

УДК 612.7+614.7

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ И КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КАРНИТИНА И РЕГУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

© *Арапова А.И., Фомина М.А.*

Кафедра биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования (ФДПО) Рязанского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Рязань

E-mail: Asiaarapova@mail.ru

Изучено изолированное и сочетанное влияние регуляторов синтеза оксида азота (L-NAME 25 и 200 мг/кг, L-аргинина 500 мг/кг) и карнитина 300 мг/кг на компартментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ В, L, Н. Получено, что L-NAME в дозе 25 мг/кг приводит к снижению общей активности катепсинов L и Н за счёт лизосомальной фракции. Увеличение дозы L-NAME до 200 мг/кг приводит к нарастанию активности в цитозольной фракции относительно L-NAME 25 мг/кг. При введении L-NAME в дозе 25 мг/кг на фоне L-аргинина наблюдалась коррекция эффекта ингибитора синтеза оксида азота. Группа карнитина демонстрирует рост активности катепсинов L, Н в цитоплазматической фракции, также отмечен рост лизосомальной и общей активностей катепсина В. В модели сочетанного воздействия карнитина и L-NAME отмечается снижение цитозольной фракции относительно карнитина и карнитина с аргинином. Произведена оценка проницаемости мембран лизосом с использованием показателя коэффициента лабильности; обнаружено его повышение для катепсинов В, L, Н и кислой фосфатазы во всех группах, кроме изолированного введения L-аргинина.

Ключевые слова: активность катепсина В, активность катепсина L, активность катепсина Н, L-NAME, L-аргинин, карнитин, коэффициент лабильности мембран.

CHANGE IN ACTIVITY AND COMPARTMENTALIZATION OF LYSOSOMAL CYSTEINE PROTEINASES OF CARDIAC MUSCLE SUBJECTED TO CARNITINE ACTION AND REGULATORS OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS

Arapova A.I., Fomina M.A.

Department of Biological Chemistry with Course of Clinical Laboratory Diagnostics of Faculty of Additional Professional Education of Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan

The effect of isolated and combined regulators of nitric oxide synthesis (L-NAME 25 and 200 mg / kg, L-arginine 500 mg / kg) and carnitine 300 mg / kg on compartmentalization of lysosomal cysteine proteinase B, L, and N was studied. It was found that 25 mg / kg L-NAME resulted in a decrease in the total activity of cathepsins L and H due to lysosomal fraction. Increasing the dose of L-NAME up to 200 mg / kg causes the increased activity of the cytosolic fraction with respect to L-NAME 25 mg / kg. Administration of 25 mg / kg L-NAME against the background of L-arginine contributes to a correction effect of the inhibitor of nitric oxide synthesis. Carnitine group demonstrates the increased activity of cathepsin L, H in the cytoplasmic fraction, the increase in the overall activity and lysosomal cathepsin B is also marked. The model of the combined effects of carnitine and L-NAME reveals the decrease in cytosolic fraction as regards carnitine and carnitine with arginine. The lysosomal membrane permeability was assessed using the coefficient lability index. Its increase in cathepsins B, L, H, and the acid phosphatase was shown in all groups except the isolated administration of L-arginine.

Keywords: activity of cathepsin B, activity of cathepsin L, activity of cathepsin H, L-NAME, L-arginine, carnitine, coefficient of membrane lability.

Компартментализация, то есть разграничение метаболизма в пространственно разделённых мембраной участках (компартаментах) клетки, играет важную роль в регуляции внутриклеточного обмена [5].

Апоптоз – один из наиболее изученных типов программируемой клеточной гибели, который в настоящее время рассматривается в качестве потенциального патогенетического фактора различных сердечно-сосудистых патологий. Морфологические признаки апоптоза обнаружены как в сосудах, так и в миокарде в ответ на влияние гипоксии, окислительного

стресса, реперфузии при ишемии миокарда, постинфарктных изменений и на развитие сердечной недостаточности [12].

