

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

ФОМИНА Мария Алексеевна

**ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ
В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук,

профессор,

член-корреспондент РАН

Терентьев Александр Александрович

Рязань – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1. Окислительная модификация белков – современный маркер окислительного стресса.....	18
1.2. Роль оксида азота и его производных в свободнорадикальных процессах; регуляция пула оксида азота.....	25
1.3. Факторы и механизмы управления активностью лизосомальных цистеиновых протеиназ.....	37
1.4. Современные представления о внелизосомальных эффектах цистеиновых катепсинов и управлении проницаемостью лизосомальной мембраны.....	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
2.1. Объект наблюдений.....	59
2.2. Экспериментальные модели.....	59
2.2.1. Экспериментальные модели <i>in vivo</i>	59
2.2.2. Экспериментальные модели <i>in vitro</i>	62
2.3. Получение материала для исследования.....	64
2.3.1. Гомогенаты тканей.....	64
2.3.2. Субклеточное фракционирование и получение суспензий лизосом.....	65
2.3.3. Выделение фракций лейкоцитов, получение гомогенатов и суспензии клеток различных фракций.....	66
2.3.4. Получение суспензии тимоцитов и спленоцитов.....	68
2.4. Методы исследования.....	69
2.4.1. Определение концентрации белка.....	69
2.4.2. Определение содержания метаболитов оксида азота.....	69
2.4.3. Определение концентрации гомоцистеина.....	70
2.4.4. Оценка состояния окислительной модификации белков.....	70

2.4.5. Определение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ.....	73
2.4.6. Метод определения аутокаталитического действия катепсинов.....	74
2.4.7. Оценка лабильности лизосомальной мембраны и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ.....	75
2.5. Статистическая обработка.....	76
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	77
3.1. Разработка способа комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях.....	77
3.2. Изменения общей активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в экспериментальных моделях, ассоциированных с окислительным стрессом.....	82
3.2.1. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеинах лейкоцитов при <i>in vitro</i> - моделированном окислительном стрессе.....	82
3.2.2. Окислительная модификация белков и активность катепсинов В, L, Н в динамике экспериментального венозного тромбоза.....	84
3.2.3. Окислительная модификация белков и активность катепсинов В, L, Н тимоцитов и спленоцитов при <i>in vitro</i> -воздействии модуляторов синтеза оксида азота.....	89
3.3. Состояние окислительной модификации белков и изменения активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при экспериментальном изменении синтеза оксида азота <i>in vivo</i>	102
3.3.1. Характеристика экспериментальных моделей.....	102

3.3.2. Результаты комплексной оценки состояния окислительной модификации белков ткани печени, почки и легкого под действием модуляторов синтеза оксида азота.....	105
3.3.3. Изменения активности и компартментализации катепсинов В, L, Н ткани печени, почки и легкого под действием модуляторов синтеза оксида азота.....	120
3.3.4. Анализ зависимости показателей активности и компартментализации катепсинов В, L, Н ткани печени, почки, легкого от состояния окислительной модификации белков при <i>in vivo</i> -воздействии модуляторов синтеза оксида азота.....	143
3.4. Оценка корректирующего влияния L-аргинина на состояние окислительной модификации белков и изменения активности и компартментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при экспериментальной гипергомоцистеинемии.....	148
3.4.1. Характеристика экспериментальных моделей.....	149
3.4.2. Результаты комплексной оценки состояния окислительной модификации белков ткани печени, почки, легкого и миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии изолированно и в сочетании с введением L-аргинина.....	149
3.4.3. Изменения активности и компартментализации катепсинов В, L, Н ткани печени, почки, легкого и миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии изолированно и в сочетании с введением L-аргинина.....	162
3.4.4. Анализ зависимости показателей активности и компартментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ от выраженности окислительной модификации белков при экспериментальной гипергомоцистеинемии изолированно и в сочетании с введением L-аргинина.....	180

3.5. Состояние окислительной модификации белков и изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ изолированных лизосом при индукции окислительного стресса <i>in vitro</i>	190
3.5.1. Изменения показателей окислительной модификации белков лизосом печени крыс при <i>in vitro</i> -индуцированном окислительном стрессе и применении модуляторов генерации оксида азота.....	191
3.5.2. Влияние <i>in vitro</i> - индуцированного окислительного стресса и модуляторов генерации оксида азота на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемость лизосомальной мембраны.....	201
3.5.3. Зависимость активности катепсинов В, L, Н и показателей проницаемости лизосомальной мембраны от выраженности окислительного повреждения белков при <i>in vitro</i> -индуцированном окислительном стрессе и применении модуляторов генерации оксида азота.....	212
3.6. Возможности оценки селективного изменения компарментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ.....	216
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	222
ВЫВОДЫ.....	231
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	234
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	235
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	236

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Прогрессивное развитие системы знаний об окислительном стрессе, представляющем собой дисбаланс про- и антиоксидантных реакций [56, 197], к настоящему моменту сформировало представления о его вовлеченности в патогенез обширного круга заболеваний, а также в целый ряд адаптивных процессов [38, 57, 328], что стимулирует дальнейшие исследования по поиску новых агентов, маркеров и мишеней свободнорадикальных процессов, способных внести вклад в понимание механизмов развития окислительного стресса и способов его коррекции. Существенный прогресс в этой области был достигнут исследованиями, продемонстрировавшими вклад в свободнорадикальные процессы активных форм азота [324, 393], сочетавшимися с описанием антиоксидантных эффектов оксида азота [304]. Кроме того, в настоящее время активно развивается направление исследований, связанное с обнаружением и описанием процесса окислительной модификации белков [41, 335], продукты которого рассматриваются современными исследователями не только в качестве наиболее стабильных и удобных для количественного определения показателей выраженности окислительного стресса [52, 143] но и как участники физиологических и патологических реакций [123, 322].

На данный момент известно, что в качестве индукторов окислительной модификации белков способны выступать как активные формы кислорода и азота, так и продукты перекисного окисления липидов, а также металлы переменной валентности и редуцирующие сахара [106, 336], появляются работы, демонстрирующие значение для этого процесса нарушений соотношения про- и антиоксидантных эффектов в условиях истощения антиоксидантной системы [12, 345]. Также последние годы ознаменованы появлением значительного количества не только экспериментальных, но и клинических исследований, использующих уровень окислительной модификации белков в качестве маркера окислительного стресса [5, 50, 71, 113]. Тем не менее, исследования в области описания выраженности и характера окислительной модификации белков при адаптивных и

патологических процессах, ассоциированных с окислительным стрессом, а также изучения возможностей, способов и механизмов защиты от токсического действия продуктов окислительного повреждения протеинов сохраняют высокую степень актуальности.

В частности, перспективным представляется выяснение антиоксидантных возможностей оксида азота в отношении процесса окислительной модификации белков, поскольку эта часть эффектов, в отличие от прооксидантных [94, 298] на данный момент практически не изучена, при том, что наличие других антиоксидантных эффектов этого соединения в настоящее время создало значимое для медицины направление по созданию лекарственных препаратов, способных стабилизировать и транспортировать оксида азота [10, 168].

Важнейшим механизмом защиты от накопления и токсического действия продуктов окислительной модификации белков признана их протеолитическая деградация [192]. Наиболее изученным механизмом утилизации окисленных протеинов на данный момент является протеасомный протеолиз [235], однако в последние годы появляются сведения об участии в деградации окислительно поврежденных белков отдельных митохондриальных протеаз [302], а также лизосомальных катепсинов [133], также обсуждается возможность участия в этом процессе шаперон-опосредованной аутофагии [303].

Среди известных на данный момент более чем 50 лизосомальных гидролаз особое внимание исследователей привлекает группа лизосомальных цистеиновых протеиназ (ЛЦП, цистеиновые катепсины), особенностью которых является способность к деградации не только внутриклеточных, но и экстрацеллюлярных белков [156, 417].

Особенности структуры цистеиновых катепсинов, создающие способность к внелизосомальному действию и чувствительность к многочисленным факторам управления активностью [156], делают их привлекательными кандидатами на роль потенциальных факторов утилизации окислительно модифицированных белков в цитоплазме клетки, что могло бы оказаться существенным дополнением

к работе эндосомально-лизосомальной и протеасомной систем деградации поврежденных белков.

В течение многих лет исследования ЛЦП акцентировались в области их экстрацеллюлярных эффектов, что к настоящему времени позволило сформировать представления не только о вовлеченности данной группы ферментов в патогенез целого ряда распространенных и медико-социально значимых заболеваний [92, 329, 436], но и о возможностях фармакологического управления их действием [174, 371].

При сохранении интереса к экстрацеллюлярным эффектам цистеиновых катепсинов, последние годы ознаменовались новым витком исследований, связанных с обнаружением участия лизосомальных протеиназ, в большей степени ЛЦП, в механизмах апоптоза [270, 378], причем не только по классическому, каспазо-зависимому [366], но и по отдельному, лизосомально-опосредованному [126, 367] пути. Это, фактически, привело к формированию нового научного направления, разработка которого не только требует дальнейшего уточнения механизмов интра- и внелизосомальной регуляции активности цистеиновых катепсинов, но и создает необходимость подробного изучения факторов, способных оказывать действие на прижизненную проницаемость (пермеабиллизацию) лизосомальных мембран, влияя тем самым на выход ферментов в цитоплазму [268, 368].

Поскольку активное изучение механизмов пермеабиллизации лизосомальных мембран началось относительно недавно [63, 352], процесс находится в настоящее время на этапе активного накопления экспериментальных данных [98, 216, 315] и полная систематизированная картина на данный момент не получена. При этом в качестве одного из факторов повышения проницаемости лизосомальной мембраны указывается окислительный стресс [114, 116, 254], однако исследования механизмов связи этих процессов весьма немногочисленны [267]. Тем не менее, имеются указания на участие цистеиновых катепсинов в АФК-индуцированном апоптозе [182, 270, 397], и возможности АФК способствовать ПЛМ через активацию Ca^{2+} -каналов лизосомальной мембраны

[390], а также появляются сведения о стабилизации лизосомальной мембраны под действием антиоксидантов [173, 178, 331], хотя результаты исследований пока весьма фрагментарны.

Таким образом, исследование взаимосвязей изменений активности цистеиновых катепсинов и проницаемости лизосомальной мембраны с уровнем окислительной модификации белка при состояниях, ассоциированных с окислительным стрессом, а также поиск факторов, способных оказывать корректирующее действие на указанные процессы, представляется актуальным направлением, имеющим важное биомедицинское значение. Разработка направления способна как расширить понимание механизмов воздействия окислительного повреждения протеинов на активность ферментов и проницаемость мембран и внести вклад в представления о роли лизосомального протеолиза в протеостате, так и послужить основой для дальнейших исследований в области антиоксидантной терапии и фармакологических путей управления апоптозом.

Цель и задачи исследования

Цель: изучить состояние и механизмы изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при окислительном стрессе и выявить роль функционального состояния цистеиновых протеиназ лизосом различных тканей в процессе адаптации к окислительному повреждению белков.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Разработать способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях.
2. Исследовать изменения общей активности лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н на клеточном и тканевом уровне в условиях индукции окислительного стресса.
3. Провести комплексную оценку содержания продуктов окислительной модификации белков различных тканей при воздействии неселективного

ингибитора и субстрата NO-синтазы *in vivo*, а также при экспериментальной гипергомоцистеинемии.

4. Исследовать изменения активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н, а также оценить состояние проницаемости лизосомальной мембраны в тканях *in vivo* под действием модуляторов синтеза оксида азота и при экспериментальной гипергомоцистеинемии.
5. Исследовать изменения активности и компартиментализации катепсинов В, L, Н, а также оценить состояние проницаемости лизосомальной мембраны в изолированных лизосомах при индукции окислительного стресса *in vitro*.
6. Изучить влияние L-аргинина на показатели окислительной модификации белков, а также установить его возможную роль в качестве фактора, изменяющего активность и компартиментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ.
7. Провести анализ связей показателей состояния окислительной модификации белков и изменений активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н.
8. Исследовать возможность разработки способа оценки селективного изменения компартиментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые на организменном, тканевом, клеточном и субклеточном уровне продемонстрирована связь изменений активности и компартиментализации цистеиновых катепсинов с окислительным стрессом, оцениваемом по выраженности и характеру окислительной модификации белков.

При выполнении исследования разработан способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, позволивший впервые осуществить полное количественное измерение содержания продуктов спонтанного и металл-катализированного карбонилирования белков с характеристикой соотношения первичных и вторичных маркеров их окислительного повреждения в моделях,

сопряженных с окислительным стрессом. Получен патент на изобретение (№2524667 от 27.07.2014). Предложен новый способ количественной оценки избирательной проницаемости лизосомальной мембраны для индивидуальных представителей группы катепсинов.

Впервые показано, что подавление синтеза оксида азота приводит к нарастанию содержания продуктов окислительной модификации белков в тимоцитах и спленоцитах (*in vitro*) и цитоплазматической фракции ткани печени, почки и легкого (*in vivo*); в *in vivo*- моделях впервые обнаружена обратная зависимость содержания продуктов окислительной модификации белков от концентрации метаболитов оксида азота. Впервые описаны изменения содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени, почки, легкого и миокарда экспериментальной гипергомоцистеинемии.

В *in vitro*- и *in vivo* экспериментах впервые продемонстрирована чувствительность общей активности цистеиновых катепсинов к развитию окислительного стресса, впервые обнаружена прямая зависимость общей активности катепсинов В, L, Н от содержания продуктов окислительного карбонилирования белков.

Впервые описаны зависимости изменений активности и субклеточного распределения лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н, а также состояния проницаемости лизосомальной мембраны от выраженности окислительной модификации белков при *in vivo*-моделировании ситуаций, сопряженных с окислительным стрессом.

Впервые исследовано прямое *in vitro* воздействие индукции окислительного стресса на уровень окислительного карбонилирования белков, активность цистеиновых катепсинов и проницаемость мембраны изолированных лизосом печени крыс с оценкой корректирующего действия L-аргинина.

Обнаружен ранее неизвестный феномен снижения проницаемости лизосомальных мембран при умеренном/кратковременном окислительном

стрессе, что позволило впервые сформулировать гипотезу о значении степени повреждения белков лизосомальных мембран в механизме пермеабилзации.

Получены новые данные об эффектах L-аргинина, не связанных напрямую с участием в генерировании оксида азота: обнаружено, что L-аргинин при изолированном применении способен приводить к уменьшению содержания продуктов окислительной модификации белков в цитоплазматической фракции и лизосомах печени крыс, снижать уровень гомоцистеина в крови при экспериментальной гипергомоцистеинемии, корректировать вызванное индукторами окислительного стресса нарастание содержания окислительно карбонилированных белков, в том числе через влияние на активность и компарментализацию цистеиновых катепсинов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе исследования результаты расширяют фундаментальные представления о механизмах и этапах повреждения белков при окислительном стрессе и способах эндогенной и экзогенной коррекции развивающихся изменений, а также способствуют более глубокому пониманию роли оксида азота в развитии свободнорадикальных патологий.

Обнаруженные корреляции между активностью цистеиновых катепсинов и выраженностью окислительной модификации белков вносят вклад в систему знаний об этой группе ферментов и могут стать основой для дальнейших исследований роли этих компонентов деградиционного пула контроля протеостаза в защите клетки от окислительного повреждения.

Выявление изменений проницаемости лизосомальной мембраны на фоне окислительного повреждения белков является существенным дополнением активно развивающегося направления исследований механизмов пермеабилзации лизосомальной мембраны и дает возможность определить новые мишени для фармакологического управления ситуациями, сопряженными с апоптозом.

Описанные протективные эффекты L-аргинина дополняют представления о его биологической роли и могут быть использованы для разработки новых

подходов терапевтической коррекции состояний, ассоциированных с окислительным стрессом.

Разработанный способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков применим для тканей и биологических жидкостей и его внедрение существенно повышает информативность количественной оценки содержания карбонилированных протеинов, являющихся современным маркером окислительного стресса.

Методология и методы исследования

Исследование носит экспериментальный характер и выполнялось путем *in vitro*- и *in vivo*- моделирования ситуаций, сопряженных с развитием окислительного стресса с последующей оценкой состояния окислительной модификации белков и изменений активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ. Объектом *in vivo*- моделирования являлись конвенциональные половозрелые крысы Wistar, для *in vitro*- исследований использовались клетки, выделенные из крови и тканей указанных лабораторных животных, а также лизосомы печени. Содержание животных, *in vivo*- моделирование, выведение из эксперимента и получение материала для исследований полностью соответствовало требованиям локального этического комитета по проведению научных исследований. Обработка полученных результатов проводилась с использованием прикладных программ. При выполнении работы использовались преимущественно биохимические методы: спектрофотометрия, спектрофлуорометрия, иммунохимические методы, колориметрия; в качестве вспомогательных методов применялись дифференциальное центрифугирование и световая микроскопия; обработка полученных результатов осуществлялась с помощью современных методов статистического анализа.

Внедрение результатов работы

Результаты исследования внедрены в работу Научно-клинического центра гематологии, онкологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский

государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областной клинический кардиологический диспансер», Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница № 11», используются в учебном процессе кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения, выносимые на защиту

1. *In vitro*- и *in vivo*- исследования демонстрируют наличие чувствительности общей активности цистеиновых катепсинов В, L, Н к действию индукторов окислительного стресса и наличие зависимости ее изменений от выраженности окислительной модификации белков.
2. *In vivo*- подавление синтеза оксида азота приводит к нарастанию содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции гомогенатов паренхиматозных органов в сочетании с множественными изменениями активности и субклеточного распределения цистеиновых катепсинов, коррелирующими со степенью изменений содержания окислительно модифицированных протеинов.
3. Экспериментальная гипергомоцистеинемия ассоциирована с повышением содержания окислительно модифицированных белков в цитоплазматической фракции ткани печени, почки и, в наибольшей степени, в миокарде, но не в ткани легкого; изменения активности и компарментализации цистеиновых катепсинов носят тканеспецифический характер, демонстрируя зависимость от изменений содержания продуктов окислительной модификации белков и, в меньшей степени, от уровня гипергомоцистеинемии.

4. L-аргинин *in vivo* при изолированном и сочетанном с индукторами окислительного стресса применении демонстрирует способность препятствовать накоплению окислительно поврежденных белков, в том числе за счет изменений активности цистеиновых катепсинов во внелизосомальной фракции.
5. Прямое *in vitro*- воздействие индуктора окислительного стресса на изолированные лизосомы печени крыс вызывает нарастание содержания окислительно модифицированных белков и преимущественное повышение активности цистеиновых катепсинов в лизосомальной фракции; изменения существенно корректируются воздействием L-аргинина.
6. На основании комплекса *in vivo*- и *in vitro*- исследований выдвигается предположение о значении степени окислительного повреждения белков лизосомальных мембран для направленности изменений их проницаемости.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы подтверждается достаточным количеством наблюдений, адекватностью экспериментальных моделей, применением современных биохимических методов исследования и способов статистической обработки.

Основные результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на: IX Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем здравоохранения» (Астрахань, 2013); XII региональной научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении (дни лабораторной диагностики южного федерального округа)» (Ростов-на-Дону, 2013); V Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2013); Международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития» (Нижний Новгород, 2014); Международной научно-практической конференции «Медицинские науки: прошлое, настоящее и будущее» (Уфа, 2014); Межрегиональной научной

конференции с международным участием Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2014); 10-й юбилейной Международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Абхазия, 2014); XIV Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при патологии и адаптации. Дни молекулярной медицины на Дону» (Ростов-на-Дону, 2015); Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2015); Российской научно-практической конференции «Зубаировские чтения: Новое в коагулологии. Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015); Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени И.П. Павлова, посвященной 65-летию работы университета на Рязанской земле (Рязань, 2015); Международной конференции «Новые инновационные технологии в медицине, биологии, фармакологии, экологии»: Весенняя сессия. (Гурзуф, 2015); VII Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2015); Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика Е.А. Строева» (Рязань, 2016); Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и лабораторной диагностики» (Ижевск, 2017); 11-й международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук – основа формирования современной медицины» (Астрахань, 2018).

Публикации

Результаты исследования представлены в 39 публикациях, их них 16 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России (в том числе 7 – в изданиях, цитируемых в системах Scopus и Web of Science), в число публикаций также входит 1 патент на изобретение, 1 методические рекомендации и 1 монография.

Личный вклад соискателя

Непосредственное участие автора заключалось в планировании и организации исследования, постановке задач, разработке дизайна, методической поддержке и проведении экспериментов, статистической обработке и анализе полученных результатов, формулировке научных положений и выводов. Все изложенные в диссертации результаты получены автором либо в ходе самостоятельно проведенных исследований, либо при работе в рамках подготовки диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук под научным руководством автора и при его непосредственном участии. Соавторы исследований указаны в публикациях.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка условных сокращений, списка литературы. Объем работы составляет 280 страниц машинописного текста, содержит 88 рисунков и 34 таблицы. Список литературы включает 438 источников, из них 82 отечественных и 356 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Окислительная модификация белков - современный маркер окислительного стресса

Неугасающий интерес к проблемам окислительного стресса сформировал представления о вовлеченности дисбаланса между про- и антиоксидантными реакциями в патогенез множества заболеваний, а также в физиологические и адаптивные процессы (Рисунок 1) [56, 197, 328]. Этот факт стимулирует дальнейшие исследования по изучению механизмов адаптивного и повреждающего действия окислительного стресса и поиску новых мишеней и маркеров окислительного воздействия. Значительный прогресс в этой области был достигнут обнаружением и описанием процесса окислительной модификации белков, продукты которого в настоящее время рассматриваются не только в качестве стабильных и удобных для количественного определения показателей выраженности окислительного стресса, но и как участники развития патологических реакций [52, 113].

Окислительная модификация белков представляет собой процесс их ковалентной модификации, вызванный непосредственным воздействием активных форм кислорода (АФК) и/или активных форм азота (АФА), а также косвенным взаимодействием с вторичными побочными продуктами окислительного стресса [335]. В качестве индукторов образования окислительно-модифицированных белков (ОМБ) в настоящее время описаны [106, 336]:

- активные формы кислорода (OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , O_2);
- активные формы азота (NO^\cdot , ONOO^-);
- металлы переменной валентности (Cu^{2+} , Fe^{2+})
- продукты перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, 4-гидрокси-2-ноненаль)
- редуцирующие сахара.

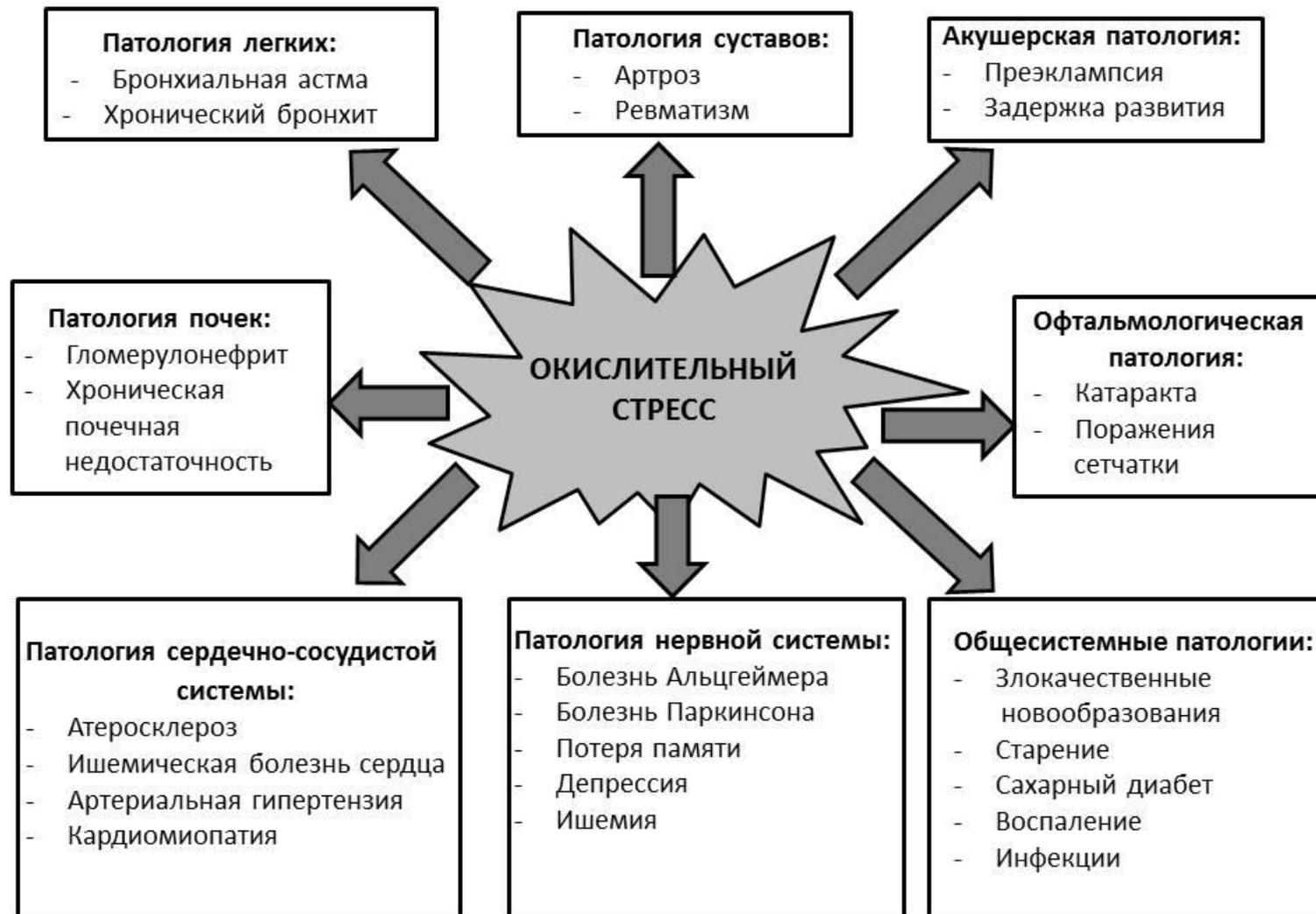


Рисунок 1. Патологии, ассоциированные с окислительным стрессом (цит. по [328])

Формирование ОМБ происходит не только при нарастании концентрации индуцирующих агентов, но и при смещении баланса антиоксидантов и прооксидантов в пользу вторых в условиях истощения антиоксидантной системы [12, 345].

Окислительной модификации может подвергаться как полипептидная цепь, так и простетическая часть сложных белков, примером последней является окисление железа негемовых белков с последующей диссоциацией [41]. Однако термин «окислительная модификация белков» применяется в основном для описания процессов, связанных с полипептидной цепью, где модификации может подвергаться как пептидная связь, так и боковые радикалы аминокислот [106, 285].

По направлению дальнейшего развития окислительное повреждение белков может оказаться как обратимым, так и необратимым процессом (Рисунок 2). Необратимое окисление белков приводит к утрате их биологических свойств, а в дальнейшем агрегации или деградации. К этому типу окисления относится образование карбонильных производных белков [432], нитротирозина и битирозина [344]. Обратимое окисление белков имеет большое значение для клеточной сигнализации, например, при ишемическом повреждении [123, 322]. Этот тип окисления характерен для модификации остатков цистеина с конечными продуктами: дисульфиды, глутатион-тиолы, нитрозотиолы, сульфеновая и сульфоновая кислоты [123].

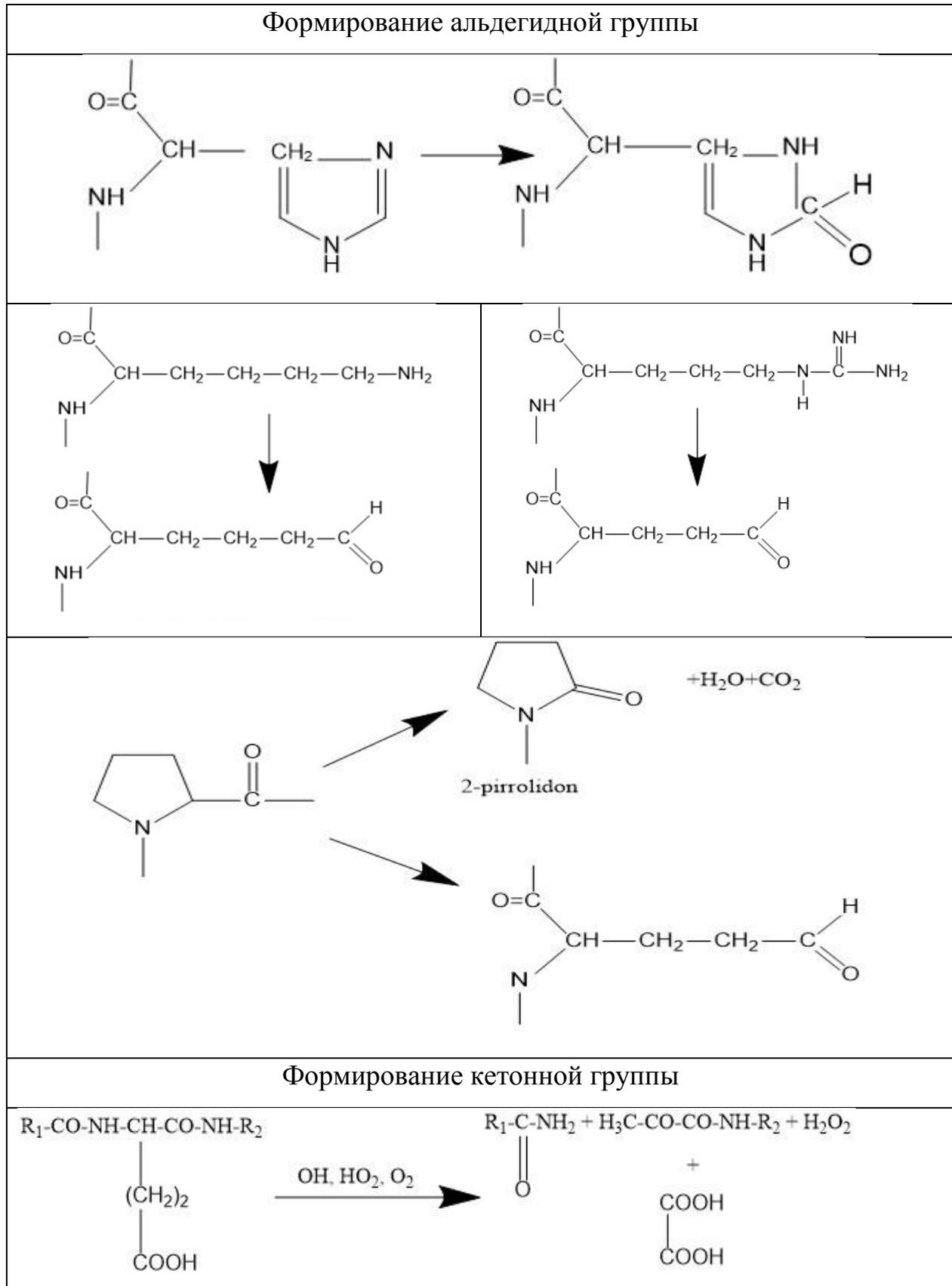
По вовлеченности аминокислот в процесс окислительной модификации белков можно выделить три группы: ароматические аминокислоты; аминокислоты, при окислении которых образуются карбоксильные группы; аминокислоты, содержащие серу. Наиболее изученным является механизм повреждения ароматических аминокислот и серосодержащих аминокислот. Характерным признаком карбонильных производных является формирование СО-группы в результате окислительной модификации боковых радикалов аминокислот в составе белков.



Рисунок 2. Варианты окислительной модификации белков (цит. по: [123])

В связи с тем, что белковые карбонилы были описаны в качестве ключевых биомаркеров многих патологий [123, 143, 335, 432], а также процесса старения [41, 111], в настоящее время наиболее изучаемым является именно этот тип окислительной модификации протеинов. На данный момент большинство исследователей описывают количественные изменения общего содержания карбонилированных протеинов при их спонтанном и металл-катализируемом образовании [32, 50, 113, 391]. Однако в ряде исследований было продемонстрировано, что карбонилирование белков в условиях окислительного стресса является селективным процессом [166, 271, 323]. В связи с этим, в последние годы стали появляться данные о конкретных участках карбонилирования белков, подверженных окислительному стрессу [255, 338, 354, 396]. Так, например, окисление функциональных групп гистидина, лизина, аргинина, пролина в боковом радикале приводит к формированию альдегидной группы, а окисление остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот приводит к разрыву полипептидной цепи с образованием пирувильной группы из N-концевой аминокислоты, то есть формированию кето-группы [21, 143, 335, 396] (Таблица 1).

Формирование альдегидной и кетонной групп при окислительном карбонилировании белков



В целом, многочисленные исследования в течение последних 15-20 лет позволили не только подтвердить первоначальный тезис о том, что выявление окислительно модифицированных белков может играть важную роль в ранней диагностике свободнорадикальных патологий [375], но и сформировать представления о карбонильных производных белков, как об идеальных биомаркерах окислительного стресса, обладающих целым рядом преимуществ перед другими продуктами процесса [340]:

- формирование на ранних стадиях окислительного повреждения;
- высокая стабильность, формирующая длительную персистенцию;
- чувствительность к степени выраженности окислительного стресса;
- способность предоставлять диагностическую информацию о фармакологическом ответе, в том числе об эффективности антиоксидантной терапии.

При этом интерес к изучению процесса окислительной модификации белков не исчерпывается диагностическим и прогностическим значением выявления его продуктов. Обширные биологические функции белков, частично или полностью утрачиваемые в результате окислительного повреждения, а также возможное токсическое воздействие формируемых при окислении агрегатов белков [52, 72] сформировали необходимость подробного изучения возможностей организма препятствовать накоплению продуктов окислительной модификации протеинов.

Важнейшим уровнем защиты от накопления окислительно модифицированных белков является протеолитическая утилизация [192]. В целом, деградационный модуль контроля протеостаза в настоящее время описывается как комплекс внутриклеточных протеаз и протеолитических систем, включающий компартментализованные (например, митохондриальные) протеазы, убиквитин-протеасомную систему и аутофаго-лизосомную систему [303].

Для утилизации окисленных протеинов на данный момент признанным и достаточно хорошо изученным механизмом является протеасомный протеолиз [234-236] предварительно убиквитинированных белков [196, 334]. Также

обсуждается участие в процессе защиты клетки от окислительно поврежденных белков процесса аутофагии, протекающего с участием внутрилизосомального протеолиза [179, 230, 241]. Из описанных механизмов аутофагии (Рисунок 3) наиболее вероятными для утилизации окислительно поврежденных белков представляются макроаутофагия, протекающая с предварительным формированием аутофагосомы, и шаперон-опосредованная селективная аутофагия [303].

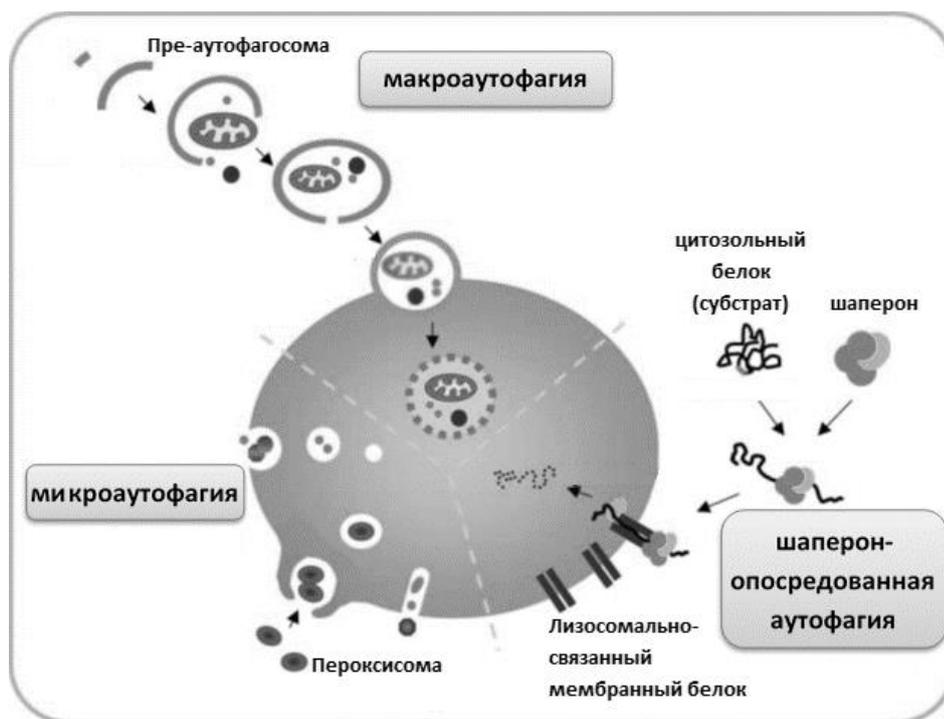


Рисунок 3. Механизмы аутофагии (цит. по: [275])

Интересно, что в настоящее время описывается роль убиквитинирования белков для селективной аутофагии, что связывает этот процесс с протеасомным механизмом [424]. Кроме того, появляются сведения об участии в деградации окислительно поврежденных белков отдельных митохондриальных протеаз (в основном Lon-протеазы) [302] и лизосомальных катепсинов [133].

Таким образом, окислительная модификация белков в настоящее время признана в качестве проявления и маркера окислительного стресса, при этом первоначальное мнение, о «случайном» характере окислительного повреждения сменяется представлениями о специфических сайтах окисления. Изучение характера и динамики процессов свободно-радикального окисления белков, а

также уточнение механизмов, вовлеченных в утилизацию продуктов их окислительного повреждения может иметь патогенетическое значение при ряде заболеваний человека или животных, а также использоваться для разработки способов их профилактики и лечения.

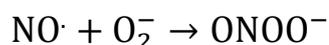
1.2. Роль оксида азота и его производных в свободнорадикальных процессах; регуляция пула оксида азота

Оксид азота относится к наиболее изучаемым биоактивным молекулам, принимающим участие во множестве ключевых для организма млекопитающих биологических процессов [65, 296, 363]. На сегодняшний день доказано участие оксида азота в регуляции сосудистого тонуса [214, 308], тромбоцитарного звена гемостаза [415], отдельных реакций лейкоцитов [207], деятельности иммунной [213, 358], нервной [221], дыхательной [307], пищеварительной [407] и мочевыделительной [294] систем.

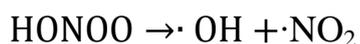
Отдельным аспектом изучения биологических эффектов оксида азота является исследование его роли в свободно-радикальных процессах.

Благодаря высокой реакционной способности, обеспеченной наличием на внешней π -орбитали неспаренного электрона [195], оксид азота способен проявлять как про-, так и антиоксидантные свойства [233].

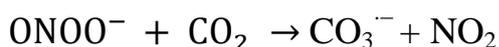
Прооксидантные эффекты оксида азота в настоящее время связывают в основном с его способностью вступать в реакцию с супероксид анион-радикалом (O_2^-), продуктом которой является пероксонитрит [343, 393]:



Образовавшийся пероксонитрит существует в двух формах: нуклеофильный анион ($ONOO^-$) и протонированная форма ($HONOO$) [413]. Обе формы являются высоко реактивными и способны вступать в прямые окислительные реакции с многочисленными биомолекулами [324, 393]. Кроме того, как протонированная, так и анионная форма участвуют в образовании свободных радикалов. Так, протонированная форма самопроизвольно распадается с образованием одноэлектронных оксидантов – гидроксильного ($\cdot OH$) и нитритного ($\cdot NO_2$) радикалов [97]:



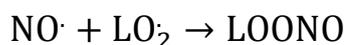
Анионная форма вступает в реакцию с диоксидом углерода, что, с одной стороны, уменьшает количество пероксонитрита, способного оказывать прямое окислительное действие, но, с другой стороны, приводит к формированию свободных радикалов карбоната ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) и диоксида азота ($\cdot\text{NO}_2$), являющихся оксидантами с высокой тропностью к цистеиновым и тирозиновым аминокислотным остаткам [326, 393]:



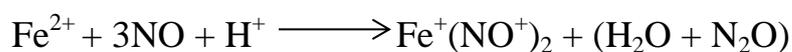
В результате, пероксонитрит как прямо, так и опосредованно выступает в качестве мощного окислительного и нитрозилирующего агента. В настоящее время описаны многочисленные биологические эффекты, связанные с окислительным/нитрозилирующим действием пероксонитрита и его производных [393]. Особо следует отметить способность пероксонитрита прямо и опосредованно снижать уровень антиоксидантной защиты [103, 152, 219], вызывать перекисное окисление и нитрозилирование липидов [325, 347, 355], а также подавлять активность NO-синтаз через окисление их эссенциального кофактора тетрагидробиоптерина (BH_4) [227, 283]. Кроме того, расширяется количество исследований, описывающих роль пероксонитрита и его производных в изменении структуры и функций белков через механизмы их не только окислительной, но и/или нитрозативной модификации, в основном затрагивающей аминокислотные остатки цистеина и тирозина [94, 102, 298, 306, 337].

Известные на сегодняшний день антиоксидантные функции оксида азота обеспечиваются, по-видимому, его прямыми эффектами. Так, была продемонстрирована способность оксида азота в газовой и водной фазе вступать в реакции аутооксидации с молекулярным кислородом, продуктами которых являются существенно менее реакционно способные NO_2 и NO_2^- соответственно [185]. Кроме того, высокий интерес к липопероксидации сконцентрировал внимание исследователей на антиоксидантных эффектах оксида азота, проявляющихся в отношении процесса перекисного окисления липидов [279].

Доказано, что оксид азота способен ингибировать перекисное окисление липидов, взаимодействуя с радикалом липидной перекиси и прерывая тем самым развитие реакции [304]:



Отдельное место в изучении антиоксидантных свойств оксида азота занимает изучение его способности реагировать с металлами и их комплексами, в первую очередь с гемовым и негемовым железом [195, 237, 238]. Наиболее изученным в настоящее время является формирование динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [10]:



Формирование такого рода комплексов, с одной стороны, способствует связыванию ионов железа, уменьшая тем самым возможности их участия в окислительных реакциях [195, 203], кроме того, оказалось, что ДНКЖ обладают собственными антиоксидантными эффектами: дозозависимо активируют антиоксидантные ферменты [18, 19], ингибируют перекисное окисление липидов [4], эффективно взаимодействуют с супероксидными радикалами при разных значениях парциального давления кислорода, включая условия глубокой гипоксии [13]. Все вышеизложенное, а также представления о ДНКЖ как о транспортной и стабилизирующей форме оксида азота [168], способной доставлять его к тканям с повышенной потребностью, формирует в настоящее время новое направление по изучению возможности создания на основе ДНКЖ терапевтических препаратов [10, 80].

Следует отметить, что, в отличие от прооксидантных эффектов, антиоксидантное действие оксида азота в отношении белков на данный момент практически не изучено.

Таким образом, оксид азота в настоящее время признан одной из ключевых сигнальных молекул с множественными биологическими эффектами [296, 311], прогрессивное расширение представлений о которых порождает интерес к механизмам регуляции его образования.

Основным механизмом генерации оксида азота у млекопитающих является реакция преобразования гуанидиловой группы L-аргинина, катализируемая NO-синтазами (NOSs, EC 1.14.13.39).

В настоящее время описано три главных изоформы NOS млекопитающих [386] – нейрональная (NOS1, nNOS), индуцибельная (NOS2, iNOS) и эндотелиальная (NOS3, eNOS), кодируемых тремя отдельными генами [186, 288, 341, 380] (Таблица 2).

Таблица 2

Изоформы NOS млекопитающих (цит. по [93])

	nNOS (NOS1)	iNOS (NOS2)	eNOS (NOS3)
Хромосомная локализация	12q24.2-12q24.3 12 хромосомы	17cen-q11.2 17 хромосомы	7q35-7q36 7 хромосомы
Структура и размер гена	29 экзонов, 28 интронов	26 экзонов, 25 интронов	26 экзонов, 25 интронов
Количество аминокислот	1434	1153	1203
Молекулярная масса, кДа	161	131	133

Все изоформы NOS являются монооксигеназами, катализирующими превращение L-аргинина в эквивалентное количество NO и L-цитрулина при участии NADPH и O₂:



Данный процесс является двухэтапным (Рисунок 4): субстрат (L-аргинин) преобразуется в N-гидрокси-L-аргинин, который затем превращается в цитруллин с выделением NO. При этом атом азота создаваемой молекулы NO происходит из гуанидиновой группы L-аргинина, а атом кислорода – из участвующего в реакции O₂.

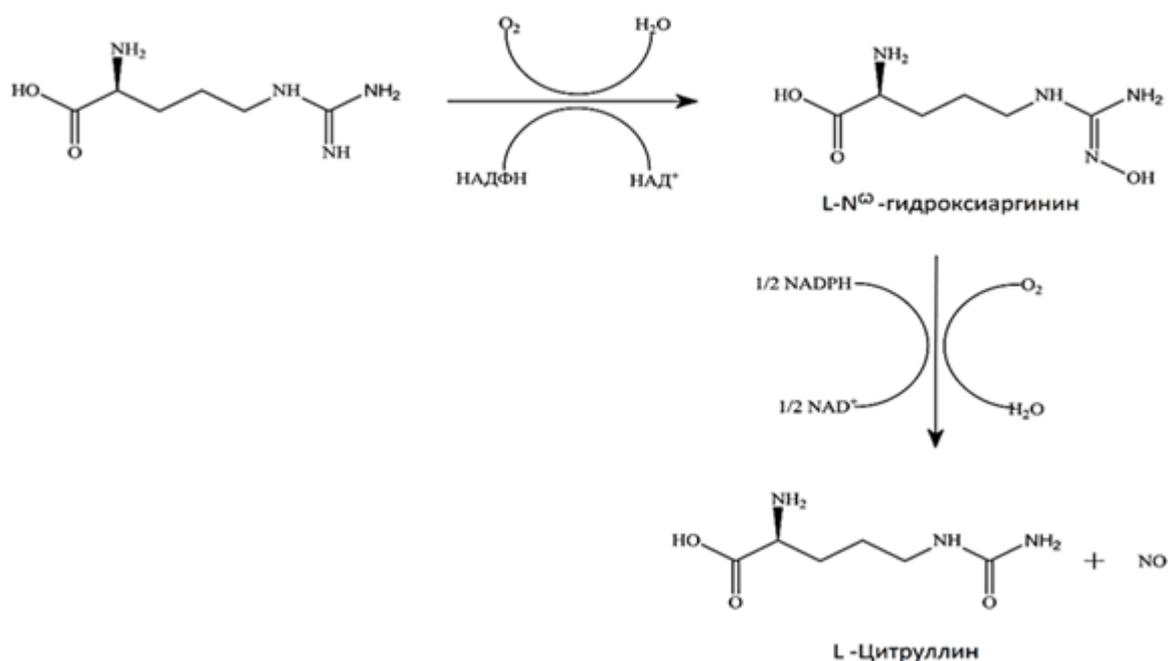


Рисунок 4. Образование оксида азота в реакции, катализируемой NOS (цит. по [17])

Структурно общим для всех изоформ NOS является двухдоменное строение с наличием оксигеназного домена на N-терминальном участке и редуктазного домена на C-терминальном участке (Рисунок 5). Оксигеназный домен содержит участки связывания для гема, 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (BH_4) и L-аргинина, а редуктазный домен для никотинамид-адениндинуклеотидфосфата (НАДФН), флавин-адениндинуклеотида (ФАД) и флавинмононуклеотида (ФМН). Оксигеназный и редуктазный домены соединены между собой кальмодулин-связывающей аминокислотной последовательностью [181]. Важнейшим условием для проявления энзиматической активности любой изоформы NO-синтазы является димеризация двухдоменных мономеров, при этом формировании и стабилизации холодимеров участвуют оксигеназные домены и связанные с ними гем, BH_4 и L-аргинин [317, 384].

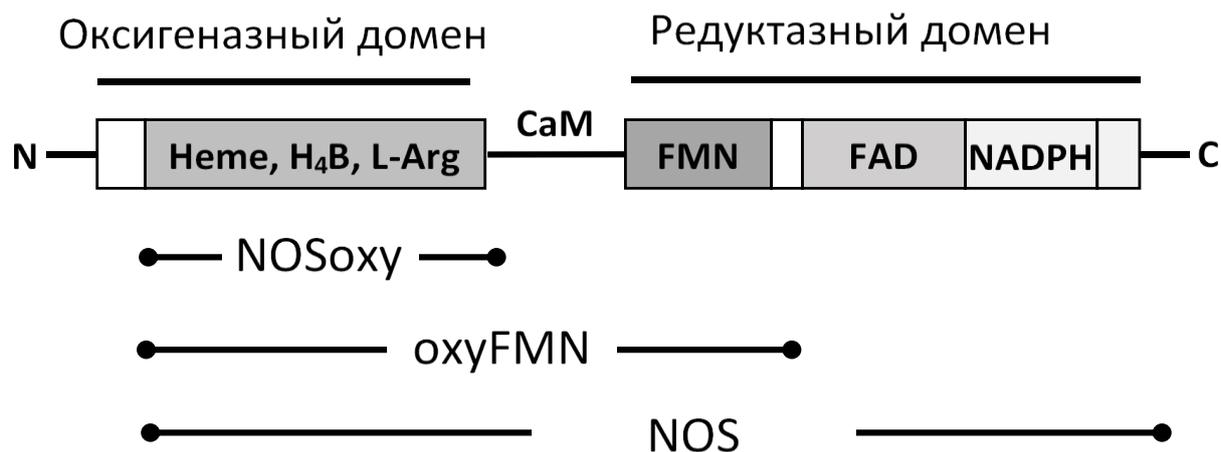


Рисунок 5. Схематическое изображение мономера NO-синтазы (NOS) (цит. по: [181])

Изоформы NO-синтазы, имея структурную и функциональную общность, различаются как по локализации, так и по особенностям экспрессии и регуляции активности. Так, названные по первично обнаруженной локализации нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS) изоформы по своей экспрессии относятся к конститутивным (kNOS): их синтез и, как следствие, содержание в клетках являются постоянными и не зависящими от изменения обменных процессов [187]. Действие указанных изоформ обеспечивает генерацию оксида азота в первую очередь в нейронах и эндотелии соответственно, обеспечивая его участие в нейротрансмиссии [427] и регуляции тонуса сосудов [171].

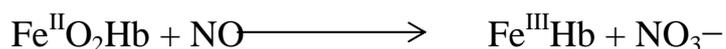
При этом индуцибельная NO-синтаза (iNOS) присутствует во множестве клеток и тканей лишь в следовых концентрациях и основным путем регуляции ее активности является модулирование экспрессии на транскрипционном и посттранскрипционном уровне [351]. Основной функцией iNOS в настоящее время считается участие в иммунной защите посредством синтеза оксида азота как противовоспалительного агента [142, 409].

Следует отметить, что представления о локализации, способах регуляции и биологической роли NO-синтаз постоянно расширяются. Так, в последнее время не теряющее актуальности направление по изучению роли оксида азота в контроле тонуса сосудов и реологии крови обогатилось формированием

представлений о значимости циркулирующего пула оксида азота, формируемого в основном через активность эндотелиальной NO-синтазы [346]. При этом оказалось, что активность данного фермента связана не только с эндотелиоцитами, но и с некоторыми популяциями лейкоцитов [287], а также с циркулирующими микровезикулами [141], и, возможно, с тромбоцитами [314, 364]. Особое же значение в последние годы придается вкладу в формирование циркулирующего пула NO и его метаболитов эндотелиальной NO-синтазы, обнаруженной в эритроцитах [210]: оказалось, что e-NOS-зависимая продукция оксида азота в этих клетках реализуется при нормоксии, а сниженная экспрессия фермента ассоциирована с сердечно-сосудистой патологией [148].

Помимо NO-синтазных реакций в формирование тканевого и плазменного пула монооксида азота могут вносить свой вклад процессы его трансформации в биологически не активные метаболиты и возобновления по NOS-независимым механизмам.

Неактивными метаболитами оксида азота считаются нитрит-анион (NO_2^-) и нитрат-анион (NO_3^-), образующиеся самопроизвольно в ходе одно- и двухэлектронного окисления NO соответственно. Дополнительно, преобразование NO в NO_2^- может катализироваться церулоплазмином в плазме крови [136] и цитохром с оксидазой в тканях [145]. Также известна способность циркулирующих эритроцитов активно захватывать NO из плазмы крови и преобразовывать его в нитратный анион (NO_3^-) в быстропротекающей реакции с переходом оксигемоглобина в метгемоглобин, что считается важным физиологическим механизмом, лимитирующим сосудорасширяющее действие NO [406]:



Помимо эндогенного образования, некоторое количество NO_2^- поступает в организм с пищей (например, с консервированным мясом), кроме того, содержащийся в зеленых листовых овощах NO_3^- восстанавливается до NO_2^- бактериями ротовой полости и кишечника, а также (в меньшей степени) под действием ксантиноксидазы в клетках печени [86]. Таким образом, в организме

преобладающим метаболитом оксида азота можно считать нитрит-анион (NO_2^-), концентрации которого находятся в области микромолярных в тканях (1-20 μM) и наномолярных в крови (100-200 nM) [370]. Следует отметить, что, несмотря на физиологическую инертность, NO_2^- в настоящее время уже не рассматривается как конечный, необратимый продукт превращения оксида азота.

Так, В.П. Реутовым и соавторами была предложена концепция цикла оксида азота, описывающая возможность неферментативного восстановления его метаболитов NO_2^- и NO_3^- до исходного вещества (NO) с участием электронодонорных систем [65]. В дальнейшем было обнаружено, что восстановление NO_2^- в NO может катализироваться множеством белков, проявляющих так называемую нитрит-редуктазную активность: гемпротеиды (гемоглобин, миоглобин, нейроглобин) [159, 208, 313], молибден-содержащие ферменты (ксантинооксидаза, альдегидоксидаза, сульфитооксидаза) [138, 251], комплексы III и IV дыхательной цепи митохондрий [312], и даже NOS [309]. Хотя механизмы нитрит-редуктазного действия указанных белков объяснены в различной степени, было показано, что оптимальными условиями для ферментативного восстановления NO_2^- в NO являются состояния гипоксии и ацидоза [259, 284].

Таким образом, NO_2^- в настоящее время рассматривается как стабильный резерв биоактивного NO и других АФА, реализуемый, в основном, при гипоксии, когда ферментативная генерация NO под действием NOS, требующая кислорода в качестве субстрата, ограничивается (Рисунок 6).

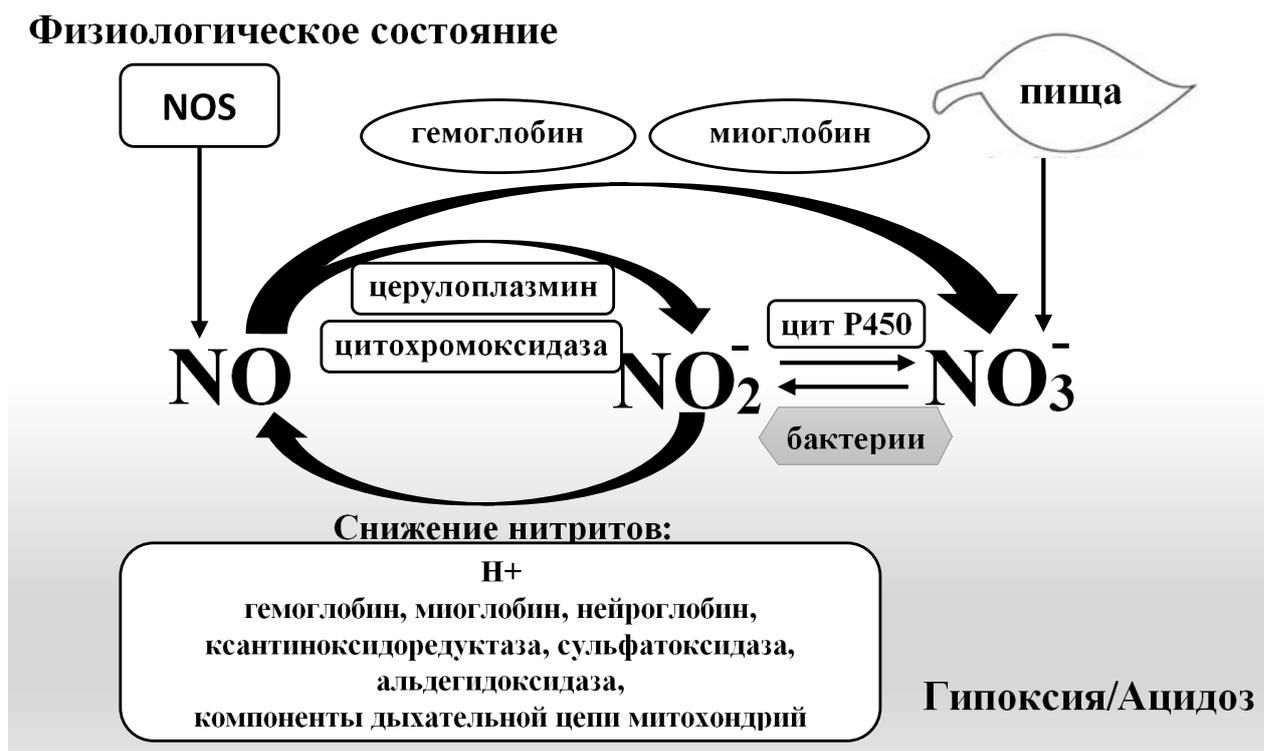


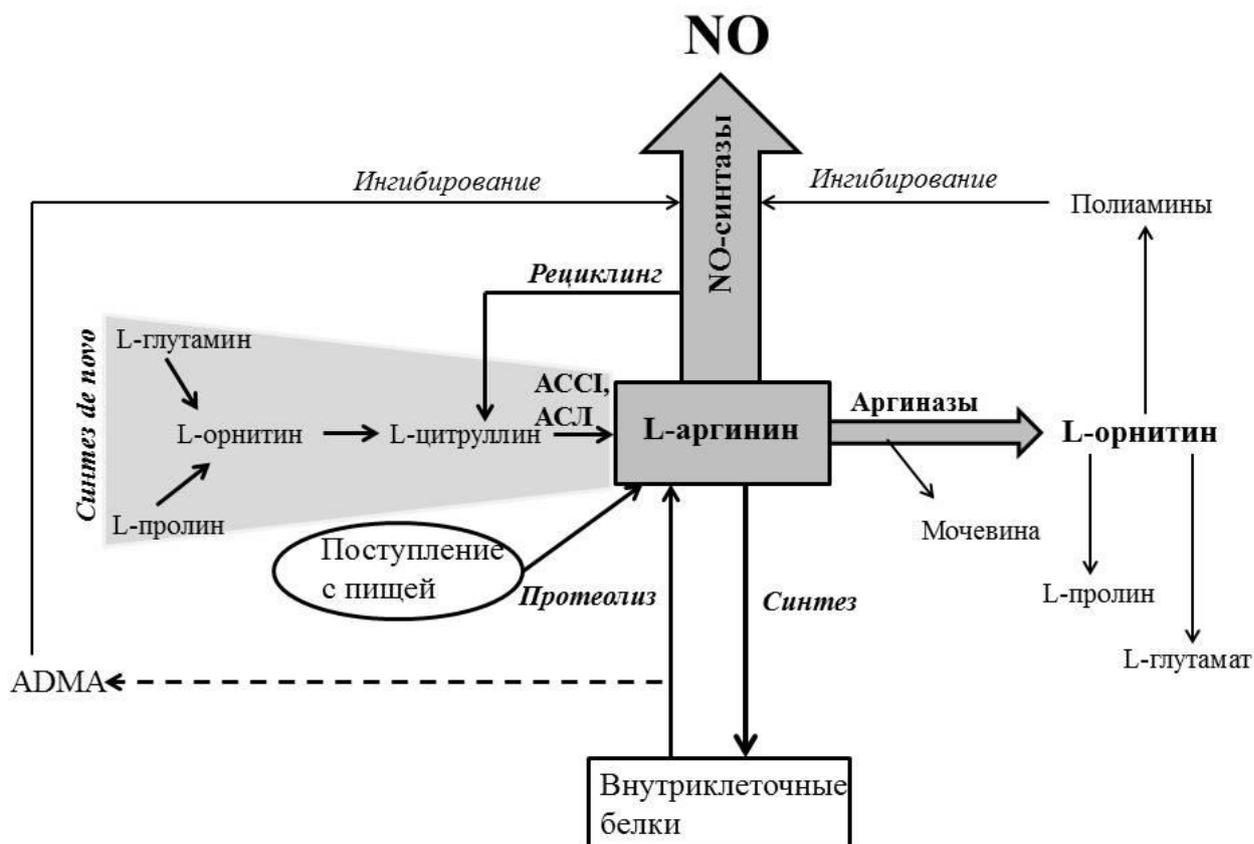
Рисунок 6. Нитрит-NO цикл (цит. по: [370])

На данный момент представления о регуляции образования оксида азота в наибольшей степени связаны с изменениями скорости его ферментативного синтеза по NOS-зависимому пути. Достаточно хорошо изученные на сегодняшний день уровни регуляции включают изменение скорости и локализации транскрипции изоформ NOS, действие белковых модуляторов активности фермента (кальмодулин, белковый ингибитор NO-синтазы – PIN, белки теплового шока – Hsp90), посттрансляционное фосфорилирование [93]. Интерес исследователей в этой области сохраняется, при этом в настоящее время активно изучается возможность влияния на уровень генерации оксида азота через изменение доступности субстрата реакции – L-аргинина.

