

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-006.446.2
©Коллектив авторов

ЦИСТАТИНЫ: РЕГУЛЯЦИЯ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ И НАРУШЕНИЯ ПРИ ОПУХОЛЕВЫХ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Т.А. Короленко^{1}, Т.Г. Филатова¹, М.С. Черканова²,
Т.А. Халикова¹, И.Ю. Бравве²*

¹Государственное учреждение Научно-исследовательский институт физиологии
СО РАМН, Новосибирск, 630117, ул. Тимакова, 4;
эл. почта: T.A.Korolenko@iph.ma.nsc.ru

²Областной кардиологический диспансер 1, Новосибирск, 630099, Новосибирск-99

Цистатин С принадлежит к наиболее широко распространённым эндогенным внеклеточным ингибиторам цистеиновых протеаз, биологические функции которого находятся в стадии изучения. Методом иммуноферментного анализа нами показано, что концентрация цистатина С наиболее высокая в спинномозговой жидкости человека, значительно более низкий уровень этого ингибитора обнаружен в моче. В сыворотке крови практически здоровых людей молодого возраста концентрация цистатина С ниже чем у лиц 50-65 лет. У больных с гемобластозами (лимфома, лимфогранулематоз) повышенные значения цистатина С нормализовались после проведения противоопухолевой терапии, что указывает на прогностическое значение определения показателя у больных с отдельными видами гемобластозов.

Ключевые слова: цистатины, цистеиновые протеазы, опухоли, атеросклероз.

ВВЕДЕНИЕ. Цистатины – новая, относительно недавно открытая группа эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз, биологическая роль которых интенсивно исследуется в течение последних 20 лет. Цистатин С – низкомолекулярный белок, обнаруженный в различных типах клеток (макрофагах, гепатоцитах и др.), является наиболее эффективным эндогенным ингибитором цистеиновых протеаз – катепсинов В, L, Н, S и К [1-5]. Основная функция цистатина С, более изученного по сравнению с другими цистатинами, – регуляция активности цистеиновых протеаз [6-11]. Согласно современной классификации цистатинов (схема) цистатин С вместе с цистатинами D, S, SA, SN относится ко второму типу семейства цистатинов [2]. В настоящее время изучается биологическая роль этого ингибитора в норме и при ряде заболеваний человека [12-18]. Для выявления ранних нарушений функции почек предложено использовать уровень сывороточной концентрации цистатина С в качестве нового показателя скорости клубочковой фильтрации [2]. Все возрастающее число работ посвящено исследованию цистатина С как возможного маркера ряда опухолей человека [18-22], предиктора атеросклероза – воспалительного процесса, сопровождаемого в месте формирования бляшки активацией макрофагов с внеклеточной секрецией цистатина С [23-25].

* – адресат для переписки

(а) Цистатины с единичным доменом

Тип 1	Тип 2	
Цистатин А (стефин)	Цистатин С	Цистатин Е
Цистатин В	Цистатин D	Цистатин F
	Цистатин S	
	Цистатин SN	Цистатин G (CRES)
	Цистатин SA	Цистатин H

(b) Комплексные типы (тип 3)

Содержат несколько доменов цистатина (2 типа)

Низкомолекулярный кининоген (L- kg)

Высокомолекулярный кининоген (H- kg)

Фетуин

Альфа₂ HS гликопротеин

Богатый гистидином гликопротеин

Схема.

Семейство цистатинов. Цистатины включают суперсемейство белковых ингибиторов цистеиновых протеаз – катепсинов В, L, Н, S и К, основная функция которых заключается в обеспечении защиты клеток и тканей от повреждающего действия протеолитических ферментов – лизосомных протеаз (пептидаз), освобождающихся во внешнюю среду при гибели отдельных клеток в физиологических условиях или в условиях патологии, при секреции протеаз опухолевыми клетками в процессе инвазии или метастазирования опухолей [3, 5].

