

А.И. КИЗИМ, И.А. СРЕБНЯК

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ И КАЛЛИКРЕИНА В ХОЛЕСТЕАТОМЕ И ПЕРИФОКАЛЬНЫХ ТКАНЯХ СРЕДНЕГО УХА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГНОЙНЫМ СРЕДНИМ ОТИТОМ

Лаб. биохимии (зав. – д-р біол. наук С.В. Верьовка), отд. микрохирургии уха и отонейрохирургии (зав. – проф. Ю.А. Сушко) Гос. учреждения «Ин-т отоларингологии им. проф. А.И. Коломийченко АМНУ» (дир. – чл.-кор. АМН Украины, проф. Д.И. Заболотный)

Хронический гнойный средний отит (ХГСО), осложненный холестеатомой, сопровождается костной деструкцией и может приводить к развитию тугоухости, иногда инвалидизирующей, а в некоторых случаях к возникновению внутричерепных осложнений (А.И. Цыганов, М.И. Волощук, 1984; В.А. Шкорботун, 2000; Ю.А.Сушко и соавт., 2001; Kaneko et al., 1980; Nakamura et al., 1995). Механизм разрушения костной ткани под действием холестеатомы до настоящего времени окончательно не выяснен. В последнее время большое внимание уделяется изучению роли ферментов, которые расщепляют структурные и регуляторные белки, способствуя тем самым эрозии костных структур среднего уха (В.О. Шкорботун, О.Й. Кизим, 2004; Desloge et al., 1997; Banerjee et al., 1998; Hansen et al., 2001; Chyczewska et al., 2002; Miyao et al., 2004; Srebnyak et al., 2004; Swane-Knudsen et al., 2004). Хотя и имеются данные о наличии в холестеатомном матриксе фосфатаз, нейтральных, кислых, цистеиновых, металлопротеиназ, однако они определялись с помощью иммунохимических методов, которые не дают полного представления о функциональной активности этих ферментов.

Для понимания патогенеза холестеатомного процесса и возникновения рецидива важное значение имеет изучение активности протеиназ с широкой и ограниченной специфичностью не только в холестеатоме, но и в прилегающих к ней структурах – костной ткани и слизистой оболочке антрама-

стоидальной полости. Данные о комплексном изучении различных протеиназ с использованием энзимологических методов малочисленны, что не позволяет сделать вывод о деструктивном воздействии холестеатомы на костные структуры среднего уха. Это объясняется малым количеством материала для биохимических исследований, который может быть получен во время операции.

Нами разработаны высокочувствительные методы для определения активности протеиназ в образцах тканей массой от 5 до 10 мг.

Цель настоящей работы – оценить информативность исследования трипсиноподобных (нейтральных) протеиназ с широкой и узкой специфичностью как показателя течения ХГСО с холестеатомой.

Под наблюдением находился 31 больной ХГСО, из них 28 – с холестеатомой, 3 – с не холестеатомной формой заболевания.

Объектом исследования служили гомогенаты, полученные из холестеатомного матрикса, слизистой оболочки, костной ткани.

Суммарная активность трипсиноподобных протеиназ (ТПП) определялась по методу К.Н. Веремеенко и соавторов (1988), модифицированного нами применительно к объекту изучения, и выражалась в нмоль аргинина / (мин·мг белка). Активность калликреина исследовалась с помощью хромогенного трипептида – НД-Вал-Лей-Арг-пара-нитроанилида и выражалась в нмоль пара-нитроанилина: п-НА/(ч·мг белка). Бе-

лок определялся по методу Lowry и соавторов (1951).

Результаты изучения общей трипси-

ноподобной активности и калликреина в различных объектах исследования приведены в табл. 1.

Таблица 1

Суммарная активность ТПП и калликреина в холестеатомном матриксе и перифокальных структурах среднего уха у больных ХГСО

Объект исследования	Активность (M±m)	
	ТПП, нмоль аргинина/ (мин·мг белка)	калликреина, нмоль п-НА/(ч·мг белка)
Больные ХГСО с холестеатомой:		
холестеатома	5,6±1,2	12,3±3,3
слизистая оболочка	57,0±16,2; p<0,001	195,0±56,4; p<0,01
костная ткань	24,0±4,0; p<0,01	35,0±5,3; p<0,01
Больные ХГСО без холестеатомы:		
слизистая оболочка	7,4±4,7	9,5±6,9
костная ткань	7,7±2,7	6,7±5,0

Как видно из табл. 1, у больных ХГСО с холестеатомой активность ТПП выявлялась как в холестеатомном матриксе, так и в окружающих его структурах. Так, в слизистой оболочке и костной ткани она превышала аналогичный показатель в холестеатомном матриксе в 10,2 и 4,3 раза, соответственно.