Данное направление можно условно подразделить на исследования, касающиеся непосредственно метаболизма L-аргинина и исследования, касающиеся влияния L-аргинина и его аналогов на активность NO-синтаз.

L-аргинин, являясь источником ферментативной генерации NO в NOS-содержащих биологических системах, является в то же время частью сложных метаболических путей [193, 292, 342], что может отражаться на его доступности в

качестве субстрата синтеза оксида азота, а также на активности NO-синтаз (Рисунок 7).



Примечание: ACC1 – аргининосукцинат-синтетаза I; AGL – аргининосукциат-лиаза; ADMA – асимметричный диметиларгинин

Рисунок 7. Основные источники и пути использования L-аргинина у млекопитающих (адаптировано из: [193, 292])

Наиболее значимыми для регуляции ферментативного синтеза NO являются следующие аспекты обмена L-аргинина [342]:

1. *De novo*- биосинтез L-аргинина, являющийся 3-х этапным процессом: 1) биосинтез L-орнитина из L-глутамина и L-пролина; 2) синтез L-цитруллина из L-орнитина; 3) синтез L-аргинина из L-цитруллина [175, 193] и ресинтез L-аргинина из L-цитруллина, образующегося в NO-синтазной реакции [291, 411]. Завершающая реакция синтеза и ресинтез L-аргинина обеспечиваются активностью цитозольных ферментов аргининосукцинат-синтетазы I (ACC1) и

аргининосукцинат-лиазы (АСЛ). Реакция, катализируемая АСЛ является скоростью-лимитирующей и использует L-аспартат в качестве дополнительного субстрата. Значимость указанной реакции для обеспечения NOS субстратом стала особенно ясна после обнаружения со-локализации и со-экспрессии ее ферментов с изоформами NO-синтазы [135, 300, 342].

2. Транспорт L-аргинина в клетки. Данный аспект обеспечивается работой специфических (специфические белки-транспортёры катионных аминокислот, CATs) и неспецифических (гетеромерные транспортёры аминокислот, NATs) транспортных белков с регулируемой экспрессией [134]. Кроме того, описана способность ряда веществ лимитировать поступление L-аргинина в клетки: так, показана способность поликатионных пептидов, высвобождающихся из активированных эозинофилов, снижать образование NO через ограничение биодоступности L-аргинина [202] и способность L-орнитина конкурировать с L-аргином за специфические транспортные белки [256].

3. Расходование пула L-аргинина, связанное с активностью аргиназ. Аргиназы, катализирующие гидролиз L-аргинина до L-орнитина и мочевины в цикле ее синтеза, помимо гепатоцитов, экспрессируются множеством других клеток [291], где продукт реакции L-орнитин является предшественником синтеза полиаминов, пролина и глутамата [292]. При этом аргиназы способны конкурировать с NO-синтазами за общий субстрат, снижая продукцию монооксида азота [137]. Дополнительно, оказалось, что образующиеся из L-орнитина полиамины, являющиеся регуляторами деления и дифференцировки клеток [321], способны лимитировать синтез NO и транспорт L-аргинина [293].

Значительный прогресс в изучении механизмов нарушения продукции оксида азота, ассоциированных большей частью с эндотелиальной дисфункцией и вызываемыми ею кардиоваскулярными рисками [176], был достигнут при разработке направления, касающегося изучения эффектов производных L-аргинина – метиларгининов, оказавшихся патогенетически значимыми эндогенными ингибиторами NO-синтазы [115]. Описанные на данный момент метиларгинины: N^G, N^G -диметил-L-аргинин (ADMA), $N^G, N^{G'}$ -диметил-L-аргинин

(SDMA) и N^G-монометил-L-аргинин (L-NMMA) являются производными L-аргинина, но образуются при протеолизе внутриклеточных белков, содержащих посттрансляционно метилированные аминокислотные остатки L-аргинина [277]. Имея высокую степень структурной аналогии с L-аргинином, ADMA и L-NMMA способны конкурировать с ним как за активный центр всех изоформ NO-синтаз, так и за связывание с белками-транспортерами, что в сумме приводит к снижению образования оксида азота [125]. Поскольку концентрации ADMA существенно превышают таковые для L-NMMA [281], в качестве основного эндогенного ингибитора образования оксида азота в настоящее время рассматривается именно это производное. На данный момент ADMA признан фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [99, 115], кроме того, обнаружены связи повышения уровня ADMA с патологией почек [109] и легких [260], также постепенно накапливаются сведения о возможной патогенетической роли ADMA при целом ряде других заболеваний [125].

При экспериментальном моделировании имитация действия эндогенных ингибиторов-аналогов L-аргинина достигается в основном использованием синтетического конкурентного неселективного ингибитора NO-синтаз N^o-нитро-L-аргинина (L-NA) и его метилового эфира (L-NAME). Эстерификация по карбоксильной группе повышает водорастворимость ингибитора, но для развития полного биологического эффекта L-NAME требуется гидролиз при участии специфической эстеразы, что может уменьшать ингибиторное воздействие вещества для ряда тканей [17].

Таким образом, высокая биологическая активность оксида азота и значимость формирования его адекватного пула для целого ряда физиологических и патологических процессов поддерживает внимание исследователей к изучению механизмов тканевых и клеточных реакций при состояниях, сопряженных с изменениями образования NO.

1.3. Факторы и механизмы управления активностью лизосомальных цистеиновых протеиназ

Лизосомальный протеолиз в настоящее время признан важнейшим механизмом внутриклеточной деградации белков, наряду с убиквитин-протеасомной системой [140]. В настоящее время описано порядка 50 лизосомальных гидролаз, среди которых наибольшее значение придается аспартильным, сериновым и цистеиновым протеиназам [118]. Основное внимание исследователей привлекает группа лизосомальных цистеиновых протеиназ (ЛЦП, цистеиновые катепсины), представляющая собой часть С1- семейства папаино-подобных протеолитических ферментов [419]. Известно 11 цистеиновых катепсинов (В, С, F, Н, К, L, О, S, V, X, W) [156], однако широко распространенными и активно изучаемыми являются катепсины В, Н, L, участвующие в деградации не только внутри-, но и внеклеточных белков [417, 423].

Более чем 20-летнее пристальное внимание к лизосомальным цистеиновым протеиназам позволило получить практически исчерпывающие сведения об их структуре и субстратной специфичности [87, 151, 359, 388, 401], а также о механизмах связывания и превращения субстратов [356, 381, 412]. При этом непрерывно расширяющиеся представления об участии представителей данной группы ферментов в целом ряде физиологических и патологических процессов [130, 146, 262, 270, 405] поддерживают интерес исследователей к механизмам управления активностью ЛЦП.

Общей чертой структуры цистеиновых катепсинов является двухдоменное строение, в котором L-домен содержит каталитический Cys25, а R-домен – каталитический His159 (для катепсина L – His163); при укладке доменов формируется V-образная «реакционная щель» активного центра, в центре которой располагается сформированная каталитическими остатками цистеина и гистидина тиолят/имидазольная пара (Рисунок 8) [156].

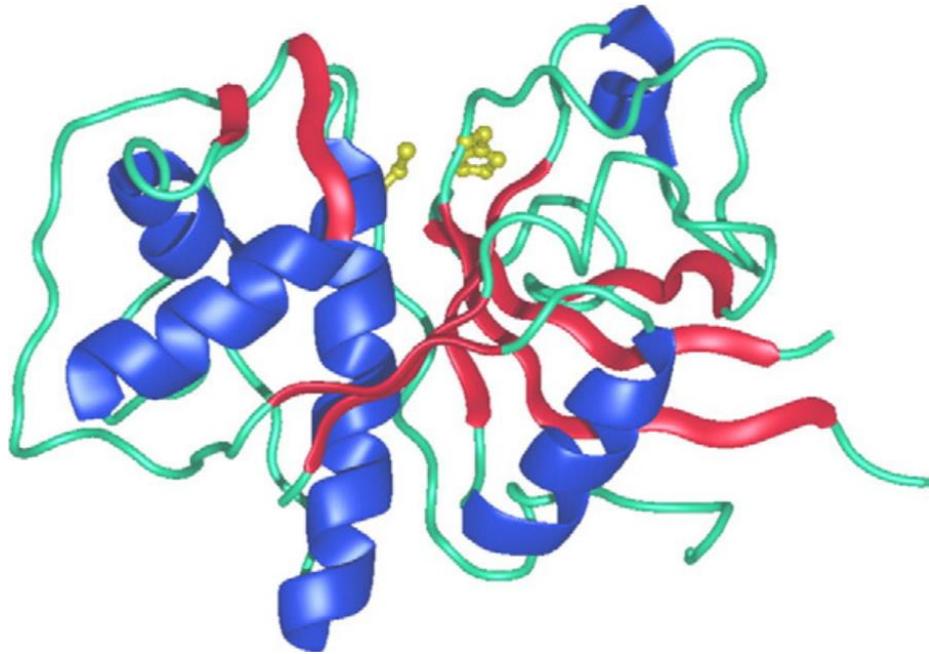


Рисунок 8. Структура цистеиновых катепсинов на примере катепсина L (цит. по: [155])

Тиолят/имидазольная пара активного центра обеспечивает каталитический механизм разрыва пептидной связи в субстрате с переносом протона между Cys25 и His159 (His163) (Рисунок 9) [264].

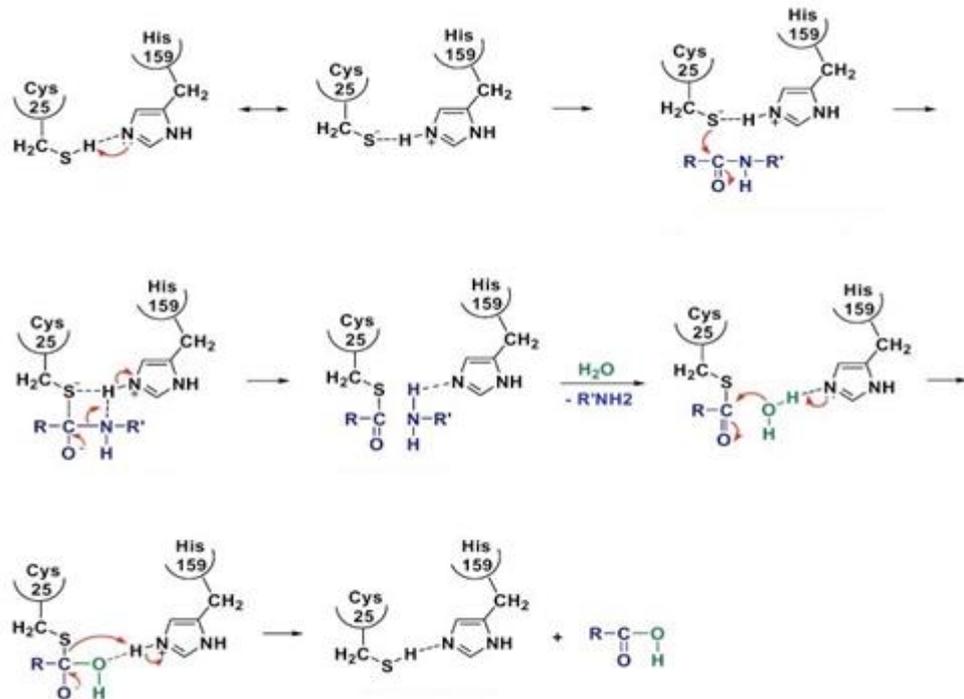


Рисунок 9. Механизм каталитического действия тиолят/имидазольной пары на примере папаина (цит. по [264])

Большинство цистеиновых катепсинов проявляют преимущественно эндопептидазную активность, за исключением катепсинов X и C, являющихся карбоксипептидазой и аминопептидазой соответственно [149, 382]. При этом катепсин H дополнительно к эндопептидазной способен проявлять аминопептидазную активность, а катепсин B – карбоксипептидазную [156]. Эти дополнительные свойства обеспечиваются особенностями структуры указанных катепсинов (Рисунок 10): при сохранении строения, характерного для папаина и классических эндопептидаз (например, катепсина L), структура катепсина B содержит дополнительную последовательность «окклюзионной петли» [87], а структура катепсина H – последовательность, получившую название «мини-цепь» [151].

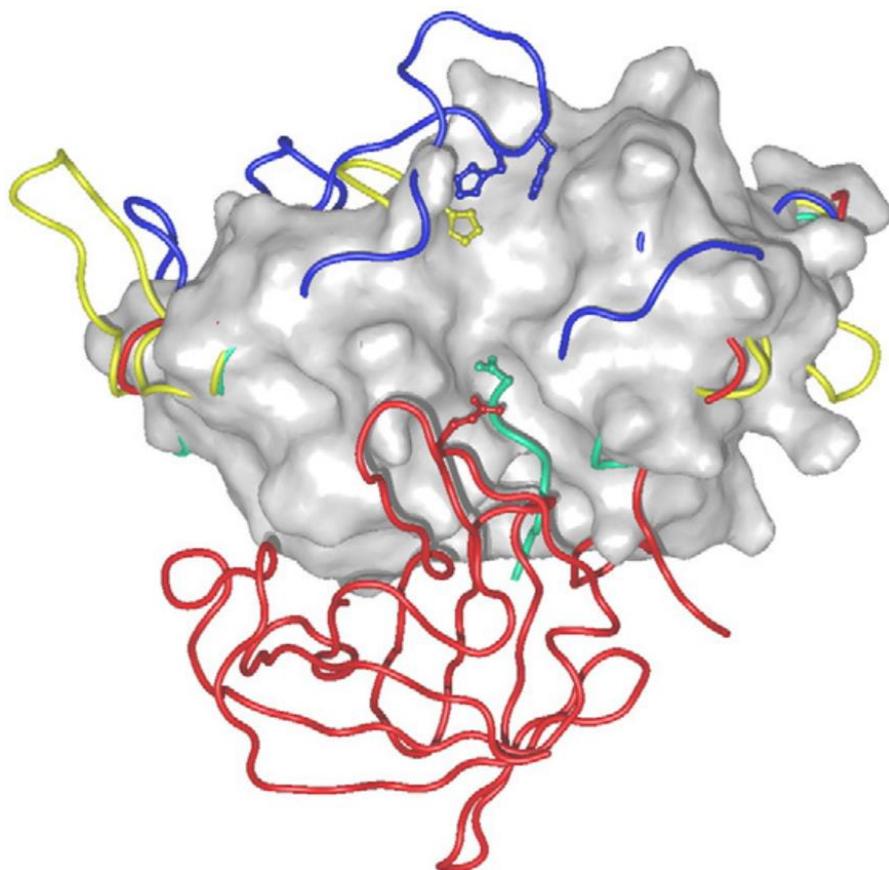


Рисунок 10. Схематическое представление дополнительных структур, создающих экзопептидазную активность цистеиновых катепсинов: относительно поверхности эндопептидазы катепсина L показаны уникальные последовательности катепсина B (синим), H (зеленым), X (желтым) и C (красным) (цит. по: [156])

На сегодняшний день известно, что поддержание адекватного функционирования ЛЦП обеспечивается комплексом регуляторных факторов, среди которых наибольшее значение придается факторам активации проферментов и обширной группе белковых и низкомолекулярных ингибиторов [156, 371, 418].

Лизосомальные катепсины синтезируются в форме препроэнзимов. Отщепление сигнального N-концевого пептида происходит при переносе к эндоплазматическому ретикулуму параллельно с N-концевым гликозилированием. После удаления сигнального пептида пропептид способствует правильному фолдингу фермента и его направлению в эндосомы/лизосомы с использованием специфического маннозо-6-фосфат-рецепторного пути, одновременно действуя как ингибитор протеолитической активности [200, 362, 429]. Для перехода в энзиматически активную форму требуется отделение N-концевого пропептида.

Изучение структуры прокатепсинов [153, 383] продемонстрировало, что пропептидная последовательность располагается на поверхности молекулы, проходя сквозь «щель» активного центра и делая его недоступным для связи с субстратами. У большинства катепсинов пропептид удерживается на поверхности фермента слабыми гидрофобными и водородными связями, а также солевыми мостиками; исключением является только катепсин X, в котором обнаружены ковалентные дисульфидные связи между остатками цистеина пропептидной последовательности и активного центра [150].

Известно, что протеолитическое отщепление N-концевого пропептида, приводящее к окончательному формированию активной формы цистеиновых катепсинов, может катализироваться как другими цистеиновыми протеиназами, так и аспартильным катепсином D, кроме того, для большинства представителей группы возможен аутокаталитический процессинг [156].

Изначально считалось, что аутокаталитический процессинг цистеиновых катепсинов является бимолекулярным [101], однако в настоящее время доказано, что данный механизм представляет собой результат комбинированного действия

моно- и бимолекулярных процессов. Так, продемонстрировано, что прокатепсин В проявляет слабую каталитическую активность, которой, однако, достаточно для запуска аутокаталитической активации – для проявления этой активности требуется диссоциация пропептида от активного центра, достигаемая, например, при значении рН ниже 5,0, и это, фактически, является единственной мономолекулярной реакцией [100]. На следующем этапе, являющемся уже бимолекулярным, эта каталитически активная молекула профермента расщепляет и активирует другие прокатепсины, запуская цепную реакцию, результатом которой является быстрый переход имеющихся проэнзимов в активную форму [156]. Важно отметить, что в соответствии с вышеописанным механизмом, к аутокаталитическому процессингу способны только цистеиновые катепсины с эндопептидазной активностью (В, Н, L, S и К), процессинг экзопептидаз (в частности, катепсинов С и Х) осуществляется эндопептидазами, в большей степени катепсинами L и S [209].

Дальнейшие исследования продемонстрировали, что аутокаталитический процессинг цистеиновых катепсинов существенно ускоряется в присутствии отрицательно заряженных молекул, таких как гликозаминогликаны (ГАГ) за счет облегчения диссоциации пропептида от активного центра, необходимого для запуска процесса, и улучшения связывания проферментов с активными формами [190]. Особенно важной оказалась способность ГАГ способствовать аутокаталитической активации цистеиновых катепсинов в нейтральных значениях рН [348], что имеет существенное значение для проявления их внеклеточной, особенно коллагенолитической, активности, вовлеченной в патогенез ряда патологий [184]. Кроме того, изучение коллагенолитической активности цистеинового катепсина К [252] обнаружило способность ГАГ выступать и в качестве аллостерических регуляторов [144, 400]. В итоге, к настоящему моменту сформулирован тезис о том, что ГАГ являются ключевыми регуляторами активности цистеиновых катепсинов [316].

Важной частью протеолитического процессинга цистеиновых катепсинов является селективная ингибиторная функция высвобождаемых N-концевых

пропептидов [332]. Оказалось, что при значительном сходстве каталитически активной части, цистеиновые катепсины имеют существенные отличия в структуре N-концевых пропептидных последовательностей [417], что создает возможность контроля протеолитического процессинга конкретных ферментов без тотального подавления активации.

Суммарное схематическое изображение механизмов протеолитического процессинга цистеиновых катепсинов представлено на Рисунке 11.

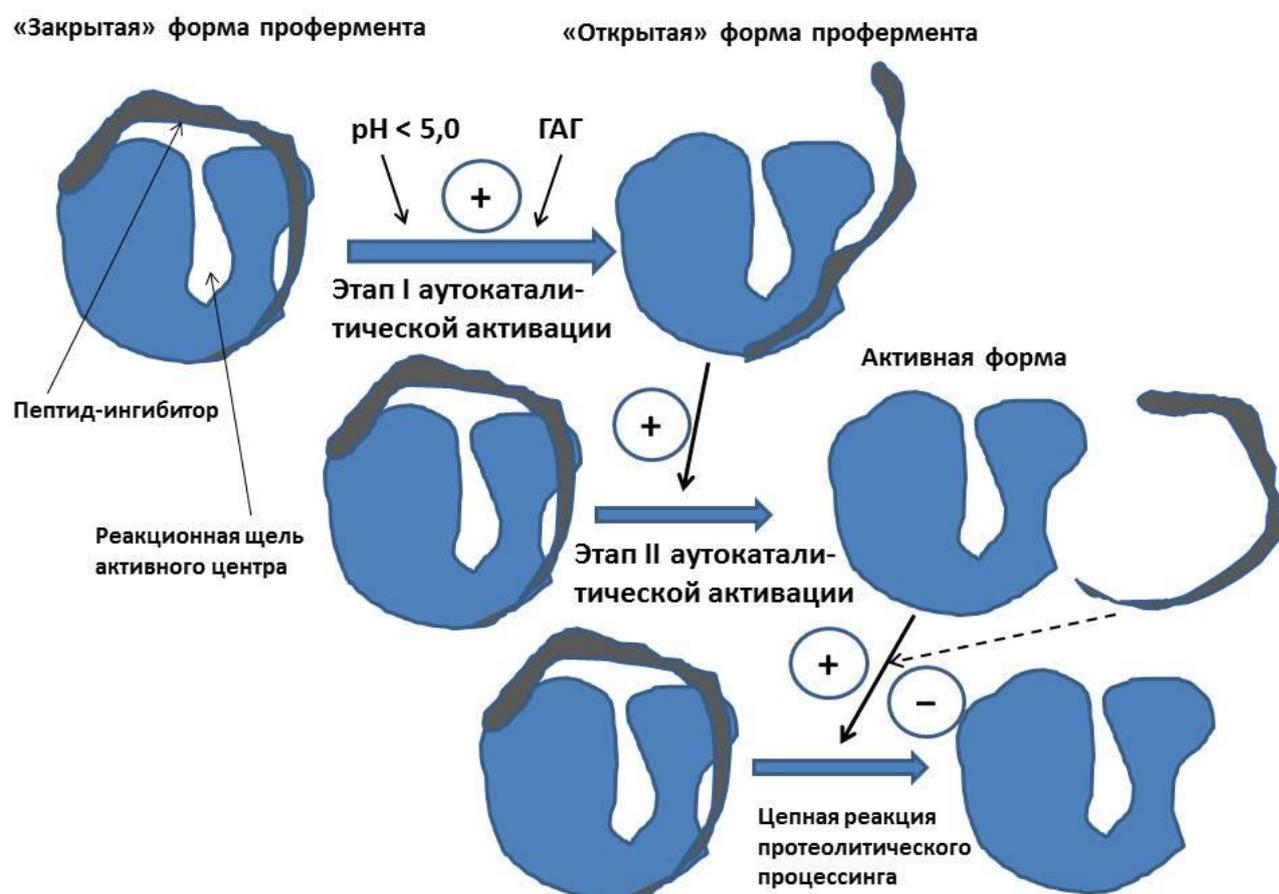


Рисунок 11. Протеолитический процессинг цистеиновых катепсинов и его регуляция

По завершении протеолитического процессинга, дальнейшее управление активностью цистеиновых катепсинов осуществляется многочисленными регуляторами, наиболее изученными среди которых являются эндогенные белковые ингибиторы: цистатины, тиропины и серпины. Все они являются конкурентными обратимыми ингибиторами, предотвращающими связывание

субстратов с активным центром фермента [156]. При этом, изучение физиологической роли белковых ингибиторов продемонстрировало неоднотипность их участия в регуляции активности цистеиновых катепсинов и позволило предложить условное подразделение на «чистые» ингибиторы (emergency inhibitors) и модуляторы активности (regulatory inhibitors) [418]. Типичными представителями «чистых» ингибиторов считаются цистатины, задачей которых является предотвращение избыточной внелизосомальной активности собственных катепсинов [319, 418], а также подавление действия катепсинов патогенных микроорганизмов [155]. Модуляторное действие изучено в меньшей степени, однако показано, что часть белковых ингибиторов способны формировать комплексы с катепсинами в отсутствие субстрата с последующим высвобождением фермента при возникновении потребности в катализе [417].

Известные в настоящее время белковые ингибиторы цистеиновых катепсинов различаются не только по структуре и локализации, но и по взаимодействию с активным центром фермента.

Так, наиболее подробно исследованным является семейство цистатинов [88, 420], включающее в себя 3 типа ингибиторов: стефины (цистатины 1 типа), цистатины (цистатины 2 типа) и кининогены (цистатины 3 типа). Кроме того, описан 4 тип цистатинов, включающий физиологически значимые, но не обладающие ингибиторной активностью в отношении цистеиновых катепсинов белки: фетуины и богатый гистидином гликопротеин [231, 295].

Стефины (цистатины 1 типа) являются преимущественно внутриклеточными ингибиторами, хотя и могут обнаруживаться в биологических жидкостях [156]; присутствуют у большинства эукариот [243].

Гораздо более широко распространенные цистатины (цистатины 2 типа) [243, 420], в отличие от стефинов, содержат сигнальный пептид, что делает их способными к секреции, в результате их основной ингибиторный эффект локализован во внеклеточном пространстве и биологических жидкостях [88]. В качестве представителей этого типа цистатинов настоящее время

идентифицированы цистатин С, цистатины слюны (цистатины S, SA, SN), цистатин D, цистатин E/M и цистатин F (лейкостатин) [422].

В качестве цистатинов 3 типа описаны также преимущественно внеклеточно локализованные кининогены, поскольку оказалось, что тяжелые цепи высоко- и низкомолекулярного кининогена содержат 3 домена, подобные последовательностям цистатинов 2 типа, при этом ингибиторным действием в отношении цистеиновых катепсинов обладают домены 2 и 3 [156]. Интересно, что дальнейшее изучение кининогенов позволило обнаружить их вовлеченность в процессы ангиогенеза и положительную регуляцию функций эндотелия, причем авторы исследований пока не связывают эти эффекты ни с участием кининогенов в каскаде свертывания крови, ни с ингибиторной функцией в отношении цистеиновых катепсинов [204, 242].

Несмотря на некоторые отличия механизмов ингибиторного действия, общей чертой белковых ингибиторов семейства цистатинов является способность действовать как на экзо-, так и на эндопептидазы, блокируя активный центр фермента путем нековалентного взаимодействия на участках связывания субстрата [361, 422]. Степень афинности различных представителей семейства к цистеиновым катепсином при этом различается (Таблица 3).

Второе место по степени изученности среди белковых ингибиторов цистеиновых катепсинов занимают тиропины, среди которых на данный момент описаны фрагмент р41 инвариантной цепи, связанный с классом II молекул главного комплекса гистосовместимости (р41-фрагмент) [272] и белок эквистатин, выделенный из *Actinia equina* [176]. По аминокислотной последовательности оба белка оказались высокоомологичными домену, присутствующему в составе тироглобулина [282], что и дало название этой группе ингибиторов. Хотя роль тиропинов окончательно не ясна, показано, что они способны подавлять активность катепсинов L, V, K и F, а механизм их ингибиторного действия близок к таковому для цистатинов [422].

Значения констант диссоциации (K_i , нмоль) комплексов различных представителей семейства цистатинов с наиболее распространенными цистеиновыми катепсинами (цит. по: [422])

Цистатины	Цистеиновые катепсины			
	Папаин	Катепсин В	Катепсин Н	Катепсин L
Стефин А	0,019	8,2	0,31	1,3
Стефин В	0,12	73,0	0,58	0,23
Цистатин С	0,00001	0,27	0,28	<0,005
Цистатин D	1,2	>1000	7,5	18,0
Цистатин Е/М	0,39	32,0	данные отсутствуют	данные отсутствуют
Цистатин F	1,1	>1000	данные отсутствуют	0,31
Цистатин S	108,0	данные отсутствуют	данные отсутствуют	данные отсутствуют
Цистатин SA	0,32	данные отсутствуют	данные отсутствуют	данные отсутствуют
Цистатин SN	0,016	19,0	данные отсутствуют	данные отсутствуют
L-кининоген	0,015	600,0	0,72	0,017

Серпины, изначально описанные как ингибиторы сериновых протеаз (serine protease inhibitors = serpins), оказались также способными подавлять активность цистеиновых катепсинов, причем ингибиторное действие оказалось селективным [212, 353]. Помимо избирательности действия, серпины отличаются от цистатино-подобных ингибиторов механизмом действия. На примере основных мишеней серпинов – сериновых протеиназ – была продемонстрирована способность ингибиторов формировать ковалентные (эфирные) связи с реакционно значимым остатком серина активного центра фермента, что приводит не только к прочной блокаде активности, но и к нарушению структуры активного центра [211]. Впоследствии подобный механизм взаимодействия был обнаружен и для чувствительных к серпинам цистеиновых протеиназ [225, 372].

Помимо расширения представлений о белковых ингибиторах, значительная часть современных исследований посвящена изучению управления

активностью цистеиновых протеиназ через действие низкомолекулярных веществ, связанная, в основном, с развитием концепции о возможном использовании данной группы ферментов в качестве терапевтических мишеней [174, 371].

По механизму ингибиторного действия известные на данный момент низкомолекулярные ингибиторы подразделяются на необратимые и обратимые (Рисунок 12).

Среди необратимых ингибиторов, общей чертой которых является препятствование связыванию субстрата через образование ковалентных связей с активным центром фермента, первоначально особое внимание уделялось эпоксисукцинатам, включающим базовое вещество E-64 и множество синтезированных на его основе производных. Большая часть эпоксисукцинатов оказалась селективна к нелизосомальным цистеиновым протеиназам кальпаинам [162], однако именно к этой группе относится, в частности, высокоселективный ингибитор катепсина В SA-074 и его аналоги, при этом метиловый эфир – SA-074Me является неактивным [290], а действие восстанавливающих агентов уменьшает селективность SA-074 и придает ингибирующие свойства SA-074Me [377].

Дальнейший поиск ингибиторов, тропных к цистеиновым катепсинам, привел к описанию группы циклических соединений, содержащих оксирановые кольца [365] и азот-содержащие гетероциклы [104], с демонстрацией их ингибиторной активности в отношении катепсинов В и L; исследования в этом направлении продолжаются [165].

Некоторая селективность в отношении цистеиновых катепсинов была обнаружена для фторметил- и хлорметилкетонов, а также для diaзометилкетонов [403], однако в настоящее время большее внимание уделяется активированным кетонам [83, 215, 248, 273].



Примечание: выделенные группы ингибиторов содержат наибольшее количество примеров селективности в отношении цистеиновых катепсинов.

Рисунок 12. Небелковые ингибиторы цистеиновых протеиназ

Особенностью обратимых ингибиторов является формирование нековалентных комплексов с молекулой фермента. Внутри этой группы выделяют ингибиторы, действующие на активный центр фермента, причем связывание с активным центром происходит по конкурентному механизму, на участке потенциального связывания субстрата, либо по бесконкурентному – после связывания с субстратом; другая подгруппа обратимых ингибиторов включает вещества, связывающиеся с аллостерическим центром протеиназы [371].

Среди обратимых ингибиторов, тропных к активному центру цистеиновых протеиназ, наиболее изученными являются альдегидные и трифторметил-кетонные формы пептидов, ингибиторное действие которых на данный момент продемонстрировано в основном для кальпаинов [110, 438], хотя имелись

указания на возможное участие этой группы веществ в качестве ингибиторов катепсинов В и L [224, 369]. Кроме того, описаны ингибиторные свойства α -кето-производных (кето-амидные и кето-гетероциклические соединения), среди которых наиболее перспективными считаются кето-гетероциклы, способные обратимо ингибировать множество протеиназ, в том числе цистеиновые катепсины [276]. α -кето-гетероциклические соединения активно изучались в качестве возможных ингибиторов катепсина К, способных предотвращать его избыточную активность при резорбции костной ткани, при этом выяснилось, что данные соединения могут, хотя и в гораздо меньшей степени, ингибировать катепсины В, L и S [154, 240, 333]. Однако максимальное количество примеров обратимого селективного ингибирования цистеиновых катепсинов продемонстрировала группа нитрилов и карбоксидиимидов [161, 416], в которой обнаружены вещества с ингибиторными свойствами против катепсинов L [169], S [84], К [430] и С [129].

Известные к настоящему времени обратимые аллостерические ингибиторы цистеиновых протеиназ рассматриваются практически только в качестве ингибиторов кальпаинов [385, 392].

Следует отметить, что столь активный поиск, синтез, совершенствование и изучение механизмов действия низкомолекулярных ингибиторов цистеиновых катепсинов имеет перспективную медицинскую значимость, основанную на совершенствовании представлений о вовлеченности этой группы протеиназ в патогенез онкологических [92], нейродегенеративных [329], сердечно-сосудистых [157] заболеваний, а также в процессы ремоделирования костной ткани [318]. На данный момент имеются экспериментальные примеры успешного применения ингибиторов цистеиновых катепсинов с целью подавления опухолевой прогрессии и метастазирования [127, 128], замедления развития симптомов болезни Альцгеймера [206], улучшения прогноза при нейротравме [402].

В целом, активность цистеиновых катепсинов является результатом координированного взаимодействия множества факторов регуляции, важнейшими из которых являются, помимо контроля экспрессии, протеолитический

процессинг и действие ингибиторов. Значительная вовлеченность цистеиновых катепсинов как в физиологические процессы, так и в патогенез распространенных медико-социально значимых заболеваний в сочетании с высокой чувствительностью к регуляции активности делает данную группу ферментов привлекательной потенциальной терапевтической мишенью и требует углубления представлений о факторах и механизмах управления их активностью.

1.4. Современные представления о внелизосомальных эффектах цистеиновых катепсинов и управлении проницаемостью лизосомальной мембраны

Несмотря на то, что основной локализацией цистеиновых катепсинов являются лизосомы, значительное количество исследований на протяжении многих лет посвящено внелизосомальным эффектам данной группы ферментов, что объясняется расширением представлений об их эффектах в патогенезе ряда патологий [156, 174, 417].

Первоначально, внелизосомальные эффекты цистеиновых катепсинов рассматривались практически исключительно как экстрацеллюлярные и связывались с их доказанным участием в расщеплении компонентов внеклеточного матрикса [120] (Таблица 4), что имеет значение в патогенезе остеопороза [434], инвазии злокачественных опухолей [191, 261, 433], частично в кардиоваскулярной патологии [130, 263].

Многочисленные подтверждения наличия внеклеточной активности цистеиновых катепсинов побудили к поиску факторов, дающих возможность этим лизосомальным ферментам, исходно чувствительным к изменениям pH и окислению, эффективно действовать в межклеточном матриксе.

Оказалось, что проявление внеклеточной активности цистеиновых катепсинов является результирующей от действия нескольких факторов (Рисунок 13).

Участие цистеиновых катепсинов в деградации белков внеклеточного матрикса

(цит. по: [120])

Белки внеклеточного матрикса	Цистеиновые катепсины
Протеогликаны	Катепсины В, L, К, S
Коллагены различных типов	Катепсин S – без выделения типов Катепсины В, L – коллагены II, IX, IX Катепсин В – коллагены IV, X Катепсин L – коллаген I Катепсин К – коллагены I, II
Эластин	Катепсины S, К, V, L
Фибронектин	Катепсины В, L, S
Ламинин	Катепсины В, L
Остеокальцин	Катепсины В, L, S
Остеонектин	Катепсины В, К

Так, было обнаружено, что большинство ситуаций, в которых проявляется внеклеточное действие цистеиновых катепсинов, сопряжено с локальным закислением среды межклеточного пространства, что приближает значения рН к оптимальным для действия этих ферментов. В частности, было продемонстрировано приближение рН окологклеточного пространства к значениям 5,0 при артритах [90] и формировании атеросклеротической бляшки [327]; кроме того, для катепсина S показана индукция экспрессии и секреции провоспалительными агентами, при том что развитие воспалительной реакции также сопряжено с закислением среды [226, 426]. Ярким физиологическим примером локального закисления среды, оптимизирующего действие цистеиновых катепсинов является кислото-секретирующая функция остеокластов при формировании резорбционной лакуны [395].

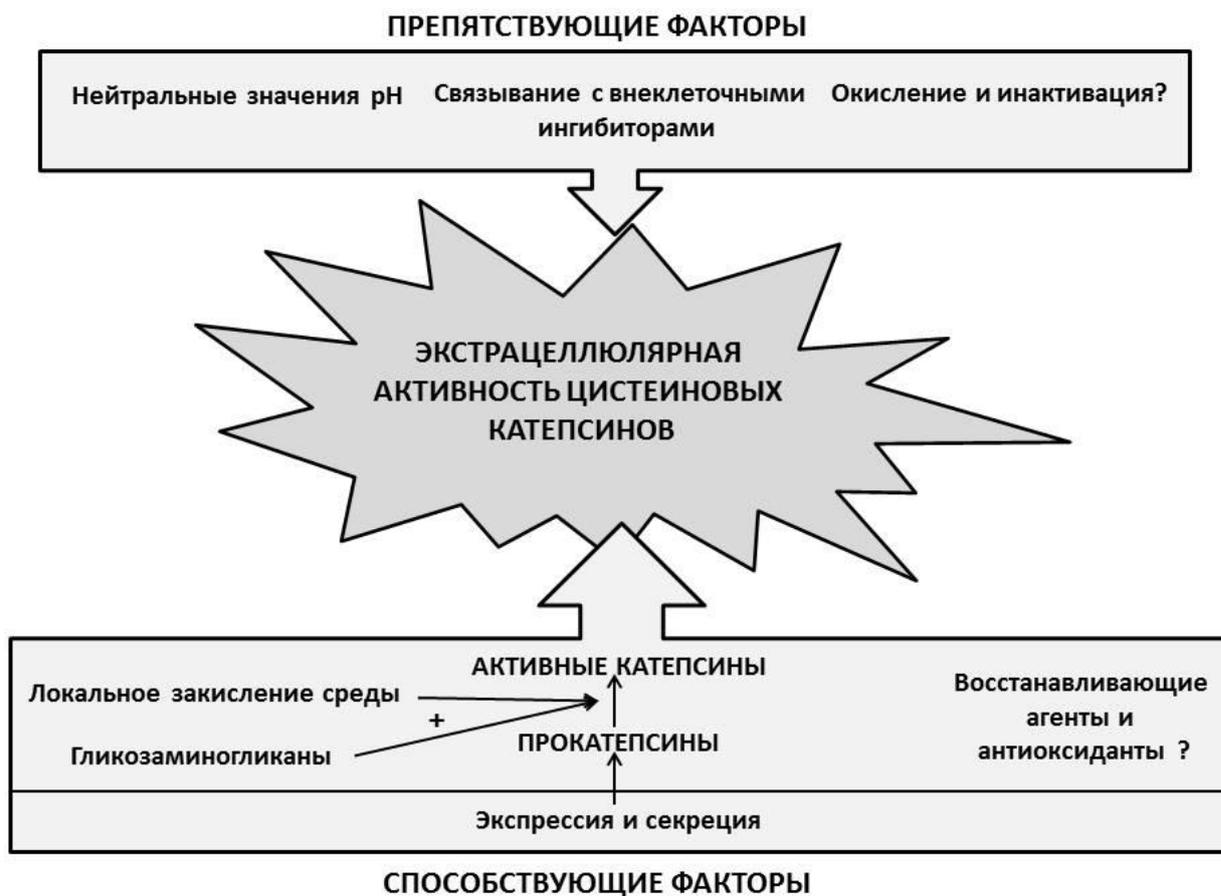


Рисунок 13. Факторы, влияющие на проявление экстрацеллюлярной активности цистеиновых катепсинов

Тезис о том, что наличие цистеина в активном центре ферментов может сделать их высокочувствительными к инактивации путем окисления реакционной группы и тем самым препятствовать проявлениям внелизосомальной активности также не является бесспорным. Обнаружено, что катепсины В, L, К, S способны расщеплять эндогенные субстраты в присутствии окислителей при близких к нейтральным значениям pH [289], также показана возможность частичной обратимости окислительного повреждения в присутствии восстанавливающих агентов [349].

Поскольку известно, что секреция цистеиновых катепсинов в экстрацеллюрное пространство осуществляется преимущественно в проферментной форме [107, 360], значимым фактором возможности проявления их каталитической активности является протеолитический процессинг. Локальное

закисление среды в этом случае создает оптимальные условия как для действия родственных протеиназ и аутокаталитической активации, кроме того, присутствие в межклеточном пространстве гликозаминогликанов существенно ускоряет данный процесс [184], кроме того, гликозаминогликаны способствуют повышению активности цистеиновых катепсинов по аллостерическому механизму [350, 400].

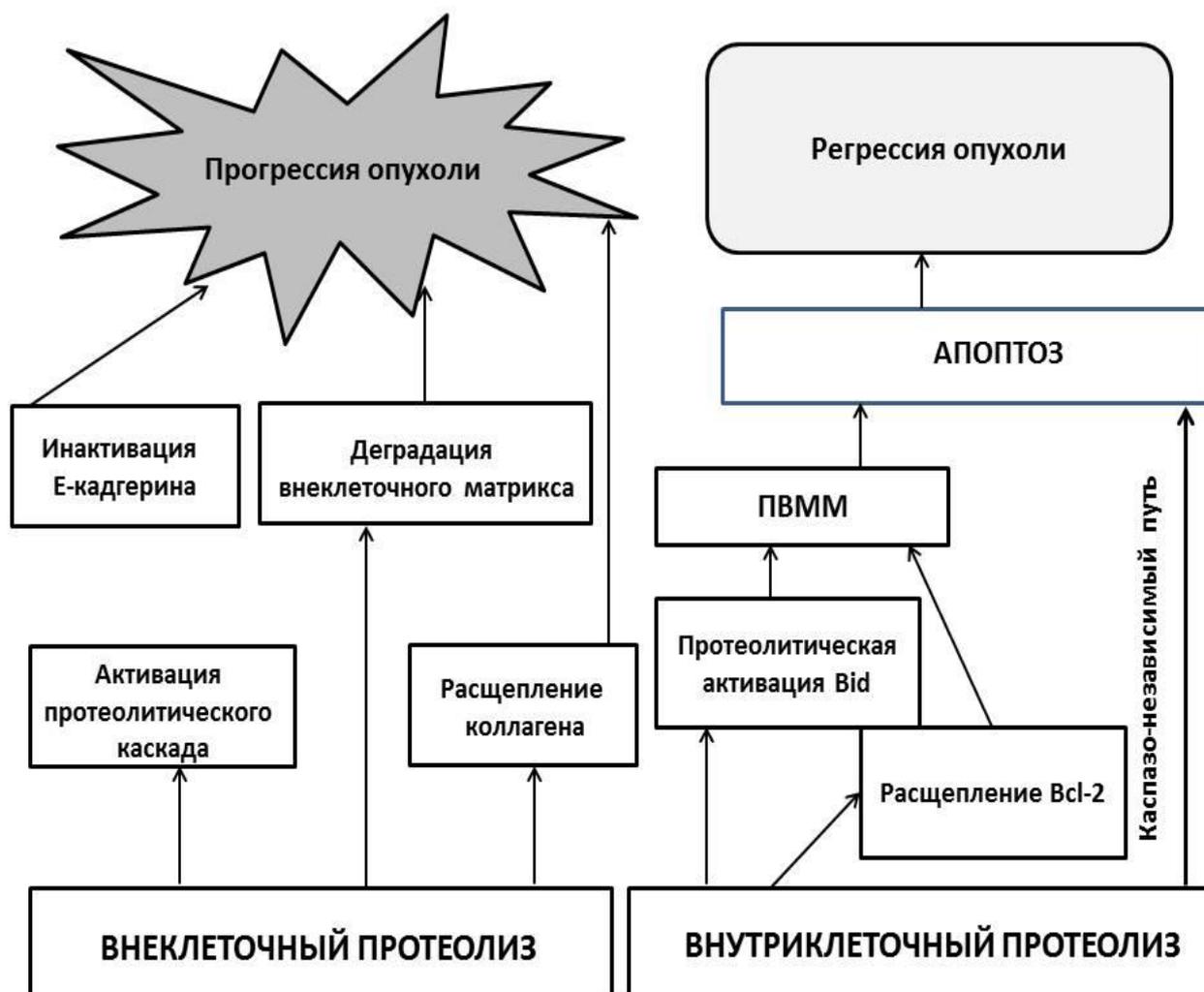
Избыточная экстрацеллюлярная активность цистеиновых катепсинов контролируется внеклеточными белковыми ингибиторами, в основном семейства цистатинов [420], поэтому патогенетически значимым является баланс экспрессии цистеиновых катепсинов и цистатинов [132].

Следует отметить, что расщепление компонентов внеклеточного матрикса осуществляется не исключительно экстрацеллюлярно: целый ряд клеток, включающий макрофаги, остеокласты, фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки, способен к эффективному эндоцитозу белков внеклеточного матрикса [120], при этом дефицит или подавление активности цистеиновых катепсинов приводит к внутриклеточной аккумуляции нерасщепленных волокон коллагена [131].

Хотя изучение экстрацеллюлярного действия цистеиновых катепсинов при остеопорозе [119, 172] и атеросклеротическом поражении [220, 250, 436] не утрачивает своей актуальности, большинство исследований в этой области традиционно связано с вкладом лизосомальных цистеиновых протеиназ в опухолевую прогрессию [191, 286, 421].

В ходе этих исследований, помимо уточнения механизмов участия цистеиновых катепсинов в инвазии и метастазировании, были получены сведения о возможностях использования показателей экстрацеллюлярной активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в качестве прогностических и диагностических маркеров [158, 164]. Вторым существенным прогрессом, достигнутым в ходе исследований, оказалось обнаружение внутриклеточных внелизосомальных эффектов цистеиновых катепсинов, внимание к которым привело к формированию нового научного направления, описывающего эффекты

цистеиновых катепсинов в развитии процессов программируемой клеточной смерти [198, 378] и изменило представления о роли данной группы ферментов в прогрессии злокачественных новообразований (Рисунок 14).



ПВММ – пермеабилзация внешней мембраны митохондрий

Рисунок 14. Внелизосомальный протеолиз в развитии злокачественных новообразований (по [156] с изменениями)

Так, наиболее изученной к настоящему моменту является способность цистеиновых катепсинов после высвобождения из лизосом запускать классический митохондриальный путь апоптоза через протеолитическую активацию Bid [170] и каспазные механизмы [270]; способность к ограниченному протеолизу Bid была продемонстрирована для катепсинов B, H, K, L, S [366]. Кроме того, цистеиновые катепсины способны расщеплять антиапоптотические белки семейства Bcl-2, что также приводит к митохондриальному варианту

апоптоза [156], также показано участие цистеиновых катепсинов в активации каспаз [112, 297, 368].

В настоящее время формируются представления об участии цистеиновых катепсинов в каспазо-независимом апоптозе и кальпаиновом пути клеточной гибели [126, 367, 368, 376].

Значительный интерес к внелизосомальным эффектам цистеиновых катепсинов, для которых, в соответствии с логистикой синтеза и транспорта, базовой локализацией являются лизосомы [258, 269], диктует необходимость детального изучения механизмов управления проницаемостью лизосомальной мембраны, без которых достижение внелизосомального действия оказалось бы невозможным. В связи с развитием представлений об участии лизосомальных ферментов в апоптозе, особенное значение в настоящее время приобретает изучение механизмов прижизненной проницаемости (пермеабиллизации) лизосомальной мембраны (ПЛМ), позволяющей цистеиновым катепсинам перемещаться в цитозоль без морфологического повреждения лизосом [63, 352].

Следует отметить, что активное изучение механизмов ПЛМ началось относительно недавно, поэтому полноценные представления о процессе на данный момент отсутствуют. Тем не менее, прогрессивно растет количество исследований в этой области, а также начинают систематизироваться ранее полученные разрозненные сведения.

Так, было обнаружено, что некоторые вирусы обладают повреждающим действием на мембрану лизосом. Вирусы доставляют свои гены в клетку путем проникновения в эндосомальную мембрану при помощи белков оболочки, которые становятся активными в кислой среде [89, 257]. Проникновение безоболочечных вирусов, как правило, достигается путем эндосомального разрыва мембраны (например, аденовирус и риновирус HRV14) или порообразования (например, риновирус HRV2 и полиовирус) [428]. Литический белок VI мембраны аденовируса вызывает повреждение лизосомальной мембраны вследствие изменения её структуры [95, 431]. Кроме того, вирусные капсидные белки HRV2 и белки полиовируса способны напрямую встраиваться в

эндолизосомальную мембрану и формировать поры определенного размера [188]. Мембрану лизосом могут повреждать вирусные катионные пептиды (например, ВИЧ - 1 Tat пептид), которые после протонирования в кислой среде приобретают поверхностно-активные свойства [278, 399].

Кроме того, индукторами ПЛМ могут служить бактериальные токсины, например, токсин возбудителя сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) [301] и пиоцианин синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) [389].

Также известно, что белок p53 вызывает раннюю ПЛМ. Например, в клетках миелоидной лейкемии достаточно активировать чувствительный к температуре p53, чтобы вызвать ПЛМ, предшествующую ПВММ [265]. Данному процессу способствует белок – адаптор LAPF [91]. Возможно, в этом случае ПЛМ происходит за счет формирования мембранных пор [63].

Поскольку основным стимулом к изучению ПЛМ является необходимость выяснения «лизосомальных» аспектов апоптоза, в настоящее время начинают накапливаться сведения о влиянии белковых медиаторов апоптоза на дестабилизацию лизосомальной мембраны. Оказалось, что проапоптотические белки из семейства Bcl-2 не являются существенными для индукции ПЛМ [105, 218], однако, они могут способствовать ПЛМ в некоторых модельных системах, как описано для белка tBid в ФНО-обработанных гепатоцитах [199]. Кроме того, было высказано предположение, что Bid привлекает к участию в ПЛМ активированный Вах в гепатоцитах, обработанных TRAIL (ФНО-опосредованный фактор индукции апоптоза) [112]. Кроме того, имеются данные о роли Vim в ацидификации лизосом [410], что может косвенно способствовать ПЛМ [216].

Также известна ПЛМ-индуцирующая способность липидов и их метаболитов. Так, алифатический аминоспирт сфингозин может выступать в качестве эндогенного лизосомотропного детергента в ФНО-обработанных гепатоцитах, что связано с активацией кислой сфингомиелиназы и церамидазы [374]. К ПЛМ ведёт ингибирование фермента сфингозинкиназы-1, который участвует в превращении сфингозин-1-фосфата [373]. ПЛМ также может быть вызвана фосфолипазой A2, которая дестабилизирует лизосомы [266]. Известна

роль свободных жирных кислот [98], холестерина [222] и липопротеинов низкой плотности [228].

Возможности индукции ПЛМ интересны и с точки зрения лекарственной терапии. Известно ПЛМ-индуцирующее действие антибиотиков фторхинолонового ряда норфлоксацина и цiproфлоксацина [268], ингибитора протонной помпы омепразола [339]. Возможность запуска апоптоза через индукцию ПЛМ в противораковой терапии описана для производных б-циннамамидо-хинолин-4-карбоксамидов [160], производных селеносемикарбазона [315].

К соединениям, стабилизирующим мембрану лизосом, относят хелаторы редокс-активного железа [63], поскольку известно, что железо, высвобождаемое при расщеплении железосодержащих белков, способно накапливаться в кислой среде лизосом и катализирует там реакцию Фентона. В результате образуются чрезвычайно активные гидроксил-радикалы, которые в условиях оксидативного стресса способны повреждать лизосомальную мембрану и приводить к выходу лизосомального содержимого в цитозоль [397]. На клетках пигментного эпителия сетчатки показано, что подавление экспрессии железо-связывающих белков, таких как ферритин и белок теплового шока HSP70, приводит к их большей восприимчивости к оксидативному стрессу [239]. Добавление к злокачественным клеткам дефероксамина приводило к их частичному восстановлению после лизосомальной липид-пероксидации и ПЛМ [228].

Кроме того, стабилизирующими свойствами в отношении лизосомальных мембран обладает белок теплового шока Hsp70.1. В ходе независимого протеомного анализа ишемии головного мозга, глаукомы и умеренных когнитивных нарушений у приматов было обнаружено, что общим субстратом кальпаина и АФК, совместно повреждающих лизосомальную мембрану, является Hsp70.1, проявляющий свое действие за счет повышения активности кислой сфингомиелиназы [437]. Также показано, что накопление сфингомиелина и холестерина в лизосомах, обусловленное дефицитом кислой сфингомиелиназы, ведет к снижению устойчивости гепатоцитов к ПЛМ и апоптозу, вызванному

пальмитиновой кислотой [98], а ингибирование кислой сфингомиелиназы рядом лекарственных средств, представляет собой новый механизм дестабилизации лизосом раковых клеток, ведущий к их гибели [414].

Также активно изучается возможность ингибирования ферментов, дестабилизирующих лизосомальную мембрану. Так, применение кальпаинового ингибитора кальпептина нивелирует дестабилизирующее лизосомальную мембрану действие кальпаинов, что приводит к задержке инволюции молочной железы у крыс [124], а эндогенный ингибитор гранзима В серпин b9 защищает лимфоциты от ПЛМ-индуцированной клеточной гибели [408].

Отдельного внимания заслуживают исследования вклада окислительного стресса в изменение проницаемости лизосомальной мембраны. Следует отметить, что, хотя окислительный стресс и указывается среди факторов повышения проницаемости лизосомальной мембраны [114, 116, 254], исследования механизмов связи этих процессов весьма немногочисленны [267]. Тем не менее, имеются указания на участие цистеиновых катепсинов в АФК-индуцированном апоптозе [182, 270, 397], и возможности АФК способствовать ПЛМ через активацию Ca^{2+} -каналов лизосомальной мембраны [390], а также появляются сведения о стабилизации лизосомальной мембраны под действием антиоксидантов [173, 178, 331]. Однако результаты исследований пока весьма фрагментарны, поэтому дальнейшее изучение взаимосвязи окислительного стресса и состояния проницаемости лизосомальной мембраны представляется крайне актуальным и значимым для медицины и биологии.

Таким образом, внелизосомальные эффекты цистеиновых катепсинов проявляются экстрацеллюлярным участием в деградации компонентов внеклеточного матрикса и интрацеллюлярным участием в классическом и лизосомальном путях апоптоза. Возможность реализации внелизосомального действия обеспечивается процессом пермеабиллизации лизосомальных мембран, исследование механизмов которого, как и изучение внутриклеточных внелизосомальных эффектов катепсинов, в том числе на фоне окислительного

стресса, в настоящее время представляет собой новое, актуальное направление биологической науки, имеющее существенное значение для медицины.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект наблюдений

Исследование выполнено на 236 конвенциональных половозрелых крысах Wistar (112 самцов и 124 самки). Содержание животных осуществлялось в металлических клетках площадью 24 дм² по 3-4 особи при естественном освещении. Уход за животными в виварии осуществлялся на основании СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ №51 от 29 августа 2014 г.

Кормление производили полноценным сухим комбикормом для лабораторных животных «Чара» (производство ЗАО «Ассортимент – Агро», Московская область, Сергиев-Посадский район, д. Тураково), воду животные получали по требованию, из оборудованных в клетках поильников. Сотрудники вивария осуществляли расчет рациона для животных согласно установленным нормам.

Содержание и выведение животных из эксперимента осуществлялось в соответствии с протоколами, изложенными Международным Советом Медицинских Научных Обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.) и правилами лабораторной практики – Приложение к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708н.

2.2. Экспериментальные модели

2.2.1. Экспериментальные модели *in vivo*

Моделирование дефицита синтеза оксида азота

(Экспериментальная группа 1, n=8, крысы-самцы Wistar)

Для моделирования дефицита синтеза оксида азота осуществляли внутрибрюшинное введение неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира L-N^o-нитроаргинина (L-NAME, «Sigma», США) в дозе 25мг/кг [3, 82] 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.

Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота субстратом NO-синтазы – L-аргинином

(Экспериментальная группа 2, n=8, крысы-самцы Wistar)

Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота (NO) субстратом NO-синтазы, осуществляли путем внутрижелудочного введения раствора L-аргинина («Sigma», США) на 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [3, 20] через стеклянный градуированный шприц с внутрижелудочным зондом. Объем вводимого раствора зависел от массы животного 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.

Моделирование корректирующего действия L-аргинина при экспериментальном подавлении синтеза оксида азота

(Экспериментальная группа 3, n=8, крысы-самцы Wistar)

Для изучения корректирующего действия L-аргинина 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 [3].

Формирование контрольных групп

Контрольные группы 1-3 (n=8 для каждой группы, крысы-самцы Wistar) формировались для каждой серии эксперимента из животных, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями. Животным контрольных групп осуществляли введение физиологического раствора, при этом вариант введения, объемы раствора и продолжительность воздействия совпадали с таковыми для соответствующей экспериментальной группы.