Термин “цистатин” предложен Barrett для обозначения гомологичных белков одного и того же суперсемейства [1]. Современная классификация цистатинов представлена на схеме. На основании гомологии аминокислотного состава (сходство более 50%) у млекопитающих выделено три основных *типа* семейства цистатинов. Среди цистатинов *с единичным доменом (а)* – цистатин А (стефин) и цистатин В, относят к первому типу; цистатины второго типа – цистатин С (наиболее изученный в настоящее время) и относительно недавно открытые цистатины D, S, SN, SA, E, F, G, H. *Комплексные цистатины (b)* (третьего типа) содержат несколько доменов цистатинов второго типа, в данную группу включены низкомолекулярный и высокомолекулярный кининоген, фетуин и некоторые гликопротеины.

Цистатин С – преимущественно внеклеточный (и частично цитоплазматический) низкомолекулярный белок, эффективный эндогенный ингибитор цистеиновых протеаз, относящийся ко второму типу семейства цистатинов [2]. Его молекулярная масса составляет 13343–13359 Да, он кодируется геном CST3, мутации которого связаны с развитием у человека ряда врождённых заболеваний [2]. Ген цистатина С относится к генам “домашнего хозяйства”, поэтому содержащее ядро клетки с постоянной скоростью синтезируют цистатин С [1, 2].

Клеточные *функции* цистатина С исследованы недостаточно, и являются предметом интенсивного изучения. Известно, что цистатин С участвует в регуляции деградации белков внеклеточного матрикса, процессинге и презентации антигена, процессов клеточной дифференцировки и пролиферации, старения [2].

У мышей, нокаутированных по гену цистатина С, однако, не обнаружено выраженных изменений, в том числе сосудистых нарушений, ожидаемых и характерных для атеросклероза [4, 8].

Ингибиторы цистеиновых протеаз в клинической медицине. Цистатин С, локализованный преимущественно вне клетки, обнаружен многими, в том числе и нами, во всех биологических жидкостях у человека (рис. 1). Наиболее высокая концентрация цистатина С отмечена в спинномозговой жидкости, менее значительная - в сыворотке крови (рис. 1) и существенно более низкая – в моче и других биологических жидкостях (слезах, ротовой жидкости, молоке) [1]. Последние годы уровень цистатина С сыворотки крови используют для определения скорости клубочковой фильтрации [16], причем оценка цистатина С находит все более широкое применение по сравнению с определением креатинина в сыворотке крови. В нормально функционирующей почке человека и млекопитающих белки с небольшой молекулярной массой полностью реабсорбируются и подвергаются деградации в клетках (лизосомах) проксимальных канальцев. С учетом того, что цистатин С постоянно синтезируется в клетках, выбор этого показателя в сыворотке крови можно считать наиболее оптимальным при оценке скорости клубочковой фильтрации для рутинной лабораторной диагностики. Для определения цистатина С в биологических жидкостях человека кроме методов иммуноферментного анализа разработаны достаточно быстрые и менее дорогостоящие имунотурбидиметрические и имунонефелометрические методы, позволяющие проводить оценку уровня цистатина С в большом количестве проб. Следует отметить, однако, что использование метода ИФА обеспечивает большую специфичность, точность и надежность определений.