Запрограммированная клеточная смерть часто классифицируется на два типа, где тип I – это каспазо-зависимая форма (классический апоптоз) и II тип (аутофагия). Процесс аутофагии происходит в лизосомах [15], где под воздействием ферментов происходит деградация различных компонентов клетки [19]. Кроме того, известен также механизм активации апоптоза при высвобождении лизосомальных протеаз – катепсинов [4].

Долгое время считалось, что лизосомы являются устойчивыми компартментами клетки и выход гидролитических ферментов за их пределы происходит только во время апоптоза или некроза [12]. Однако данные последних исследований доказали высокую чувствительность этих органелл к дестабилизирующим факторам. На сегодняшний день достаточно подробно описан процесс пермеабилзации лизосомальной мембраны, даже при отсутствии нарушений её структуры, который сопровождается высвобождением в цитозоль катепсинов [10].

Регуляция апоптоза и участие в функционировании сердечно-сосудистой системы – это одна из важнейших физиологических функций оксида азота (NO). Данные литературы в настоящее время достаточно подробно описывают модулирующее дозозависимое влияние на апоптоз NO в культурах различных клеток и типах тканей. В результате влияния на образование оксида азота через его регуляторы было выяснено, что в высоких концентрациях NO оказывает цитотоксическое действие, а низкие концентрации ингибируют апоптоз [11]. Помимо этого, NO может активировать процессы внутри клеток, в результате которых ферменты из малоактивной растворимой формы переходят в более активную мембраносвязанную [2].

Исключительный интерес вызывает способность L-карнитина предотвращать индукцию апоптоза [17]. Применение L-карнитина сопровождается снижением как в тканях, так и в крови концентрации маркеров воспаления, к которым относятся, в том числе, и лизосомальные цистеиновые протеиназы [20].

Поэтому актуальным представляется изучение эффектов ингибитора и субстрата синтеза оксида азота (L-NAME, L – аргинина), а также карнитина на активность катепсинов B, L, H и состояние лизосомальной мембраны в ткани миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 80 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280-320 граммов. Животные содержались по 3-4 особи одного пола в металлических клетках площадью 24 дм² при естественном освещении, получали воду и полноценный сухой комбикорм для лабораторных животных «Чара» (производство ЗАО «Ассортимент – Агро», Московская область, Сергиев-Посадский район, д. Тураково). Приготовление кормов для животных, расчёт рациона осуществляли сотрудники вивария в соответствии с

установленными нормами. Содержание животных в виварии соответствовало «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993 г. Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли в соответствии с правилами, изложенными Международным Советом медицинских научных обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.) и приказе МЗРФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Для стандартизации условий опытов животных лишали пищи за 12 часов до забоя. Эвтаназия животных осуществлялась методом обескровливания под эфирным рауш-наркозом при сохранённом дыхании и сердцебиении. Немедленно после обескровливания и извлечения сердце крысы помещали в 0,25 М раствор сахарозы. Далее следовало взвешивание левого желудочка сердца, очищенного от соединительной и жировой ткани и сгустков крови, на электронных весах (АН-220 СЕ, Япония) и гомогенизация с помощью аппарата «Potter S» (Sartorius, Германия) в охлаждённом 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1/10 в течение 60 секунд при скорости вращения тefлонового пестика 1500 об/мин и зазоре в пределах 0,16-0,24 мм. Описанные процедуры проводили при температуре не выше 4⁰С.

Оценка качества гомогената осуществлялась путем морфологического контроля с помощью окраски мазков по Романовскому-Гимзе с подсчётом на предметном стекле числа неразрушенных клеток на 1000 освобождённых ядер [7]. Число неразрушенных клеток в гомогенате не превышало 1-2%.

Гомогенаты центрифугировались в течение 10 мин при 800 g (центрифуга СМ-6М ЕЛМ1, Латвия) для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость отбирали пипеткой в отдельные пробирки и центрифугировали 15 мин при 14000 g для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант – дополнительно при 20000 g в течение 30 мин (центрифуга рефрижераторная К 24 Д, ГДР) для получения чистой цитоплазматической (неседиментируемой) фракции. Осадок, представляющий собой грубую фракцию лизосом (седиментируемая фракция), ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона Х-100 в конечной концентрации 0,1%.