*Моделирование выраженной гипергомоцистеинемии
(Экспериментальная группа 4, n=8, крысы-самцы Wistar)*

Моделирование выраженной гипергомоцистеинемии [27, 43, 44] проводили внутрижелудочным введением метионина в качестве субстрата для синтеза гомоцистеина в виде суспензии, приготовленной на 1% крахмальном растворе с добавлением 10% твина-80, в дозе 1,5 г/кг ежедневно 2 раза в сутки в течение 21 дня. Суспензия вводилась экспериментатором с участием ассистента с помощью стеклянного градуированного шприца с зондом. Объем вводимой суспензии зависит от массы животного и не превышает 1,5 мл. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

Животным *контрольной группы 4* (n=8, крысы-самцы Wistar) таким же образом внутрижелудочно вводилась суспензия, не содержащая метионин (состав по массе: 10% твина-80, 1% крахмала, 89% воды) в течение 21 дня.

*Изучение эффектов L-аргинина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии
(Экспериментальная группа 5, n=8, крысы-самцы Wistar)*

Для изучения эффектов аргинина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии выборке животных вводили аргинин per os 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг [20, 27] на 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток параллельно с введением метионина по схеме, описанной выше (с 12 по 21 сутки введения метионина).

Животным *контрольной группы 5* (n=8, крысы-самцы Wistar) осуществляли введение аргинина per os 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток параллельно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше – контроль 5. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

*Экспериментальное моделирование острого венозного тромбоза
(n=18, крысы-самки Wistar).*

Перед хирургическим вмешательством животных наркотизировали. Предварительно, за 15 минут до подачи наркоза, проводили премедикацию введением «Рометара» внутримышечно, наркоз осуществлялся введением

препарата «Золетил» внутримышечно. Премедикация и подача наркоза осуществлялась сотрудниками вивария. Воспроизведение тромбоза у экспериментальных животных осуществляли путём лигирования общей подвздошной вены [33, 223, 357] одной конечности. Операция проводилась в специально оборудованной операционной вивария. В ходе операции определяли пульсацию подвздошной артерии и в месте её проекции производили разрез кожи и подкожной клетчатки длиной 4 – 5 см. Тупо расслаивая мышцы, выделяли сосудисто-нервный пучок, определяли в нём общую подвздошную вену и перевязывали её. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 1-е, 3-е и 5-е сутки после операции.

В качестве *контроля* использовался материал, полученный от интактных животных, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями (n=6, крысы-самки Wistar).

2.2.2. Экспериментальные модели *in vitro*

Моделирование вариантов окислительного стресса in vitro на суспензиях клеток

In vitro-индукция окислительного стресса

Для моделирования оксидативного стресса в условиях *in vitro* осуществляли инкубацию выделенных из периферической крови интактных животных (n=10, крысы-самки Wistar) моноядерных и полиморфноядерных лейкоцитов в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 5 мМ перекись водорода в течение 18 часов при температуре 37⁰C [69, 77].

Контрольные группы формировались для каждого вида клеток инкубацией в аналогичных условиях без добавления перекиси водорода.

In vitro- моделирование дефицита синтеза оксида азота

Для моделирования дефицита синтеза оксида азота *in vitro* производили инкубацию свежевыделенных тимоцитов и спленоцитов интактных животных (n=8, крысы-самцы Wistar) в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ L-Gln, по 2 мг/мл стрептомицина и пенициллина и с дополнительным

внесением L-NAME в конечной концентрации 5 мМ в течение 24 часов при температуре 37⁰С [3, 69].

Контрольные группы формировались из тимоцитов и спленоцитов, инкубированных в полной питательной среде без добавления L-NAME в течение 24 часов при температуре 37⁰С.

*In vitro- моделирование изменения уровня синтеза оксида азота субстратом
NO-синтазы – L-аргинином*

Для моделирования изменения уровня синтеза оксида азота (П) *in vitro* производили инкубацию свежевыделенных тимоцитов и спленоцитов интактных животных (n=8, крысы-самцы Wistar) в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ L-Gln, по 2 мг/мл стрептомицина и пенициллина и с дополнительным внесением L-аргинина в конечной концентрации 5 мМ в течение 24 часов при температуре 37⁰С [3, 69].

Контрольные группы формировались из тимоцитов и спленоцитов, инкубированных в полной питательной среде без добавления L-аргинина в течение 24 часов при температуре 37⁰С.

Моделирование окислительного стресса in vitro на суспензиях лизосом

In vitro-индукция окислительного стресса

Моделирование оксидативного стресса *in vitro* на суспензиях изолированных лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) осуществляли путем их инкубации в 0,25 М растворе сахарозы (среда выделения), содержащем 5мМ перекись водорода в течение 1, 2 и 4 часов при температуре 37⁰С [75].

Контрольные группы формировались инкубацией изолированных суспензий лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) в аналогичных условиях без добавления перекиси водорода.

Оценка эффектов L-аргинина

Для оценки эффектов изолированного воздействия L-аргинина осуществляли инкубацию суспензий лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) в 0,25 М растворе сахарозы (среда выделения), содержащем

5 мМ L-аргинин [3, 37, 75] («Sigma», США) в течение 1, 2 и 4 часов при температуре 37⁰С

Для исследования протективных эффектов L-аргинина при окислительном стрессе осуществляли инкубацию суспензий лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) в 0,25 М растворе сахарозы (среда выделения), содержащем 5мМ перекись водорода и 5 мМ L-аргинин [3, 37, 75] («Sigma», США) в течение 1, 2 и 4 часов при температуре 37⁰С.

Моделирование спонтанной генерации оксида азота

Изучение потенциального самостоятельного вклада оксида азота осуществляли путем осуществляли инкубации суспензий лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) в 0,25 М растворе сахарозы (среда выделения), содержащем 0,1 М нитропруссид натрия [11, 31, 180] в течение 1, 2 и 4 часов при температуре 37⁰С.

Контрольные группы формировались инкубацией изолированных суспензий лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) в аналогичных условиях в среде выделения.

2.3. Получение материала для исследования

2.3.1. Гомогенаты тканей

За 12 часов до забоя животных лишали пищи для стандартизации условий опытов. Эфтаназия животных осуществлялась методом обескровливания пересечением брюшного отдела аорты под эфирным рауш – наркозом или медикаментозным наркозом с использованием препаратов ксила и золетил 100 при сохраненном дыхании и сердцебиении. Немедленно после обескровливания извлекали органы в соответствии с задачей экспериментальной модели, которые отдельно помещали в 0,25 М раствор сахарозы. У животных с экспериментальным венозным тромбозом извлекали участок вены ниже места лигирования (тромбированная вена) и симметричный участок вены другой конечности (интактная вена). Далее выделенные органы очищали от остатков жировой и соединительной ткани, паренхиматозные – дополнительно промывали средой выделения, затем готовили точные навески с использованием

электронных весов (АН-220 СЕ, Япония). Полученные навески тканей предварительно измельчали ножницами и переносили в стеклянный стакан гомогенизатора «Potter S» (Sartorius, Германия), добавляя холодный раствор 0,25 М сахарозы в соотношении 1/10, после чего гомогенизировали тefлоновым пестиком при зазоре в пределах 0,16-0,24 мм. Продолжительность гомогенизации и скорость вращения пестика устанавливались в зависимости от вида ткани (Таблица 5). Описанные процедуры проводили при температуре не выше 4⁰С.

Таблица 5

Условия гомогенизации в зависимости от вида ткани.

Ткань	Скорость вращения пестика (об/мин)	Продолжительность гомогенизации (секунд)
Печень	900	35
Почка	1000	50
Легкое	1000	50
Миокард (левый желудочек сердца)	1500	60
Стенка сосуда	1500	60

Оценку приготовленных гомогенатов осуществляли посредством морфологического контроля путем окраски мазков гомогенатов по Романовскому-Гимза с последующим подсчетом на предметном стекле числа не разрушенных клеток на 1000 освобожденных ядер [61]. При указанных в таблице 5 условиях число не разрушенных клеток в гомогенатах не превышало 1-2%.

2.3.2. Субклеточное фракционирование и получение суспензий лизосом

Полученные гомогенаты центрифугировали 15 мин при 800g (центрифуга СМ-6М ЕLMI, Латвия) для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость отбирали пипеткой в отдельные гильзы и центрифугировали 15 мин при 14000g для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант – дополнительно при 20000g в течение 30 мин (центрифуга рефрижераторная К 24 Д, ГДР).

Получение субклеточных фракций

Полученный после центрифугирования при 20000g супернатант представлял собой неседиментируемую (цитоплазматическую) фракцию гомогената ткани и использовался в этом качестве для измерения изучаемых показателей. Осадок, содержащий грубую фракцию лизосом (седиментируемая фракция), дополнительно ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1% и также использовали для исследований.

Выделение суспензий лизосом для in vitro-исследований

При выделении суспензии лизосом для *in vitro*-исследований в качестве ткани использовали печень половозрелых интактных крыс-самок линии Wistar массой 280-330 г. Эфтаназия животных, извлечение органа, подготовка ткани, гомогенизация и субклеточное фракционирование осуществляли идентично описанных выше процедурам. По окончании центрифугирования осадок, представляющий собой грубую фракцию лизосом, ресуспендировали в 2 мл среды инкубации и использовали для *in vitro* исследования. По завершении инкубации лизосомы повторно осаждались центрифугированием при 20000g в течение 30 мин, после чего отбирали неседиментируемую фракцию, а седиментируемую фракцию ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1%. Полученные фракции отдельно использовали для исследования.

2.3.3. Выделение фракций лейкоцитов, получение гомогенатов и суспензии клеток различных фракций

В качестве материала использовали периферическую кровь, полученную при выведении животного из эксперимента. Антикоагулянтом служил раствор ЭДТА, приготовленный из расчёта 1,5 мг антикоагулянта на 1 мл крови.

С целью осаждения эритроцитов к крови, стабилизированной ЭДТА, добавляли 6% декстран 500 (6% раствор декстрана с молекулярной массой от 50 тыс. до 70 тыс. в изотоническом растворе NaCl, ОАО «Красфарма», Россия) в соотношении 1:10 и смесь отстаивали 15 – 30 минут [40]. По истечении этого

времени надосадочную взвесь лейкоцитов в плазме отбирали при помощи шприца с иглой большого диаметра и использовали для дальнейшего разделения путём изопикнического центрифугирования [48].

Для выделения различных фракций плазму, обогащённую лейкоцитами, наслаивали в соотношении 3:1 на смесь полиглюкина с 76% верографинном (плотность 1,077) и центрифугировали при 200 g в течение 25 минут. Интерфазный слой, содержащий моноядерные лейкоциты (МЯЛ), отбирали и центрифугировали при 600 g в течение 10 минут для отделения от плазмы. Осадок полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) обрабатывали 0,9 % раствором хлорида аммония для удаления остаточных эритроцитов и центрифугировали 10 минут при 600 g. Полученные осадки лейкоцитов троекратно отмывали 0,15 М раствором хлорида натрия в соотношении 5:1 и пропускали через капроновый фильтр для удаления конгломератов клеток и подсчитывали в камере Горяева, используя микроскоп бинокулярный Р-15 «Биолам» фирмы ЛОМО.

Чистоту разделения лейкоцитов проверяли микроскопией окрашенных мазков из интерфазы и осадка (микроскоп бинокулярный Р-15 «Биолам»). В соответствующих препаратах содержание МЯЛ составляло 96,1%, ПМЯЛ – 95,6%.

Получение гомогенатов лейкоцитов

Полученные описанным выше способом осадки отмытых лейкоцитов описанных фракций доводили до концентрации 10^6 – 10^7 клеток/мл дистиллированной водой с добавлением раствора тритона X – 100 в конечной концентрации 0,1% и подвергали трёхкратному замораживанию – оттаиванию для окончательного разрушения плазматических и лизосомальных мембран. Гомогенизация производилась пипетированием через иглу малого диаметра. Нерастворимый материал осаждался центрифугированием (600 g, 10 минут). Супернатант использовался для дальнейшего исследования.

Получение суспензии лейкоцитов для in vitro-исследований

Выделение фракций лейкоцитов для *in vitro*-исследований осуществляли из периферической крови, полученной под эфирным наркозом из брюшной

аорты 12 половозрелых интактных крыс-самок линии Wistar массой 280-330 г. Стабилизация, обработка крови и фракционирование лейкоцитов осуществлялось аналогично вышеописанным процедурам. После фракционирования осадки МЯЛ и ПМЯЛ ресуспендировались в полной питательной среде RPMI-1640 и подвергались инкубации. Подсчет клеток осуществлялся в начале и по завершении процедуры инкубации пробирочным методом в камере Горяева. По завершении инкубации осуществляли осаждение клеток центрифугированием в течение 10 минут при 600 g и готовили гомогенаты по описанной выше процедуре.

2.3.4. Получение суспензии тимоцитов и спленоцитов

После введения животных в глубокий эфирный наркоз производили обескровливание и стерильно извлекали тимус и селезенку. Сразу после извлечения тимус и селезенку погружали в охлажденную среду RPMI 1640, освобождали от крови, жира и соединительной ткани. Далее левую долю тимуса использовали для получения тимоцитов контрольной группы, а правую – экспериментальной группы, предварительно взвесив каждую из долей; селезенку делили на две части примерно по 500 мг и каждую использовали отдельно для получения спленоцитов контрольной и экспериментальной групп. Очищенную ткань переносили в стеклянный гомогенизатор (150x25 мм), содержащий среду RPMI 1640 в соотношении 1/10, и измельчали, вращая стеклянный пестик вручную. Полученную взвесь клеток отбирали шприцем через длинную иглу, переносили в центрифужную пробирку и оставляли для оседания клеточных агрегатов на ледяной бане в течение 1 часа. После этого отбирали шприцем взвесь одиночных клеток и осаждали тимоциты и спленоциты центрифугированием в течение 10 мин при 100 g (центрифуга CM-6M ELMi, Латвия) [3, 39]. Клеточный осадок ресуспендировали при комнатной температуре в 5 мл полной питательной среды и осуществляли инкубацию.

Подсчет количества клеток и оценку жизнеспособности клеток осуществляли до и после инкубации пробирочным методом в камере Горяева,

используя в качестве красителя 0,2 % раствор трипанового синего в физиологическом растворе [3, 39].

После инкубации полученные клетки осаждали при 100 g в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в 0,25М сахарозе с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1% и использовали для дальнейших исследований.

2.4. Методы исследования

2.4.1. Определение концентрации белка

Содержание белка в исследуемом материале измеряли по методу Лоури коммерческим набором НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург).

Принцип метода заключается в образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот при взаимодействии с реактивом Фолина – Чокальтеу в комплексе с биуретовой реакцией на пептидные связи. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка в исследуемой пробе, определяемой фотометрически при длине волны 750 нм. Содержание белка в экспериментальной пробе определяли по калибровочному графику, построенному с использованием калибровочного бычьего сывороточного альбумина 0,25мг/мл, входящего в состав набора.

2.4.2. Определение содержания метаболитов оксида азота

Суммарную концентрацию нитратов и нитритов (содержание метаболитов оксида азота) определяли спектрофотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса [45].

Депротенинизация проб осуществлялась добавлением 96% этиловым спирта в соотношении 1:2 с последующим центрифугированием при 800 g в течение 20 мин. Для колориметрического определения нитрит-иона использовали реактив Грисса (Нева Реактив, Санкт-Петербург), растворенный в 12 % уксусной кислоте. Для колориметрического определения нитрат-иона готовили раствор ванадия хлорида в 1 N HCl. Реактивы готовили ex tempore. Для построения калибровочной кривой использовали 1 М раствор NaNO₂ в воде, перед употреблением его разводили в 1000 раз и готовили серию дальнейших разведений. .

Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра с регистрацией на микропланшетном анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology, США) при длине волны 540 нм.

Результаты выражали в нмоль/мг белка для тканей и в мкмоль/мл для плазмы крови.

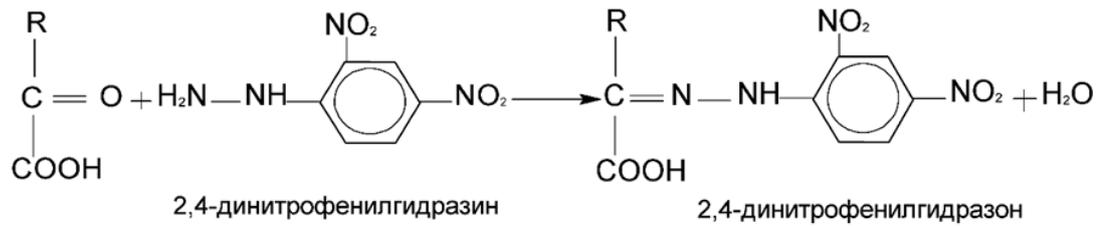
2.4.3. Определение концентрации гомоцистеина

Концентрацию общего гомоцистеина определяли в сыворотке крови экспериментальных животных соответствующих серий методом иммуноферментного анализа коммерческим набором Axis® HomocysteineEIA («Axis-Shield Diagnostics Ltd», Великобритания). Метод основан на восстановлении содержащихся в пробе белково-связанного гомоцистеина и гомоцистина до свободного гомоцистеина с последующим ферментативным переводом суммарного гомоцистеина в S-аденозил-L-гомоцистеин, подлежащий иммуноферментному определению [27, 43, 44]. Для проведения исследования использовали иммуноферментный анализатор StatFax 3200 (Awareness Tecnology Inc., США). Для расчета концентрации гомоцистеина использовали калибровочный график, построенный с использованием входящих в состав набора калибровочных растворов, результаты выражали в мкмоль/л.

2.4.4. Оценка состояния окислительной модификации белков

Для количественной оценки содержания окислительно модифицированных белков в исследуемом материале использовали определение уровня карбонильных производных по R. L. Levine [163] в модификации Е. Е. Дубининой [51].

Метод основан на реакции взаимодействия карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые подлежат спектрофотометрической регистрации:



При использовании в качестве материала гомогената клеток и тканей во избежание завышения показателей уровня карбонильных производных белков предварительно проводили осаждение нуклеиновых кислот добавлением 10% стрептомицина сульфата, в соотношении к гомогенату 1:9, экспозиция 15 минут при комнатной температуре. Далее центрифугировали в течение 10 мин при 800g и для работы использовали надосадочную жидкость [21].

При определении уровня карбонильных производных, образовавшихся при спонтанной окислительной модификации белков, использовали 0,1 мл надосадочной жидкости, в которой осаждали белки 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты как в опыте, так и в контроле. Далее в опытную пробу вносили 1 мл 0,01 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2 М HCl, а в контрольную пробу 1 мл 2 М HCl. Пробу инкубировали при комнатной температуре 1 час, затем центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g. Полученные осадки промывали 3 раза смесью этанол (96%) – этилацетат (1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, не прореагировавшего с карбонильными группами окисленных белков. Полученные осадки высушивали для удаления оставшегося раствора этанол-этилацетат, а затем растворяли в 8 М растворе мочевины в объеме 3 мл, для лучшего растворения к осадкам добавляли 1 каплю 2 М HCl.

Определение карбонильных производных белков, образующихся по металл-катализируемому (индуцируемому) механизму проводили аналогичным образом с предварительной 15-минутной инкубацией после добавления к опытной и контрольной пробам по 0,1 мл 4×10^{-3} М FeSO₄, 1×10^{-3} М ЭДТА, 3×10^{-4} М H₂O₂ приготовленных ex tempore, при этом взаимодействие двухвалентного железа с перекисью водорода, способствует последующему образованию радикала OH[·] по реакции Фентона [21]:



Полученные в вышеописанных реакциях динитрофенилгидразоны регистрировали на спектрофотометре (СФ-2000, Санкт-Петербург) в ультрафиолетовой и видимой части спектра.

Регистрация продуктов и последующая обработка результатов проводилась в соответствии с разработанным в ходе исследования способом комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях [60], основанном на анализе площади под кривой спектра поглощения ДНФГ-производных после регистрации на длинах волн 230, 254, 270, 280, 356, 363, 370, 428, 430, 434, 524, 530, 535 нм, выбранных в соответствии с диапазонами поглощений соответствующих динитрофенилгидразонов [232].

В качестве результата анализа использовалась общая площадь под кривой спектра поглощения ($S_{\text{общ}}$), характеризующая общее содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в материале, а также суммы площадей под кривой участков поглощения, характерных для альдегид-динитрофенилгидразонов ($S_{\text{АДНФГ сумм}}$) и кетон-динитрофенилгидразонов ($S_{\text{КДНФГ сумм}}$), полученные значения можно выражались в единицах оптической плотности (е.о.п.) на мл плазмы крови, либо на грамм белка для гомогенатов клеток и тканей.

Дополнительно производили расчет доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса [72], как соотношение $S_{\text{АДНФГ сумм}}$ или $S_{\text{КДНФГ сумм}}$ к $S_{\text{общ}}$ (%).

Кроме того, значения, полученные при измерении карбонильных производных, образовавшихся при спонтанном и металл-катализируемом окислении, использовали для расчета показателя резервно-адаптационного потенциала (РАП) [47]: значение РАП (%) является разницей между принятым за 100% результатом измерения $S_{\text{общ}}$ в металл-катализируемом варианте и процентной долей в нем значения $S_{\text{общ}}$ спонтанного окисления (Рисунок 15).

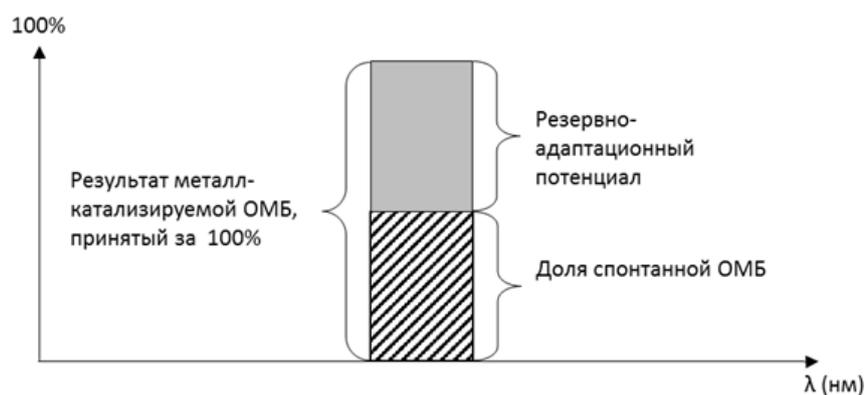


Рисунок 15. Принцип расчета показателя резервно-адаптационного потенциала

2.4.5. Определение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ

Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ - катепсинов В, L и H изучалась спектрофлуориметрическим методом по Barrett & Kirschke [108] с регистрацией продукта реакции на спектрофлуориметре System 3 Scanning Spectrofluorometr (Optical technology devices, inc. Elmstord, New York, 10523).

Метод основан на количественном определении 7-амидо-4-метилкумарина, высвобождающегося в результате энзиматического гидролиза пептидной связи:

- N α -CBZ-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина В,
- N α -CBZ-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина L,
- Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина H («Sigma», США).

Преимущества данного метода связаны с высокой чувствительностью и специфичностью используемых субстратов.

Субстратно-буферные растворы содержали 20 мкМ соответствующего субстрата, а также 8 мМ ДТТ и 2 мМ ЭДТА в:

- 0,1 М ацетатном буфере pH 6,0 для катепсина В,
- 0,1 М ацетатном буфере pH 5,5 для катепсина L,
- 0,1 М Na/К-фосфатном буфере pH 6,8 для катепсина H.

К 0,4 мл субстратно-буферного раствора, преинкубированного 2 мин при 37⁰С, добавляли 0,1 мл исследуемого материала. Реакционную смесь инкубировали при 37⁰С 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 2 мл холодного 0,1 М ацетатного буфера рН 4,0. Контролем служила проба, содержащая те же компоненты, за исключением исследуемого материала, который вносился в конце инкубации непосредственно после добавления ацетатного буфера рН 4,0.

Количество свободного 7-амидо-4-метилкумарина измеряли на при λex и λem , соответственно 360 нм и 440 нм против контроля. В качестве стандартного раствора использовали 7-амидо-4-метилкумарин (Sigma, США), растворенный в диметилсульфоксиде (Вектон, Санкт-Петербург). Активность ферментов в 1 мл гомогената рассчитывалась по формуле:

$$A = \frac{F_0 * C * B}{F_{st} * t * 0,1}$$

F_0 – интенсивность флуоресценции анализируемого образца;

F_{st} – интенсивность флуоресценции стандартного раствора амидо-метилкумарина;

C – концентрация 7-амидо-4-метилкумарина в стандартном растворе;

B – разведение гомогената;

t – время инкубации (сек);

0,1 – объем гомогената в пробе (мл).

Удельную активность катепсинов в тканях и суспензиях клеток выражали в нкат/г белка.

2.4.6. Метод определения аутокаталитического действия катепсинов

Для выявления аутокаталитического действия катепсинов реакцию смесь, включающую 8 мМ ДТТ, 2 мМ ЭДТА в соответствующем буферном растворе и 0,1 мл исследуемого материала, преинкубировали в течение 15 минут при 37⁰С (прекаталитическая инкубация), после чего к ней добавляли 20 мкМ Na-

CBZ-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin для катепсина В, N-CBZ-Phe-Arg-7-амидо-4-метилкумарина для катепсина L и Arg-7-amido-4-methylcoumarin для катепсина H и инкубировали 60 минут при 37 °С с последующим добавлением 2 мл холодного 0,1 М ацетатного буфера pH 4,0. [8]. Аутокаталитическое действие катепсинов оценивалось по коэффициенту отношения значения активности фермента, полученного в реакции с применением прекалитической инкубации к параллельно определяемому значению активности без преинкубации (K_{ACA} – коэффициент аутокаталитического действия).

2.4.7. Оценка лабильности лизосомальной мембраны и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ

Определение активности кислой фосфатазы

Активность кислой фосфатазы определяли в седиментируемой и неседиментируемой фракциях гомогенатов тканей и суспензий лизосом унифицированным методом по «конечной точке» с помощью коммерческого набора «Витал Диагностикс СПб» (Россия, Санкт – Петербург).

Метод основан на количественном определении образовавшегося в единицу времени продукта катализа *n*-нитрофенола, которое пропорционально активности фермента, по оптической плотности образца при длине волны 405 нм.



Активность фермента оценивали по калибровочному графику, построенному с помощью калибровочного раствора *n*-нитрофенола, входящего в состав набора.

Определение доли внелизосомальной активности исследуемых ферментов

Для гомогенатов тканей и суспензий лизосом активность кислых гидролаз в неседиментируемой и седиментируемой фракциях определяли отдельно и обозначали как, соответственно, неседиментируемую и седиментируемую активность (НСА и СА). Общую активность (ОА) вычисляли как сумму НСА и СА.

Доля внелизосомальной активности (традиционно обозначаемая как коэффициент лабильности, Клаб) изучаемых ферментов рассчитывалась как

отношение неседиментируемой активности соответствующего фермента к его общей активности [61].

2.5. Статистическая обработка

Статистический анализ результатов исследования проведен с применением современных методов виртуального математического анализа, а именно, с использованием программы «Microsoft Office Excel 2013» и «Statistica 10.0». Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Для вариационных рядов с отсутствием согласия данных с нормальным распределением вычисляли характеристики: медиану (Me), верхний и нижний квартилей (Q1 и Q3 соответственно), результаты представляли в формате Me [Q1;Q3]; при построении графиков использовались также минимальное (min) и максимальное (max) значение. При нормальном распределении данных вычисляли среднее значение (M) и стандартное отклонение (s), результаты представляли в формате $M \pm s$. Поскольку отмечалось отсутствие согласия большинства данных с нормальным распределением, для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест), при нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента. Оценку ранговой корреляции осуществляли с помощью коэффициента Спирмена.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка способа комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях

Формирование представлений об окислительной модификации белков как о раннем, стабильном и информативном маркере свободнорадикальной патологии [52, 113, 122, 391], создало перспективное направление в сфере медицинских и биологических наук, связанное с практическим исследованием содержания продуктов окислительной модификации белков. Оценка состояния окислительной модификации белков в настоящее время становится целью не только экспериментальных [32, 50, 67, 73], но и клинических исследований, причем в качестве материала в последнем случае выступают как сыворотка/плазма крови [35, 58, 71, 79], так и другие биологические жидкости [5, 6, 42], а также клетки [53, 78] и ткани [24].

Несмотря на существование нескольких методологических подходов к выявлению окислительно модифицированных белков [201], в качестве стандартного метода измерения их содержания в биологических материалах в настоящее время используется спектрофотометрическая регистрация продуктов реакции карбонильных групп с 2,4-динитрофенилгидразином [340], предложенная R.L. Levine [163]. В отечественных исследованиях указанный метод используется в модификации Е.Е. Дубининой [51] и все предложения по усовершенствованию касаются именно этой методологии [7, 9].

Несомненными преимуществами метода R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой являются технологическое удобство использования, достаточная воспроизводимость и отсутствие потребности в дорогостоящем оборудовании и реагентах. Однако созданное этими преимуществами широкое применение метода выявило и его существенный, на наш взгляд недостаток: регистрация продуктов реакции на 4 фиксированных длинах волн, несмотря на предоставление значительного эмпирического материала, не дает возможности сделать заключение об общем содержании карбонильных производных и их компонентов

в изучаемом материале, что приводит к существенному дефициту дальнейшей трактовки и сопоставления полученных результатов.

Вышеизложенные соображения привели к пониманию того, что для корректной интерпретации полученных результатов необходим новый подход к анализу данных, который позволил бы комплексно оценить количество карбонильных производных, а также дать возможность сделать заключение о стадии окислительного стресса и состоянии адаптации к его проявлениям. Для решения этой задачи нами был предложен способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, защищенный патентом РФ [60].

Сущность нового подхода заключается в том, что анализу подлежит площадь под кривой спектра поглощения ДНФГ-derivатов карбонильных производных белков. Полученные в соответствии с методом [51] ДНФГ-продукты карбонильных производных окисленных белков регистрируют на спектрофотометре в ультрафиолетовой части спектра на длинах волн 230, 254, 270, 280, 356 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны $S_{\text{АДНФГ}}$ _{uv}), 363 нм и 370 нм (кетон-динитрофенилгидразоны $S_{\text{КДНФГ}}$ _{uv}), а в области видимого света - 428 и 430 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны $S_{\text{АДНФГ}}$ _{vs}) и 434, 524, 530, 535 нм (кетон-динитрофенилгидразоны $S_{\text{КДНФГ}}$ _{vs}). Перечисленные длины волн выбраны в соответствии с диапазонами, в которых регистрируются динитрофенилгидразоны [232].

Оценка осуществляется при подсчете площади под кривой спектра окислительной модификации белков. Учитывая, что «шаг» между длинами волн является величиной непостоянной, то вычислить площадь плоской фигуры с помощью определенного интеграла не представляется возможным. В результате этого возникает необходимость разбить площадь под кривой на отдельные фигуры, которые представляют собой прямоугольные трапеции (Рисунок 16), высота которых будет равна разнице между длинами волн ($h = \lambda_2 - \lambda_1$), а

основания равны значениям экстинкции на определенной длине волны, например Ext_{λ_1} и Ext_{λ_2} , выраженные в единицах оптической плотности (е.о.п.) (рисунок 7). Далее полученное значение можно выразить в е.о.п. на мл плазмы, е.о.п. на грамм ткани, е.о.п. на грамм белка для тканей органов.

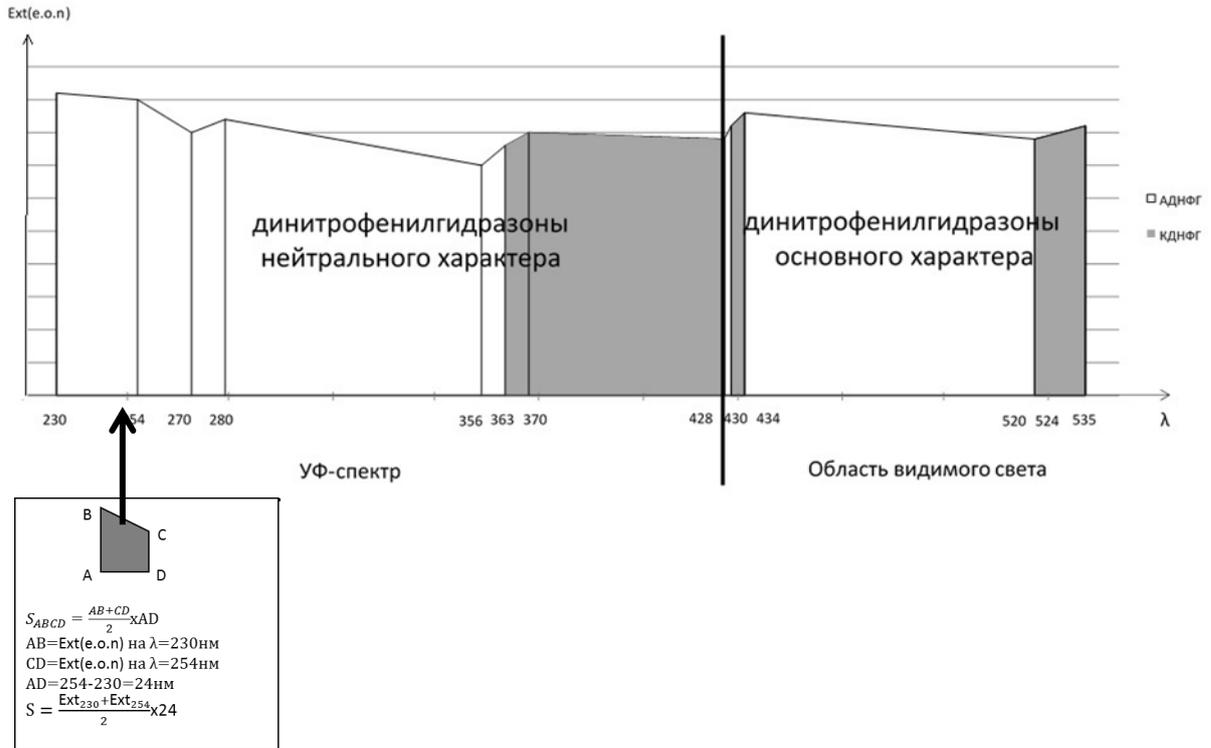


Рисунок 16. Характеристика регистрации динитрофенилгидразонов в световом спектре

Таким образом, площадь под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков, которая складывается из площадей под кривой АДНФГ и КДНФГ, регистрируемых в УФ-спектре и видимой части спектра, определяется формулой:

$$S_{\text{омб}} = S_{\text{аднфг}}^{uv} + S_{\text{аднфг}}^{vs} + S_{\text{кднфг}}^{uv} + S_{\text{кднфг}}^{vs}$$

где

$$S_{\text{аднфг}}^{uv} = \frac{Ext_{230} + Ext_{254}}{2} \times 24 + \frac{Ext_{254} + Ext_{270}}{2} \times 16 + \frac{Ext_{270} + Ext_{280}}{2} \times 10 + \frac{Ext_{280} + Ext_{356}}{2} \times 76 + \frac{Ext_{356} + Ext_{363}}{2} \times 7$$

(1)

$$S_{\text{АДНФГ}}^{\text{vs}} = \frac{\text{Ext}_{428} + \text{Ext}_{520}}{2} \times 92 \quad (2)$$

$$S_{\text{КДНФГ}}^{\text{uv}} = \frac{\text{Ext}_{363} + \text{Ext}_{370}}{2} \times 7 + \frac{\text{Ext}_{370} + \text{Ext}_{428}}{2} \times 58 \quad (3)$$

$$S_{\text{КДНФГ}}^{\text{vs}} = \frac{\text{Ext}_{430} + \text{Ext}_{434}}{2} \times 4 + \frac{\text{Ext}_{520} + \text{Ext}_{535}}{2} \times 15 \quad (4)$$

Предлагаемая формула позволяет вычислить суммарное содержание карбонильных производных белков, при этом важно отметить, что в формуле выделены составляющие эквивалентные участкам спектра и характеризующие этапы окислительного стресса, природу образовавшихся карбониллов, а также функциональное состояние клетки при накоплении окисленных белков. А именно формула позволяет вычислить общее количество образовавшихся карбониллов (конечный результат вычислений), а также отдельно сумму альдегидов и кетонов – первичные и вторичные маркеры, что характеризует этапы окислительного стресса, кроме того, накопление альдегидов ассоциируют с процессом фрагментации, а кетонов – с процессом агрегации белков [72], вследствие чего происходит нарушение нативной конформации белка.

Результат, который может быть получен при применении описываемого способа, состоит в более полном анализе фактического материала, используя комплексную оценку содержания окисленных продуктов белка.

Критерии, содержащиеся в предлагаемом способе, дают возможность адекватно осуществить комплексную оценку содержания продуктов ОМБ по следующим направлениям:

1. Вычислить математическим путем общее количество карбонильных производных белков ($S_{\text{ОМБ}} = S_{\text{АДНФГ}}^{\text{uv.}} + S_{\text{АДНФГ}}^{\text{vs.}} + S_{\text{КДНФГ}}^{\text{uv.}} + S_{\text{КДНФГ}}^{\text{vs.}}$), используя площадь под кривой спектра поглощения ДНФГ-дериватов

окислительно модифицированных протеинов. При этом в спектре выделяются участки, которые характеризуют:

а) количество АДНФГ и КДНФГ, регистрируемых как в области УФ-света, так и в области видимого света спектра;

б) источники образовавшихся карбонилов - количество производных нейтрального характера характеризует степень повреждения аминокислотных остатков нейтрального характера ($S_{\text{АДНФГ}}^{uv} + S_{\text{КДНФГ}}^{uv}$) и аналогичным образом основного ($S_{\text{АДНФГ}}^{vs} + S_{\text{КДНФГ}}^{vs}$).

2. Подсчитать суммарное количество АДНФГ и КДНФГ, а также долю каждого вида относительно общего содержания карбонильных производных белков с целью анализа:

а) этапов окислительного стресса: сумма АДНФГ ($S_{\text{АДНФГ}}^{uv} + S_{\text{АДНФГ}}^{vs}$) - первичные маркеры и сумма КДНФГ ($S_{\text{КДНФГ}}^{uv} + S_{\text{КДНФГ}}^{vs}$) - вторичные маркеры;

б) функционального состояние клетки при накоплении окисленных белков - накопление альдегидов ($S_{\text{АДНФГ}}^{uv} + S_{\text{АДНФГ}}^{vs}$) провоцирует процесс фрагментации, а кетонов - агрегацию белков ($S_{\text{КДНФГ}}^{uv} + S_{\text{КДНФГ}}^{vs}$).

3. Произвести оценку резервно-адаптационного потенциала [81], используя значения площадей под кривой спектра поглощения продуктов спонтанной и индуцируемой по реакции Фентона окислительной модификации белков.

Таким образом, предложенный нами способ позволяет дать количественную характеристику как общего содержания окислительно модифицированных белков, так и содержания АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера, а также предоставляет возможность сопоставления доли первичных и вторичных маркеров окислительного стресса и объективизирует расчет показателя резервно-адаптационного потенциала.

3.2. Изменения общей активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в экспериментальных моделях, ассоциированных с окислительным стрессом

3.2.1. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ лейкоцитов при *in vitro*- моделированном окислительном стрессе

Для *in vitro*- моделирования окислительного стресса была выбрана инкубация лейкоцитов в питательной среде с добавлением перекиси водорода в конечной концентрации 5 мМ, поскольку ранее было установлено, что данное значение является оптимальной концентрацией, вызывающей нарастание внутриклеточной продукции АФК и индуцирующей апоптоз наибольшего количества нейтрофильных лейкоцитов без стимуляции их некротических изменений [64, 69].

Нами была определена общая активность катепсинов В, L и Н в полиморфноядерных (ПМЯЛ) и моноядерных (МЯЛ) лейкоцитах, выделенных из периферической крови 10 интактных половозрелых белых беспородных крыс-самок. Каждая фракция лейкоцитов после ресуспендирования делилась на 2 аликвоты (опыт и контроль), которые инкубировались параллельно. Результаты исследования представлены в Таблице 6.

Таблица 6

Изменения активности катепсинов В, L, Н в лейкоцитах крови при *in vitro* моделированном окислительном стрессе, нмоль/чхмг белка (M±s)

	ПМЯЛ		МЯЛ	
	Контроль (инкубация в среде RPMI-1649)	Опыт (инкубация в среде RPMI-1649 с 5 мМ H ₂ O ₂)	Контроль (инкубация в среде RPMI-1649)	Опыт (инкубация в среде RPMI-1649 с 5 мМ H ₂ O ₂)
Катепсин В	1631,3±724,9	458,8±379,5*	642,5±593,0	1734,1±1318,6*
Катепсин L	1386,7±661,4	394,8±309,9*	418,4±317,6	1424,0±1083,3*
Катепсин Н	710,3±427,2	173,5±143,1*	157,1±119,8	529,0±432,6*

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы (p<0,05)

Оказалось, что инкубация в среде, содержащей 5 мМ H_2O_2 в течение 18 часов приводит к статистически значимым изменениям активности катепсинов В, L и Н, однако изменения в различных фракциях лейкоцитов крови оказались разнонаправленными. Так, для моноядерных лейкоцитов зафиксировано статистически значимое нарастание показателей: активность катепсина В возросла в 2,7 раза, активность катепсинов L и Н – в 3,4 раза. В то же время в полиморфноядерных лейкоцитах при *in vitro* моделированном окислительном стрессе обнаружено статистически значимое снижение общей активности всех изучаемых ферментов относительно контрольных образцов (в 3,6 раз для катепсина В, в 3,5 раз для катепсина L и в 4,1 раза для катепсина Н) [77]. Для объяснения обнаруженной разнонаправленности изменений активности изучаемых ферментов следует отметить, что фракция ПМЯЛ представлена гранулоцитами периферической крови (преимущественно нейтрофильного ряда), характерной чертой которых, в отличие от МЯЛ, является способность к собственной генерации пероксида водорода, необходимого для проявления функциональной активности [299]. Показано, что инкубация таких клеток с пероксидом водорода даже в концентрации 200 мкМ уже приводит к существенному нарастанию содержания карбонильных производных белков [74]. Поэтому возможно, что дополнительное внесение пероксида водорода в инкубационную среду для данного типа клеток приводит к гораздо более значительному окислительному повреждению их белков по сравнению с фракцией МЯЛ, для которой также ранее была показана чувствительность к окислительному стрессу [46], что и вызывает подавление активности лизосомальных цистеиновых протеиназ.

Полученные результаты продемонстрировали чувствительность активности лизосомальных цистеиновых протеиназ к прямому воздействию провокатора окислительного стресса, в концентрации, для которой была выявлена способность статистически значимо повышать количество клеток, вступивших в апоптоз и содержание в них проапоптотического белка Вах в сочетании с нарастанием концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле, что трактовалось авторами как

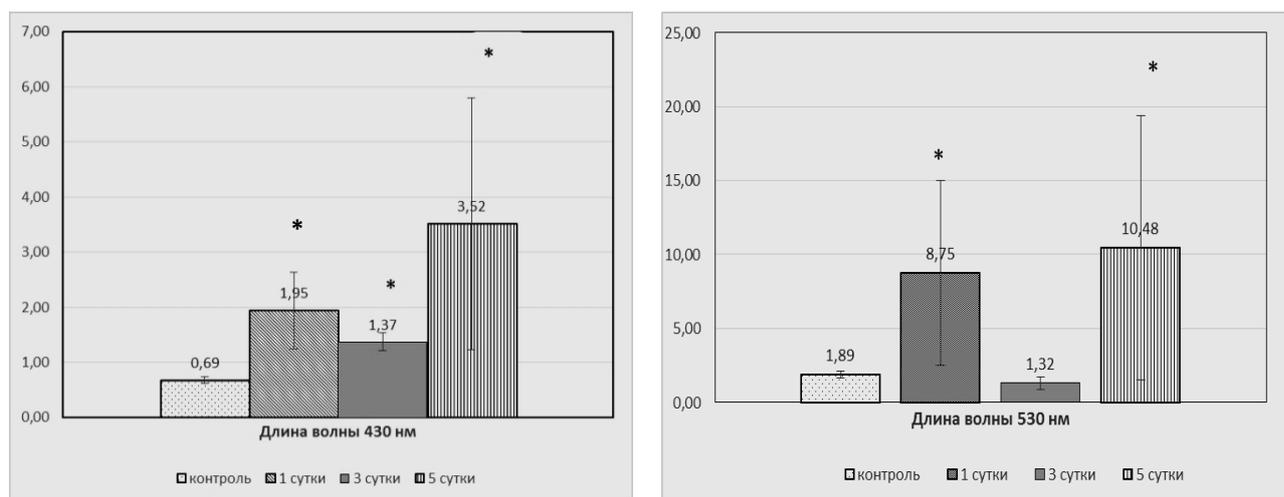
результат повышения проницаемости мембран митохондрий, приводящей к программируемой клеточной гибели [55].

3.2.2. Окислительная модификация белков и активность катепсинов В, L, Н в динамике экспериментального венозного тромбоза

Для дальнейшей оценки изменений общей активности цистеиновых катепсинов лейкоцитов при состояниях, потенциально сопряженных с окислительным стрессом *in vivo*, была выбрана модель экспериментального венозного тромбоза. Для данной патологии была продемонстрирована вовлеченность лейкоцитов в морфологические изменения стенки сосудов [70], поэтому экспериментальное моделирование мы посчитали оптимальным вариантом для параллельной оценки изменений активности цистеиновых катепсинов в зависимости от выраженности окислительной модификации белков не только в лейкоцитах крови, но и в ткани сосуда. Представляемые результаты получены в ходе выполнения диссертационного исследования [84] под научным руководством автора и представлены в совместных публикациях [22, 23, 54].

Обнаружено, что развитие экспериментального венозного тромбоза сопровождается нарастанием продуктов окислительной модификации белков в плазме крови, регистрация светопоглощения которых на данном этапе исследования проводилась спектрофотометрически на рекомендованных [51] длинах волн (Рисунок 17).

При этом в плазме крови статистически значимое нарастание продуктов окислительной модификации белков со светопоглощением при 430 нм и 530 нм, характерном для кетондинитрофенилгидразонов, регистрировалось уже на 1 сутки от момента формирования экспериментального тромбоза и сохранялось на 3 и 5 сутки без существенной временной динамики. Важно отметить наличие «провала» на 3 сутки для продуктов со светопоглощением при 530 нм, с возвращением их повышения относительно контроля на 5 сутки.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 17. Содержание продуктов окислительной модификации белков в плазме крови в динамике экспериментального венозного тромбоза (е.о.п./мг белка, $M \pm s$)

Зафиксированное при развитии экспериментального венозного тромбоза нарастание содержания в плазме крови продуктов окислительной модификации белков сопровождалось статистически значимым нарастанием общей активности цистеиновых катепсинов как в полиморфноядерных, так и в моноядерных лейкоцитах (Таблица 7).

Важно отметить, что нарастание активности катепсинов в лейкоцитах демонстрировало ту же динамику, что и повышение уровня продуктов окислительной модификации белков в плазме крови: статистически значимые изменения показателей достигались уже в 1 сутки экспериментального венозного тромбоза и сохранялись на 3 и 5 сутки без значительной временной динамики. Интересно также, что, хотя при описании роли лейкоцитов в патогенезе венозного тромбоза основная роль отводится полиморфноядерным нейтрофилам [49, 70], для моноядерных лейкоцитов нами также зарегистрировано повышение активности катепсинов В и Н.

На этом фоне, оценка состояния окислительной модификации белков в ткани тромбированной и интактной вены, проведенная с использованием

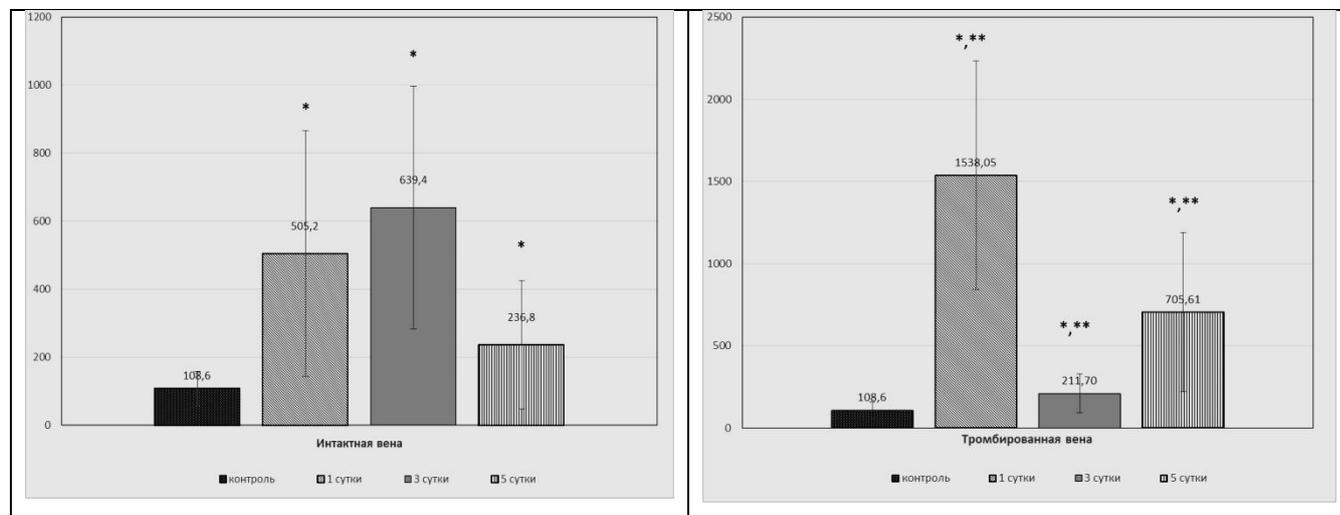
авторского способа [60], также продемонстрировала интенсификацию окислительных процессов (Рисунок 18).

Таблица 7

Изменение активности катепсинов В, L, Н лейкоцитов крови в динамике экспериментального венозного тромбоза, нмоль/чхмг белка ($M \pm s$)

	Контроль	Экспериментальный венозный тромбоз		
		1 сутки	3 сутки	5 сутки
Полиморфноядерные лейкоциты				
Катепсин В	0,84±0,19	14,61±4,36*	13,2±4,92*	12,54±2,94*
Катепсин L	17,15±4,47	29,27±5,87*	22,62±7,37	25,89±7,64
Катепсин Н	5,37±1,79	12,44±2,46*	10,96±4,59	11,08±5,05*
Моноядерные лейкоциты				
Катепсин В	1,26±0,24	16,14±5,05*	15,91±6,27*	8,38±3,00*
Катепсин L	22,91±5,66	27,95±7,41	23,44±5,24	19,53±8,60
Катепсин Н	1,40±0,29	12,31±3,67*	10,36±3,70*	5,74±2,36*

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы; ** - изменения показателя статистически значимы относительно полученных для интактной вены ($p < 0,05$)

Рисунок 18. Содержание продуктов окислительной модификации белков в стенке интактной и тромбированной вены в динамике экспериментального венозного тромбоза (S общ, е.о.п./мг белка, $M \pm s$)

Так, было обнаружено, что нарастание общего содержания продуктов окислительной модификации белков возникает уже на 1 сутки формирования экспериментального венозного тромбоза, причем изменения касаются как тромбированной, так и противоположной интактной вены. Однако в ткани тромбированной вены при этом изменения оказались более выраженными, что проявилось в статистически значимом повышении уровня продуктов окислительной модификации белков не только относительно контроля, но и относительно значений, полученных для интактной вены. Обнаруженные изменения согласуются с данными морфологических исследований [70], продемонстрировавших выраженные структурные изменения стенки сосуда уже на 1 сутки после формирования экспериментального тромбоза и могут оказаться частью механизма выявленных авторами повреждений эндотелиоцитов и базальной мембраны.

В дальнейшем содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в ткани поврежденного и противоположного сосуда сохраняло статистически значимое повышение относительно контроля. Однако сопоставление динамики изменений для интактной и тромбированной вены позволило выявить интересную закономерность: в тромбированной вене на 3 сутки от момента формирования экспериментального тромбоза обнаружено значительное снижение содержания окислительно модифицированных белков по сравнению с показателями, полученными для интактной вены. Возможно, это является результатом полноценного включения в указанный период факторов антиоксидантной защиты, кроме того, именно здесь могла бы проявиться роль цистеиновых катепсинов как факторов, снижающих содержание окислительно поврежденных белков за счет их деградации. Важно отметить, что на 5 сутки экспериментального тромбоза содержание окислительно модифицированных белков вновь повышается, статистически значимо превосходя показатели, полученные как для контроля, так для интактной вены. Возможно, эта динамика является отражением исчерпания возможностей антиоксидантной защиты на фоне продолжающегося патологического процесса.

Изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ ткани сосудистой стенки продемонстрировали следующую динамику (Таблица 8).

Таблица 8

Значения активности катепсинов В, L, Н стенки сосуда в динамике экспериментального венозного тромбоза, нмоль/чхг белка (M±s)

		Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
Контроль		227,00±47,39	505,21±129,95	158,07±24,45
Интактная вена	1 сутки	255,56±75,99	619,44±278,51	224,24±99,89
	3 сутки	557,25±285,37*	1196,13±275,50*	450,39±136,11*
	5 сутки	294,30±50,90	731,50±119,41	226,24±59,44
Тромбированная вена	1 сутки	469,15 ± 160,20 ^{*,**}	1284,47 ± 47,91 ^{*,**}	358,66 ± 134,94 ^{*,**}
	3 сутки	709,43±400,23*	1726,81±1080,47*	539,30±306,54*
	5 сутки	866,44±544,68 ^{*,**}	2130,88±1328,11 ^{*,**}	653,42±333,10 ^{*,**}

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно контроля; ** - относительно интактной вены (p<0,05)

В интактной вене активность катепсинов В, L, Н формировала статистически значимое повышение относительно контрольных значений лишь на 3 сутки от момента моделирования тромбоза, совпадая по времени с максимумом содержания продуктов окислительной модификации белков и возвращаясь на 5 сутки к уровням, сопоставимым с контрольными. В тромбированной же вене выраженное, статистически значимое нарастание активности всех изучаемых ферментов развивалось уже на 1 сутки от момента моделирования и продолжалось на 3 и 5 сутки без тенденции к снижению.

Для подтверждения положения о зависимости изменений активности цистеиновых катепсинов от степени выраженности окислительной модификации

белков при экспериментальном венозном тромбозе был проведен анализ корреляционных связей указанных параметров.

Обнаружены статистически значимые линейные прямые корреляционные связи общей активности катепсинов В, L, Н с общим содержанием продуктов окислительной модификации белков в тромбированной вене; для интактной вены, характеризовавшейся несколько иной динамикой изменений анализируемых параметров, статистически значимая линейная прямая корреляционная связь с общим содержанием продуктов окислительного карбонилирования протеинов получена только для катепсина В (Рисунок 19).

Таким образом, при *in vivo*-моделировании было подтверждено наличие чувствительности общей активности цистеиновых катепсинов к повышению уровня окислительно модифицированных белков и обнаружены прямые зависимости изменений активности цистеиновых катепсинов от изменений содержания продуктов окислительного карбонилирования протеинов.

3.2.3. Окислительная модификация белков и активность катепсинов В, L, Н тимоцитов и спленоцитов при *in vitro*-воздействии модуляторов синтеза оксида азота

Среди многочисленных биологических эффектов оксида азота особо выделяется способность его производных индуцировать окислительный стресс. Наибольшее значение в этом аспекте на сегодняшний день придается образуемому при взаимодействии NO с супероксид-анион радикалом мощному окислителю пероксонитриту [343], накопление которого способно вызывать многочисленные цитотоксические эффекты, в том числе повреждение митохондриальных мембран [393], а также индуцировать Вах-зависимый апоптоз [305].

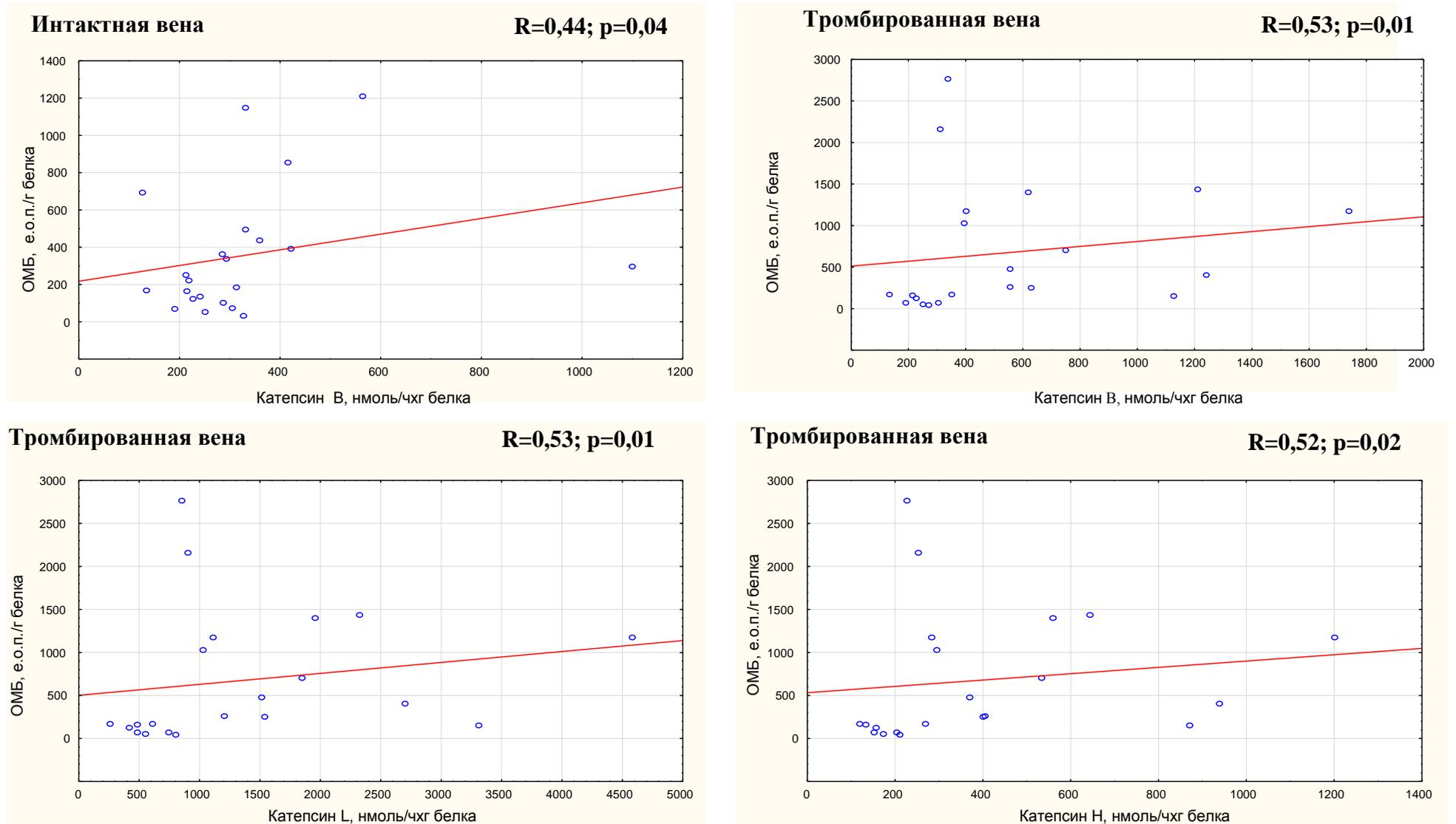


Рисунок 19. Зависимость общей активности цистеиновых катепсинов от содержания окислительно модифицированных белков в стенке тромбированной и интактной вены

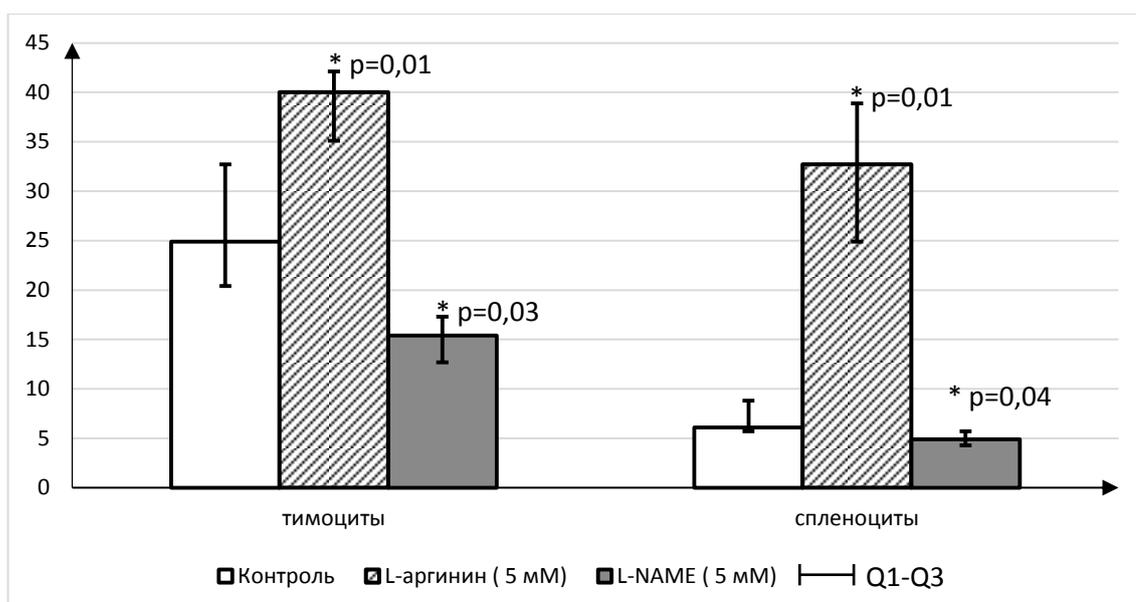
Однако следует отметить, что роль оксида азота в формировании окислительного стресса не столь однозначна: значительное количество исследований, описывающих антиоксидантные эффекты данного соединения дали основание говорить об оксиде азота как о двуликкой Янус-молекуле [304, 306, 310].