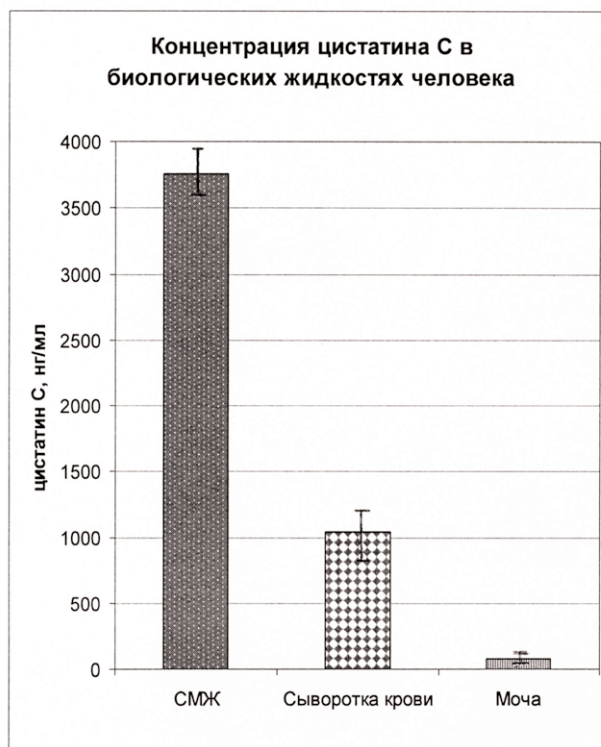


Рисунок 1.

Концентрация цистатина С в биологических жидкостях человека (нг/мл). Биологические жидкости: СМЖ – спинномозговая жидкость пациентов невоспалительными заболеваниями ЦНС (10), сыворотка крови (30) и моча (15 образцов) практически здоровых лиц 20-40 лет. Концентрацию цистатина С определяли методом ИФА с помощью коммерческих наборов для цистатина С человека (BioVendor, Чехия).

МЕТОДИКА. Концентрацию цистатина С в биологических образцах оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов BioVendor (Чехия) и КРКА (Словения) для ИФА анализа цистатина С человека. Данные наборы предназначены для определения концентрации цистатина С в биологических жидкостях человека. Применение наборов ИФА специфично для цистатина С и позволяет исключить перекрестную реакцию с другими цистатинами человека (цистатин А, цистатин F и др.). Определение интенсивности окраски проводили при 540 нм с помощью планшетного ридера Multiscan EX (ThermoLabSystems, США); результаты выражали в нг/мл биологического образца (в отдельных определениях - в нмоль на л).

Сыворотку крови получали при центрифугировании образцов крови при 3000 g при +4°C в течение 20 мин (центрифуга Eppendorf 5415 R). Мочу (средняя порция утренней мочи) получали у практически здоровых лиц, спинномозговую жидкость - у пациентов после диагностической пункции и исключения воспалительных и опухолевых заболеваний нервной системы (клиника ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск, при наличии письменного информированного согласия пациентов и одобрения этического комитета). Пробы хранили при -20°C не более одного месяца и исследовали после однократного размораживания.

Были исследованы две группы пациентов. В первую группу вошли практически здоровые люди (20-40 и 45-65 лет), а также больные, прошедшие операцию коронарного шунтирования (Областной кардиологический диспансер, Новосибирск). У всех испытуемых анализировали сыворотку крови и мочу, и не обнаружили изменений уровня креатинина сыворотки крови и нарушений клубочковой фильтрации.

Во второй группе исследовали сыворотку крови 83 пациентов Городского гематологического центра г. Новосибирска: 55 больных неходжкинской злокачественной лимфомой (НХЛ); 18 - лимфогранулематозом (ЛГМ) и 10 пациентов - с острым лейкозом (ОЛ). Средний возраст больных составил $54,7 \pm 2,19$ лет (16-83 лет). Группу контроля составили 28 клинически здоровых доноров из отделения переливания крови Городской клинической больницы №1. Средний возраст доноров был $34,4 \pm 1,42$ лет.

Кровь для исследования забирали у больных до начала лечения. Повторное исследование проводили у пациентов с НХЛ и ЛГМ после проведения 4-6 курсов полихимиотерапии и у пациентов с ОЛ при достижении полной клинико-гематологической ремиссии. Кровь забирали из локтевой вены, центрифугировали, полученную сыворотку хранили до исследования при температуре -20°C.

