L, G, H, S та інші. Вони беруть участь в ремодулюванні тканин, обміні внутріш-

ньоклітинного матриксу, функціонуванні імунної системи, зміні клітинної функції, обміні білків (Turk et al., 2001).

В літературі відсутні дані щодо одночасного вивчення активності цистеїнових протеїназ в біологічних рідинах та тканинах середнього вуха у хворих на хронічний гнійний середній отит (ХГСО) з холестеатомою за допомогою біохімічних методів.

Мета роботи – з'ясувати роль цистеїнових протеїназ в перебігу ХГСО з холестеатомою.

Об'єктом дослідження були сироватка крові у 30 хворих і 10 практично здорових людей, ексудат із середнього вуха, а також гомогенати холестеатомного матриксу, оточуючої його слизової оболонки і підлеглої кісткової тканини.

Сумарна активність ЦП визначалася за методом Fukal і співавторів (1998), який був модифікований нами відповідно до об'єкта дослідження для розробки оптимальних умов вивчення ЦП. За субстрат правив хромогенний пептид – Suc-Gly-Ley-Cys-(Benz)-пара-нітроанілід і N-бензоїл-DL-аргінін-пара-нітроанілід (БАПНА) – для катепсину В. Активність ЦП і катепсину В виражалася в нмоль пара-нітроаніліну (п-НА)/(год·мг білка) в ексудаті, тканинах і на 1 мл сироватки крові. Білок визначався за методом Lowry і співавторів (1951).

Результати дослідження сумарної активності ЦП в ексудаті, холестеатомі і перифокальних структурах середнього вуха у хворих на ХГСО наведені в табл.1.

Таблиця 1

Сумарна активність цистеїнових протеїназ в ексудаті, холестеатомному матриксі і оточуючих його тканинах у хворих на ХГСО

Групи обстежених	Активність ЦП, нмоль п-НА/(год·мг білка), M±m			
	ексудат	холестеатомний матрикс	слизова оболонка	кісткова тканина
Хворі на ХГСО	26,0 ± 5,2 p < 0,01	2,2 ± 0,7	21,0 ± 4,5 p < 0,01	10,2 ± 2,7 p < 0,05

Примітка: p – достовірність різниці між показниками в холестеатомному матриксі і ексудаті, перифокальних тканинах.

Як видно з даних табл. 1, в ексудаті і в перифокальних структурах середнього вуха виявляється активність ЦП, яка була статистично вищою, ніж в холестеатомному матриксі. Так, вона була найбільшою в ексудаті, слизовій оболонці і дорівнювала, відповідно, 26,0±5,2 і 21,0±4,5 нмоль п-НА/(год·мг білка), а найменшою – в холес-

театомному матриксі – 2,2±0,7 нмоль п-НА/(год·мг білка). У підлеглий кістковій тканині середнього вуха цей показник становив 10,2±2,7 нмоль п-НА/(год·мг білка).

Крім загальної активності ЦП, нами вивчалась активність одного з представників цих ферментів – катепсину В (табл. 2).

Таблиця 2

Активність катепсину В в обстежуваних групах

Групи обстежених	Активність катепсину В, нмоль п-НА/(год·мг білка), M±m				
	сироватка крові	ексудат	холестеатомний матрикс	слизова оболонка	кісткова тканина
Хворі на ХГСО з холестеатомою (n=30)	24,0 ± 4,1 p < 0,01	43,0 ± 12,0 p ₁ < 0,001	2,8 ± 0,7	35,5 ± 6,4 p ₁ < 0,001	11,0 ± 2,2 p ₁ < 0,01
Хворі на ХГСО без холестеатомі (n=5)	-	-	-	0	0
Практично здорові люди (n=10)	9,0 ± 0,3				

Примітка: p – достовірність різниці між активністю катепсину В в сироватці крові у хворих на ХГСО з холестеатомою і у практично здорових людей; p₁ – достовірність різниці між показниками в холестеатомі і ексудаті, перифокальних тканинах.

Отримані результати (табл. 2) свідчать про те, що як біологічним рідинам, так і перифокальним тканинам, що контактують з холестеатомним матриксом, притаманна здатність гідролізувати специфічний для катепсину В субстрат. Так, в сироватці крові у хворих на ХГСО з холестеатомою активність катепсину В перевищувала таку у практично здорових осіб в 2,6 рази. Активність цієї цистеїнової протеїнази в кістковій тканині, слизовій оболонці була вищою, ніж

в холестеатомному матриксі, відповідно, в 3,9 і 12,7 рази.