Ранее в исследованиях [66, 69] была продемонстрирована способность субстрата синтеза оксида азота L-аргинина и неселективного конкурентного ингибитора NO-синтазы L-NAME при *in vitro*-инкубациях нейтрофилов воздействовать на внутриклеточное содержание активных форм кислорода, концентрацию кальция в цитоплазме и число клеток с признаками раннего апоптоза.

В рамках задач нашего исследования проведена оценка изменений состояния окислительной модификации белков в сочетании с анализом показателей активности лизосомальных цистеиновых протеиназ и ее регуляции при инкубации тимоцитов и спленоцитов с указанными соединениями. Поскольку в указанных выше исследованиях различия числовых значений полученных результатов с контрольными значениями оказались не высокими, конечные концентрации действующих агентов нами были увеличены до 5 мМ, а продолжительность инкубации – до 24 часов [1-3, 76, 183].

В качестве характеристик экспериментальных моделей использовали показатель доли жизнеспособных клеток, определяемый при окраске трипановым синим и концентрацию метаболитов оксида азота в лизатах клеток.

Эффективность моделирования подтверждалась обнаружением статистически значимого повышения концентрации метаболитов оксида азота как в тимоцитах, так и в спленоцитах после их инкубации в среде, содержащей L-аргинин; внесение в среду инкубации ингибитора синтеза оксида азота L-NAME приводило к статистически значимому снижению показателей (Рисунок 20).



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 20. Изменения содержания метаболитов оксида азота (нмоль/мг белка) в тимоцитах и спленоцитах при *in vitro*-воздействии модуляторов синтеза оксида азота

При оценке жизнеспособности клеток (Таблица 9) зафиксировано статистически значимое снижение доли жизнеспособных клеток как для тимоцитов, так и для спленоцитов после инкубации в среде, содержащей L-NAME, что соотносится с результатами, полученными ранее для нейтрофилов периферической крови [66], внесение в среду инкубации L-аргинина не привело к статистически значимым изменениям показателя.

Таблица 9

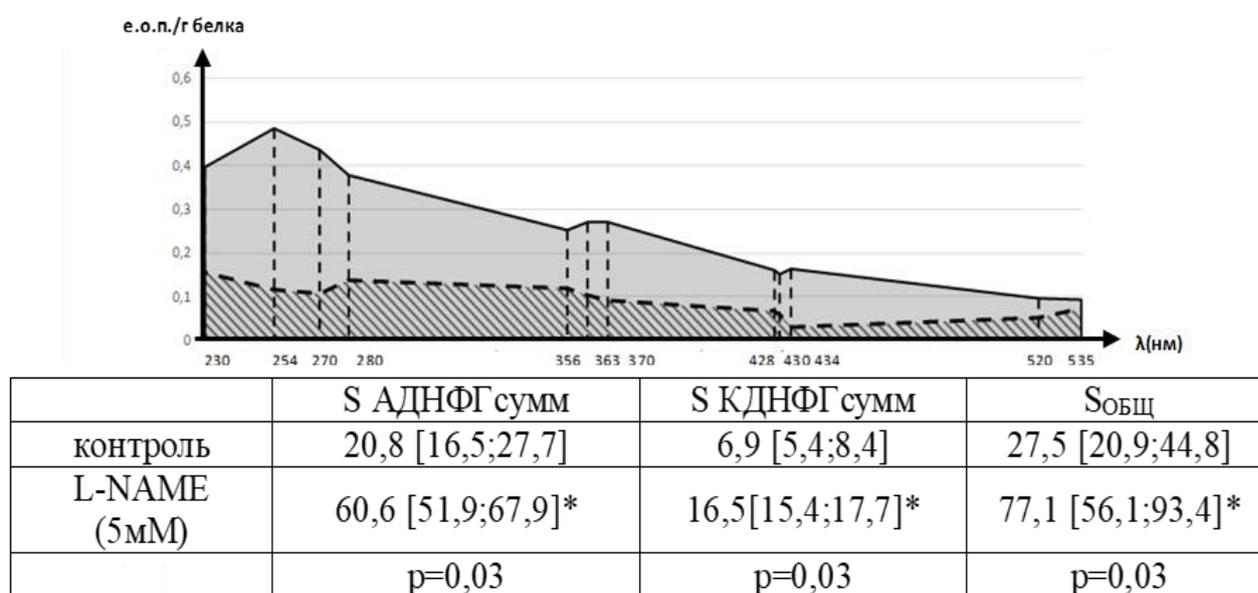
Доля жизнеспособных клеток после инкубации с модуляторами синтеза оксида азота, % ($M \pm s$)

	Тимоциты	Спленоциты
После выделения	70,2±2,8	69,7±1,0
Контроль	66,0±5,5	67,7±2,4
L-аргинин (5 мМ)	66,8±2,1	67,8±2,3
L-NAME (5 мМ)	52,0±2,1*	48,5±1,1*

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

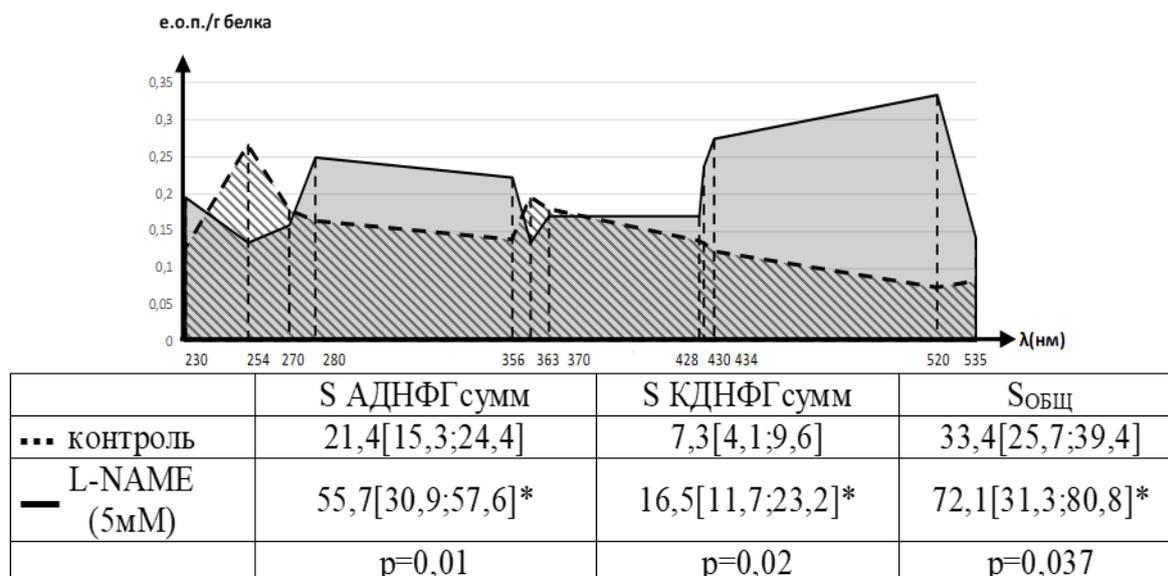
Инкубация тимоцитов и спленоцитов в среде, содержащей 5 мМ L-NAME привела к статистически значимому нарастанию содержания продуктов окислительного карбонилирования белков относительно контроля как в тимоцитах (Рисунок 21), так и в спленоцитах (Рисунок 22). При этом повышение общего содержания карбонильных производных (Собщ) в обоих типах клеток происходило за счет повышения как альдегидных (S АДНФГ сумм), так и кетонных производных (S КДНФГ сумм).

При *in vitro*-воздействии L-аргинина в конечной концентрации 5 мМ в тимоцитах обнаружено статистически значимое снижение общего содержания продуктов окислительной модификации белков относительно контрольных значений за счет как альдегидных, так и кетонных производных (Рисунок 23).



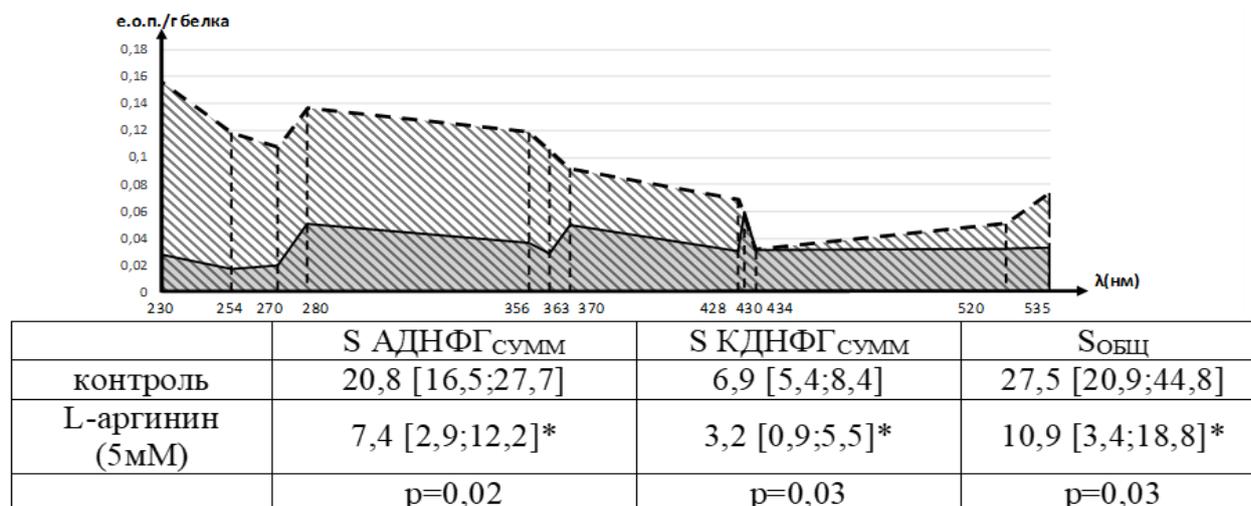
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 21. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в тимоцитах при *in vitro*-воздействии ингибитора синтеза NO, Me [Q₁;Q₃]



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 22. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в спленocyтaх при *in vitro*-воздействии ингибитора синтеза NO, Me [Q₁;Q₃]



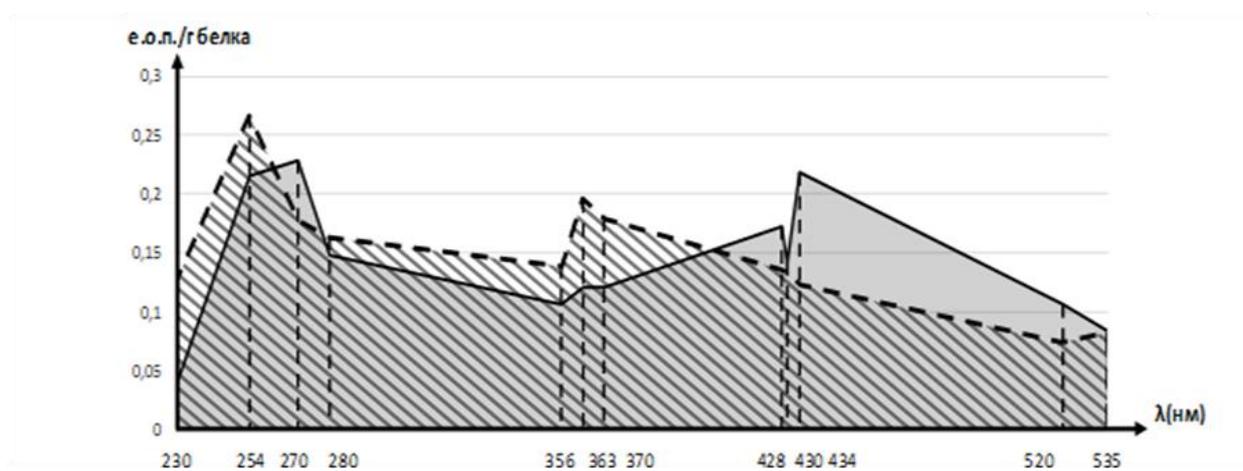
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 23. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в тимocyтaх при *in vitro*-воздействии субстрата синтеза NO, Me [Q₁;Q₃]

В спленocyтaх *in vitro*- воздействие субстрата синтеза NO L-аргинина сформировало лишь тенденцию к снижению содержания продуктов

окислительного карбонилирования белков, однако отличия показателей от контрольных оказались статистически не значимыми (Рисунок 24).

При анализе соотношения первичных и вторичных маркеров окислительного стресса (АДНФГ и КДНФГ соответственно) и значения резервно-адаптационного потенциала при *in vitro*-модулировании синтеза оксида азота оказалось (Рисунок 25), что в тимоцитах описанное выше нарастание продуктов окислительного карбонилирования белков, развивающееся под действием 5 мМ L-NAME сопровождается статистически значимым снижением показателя РАП, а снижение содержания окислительно модифицированных белков, вызываемое аргинином – статистически значимым повышением показателя РАП.



	S АДНФГ сумм	S КДНФГ сумм	S общ
----- контроль	22,3 [19,5; 29,6]	8,5 [4,5; 10,5]	33,4 [25,7; 39,4]
— L-аргинин (5мМ)	13,5 [8,9; 39,8]	7,2 [2,3; 22,5]	18,4 [12,9; 81,1]
	p=0,36	p=1,0	p=0,76

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

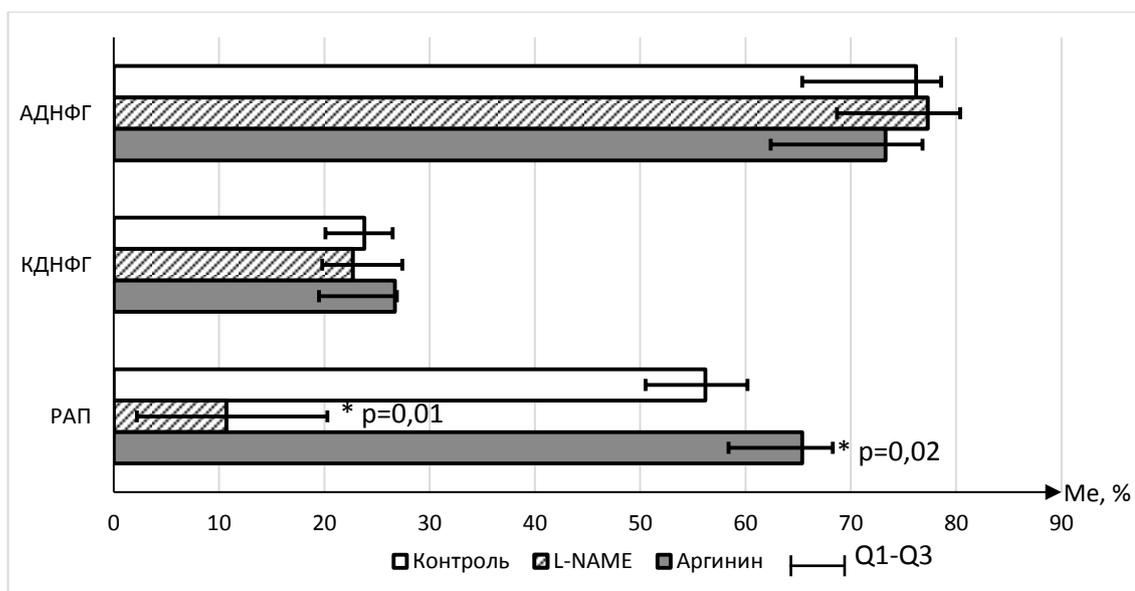
Рисунок 24. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в спленocyтaх при *in vitro*-воздействии субстрата синтеза NO, Me [Q₁;Q₃]

Поскольку воздействие ингибитора и субстрата синтеза оксида азота в описываемых моделях является краткосрочным, наиболее вероятной причиной выявленных изменений показателя РАП представляется описанное выше повышение/снижение содержания спонтанно образованных окислительно

модифицированных белков на фоне сохраняющегося неизменным количества белков, способных к металл-индуцированному окислению. Изменения же содержания АДНФГ и КДНФГ в данных моделях происходят, по-видимому, равномерно, поскольку статистически значимых изменений их соотношения в тимоцитах обнаружено не было.

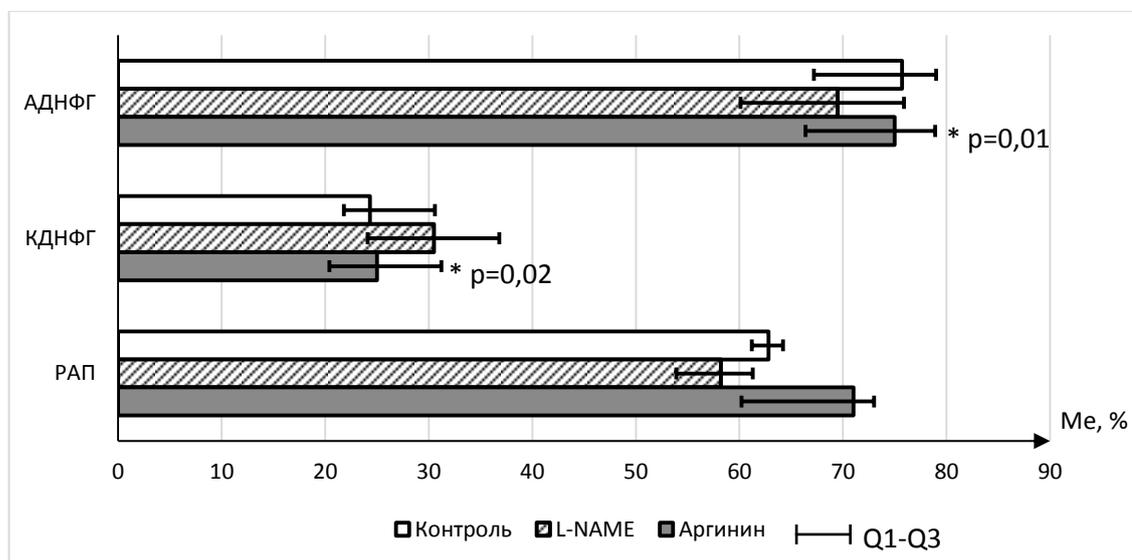
В спленоцитах показатели РАП демонстрировали тенденцию изменений, сходную с описанными для тимоцитов, однако статистически значимых отличий от контроля получено не было. Интересно, что, несмотря на отсутствие статистически значимых отличий содержания продуктов окислительной модификации белков при действии L-аргинина в данном типе клеток, при анализе соотношения первичных и вторичных маркеров обнаружено статистически значимое снижение доли КДНФГ, сопровождающееся статистически значимым повышением доли АДНФГ, что говорит о наличии влияния повышения синтеза оксида азота на состояние окислительного карбонилирования белков в данном типе клеток (Рисунок 26).

При оценке изменений общей активности цистеиновых катепсинов В, L и Н в условиях *in vitro*-модулирования синтеза оксида азота обнаружено, что 24-часовое воздействие L-аргинина в конечной концентрации 5 мМ не приводит к статистически значимым изменениям показателей относительно контрольных наблюдений ни в тимоцитах, ни в спленоцитах. В то же время, инкубация тимоцитов и спленоцитов в питательной среде, содержащей 5 мМ L-NAME, вызывая описанное выше повышение содержания окислительно модифицированных белков, формирует статистически значимое повышение общей активности катепсинов L и Н в обоих типах клеток, активность катепсина В также повышалась, но различия оказались статистически не значимыми (Таблица 10).



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 25. Доля первичных и вторичных маркеров окислительного стресса и значения резервно-адаптационного потенциала тимоцитов под действием L-NAME и L-аргинина *in vitro*



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 26. Доля первичных и вторичных маркеров окислительного стресса и значения резервно-адаптационного потенциала спленоцитов под действием L-NAME и L-аргинина *in vitro*

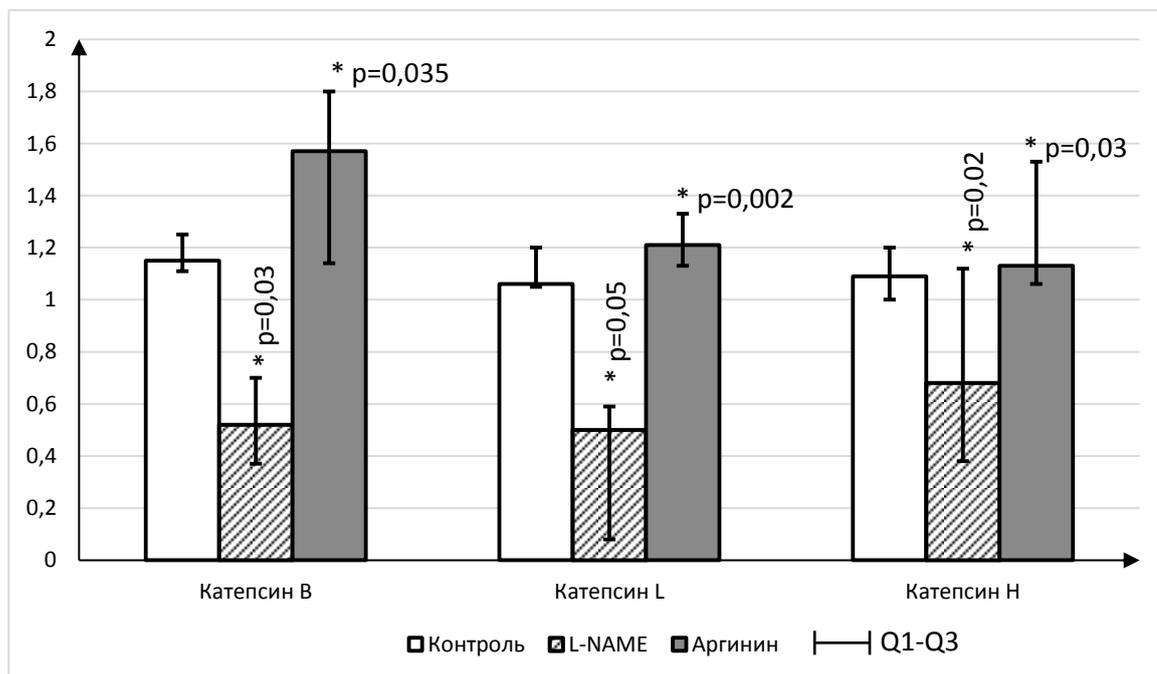
Изменения общей активности катепсинов В, L, Н тимоцитов и спленоцитов при *in vitro*-воздействии модуляторов синтеза оксида азота, нкат/мг белка (Me[Q₁;Q₃])

		Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
timoциты	Контроль	2,80[2,59;2,98]	6,72[6,31;6,92]	4,70[3,69;4,74]
	L-NAME 5 мМ	4,62[3,42;4,78]	12,74[9;14,11]* p=0,001	5,72[4,89;6,2]* p=0,03
	L-аргинин 5 мМ	2,99[2,26;3,18]	6,82[6,17;6,92]	4,73[3,37;4,76]
спленоциты	Контроль	0,87[0,57;1,51]	32,66[28,17;35,26]	10,75[9,29;12,85]
	L-NAME 5 мМ	4,41[3,73;4,41]	38,59[33,04;38,59]* p=0,01	17,47[16,4;20,2]* p=0,02
	L-аргинин 5 мМ	1,90[1,14;2,07]	28,35[24,16;32,61]	8,43[8,07;8,92]

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы (p<0,05)

Поскольку механизмом «быстрого реагирования» для повышения активности большинства протеолитических ферментов, в том числе для лизосомальных цистеиновых протеиназ, является ограниченный протеолиз, переводящий их из проферментной в энзиматически активную форму [156], для выяснения возможных причин обнаруженных изменений активности была проведена оценка показателя коэффициента аутокаталитического действия (K_{ACA}). В ходе исследования были получены однотипные изменения для тимоцитов (Рисунок 27) и спленоцитов (Рисунок 28). Оказалось, что нарастание активности катепсинов, формирующееся при *in vitro*-инкубации в присутствии ингибитора синтеза оксида азота L-NAME, сопровождается статистически значимым снижением показателя K_{ACA} относительно контроля, что говорит о повышении доли активных форм катепсинов относительно проферментных, что и является наиболее вероятной причиной описанных выше изменений. Важно отметить, что для катепсина В, повышение активности которого в тимоцитах и спленоцитах

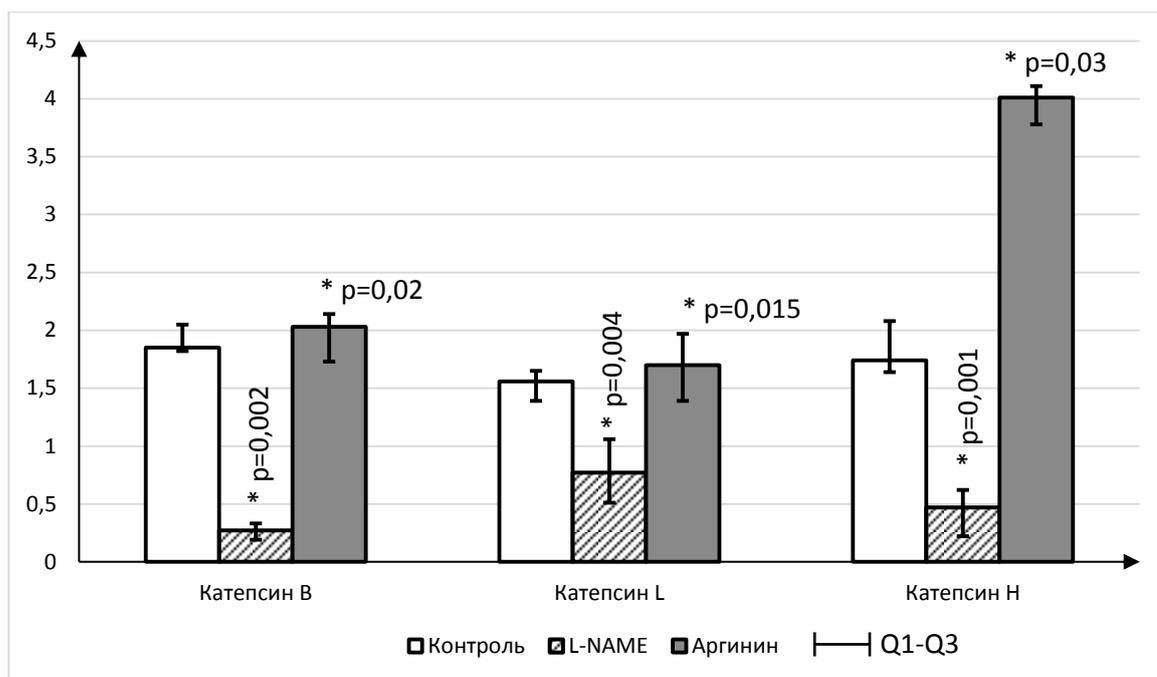
оказалось статистически не значимым, показатель K_{ACA} продемонстрировал статистически значимые отличия от контроля.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 27. Значения показателя коэффициента аутокаталитического действия (K_{ACA}) в тимоцитах при *in vitro*-воздействии модуляторов синтеза оксида азота

Интересным наблюдением мы считаем также обнаруженные нами статистически значимые нарастания показателя K_{ACA} для всех изучаемых катепсинов при *in vitro*-воздействии L-аргинина на тимоциты и спленоциты. Возможно, именно это и является ответом системы лизосомальных цистеиновых протеиназ в данной модели: «невостребованность» дополнительного протеолиза в условиях формирующегося под влиянием субстрата синтеза оксида азота снижения содержания окислительно модифицированных белков не приводит к изменениям активности цистеиновых катепсинов, поскольку повышается доля их энзиматически неактивных проферментных форм.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 28. Значения показателя коэффициента аутокаталитического действия (K_{ACA}) в спленоцитах при *in vitro*-воздействии модуляторов синтеза оксида азота

При анализе связей содержания метаболитов NO и состояния окислительного карбонилирования белков с показателями активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в описываемых моделях выявлены многочисленные статистически значимые корреляционные связи.

Так, обнаружены статистически значимые отрицательные корреляционные связи концентрации метаболитов NO и активности катепсинов В, L и H как для тимоцитов (Рисунок 29), так и для спленоцитов (Рисунок 30) и статистически значимые прямые корреляционные связи между общим содержанием продуктов окислительного карбонилирования белков (Собщ) и активностью указанных ферментов в тимоцитах (Рисунок 31) и спленоцитах (Рисунок 32).

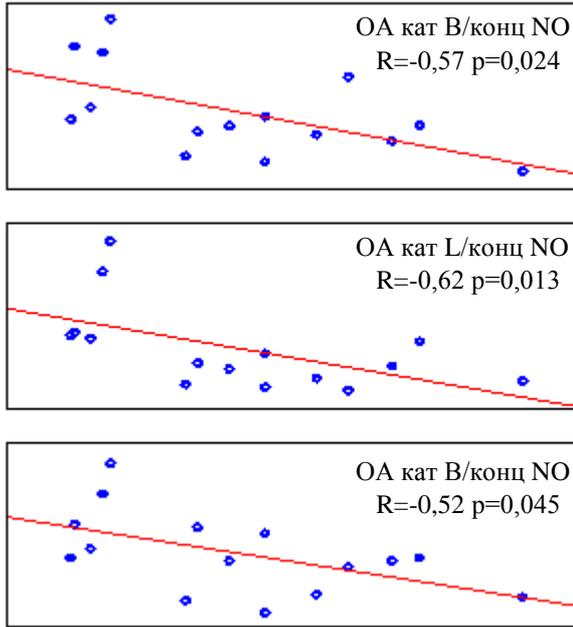


Рисунок 29. Зависимость общей активности (ОА) катепсинов В, L, Н от концентрации метаболитов NO в тимоцитах

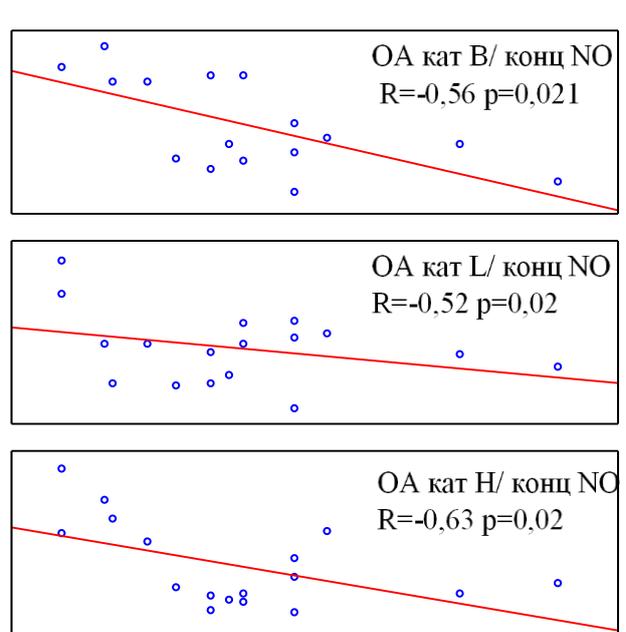


Рисунок 30. Зависимость общей активности (ОА) катепсинов В, L, Н от концентрации метаболитов NO в спленоцитах

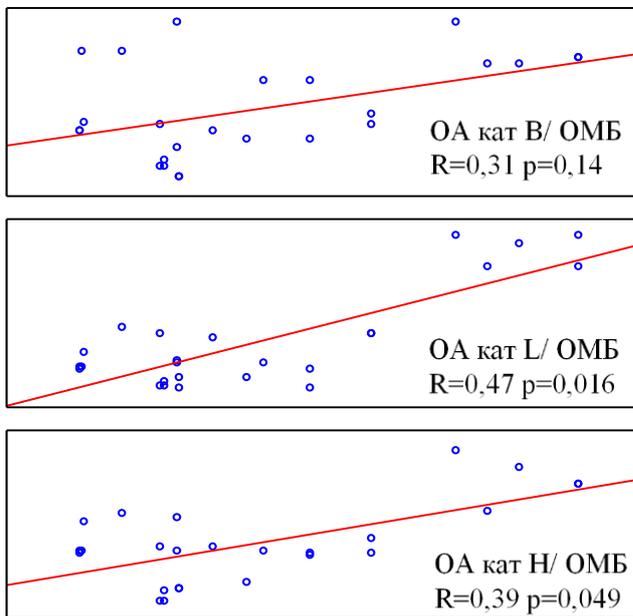


Рисунок 31. Зависимость общей активности (ОА) катепсинов В, L, Н от общего содержания ОМБ (S общ) в тимоцитах

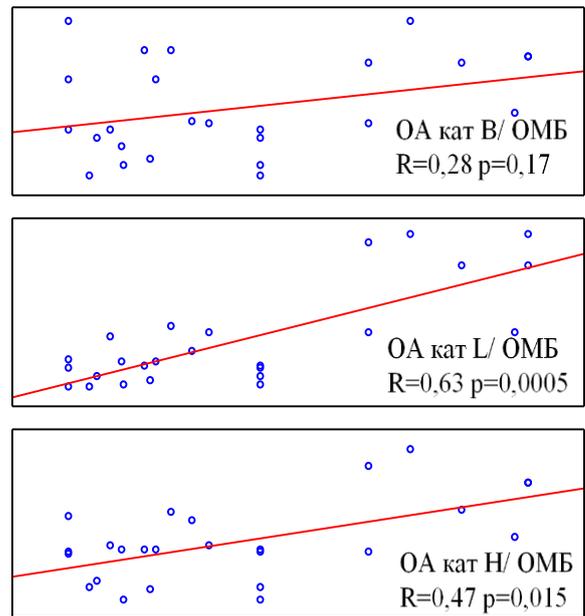


Рисунок 32. Зависимость общей активности (ОА) катепсинов В, L, Н от общего содержания ОМБ (S общ) в спленоцитах

Таким образом, *in vitro*- моделирование на клеточном уровне продемонстрировало, что развивающееся при подавлении синтеза оксида азота неселективным конкурентным ингибитором NO-синтазы L-NAME нарастание содержания окислительно модифицированных белков в тимоцитах и спленоцитах сопровождается нарастанием активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в сочетании с признаками повышения доли их активных форм относительно проферментных.

3.3. Состояние окислительной модификации белков и изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при экспериментальном изменении синтеза оксида азота *in vivo*

3.3.1. Характеристика экспериментальных моделей

Для исследования *in vivo*-воздействия модуляторов синтеза оксида азота применены неселективный ингибитор NO-синтазы L-N^o-нитро-аргинина метилового эфира (L-NAME) и субстрат синтеза оксида азота L-аргинин изолированно и в сочетании.

В качестве объектов исследования были выбраны ткани, для которых было показано наличие достаточного содержания ферментов генерации оксида азота: печень [394], почка [294] и легкое [217].

Оценка наличия изменений синтеза оксида азота в экспериментальных моделях осуществлялась измерением его метаболитов в плазме крови и цитоплазматической (неседиментируемой) фракции гомогенатов тканей (Таблица 11).

Обнаружено, что внутрибрюшинное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг в течение 7 суток, не вызвав статистически значимого снижения концентрации метаболитов NO в плазме крови, сформировало уменьшение их тканевой концентрации, причем для ткани печени и легкого отличия оказались статистически значимы относительно соответствующего контроля.

При этом пероральное введение L-аргинина (500 мг/кг, 10 суток), сформировав подтверждающее адекватность моделирования выраженное

статистически значимое нарастание концентрации метаболитов оксида азота в плазме крови, не привело к изменениям показателя в ткани печени и легкого, а в ткани почки вызвало статистически значимое его снижение относительно контрольных значений.

Если отсутствие изменений уровня метаболитов оксида азота в печени и легком можно объяснить исходным полным насыщением активных центров NO-синтазы субстратом, когда дополнительное алиментарное введение L-аргинина не приводит к дальнейшему нарастанию продуктов, то для ткани почки, отличающейся крайне высоким уровнем синтеза собственного L-аргинина [121], в качестве причин выявленного феномена снижения продукции оксида азота на фоне введения субстрата синтеза могут выступать либо субстратное ингибирование [387], либо эффект образующихся из избытка L-аргинина эндогенных ингибиторов синтеза оксида азота [125, 293].

Обнаруживаемое при этом нарастание уровня метаболитов оксида азота в плазме крови является, по-видимому, результатом действия эндотелиальной NO-синтазы как проявления «аргининового парадокса» [85, 435].

Сочетание введение субстанций, призванное продемонстрировать возможность L-аргинина компенсировать эффекты, развивающиеся при блокаде NO-синтазы, а также оценить возможные прямые эффекты L-NAME, не зависящие от вызываемого им снижения продукции оксида азота, сформировало уровень метаболитов оксида азота в плазме, сопоставимый с таковым для группы, получавшей L-аргинин изолированно. При этом во всех изучаемых тканях концентрация метаболитов оксида азота оказалась статистически значимо повышена относительно группы, получавшей изолированно L-NAME, а в ткани печени и почки – еще и относительно соответствующего контроля. Особенно следует отметить, что для ткани почки, в которой изолированное введение L-аргинина приводило к парадоксальному снижению концентрации метаболитов оксида азота, сочетание L-аргинина с ингибитором NO-синтазы L-NAME сформировало статистически значимое повышение относительно группы с изолированным введением субстрата синтеза NO.

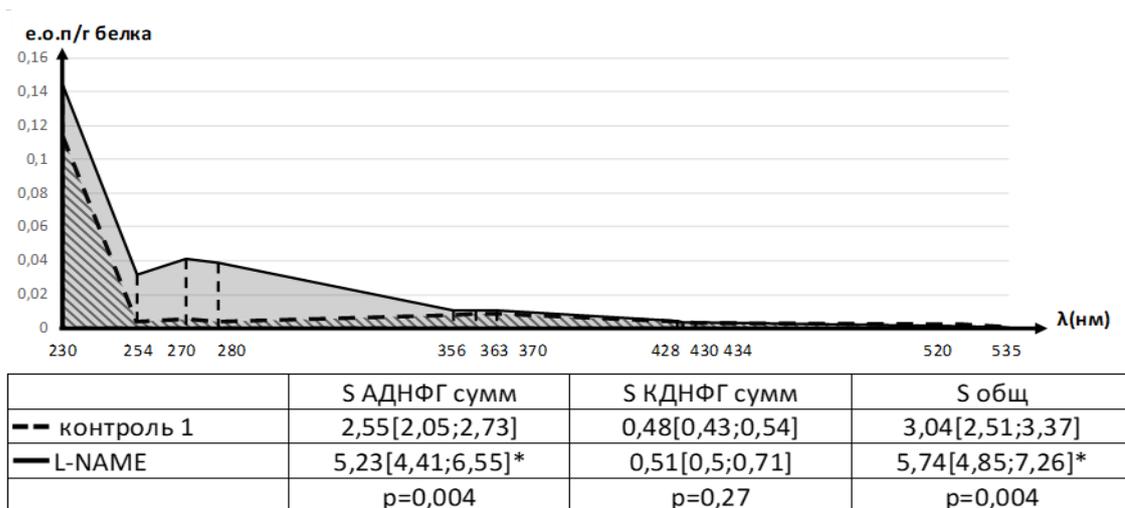
Содержание метаболитов оксида азота в исследуемом материале, Me[Q₁;Q₃]

ГРУППА	МАТЕРИАЛ			
	Печень (нмоль/мг белка)	Почка (нмоль/мг белка)	Легкое (нмоль/мг белка)	Плазма (мкмоль/л)
Физ. р-р 7 дней в/брюшинно (Контроль 1)	0,198 [0,185;0,225]	0,192 [0,174;0,207]	0,703 [0,637;0,752]	23,12 [19,94; 29,87]
L-NAME 25 мг/кг 7 дней в/брюшинно	0,154 [0,130;0,158]* p ₁ =0,02	0,139 [0,120;0,166]	0,178 [0,155;0,257]* p ₁ =0,003	22,34 [20,03; 26,19]
Физ. р-р 10 дней per os (Контроль 2)	0,204 [0,183;0,213]	0,190 [0,177;0,215]	0,729 [0,649;0,757]	24,22 [21,91; 28,07]
Аргинин 500 мг/кг 10 дней per os	0,174 [0,167;0,238]	0,143 [0,136;0,154]* p ₁ =0,008	0,725 [0,644;0,773]	55,99 [51,95; 76,98]* p ₁ =0,03
Физ. р-р в/брюшинно+per os (Контроль 3)	0,203 [0,186;0,212]	0,181 [0,166;0,185]	0,736 [0,677;0,755]	25,02 [24,01; 25,97]
L-NAME 25 мг/кг 7 дней в/брюшинно +Аргинин 500 мг/кг 10 дней per os	0,254 [0,239;0,263]*• p ₁ =0,031 p ₃ =0,002	0,222 [0,200;0,242]*▲• p ₁ =0,022 p ₂ =0,008 p ₃ =0,010	0,406 [0,351;0,447]*▲• p ₁ =0,008 p ₂ =0,008 p ₃ =0,046	47,90 [21,52; 77,37]• p ₃ =0,04

Примечание: *, p₁ - статистически значимые отличия от соответствующей контрольной группы (p<0,05); ▲, p₂ - статистически значимые отличия от группы с введением аргинина (p<0,05); •, p₃ - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг (p<0,05)

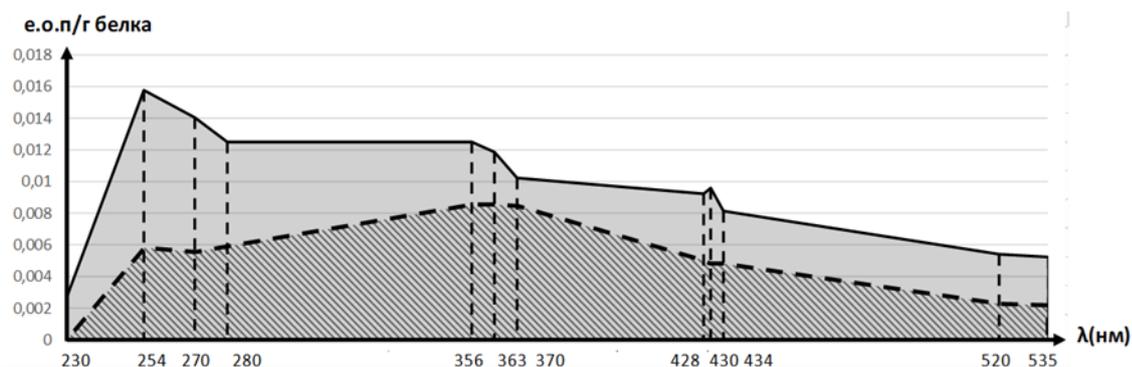
3.3.2. Результаты комплексной оценки состояния окислительной модификации белков ткани печени, почки и легкого под действием модуляторов синтеза оксида азота

При анализе содержания продуктов окислительного карбонилирования белков [25, 76] обнаружено, что введение неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME приводит к статистически значимому нарастанию их концентрации в цитоплазматической фракции ткани печени (Рисунок 33), почки (Рисунок 34) и легкого (Рисунок 35). При этом во всех описанных тканях наблюдалось статистически значимое относительно контрольных значений повышение содержания первичных маркеров окислительного стресса (АДФФГ), в ткани почки и легкого эти изменения сочетались со статистически значимым повышением содержания вторичных маркеров (КДФФГ).



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

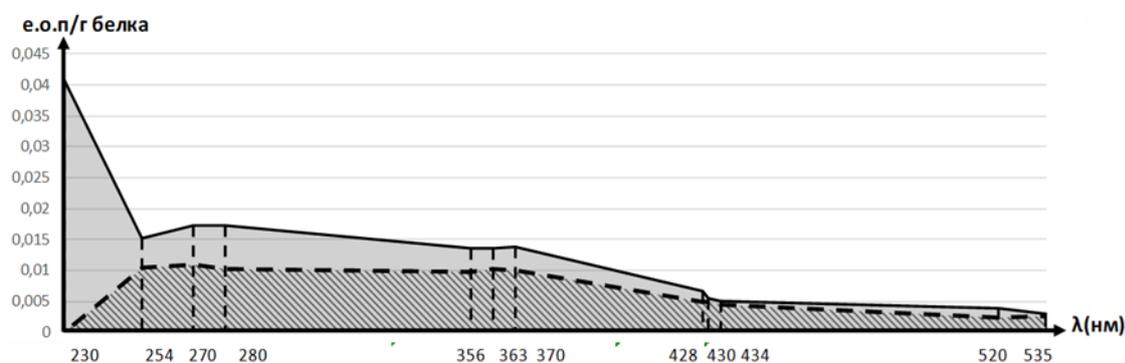
Рисунок 33. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза NO, Me [Q₁;Q₃]



	S АДНФГ сумм	S КДНФГ сумм	S общ
--- контроль 1	1,16[1;1,75]	0,51[0,46;0,54]	1,69[1,47;2,27]
— L-NAME	2,24[2,04;2,74]*	0,84[0,67;0,9]*	3,08[2,72;3,62]*
	p=0,007	p=0,003	p=0,005

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 34. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани почки при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза NO, Me [Q₁;Q₃]



	S АДНФГ сумм	S КДНФГ сумм	S общ
--- контроль 1	1,62[0,98;1,66]	0,57[0,48;0,61]	2,2[1,39;2,28]
— L-NAME	3,07[2,55;3,81]*	0,8[0,69;1,19]*	3,76[3,34;5,06]*
	p=0,003	p=0,02	p=0,01

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

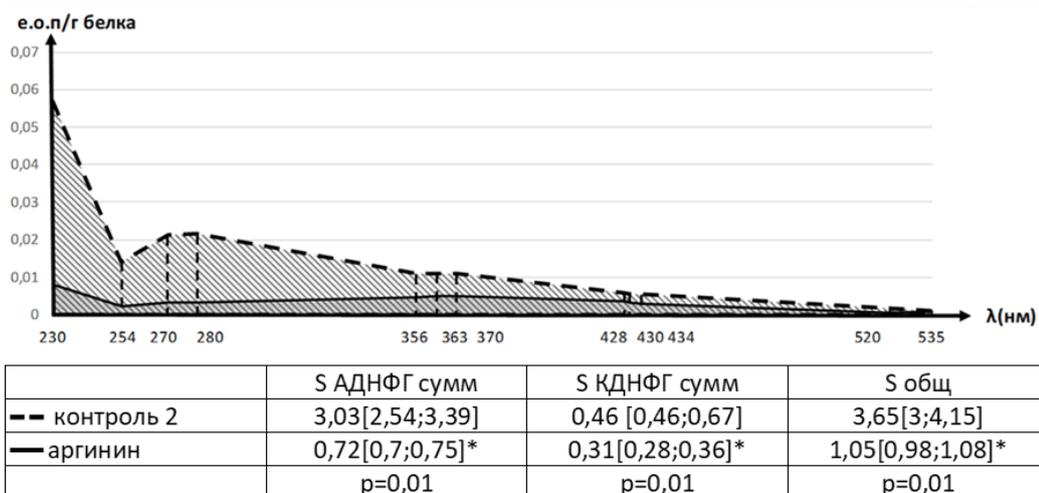
Рисунок 35. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани легкого при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза NO, Me [Q₁;Q₃]

Вышеописанные изменения совпадают с ранее описанными в *in vitro*-эксперименте тенденциями и демонстрируют способность ингибитора синтеза оксида азота L-NAME индуцировать окислительный стресс, подтверждая тезис об антиоксидантных эффектах оксида азота [304].

In vivo-воздействие изолированного введения L-аргинина привело к статистически значимому снижению общего содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в ткани печени за счет снижения как АДНФГ, так и КДНФГ (Рисунок 36). Поскольку статистически значимых изменений содержания метаболитов оксида азота в данной ткани при этом зафиксировано не было, следует предположить, что в данном случае аргинин способен проявлять самостоятельные протективные эффекты в отношении окислительного повреждения белков, не связанные с его ролью как субстрата синтеза оксида азота. Для L-аргинина описано прямое антиоксидантное действие [189, 398], однако дополнительные эффекты субстанции по защите тканей от окислительного повреждения продолжают в настоящее время активно изучаться [247].

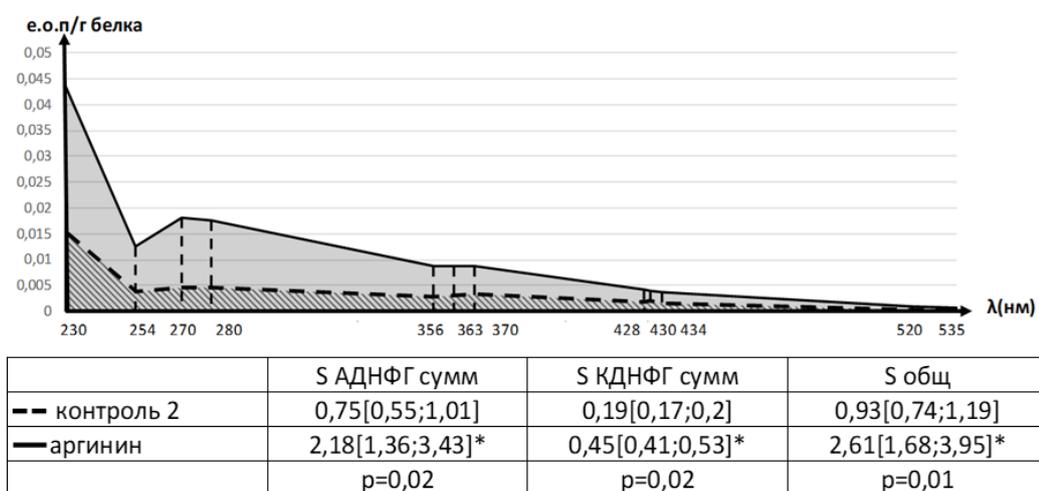
В ткани почки, где введение L-аргинина сформировало описанное выше снижение концентрации метаболитов оксида азота, изменения показателей содержания продуктов окислительного карбонилирования белков оказались сходными с изменениями, развивавшимися на фоне введения ингибитора синтеза NO L-NAME: статистически значимо относительно контроля повысилось общее содержание ОМБ за счет как АДНФГ, так и КДНФГ (Рисунок 37). Таким образом, нарастание интенсивности процесса окислительной модификации белков в данной ткани вызывается снижением продукции оксида азота независимо от вызвавшей его причины.

В ткани легкого (Рисунок 38) изолированное *in vivo*-воздействие L-аргинина не привело к статистически значимым изменениям содержания продуктов окислительной модификации белков.



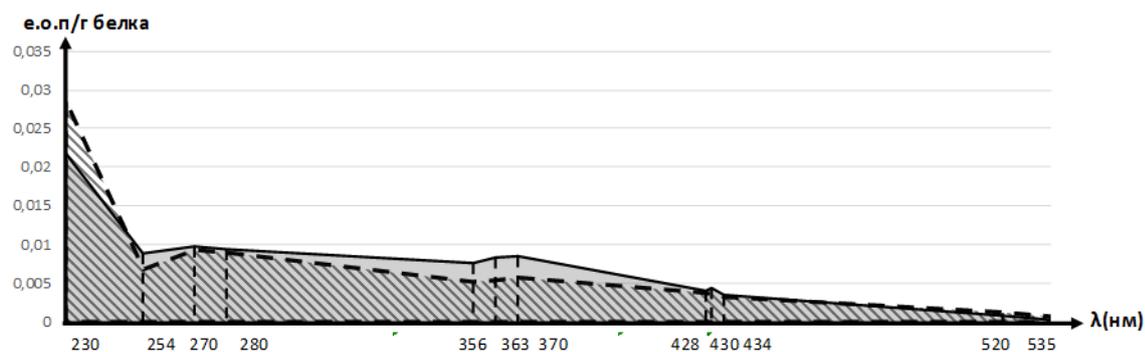
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 36. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени при изолированном *in vivo*-воздействии L-аргинина, Ме [Q₁;Q₃]



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 37. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани почки при изолированном *in vivo*-воздействии L-аргинина, Ме [Q₁;Q₃]



	S АДНФГ сумм	S КДНФГ сумм	S общ
--- контроль 2	1,43[1,37;1,5]	0,35[0,32;0,38]	1,74[1,71;1,84]
— аргинин	1,59[1,45;1,87]	0,45[0,39;0,56]	2,08[1,85;2,38]
	p=0,45	p=0,24	p=0,24

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 38. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани легкого при изолированном *in vivo*-воздействии L-аргинина, Me [$Q_1; Q_3$]

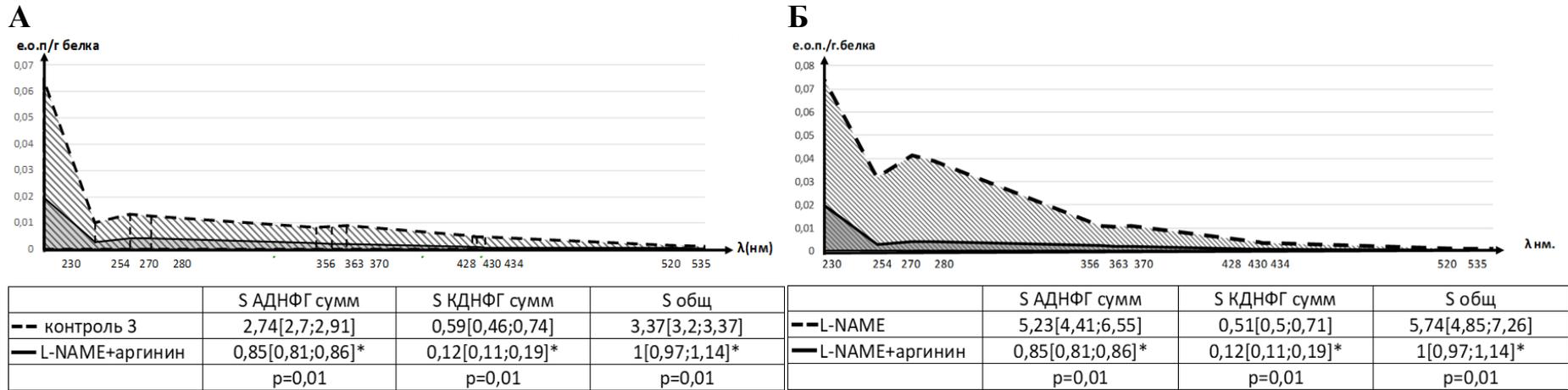
Сочетанное введение ингибитора и субстрата синтеза оксида азота, вызывая в ткани печени повышение концентрации его метаболитов не только относительно группы, получавшей изолированно ингибитор, но и относительно контроля, на показатели окислительного карбонилирования белков также оказало эффекты, демонстрирующие преобладающее действие аргинина (Рисунок 39): содержание продуктов окислительной модификации белков статистически значимо снижалось по сравнению с контрольными значениями и показателями группы, получавшей изолированно L-NAME, приближаясь к значениям, полученным при изолированном введении L-аргинина.

В ткани почки, где эффекты изолированного введения L-NAME и L-аргинина на уровень метаболитов оксида азота и продуктов окислительной модификации белков оказались однотипными, сочетанное введение субстанций, вызывая значительный прирост уровня метаболитов оксида азота, привело к статистически значимому снижению содержания продуктов окислительного карбонилирования белков как относительно группы, получавшей изолированно ингибитор NO-синтазы, так и относительно группы с изолированным введением

L-аргинина, приблизив показатели к значениям контрольной группы (Рисунок 40). Таким образом, сочетанное введение вызвало не потенцированные, а противоположные к изолированному введению сустанций эффекты, сформировав проявления, ожидаемые как ответ на введение субстрата синтеза оксида азота.

Ткань легкого, оказавшаяся не чувствительной к изолированному воздействию L-аргинина в отношении изменения уровня метаболитов оксида азота и содержания окислительно модифицированных белков, продемонстрировала полное нивелирование повышения содержания ОМБ, развивавшегося на фоне L-NAME, при сочетании его с L-аргином (Рисунок 41).

Вышеописанные изменения позволяют говорить о наличии связи между состоянием окислительной модификации белков и уровнем внутриклеточной продукции оксида азота, что было дополнительно подтверждено корреляционным анализом: обнаружены статистически значимые обратные корреляционные связи средней степени между общим содержанием продуктов окислительного карбонилирования белков (S общ) и уровнем метаболитов оксида азота в ткани печени (Рисунок 42), почек (Рисунок 43) и легкого (Рисунок 44).