Результаты обрабатывали методом параллельных рядов вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента. За достоверные принимали различия сравниваемых средних при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Нами показано, что концентрация цистатина С в сыворотке крови практически здоровых лиц в возрасте 20-45 лет составляла $991,1 \pm 163,1$ нг/мл, что соответствовало литературным данным (570-1790 нг/мл) [11, 12]. Концентрация цистатина С в спинномозговой жидкости пациентов с невоспалительными заболеваниями ЦНС выше данных сыворотки крови почти в 4 раза (рис 1). В моче по сравнению с сывороткой крови обнаружена низкая концентрация цистатина С (рис. 1).

Цистатин С и опухоли. В сыворотке крови больных с гемобластозами (кроме острого лейкоза) отмечено повышение концентрации цистатина С, с тенденцией к нормализации этого показателя после эффективного противоопухолевого лечения (рис. 2).

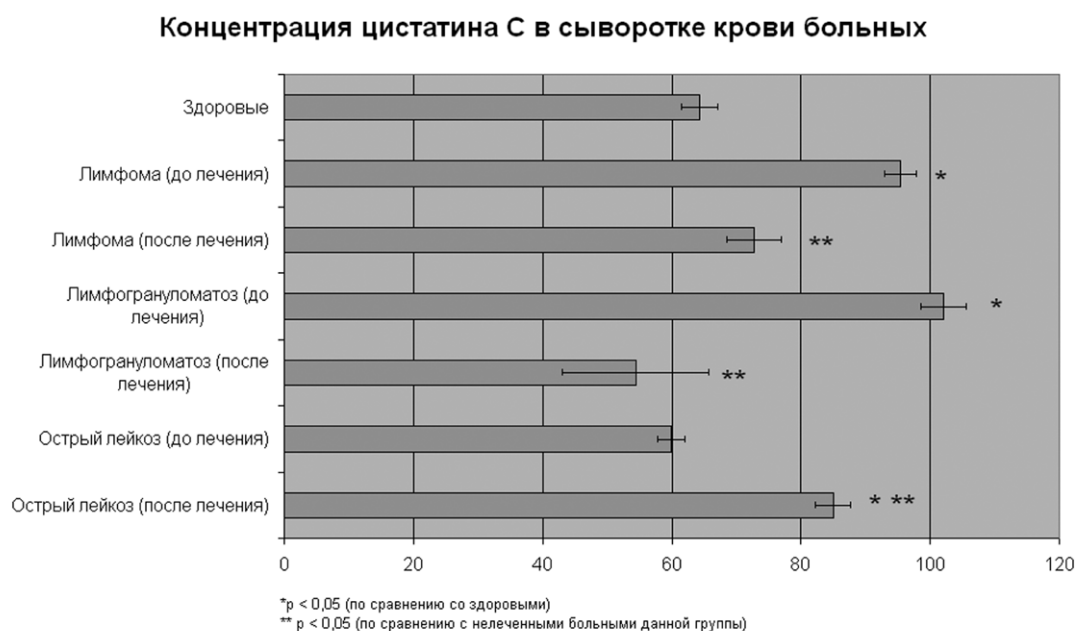


Рисунок 2.

Концентрация цистатина С в сыворотке крови больных с гемобластозами (нмоль/л). Концентрацию цистатина С определяли методом ИФА с помощью коммерческих наборов для цистатина С человека (КРКА, Словения). * p < 0,05 по сравнению со здоровыми; ** p < 0,05 по сравнению с нелеченными больными данной группы.

Концентрация цистатина С (а также цистатина А и цистатина В) в сыворотке крови является прогностическим признаком при ряде опухолей человека, например, при раке прямой кишки, неходжкинской В-клеточной лимфоме [18-21]. В сыворотке крови больных с неходжкинской злокачественной лимфомой и лимфогранулематозом нами обнаружено повышение концентрации цистатина С, коррелирующее с тяжестью течения заболевания (рис. 2). При опухолях молочной железы человека отмечены изменения экспрессии, активности и концентрации цистатина С локально в ткани опухоли, а также его концентрации в сыворотке крови, изменения которой, однако, не всегда соответствуют локальным изменениям его концентрации и экспрессии [15]. Последнее несколько ограничивает перспективы использования сывороточного цистатина С как маркера отдельных опухолей человека.