Экспериментальная группа № 1: осуществляли внутрибрюшинное введение

неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME, «Sigma», США) в дозе 25 мг/кг [8] в виде водного раствора через переднюю брюшную стенку одноразовым пластиковым шприцем с тонкой короткой иглой. Объем вводимого препарата зависел от массы животного: 0,5 мл на 200 граммов животной массы. Препарат вводился 1 раз в сутки в утренние часы ежедневно в течение 7 дней. Выведение из эксперимента осуществлялось на 8-е сутки.

Экспериментальная группа № 2: осуществляли путём внутрижелудочного введения раствора L-аргинина («Sigma», США) на 0,9% растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [8] через стеклянный градуированный шприц с внутрижелудочным зондом. Объем вводимого раствора зависел от массы и не превышал 1 мл. Препарат вводили 1 раз в сутки до утреннего кормления ежедневно в течение 10 дней. Выведение из эксперимента осуществляли на 11-е сутки.

Экспериментальная группа № 3: осуществляли внутрибрюшинное введение L-NAME в указанных дозах с 3-и по 10-е сутки на фоне перорального введения L-аргинина. Животных выводили из эксперимента на 11-е сутки.

Экспериментальная группа № 4: карнитина хлорид (производство ФГУ «РКНПК» Минздрава России) вводили в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно. Препарат вводили 1 раз в сутки до утреннего кормления ежедневно в течение 21 дня. Выведение из эксперимента осуществляли на 22-е сутки.

Экспериментальная группа № 5: осуществляли введение карнитина хлорида (производство ФГУ «РКНПК» Минздрава России) в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно в течение 21 дня, одновременно осуществляя внутрибрюшинное введение L-NAME в указанных дозах с 14-е по 21-е сутки. Животных выводили из эксперимента на 22-е сутки.

Экспериментальная группа № 6: осуществляли внутрибрюшинное введение карнитина хлорида (производство ФГУ «РКНПК» Минздрава России) в дозе 300 мг/кг в течение 21 дня; одновременно осуществляли внутрижелудочное введение раствора L-аргинина («Sigma», США) на 0,9% растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [3] через стеклянный градуированный шприц с внутрижелудочным зондом с 11-е по 21-е сутки. Животных выводили из эксперимента на 22-е сутки.

Экспериментальная группа № 7: осуществляли внутрибрюшинное введение неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-

L-аргининметилового эфира (L-NAME, «Sigma», США) в дозе 200 мг/кг [21] в виде водного раствора через переднюю брюшную стенку одноразовым пластиковым шприцем с тонкой короткой иглой. Объем вводимого препарата зависел от массы животного: 0,5 мл на 200 граммов животной массы. Препарат вводился 1 раз в сутки в утренние часы ежедневно в течение 7 дней. Выведение из эксперимента осуществляли на 8-е сутки.

Контрольные группы формировались для каждой серии эксперимента из животных, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями. Животным контрольной группы осуществляли введение физиологического раствора, при этом вариант введения, объёмы раствора и продолжительность воздействия совпадают с таковыми для экспериментальной группы.

Активность кислых гидролаз в седиментируемой и неседиментируемой фракциях определяли отдельно и обозначали как соответственно седиментируемую и неседиментируемую активность (СА и НСА). Общую активность (ОА) рассчитывали как сумму СА и НСА. Активность катепсинов В, L, Н (KB, KL и KH) изучалась спектрофлуориметрическим методом [13].

Коэффициент лабильности (К лаб, %) представляет собой процентное отношение НСА к ОА, характеризует проницаемость лизосомальной мембраны, для данного фермента, отражая компартментализацию лизосомальных гидролаз.