Високу активність катепсину В ми виявляли і в ексудаті з середнього вуха (43,0±12,0 при 2,8±0,7 нмоль п-НА/ (год·мг білка) в холестеатомі). Слід відмітити, що при ХГСО без холестеатомі в перифокальних тканинах у пацієнтів активність ферменту не визначалась.

Отже, проведені дослідження показали, що при ХГСО спостерігається підви-

щення як загальної активності цистеїнових протеїназ, так і катепсину В.

Для з'ясування питання, чи існує залежність між агресивністю холестеатомного

процесу і активністю катепсину В, були проаналізовані результати вивчення цього ферменту при різних формах холестеатоми. Отримані дані представлені в табл. 3.

Таблиця 3

Активність катепсину В в ексудаті, холестеатомі і слизовій оболонці у хворих на ХГСО з різними формами холестеатоми

Хворі на ХГСО з холестеатомою різної форми	Активність катепсину В нмоль п-НА/(год·мг білка), M±m		
	ексудат	холестеатомний матрикс	слизова оболонка
Інкапсульована форма (n = 25)	22,5 ± 4,3	1,5 ± 0,6	27,0 ± 6,3
Інвазивна форма (n = 5)	83,0 ± 10,0 p < 0,01	6,1 ± 2,0	33,0 ± 13,5

Примітка: p – достовірність різниці показників в групах хворих з інкапсульованою та інвазивною формою холестеатоми.

Нами було встановлено (табл. 3), що при більш агресивній (інвазивній) формі холестеатоми активність катепсину В в ексудаті з середнього вуха перевищувала в 3,7 рази аналогічний показник при інкапсульованій (менш агресивній) формі, а в холестеатомному матриксі – в 4 рази. Активність катепсину В в слизовій оболонці у хворих з інвазивною формою холестеатоми мала тенденцію до збільшення порівняно з інкапсульованою.

Таким чином, проведені дослідження дозволяють припустити, що цистеїнові протеїнази (зокрема катепсин В), можуть бути одними з ферментів, які сприяють деструк-

ції колагену – головного органічного компоненту кісткової тканини. Деструкція колагену здійснюється як прямим, так і опосередкованим шляхом внаслідок активації під дією ЦП латентної колагенази. Катепсин В є одним з важливих цистеїнових протеолітичних ферментів, котрий запускає протеолітичний каскад, що може призводити до дезорганізації кісткових структур середнього вуха і вторгнення холестеатоми в оточуючі тканини.

Визначення катепсину В в ексудаті з середнього вуха у хворих на ХГСО може вважатися показником агресивності холестеатомного процесу.

1. Сребняк І.А., Кизим А.И. Изучение активности щелочной и кислой фосфатаз в биологических жидкостях и перифокальных тканях среднего уха у больных хроническим гнойным средним отитом // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2002. – №3. – С. 44-49.
2. Сребняк І.А., Кизим А.И. Активность эластазы в биологических жидкостях и перифокальных тканях среднего уха у больных хроническим гнойным средним отитом // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2004. – №6. – С. 19-22.
3. Шкорботун В.О., Карпенко Г.Ф. Протеолітичні ферменти в генезі хронічного гнійного середнього отиту // Тез. доп. VI конгресу СФУЛТ. – Одеса, 1996. – С. 176.
4. Шкорботун В.О., Кизим О.Й., Пеньковська Н.П. Показники протеазно-антипротеазної системи та пе-

- рекисного окислення ліпідів як маркери руйнівного процесу при ускладненнях хронічного гнійного середнього отиту // Збірник наук, праць, співробітн. КМАПО ім. П.Л. Шупика. – Київ. – 2004. – Вип.13, кн. 1 – С. 716-723.
5. Avidano M., Cotter C., Stringer S., Schultz G. Analysis of protease activity in human otitis media // Otolaryngol. Head Neck Surg. – 1998. – № 4. – P. 346-351.
6. Banerjee A., James R., Narula A., Lec R. Matrix metalloproteinases-1 in cholesteatoma, middle ear granulations and deep meatal skin: a comparative analyses // Clin. Otolaryngol. – 1998. – Vol. 23, №6. – P. 515-519.
7. Bernard E., Hornebeck W. L'endopeptidase de type elastase des fibroblastes. Effet des inhibiteurs des metalloproteases // Comptes Rendus Acad. Sci. – 1995. – Vol. 318, №2. – P. 179-182.