В эксперименте с использованием различных опухолей мышей (лимфосаркома LS, аденокарцинома легких Льюис, HA-1 гепатома) нами обнаружено резкое снижение концентрации цистатина С в ткани опухолей, а также в меньшей степени – в сыворотке крови этих животных [17-21]. Уровень цистатина С в опухоли (и частично - в сыворотке крови) восстанавливался почти до нормальных значений после успешной противоопухолевой терапии (циклофосфаном изолированно или в комбинации с иммуномодуляторами β-гликанами) [17-21]. Аналогичные, но менее выраженные изменения цистатина С отмечены также в ткани печени и селезенки – органах, в которых не происходил опухолевый рост (последствия опухоленосительства) [17-21]. Резкое снижение уровня цистатина С в исследованных опухолях мышей, а также в сыворотке крови, очевидно, отражает общебиологическую закономерность развития опухолей мышей и может быть следствием повышенного расхода ингибитора в клетках опухоли. Вопрос об отсутствии аналогичных нарушений в тканях опухолей человека остаётся неясным и требует дальнейшего изучения.

ЦИСТАТИНЫ: РЕГУЛЯЦИЯ ПРОТЕАЗ В НОРМЕ И ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗЕ

Значительное повышение концентрации цистатина С сыворотки показано как при циррозе печени, так и при гепатоцеллюлярной карциноме [1, 2]. Следовательно, по повышению уровню цистатина С сыворотки крови не удаётся дифференцировать цирроз печени от гепатоцеллюлярной карциномы. Нарушения компонентов внеклеточного матрикса отмечены при развитии фиброза печени и, очевидно, отдельные показатели, в том числе цистатины, могут быть маркерами этого процесса [1].

Цистатин С как маркер воспаления и нарушения при атеросклерозе. По сравнению с показателями у практически здоровых людей среднего возраста (20–40 лет) нами обнаружено повышение концентрации цистатина С у пациентов 50–65 лет без клинических проявлений ишемической болезни сердца как раннего проявления риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (таблица), что подтверждается некоторыми исследователями [8, 23]. На всех сроках после операции коронарного шунтирования (КШ) (кроме периода непосредственно после КШ) концентрация цистатина С повышена по сравнению с данными здоровых лиц молодого возраста (таблица).

Таблица. Концентрация цистатина С в сыворотке крови пациентов 50–65 лет и в течение первых 3 сут. после операции коронарного шунтирования (КШ).

Группы, число обследованных	Концентрация цистатина С в сыворотке крови, нг/мл	
Практически здоровые, 20 – 45 лет, n = 26	846,0 ± 124, 1	
Пациенты 50– 65 лет, n = 15	1704,5±235,0	p<0,05
Пациенты 50 – 65 лет, коронарное шунтирование (КШ):		
До КШ, n = 24	1729,8±269,0	p<0,05
Непосредственно после КШ, n = 23	1084,75±304,3	
2 сут. после КШ, n = 24	1407,2±256,2	p<0,05
3 сут. после КШ, n = 24	1494,9±260,5	p<0,05

Примечание: сравнение с группой практически здоровых лиц 20–45 лет.

Лизосомные цистеиновые протеазы наряду с сериновыми протеазами и ММП вовлечены в патогенез атеросклероза [8]. Известно также, что идицибельные катепсины S, K, C, V и W являются теми цистеиновыми протеазами, которые функционируют и вне лизосомного компартмента [2-4]. У человека при атеросклерозе и у мышей с дефицитом ApoE (известная модель атеросклероза) отмечена резко повышенная экспрессия эластолитических и коллагенолитических катепсинов S и K при сниженной экспрессии их эндогенного ингибитора – цистатина С [8].