Статистический анализ результатов исследования проведён согласно руководствам по медицинской статистике, с использованием программы «Microsoft Office Excel 2010» и «Statistica 10.0». Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Поскольку отмечалось отсутствие согласия большинства данных с нормальным распределением, вычисляли характеристики: медиану (Me), минимальное (min) и максимальное (max) значение, результаты представляли в формате Me [min; max], для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментальных моделях с применением субстрата (L-аргинин) и ингибитора (L-NAME) синтеза оксида азота (табл. 1) обнаружено, что изолированное применение

L-аргинина не вызывает статистически значимых изменений изучаемых показателей. При этом введение L-NAME в дозе 25 мг/кг приводит к снижению общей активности катепсинов L и H относительно данных контрольной группы за счёт лизосомальной фракции. В более ранних работах уже были получены сходные данные [1]. Увеличение дозы L-NAME до 200 мг/кг приводит к нарастанию активности изучаемых протеиназ в цитозольной фракции относительно группы с введением L-NAME в дозе 25 мг/кг, что может свидетельствовать о дестабилизации лизосомальных мембран в условиях дефицита синтеза оксида азота.

При введении L-NAME в дозе 25 мг/кг на фоне L-аргинина наблюдалась некоторая коррекция эффекта ингибитора синтеза оксида азота, проявляющаяся как статистически значимые изменения активности всех изучаемых катепсинов в цитозольной фракции по сравнению

с изолированным действием L-NAME в дозе 25 мг/кг. Однако сохранение статистически значимых отличий показателей от группы, получавшей изолированно L-аргинин, заставляют предположить, что доза L-аргинина оказалась недостаточна для полной разблокировки NO-синтазы и коррекции эффекта L-NAME. Возможно, дальнейшее увеличение дозы L-аргинина приведёт к полному отсутствию эффекта L-NAME в сочетанной группе, однако это требует дальнейших исследований.

Показатели на фоне введения карнитина (табл. 2) демонстрируют увеличение активности всех изучаемых катепсинов в цитоплазматической фракции гомогената по сравнению с группой контроля. Одновременно значимые отличия нарастания демонстрирует активность катепсина В в лизосомальной фракции с нарастанием общей активности.

Таблица 1

Активность катепсинов В, L и H в цитозольной и лизосомальной фракциях гомогенатов сердечной мышцы в группах L-NAME и/или L-аргинина, нмоль/схг белка

Показатель	Контроль L-NAME, 25	L-NAME, 25	L-NAME, 200	Контроль L-NAME + L-аргинин	L-NAME + L-аргинин	Контроль	L-аргинин
Катепсин В	0,03 [0,01; 0,09]	0,05 [0,01; 0,11] ▲	0,30 [0,13; 0,49] ▲•	0,09 [0,04; 14,32]	0,20 [0,16; 0,26] ▲•	1,34 [0,35; 14,32]	0,49 [0,45; 0,62]
	1,47 [0,21; 5,51]	0,91 [0,09; 2,60] ▲	1,84 [0,79; 3,34] ▲	1,63 [0,19; 11,87]	0,91 [0,64; 1,50] ▲	1,14 [0,19; 11,87]	4,52 [3,42; 6,72]
	1,50 [0,22; 5,60]	0,95 [0,11; 2,69] ▲	1,97 [1,19; 3,68] ▲•	1,78 [0,63; 26,19]	1,11 [0,86; 1,69] ▲	2,44 [0,63; 26,19]	5,13 [3,91; 7,21]
Катепсин L	0,17 [0,08; 0,22]	0,09 [0,03; 0,29] ▲	0,94 [0,53; 1,93] ▲•	0,21 [0,09; 0,83]	0,27 [0,17; 0,33] ▲•	0,34 [0,17; 0,83]	0,45 [0,41; 0,74]
	5,70 [2,52; 13,31]	2,22 [0,10; 6,79] * ▲	6,81 [3,55; 9,45]	3,61 [1,32; 7,37]	1,61 [1,09; 2,51]* ▲	3,61 [1,32; 7,37]	4,74 [3,58; 6,88]
	5,87 [2,69; 13,53]	2,3 [0,13; 7,02] * ▲	8,02 [5,08; 10,44]	3,92 [1,56; 8,20]	1,83 [1,36; 2,79]* ▲	3,92 [1,56; 8,20]	5,48 [3,99; 7,34]
Катепсин H	0,12 [0,07; 0,32]	0,11 [0,03; 0,18] * ▲	0,40 [0,26; 0,73] •	0,16 [0,10; 0,58]	0,20 [0,12; 0,22] ▲•	0,40 [0,17; 0,58]	0,44 [0,34; 0,68]
	3,53 [2,27; 13,98]	1,82 [0,15; 3,56] * ▲	2,46 [1,08; 4,30]	2,37 [0,98; 5,81]	0,89 [0,66; 1,08]* ▲	2,83 [0,98; 5,81]	3,58 [2,93; 3,91]
	3,67 [2,38; 14,30]	1,95 [0,19; 3,73] * ▲	2,76 [1,48; 5,02]	2,48 [1,24; 6,40]	1,10 [0,77; 1,27]* ▲	3,19 [1,24; 6,40]	4,25 [3,38; 4,35]