8. Chodynicki S., Chyczewski L., Olszewska E. Immunohistochemical investigation of cathepsin D activity in the structures of cholesteatoma // *Med. Sci. Monit.* – 2002. – №2. – P. 184-186.
9. Dickinson D. Cysteine peptidase of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* – 2002. – Vol. 13, №3. – P. 238-275.
10. Fukal L., Kasafirek E. Sensitive assay of cysteine proteinases using new peptide p-nitroanilides // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1998. – Vol. 10. – P. 473-475.
11. Hansen T., Unger R., Gaumann A. et al. Expression of matrix-degrading cysteine proteinase cathepsin K in cholesteatoma // *Mod. Pathol.* – 2001. – Vol. 14, №12. – P. 1226-1231.
12. Kusunoki T., Nishida S., Murata K. et al. Cathepsin L activity and its inhibitor in human otitis media // *J. Otolaryngol.* – 2001. – Vol. 30, №3. – P. 157-161.
13. Lowry O.U., Rosenbrough N.J., Farr A.Z., Randall K. Protein measurement with folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, №1. – P. 265-276.
14. Schonemark M., Issing P., Erbrich B., Lenarz T. Expression pattern of the plasminogen activator-plasmin system in human cholesteatoma // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 1999. – Vol. 108, №3. – P. 245-252.
15. Srebnyak I., Soushko Yu., Borysenko O., Veremeenko K., Kizim A. Enzymatic activity study in perifocal middle ear tissues and serum in patients with middle ear cholesteatoma // Abstract book of 7th International Conference on Cholesteatoma & Ear Surgery (22-24 June 2004, The Hague, The Netherlands). – 2004. – P. 39-40.
16. Turk V., Turk B., Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities // *The EMBO J. (Eur. molec. biol. organization)*. – 2001. – Vol. 20, №17. – P. 4629-4633.

Надійшла до редакції 15.12.06.

© I.A. Сребняк, О.Й. Кизим, 2007

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ
КАТЕПСИНА В В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЖИДКОСТЯХ И ПЕРИФОКАЛЬНЫХ
ТКАНЯХ СРЕДНЕГО УХА У БОЛЬНЫХ
ХРОНИЧЕСКИМ ГНОЙНЫМ СРЕДНИМ
ОТИТОМ С ХОЛЕСТЕАТОМОЙ**

Сребняк И.А., Кизим А.И. (Киев)

Резюме

Исследование общей активности цистеиновых протеиназ и активности катепсина В показало ее повышение в холестеатомном матриксе и перифокальных тканях среднего уха у больных хроническим гнойным средним отитом (ХГСО) с холестеатомой. У пациентов с не холестеатомной формой ХГСО в перифокальных структурах среднего уха не определялась активность катепсина В. Обнаружено значительное повышение активности катепсина В в экссудате из среднего уха и холестеатомном матриксе у больных с инвазивной холестеатомой по сравнению с активностью этого фермента в аналогичных структурах у пациентов с инкапсулированной холестеатомой. Обсуждается роль цистеиновых протеиназ и катепсина В в биохимических механизмах разрушения костной ткани. Определение активности катепсина В в экссудате из среднего уха может быть показателем агрессивности холестеатомного процесса у больных ХГСО.

**CYSTEIN PROTEINASES AND
CATHEPSIN B ACTIVITY STUDY
IN MIDDLE EAR CHOLESTEATOMA
AND PERIFOCAL TISSUES IN PATIENTS
WITH CHRONIC OTITIS MEDIA**

Srebnyak I.A., Kizim A.I. (Kiyev)

Summary

The comparative biochemical study of cystein proteinase and cathepsin B demonstrated the high activity of these enzymes in middle ear effusion and in cholesteatoma matrix in patients with cholesteatoma and total absence of these enzymes activity in patients with non-cholesteatomatous otitis media. The dependence of the aggressive cholesteatoma process on the cathepsin B activity in middle ear effusion and in cholesteatoma matrix was established. The role of these proteinases in the biochemical bone destruction mechanisms in patients with middle ear cholesteatoma is discussed. Cathepsin B activity index in middle ear effusion might be used as a test for cholesteatoma aggressiveness.