При атеросклеротическом поражении сосудов человека в бляшке обнаружена повышенная экспрессия эластолитических протеаз, катепсинов S и K, а в местах повреждения эластина артерий отмечено снижение уровня эндогенных ингибиторов, прежде всего цистатина C, что приводит к усиленной деградации стенки артерий [8, 23]. Экспериментальные данные в пользу гипотезы о дефиците цистатина C в месте формирования повреждения сосудов были получены на мышах, дефицитных по цистатину C, скрещенных с мышами, дефицитными по аполипопротеину E, у которых при содержании на атерогенной диете отмечена фрагментация эластической стенки сосудов, расширение торакальной и абдоминальной аорты. Таким образом, продемонстрирована важность нарушения соотношения цистеиновых протеаз и их ингибиторов в повреждении структуры стенки артерий и ремоделировании внеклеточного матрикса при экспериментальном атеросклерозе.

Цистатин C является наиболее эффективным эндогенным ингибитором катепсинов S, K и L, обладающих также эластазной и коллагеназной активностью [2, 8]. В местах формирования атеросклеротической бляшки и при аневризме аорты на фоне резкого увеличения экспрессии катепсинов S и K, обнаружено выраженное снижение экспрессии ингибитора протеаз в макрофагах и гладкомышечных клетках при весьма умеренных изменениях тканевого ингибитора металлопротеаз первого типа (ТИМП-1). Мыши с изолированным дефицитом цистатина C не обнаруживали явных нарушений экспрессии ТИМП-1, а наиболее значимые изменения сосудов происходили при двойном нокаутинге по генам цистатина C и Apo E, при содержании животных на атерогенной диете. Эти результаты позволяют заключить, что нарушения экспрессии цистатина C могут иметь важное значение в формировании атеросклероза.

Нарушения концентрации цистатина C в различных биологических жидкостях человека (кроме сыворотки крови) последние годы связывают с заболеваниями нервной системы (ишемический инсульт, болезнь Кройцфельда-Якоба), органов зрения [2] и другими заболеваниями, где диагностическое и прогностическое значение цистатина C находится в стадии изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. У пациентов старшего возраста (45-55 лет), а также при атеросклерозе обнаружено увеличение концентрации цистатина C в сыворотке крови, возможно, как следствие внеклеточной секреции цистатина C (при стимуляции макрофагов). Повышенная концентрация цистатина C сыворотки крови при гемобластозах человека нормализуется после эффективной терапии, что может быть использовано как показатель эффективности противоопухолевого лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abrahamson M., Alvares-Fernandez M., Nathanson C.-M. (2003) Biochem. Soc. Symp., **70**, 179-199.
2. Keppler D. (2006) Cancer Letters, **235**, 159-176.
3. Turk B., Turk D., Salvesen G.S. (2002) Curr. Pharm. Des., **8**, 1623-1637.
4. Shi G.-P., Sukhova G.K., Grubb A. et al. (1999) J. Clin. Invest., **104**(9), 1191-1197.
5. Stoka V., Turk B., Turk V. (2005) Life, **57**(4/5), 347-353.
6. Bengtsson E., To F., Grubb A. et al. (2005) Atherosclerosis, **180**, 45-53.
7. Bokenkamp A., Herget-Rosenthal S., Bokenkamp R. (2006) Pediatric Nephrology, **10**, 11-48.
8. Sukhova G.K., Wang B., Libby P. et al. (2005) Circ. Res., **96**(3), 368-375.
9. Sarnak M.J., Katz R., Stehman-Breen C., Fried L.F., Jenny N.S., Psaty B.M., Newman A.B., Siscovick D., Shlipak M.G. (2005) Ann. Intern. Med., **142**(7), 497-505.
10. Pinon P., Kaski J.C. (2006) Rev. Esp. Cardiol., **59**(3), 247-258.
11. Filler G., Bokenkamp A., Hofmann W. et al. (2006) Clin. Biochem., **38**, 1-8.