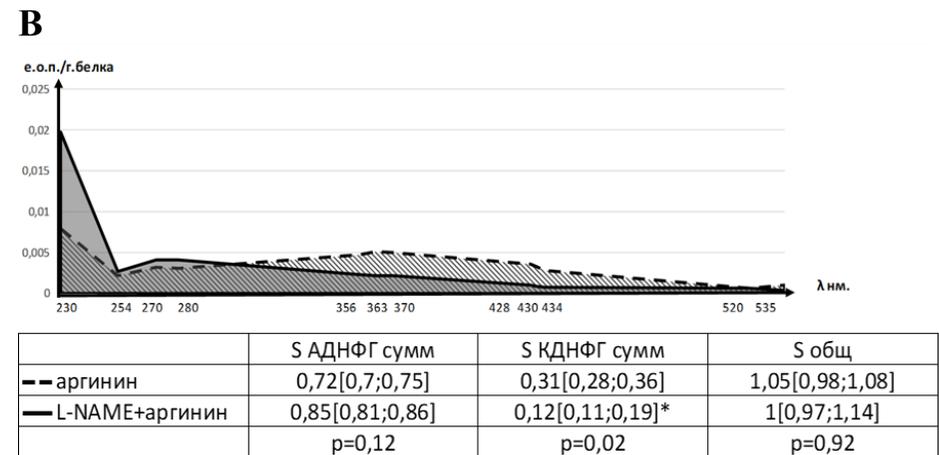
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно:

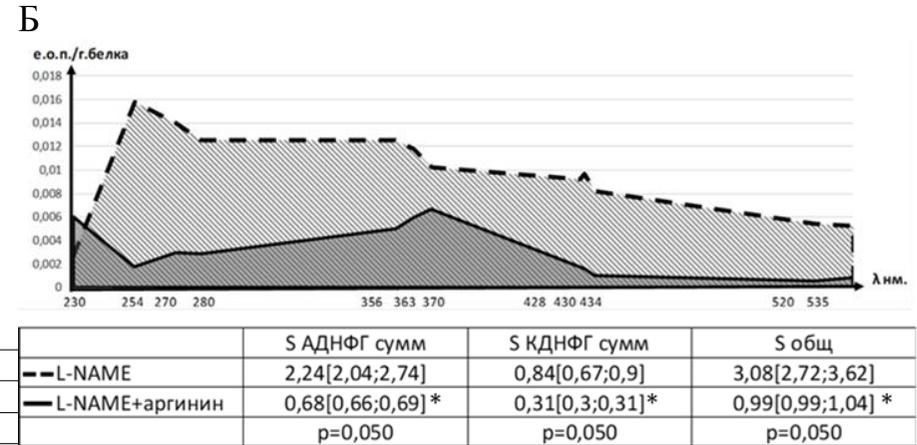
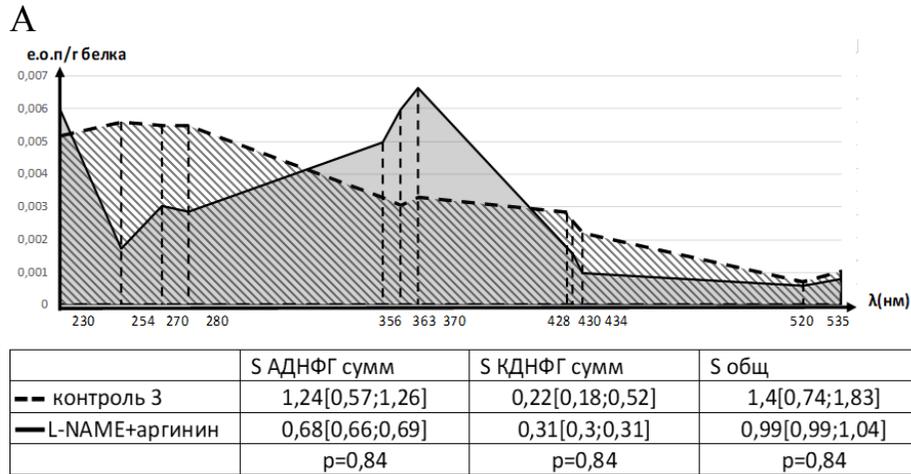
А – контрольной группы ($p < 0,05$);

Б – группы с изолированным введением L-NAME ($p < 0,05$);

В – группы с изолированным введением L-аргинина ($p < 0,05$)

Рисунок 39. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME, Ме [Q₁;Q₃]





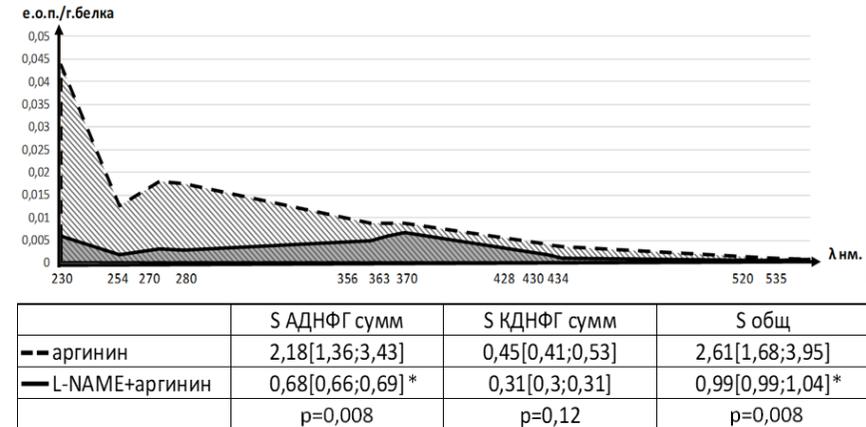
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно:

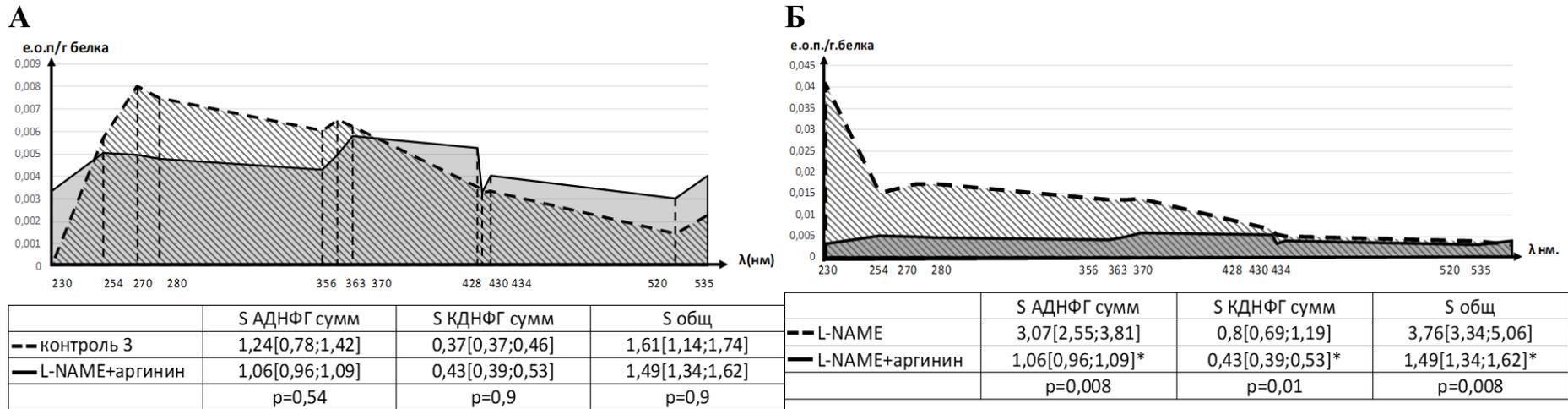
А – контрольной группы ($p < 0,05$);

Б – группы с изолированным введением L-NAME ($p < 0,05$);

В – группы с изолированным введением L-аргинина ($p < 0,05$)

Рисунок 40. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани почки при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME, Me [Q₁;Q₃]





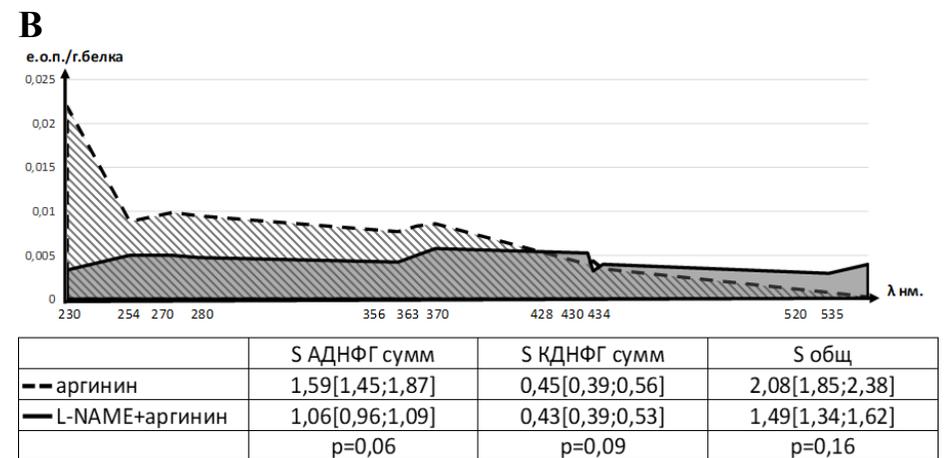
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно:

А – контрольной группы ($p < 0,05$);

Б – группы с изолированным введением L-NAME ($p < 0,05$);

В – группы с изолированным введением L-аргинина ($p < 0,05$)

Рисунок 41. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани легкого при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME, Me [Q₁;Q₃]



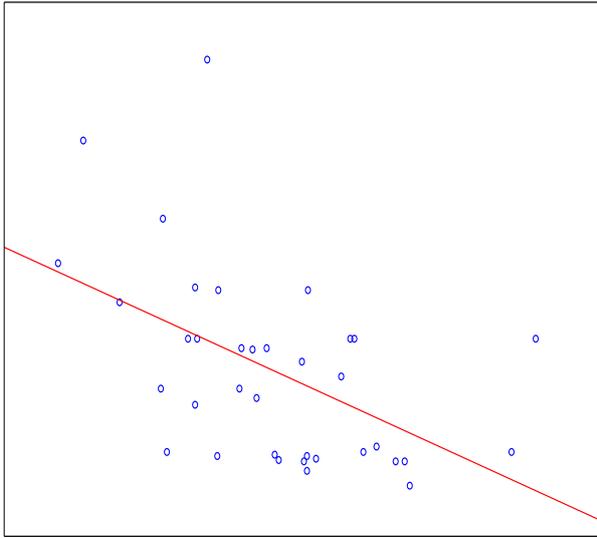


Рисунок 42. Зависимость общего содержания продуктов окислительного карбонилирования белков (S общ) от концентрации метаболитов NO в цитоплазматической фракции ткани печени; $R = -0,51$, $p = 0,001$

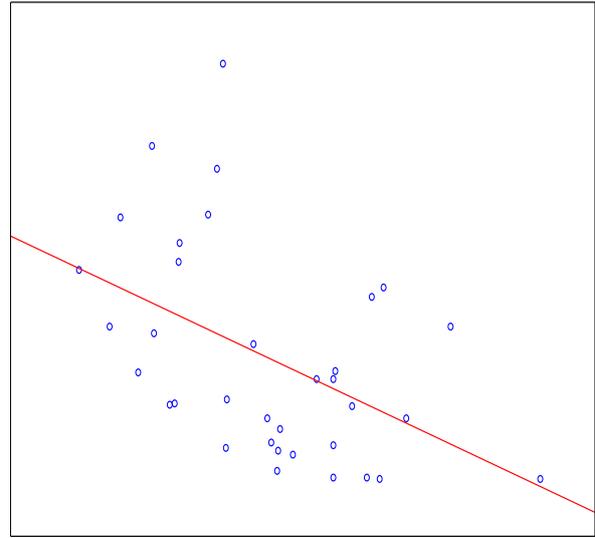


Рисунок 43. Зависимость общего содержания продуктов окислительного карбонилирования белков (S общ) от концентрации метаболитов NO в цитоплазматической фракции ткани почки; $R = -0,51$, $p = 0,002$

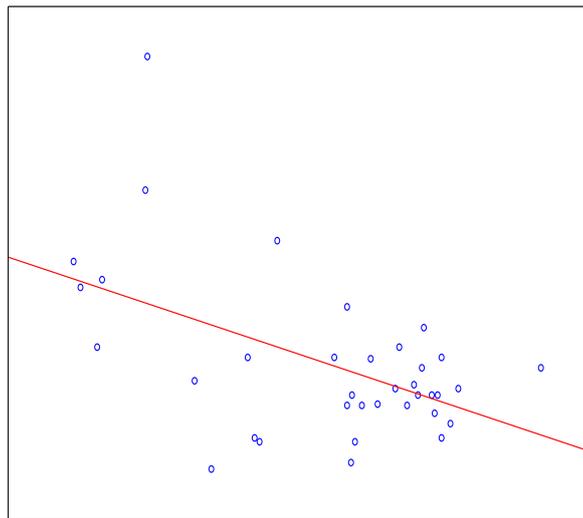


Рисунок 44. Зависимость общего содержания продуктов окислительного карбонилирования белков (S общ) от концентрации метаболитов NO в цитоплазматической фракции ткани легкого; $R = -0,36$, $p = 0,03$

Дальнейшая характеристика изменений состояния окислительной модификации белков под действием модуляторов синтеза оксида азота *in vivo* включала анализ изменений соотношения первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя резервно-адаптационного потенциала ткани, рассчитанного на основе сопоставления доли общего количества карбонильных производных белков (S общ), сформированного при спонтанном окислении, к принятому за 100% количеству, образованному *in vitro* при металл-индуцированном окислении.

Обнаружено, что в ткани печени нарастание содержания продуктов окислительной модификации белков, развивающееся на фоне ингибирования образования оксида азота под действием L-NAME, сопровождается статистически значимым нарастанием доли первичных маркеров окислительного стресса (АДНФГ) и снижением показателя резервно-адаптационного потенциала (Рисунок 45). Изолированное введение L-аргинина, приводившее к снижению содержания продуктов окислительной модификации белков, здесь оказывает также позитивное воздействие: доля АДНФГ статистически значимо снижается, а показатель РАП – возрастает (Рисунок 46).

Сочетанное введение модуляторов синтеза оксида азота приблизило показатели доли АДНФГ и КДНФГ к контрольным значениям, сформировав их статистически значимые отличия от результатов, полученных для изолированного введения субстанций. Однако показатель РАП сохранился в зоне значений, близких к полученным для изолированного действия аргинина и оказался статистически значимо выше диапазона, полученного не только для изолированного введения ингибитора NO-синтазы, но и для контрольной группы (Рисунок 47).

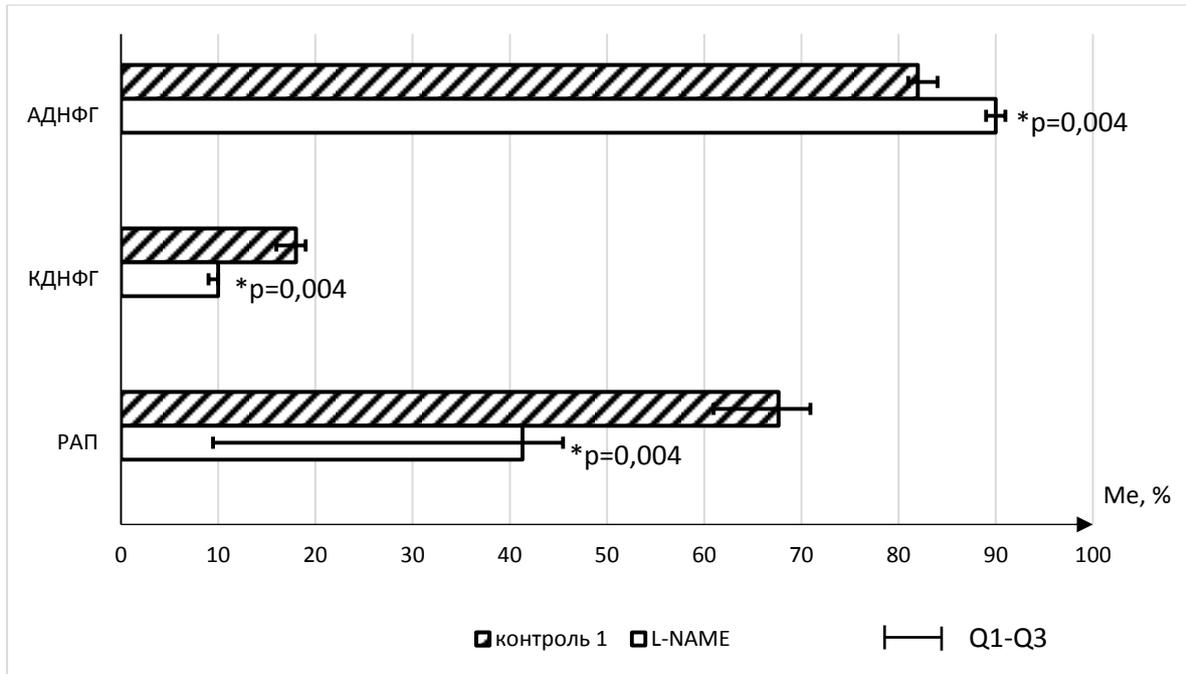


Рисунок 45. Изменение доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани печени при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза NO

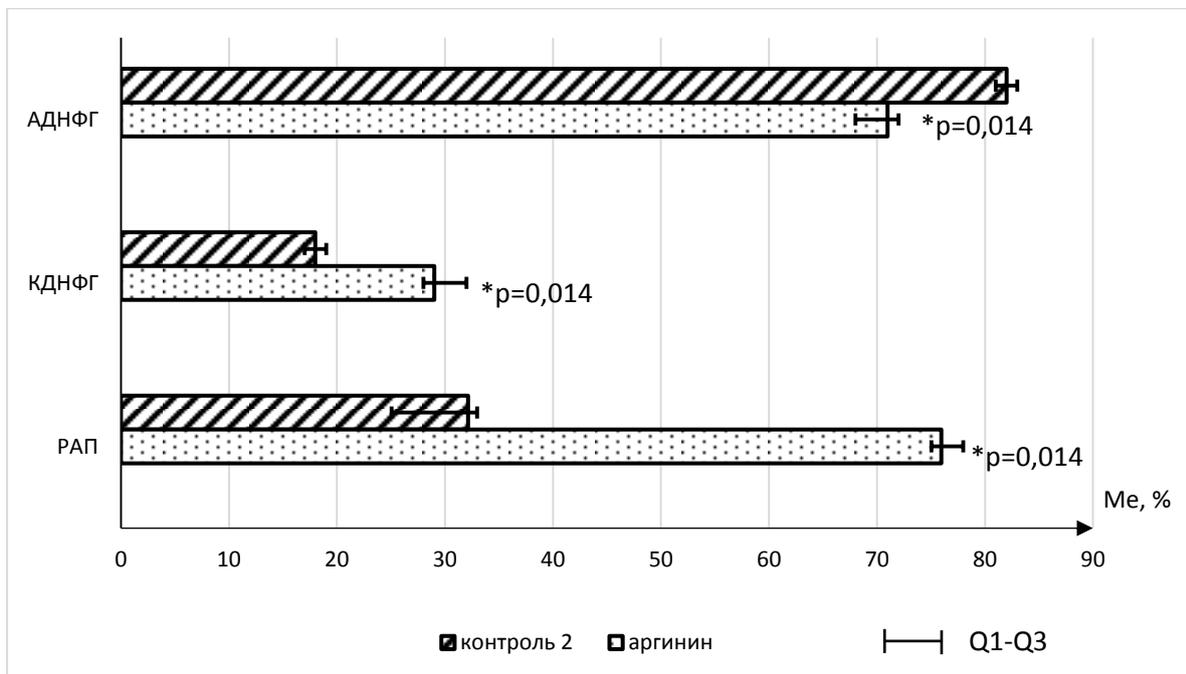
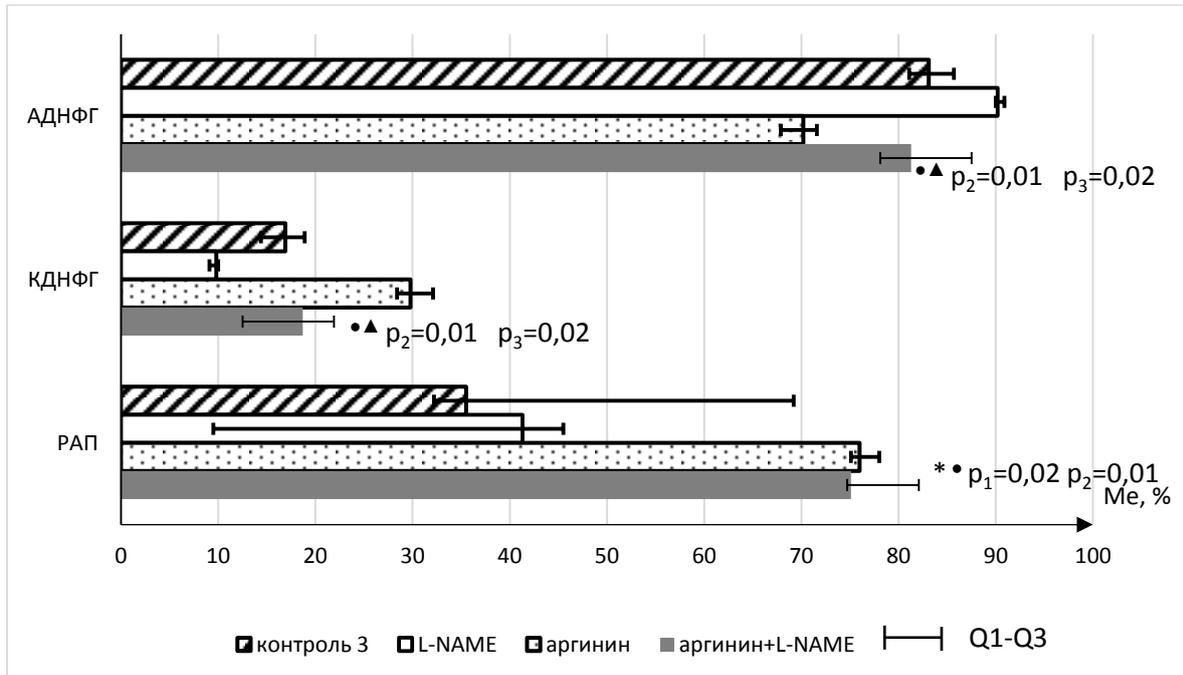


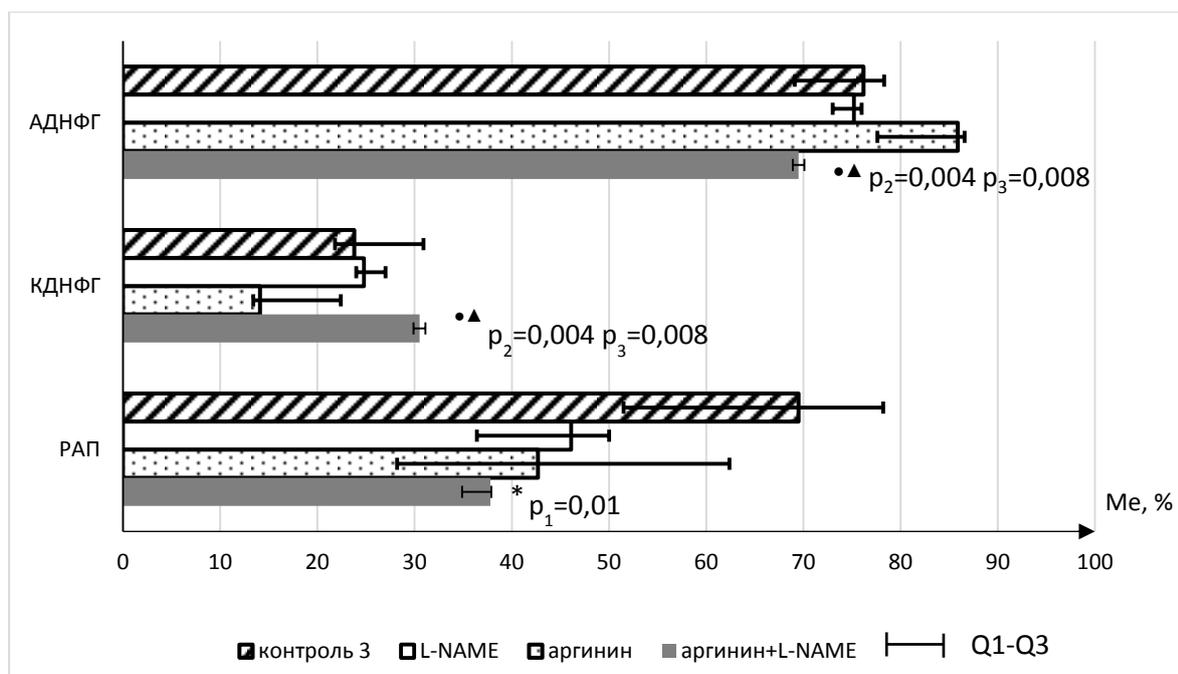
Рисунок 46. Изменение доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани печени при *in vivo*-воздействии L-аргинина



Примечание: *, p_1 - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы; •, p_2 - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-NAME; ▲, p_3 - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-аргинина

Рисунок 47. Изменение доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани печени при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME

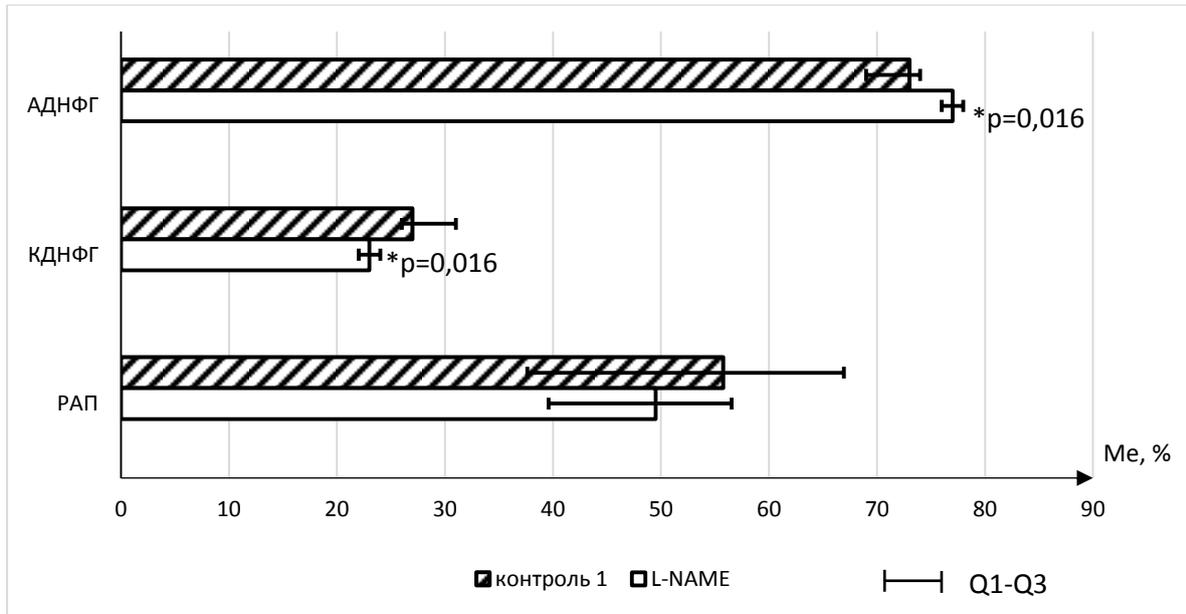
В ткани почки статистически значимых изменений доли АДНФГ и КДНФГ, а также показателя РАП на фоне изолированного введения ингибитора и субстрата синтеза оксида азота не получено; сочетанное введение субстанций привело к статистически значимому снижению РАП относительно контроля, продемонстрировав в данном случае усугубление эффекта L-аргинина (Рисунок 48).



Примечание: *, p_1 - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы; ●, p_2 - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-NAME; ▲, p_3 - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-аргинина

Рисунок 48. Изменение доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани почки при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME

В ткани легкого изолированное введение L-NAME вызвало статистически значимое нарастание доли первичных маркеров окислительного стресса без изменений показателя РАП (Рисунок 49), изолированное введение аргинина, не вызывавшее изменения содержания продуктов окислительной модификации белков, на изучаемых здесь показателях также не отразилось (Рисунок 50). При этом сочетание применения ингибитора NO-синтазы с L-аргинином приблизило показатели доли АДНФГ и КДНФГ и значение РАП уровню контрольных, сформировав статистически значимые отличия от показателей, полученных для изолированного применения субстанций (Рисунок 51).



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 49. Изменение доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани легкого при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза NO

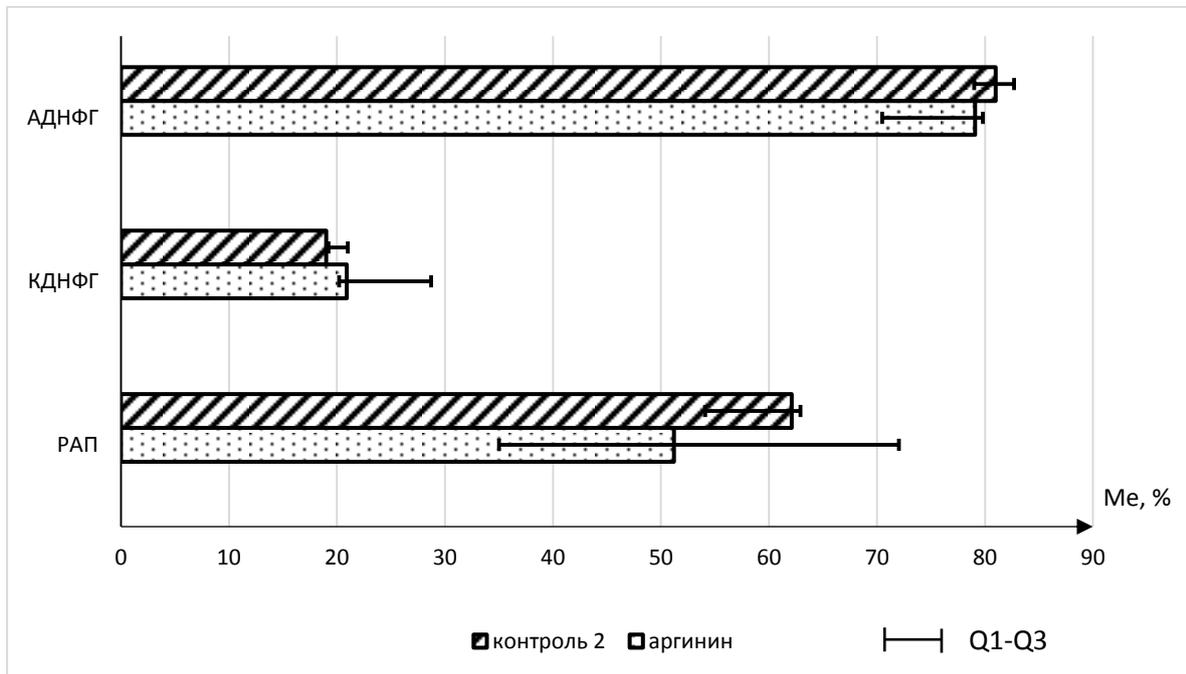
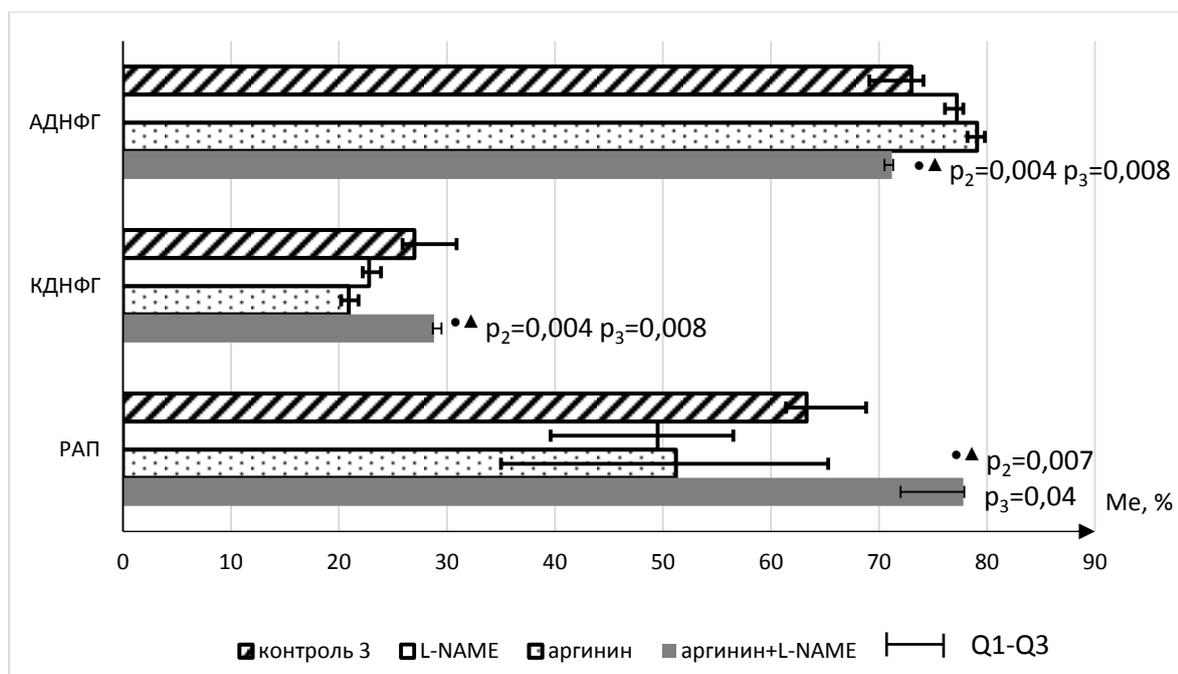


Рисунок 50. Изменение доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани легкого при *in vivo*-воздействии L-аргинина



Примечание: ●, p_2 - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-NAME; ▲, p_3 - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-аргинина

Рисунок 51. Изменение доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани легкого при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME

Таким образом, применение модуляторов генерации оксида азота приводит к существенным изменениям показателей состояния окислительной модификации белков в ткани печени, почки и легкого. При этом, для изучаемых паренхиматозных органов угнетение синтеза оксида азота сопряжено с изменениями показателей, демонстрирующими повышение интенсивности окислительной модификации белков, а L-аргинин оказывает в отношении белков антиокислительное действие.

3.3.3. Изменения активности и компартиментализации катепсина В, L, Н ткани печени, почки и легкого под действием модуляторов синтеза оксида азота

При изолированном введении ингибитора синтеза оксида азота *L-NAME* в ткани печени статистически значимых изменений активности катепсина В обнаружено не было, для катепсина L обнаружено статистически значимое снижение активности в неседиментируемой фракции. В то же время для катепсина Н продемонстрировано статистически значимое нарастание общей активности в сочетании с повышением активности в седиментируемой (лизосомальной) фракции (Рисунок 52).

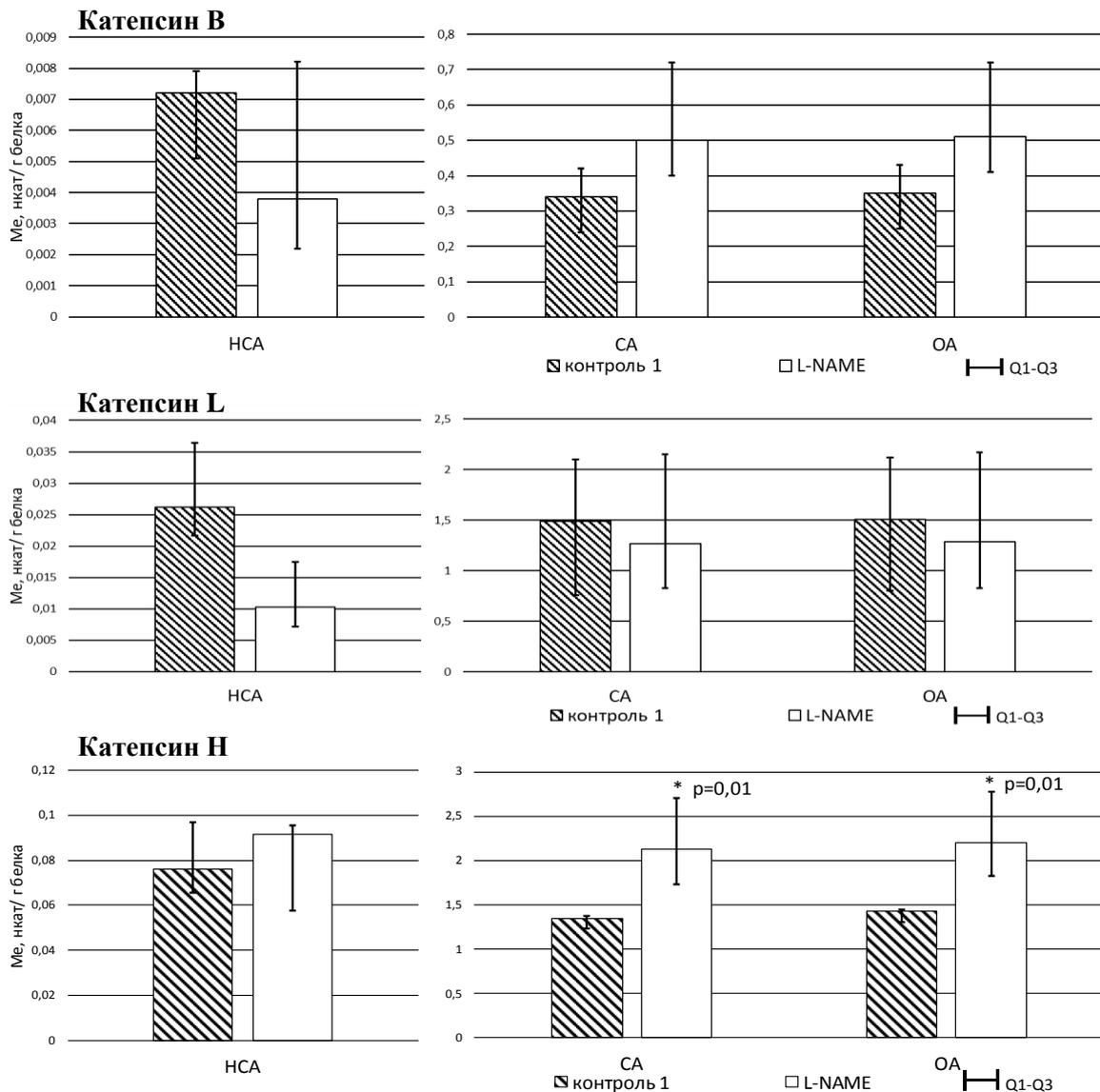


Рисунок 52. Изменение активности катепсина В, L, Н в субклеточных фракциях ткани печени при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза оксида азота

В ткани почки под действием L-NAME обнаружены однотипные изменения активности для всех изучаемых ферментов: статистически значимое снижение общей активности катепсинов В, L, Н в сочетании со статистически значимым снижением активности в седиментируемой (лизосомальной) фракции; при этом активность катепсина L в неседиментируемой фракции статистически значимо возросла (Рисунок 53).

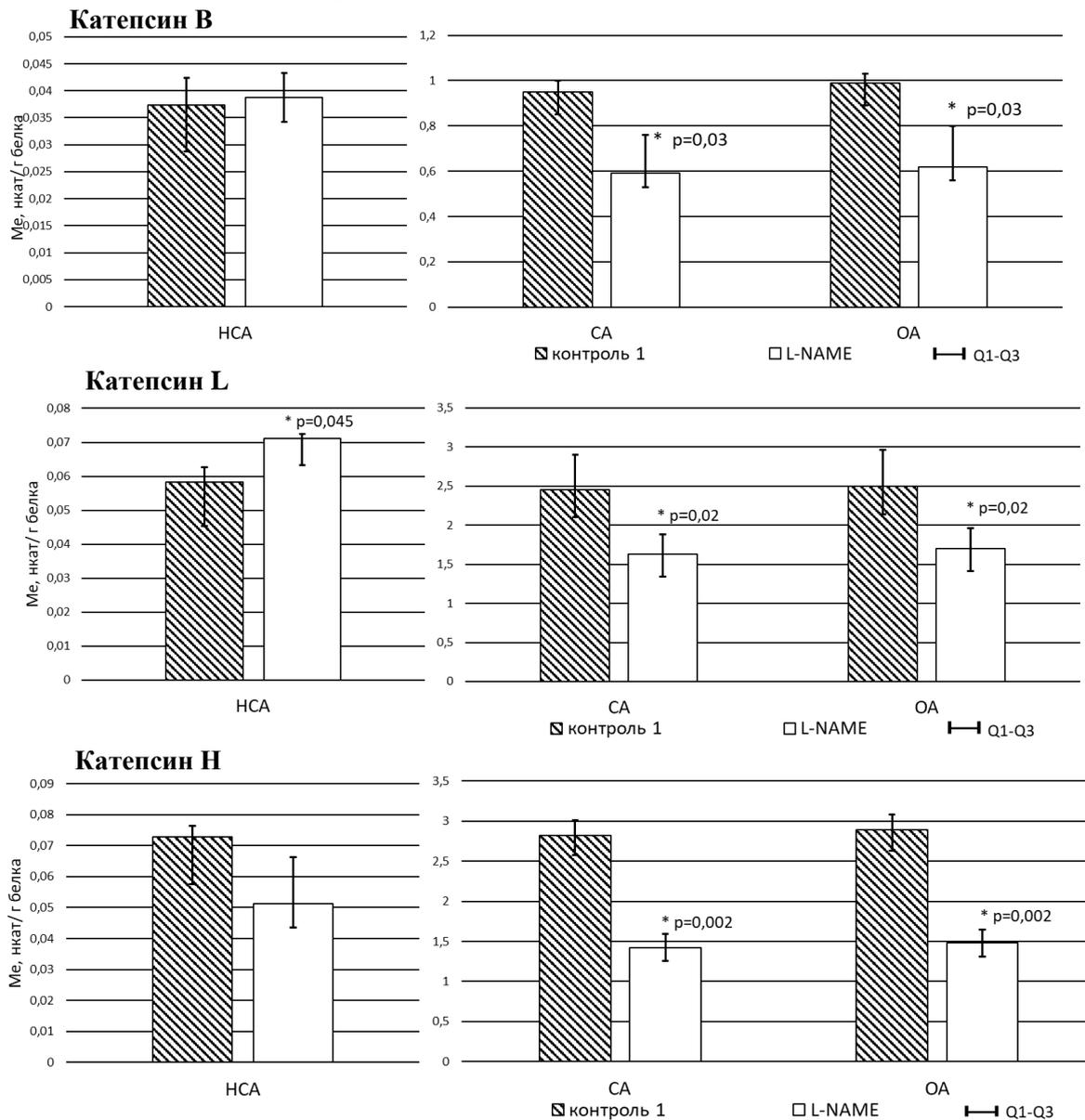


Рисунок 53. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани почки при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза оксида азота

В ткани легкого применение неселективного ингибитора NO-синтазы не вызвало статистически значимых изменений активности изучаемых катепсинов (Рисунок 54).

Таким образом, эффекты ингибитора оксида азота, вызывавшего нарастание интенсивности окислительной модификации белков в цитоплазматической фракции ткани печени, почки и легкого на показатели активности катепсинов В, L, Н в изучаемых тканях оказались преимущественно подавляющими.

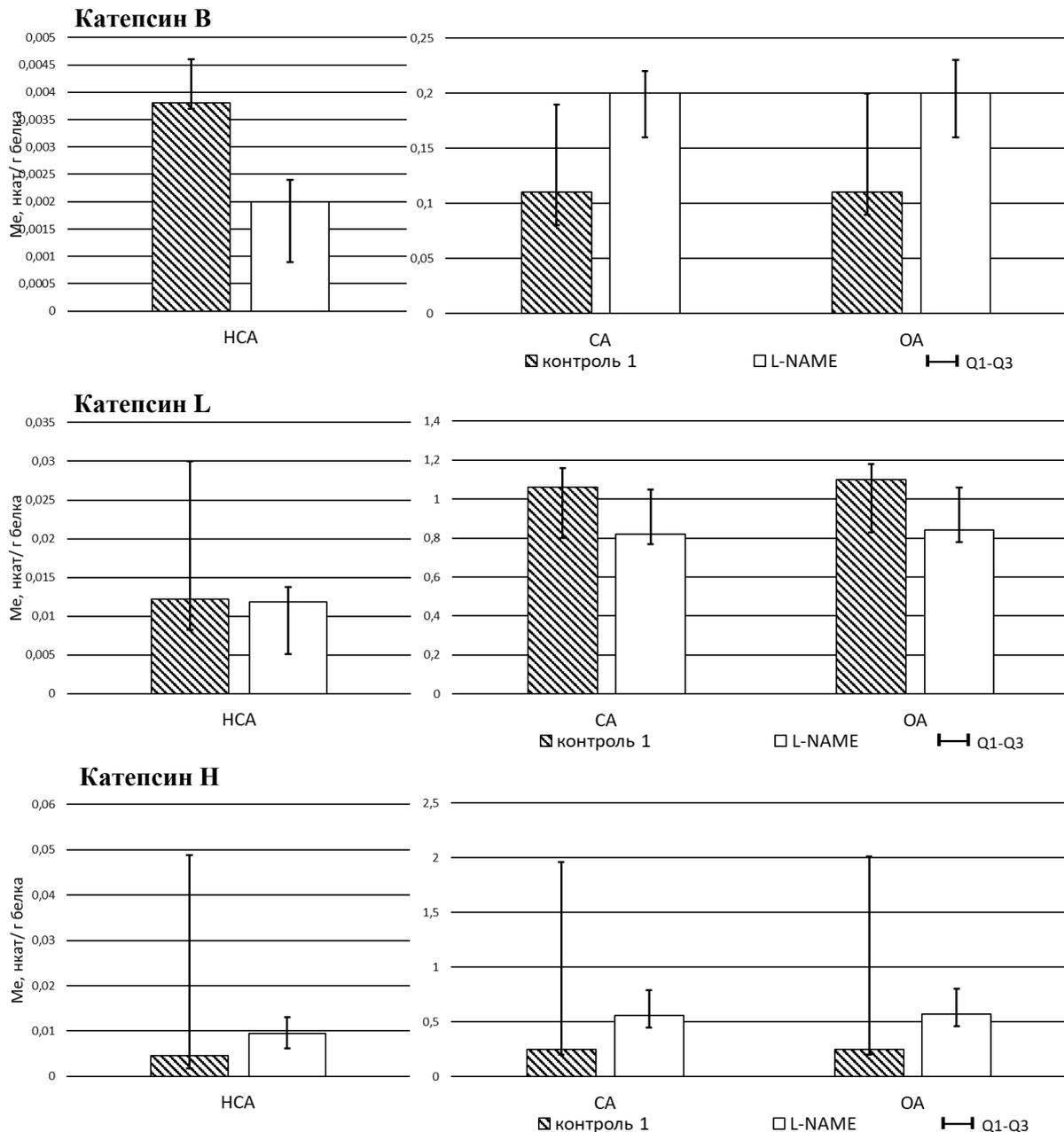


Рисунок 54. Показатели активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани легкого при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза оксида азота

Поскольку в качестве одного из факторов, влияющего на активность катепсинов, выступает протеолитический (в том числе и аутокаталитический) процессинг, причиной обнаруженных изменений может оказаться увеличение доли проферментных форм катепсинов относительно в каталитически активных. Для выяснения вклада этого механизма в обнаруженные изменения активности ферментов проведен анализ показателя коэффициента аутокаталитического действия (K_{ACA}) изучаемых катепсинов.

Обнаружено, что действие L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает преимущественное нарастание показателя K_{ACA} (Таблица 12). Так, описанное выше снижение активности катепсина L во внелизосомальной фракции ткани печени сопровождалось статистически значимым нарастанием соответствующего показателей K_{ACA} . Такое сочетание изменений можно трактовать как замедление перехода проферментных форм катепсина L в каталитически активные; кроме того, поскольку изменений K_{ACA} катепсина L в лизосомальной фракции ткани печени зафиксировано не было, можно предположить, что торможение протеолитического процессинга катепсина происходит после выхода его проферментных форм из лизосом во внелизосомальное пространство. Обнаруженное снижение лизосомальной активности катепсина H для ткани почки также сочеталось с повышением показателя K_{ACA} для этой фракции – т.е. в данном случае нарастание доли проферментных форм катепсина развивается уже внутри лизосом. Интересно, что выявленное для ткани печени повышение активности катепсина H в лизосомальной фракции сопровождалось повышением и показателя K_{ACA} – в этом случае причиной изменений может оказаться уже повышение синтеза фермента, не только приводящее к регистрируемому повышению его активности, но и создающему «резерв» дальнейшего возможного повышения за счет значительного количества проферментных форм. При этом обнаруженное для ткани почки сочетание повышения активности катепсина L в цитоплазматической фракции с повышением соответствующего показателя K_{ACA} следует трактовать несколько иначе. Поскольку описываемое нарастание внелизосомальной активности катепсина L сопровождается снижением

активности фермента в лизосомальной фракции, наиболее вероятной причиной здесь представляется перераспределение катепсина в цитоплазму, повышенное же значение K_{ACA} указывает на выход не только активных, но и проферментных форм, т.е. «резерв» формируется, но без вовлечения повышенного синтеза.

Особо следует обсудить тот факт, что в ткани легкого, где на фоне снижения концентрации метаболитов оксида азота и нарастания содержания продуктов окислительной модификации белков под действием ингибитора NO-синтазы статистически значимых изменений активности катепсинов В, L и Н зафиксировано не было, показатель K_{ACA} продемонстрировал отличия от контрольных значений. Обнаруженное статистически значимое нарастание показателя K_{ACA} для неседиментируемой активности катепсина В, а также седиментируемой и неседиментируемой активности катепсина Н дает основание предполагать, что ответом ткани легкого в данном случае является, скорее всего, повышение синтеза молекул катепсинов, однако их адекватного перехода в каталитически активные формы в описываемой модели не происходит, что и не дает возможности зарегистрировать изменения активности.

Изолированное введение L-аргинина практически не отразилось на показателях активности цистеиновых катепсинов в ткани печени, единственным статистически значимым изменением оказалось повышение внелизосомальной активности катепсина L (Рисунок 55), однако важно отметить, что это изменение оказалось разнонаправленным по отношению к ранее описанному эффекту ингибитора синтеза оксида азота. Возможно, именно это изменение является частью механизма самостоятельного протективного эффекта аргинина в отношении окислительной модификации белков: вызываемое L-аргинином нарастание активности катепсина L в цитоплазме приводит к расщеплению окислительно поврежденных белков и формирует описанное выше снижение их содержания.

Изменения значений коэффициента аутокаталитического действия (K_{ACA}) для катепсинов В, L, Н при in vivo-воздействии ингибитора синтеза оксида азота, Me [Q_1 ; Q_3]

	Контроль 1		
	Печень	Почка	Легкое
K_{ACA} катепсин В, НСА	1,22[0,61;1,33]	0,47[0,28;0,71]	0,97[0,73;0,98]
K_{ACA} катепсин В, СА	1,15[0,4;1,83]	1,18[0,99;1,35]	1,14[0,98;1,53]
K_{ACA} катепсин L, НСА	0,97[0,82;1,08]	0,74[0,66;0,78]	1,28[1,01;3,11]
K_{ACA} катепсин L, СА	1,23[0,93;1,81]	0,8[0,73;0,88]	1,46[1,06;1,54]
K_{ACA} катепсин Н, НСА	0,65[0,57;0,76]	1,01[0,92;1,15]	0,87[0,66;0,98]
K_{ACA} катепсин Н, СА	0,34[0,28;0,41]	1,01[0,93;1,12]	0,39[0,32;0,41]
	L-NAME 25 мг/кг, 7 суток		
	Печень	Почка	Легкое
K_{ACA} катепсин В, НСА	1,82[0,85;4,78]	1,27[0,78;1,57]* p=0,01	2,02[1,81;2,43]* p=0,03
K_{ACA} катепсин В, СА	0,78[0,64;1,63]	1,00[0,87;1,22]	0,01[0,01;0,02]* p=0,04
K_{ACA} катепсин L, НСА	1,61[1,19;3,92]* p=0,02	0,98[0,93;1,03]* p=0,02	1,18[1,07;6,07]
K_{ACA} катепсин L, СА	1,24[1,03;4,94]	0,94[0,82;1,06]	2,49[1,51;3,2]
K_{ACA} катепсин Н, НСА	0,79[0,73;0,83]	1,68[1,06;2,40]	2,67[1,68;4,32]* p=0,008
K_{ACA} катепсин Н, СА	0,56[0,43;0,70]* p=0,02	1,78[1,14;2,46]* p=0,045	1,02[0,78;1,29]* p=0,003

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

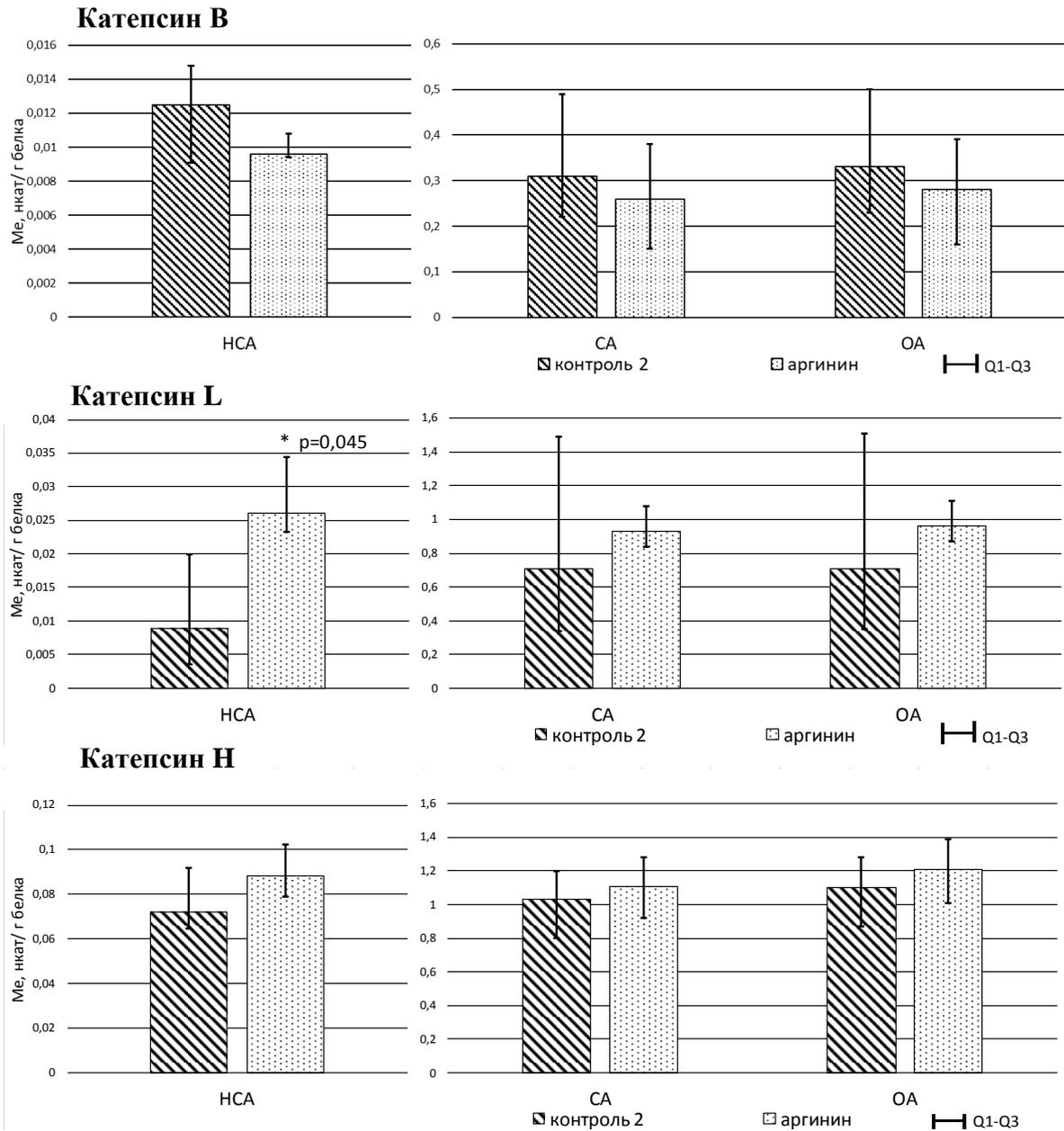


Рисунок 55. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани печени при *in vivo*-воздействии L-аргинина

В ткани почки под действием L-аргинина обнаружено статистически значимое нарастание общей активности катепсина Н в сочетании с нарастанием его лизосомальной активности, изменения оказались прямо противоположными по отношению к выявленным под влиянием L-NAME (Рисунок 56).

При этом активность катепсина L в ткани почки оказалась практически не чувствительной к изолированному воздействию L-аргинина, общая и

лизосомальная активность катепсина В сформировали тенденцию к повышению, однако статистически значимых отличий от контроля обнаружено не было.