У пациентов с ХГСО без холестеатомы средняя активность ТПП в перифокальных структурах среднего уха значительно отличалась от таковой при наличии холестеатомы: в слизистой оболочке она была в 7,7, а в костной ткани – в 3,1 раза меньше.

Определение функциональной активности калликреина-протеиназы с узкой субстратной специфичностью, которая принимает участие в образовании медиаторов во-

спаления – кининов (табл. 1), показало, что она была более высокой в слизистой оболочке у больных ХГСО (195,0±56,4 нмоль п-НА/(ч·мг белка), меньшей – в костной ткани (35,0±5,3 нмоль п-НА/(ч·мг белка) и наименьшей – в холестеатомном матриксе (12,3±3,3 нмоль п-НА/(ч·мг белка).

Сравнение активности калликреина в перифокальных структурах среднего уха у обследуемых лиц с холестеатомой и без нее позволило установить, что средние показатели её в основной группе были значительно выше, чем в контрольной.

Нами проанализированы результаты изучения протеиназ в холестеатоме и прилегающей к ней костной ткани в зависимости от агрессивности холестеатомного процесса. Эти данные обобщены в табл. 2.

Таблица 2

Активность трипсиноподобных протеиназ и калликреина в холестеатоме и костной ткани у больных ХГСО в зависимости от формы холестеатомы

Анатомопатологические формы холестеатомы у больных ХГСО	Объект исследования	Активность (M±m)	
		ТПП, нмоль аргинина / (мин·мг белка)	калликреина, нмоль п-НА/(ч·мг белка)
Инкапсулированная	холестеатома	3,9±1,0	5,6±0,8
	кость	14,0±2,8	30,0±6,4
Инвазивная	холестеатома	12,0±2,6; p < 0,02	31,0±8,0; p < 0,01
	кость	41,0±9,0; p < 0,05	46,0±3,2; p < 0,05

Согласно полученным результатам, активность ТПП при более агрессивном течении заболевания превышала таковую при инкапсулированной форме холестеатомы в костной ткани в 2,9, в холестеатомном матриксе – в 3 раза. Аналогичная закономерность отмечена и для калликреина: его активность при инкапсулированной форме холестеатомы была в холестеатомном матриксе в 5,5, а в костной ткани – в 1,5 раза ниже, чем при инвазивной форме.

Наиболее существенные изменения активности изучаемых протеиназ при инвазивной форме холестеатомы объясняются, вероятно, более выраженным воспалительным процессом в прилегающих к холестеатоме тканях.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высоком протеолитическом потенциале в перифокальных структурах среднего уха у больных ХГСО с холес-

театомой. Повышение суммарной активности нейтральных (трипсиноподобных) протеиназ и калликреина в холестеатоме и окружающих ее тканях, возможно, обусловлено их освобождением из тучных клеток, которые содержат около 20% белка с трипсиноподобной специфичностью. Известно, что при воспалительных процессах в среднем ухе их количество возрастает в 10 раз и они могут быть источником исследуемых ферментов (Hochstrasser et al., 1994). Калликреины, кроме образования вазоактивного кинина – каллидина, являются активаторами коллагеназы. Последняя расщепляет один из основных белков соединительной ткани – коллаген, что может быть одним из факторов, приводящим к резорбции костной ткани, которая контактирует с холестеатомным матриксом (Mignatti, Rifkin, 1993), и, возможно, имеет отношение к патогенезу ХГСО, осложненного холестеатомой.

1. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. - К.: Здоров'я, 1988. – 200 с.
2. Сушко Ю.А., Борисенко О.Н., Сребняк И.А. Клинико-морфологические и функциональные результаты saniрующих операций у больных ХГСО с социально-адекватным слухом // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. - 2000. - №5. – С. 31-34.
3. Цыганов А.И., Волощук М.И. Некоторые вопросы клиники и лечения больных с холестеатомой среднего уха // Вестн. оториноларингологии. – 1984. - №1. – С. 60-63.
4. Шкорботун В.А. Тимпанопластика в ближайшем периоде после санации внутричерепных осложнений хронического гнойного среднего отита // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. - 2000. - №1. – С. 63-69.
5. Шкорботун В.О., Кизим О.Й., Пеньковська Н.П. Показники протеазно-антипротеазної системи та перекисного окислення ліпідів як маркери руйнівного процесу при ускладненнях хронічного гнійного середнього отиту // Зб. наук. праць співробіт. КМАПО ім. П.Л. Шупика. – Київ, 2004. – Вип.13, Кн. 1 – С. 716-723.
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, N6. – 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, N2. – P. 179-182.
8. Chodyncki S., Chyczewski L., Olszewska E. Immunohistochemical investigation of cathepsin D activity in the structures of cholesteatoma // Med. Sci. Monit. – 2002. - N2. – P. 184-186.
9. Desloge R.B., Finstad C.L., Sasson J. et al. Altered regulation of cell surface peptidases in human cholesteatoma // Otolaryngol. Head Neck Surg. - 1997. - Vol. 116, N1.- P. 58-63.
10. Hansen T., Unger R., Gaumann A. et al. Expression of matrix-degrading cysteine proteinase cathepsin K in cholesteatoma // Mod. Pathol. – 2001. – Vol. 14, N12. – P. 1226-1231.
11. Hochstrasser K., Albrecht G.Y., Gebhard W. et al. Isolation and characterization of trypsin-like and chymotrypsin-like proteinases from human cholesteatoma // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. – 1994. – Vol. 251. – P. 30-35.
12. Kaneko G., Guasa R., Gino G. et al. Bone destruction due to the rupture of a cholesteatoma. A pathogenesis of bone destruction in aural cholesteatoma // Laryngoscope. – 1980. – Vol. 90. – P. 1865-1971.

13. Kusunoki T., Nishida S., Murata K. et al. Cahtepsin L activity and its inhibitor in human otitis media // *J. Otolaryngol.* – 2001. – Vol. 30, N3. – P. 157-161.
14. Lowry O.U., Rosenbrough N.J., Farr A.Z., Randall K. Protein measurement with folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N1. – P. 265-276.
15. Mignati P., Rifkin D. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion // *Physiol. Rev.* – 1993. – Vol. 73, N1. – P. 161-195.
16. Miyao M., Shinoda H., Takahashi S. Expressions of caspase-3-8 and NF-KB in human ear cholesteatoma // Abstract book VIIth International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery (22-24 June 2004, The Hague, The Netherlands). – 2004. - P. 29.
17. Svan-Knudsen V., Rogowska-Wrzesinska A., Mose-Larsen P. et al. Identification of enzymes and proteins involved in the cholesteatoma development // Abstract book VIIth International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery (22-24 June 2004, The Hague, The Netherlands). – 2004. - P. 29.
18. Srebnyak I., Soushko Yu., Borysenko O., Vere-meenko K., Kizim A. Enzymatic activity study in perifocal middle ear tissues and serum in patients with middle ear cholesteatoma // Abstract book of VII International Conference on Cholesteatoma & Ear Surgery (22-24 June 2004, The Hague, The Netherlands). – 2004. - P. 39-40.

Поступила в редакцію 05.02.07.

© А.И. Кизим, И.А. Сребняк, 2007

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ТРИПСИНО-ПОДІБНИХ ПРОТЕЇНАЗ І КАЛІКРЕЇНУ В ХОЛЕСТЕАТОМІ ТА ПЕРИФОКАЛЬНИХ ТКАНИНАХ СЕРЕДЬОГО ВУХА У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГНІЙНИЙ СЕРЕДНІЙ ОТИТ

Кизим О.Й., Сребняк І.А. (Київ)

Резюме

Порівняльне біохімічне дослідження трипсиноподібних протеїназ (ТПП) і калікреїну в перифокальних тканинах середнього вуха виявило більш високу активність цих ферментів в слизовій оболонці та кістковій тканині у хворих на хронічний гнійний середній отит (ХГСО) з холестеатомою, ніж у пацієнтів з ХГСО без холестеатоми. Визначено залежність агресивності холестеатомного процесу від активності ТПП і калікреїну в холестеатомному матриксі та кістковій тканині. Обговорюється роль досліджуваних протеїназ в біохімічних механізмах деструкції кісткових структур середнього вуха у хворих на ХГСО з холестеатомою.

STUDY OF TRYPSIN-LIKE PROTEINASE AND KALLIKREIN ACTIVITY IN CHOLESTEATOMA, PERIFOCAL MIDDLE EAR TISSUES IN PATIENTS WITH CHRONIC OTITIS MEDIA

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

Resumé

The comparative biochemical study of trypsin-like proteinase (TLP) and kallikrein in perifocal middle ear tissues demonstrated the higher activity of these enzymes in middle ear mucosa and adjacent bone in patients with cholesteatoma and without it. The dependence of the aggressive cholesteatoma process on the TLP and kallikrein activity in the cholesteatoma matrix and bone tissues was established. The role of these proteinases in the biochemical bone destruction mechanisms in patients with middle ear cholesteatoma is discussed.