Примечание:

- *- статистически значимые отличия от группы контроля (p < 0,05)
- ▲ - статистически значимые отличия от группы аргинина (p < 0,05)
- - статистически значимые отличия от группы L-NAME (p < 0,05)

Таблица 2

Активность катепсинов В, L и Н в цитозольной и лизосомальной фракциях гомогенатов сердечной мышцы в группах L-карнитина, L-NAME и L-аргинина, нмоль/схг белка

Показатель	Контроль L-карнитин	L-карнитин	L-аргинин	L-аргинин + L-карнитин	L-NAME, 25	L-NAME + L-карнитин
Катепсин В	HCA 0,05 [0,01; 14,32]	0,28 [0,24; 0,37] * ▲ •	0,49 [0,45; 0,62]	0,22 [0,15; 0,31] * ▲ •	0,05 [0,01; 0,11] ▲	0,20 [0,13; 0,25] ▲ • ■
	CA 0,91 [0,09; 11,87]	2,89 [1,96; 4,14] * ▲ •	4,52 [3,42; 6,72]	2,30 [1,24; 2,78] * ▲	0,91 [0,09; 2,60] ▲	1,75 [1,45; 2,26] ▲ • ■
	OA 0,95 [0,11; 26,19]	3,15 [2,23; 4,51] * ▲ •	5,13 [3,91; 7,21]	2,58 [1,47; 2,99] ▲	0,95 [0,11; 2,69] ▲	1,92 [1,62; 2,46] ▲ • ■
Катепсин L	HCA 0,12 [0,03; 0,83]	0,41 [0,27; 0,63] * •	0,45 [0,41; 0,74]	0,35 [0,26; 0,40] * ▲ •	0,09 [0,03; 0,29] ▲	0,27 [0,20; 0,32] * ▲ • ■
	CA 2,52 [0,10; 7,37]	4,27 [2,49; 4,62]	4,74 [3,58; 6,88]	2,58 [1,72; 3,48] ▲ ■	2,22 [0,10; 6,79] * ▲	2,18 [1,84; 2,32] ▲ ■
	OA 2,64 [0,13; 8,20]	4,64 [3,09; 5,24]	5,48 [3,99; 7,34]	2,95 [2,02; 3,83] ▲ ■	2,30 [0,13; 7,02] * ▲	2,47 [2,03; 2,61] ▲ ■
Катепсин Н	HCA 0,11 [0,03; 0,58]	0,28 [0,23; 0,34] * ▲ •	0,44 [0,34; 0,68]	0,19 [0,11; 0,20] ▲ • ■	0,11 [0,03; 0,18] * ▲	0,24 [0,17; 0,27] * ▲ • ■
	CA 1,88 [0,15; 5,81]	2,41 [1,49; 3,58] ▲	3,58 [2,93; 3,91]	0,59 [0,32; 1,36] ▲ ■	1,82 [0,15; 3,56] * ▲	1,47 [1,29; 1,85] ▲ ■
	OA 2,04 [0,19; 6,40]	2,73 [1,74; 3,92] ▲	4,25 [3,38; 4,35]	0,78 [0,51; 1,54] ▲ ■	1,95 [0,19; 3,73] * ▲	1,68 [1,54; 2,02] ▲ ■

Примечание:

- *- статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$)
- ▲ - статистически значимые отличия от группы аргинина ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы L-NAME ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы L-карнитина ($p < 0,05$)

Одна из важных функций карнитина – его способность образовывать соединения с различными органическими кислотами, являющимися промежуточными продуктами окислительных процессов и способными оказывать мембранотоксическое действие [6]. В результате накопления продуктов полураспада под действием карнитина может происходить закисление среды, тем самым создаются оптимальные условия для проявления активности лизосомальных цистеиновых протеиназ.