ЦИСТАТИНЫ: РЕГУЛЯЦИЯ ПРОТЕАЗ В НОРМЕ И ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗЕ

12. *Ix J.H., Shlipak M.G., Chertow G.M., Whooley M.A.* (2007) *Circulation*, **115**(2), 173-179.
13. *Heilman R., Mazur M.J.* (2005) *Liver Transplantation*, **11**(3), 264-266.
14. *Mares J., Stejskal D., Vavrouskova J. et al.* (2003) *Biomed. Papers*, **147**(2), 177-180.
15. *Kos J., Krasovec M., Cimerman N., Nielsen H.J., Christensen I.J., Brunner N.* (2000) *Clin. Cancer Res.*, **6**, 505-511.
16. *Mulaomerovic A., Halilbasic A., Cickusic E., Zavasnik-Bergant T., Begic L., Kos J.* (2007) *Cancer Letters*, **248**(2), 192-197.
17. *Короленко Т.А., Жанаева С.Я., Потеряева О.Н., Фаламеева О.В., Левина О.А., Каледин В.И., Шандула Й.* (2002) *Бюлл. exper. биол. мед.*, **133**, 452-455.
18. *Потеряева О.Н., Поляков Л.М., Короленко Т.А., Зуева Т.В., Русских Г.С., Панин Л.Е.* (2004) *Биохимия*, **69**, 295-298.
19. *Korolenko T.A., Poteryaeva O.N., Djanaeva S.Ya., Svechnikova I.G., Kaledin V.I., Timofeeva O.A., Filipenko M.L., Nowicky J.* (2000) *Drugs Exper. Clin. Res.*, **25**(5/6), 285-292.
20. *Korolenko T.A., Falameyeva O.V., Poteryaeva O.N., Zhanaeva S.Ya., Levina O.A., Nowicky J.M.* (2003) *Int. J. Immunother.*, **19**, 151-157.
21. *Khalikova T.A., Zhanaeva S.Ya., Korolenko T.A., Kaledin V.I., Kogan G.* (2005) *Cancer Letters*, **223**(1), 77-83.
22. *Ognibene A., Manucci E., Caldini A., Terreni A., Brogi M., Bardini G., Sposato I., Mosconi V., Salvadori B., Rotella C.M., Messeri G.* (2006) *Clin. Biochem.*, **29**, 658-661.
23. *Bengtsson E., To F., Hakansson K., Grubb A., Branen L., Nilsson J., Jovinge S.* (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**(10), 2151-2156.
24. *Larsson A., Helmersson J., Hansson L.-O., Basu S.* (2005) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **65**, 301-306.
25. *Joyce J.A., Baruch A., Chehade K., Meyer-Morse N., Giraudo E., Tsai F.Y., Greenbaum D.C., Hager J.H., Bogoy M., Hanahan D.* (2004) *Cancer Cells*, **5**, 443-453.

Поступила: 30. 06. 2007.

CYSTATINS: CYSTEINE PROTEASES REGULATION AND DISTURBANCES IN TUMORS AND INFLAMMATION

T.A. Korolenko¹, T.G. Filatova¹, M.S. Cherkanova², T.A. Khalikova¹, I.Yu. Bravve²

¹Institute of Physiology Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Timakova ul., 4, Novosibirsk, 630117 Russia

²Novosibirsk Regional Cardiology Unit, Novosibirsk, 630099 Russia;
e-mail: T.A.Korolenko@iph.ma.nsc.ru

Cystatin C belongs to the group of wide spread extracellular cysteine protease inhibitors. Using ELISA kits it was shown that the highest cystatin C concentration was in human cerebrospinal fluid and low cystatin C concentration was in human urine. In healthy young persons serum cystatin C concentration was lower than in elder patients (50-65 year old). In patients with hemoblastoses (lymphoma, lymphogranulomatosis) increased serum cystatin C concentration was normalized after effective antitumor therapy. According to these data one can conclude that serum cystatin C concentration can be used as one of the prognostic criteria in patients with several kinds of hemoblastoses.

Key words: cysatins, cysteine proteases, tumors, atherosclerosis.