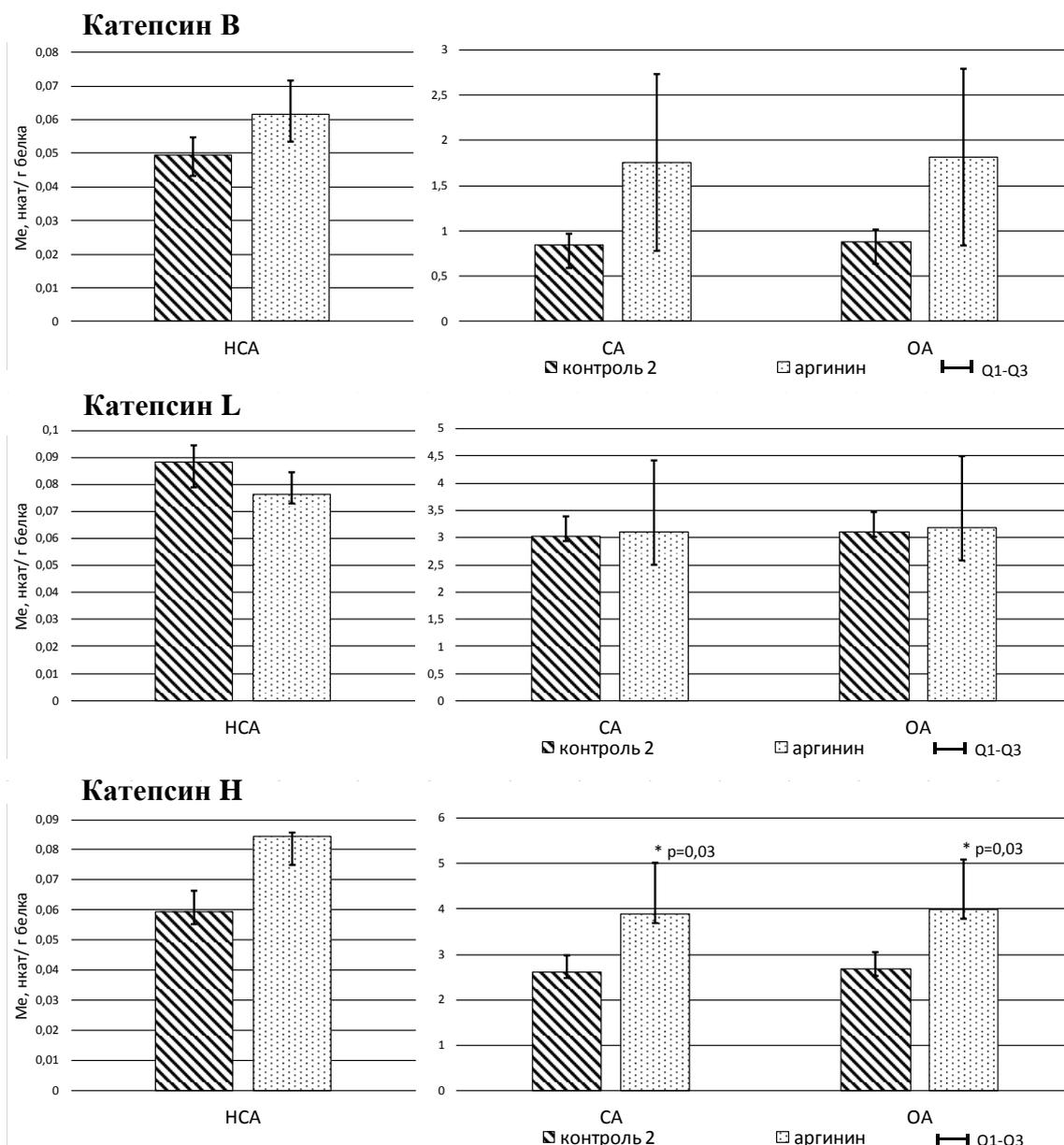


Рисунок 56. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани почки при *in vivo*-воздействии L-аргинина

Поскольку для ткани почки изменения концентрации метаболитов оксида азота и уровня продуктов окислительной модификации белков под действием ингибитора и субстрата синтеза оксида азота оказались однотипными, обнаружение противоположного эффекта на активность ферментов здесь заставляет предположить наличие самостоятельного влияния L-аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ.

Наиболее чувствительной к действию L-аргинина оказалась активность цистеиновых катепсинов ткани легкого, где изолированное введение субстанции вызвало существенное, статистически значимое по отношению к контрольным значениям нарастание активности всех изучаемых ферментов во внелизосомальной фракции в сочетании со статистически значимым нарастанием общей и лизосомальной активности катепсинов В и Н (Рисунок 57).

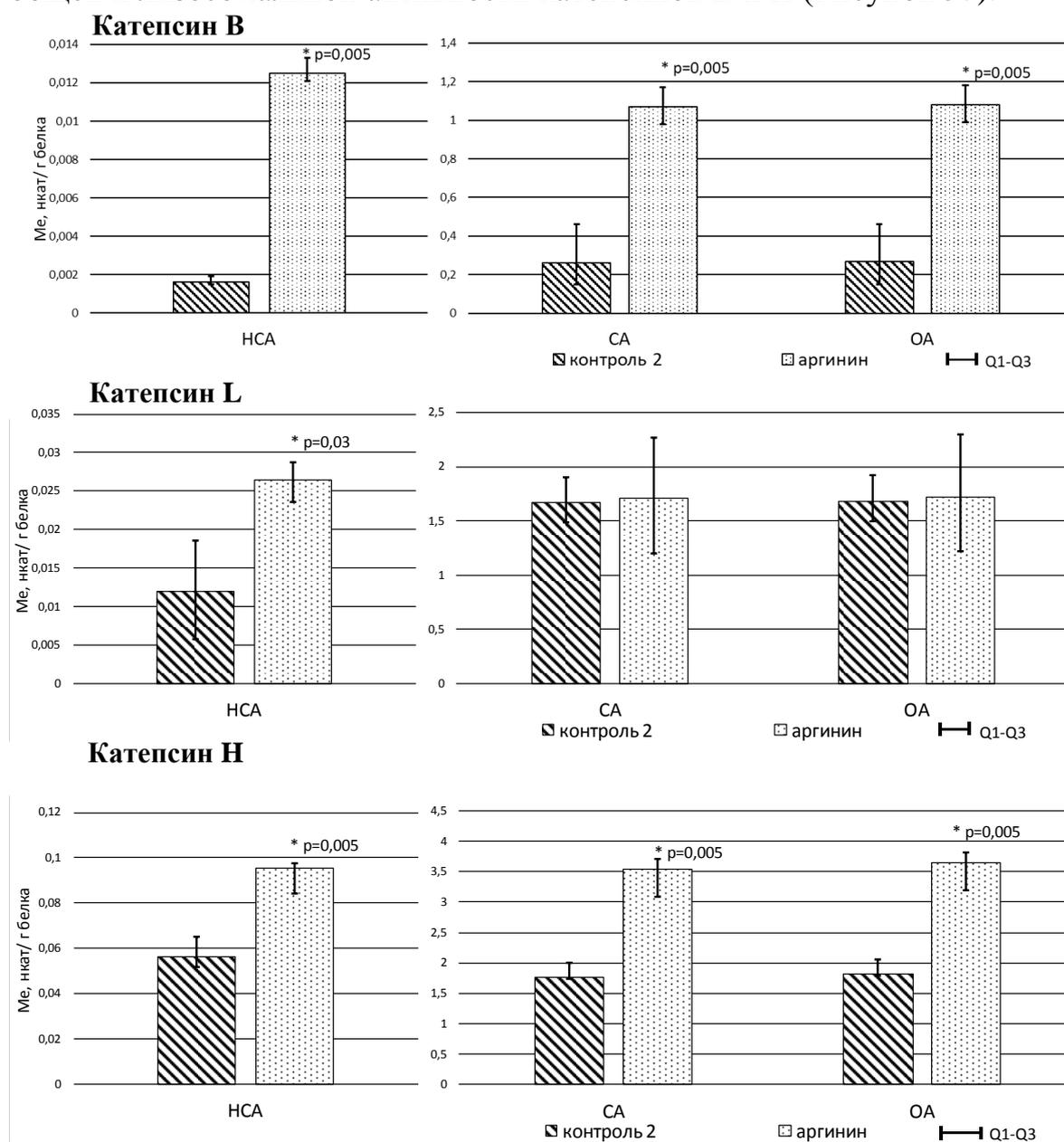


Рисунок 57. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани легкого при *in vivo*-воздействии L-аргинина

Анализ изменений коэффициента аутокаталитического действия цистеиновых катепсинов при *in vivo*-воздействии L-аргинина (Таблица 13)

продемонстрировал, что в ткани печени описанное выше нарастание активности катепсина L во внелизосомальной фракции сочетается со статистически значимым снижением показателя K_{ACA} , т.е. в данном случае в цитоплазматической фракции все молекулы фермента каталитически активны и резерв проферментных форм практически отсутствует. Интересно, что для катепсина B, несмотря на отсутствие в данной модели изменений активности, было зафиксировано значительное нарастание показателя K_{ACA} в лизосомальной фракции, что может быть проявлением активации синтеза молекул фермента в условиях изолированного действия L-аргинина без их перехода из проферментных форм в активные.

Следует также отметить, что в ткани почки, где изменений активности катепсинов B и L в цитоплазматической и лизосомальной фракции под действием L-аргинина обнаружено не было, мы зафиксировали статистически значимое нарастание K_{ACA} для этих ферментов в неседиментируемой фракции. Это может свидетельствовать о том, что эффект изолированного действия L-аргинина в данной ткани проявляется лишь в стимуляции выхода проэнзимных форм катепсинов B и L в цитоплазму, однако протеолитический процессинг оказывается заблокирован. Важным наблюдением мы считаем тот факт, что описываемые изменения K_{ACA} катепсина L для ткани почки совпадают с таковыми, обнаруженными в модели с изолированным *in vivo*-воздействием L-NAME и, возможно, имеют единую причину, в качестве которой может выступать, например, описанное ранее совпадающее для обеих моделей нарастание содержания окислительно модифицированных белков на фоне снижения концентрации метаболитов оксида азота. При этом на фоне действия L-NAME нарушение дозревания выходящих из лизосом прокатепсинов выражено в меньшей степени и приводит к регистрируемому повышению активности ферментов. Развивающееся же при *in vivo*-воздействии L-аргинина нарастание активности катепсина H в лизосомальной фракции ткани почки не сопровождалось статистически значимыми изменениями K_{ACA} , что косвенно подтверждает ранее высказанное предположение о возможном самостоятельном

влиянии L-аргинина на активность фермента, причем это влияние не связано с изменением соотношения проферментных и активных его форм.

Последний тезис косвенно подтверждает также полное отсутствие изменений показателя K_{ACA} в ткани легкого, где *in vivo*-воздействие L-аргинина также привело к многочисленным статистически значимым отличиям активности цистеиновых катепсинов от контрольных значений в сторону повышения показателей.

Сочетанное in-vivo-воздействие ингибитора синтеза оксида азота L-NAME и L-аргинина в большинстве случаев продемонстрировало преобладание эффектов, описанных при изолированном действии L-аргинина.

Так, в ткани печени (Рисунок 58) активность катепсинов В и L, не продемонстрировав статистически значимых отличий от показателей контрольной группы, оказалась близка к значениям активности, полученным при изолированном действии L-аргинина. При этом общая и седиментируемая активность катепсина В оказалась статистически значимо ниже, а внелизосомальная (неседиментируемая) активность катепсина L – статистически значимо выше показателей, полученных при изолированном действии ингибитора NO-синтазы. Существенным исключением оказались изменения активности катепсина Н: в то время как изолированное действие L-NAME приводило к повышению активности фермента в лизосомальной фракции, а изолированное применение L-аргинина практически не вызывало изменений активности, сочетание *in vivo*-воздействия ингибитора и субстрата синтеза оксида азота привело к статистически значимому снижению активности катепсина Н как в седиментируемой, так и в неседиментируемой фракции.

При этом изменения оказались статистически значимыми как относительно контроля, так и относительно показателей, полученных при изолированном воздействии субстанций.

Таблица 13

Изменения значений коэффициента аутокаталитического действия (K_{ACA}) для катепсинов В, L, Н при in vivo-воздействии L-аргинина, Me [Q₁; Q₃]

	Контроль 2		
	Печень	Почка	Легкое
K_{ACA} катепсин В, НСА	0,35[0,26;0,54]	0,88[0,77;0,95]	0,00[0,00;0,48]
K_{ACA} катепсин В, СА	0,38[0,20;0,56]	0,72[0,59;0,86]	0,90[0,81;0,98]
K_{ACA} катепсин L, НСА	2,15[2,11;17,63]	0,8[0,61;0,89]	0,52[0,12;1,70]
K_{ACA} катепсин L, СА	1,12[0,95;1,19]	0,66[0,56;0,93]	0,57[0,42;0,78]
K_{ACA} катепсин Н, НСА	0,61[0,60;0,67]	0,99[0,89;1,06]	0,70[0,56;0,73]
K_{ACA} катепсин Н, СА	0,42[0,34;0,59]	0,58[0,37;0,88]	0,30[0,27;0,33]
	L-аргинин 500 мг/кг, 10 суток		
	Печень	Почка	Легкое
K_{ACA} катепсин В, НСА	1,21[0,58;1,63]	1,39[1,34;1,51]* p=0,005	0,15[0,14;0,20]
K_{ACA} катепсин В, СА	1,47[1,28;4,23]* p=0,03	1,2[0,57;2,17]	1,16[0,77;1,26]
K_{ACA} катепсин L, НСА	0,84[0,66;1,00]* p=0,005	1,03[0,95;1,26]* p=0,02	0,57[0,50;0,58]
K_{ACA} катепсин L, СА	0,89[0,68;0,99]	0,89[0,69;0,99]	0,94[0,73;1,16]
K_{ACA} катепсин Н, НСА	0,58[0,5;0,71]	1,16[1,00;1,31]	0,58[0,52;0,61]
K_{ACA} катепсин Н, СА	0,40[0,34;0,55]	0,71[0,59;0,88]	0,27[0,27;0,34]

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы (p<0,05)

Поскольку для ткани печени в этой модели уровни метаболитов оксида азота и продуктов окислительной модификации белков оказались близкими к значениям, полученным для изолированного действия L-аргинина, в качестве возможного объяснения полученных статистически значимых отличий можно предположить лишь наличие у L-NAME и/или L-аргинина собственных эффектов на активность катепсина Н, не связанных с их участием в синтезе оксида азота и модуляцией выраженности окислительного карбонилирования белков.

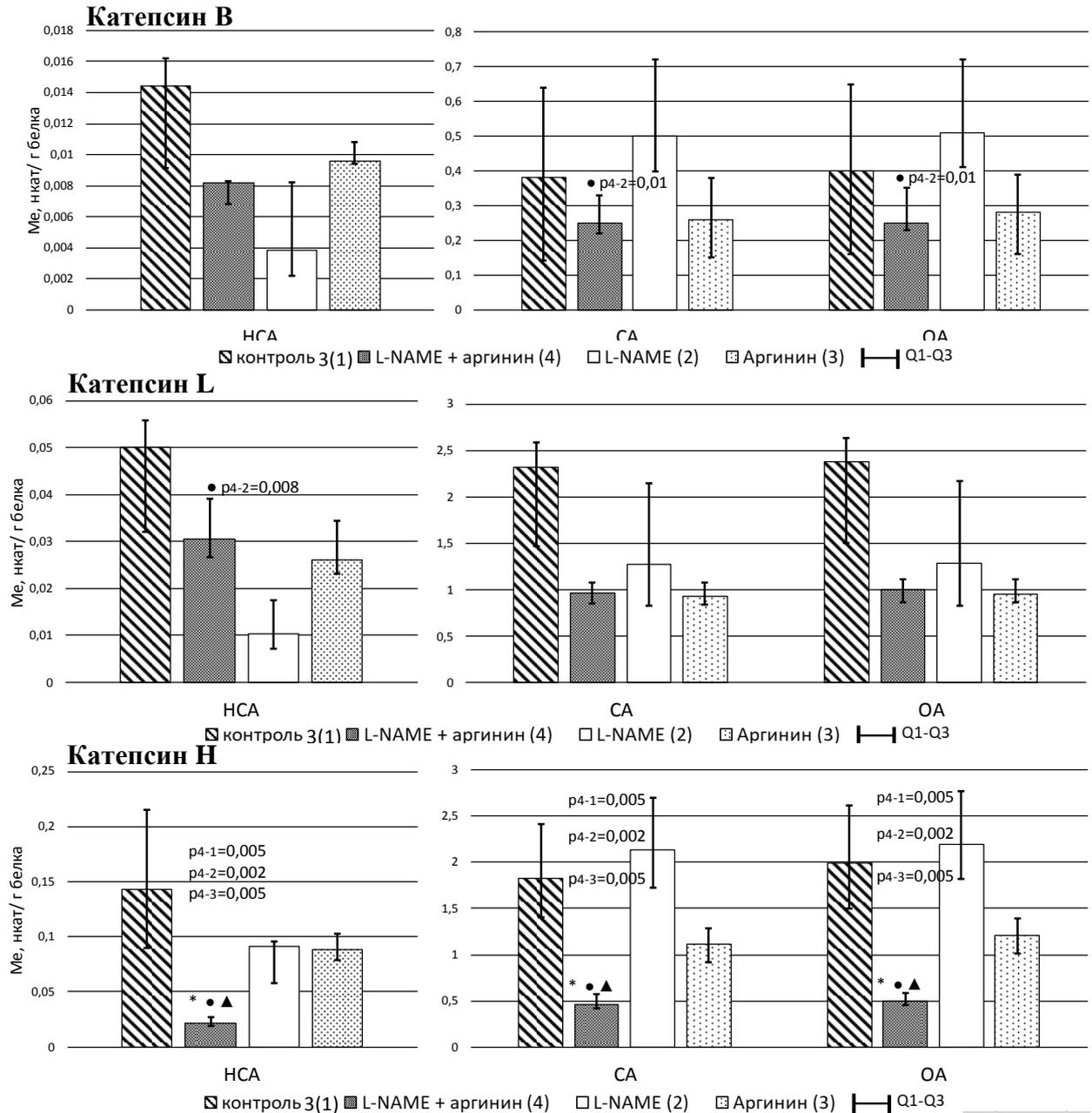


Рисунок 58. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани печени при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME

В ткани почки (Рисунок 59) при сочетанном воздействии L-NAME и L-аргинина не обнаружено статистически значимых отличий активности цистеиновых катепсинов ни от контроля, ни от группы с изолированным введением L-аргинина. При этом показатели лизосомальной активности всех изучаемых катепсинов и внелизосомальная активность катепсинов В и Н оказались статистически значимо выше таковых, полученных для изолированного действия ингибитора NO-синтазы.

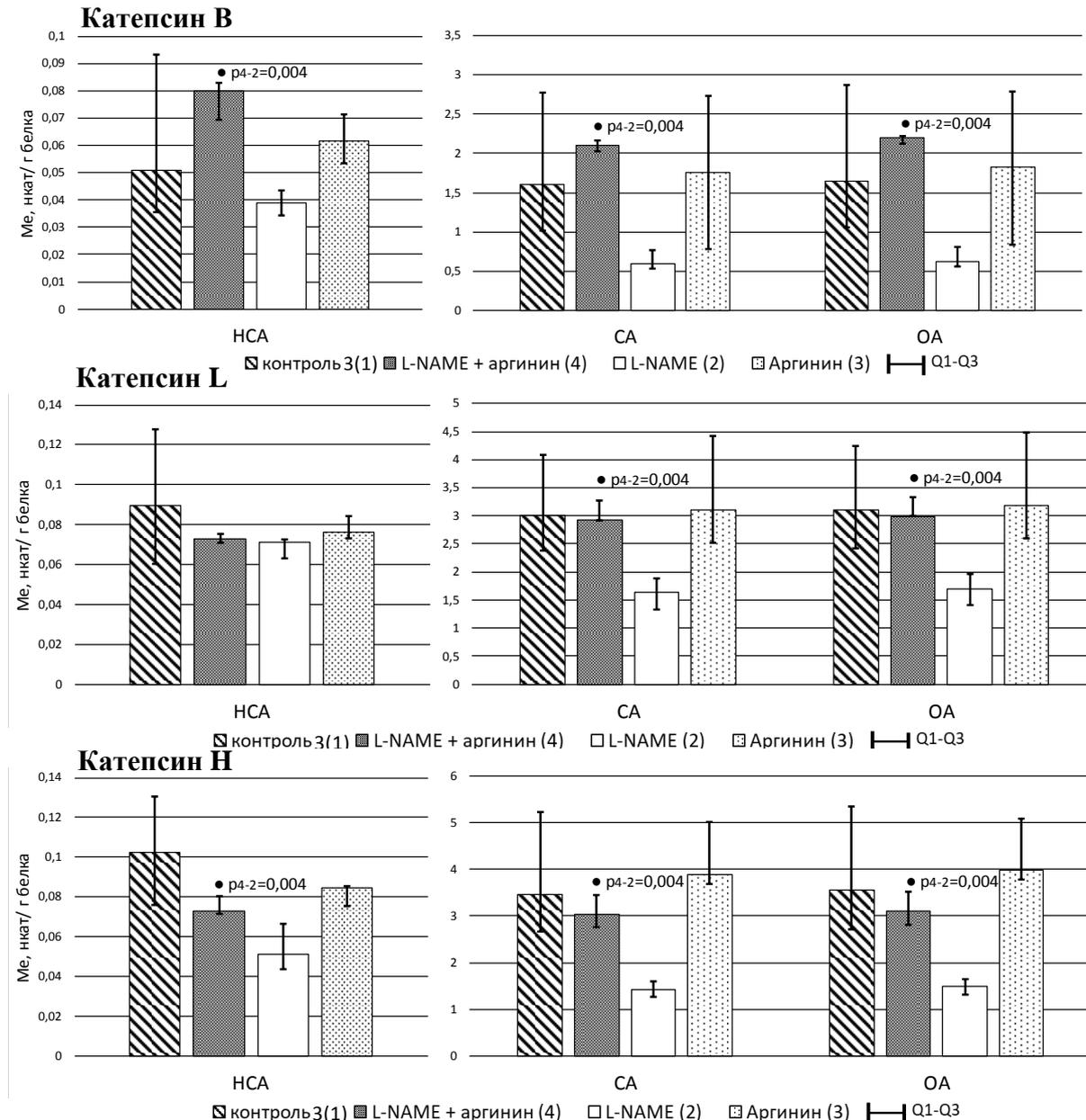


Рисунок 59. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани почки при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME

Фактически, для ткани почки сочетанное введение субстанций, существенно повышая сниженный при изолированном их введении уровень метаболитов оксида азота и полностью корректируя вызванное отдельным введением повышение окислительного карбонилирования белков, нормализует и показатели активности цистеиновых катепсинов.

Для ткани легкого (Рисунок 60) статистически значимых отличий активности катепсинов В, L, Н от контроля также получено не было. При этом для всех ферментов как общая активность, так и активность в седиментируемой и неседиментируемой фракции оказались статистически значимо выше таковых, полученных при изолированном действии L-NAME. Интересно, что показатели общей, седиментируемой и неседиментируемой активности катепсина Н, а также неседиментируемой активности катепсина В при этом заняли промежуточное положение, оказавшись статистически значимо ниже таковых, полученных при изолированном воздействии L-аргинина.

Показатели коэффициента аутокаталитического действия изучаемых катепсинов в лизосомальной и внелизосомальной фракциях (Таблица 14) в целом оказались ближе к результатам, полученным для изолированного действия L-аргинина и статистически значимо отличались от таковых, продемонстрированных для изолированного действия L-NAME.

Поскольку важным фактором изменения внутриклеточного распределения активности лизосомальных ферментов является общая и избирательная проницаемость лизосомальной мембраны [63, 267], нами была проведена оценка состояния ее проницаемости по показателям коэффициента лабильности (Клаб) маркерного фермента лизосом кислой фосфатазы в сопоставлении с показателями Клаб для изучаемых катепсинов.

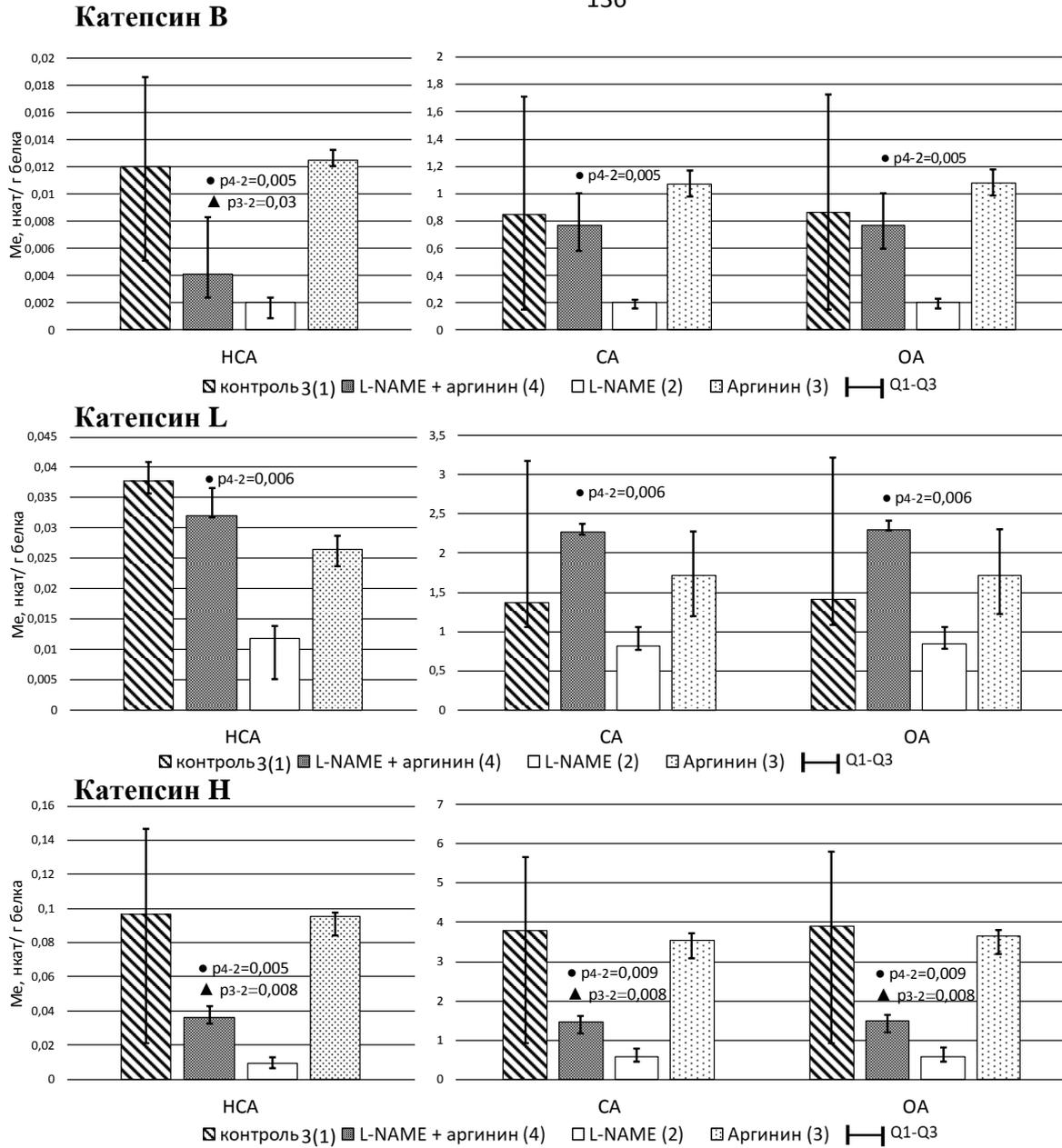


Рисунок 60. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани легкого при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME

Изменения значений коэффициента аутокаталитического действия (K_{ACA}) для катепсинов В, L, Н при сочетанном *in vivo*-воздействии L-NAME и L-аргинина, Ме [Q₁; Q₃]

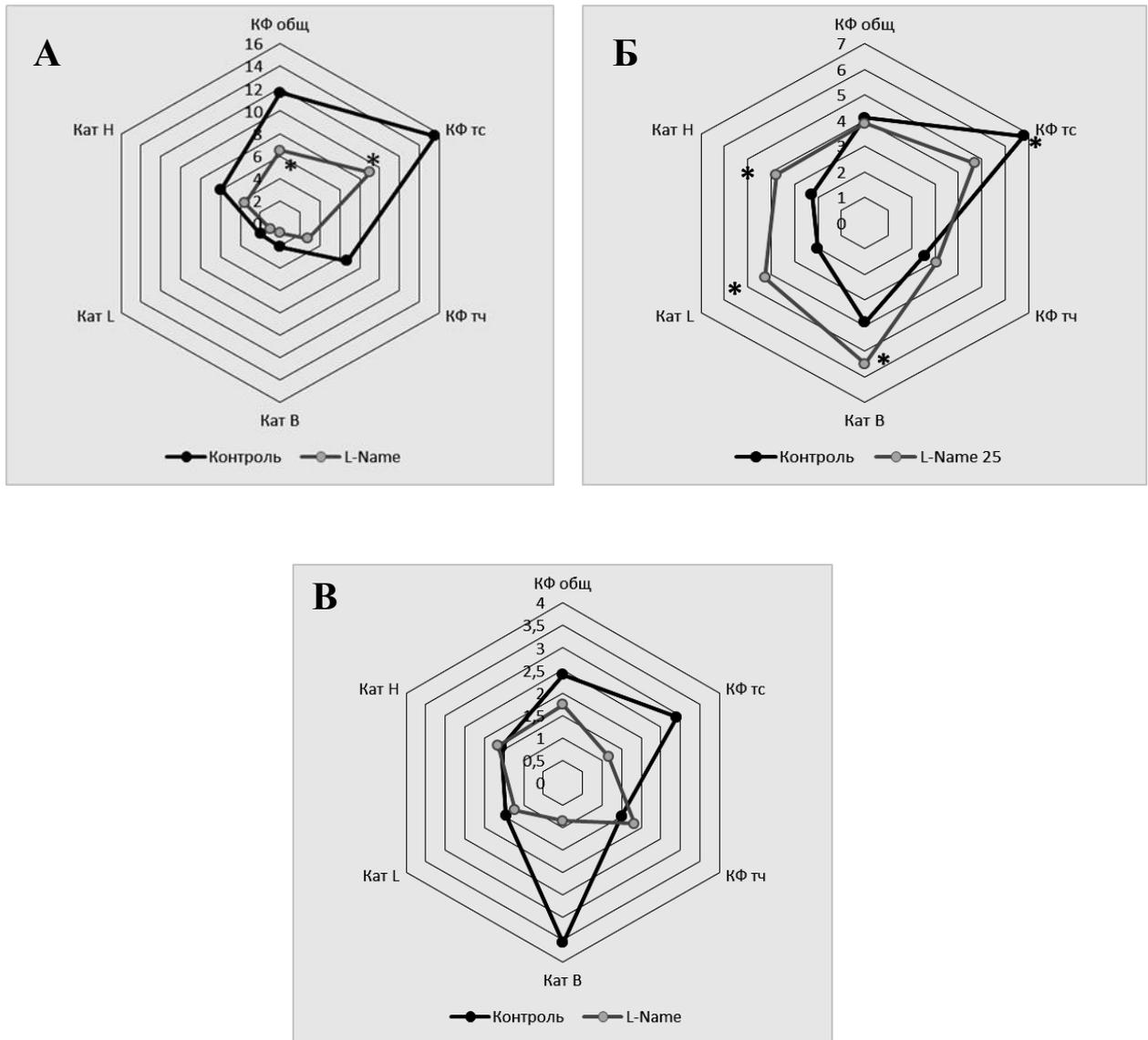
	Контроль 3		
	Печень	Почка	Легкое
K_{ACA} катепсин В, НСА	1,06[0,51;1,42]	1,16[0,61;1,71]	0,38[0,16;0,6]
K_{ACA} катепсин В, СА	1,69[1,15;2,03]	1,27[0,68;1,43]	1,14[0,9;1,53]
K_{ACA} катепсин L, НСА	0,73[0,60;0,91]	0,94[0,73;1,17]	0,87[0,64;1,06]
K_{ACA} катепсин L, СА	0,80[0,68;1,2]	1,03[0,90;1,14]	1,43[1,06;1,48]
K_{ACA} катепсин Н, НСА	0,54[0,49;0,58]	1,28[1,08;1,66]	0,76[0,63;0,89]
K_{ACA} катепсин Н, СА	0,32[0,28;0,36]	1,01[0,99;1,23]	0,36[0,33;0,41]
L-NAME 25 мг/кг 7 суток + L-аргинин 500 мг/кг, 10 суток			
	Печень	Почка	Легкое
K_{ACA} катепсин В, НСА	2,58[2,10;3,16]* [▲]	0,94[0,93;0,95]	1,67[0,74;2,50] [▲]
K_{ACA} катепсин В, СА	2,23[1,81;3,00] [•]	0,61[0,53;0,68] [•]	0,83[0,39;0,83] [•]
K_{ACA} катепсин L, НСА	0,77[0,67;0,93] [•]	0,98[0,96;0,99]	0,66[0,58;0,75] [•]
K_{ACA} катепсин L, СА	0,51[0,49;0,55] [•]	1,06[0,93;1,08]	0,98[0,98;1,00] [•]
K_{ACA} катепсин Н, НСА	0,67[0,61;0,91]*	0,99[0,93;1,00] [•]	0,61[0,55;0,67] [•]
K_{ACA} катепсин Н, СА	0,45[0,21;0,66]	0,81[0,62;0,87] [•]	0,42[0,36;0,49] [•]

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$), • - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-NAME ($p < 0,05$); ▲ - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-аргинина ($p < 0,05$)

При анализе изменений доли неседиментируемой активности (Клаб) для изучаемых ферментов обнаружено, что изолированное применение ингибитора синтеза оксида азота (Рисунок 61), не вызывая статистически значимых изменений показателя в ткани легкого, для ткани печени и почек проявилось статистически значимым снижением значения Клаб для кислой фосфатазы, что можно трактовать как снижение общей проницаемости лизосомальной мембраны. При этом в ткани почки указанные изменения сочетались со статистически значимым нарастанием показателя Клаб для катепсинов В, L, Н. Такое рассогласование показателей может быть признаком повышения селективной проницаемости лизосомальной мембраны для катепсинов, т.е. пермеабиллизации, подтверждая ранее высказанное предположение о наличии перераспределения катепсинов из лизосомальной в цитоплазматическую фракцию, что проявилось для катепсина L еще и ранее описанным нарастанием внелизосомальной активности.

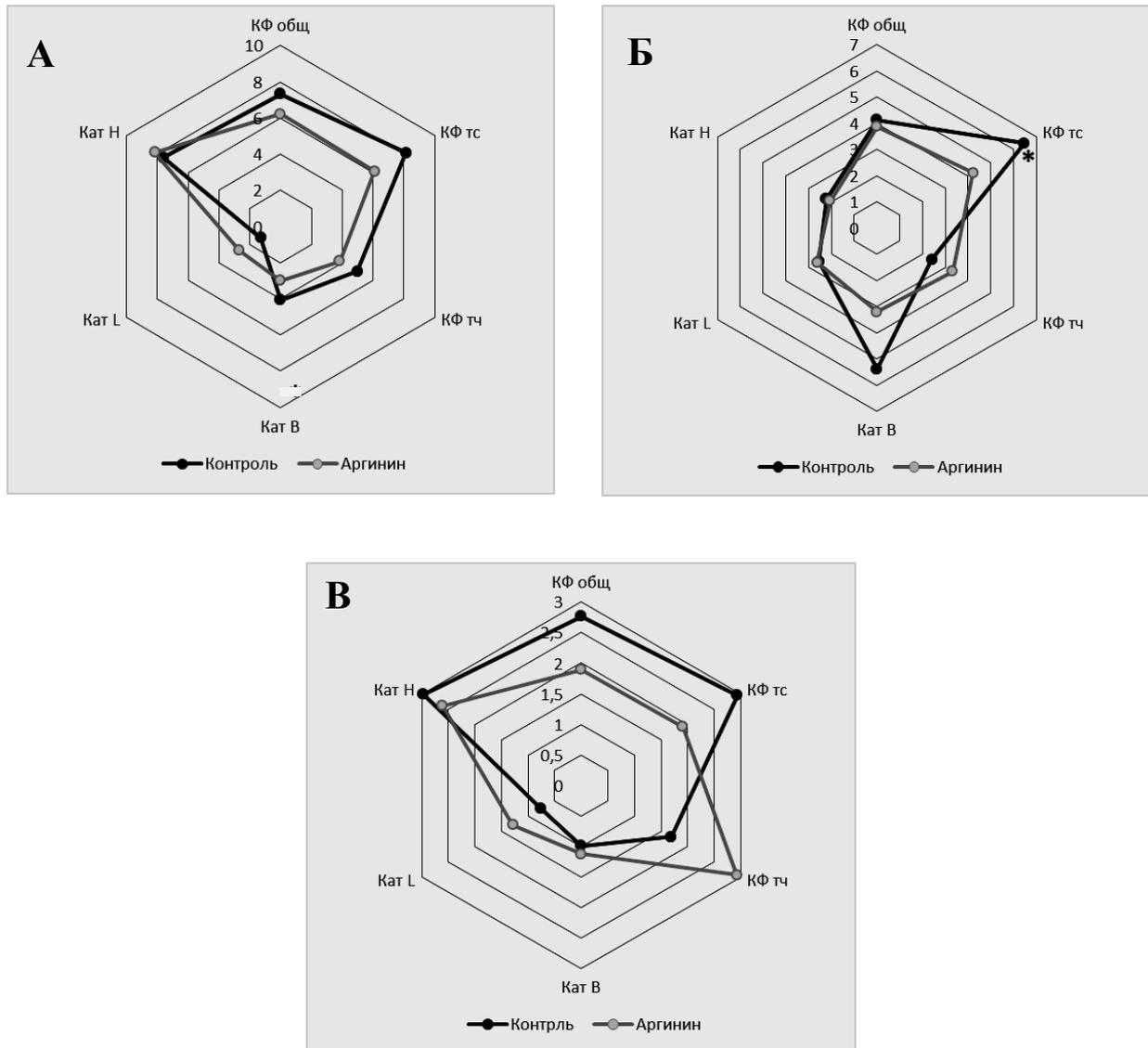
При изолированном действии L-аргинина (Рисунок 62) для ткани печени и легкого статистически значимых отличий показателей Клаб изучаемых ферментов не получено, для ткани почки описано снижение Клаб тартрат-стабильной кислой фосфатазы, однотипное к обнаруженному при изолированном действии L-NAME.

Сочетанное *in vivo*-воздействие L-NAME и L-аргинина (Рисунок 63, Таблица 15) продемонстрировало полную компенсацию изменений, описанных для изолированного действия L-NAME в ткани почки и практически полную – в ткани печени.



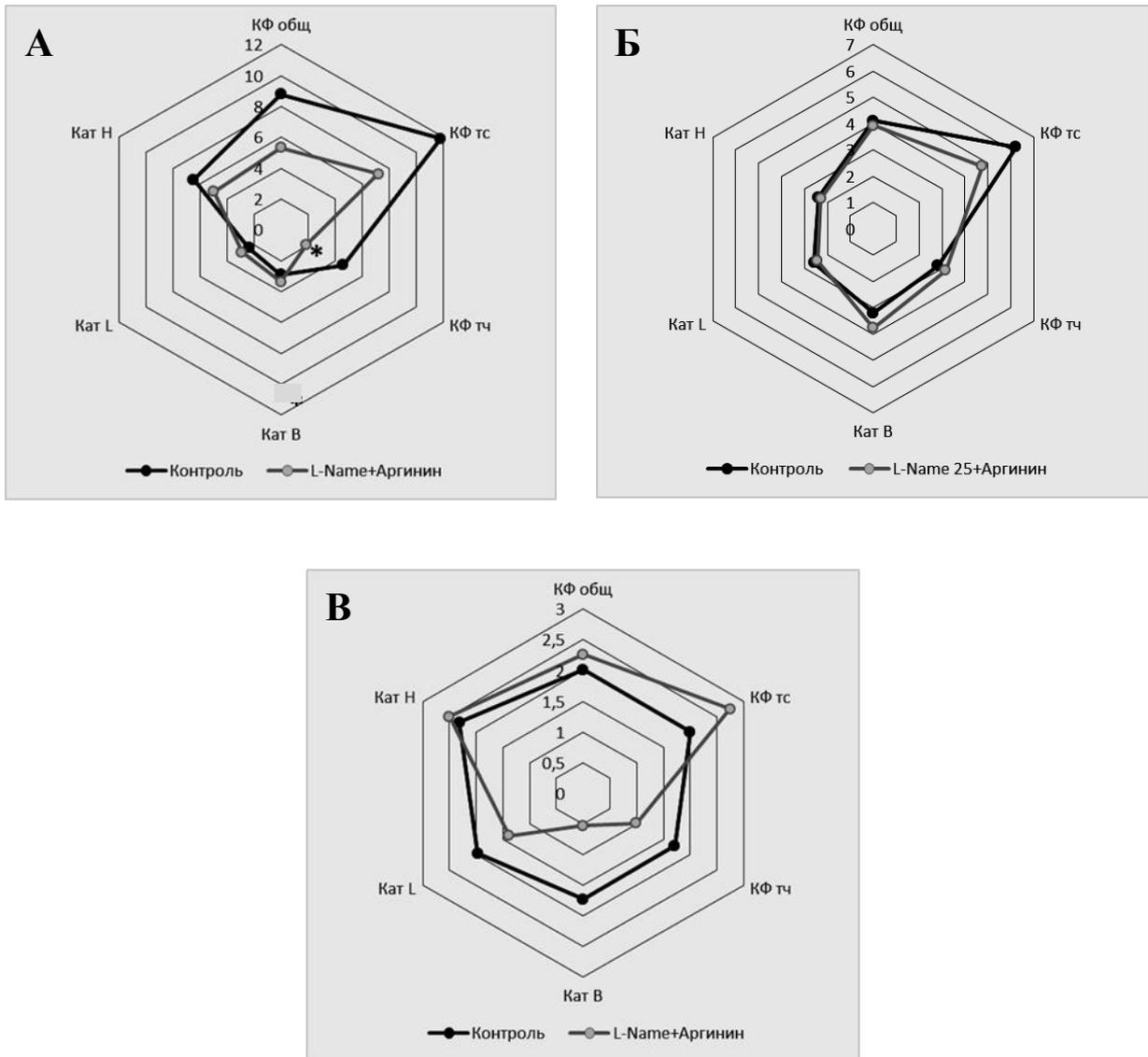
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 61. Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы ткани печени (А), почки (Б), легкого (В) при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза оксида азота



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 62. Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы ткани печени (А), почки (Б), легкого (В) при *in vivo*-воздействии L-аргинина



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 63. Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы ткани печени (А), почки (Б), легкого (В) при при сочетанном *in vivo*-воздействии L-аргинина и L-NAME

Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы при сочетанном *in vivo*-воздействии L-NAME и L-аргинина, Ме [Q₁; Q₃]

Ткань	Группа	Клаб Катепсин В	Клаб Катепсин L	Клаб Катепсин H	Клаб КФ сумм	Клаб КФ тс	Клаб КФ тч
Печень	L-NAME+L-аргинин	3,37[2,43;3,51][●] p₂=0,01	2,89[2,56;3,81]	4,97[3,35;6,40][▲] p₃=0,045	5,32[4,39;5,87][●] p₂=0,045	7,22[5,3;9,8]	1,89[0,94;1,99]
	L-NAME	0,88[0,33;1,55]	0,99[0,38;3,75]	3,56[2,23;5,14]	6,48[5,78;7,42]	9,03[7,33;13,25]	2,78[1,26;3,53]
	L-аргинин	2,99[2,39;4,83]	2,68[2,6;2,72]	8,18[6,84;9,09]	6,22[4,76;6,63]	6,09[5,21;8,44]	3,84[3,12;5,8]
Почка	L-NAME+L-аргинин	3,77[3,03;4,02][●] p₂=0,006	2,43[2,37;2,49][●] p₂=0,004	2,29[2,28;2,42][●] p₂=0,004	3,92[3,89;4,39]	4,75[4,33;6,14]	3,16[2,82;3,39]
	L-NAME	5,50[4,65;5,76]	4,27[3,79;4,41]	3,77[3,45;4,27]	3,9[3,35;4,55]	4,68[4,03;4,93]	3,07[2,73;4,1]
	L-аргинин	3,21[2,39;7,73]	2,63[1,72;3,20]	2,06[1,61;2,26]	3,88[3,53;4,26]	4,22[3,42;5,58]	3,32[2,84;3,77]
Легкое	L-NAME+L-аргинин	0,53[0,45;0,78]	1,39[1,32;1,46]	2,50[2,39;2,74][●] p₂=0,02	2,26[2,07;2,35]	2,75[2,46;2,93]	0,99[0,5;1,9]
	L-NAME	0,85[0,54;1,54]	1,22[0,53;1,54]	1,65[1,18;1,89]	1,74[1,45;2,22]	1,16[0,74;2,24]	1,83[1,51;3,17]
	L-аргинин	1,12[0,7;1,22]	1,29[0,92;1,92]	2,61[2,51;2,78]	1,89[1,67;2,45]	1,91[1,8;2,01]	2,93[1,19;3,73]

Примечание: ● - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-NAME (p<0,05); ▲ - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированным введением L-аргинина (p<0,05)

3.3.4. Анализ зависимости показателей активности и компарментализации катепсинов В, L, Н ткани печени, почки, легкого от состояния окислительной модификации белков при *in vivo*-воздействии модуляторов синтеза оксида азота

Для уточнения наличия зависимости показателей активности лизосомальных цистеиновых протеиназ и ее внутриклеточного распределения от изменений состояния окислительной модификации белков при *in vivo*-воздействии модуляторов синтеза оксида азота был проведен анализ корреляционных связей между указанными параметрами, дополненный анализом связей с уровнем метаболитов оксида азота.

Обнаружено, что в ткани печени (Таблица 16) описанные выше статистически значимые изменения внелизосомальной активности катепсина L статистически значимо прямо коррелируют с концентрацией метаболитов оксида азота и обратно – с общим содержанием окислительно карбонилированных белков (Собщ) и уровнем первичных маркеров окислительного стресса (АДНФГ). Статистически значимые изменения активности катепсина Н в седиментируемой и неседиментируемой фракции при этом продемонстрировали положительные линейные статистически значимые корреляционные связи только с содержанием продуктов окислительного карбонилирования белков.

В ткани почки (Таблица 17) обнаружены статистически значимые линейные зависимости неседиментируемой активности катепсинов В и Н, а также общей активностью катепсина Н как от концентрации метаболитов оксида азота (прямые корреляционные связи), так и от уровня продуктов окислительного карбонилирования белков (обратные корреляционные связи).

Для ткани легкого (Таблица 18) обратные корреляционные связи с уровнем окислительно карбонилированных белков обнаружены для НСА катепсинов В и Н, а также для общей активности катепсинов L и Н.

Результаты корреляционного анализа зависимости показателей активности и компарментализации лизосомальных ферментов с уровнем метаболитов оксида азота и характеристиками состояния окислительной модификации белков в ткани печени

	Метаболиты NO		S общ		АДНФГ сумм		КДНФГ сумм		РАП	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Кат. В ОА	-0,26	0,12	0,43	0,0008	0,44	0,007	-0,012	0,94	-0,31	0,06
Кат. В СА	-0,26	0,12	0,43	0,008	0,43	0,007	-0,007	0,96	-0,31	0,06
Кат. В НСА	0,22	0,19	0,01	0,93	0,02	0,89	0,01	0,56	0,001	0,99
Кат. В Клаб	0,35	0,04	-0,25	0,14	-0,27	0,11	0,26	0,11	0,03	0,85
Кат. L ОА	0,09	0,59	0,046	0,78	0,05	0,76	-0,15	0,38	0,062	0,71
Кат. L СА	0,10	0,54	0,043	0,8	0,04	0,27	-0,15	0,38	0,059	0,72
Кат. L НСА	0,52	0,001	-0,45	0,005	-0,40	0,014	-0,31	0,062	0,50	0,002
Кат. L Клаб	0,17	0,32	-0,21	0,23	-0,22	0,18	-0,17	0,29	0,21	0,21
Кат. Н ОА	-0,17	0,31	0,45	0,005	0,44	0,007	-0,12	0,47	-0,13	0,47
Кат. Н СА	-0,17	0,29	0,46	0,004	0,45	0,005	-0,13	0,43	-0,14	0,42
Кат. Н НСА	0,05	0,79	0,19	0,26	0,15	0,37	0,01	0,56	0,02	0,91
Кат. Н Клаб	0,41	0,01	-0,33	0,047	-0,34	0,04	0,06	0,74	0,089	0,60
КФ сумм Клаб	0,23	0,16	0,15	0,38	0,21	0,21	-0,28	0,08	-0,08	0,63
КФ тс Клаб	0,23	0,17	0,19	0,24	0,23	0,17	-0,29	0,07	0,02	0,9
КФ тч Клаб	0,18	0,28	0,07	0,68	0,07	0,65	0,09	0,58	-0,28	0,09

Результаты корреляционного анализа зависимости показателей активности и компарментализации лизосомальных ферментов с уровнем метаболитов оксида азота и характеристиками состояния окислительной модификации белков
в ткани почки

	Метаболиты NO		S общ		АДФГ сумм		КДФГ сумм		РАП	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Кат. В ОА	0,21	0,23	-0,30	0,48	-0,29	0,08	-0,18	0,29	0,14	0,42
Кат. В СА	0,076	0,66	0,23	0,17	-0,21	0,22	-0,03	0,86	0,009	0,96
Кат. В НСА	0,34	0,047	-0,41	0,012	-0,37	0,026	-0,24	0,15	0,17	0,31
Кат. В Клаб	-0,07	0,68	0,23	0,16	0,21	0,23	0,35	0,04	-0,02	0,90
Кат. L ОА	0,33	0,047	-0,21	0,21	-0,17	0,34	-0,13	0,47	0,026	0,87
Кат. L СА	0,17	0,33	-0,08	0,64	-0,04	0,82	0,05	0,75	-0,15	0,38
Кат. L НСА	0,29	0,089	-0,27	0,10	-0,23	0,16	-0,09	0,61	0,37	0,02
Кат. L Клаб	-0,02	0,92	0,21	0,22	0,17	0,32	0,06	0,71	-0,01	0,94
Кат. Н ОА	0,42	0,01	-0,42	0,012	-0,37	0,029	-0,12	0,45	0,081	0,64
Кат. Н СА	0,29	0,09	-0,32	0,054	-0,28	0,097	0,031	0,86	-0,05	0,75
Кат. Н НСА	0,58	0,0002	-0,51	0,002	-0,49	0,002	-0,19	0,25	0,45	0,006
Кат. Н Клаб	-0,005	0,98	0,10	0,55	0,06	0,74	-0,19	0,24	-0,09	0,62
КФ сумм Клаб	-0,020	0,91	-0,003	0,98	-0,034	0,84	-0,026	0,88	0,08	0,64
КФ тс Клаб	0,24	0,15	-0,26	0,12	-0,27	0,10	-0,21	0,22	0,07	0,66
КФ тч Клаб	-0,27	0,11	0,21	0,23	0,19	0,25	0,15	0,37	0,12	0,47

Результаты корреляционного анализа зависимости показателей активности и компарментализации лизосомальных ферментов с уровнем метаболитов оксида азота и характеристиками состояния окислительной модификации белков
в ткани легкого

	Метаболиты NO		S общ		АДНФГ сумм		КДНФГ сумм		РАП	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Кат. В ОА	0,09	0,58	-0,24	0,14	-0,36	0,035	0,11	0,51	0,4	0,015
Кат. В СА	0,31	0,06	0,003	0,98	-0,07	0,69	0,39	0,015	0,18	0,28
Кат. В НСА	0,21	0,22	-0,41	0,01	-0,49	0,003	-0,26	0,11	0,41	0,01
Кат. В Клаб	0,07	0,64	-0,09	0,58	-0,11	0,50	-0,41	0,01	0,04	0,81
Кат. L ОА	0,32	0,051	-0,37	0,025	-0,35	0,036	0,17	0,32	0,32	0,051
Кат. L СА	0,47	0,004	-0,16	0,34	-0,12	0,45	0,37	0,025	0,16	0,34
Кат. L НСА	0,15	0,37	-0,31	0,058	-0,46	0,004	-0,29	0,08	0,50	0,002
Кат. L Клаб	0,06	0,73	-0,05	0,75	-0,26	0,13	-0,36	0,03	0,38	0,02
Кат. H ОА	0,14	0,40	-0,36	0,029	-0,42	0,009	0,13	0,04	0,31	0,07
Кат. H СА	0,035	0,037	-0,11	0,51	-0,14	0,041	0,4	0,015	0,09	0,57
Кат. H НСА	0,16	0,34	-0,34	0,04	-0,44	0,008	0,14	0,41	0,26	0,12
Кат. H Клаб	0,25	0,13	-0,19	0,26	-0,26	0,12	0,23	0,16	0,12	0,47
КФ сумм Клаб	0,22	0,19	-0,12	0,48	-0,11	0,52	-0,007	0,96	0,10	0,57
КФ тс Клаб	0,26	0,12	-0,11	0,49	-0,13	0,41	0,02	0,91	-0,07	0,67
КФ тч Клаб	-0,09	0,58	0,02	0,88	0,05	0,75	-0,07	0,67	0,05	0,79

Таким образом, на данном этапе в *in vivo*- исследования подтверждены полученные *in vitro* данные о нарастании уровня окислительно модифицированных белков при блокаде синтеза оксида азота и получены обратные корреляционные связи уровня метаболитов оксида азота и общего содержания продуктов окислительного карбонилирования протеинов в цитоплазматической фракции ткани печени, почки и легкого. Для ткани печени продемонстрирована способность L-аргинина проявлять протективные эффекты в отношении окислительной модификации белков, в условиях отсутствия изменений уровня синтеза оксида азота.

При этом изучение влияния неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME) и субстрата синтеза оксида азота L-аргинина на активность катепсинов В, L, Н и ее субклеточное распределение в ткани печени, почек и легкого продемонстрировало тканеспецифические и в ряде случаев разнонаправленные реакции. Обнаружено, что изменения активности сопровождаются признаками изменения соотношения проферментных и энзиматически активных форм преимущественно за счет повышения доли проферментных. Интересно, что данные эффекты тоже, по-видимому, тканеспецифичны. Так, обнаруженная в данном исследовании способность L-аргинина повышать показатель коэффициента в отношении катепсина В в ткани печени, что можно трактовать как повышение доли проферментных форм в материале, совпадает с эффектом, описанным для тимоцитов и спленоцитов в условиях *in vitro* [1].

Обнаружение статистически значимых линейных корреляционных связей активности и компарментализации цистеиновых катепсинов с уровнем продуктов окислительного карбонилирования белков демонстрируют наличие взаимозависимости этих процессов.

3.4. Оценка корректирующего влияния L-аргинина на состояние окислительной модификации белков и изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при экспериментальной гипергомоцистеинемии

Гомоцистеин является промежуточным продуктом цикла обмена метионина и обладает выраженным цитотоксическим действием, в том числе за счет провокации образования свободных радикалов, влекущего за собой развитие окислительного стресса [81, 229].

В настоящее время имеются сведения о вовлеченности гомоцистеина в патогенез заболеваний печени [16], почек [14], легких [330], хотя подавляющее количество исследований посвящено роли гомоцистеина как предиктора и независимого фактора риска тромбоваскулярных и атеросклеротических поражений [34, 194, 425] и, как следствие, сердечно-сосудистой патологии [117].

Следует отметить, что, несмотря на значительное количество работ, увязывающих повышение уровня гомоцистеина в крови с развитием различных патологических состояний, детализация механизмов тканевых изменений остается актуальной.

Поскольку индукция окислительного стресса остается превалирующей гипотезой, объясняющей механизмы повреждения органов и тканей при высоких уровнях гомоцистеина [147], для дальнейшего *in vivo*- исследования связи окислительного повреждения белков с лизосомальным протеолизом была выбрана экспериментальная модель выраженной гипергомоцистеинемии.

Разработка способа формирования экспериментальной гипергомоцистеинемии и моделирование указанной патологии осуществлялось совместно с Д.В. Медведевым, В.И. Звягиной [44], результаты исследования для ткани миокарда получены совместно с А.С. Ильичевой при выполнении диссертационного исследования [27] под научным руководством автора и отражены в совместных публикациях [26, 28-30].

3.4.1. Характеристика экспериментальных моделей

Для подтверждения формирования гипергомоцистеинемии проведено измерение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови животных экспериментальных и контрольных групп. Обнаружено выраженное нарастание концентрации гомоцистеина у животных, получавших суспензию метионина (Экспериментальная группа 4), статистически значимое по сравнению с показателями животных, получавших суспензию без содержания метионина (Контроль 4): 293,10[273,10;318,20] мкмоль/л и 5,90[5,50;6,70] мкмоль/л соответственно, $p=0,001$. При этом у животных, получавших L-аргинин на фоне введения суспензии метионина (Экспериментальная группа 5), данный показатель составил 92,80[58,75;112,07] мкмоль/л, что превышало результаты, полученные для животных, получавших раствор L-аргинина и суспензию без содержания метионина (Контроль 5): 5,87[5,65;6,77] мкмоль/л, $p=0,002$, но оказалось статистически значимо ниже значений Экспериментальной группы 4 ($p=0,001$).

Полученные данные демонстрируют успешность моделирования выраженной гипергомоцистеинемии у животных Экспериментальной группы 4, обнаружение феномена снижения уровня гомоцистеина в сыворотке крови при сочетании моделирования с введением L-аргинина не противоречит литературным данным [246], однако следует отметить, что взаимосвязь метаболизма гомоцистеина и L-аргинина продолжает изучаться и результаты на данный момент не вполне однозначны [245, 249, 404].

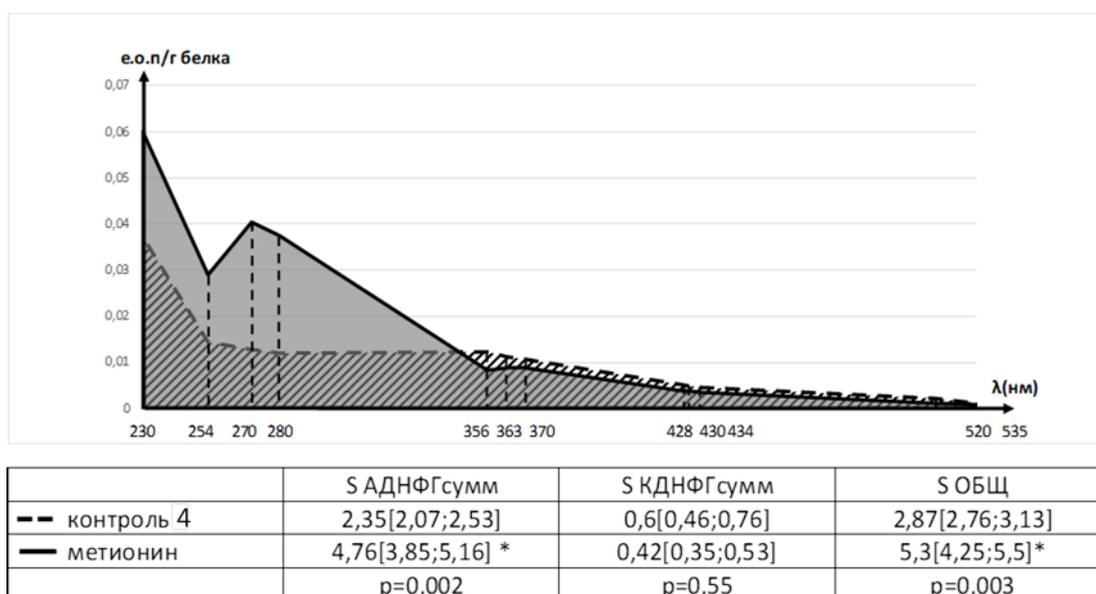
3.4.2. Результаты комплексной оценки состояния окислительной модификации белков ткани печени, почки, легкого и миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии изолированно и в сочетании с введением L-аргинина

Анализ содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени, почки, легкого и миокарде продемонстрировал, что на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии формируется существенное, статистически значимое относительно показателей контрольной группы нарастание содержания продуктов окислительной

модификации белков в цитоплазматической фракции ткани печени (Рисунок 64) и почки (Рисунок 65), причем для обеих тканей рост общего содержания продуктов окислительной модификации белков происходит за счет повышения концентрации первичных маркеров окислительного стресса (АДНФГ).