Суммарное воздействие карнитина с аргинином и карнитина с L-NAME (25 мг/кг) ниже, чем карнитина, и значительно ниже, чем аргинина.

L-аргинин, являясь донатором синтеза NO, индуцирует апоптоз [11], а карнитин предотвращает его индукцию [17]. Возможно, поэтому суммарное воздействие веществ в экспериментальной группе № 6 ниже, чем отдельно карнитина и аргинина.

В модели сочетанного воздействия препаратами карнитина и L-NAME все виды активностей протеиназ продемонстрировали статистически значимые отличия от группы аргинина и карнитина. Отмечается

незначительное снижение цитозольной фракции сочетанной группы относительно не только карнитина, но и карнитина с аргинином, что может являться признаком частичной разблокировки NO-синтазы.

Для выяснения причин обнаруженных изменений активности катепсинов в цитозольной фракции предпринята оценка проницаемости мембран лизосом с использованием показателя коэффициента лабильности (К лаб., %). Стабильность мембраны лизосом оценивается по степени прикрепления лизосомальных ферментов к мембранам и определяется, как правило, по маркерным ферментам, одним из наиболее изученных является кислая фосфатаза [7]. Доказано, что слабый окислительный стресс, вызывающий частичное повреждение лизосом, может индуцировать апоптоз, тогда как выраженное повреждение приводит к некрозу [18].

В настоящее время хорошо известно, что мембрана лизосом участвует в регуляции компарментализации цистеиновых протеиназ, которые способны секретироваться в цитоплазму клетки. В то время как нарастание значений коэффициента лабильности для кислой