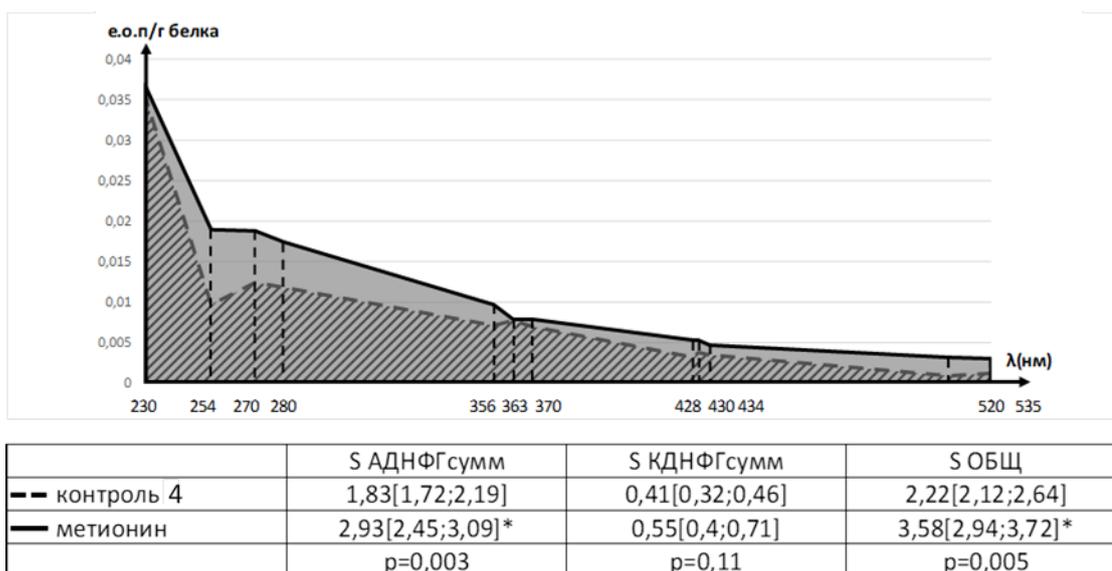
В ткани легкого при этом статистически значимых изменений показателей обнаружено не было (Рисунок 66).

Наиболее выраженные изменения содержания продуктов окислительной модификации белков при экспериментальной гипергомоцистеинемии были зафиксированы в миокарде (Рисунок 67), где значения показателей продемонстрировали практически десятикратное повышение относительно контрольных, причем нарастание общего содержания продуктов окислительного карбонилирования белков сочеталось с нарастанием концентрации не только первичных (АДНФГ), но и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса. Выявленные изменения согласуются с клиническими представлениями о связи гипергомоцистеинемии с рисками кардиоваскулярных событий [62, 167, 274], выявляя при этом наличие тканевых изменений в миокарде при данной патологии и расширяя тем самым возможности понимания патогенетических механизмов подобной связи.



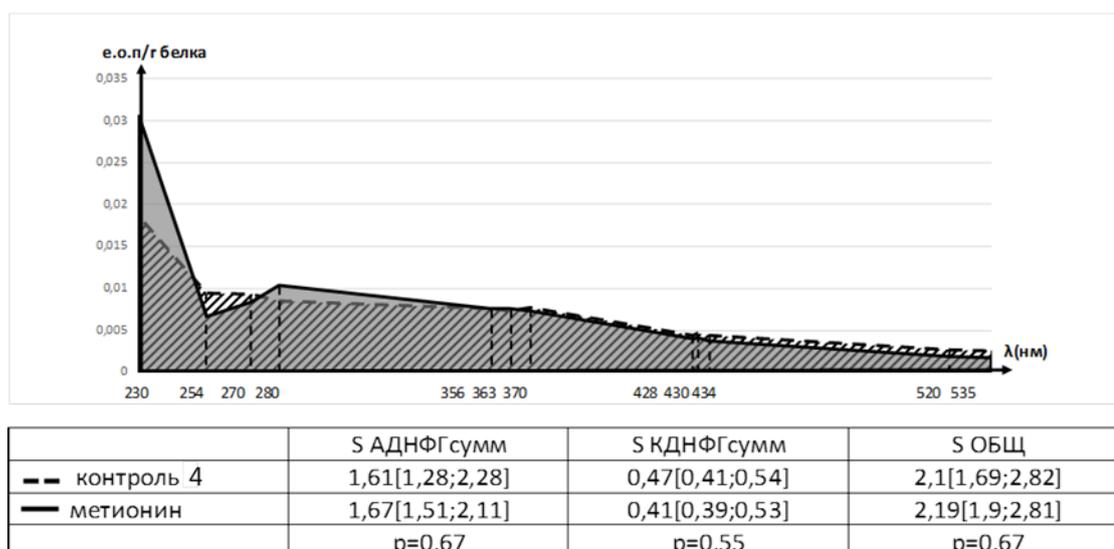
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 64. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени при экспериментальной гипергомоцистеинемии, Me [$Q_1; Q_3$]



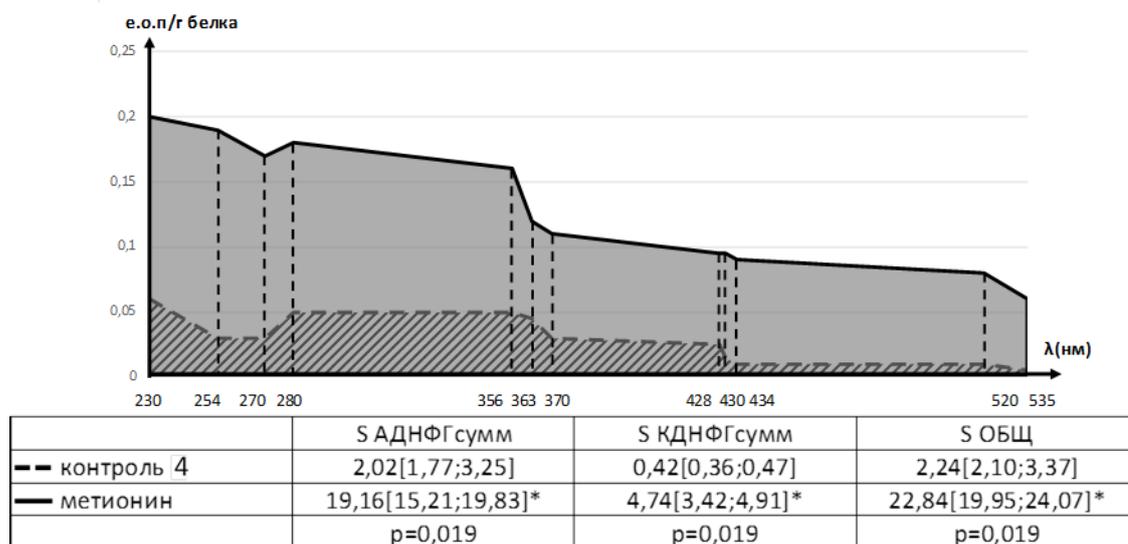
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 65. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани почки при экспериментальной гипергомоцистеинемии, Me [$Q_1; Q_3$]



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 66. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани легкого при экспериментальной гипергомоцистеинемии, Me [$Q_1; Q_3$]



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

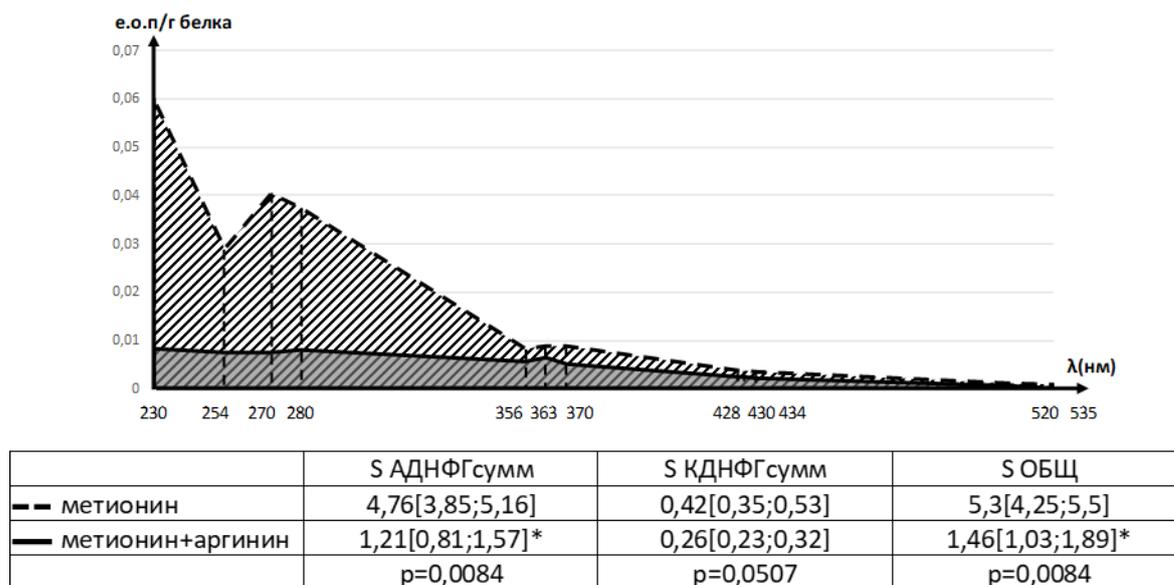
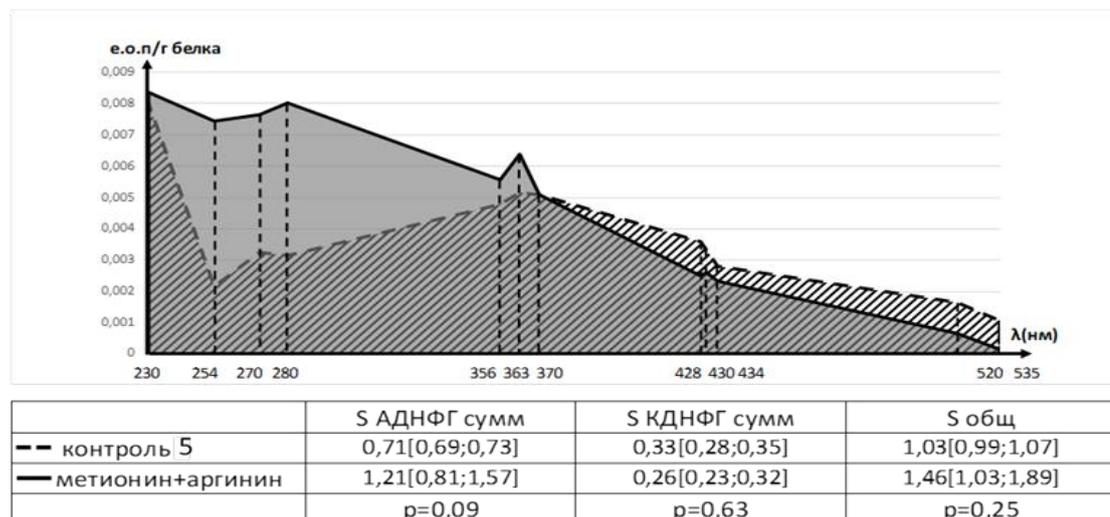
Рисунок 67. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии, Me [$Q_1; Q_3$]

Применение L-аргинина в дозе 500 мг/кг в течение 10 суток на фоне моделирования экспериментальной гипергомоцистеинемии привело к коррекции показателей содержания окислительно модифицированных белков в ткани печени (Рисунок 68) и почки (Рисунок 69), приблизив их значения к полученным для соответствующей контрольной группы и сформировав статистически значимое снижение относительно результатов, полученных для изолированной гипергомоцистеинемии. Таким образом, полученные результаты можно считать подтверждением ранее высказанного предположения о возможном действии L-аргинина *in vivo* в качестве агента, способного создавать протективный эффект в отношении окислительного повреждения белков в условиях, когда окислительный стресс не вызывается действием ингибиторов синтеза оксида азота. Важно также, что указанный эффект проявился в этой модели и для ткани почки, для которой изолированное действие L-аргинина приводило к ранее описанному, однотипному с действием L-NAME повышению содержания продуктов окислительной модификации белка. Возможно, что прооксидантная часть эффектов L-аргинина здесь не проявилась по причине параллельно развивающихся выявленных ранее антиоксидантных эффектов Твин-80 [43], который применялся нами в качестве основы суспензии как в экспериментальных, так и в контрольных группах.

В ткани легкого, где на фоне изолированной гипергомоцистеинемии изменений содержания продуктов окислительной модификации белков не обнаружено, дополнительное введение L-аргинина изменений также не вызывало (Рисунок 70).

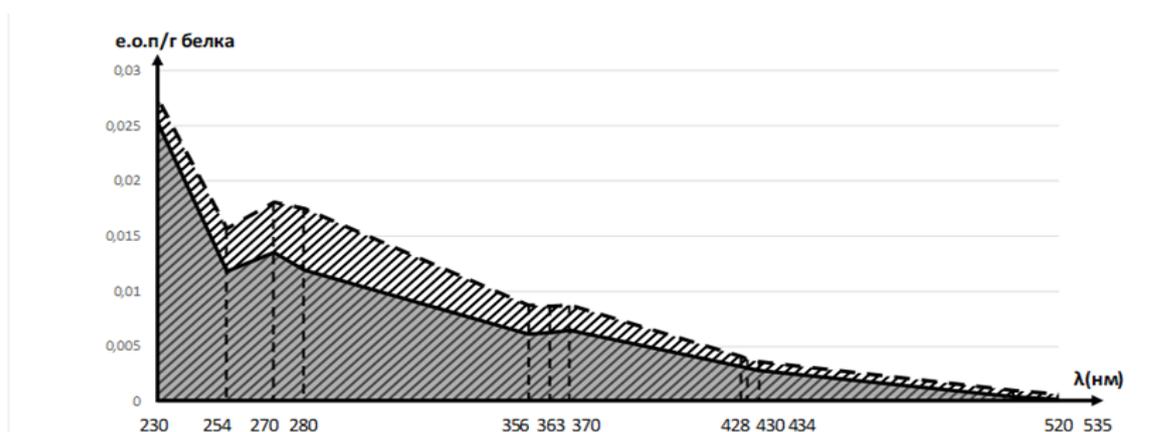
В миокарде введение L-аргинина привело к существенной коррекции вызванного гипергомоцистеинемией значительного повышения содержания продуктов окислительной модификации белков, однако показатели оказались статистически значимо выше таковых, полученных для контрольной группы (Рисунок 71). Это позволяет выдвинуть предположение о том, что протективный эффект L-аргинина в отношении окислительного повреждения белков проявляется и для этой ткани, однако причиной выявленных изменений может также оказаться вызываемая L-аргинином частичная коррекция

гипергомоцистеинемии. В пользу последнего тезиса говорит обнаружение только для ткани миокарда статистически значимых прямых корреляционных связей содержания продуктов окислительно карбонилированных белков и концентрации гомоцистеина в сыворотке крови (Рисунок 72).

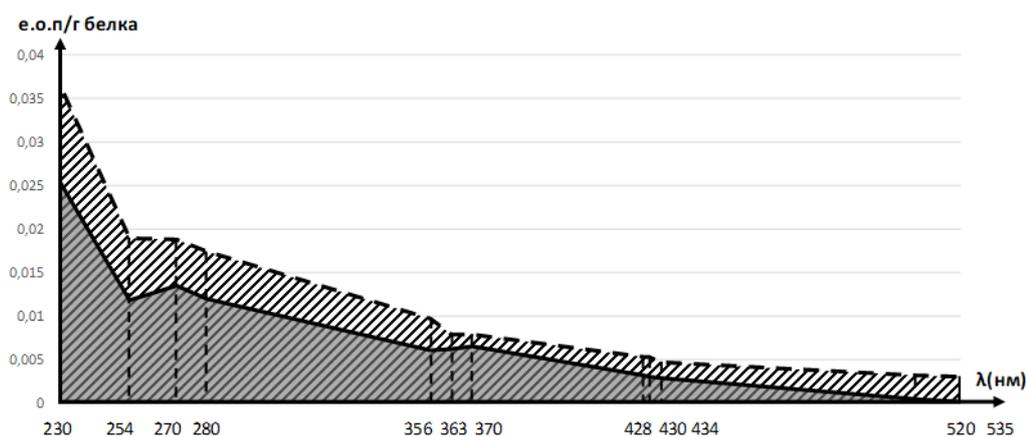


Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно группы, получавшей изолированно метионин ($p < 0,05$)

Рисунок 68. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени при действии L-аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии, Me [Q₁;Q₃]



	S АДНФГ сумм	S КДНФГ сумм	S общ
--- контроль 5	2,1[0,66;3,38]	0,45[0,41;0,54]	2,41[1,06;3,9]
— метионин+аргинин	1,6[1,32;1,93]	0,35[0,23;0,5]	1,85[1,45;2,42]
	p=0,52	p=0,52	p=0,24



	S АДНФГ сумм	S КДНФГ сумм	S ОБЩ
--- метионин	2,93[2,45;3,09]	0,55[0,4;0,71]	3,58[2,94;3,72]
— метионин+аргинин	1,60[1,32;1,93]*	0,35[0,23;0,5]	1,85[1,45;2,42]*
	p=0,029	p=0,21	p=0,047

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно группы, получавшей изолированно метионин ($p < 0,05$)

Рисунок 69. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани почки при действии L-аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии, Me [Q₁;Q₃]

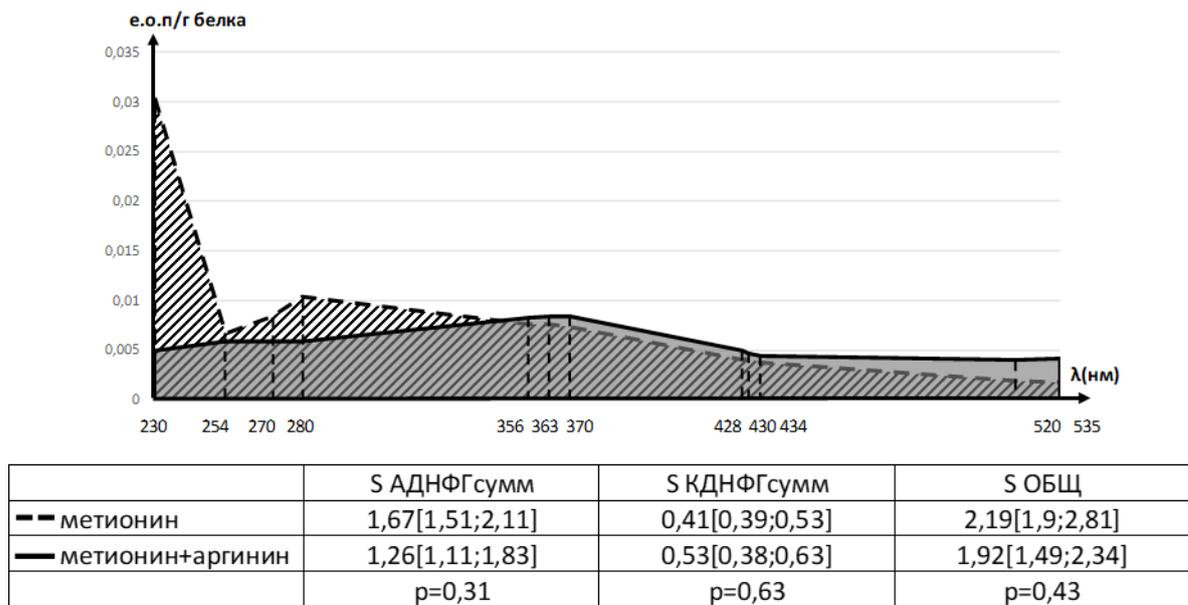
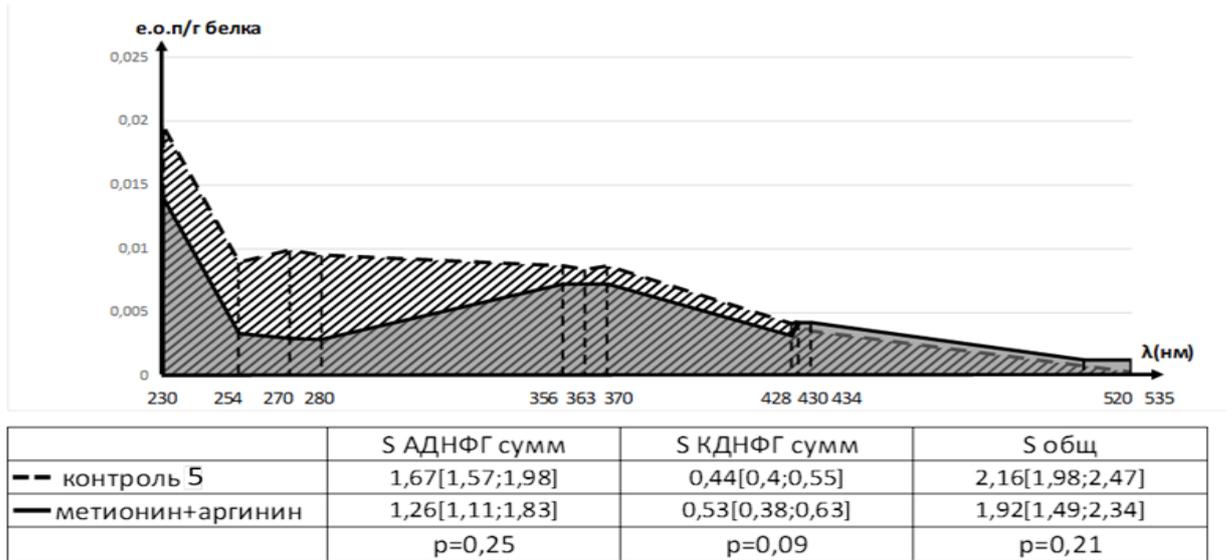
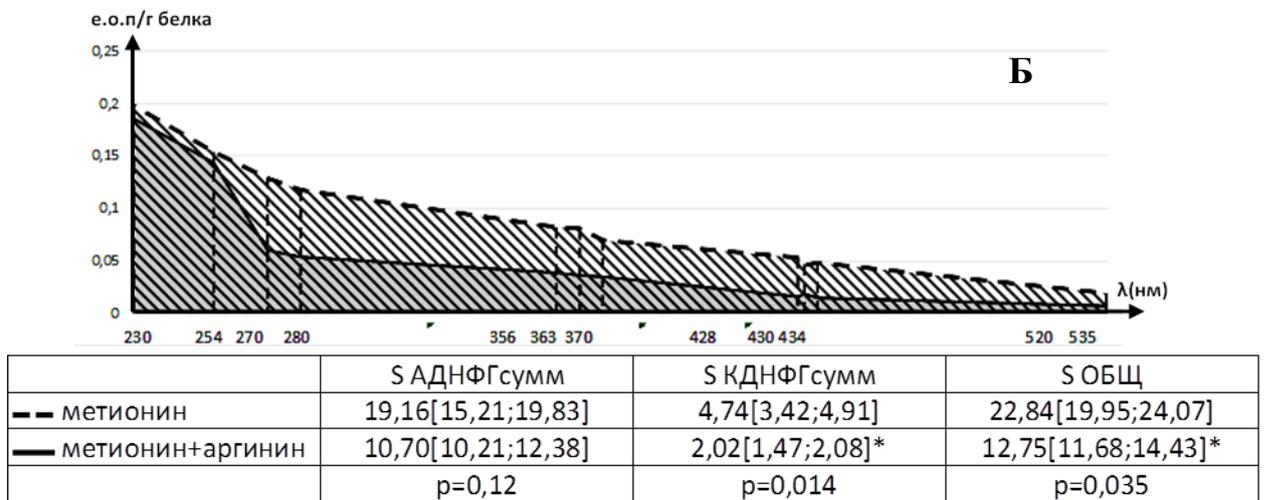
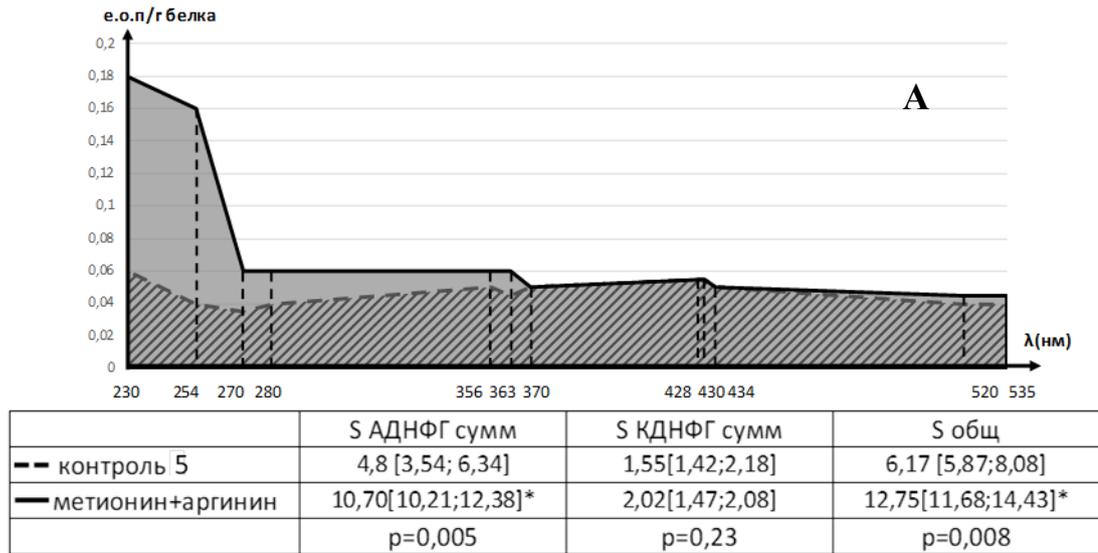


Рисунок 70. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани легкого при действии L-аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии, Me [Q₁;Q₃]



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно:

А – контрольных значений ($p < 0,05$)

Б – группы, получавшей изолированно метионин ($p < 0,05$)

Рисунок 71. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции миокарда при действии L-аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии, Me [Q₁;Q₃]

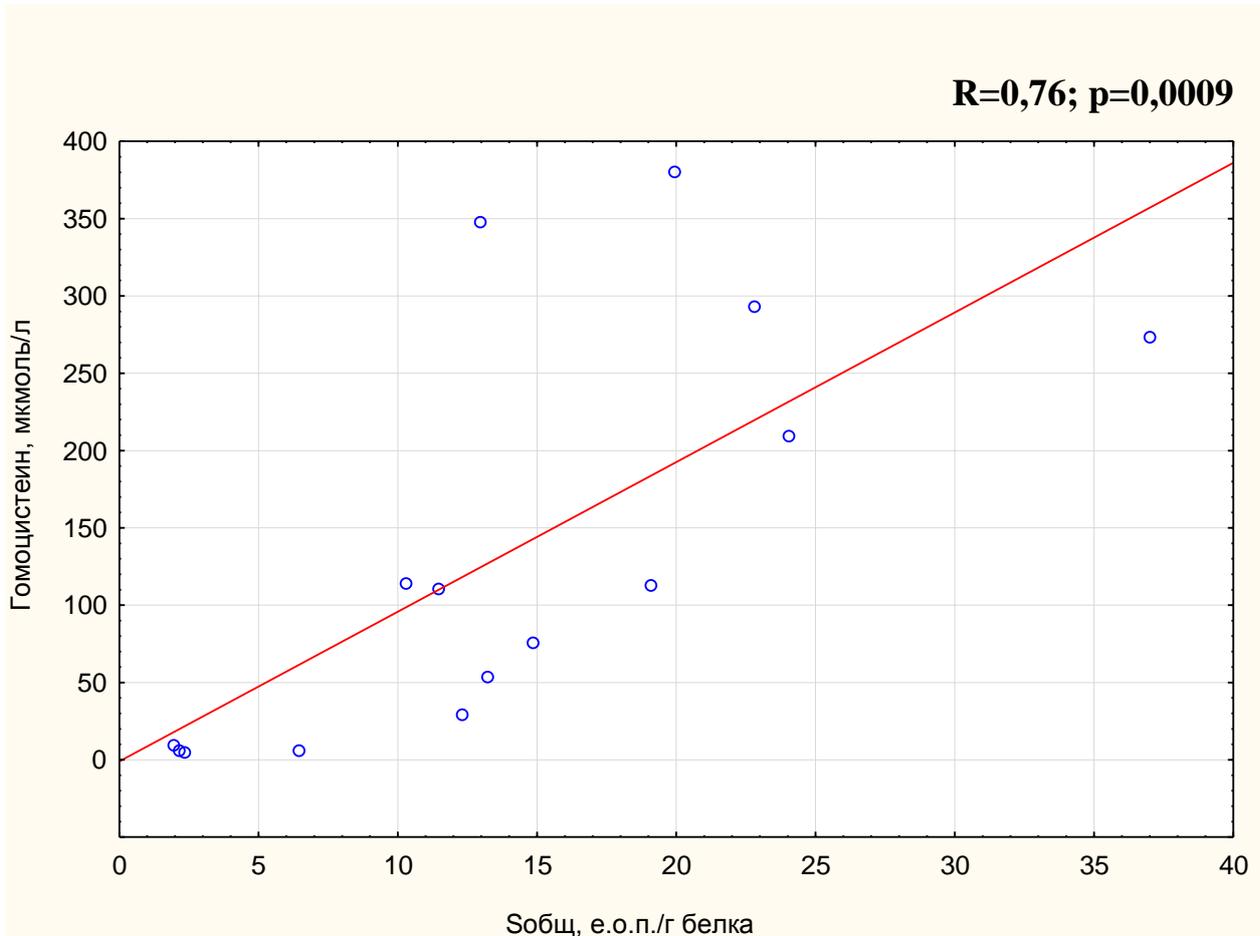
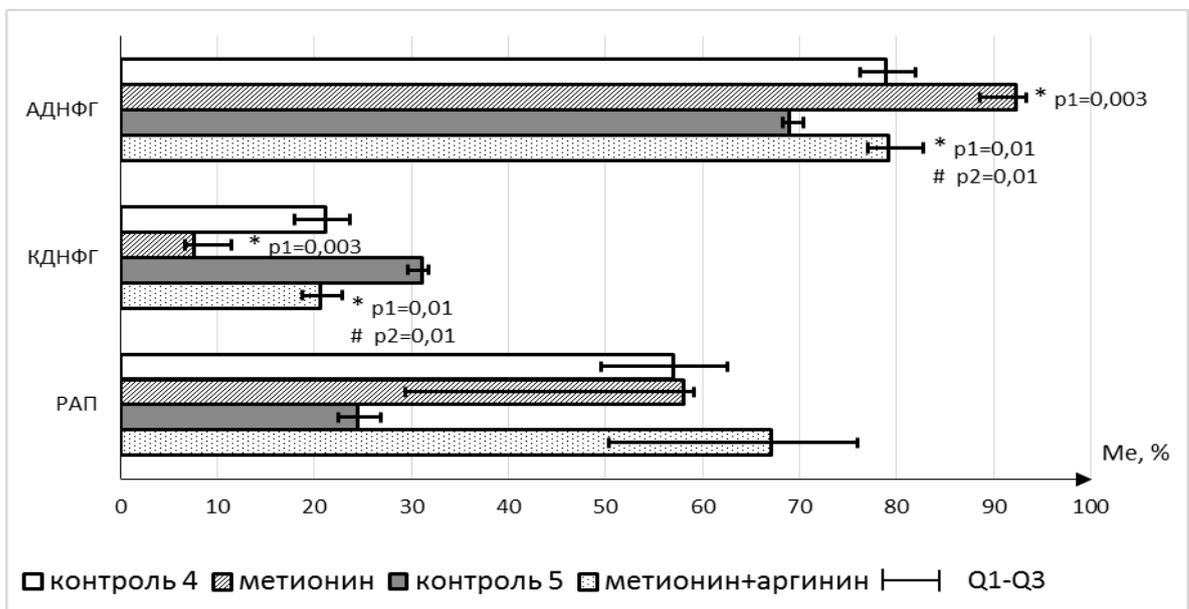


Рисунок 72. Зависимость общего содержания продуктов окислительной модификации белков в цитоплазматической фракции миокарда от уровня гипергомоцистеинемии

Следует отметить, что при анализе зависимости показателей содержания продуктов окислительной модификации белков в миокарде от концентрации гомоцистеина в сыворотке крови также обнаружены статистически значимые плотные прямые корреляционные связи уровня гомоцистеина с содержанием первичных маркеров окислительного стресса (АДНФГ): $R=0,70$; $p=0,004$ и с содержанием вторичных маркеров окислительного стресса (КДНФГ): $R=0,84$; $p=0,00008$.

Исследование соотношения доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и изменений значения резервно-адаптационного потенциала продемонстрировало, что в ткани печени (Рисунок

73) при экспериментальной гипергомоцистеинемии нарастание общего содержания продуктов окислительного карбонилирования белков за счет повышения содержания АДНФГ проявилось также статистически значимым увеличением доли первичных маркеров окислительного стресса, изменений показателя РАП при этом зафиксированно не было. Введение L-аргинина на фоне моделирования гипергомоцистеинемии сформировало снижение доли первичных маркеров (АДНФГ) относительно показателей, полученных для изолированной гипергомоцистеинемии, но коррекция оказалась не полной: значения заняли промежуточное положение, статистически значимо оставаясь повышенными относительно контрольных.



Примечание: *, p1 - изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы ($p < 0,05$); #, p2 - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией ($p < 0,05$)

Рисунок 73. Изменение доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани печени при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина

В ткани почки (Рисунок 74) и легкого (Рисунок 75) экспериментальная гипергомоцистеинемия и введение на ее фоне L-аргинина не вызвали статистически значимых изменений доли АДНФГ/КДНФГ и показателя РАП.

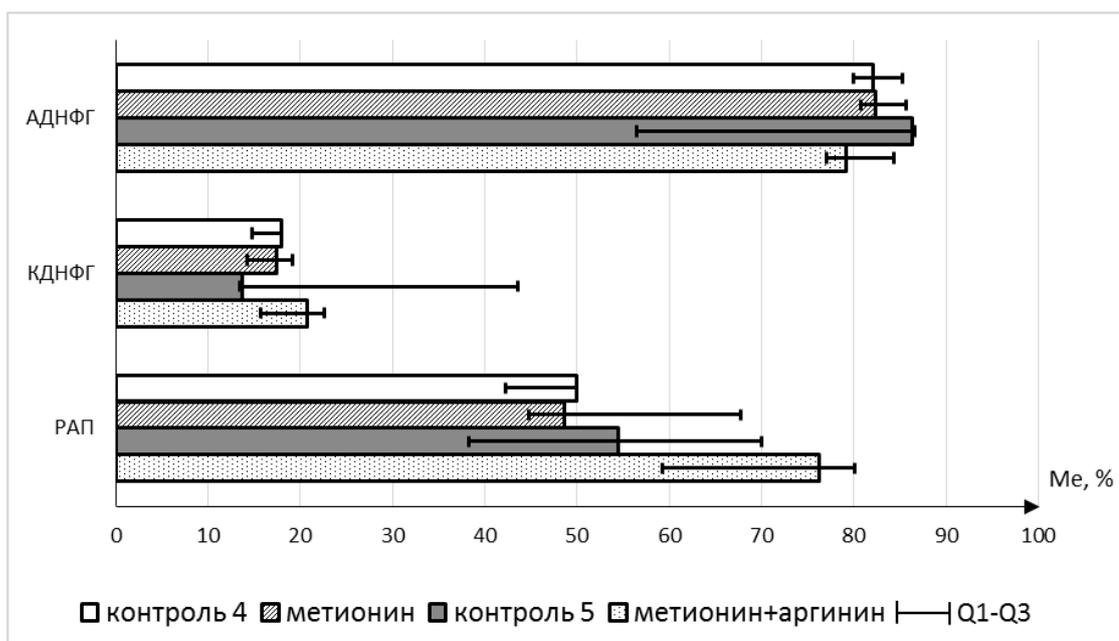


Рисунок 74. Показатели доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани почки при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина

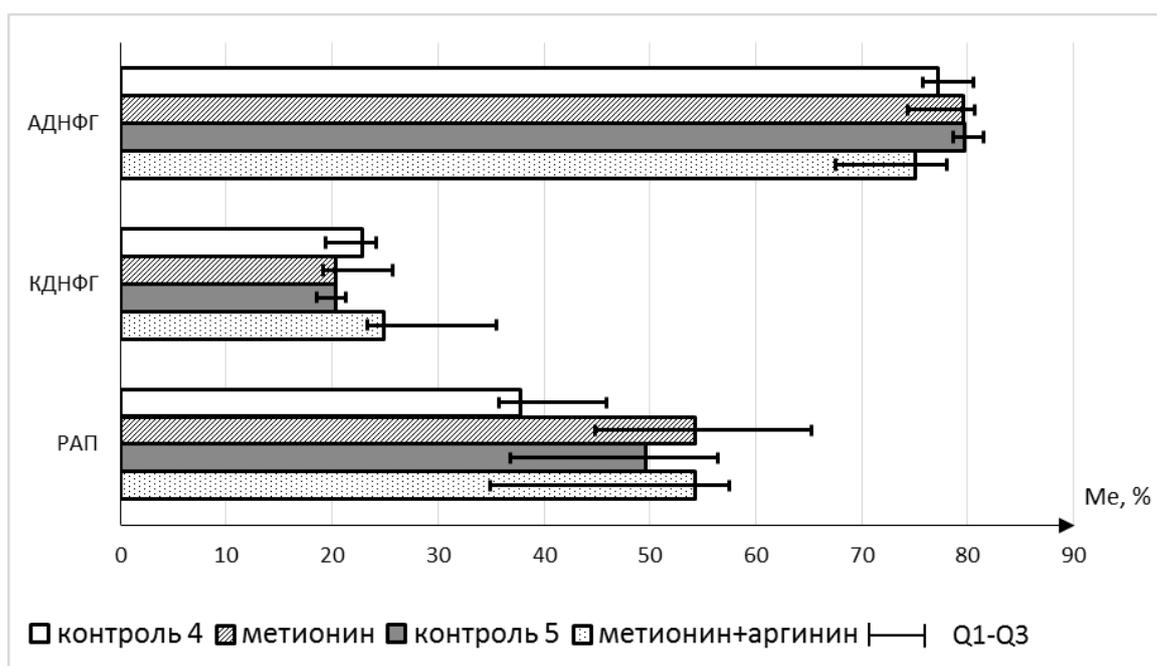
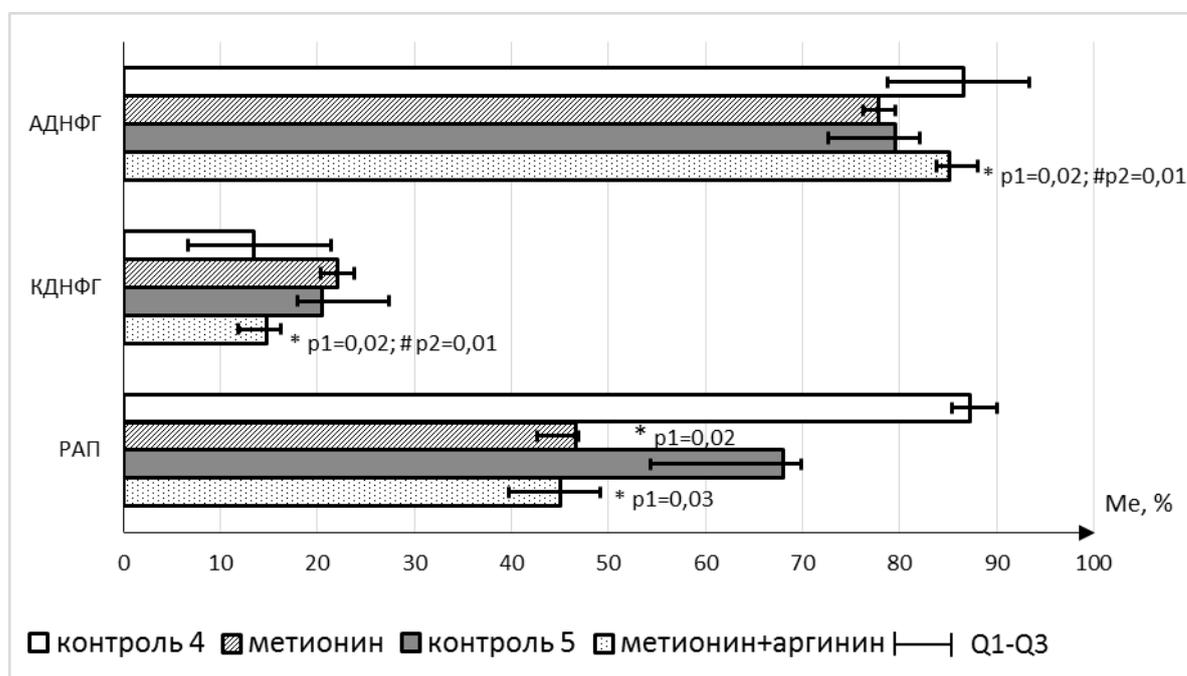


Рисунок 75. Показатели доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в ткани легкого при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина

В миокарде (Рисунок 76) на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии значительное нарастание содержания как альдегидных, так и кетонных продуктов окислительного карбонилирования белков не

сопровождалось изменением соотношения их доли, при этом произошло выраженное, практически двукратное, снижение значения резервно-адаптационного потенциала относительно контроля, что является признаком истощения возможностей тканей к защите белков от окислительного повреждения. Введение L-аргинина, частично исправлявшее показатели уровня окислительного карбонилирования белков, привело здесь к снижению доли вторичных маркеров окислительного стресса (КДНФГ), но практически не скорректировало значение РАП.



Примечание: *, p1 - изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы ($p < 0,05$); #, p2 - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией ($p < 0,05$)

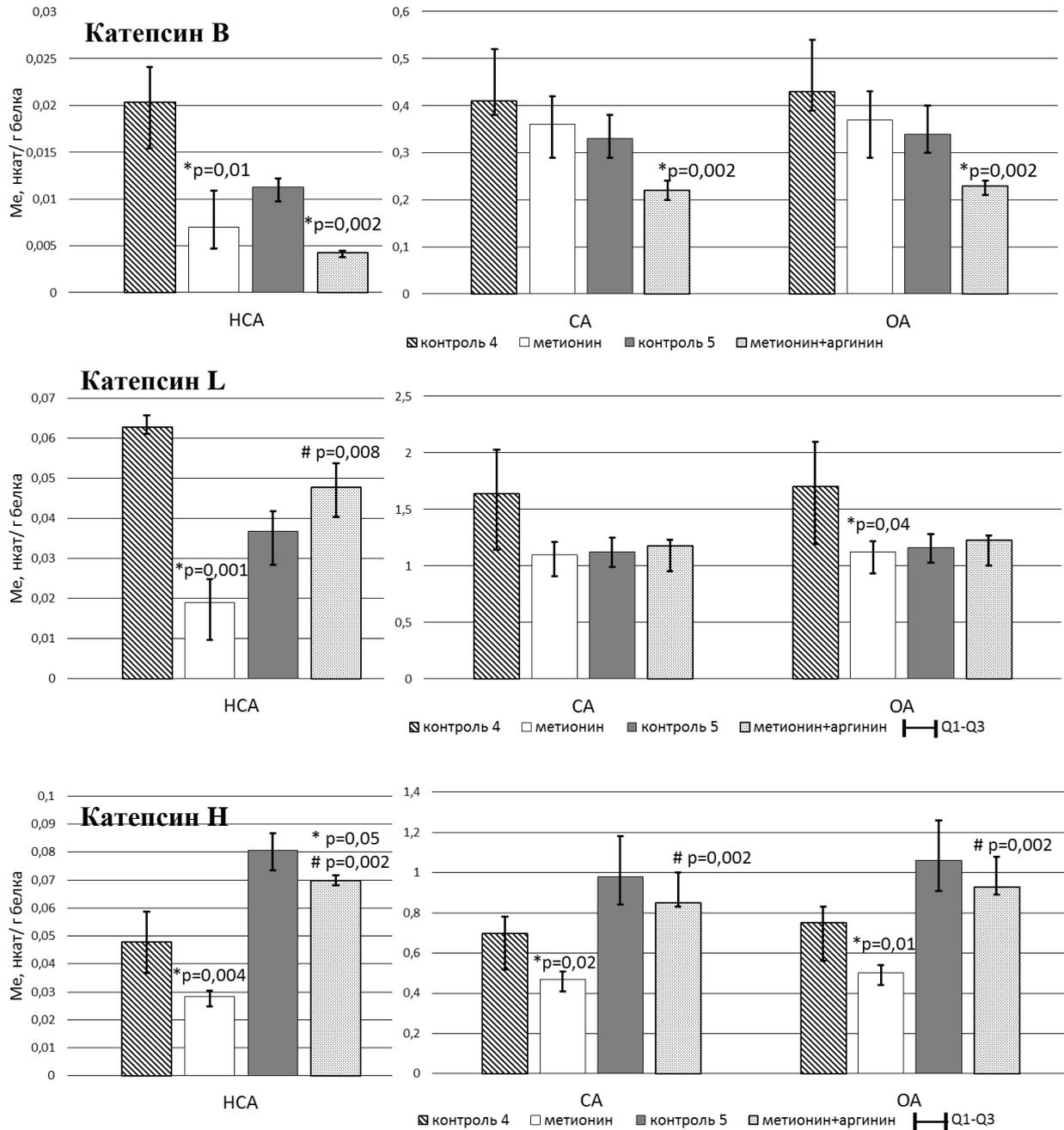
Рисунок 76. Изменение доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса и показателя РАП в миокарде при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина

3.4.3. Изменения активности и компартиментализации катепсинов В, L, Н ткани печени, почки, легкого и миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии изолированно и в сочетании с введением L-аргинина

При оценке изменений активности лизосомальных цистеиновых протеиназ и ее внутриклеточного распределения на фоне окислительного стресса, вызванного экспериментальной гипергомоцистеинемией и его коррекции L-аргинином был обнаружен ряд тканеспецифических и энзимоспецифических тенденций.

В ткани печени (Рисунок 77) при экспериментальной гипергомоцистеинемии описанное выше нарастание содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции сопровождалось статистически значимым снижением внелизосомальной активности катепсинов В, L, Н. Введение L-аргинина, корректировавшее показатели уровня окислительно модифицированных белков, здесь также привело к коррекции изменений неседиментируемой активности катепсинов L и Н, сформировав статистически значимое ее повышение относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией. При этом внелизосомальная активность катепсина В осталась статистически значимо ниже соответствующего контроля, демонстрируя отсутствие коррекции ее изменений.

Изменения общей и седиментируемой активности изучаемых катепсинов в ткани печени оказались не столь однонаправленными. Наибольшую чувствительность проявила активность катепсина Н, для которого при экспериментальной гипергомоцистеинемии обнаружено статистически значимое снижение общей и лизосомальной активности, скорректированное введением L-аргинина. При этом изолированная гипергомоцистеинемия не вызвала изменений седиментируемой активности катепсинов В и L, незначительное снижение общей активности катепсина L при этом следует считать результатом выраженного снижения активности фермента во внелизосомальной фракции.



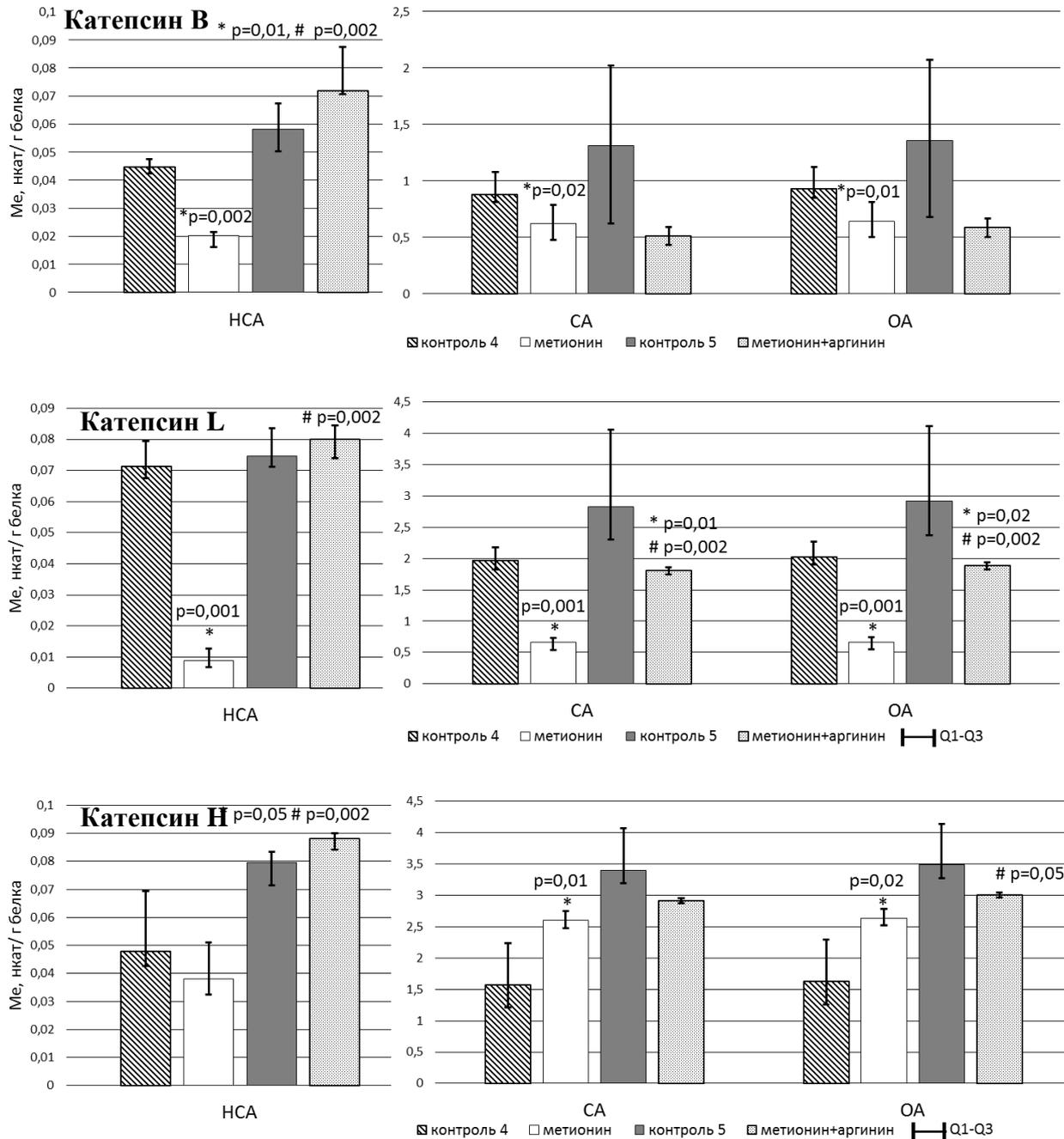
Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы ($p < 0,05$); # - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией ($p < 0,05$)

Рисунок 77. Изменение активности катепсинов В, L, H в субклеточных фракциях ткани печени при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина

Важно отметить, что для катепсина В мы обнаружили здесь тенденцию изменений, однотипную ранее описанной для действия модуляторов синтеза оксида азота: введение L-аргинина на фоне фактора, повышающего уровень окислительного карбонилирования белков (L-NAME в предыдущих наблюдениях и гипергомоцистеинемия в данном разделе) приводит к статистически значимому снижению не изменяющихся на фоне отдельного воздействия факторов показателей общей и лизосомальной активности фермента.

В ткани почки (Рисунок 78) на фоне гипергомоцистеинемии наблюдались однотипные изменения катепсинов В и L: статистически значимое относительно контроля снижение общей активности за счет как вне-, так и лизосомальной. При этом введение L-аргинина привело к существенному, статистически значимому нарастанию внелизосомальной активности ферментов, причем для катепсина В значения оказались даже статистически значимо выше контрольных. Однако общая и лизосомальная активность катепсина В к корректирующему влиянию аргинина оказались не чувствительными, для катепсина L эти показатели заняли промежуточное положение, статистически значимо повышаясь относительно полученных для изолированной гипергомоцистеинемии, но не достигая диапазона значений соответствующей контрольной группы. Такое сочетание изменений активности формирует предположение, что корректирующие эффекты L-аргинина в данной ткани заключаются в большей степени в перераспределении катепсинов В и L из лизосомальной в цитоплазматическую фракцию, без существенного воздействия на их активность. Возможно, именно этот фактор является значимым механизмом обнаруженной при действии L-аргинина коррекции показателей уровня окислительно модифицированных белков в цитоплазме ткани почки.

Для катепсина Н изолированная гипергомоцистеинемия, не вызывая статистически значимых изменений внелизосомальной активности, привела к нарастанию общей активности за счет седиментируемой фракции, что могло бы оказаться ответом на возрастающую на фоне повышения интенсивности процесса окислительной модификации белков потребность в их утилизации.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы ($p < 0,05$); # - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией ($p < 0,05$)

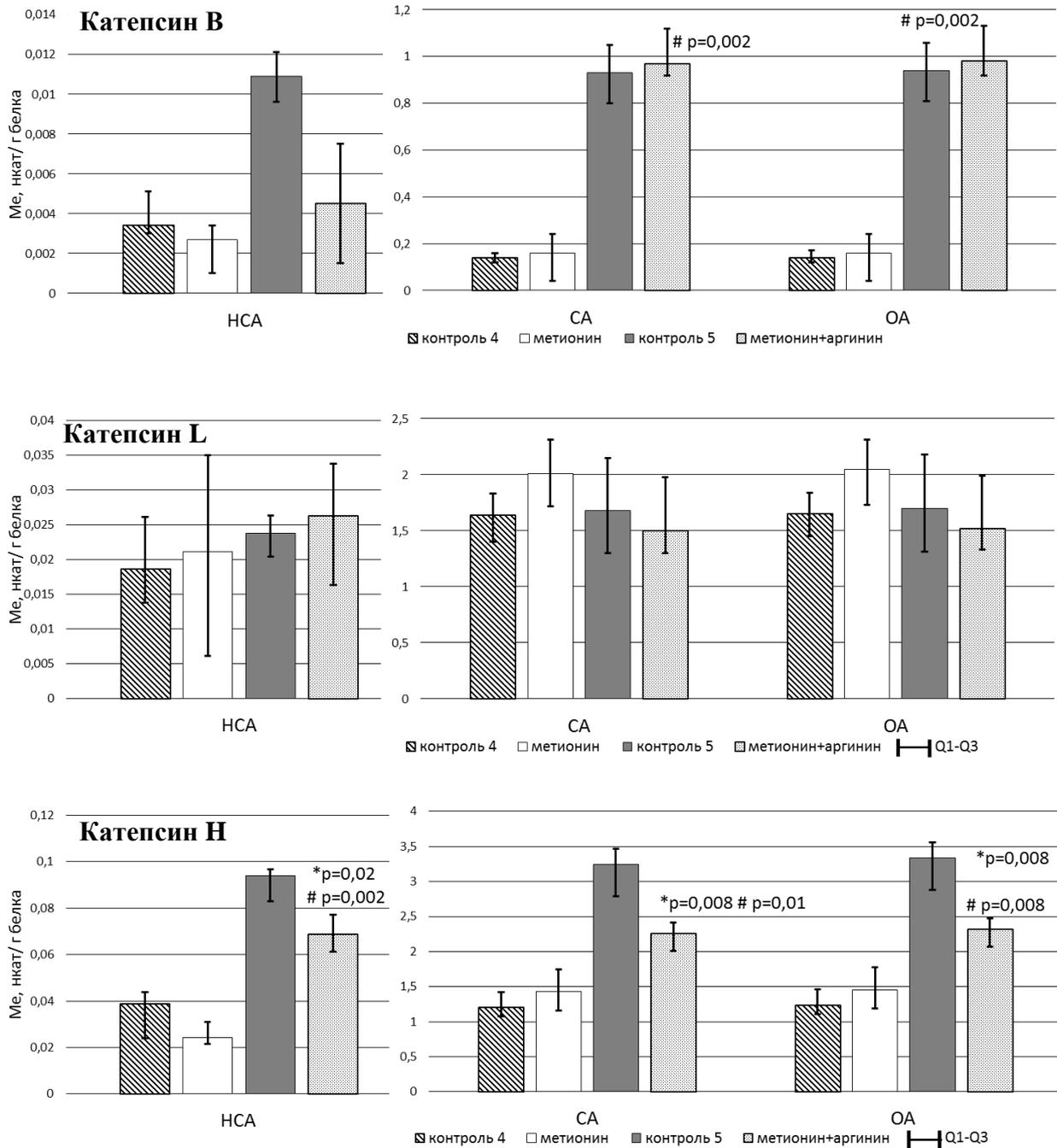
Рисунок 78. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани почки при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина

При этом введение L-аргинина привело к дальнейшему повышению общей активности, но, по-видимому, в большей степени за счет ее внелизосомальной фракции: поскольку значения неседиментируемой активности катепсина Н под действием L-аргинина превысили диапазоны таковых, полученные не только для изолированной гипергомоцистеинемии, но и для соответствующей контрольной группы, в качестве причин здесь следует рассматривать не только субклеточное перераспределение фермента, но и непосредственное активирующее влияние.

В ткани легкого (Рисунок 79), оказавшейся не чувствительной к обнаруженному для других тканей нарастанию интенсивности окислительной модификации белков на фоне гипергомоцистеинемии, изменений активности активности катепсинов В, L и Н при этой модели также не зафиксировано, что подтверждает тезис о связи изменений активности цистеиновых катепсинов и ее компартиментализации с уровнем процесса окислительного карбонилирования протеинов. Кроме того, интересным наблюдением мы считаем обнаруженный здесь эффект L-аргинина: при введении субстанции на фоне гипергомоцистеинемии зафиксировано статистически значимое снижение активности катепсина Н как в лизосомальной, так и цитоплазматической фракции.