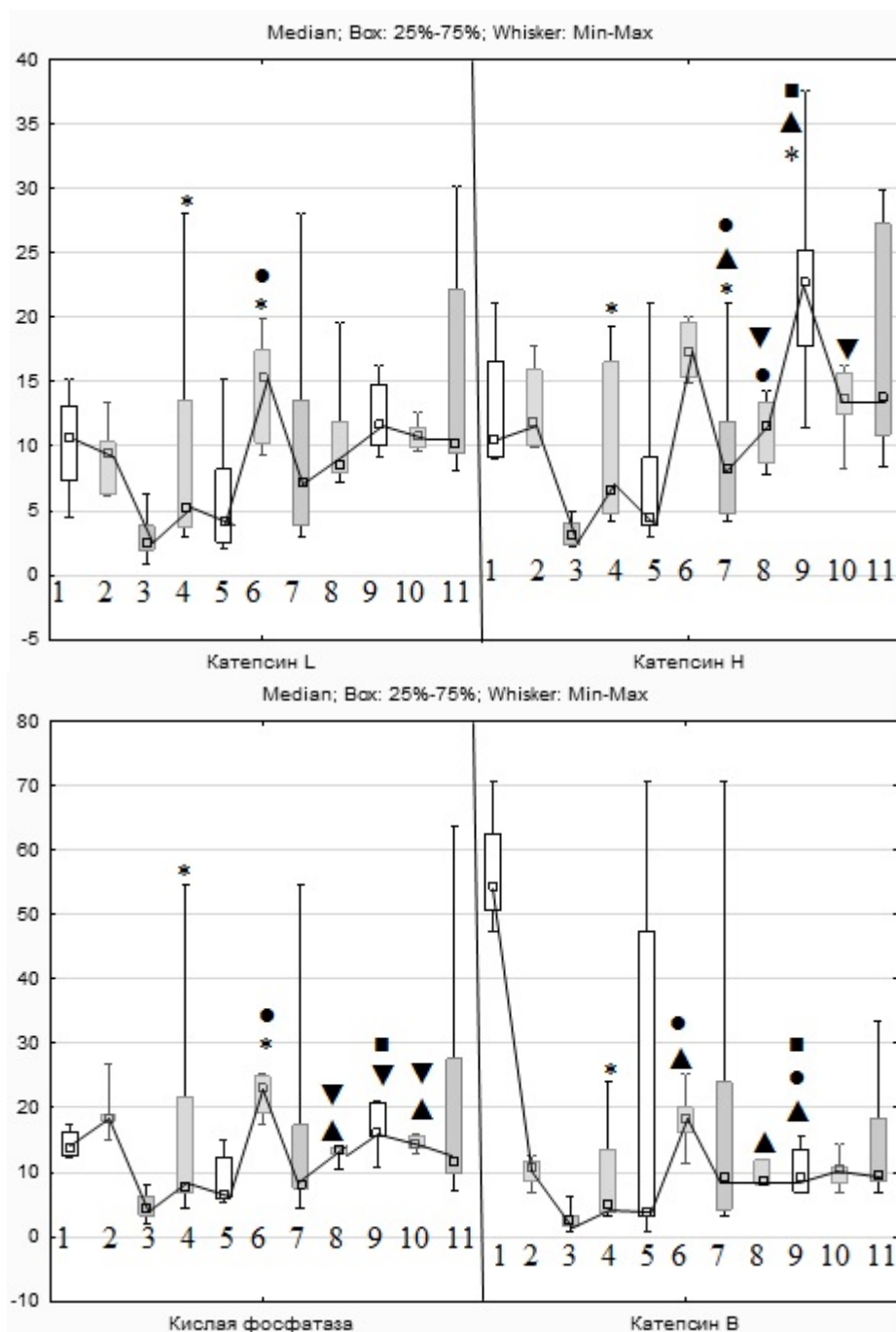


Рис. 1. Показатели коэффициента лабильности лизосомальных гидролаз в миокарде в различных экспериментальных группах.

Примечание:

1. контроль L-arg; 2. L-arg; 3. контроль L-NAME, 25 мг/кг; 4. L-NAME, 25 мг/кг; 5. контроль L-arg+L-NAME, 25 мг/кг; 6. L-arg+L-NAME, 25 мг/кг; 7. Контроль L-карнитина; 8. L-карнитин; 9. L-аргинин + L-карнитин; 10. L-NAME, 25 мг/кг + L-карнитин; 11. L-NAME, 200 мг/кг

- *- статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$)
- ▲ - статистически значимые отличия от группы аргинина ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы L-NAME ($p < 0,05$)
- ▼ - статистически значимые отличия от группы аргинина + L-NAME ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы L-карнитина ($p < 0,05$)

фосфатазы может быть однозначно трактовано как нарушение целостности лизосомальной мембраны, для катепсинов существует дополнительный механизм перемещения во внелизосомальную фракцию: секреция сквозь не повреждённую лизосомальную мембрану [14].

Таким образом, выход катепсинов за пределы лизосом может осуществляться по двум причинам: изменение степени секреции индивидуального фермента и изменение общей проницаемости мембраны. Относительное распределение фермента между лизосомальной и

внелизосомальной фракциями, а также проницаемость мембраны для отдельных гидролаз косвенно характеризует коэффициент лабильности.

Обнаружение повышения этого показателя как для всех исследуемых катепсинов, так и для маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы во всех экспериментальных группах, кроме изолированного введения L-аргинина (рис. 1), может свидетельствовать о том, что причиной нарастания активности катепсинов в цитозольной фракции является дестабилизация лизосомальных мембран [9]. Стоит обратить внимание на то, что границы прижизненной пермеабилитации мембран, соответствующие индукции апоптоза, остаются размытыми, и, по данным А. Michihara et al., даже 15% лабильная лизосом может не вызвать апоптоза [16].

Заключение: регуляторы синтеза оксида азота и карнитин в созданных экспериментальных моделях создают условия для изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ, запускают механизм пермеабилитации мембраны, что в свою очередь оказывает влияние на процессы их компартиментализации в клетке.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абаленихина Ю.В., Фомина М.А.* Влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность и аутопроцессинг катепсина в иммунокомпетентных органах крыс в условиях *in vitro* // Наука молодых *Eruditio Juvenium* – 2014. – № 1. – С. 53-59.
2. *Гринштейн С.В., Кост О.А.* Структурно-функциональные особенности мембранных белков // *Успехи биологической химии*. – 2001. – Т. 41. – С. 77-104.
3. *Дорохина Л.В., Зинчук В.В.* Прооксидантно-антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы // *Вестн. НАН РБ. Сер. биол. нав.* – 2000. – № 4. – С. 87-90.
4. *Ковалева О.В., Шитова М.С., Зборовская И.Б.* Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? // *Онкогематология*. – 2014 – Т. 7, № 2. – С. 103-113
5. *Комов В.П., Шведова В.Н.* Биохимия : учебник для академического бакалавриата. 4-е изд., испр. и доп. – М. : Юрайт, 2014. – 640 с.
6. *Николаева Е.А., Семякина А.Н., Воздвиженская Е.С., Харабадзе М.Н., Новиков П.В.* Коррекция недостаточности карнитина у детей с наследственными заболеваниями обмена веществ // *Педиатрическая фармакология*. – 2003. – № 1(4) – С. 1-4.
7. *Покровский А.А., Тутельян В.А.* Лизосомы. – М. : Наука, 1976. – 378 с.
8. *Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И., Артюшкова Е.Б.* Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота // *Эксперим. и клинич. фармакология*. – 2008. – Т. 71, № 2. – С. 29-31.
9. *Полупанов А.С.* Влияние статинов на активность лизосомальных гидролаз при аллоксановом диабете // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова* 2011. – № 1. – С. 33-37.
10. *Путьшев А.Б.* Пермеабилитация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор // *Цитология*. – 2011. – Т. 53, № 4. – С. 313-324.
11. *Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Стеновая Е.А., Стариков Ю.В., Осихов И.А., Новицкий В.В.* Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза // *Цитология*. – 2012. – № 2. – С. 105-111.
12. *Шимановская Н.П., Расулов М.М., Бобкова С.Н., Беликова О.А., Нурбеков М.К., Зверева М.В.* Роль катепсинов в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2012. – № 2. – С. 56-64.
13. *Barrett A.J., Rawlings N.D.* ‘Species’ of peptidases // *Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 388, N 11. – P. 1151–1157.
14. *Benes P., Vetvicka V., Fusek M.* Cathepsin D — many functions of one aspartic protease // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2008. – N 68. – P. 12-28.
15. *Brunk U.T., Neuzil J., Eaton J.W.* Lysosomal involvement in apoptosis // *Redox Report*. – 2001. – N 6. – P. 91-97.
16. *Michihara A., Toda K., Kubo T., Fujiwara Y., Akasaki K., Tsuji H.* Disruptive effect of chloroquine on lysosomes in cultured rat hepatocytes // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2005. – N 28. – P. 947-951.
17. *Miguel-Carrasco J.L., Mate A., Monserrat M.T., Arias J.L., Aramburu O., Vazquez C.M.* The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension // *Am J Hypertens*. – 2008. – N 21. – P. 1231-1237.
18. *Rajasekar P., Palanisamy N., Anuradha C.V.* Increase in nitric oxide and reduction in blood pressure, protein kinase C beta II and oxidative stress by L-carnitine: a study in the fructose-fed hypertensive rat. // *Clinical and Experimental Hypertension*. – 2007. – Vol. 29, N 8. – P. 517-530.
19. *Terman A., Kurz T., Gustafsson B., Brunk U.* Lysosomal labilization // *IUBMB Life*. – 2006. – Vol. 58, N 9. — P. 531–539.
20. *Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D.* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – N 1824. – P. 68-88.
21. *Wang Z.Y., Håkanson R.* Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation // *British Journal of Pharmacology*. – 1995. – Vol. 116. – P. 2447- 2450.