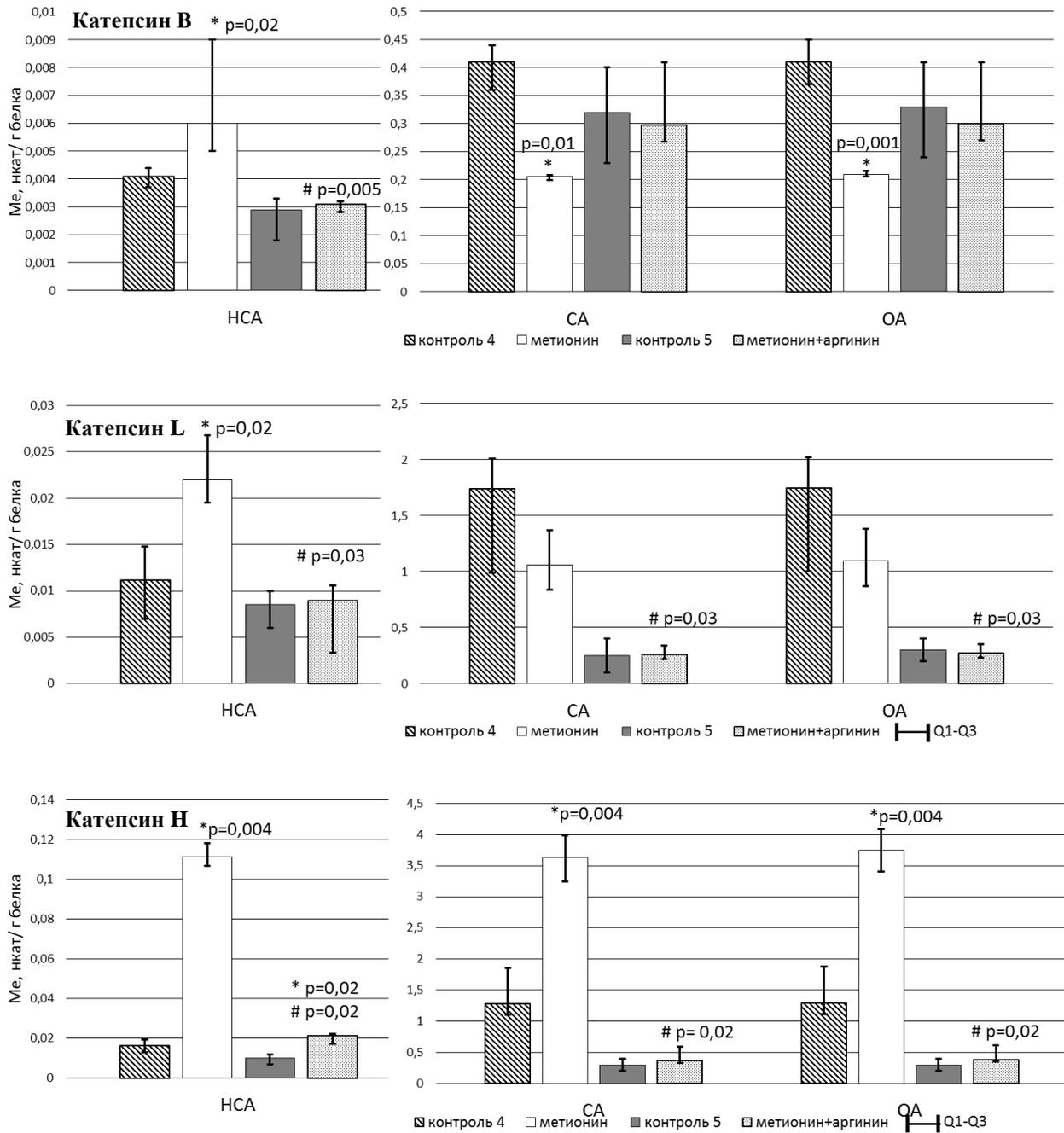
В миокарде, где моделирование гипергомоцистеинемии вызвало наиболее выраженное нарастание уровня окислительно модифицированных белков, изменения активности цистеиновых катепсинов также оказались весьма существенными (Рисунок 80).

Так, только для данной ткани гипергомоцистеинемия и ассоциированное с ней выраженное нарастание интенсивности окислительного повреждения белков цитоплазмы вызывали существенное, статистически значимое по отношению к контрольным значениям, повышение внелизосомальной активности всех изучаемых катепсинов. Описываемое повышение неседиментируемой активности для катепсина В сочеталось со снижением общей лизосомальной активности, а для катепсина L происходило без статистически значимых изменений таковых, что указывает скорее на перераспределение фермента между компартаментами.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы ($p < 0,05$); # - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией ($p < 0,05$)

Рисунок 79. Изменение активности катепсинов В, L, H в субклеточных фракциях ткани легкого при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы ($p < 0,05$); # - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией ($p < 0,05$)

Рисунок 80. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина

Для катепсина Н при этом нарастание внелизосомальной активности сопровождалось выраженным, статистически значимым относительно контроля нарастанием общей и седиментируемой активности, что формирует предположение либо о тотальной активации молекул указанного катепсина, либо об увеличении их синтеза; перераспределение в цитоплазматическую фракцию здесь может оказаться дополнительным процессом. Важно отметить, что такой ответ лизосомальных протеиназ не привел к компенсации интенсифицированного гипергомоцистеинемией процесса окислительной модификации белков и, возможно, является здесь дополнительным фактором повреждения кардиомиоцитов. Интересно также, что эффекты L-аргинина, введение которого приводило к описанной ранее частичной коррекции уровня гипергомоцистеинемии и показателей содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в миокарде, проявились здесь практически полной коррекцией значений внелизосомальной активности всех изучаемых катепсинов со статистически значимым ее снижением относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией. При этом для катепсинов L и Н описанное снижение активности в цитоплазматической фракции сопровождалось снижением общей и лизосомальной активности, что указывает на наличие единой причины изменений, приводящей к уменьшению количества активных форм указанных ферментов. Для катепсина В, напротив, снижение внелизосомальной активности сопровождалось нарастанием лизосомальной и общей активности, что указывает, скорее, на подавление выхода фермента из лизосом в цитоплазму.

Обнаруженные в изучаемых моделях изменения активности катепсинов преимущественно в сторону снижения на фоне развивающегося окислительного стресса при гипергомоцистеинемии и коррекция показателей аргинином могут объясняться не только снижением их синтеза из-за окислительного повреждения нуклеиновых кислот, либо снижением активности ферментов при их непосредственной окислительной модификации [52, 335], но и изменением соотношения активных и проферментных форм. Для проверки последнего тезиса нами была предпринята оценка коэффициента аутокаталитического действия

(Каса) изучаемых катепсинов (Таблица 19), поскольку для них аутокаталитический процессинг описан в качестве механизма оперативного перевода зимогена в активную форму фермента [101, 156].

Оказалось, что описанные выше многочисленные изменения активности катепсинов в ткани почки на фоне окислительного стресса при экспериментальной гипергомоцистеинемии не сопровождаются изменениями коэффициента аутокаталитического действия, что дает основания полагать, что соотношение активных и проферментных форм в данной модели роли не играет. При этом применение аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии приводит к статистически значимому снижению Каса для всех изучаемых катепсинов в цитоплазматической фракции относительно контроля. Такие изменения могут говорить о существовании большей части протеиназ в активной форме, что в какой-то степени подтверждает ранее высказанное предположение о возможной роли выходящих из лизосом катепсинов в утилизации окислительно поврежденных белков как о возможном механизме коррекции аргинином изменений, вызванных экспериментальной гипергомоцистеинемией.

В ткани печени, однако, на фоне гипергомоцистеинемии получено статистически значимое нарастание Каса для неседиментируемой активности катепсина В, что позволяет предполагать, что описанное выше снижение его активности в цитоплазматической фракции может иметь причиной замедление дозревания зимогенов; для остальных показателей статистически значимых отличий не обнаружено. Интересно, что применение аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии, приводя к дальнейшему снижению активности катепсина В в цитоплазматической фракции, вызывает и дальнейшее значительное нарастание Каса, т.е. изменения вызываются продолжением повышения доли проферментных форм относительно активных. Выявленные ранее изменения активности катепсинов L и H в ткани печени для изучаемых моделей не сопровождались статистически значимыми изменениями Каса, что не дает оснований предполагать наличие вклада изменения соотношения

проферментных и активных форм в обнаруженные сдвиги. Однако введение аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии привело к статистически значимому снижению показателя Каса в неседиментируемой фракции как относительно группы с введением метионина, так и относительно контроля, что указывает на то, что обнаруженная частичная коррекция сниженной на фоне оксидативного стресса активности данного фермента в цитоплазматической фракции может быть связана с увеличением доли активных форм.

Интересной находкой мы считаем обнаружение изменений Каса для ткани легкого. Хотя, согласно ранее представленным данным, данная ткань не демонстрирует изменений показателей окислительного повреждения белков и активности катепсинов, оказалось, что развитие экспериментальной гипергомоцистеинемии приводит к статистически значимому повышению Каса для катепсинов L и H в неседиментируемой фракции, а введение аргинина возвращает показатели к контрольным значениям. Таким образом, при экспериментальной гипергомоцистеинемии данная ткань характеризуется увеличением доли неактивных форм без статистически значимого снижения активности, что можно трактовать, как компенсаторное нарастание синтеза и вывода в цитоплазму указанных катепсинов, создающее в итоге резистентность к повышению уровня окислительно поврежденных белков.

Изменения значений коэффициента аутокаталитического действия (K_{ACA}) для катепсинов В, L, Н при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина, Me [Q_1 ; Q_3]

	Контроль 4			
	Печень	Почка	Легкое	Миокард
K_{ACA} катепсин В, НСА	0,18[0,12;0,40]	1,01[0,79;1,17]	0,49[0,49;0,97]	0,43[0,26;0,74]
K_{ACA} катепсин В, СА	0,47[0,14;0,71]	0,97[0,68;1,09]	0,76[0,67;0,97]	0,21[0,21;0,22]
K_{ACA} катепсин L, НСА	0,80[0,74;0,83]	0,87[0,76;0,95]	0,62[0,31;0,86]	0,89[0,73;1,25]
K_{ACA} катепсин L, СА	0,83[0,72;1,28]	0,95[0,88;1,02]	0,84[0,66;1,14]	0,68[0,47;0,80]
K_{ACA} катепсин Н, НСА	0,63[0,35;0,79]	0,87[0,81;1,19]	0,49[0,37;0,54]	0,31[0,23;0,37]
K_{ACA} катепсин Н, СА	0,60[0,40;0,80]	0,89[0,86;0,94]	0,25[0,18;0,47]	0,12[0,05;0,20]
	Экспериментальная гипергомоцистеинемия			
	Печень	Почка	Легкое	Миокард
K_{ACA} катепсин В, НСА	0,73[0,46;0,98]* $p_1=0,03$	0,95[0,77;1,12]	0,81[0,61;0,98]	0,42[0,30;0,42]
K_{ACA} катепсин В, СА	0,68[0,58;0,91]	0,81[0,63;0,96]	0,49[0,33;1,22]	0,32[0,26;0,39]* $p_1=0,03$
K_{ACA} катепсин L, НСА	1,04[0,56;1,12]	0,90[0,65;1,53]	1,16[0,85;3,99]* $p_1=0,03$	0,82[0,58;1,00]
K_{ACA} катепсин L, СА	0,67[0,54;0,81]	0,9[0,82;1,08]	1,03[0,94;1,16]	0,64[0,32;0,78]
K_{ACA} катепсин Н, НСА	0,49[0,44;0,6]	0,89[0,82;0,95]	0,70[0,60;0,78]* $p_1=0,02$	0,22[0,19;0,27]
K_{ACA} катепсин Н, СА	0,37[0,30;0,61]	0,91[0,83;0,95]	0,39[0,31;0,49]	0,18[0,15;0,21]

	Контроль 5			
	Печень	Почка	Легкое	Миокард
КАСА катепсин В, НСА	1,20[0,82;1,47]	1,42[1,36;1,60]	0,35[0,32;0,37]	0,24[0,22;0,44]
КАСА катепсин В, СА	1,36[1,15;1,75]	1,47[0,74;3,78]	1,18[0,88;1,22]	0,33[0,26;0,44]
КАСА катепсин L, НСА	0,81[0,71;0,83]	1,02[0,94;1,26]	0,58[0,53;0,65]	1,38[1,58;5,32]
КАСА катепсин L, СА	0,75[0,62;0,85]	0,96[0,76;1,06]	0,77[0,69;1,10]	1,91[1,06;1,16]
КАСА катепсин H, НСА	0,67[0,52;0,77]	1,19[1,06;1,33]	0,62[0,55;0,63]	1,17[1,15;1,23]
КАСА катепсин H, СА	0,44[0,35;0,53]	0,80[0,72;0,97]	0,38[0,35;0,41]	1,24[1,10;1,34]
	Экспериментальная гипергомоцистеинемия + L-аргинин			
	Печень	Почка	Легкое	Миокард
КАСА катепсин В, НСА	1,45[1,26;1,61]# p ₂ =0,02	0,84[0,81;1,02]* p ₁ =0,005	1,20[0,98;2,20]* p ₁ =0,02	0,86[0,48;1,31]*# p ₁ =0,02 p ₂ =0,02
КАСА катепсин В, СА	0,69[0,50;0,82]* p ₁ =0,005	1,44[1,08;1,62]	0,90[0,84;1,02]	0,32[0,25;0,35]
КАСА катепсин L, НСА	0,60[0,58;0,67]	0,87[0,86;0,89]* p ₁ =0,02	0,31[0,08;0,59]# p ₂ =0,008	1,27[0,94;1,67]
КАСА катепсин L, СА	0,61[0,55;0,72]	0,8[0,77;1,09]	0,89[0,82;1,08]	1,75[1,43;3,43]
КАСА катепсин H, НСА	0,27[0,25;0,29]*# p ₁ =0,008 p ₂ =0,005	0,99[0,98;1,03]* p ₁ =0,05	0,48[0,33;0,6]# p ₂ =0,05	0,56[0,44;0,75]*# p ₁ =0,02 p ₂ =0,01
КАСА катепсин H, СА	0,25[0,20;0,36]	0,62[0,50;0,81]	0,33[0,33;0,34]	0,89[0,76;0,97]# p ₂ =0,009

Примечание: *, p₁ – изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы; #, p₂ – изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией

В миокарде описанное выше значительное нарастание внелизосомальной активности катепсинов В, L и H, а также лизосомальной активности катепсина H при экспериментальной гипергомоцистеинемии не сопровождалось статистически значимыми изменениями показателей K_{ACA} , демонстрируя отсутствие вклада сдвига соотношения проферментных и активных форм в выявленные изменения и не меняя высказанных ранее предположения об их возможных причинах. При этом обнаруженное снижение активности катепсина В в лизосомальной фракции оказалось сопряжено со статистически значимым повышением показателя K_{ACA} относительно контроля, указывая, что в качестве причины снижения активности здесь выступает не только перераспределение фермента в цитоплазматическую фракцию, но и замедление дозревания с повышением доли проферментных форм.

Введение L-аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии привело к статистически значимому повышению показателя K_{ACA} для катепсина В в неседиментируемой фракции миокарда относительно показателей, полученных как для контрольной группы, так и для изолированной гипергомоцистеинемии. Это позволяет предполагать, что для данного фермента корректирующее действие L-аргинина, проявившееся снижением внелизосомальной активности катепсина, связано с выраженным подавлением дозревания его проферментных форм. Для внелизосомальной активности катепсина L прослеживалась тенденция к повышению показателя K_{ACA} относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией, но отличия оказались статистически не значимыми. Для катепсина H коррекция L-аргинином повышенной на фоне гипергомоцистеинемии активности как лизосомальной, так и в цитоплазматической фракции также оказалась сопряжена с повышением показателя K_{ACA} , т.е. эффект L-аргинина по увеличению доли проферментных форм распространяется и на указанный катепсин.

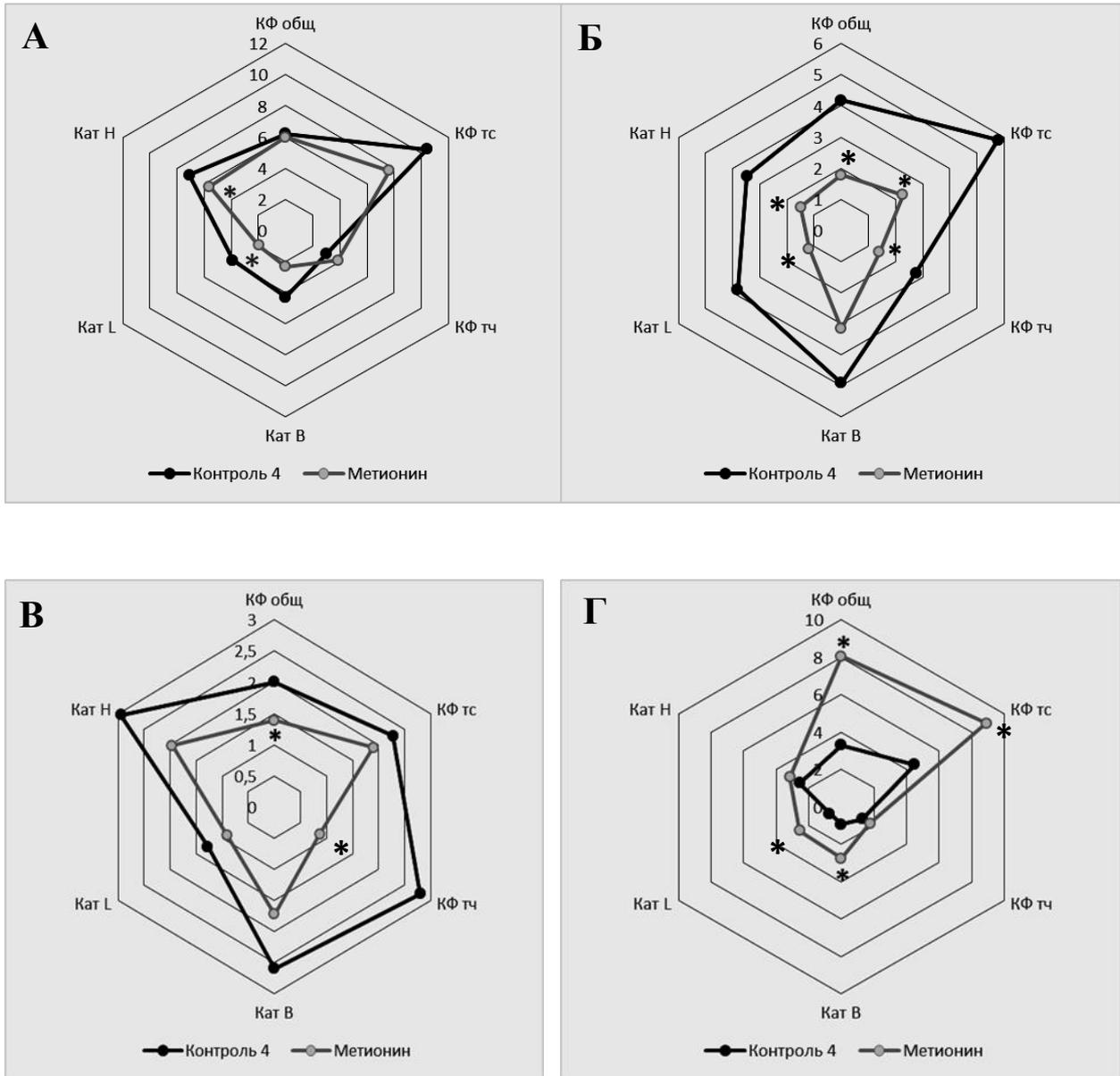
Для проверки высказанных на основе обнаруженных многочисленных изменений активности цистеиновых катепсинов в субклеточных фракциях предположений о перераспределении изучаемых ферментов между вне- и интрализосомальным пространством на фоне экспериментальной

гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина проведен сравнительный анализ показателей доли внелизосомальной активности (Клаб) катепсинов В, L, Н и оценка общей стабильности лизосомальной мембраны по показателям Клаб кислой фосфатазы.

Обнаружено, что при экспериментальной гипергомоцистеинемии происходит изменение соотношения активности лизосомальных ферментов между цитоплазматической и лизосомальной фракцией (Рисунок 81).

При этом для паренхиматозных органов выявленная ранее тенденция к снижению внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии проявилась здесь тенденцией к снижению и доли их внелизосомальной активности (Клаб). Однако сочетанная трактовка изменений Клаб цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы, как маркера общей проницаемости лизосомальной мембраны, позволяет говорить о тканеспецифических отличиях механизмов обнаруженных изменений. Так, в ткани печени снижение доли внелизосомальной активности катепсинов (статистически значимое для катепсинов L и Н) оказалось не сопряжено с изменениями доли внелизосомальной активности кислой фосфатазы, т.е. выявленные ранее изменения внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов в этой ткани следует считать именно подавлением активности без вклада изменения проницаемости лизосомальной мембраны.

В то же время в ткани почки, где экспериментальная гипергомоцистеинемия вызывала наиболее ярко выраженные среди паренхиматозных органов изменения активности цистеиновых катепсинов, сопоставление изменений доли их внелизосомальной активности с изменениями таковой для кислой фосфатазы продемонстрировало универсальное снижение показателей (статистически не значимым оказалось только снижение Клаб для катепсина В). Такое сочетание демонстрирует универсальное снижение проницаемости лизосомальной мембраны, что для данной ткани следует рассматривать как часть механизма обнаруженного выше снижения внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 81. Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы ткани печени (А), почки (Б), легкого (В) и миокарда (Г) при экспериментальной гипергомоцистеинемии

В качестве причины выявленных изменений может выступать мало изученный на данный момент феномен повышения на фоне окислительного стресса «жесткости» лизосомальных мембран, ранее описанный лишь для наружных мембран эритроцитов [15, 139], однако нельзя исключать и возможности проявления столь же недостаточно изученного самостоятельного

цитотоксического действия гомоцистеина на мембраны, например, через реакции с тиольными группами их белков [244].

Последнее предположение в какой-то степени подтверждается изменениями, обнаруженными для ткани легкого: в данной ткани отсутствие на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии изменений содержания продуктов окислительной модификации белков и внелизосомальной активности катепсинов также сочеталось с признаками снижения общей проницаемости лизосомальной мембраны, причем статистически значимые снижения показателя Клаб получены именно для маркерного фермента – кислой фосфатазы.

Изменения в миокарде, для которого нарастание продуктов окислительной модификации белков как проявление окислительного стресса при гипергомоцистеинемии было многократно более выраженным по сравнению с паренхиматозными органами, оказались принципиально иными. Экспериментальная гипергомоцистеинемия оказалась для данной ткани ассоциирована с нарастанием показателей доли внелизосомальной активности изучаемых ферментов, что следует расценивать как признак тотального повышения проницаемости лизосомальных мембран – лабилизации [267]. Таким образом, подтверждается наше предположение о том, что причиной выявленного ранее нарастания внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов действительно является интенсификация их выхода в цитоплазму, причем механизмом здесь является повреждение мембран лизосом, а не адаптивные реакции на повышение содержания окислительно поврежденных белков.

L-аргинин, демонстрируя способность существенно корректировать вызываемые гипергомоцистеинемией изменения активности цистеиновых катепсинов в субклеточных фракциях, оказал влияние и на показатели доли внелизосомальной активности (Рисунок 82).

Так, в ткани печени введение L-аргинина привело к статистически значимому повышению сниженных на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии значений Клаб для катепсинов L и H, кроме того,

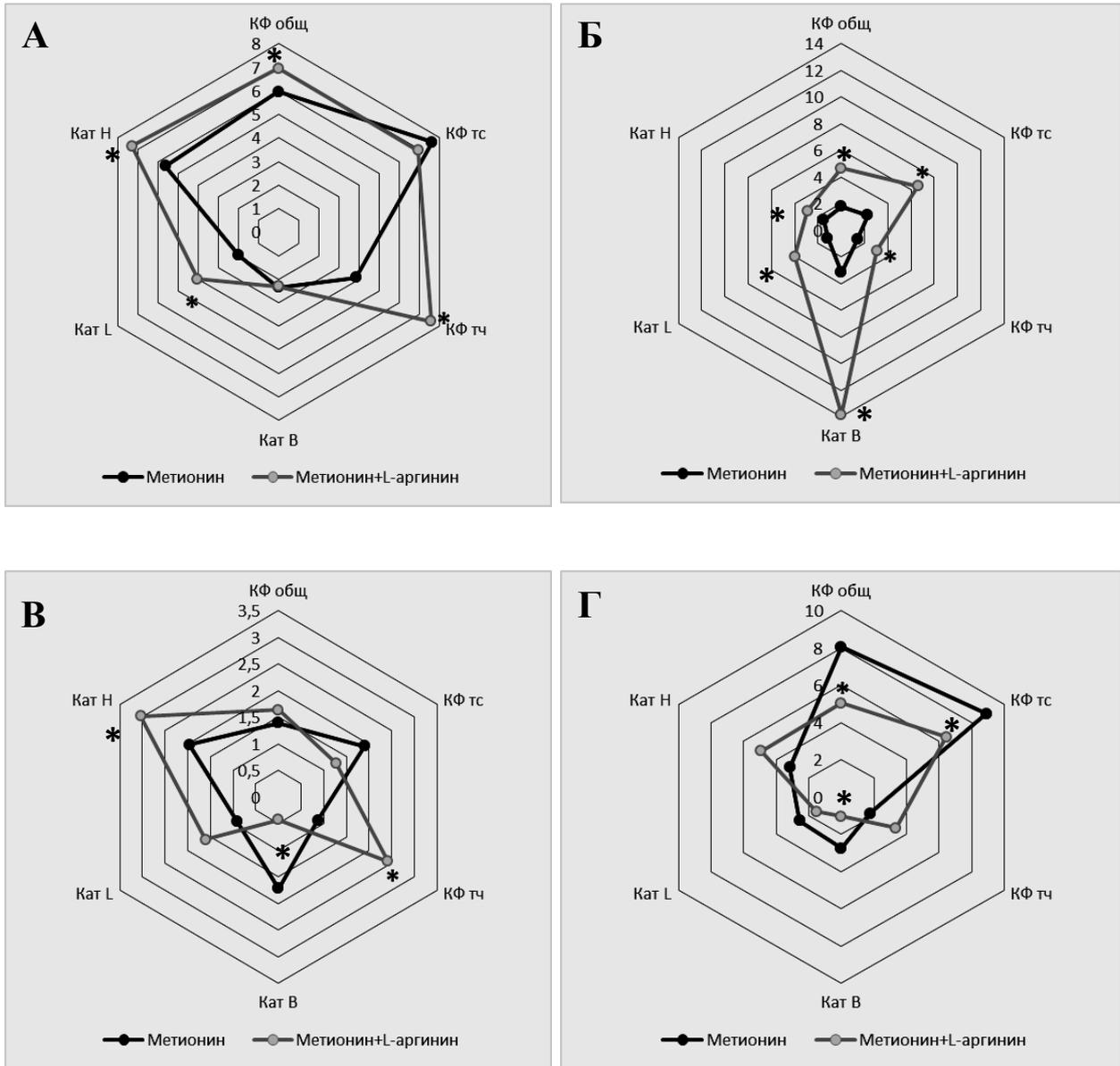
статистически значимо повысились показатели Клаб кислой фосфатазы (суммарная и тартрат-чувствительная фракция).

В ткани почки введение L-аргинина также полностью скорректировало вышеописанное снижение показателей проницаемости лизосомальной мембраны, причем для кислой фосфатазы (суммарная и тартрат-стабильная фракции) и катепсина L показатели даже статистически значимо превысили контрольные значения.

В ткани легкого под действием L-аргинина произошла коррекция ранее сниженных показателей Клаб для тартрат-чувствительной фракции кислой фосфатазы и катепсина H, однако Клаб катепсина B продолжил снижение, статистически значимо отдалившись от показателей, полученных для изолированной гипергомоцистеинемии.

В целом, полученные данные позволяют говорить, что L-аргинин при его применении на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии оказывает на паренхиматозные органы достаточно универсальный эффект, проявляющийся в повышении проницаемости лизосомальных мембран. Возможно, именно формирующееся в результате такого эффекта нарастание доли внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов приводит к вызываемому L-аргинином снижению содержания окислительно модифицированных белков.

Действие L-аргинина на миокард следует признать частично корректирующим: введение субстанции на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии привело к статистически значимому снижению Клаб кислой фосфатазы, что можно трактовать как устранение дестабилизирующего действия изолированной модели на лизосомальные мембраны, однако в отношении цистеиновых катепсинов статистически значимое снижение Клаб получено только для катепсина B.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией ($p < 0,05$)

Рисунок 82. Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы ткани печени (А), почки (Б), легкого (В) и миокарда (Г) при действии L-аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии

3.4.4. Анализ зависимости показателей активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ от выраженности окислительной модификации белков при экспериментальной гипергомоцистеинемии изолированно и в сочетании с введением L-аргинина

С целью проверки предположений о зависимости выявленных изменений активности и компартиментализации цистеиновых катепсинов от степени выраженности процесса окислительной модификации белков в описываемых моделях проведен анализ корреляционных связей между указанными параметрами, дополненный анализом связей с уровнем гипергомоцистеинемии.

Обнаружено, что в ткани печени (Таблица 20) описанные выше статистически значимые изменения активности катепсина Н как в цитоплазматической, так и в лизосомальной фракции, демонстрируют плотные обратные корреляционные связи с общим содержанием окислительно карбонилированных белков и уровнем первичных маркеров окислительного стресса без статистически значимой зависимости от выраженности гипергомоцистеинемии. В то же время выявленные в изучаемых моделях статистически значимые изменения активности катепсинов В и L в неседиментируемой фракции ткани печени не показали линейных корреляционных связей с показателями состояния окислительной модификации белков, но имели статистически значимую обратную зависимость от выраженности гипергомоцистеинемии. Таким образом, несмотря на единую тенденцию к снижению внелизосомальной активности этих ферментов в печени при окислительном стрессе на фоне гипергомоцистеинемии с коррекцией этих изменений L-аргинином, механизмы обнаруженных сдвигов, скорее всего, различаются. Так, если для катепсина Н наиболее вероятным представляется общее угнетение активности, связанное с окислительным повреждением его молекул как внутри, так и вне лизосом, подавление активности катепсинов В и L, затронувшее только внелизосомальную фракцию, может оказаться проявлением цитотоксического действия гомоцистеина.

Выявленные для ткани печени обратные зависимости значений доли внелизосомальной активности (Клаб) катепсинов В, L и тартрат-чувствительной кислой фосфатазы от содержания продуктов окислительного карбонилирования белков мы считаем отражением описанной выше способности L-аргинина на фоне гипергомоцистеинемии повышать эти показатели, фактически, увеличивая проницаемость лизосомальных мембран, одновременно корректируя повышенный на фоне гипергомоцистеинемии уровень окислительно поврежденных белков.

Несмотря на то, что корреляционный анализ не позволяет напрямую судить о причинно-следственных связях, наличие обратных зависимостей доли внелизосомальной активности катепсинов В и L и содержания продуктов окислительной модификации белков в цитоплазматической фракции ткани печени может оказаться подтверждением предположения о механизме корректирующего влияния L-аргинина: повышение под действием субстанции проницаемости лизосомальных мембран приводит к увеличению доли внелизосомальной активности катепсинов и утилизации с их участием окислительно поврежденных белков.

Поскольку для ткани печени не обнаружено статистически значимой линейной зависимости статистически значимо изменявшихся уровней продуктов окислительно карбонилированных белков от выраженности гипергомоцистеинемии (для Собщ/гомоцистеин $R=-0,09$; $p=0,68$; для САДНФГ сумм/гомоцистеин $R=-0,08$; $p=0,73$), обнаруженные дополнительно для Клаб катепсина L и тартрат-чувствительной кислой фосфатазы статистически значимые зависимости и от уровня гипергомоцистеинемии следует скорее считать следствием параллельно развивающейся частичной коррекции L-аргинином концентрации гомоцистеина в крови.

Результаты корреляционного анализа зависимости показателей активности и компарментализации лизосомальных ферментов в ткани печени с характеристиками состояния окислительной модификации белков и уровнем гипергомоцистеинемии.

	Гомоцистеин сыворотки		S общ		АДФГ сумм		КДФГ сумм		РАП	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Кат. В ОА	-0,32	0,15	0,36	0,10	0,36	0,10	0,54	0,008	-0,16	0,48
Кат. В СА	-0,30	0,17	0,36	0,10	0,36	0,10	0,52	0,01	-0,21	0,35
Кат. В НСА	-0,42	0,05	0,22	0,31	0,22	0,31	0,42	0,051	0,12	0,58
Кат. В Клаб	0,04	0,88	-0,55	0,01	-0,56	0,01	-0,41	0,06	0,32	0,15
Кат. L ОА	-0,28	0,21	-0,20	0,37	-0,27	0,23	0,18	0,43	0,37	0,09
Кат. L СА	-0,24	0,29	-0,18	0,43	-0,25	0,27	0,16	0,48	0,38	0,08
Кат. L НСА	-0,71	0,0002	-0,36	0,10	-0,38	0,051	0,37	0,09	-0,07	0,74
Кат. L Клаб	-0,46	0,03	-0,49	0,02	-0,47	0,03	0,07	0,74	-0,18	0,43
Кат. Н ОА	-0,10	0,66	-0,74	0,00008	-0,74	0,00008	-0,10	0,67	0,13	0,55
Кат. Н СА	-0,05	0,82	-0,76	0,00005	-0,76	0,00005	-0,11	0,61	0,13	0,58
Кат. Н НСА	-0,17	0,46	-0,66	0,001	-0,66	0,001	-0,11	0,61	0,09	0,70
Кат. Н Клаб	-0,25	0,26	-0,31	0,16	-0,33	0,14	-0,02	0,92	-0,04	0,86
КФ сумм Клаб	0,13	0,56	-0,29	0,19	-0,25	0,25	-0,23	0,30	-0,27	0,22
КФ тс Клаб	-0,33	0,13	0,25	0,26	0,24	0,29	0,39	0,07	-0,35	0,11
КФ тч Клаб	0,46	0,03	-0,46	0,03	-0,45	0,04	-0,37	0,09	0,02	0,94

В ткани почки изменения активности и компартментализации лизосомальных ферментов, оказавшиеся наиболее яркими среди изучаемых паренхиматозных органов, продемонстрировали множество статистически значимых корреляционных связей как от содержания продуктов окислительной модификации белков, так и от уровня гипергомоцистеинемии (Таблица 21). При этом отсутствие для данной ткани статистически значимых линейных корреляций содержания продуктов окислительного карбонилирования белков и концентрации гомоцистеина сыворотки крови (Собщ/гомоцистеин $R=0,29$; $p=0,19$; САДНФГ сумм/гомоцистеин $R=0,21$; $p=0,34$) дает возможность описывать эти показатели как независимые факторы при трактовке связей со значениями активности и компартментализации лизосомальных ферментов.

Так, обнаруженные нами для ткани почки статистически значимые изменения седиментируемой (лизосомальной) активности катепсинов В, L и Н, как и вызванные ими изменения общей активности этих ферментов, продемонстрировали статистически значимые линейные корреляционные связи с уровнем гипергомоцистеинемии. Характер связей оказался обратным для катепсинов В и L и прямым для катепсина Н, что полностью соответствует направлению сдвигов их активности в изучаемых моделях. Важно, что для седиментируемой и общей активности катепсинов В и Н связь с уровнем гипергомоцистеинемии оказалась единственной статистически значимой, что позволяет предполагать, что эти изменения могут оказаться проявлением цитотоксического действия гомоцистеина. Для седиментируемой и общей активности катепсина L при этом получены также и статистически значимые обратные корреляционные связи с показателями содержания продуктов окислительной модификации белков, указывающие либо на наличие сочетанного влияния гипергомоцистеинемии и окислительного стресса на активность фермента, либо на вовлеченность лизосомальной фракции катепсина L в деградацию окислительно поврежденных белков.

Результаты корреляционного анализа зависимости показателей активности и компарментализации лизосомальных ферментов в ткани почки с характеристиками состояния окислительной модификации белков и уровнем гипергомоцистеинемии.

	Гомоцистеин сыворотки		S общ		АДФГ сумм		КДФГ сумм		РАП	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Кат. В ОА	-0,44	0,04	-0,30	0,17	-0,25	0,26	-0,20	0,37	-0,14	0,52
Кат. В СА	-0,44	0,04	-0,26	0,24	-0,20	0,37	-0,18	0,43	-0,13	0,56
Кат. В НСА	-0,14	0,53	-0,72	0,0002	-0,74	0,00008	-0,59	0,004	0,09	0,70
Кат. В Клаб	0,05	0,84	-0,55	0,008	-0,61	0,002	-0,37	0,09	0,12	0,60
Кат. L ОА	-0,50	0,02	-0,57	0,005	-0,57	0,006	-0,53	0,01	-0,18	0,11
Кат. L СА	-0,50	0,02	-0,57	0,005	-0,57	0,006	-0,53	0,01	-0,19	0,39
Кат. L НСА	-0,32	0,14	-0,58	0,005	-0,65	0,001	-0,39	0,07	0,00	0,99
Кат. L Клаб	-0,28	0,20	-0,48	0,02	-0,56	0,006	-0,27	0,22	0,25	0,27
Кат. Н ОА	0,65	0,001	-0,0006	0,99	-0,11	0,61	0,08	0,71	0,27	0,23
Кат. Н СА	0,68	0,0005	0,04	0,87	-0,07	0,74	0,12	0,58	0,26	0,24
Кат. Н НСА	0,02	0,93	-0,57	0,01	-0,65	0,001	-0,33	0,14	0,06	0,80
Кат. Н Клаб	-0,44	0,04	-0,58	0,005	-0,59	0,004	-0,39	0,07	-0,02	0,92
КФ сумм Клаб	-0,31	0,16	-0,83	0,000002	-0,84	0,000001	-0,61	0,003	-0,19	0,40
КФ тс Клаб	-0,28	0,21	-0,69	0,0004	-0,71	0,0002	-0,46	0,03	-0,17	0,44
КФ тч Клаб	-0,35	0,11	-0,87	0,000001	-0,85	0,000004	-0,68	0,001	-0,16	0,49

В то же время, неседиментируемая (цитоплазматическая) активность всех изучаемых цистеиновых катепсинов статистически значимо линейно коррелировала только с показателями содержания продуктов окислительно карбонилированных белков, причем характер связи оказался обратным, что также соответствует динамике изменений активности ферментов.

Наиболее важным мы считаем здесь обнаружение статистически значимых обратных корреляционных связей показателей доли внелизосомальной активности (Клаб) как цистеиновых катепсинов, так и кислой фосфатазы, полученных только со значениями содержания продуктов окислительной модификации белков, но не с уровнем гипергомоцистеинемии. Несмотря на ограничения корреляционного анализа, такое сочетание, по нашему мнению, позволяет при трактовке возможных причин обнаруженного выше универсального снижения проницаемости мембран лизосом на фоне гипергомоцистеинемии с последующей коррекцией его L-аргинином склониться к версии об окислительном повреждении, но не о цитотоксическом действии гомоцистеина. Кроме того, это может дополнительно подтверждать предположение о том, что причиной изменений внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов, также обратно коррелирующих с уровнем окислительной модификации белков, является возникающее при окислительном стрессе и его коррекции изменение проницаемости лизосомальных мембран.

Для ткани легкого, продемонстрировавшей отсутствие статистически значимых изменений содержания окислительно модифицированных белков, целесообразной представляется лишь трактовка результатов анализа связей с уровнем гипергомоцистеинемии (Таблица 22). Так, была обнаружена однотипная описанной для ткани почки прямая статистически значимая зависимость общей и седиментируемой активности катепсина Н от концентрации гомоцистеина в сыворотке крови, что можно также считать признаком возможного цитотоксического действия гомоцистеина и на ткань легкого. Также очень важной находкой мы считаем здесь выявление статистически значимых обратных связей уровня гипергомоцистеинемии и показателей общей проницаемости

лизосомальной мембраны (Клаб кислой фосфатазы). Это позволяет объяснить выявленные ранее статистически значимые изменения этих показателей, причем для данной ткани, в отличие от ткани почки, при поиске возможных причин нарушения проницаемости лизосомальной мембраны следует склоняться к версии о цитотоксическом действии гомоцистеина.

В миокарде наличие статистически значимых выраженных прямых корреляционных связей всех показателей содержания продуктов окислительного карбонилирования белков с концентрацией гомоцистеина в сыворотке крови отразилось на результатах корреляционного анализа (Таблица 23), исключив возможность отдельной трактовки зависимости показателей активности/компартиментализации лизосомальных ферментов от этих параметров.

Так, оказалось, что статистически значимые изменения активности седиментируемой и общей активности катепсина В статистически значимо обратно коррелируют как с уровнем гомоцистеина сыворотки крови, так и с показателями содержания окислительно карбонилированных белков. Для общей и седиментируемой активности катепсинов L и H статистически значимых линейных зависимостей при этом не выявлено. Статистически значимые изменения внелизосомальной активности катепсинов L и H оказались статистически значимо связанными прямой зависимостью с уровнем гипергомоцистеинемии и выраженностью окислительного повреждения белков; для катепсина В статистически значимых линейных зависимостей не получено. Наиболее значимым здесь, на наш взгляд, является обнаружение корреляционных связей с показателями доли внелизосомальной активности катепсинов и общей проницаемости лизосомальной мембраны, оцениваемой по Клаб кислой фосфатазы.

Результаты корреляционного анализа зависимости показателей активности и компарментализации лизосомальных ферментов в ткани легкого с характеристиками состояния окислительной модификации белков и уровнем гипергомоцистеинемии.

	Гомоцистеин сыворотки		S общ		АДФГ сумм		КДФГ сумм		РАП	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Кат. В ОА	0,34	0,12	0,43	0,04	0,46	0,03	0,35	0,11	-0,10	0,67
Кат. В СА	0,34	0,12	0,43	0,04	0,46	0,03	0,35	0,11	-0,10	0,67
Кат. В НСА	-0,05	0,81	0,15	0,52	0,16	0,48	0,03	0,88	0,03	0,90
Кат. В Клаб	-0,30	0,17	-0,34	0,13	-0,35	0,11	-0,35	0,12	0,11	0,61
Кат. L ОА	0,15	0,52	-0,26	0,25	-0,26	0,24	-0,29	0,20	0,13	0,57
Кат. L СА	0,14	0,52	-0,28	0,21	-0,28	0,20	-0,32	0,15	0,14	0,55
Кат. L НСА	-0,07	0,77	0,43	0,043	0,38	0,08	0,53	0,01	-0,14	0,53
Кат. L Клаб	-0,09	0,68	0,48	0,02	0,44	0,04	0,53	0,01	-0,24	0,28
Кат. Н ОА	0,44	0,041	0,62	0,002	0,63	0,002	0,53	0,01	-0,03	0,88
Кат. Н СА	0,43	0,045	0,60	0,003	0,61	0,003	0,51	0,02	-0,04	0,87
Кат. Н НСА	-0,07	0,75	0,77	0,00003	0,76	0,00005	0,80	0,00001	-0,20	0,38
Кат. Н Клаб	-0,34	0,12	0,52	0,01	0,51	0,02	0,57	0,01	-0,25	0,27
КФ сумм Клаб	-0,52	0,01	-0,02	0,91	-0,06	0,78	0,10	0,66	-0,02	0,92
КФ тс Клаб	-0,52	0,01	-0,20	0,37	-0,24	0,28	-0,08	0,71	0,07	0,75
КФ тч Клаб	-0,24	0,28	0,17	0,44	0,16	0,49	0,21	0,35	0,13	0,57

Результаты корреляционного анализа зависимости показателей активности и компарментализации лизосомальных ферментов в миокарде с характеристиками состояния окислительной модификации белков и уровнем гипергомоцистеинемии.

	Гомоцистеин сыворотки		S общ		АДНФГ сумм		КДНФГ сумм		РАП	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Кат. В ОА	-0,71	0,003	-0,69	0,005	-0,68	0,005	-0,61	0,005	0,06	0,83
Кат. В СА	-0,71	0,003	-0,69	0,005	-0,68	0,006	-0,61	0,02	0,07	0,81
Кат. В НСА	0,40	0,14	0,34	0,21	0,24	0,38	0,40	0,14	-0,005	0,98
Кат. В Клаб	0,74	0,001	0,58	0,02	0,50	0,06	0,61	0,02	-0,13	0,64
Кат. L ОА	-0,25	0,38	-0,23	0,41	-0,30	0,28	-0,25	0,36	0,47	0,08
Кат. L СА	-0,29	0,30	-0,23	0,41	-0,30	0,28	-0,27	0,33	0,44	0,10
Кат. L НСА	0,60	0,02	0,58	0,02	0,48	0,07	0,71	0,003	-0,25	0,37
Кат. L Клаб	0,54	0,04	0,61	0,02	0,57	0,03	0,70	0,003	-0,54	0,04
Кат. Н ОА	0,43	0,11	0,35	0,19	0,26	0,35	0,35	0,20	0,18	0,53
Кат. Н СА	0,43	0,11	0,35	0,19	0,26	0,35	0,35	0,20	0,18	0,53
Кат. Н НСА	0,65	0,008	0,60	0,02	0,50	0,06	0,66	0,008	-0,25	0,36
Кат. Н Клаб	0,43	0,11	0,35	0,20	0,37	0,17	0,46	0,08	-0,67	0,007
КФ сумм Клаб	0,82	0,0002	0,78	0,0007	0,69	0,005	0,89	0,000009	-0,63	0,01
КФ тс Клаб	0,68	0,006	0,64	0,01	0,56	0,03	0,73	0,002	-0,38	0,16
КФ тч Клаб	-0,07	0,81	0,29	0,28	0,27	0,31	0,24	0,38	-0,11	0,69

Обнаруженные ранее признаки лабильности лизосомальной мембраны при выраженном окислительном стрессе на фоне гипергомоцистеинемии проявились здесь наличием статистически значимых прямых линейных зависимостей показателей Клаб от уровня гипергомоцистеинемии и состояния окислительного карбонилирования белков, подчеркивая наличие повреждающего действия гипергомоцистеинемии на лизосомальные мембраны клеток миокарда.

Таким образом, на данном этапе *in vivo*- исследований, продемонстрировано, что:

- Аргинин в дозе 500 мг/кг при 10-дневном введении полностью корректирует развивающееся на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии повышение продуктов окислительного карбонилирования белков в паренхиматозных органах и частично – в миокарде.
- Под действием аргинина происходит нарастание сниженной при изолированной гипергомоцистеинемии активности катепсинов В, L, Н в цитоплазматической фракции печени и почки и снижение повышенной внелизосомальной активности катепсинов в миокарде за счет внутриклеточного перераспределения ферментов.
- Изменения компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ под действием аргинина происходят через вызываемое им неселективное повышение проницаемости лизосомальной мембраны.

Также обнаружены обратные корреляционные связи содержания продуктов окислительной модификации белков с активностью катепсинов в цитоплазматической (неседиментируемой) фракции и долей их неседиментируемой активности, позволяющие предполагать наличие вклада изменения компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ в развивающуюся под действием аргинина компенсацию окислительного стресса на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии.

3.5. Состояние окислительной модификации белков и изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ изолированных лизосом при индукции окислительного стресса *in vitro*

Изложенные выше результаты *in vivo*- и *in vitro*-исследований продемонстрировали наличие зависимости изменений активности лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемости лизосомальной мембраны в ответ на состояния, сопровождающиеся повышением интенсивности окислительной модификации белков как проявлением окислительного стресса. Однако, особенности исследований на клеточном и организменном/тканевом уровне, связанные с наличием дополнительных факторов воздействия (метаболизм агентов, используемых для моделирования, степень доступности их для тканей, клеток и органелл, возможное самостоятельное влияние на лизосомы и их ферменты факторов, формирующих окислительный стресс – оксид азота, гомоцистеин) в ряде случаев не дали возможности получить окончательный ответ о связи изменений активности цистеиновых катепсинов и состояния лизосомальной мембраны с выраженностью окислительной модификации белков.

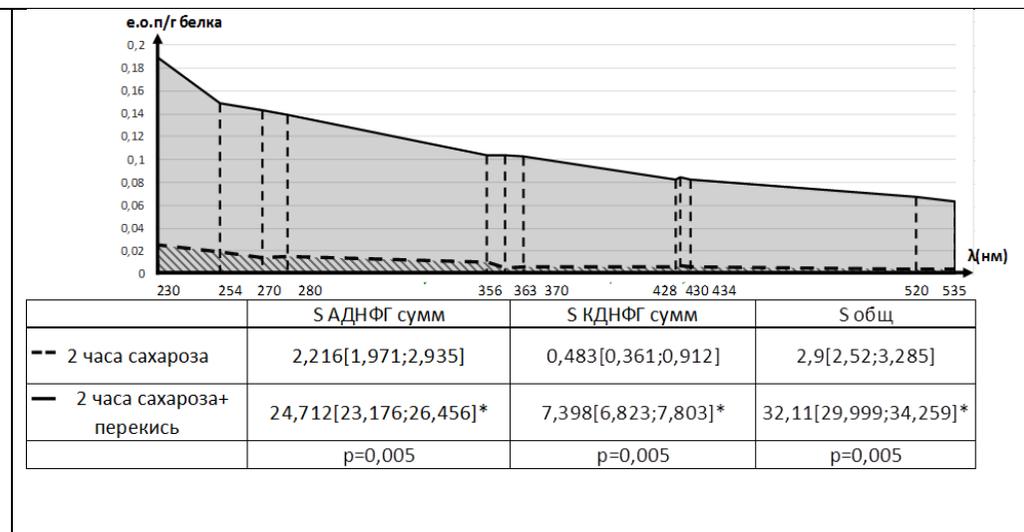
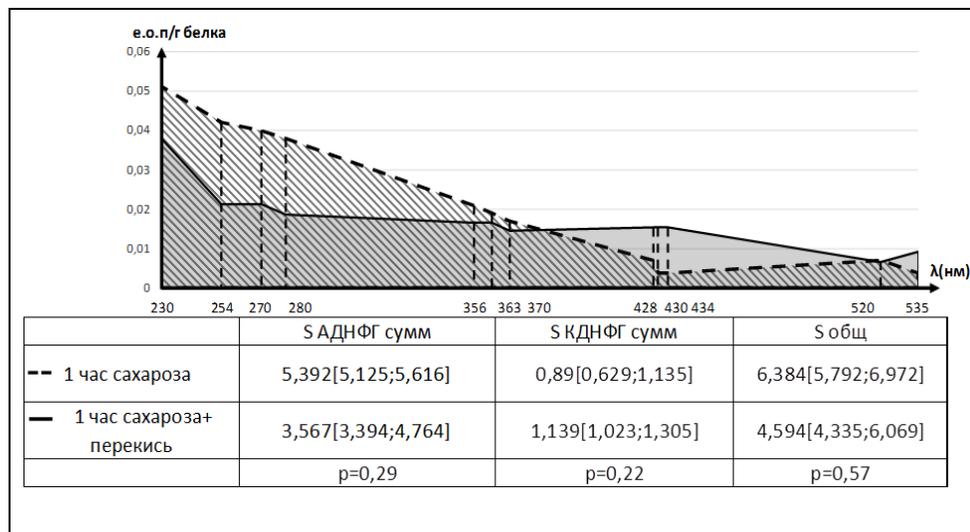
В связи с этим, следующим этапом исследования стала прямая оценка изменений, происходящих в изолированных лизосомах печени крыс при *in vitro*-провокации окислительного стресса инкубацией в среде, содержащей 5 мМ пероксид водорода. Кроме того, поскольку на сегодняшний день отсутствуют сведения о наличии в лизосомах NO-синтаз, *in vitro*-моделирование использовалось нами для проверки выдвинутых ранее предположений о возможной протективной роли L-аргинина в отношении окислительной модификации белков, не связанной с участием в синтезе оксида азота, а также о его самостоятельном влиянии на активность цистеиновых катепсинов и состояние лизосомальной мембраны. Дополнительно, изучение самостоятельного вклада оксида азота в изменения исследуемых параметров, проведено с использованием инкубаций лизосом с широко применяемым спонтанным донором NO – натрия нитропруссидом. Результаты, описываемые в данном разделе получены

совместно с Кудлаевой А.М. и отражены в совместных публикациях [11, 31, 36, 37, 75].

3.5.1. Изменения показателей окислительной модификации белков лизосом печени крыс при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе и применении модуляторов генерации оксида азота

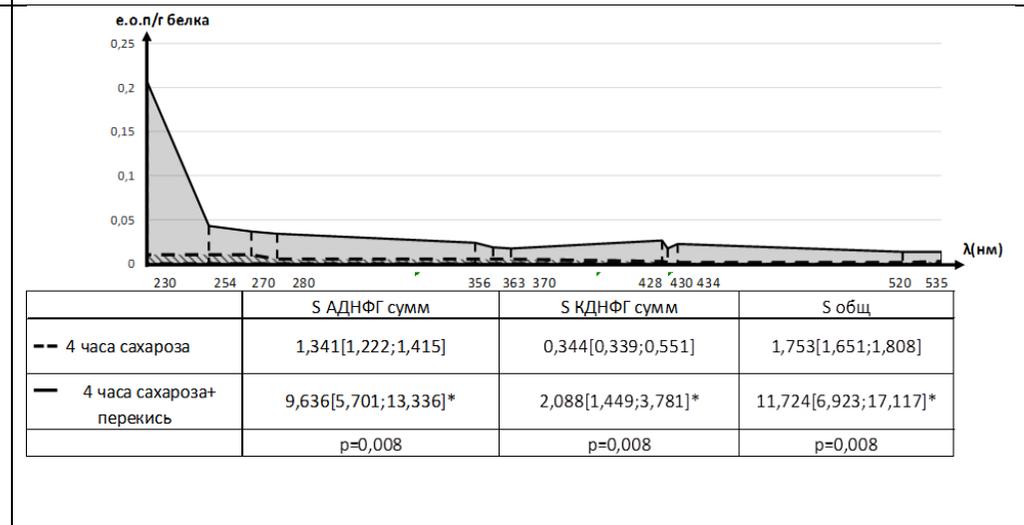
Исследование динамики изменений содержания окислительно модифицированных белков в лизосомах печени крыс при изолированном моделировании окислительного стресса инкубацией с 5 мМ пероксидом водорода продемонстрировало, что статистически значимое повышение содержания продуктов окислительного карбонилирования формируется после 2 часов и сохраняется после 4 часов инкубации, при этом максимально выраженное повышение относительно контрольных наблюдений зафиксировано для 2-часовой инкубации (Рисунок 83). При этом статистически значимым оказалось как повышение общего содержания продуктов окислительной модификации белков (Собщ), так и содержание первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса.

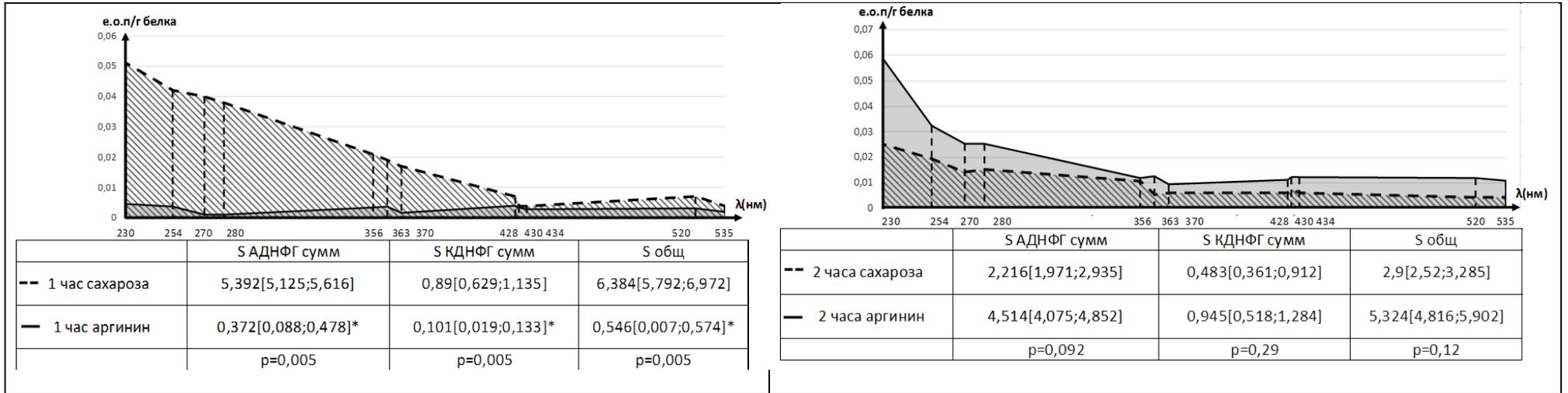
Изолированное *in vitro*-применение L-аргинина привело к выраженному статистически значимому снижению содержания продуктов окислительной модификации белков после 1 часа инкубации, что подтвердило ранее высказанное предположение об антиокислительных эффектах субстанции в отношении белков; однако при удлинении времени инкубации до 2 часов содержание продуктов окислительного карбонилирования протеинов начало расти и после 4 часов инкубации повышение стало статистически значимым относительно контрольных значений (Рисунок 84).



Примечание: * - изменения статистически значимы относительно соответствующих контрольных наблюдений

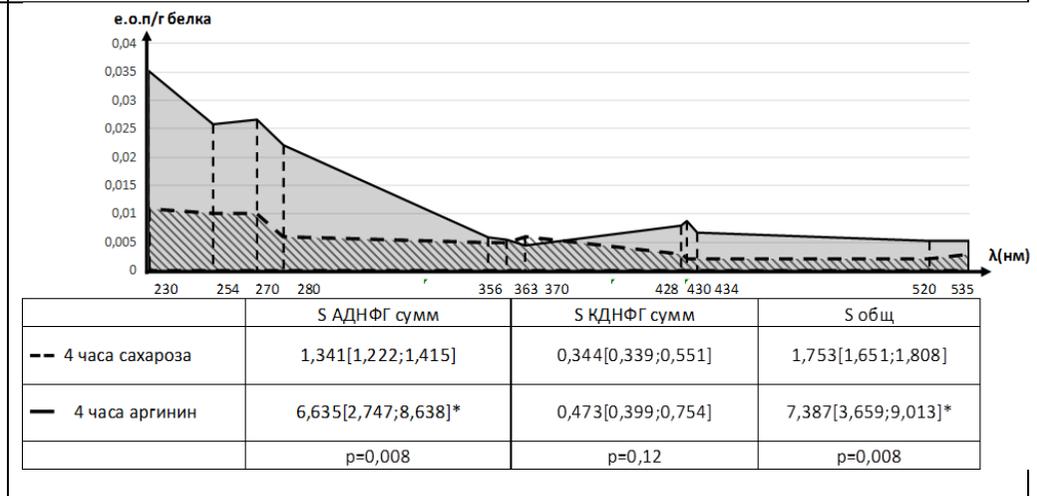
Рисунок 83. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в лизосомах печени крыс в динамике *in vitro*-индуцированного окислительного стресса





Примечание: * - изменения статистически значимы относительно соответствующих контрольных наблюдений

Рисунок 84. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в лизосомах печени крыс в динамике изолированного *in vitro*-воздействия L-аргинина



Таким образом, можно говорить, что протективные эффекты L-аргинина в отношении окислительного повреждения белков проявляющихся в отсутствии факторов, моделирующих окислительный стресс лишь при краткосрочном воздействии субстанции.

При этом *in vitro*-исследование эффектов L-аргинина на фоне индуцированного 5 мМ пероксидом водорода окислительного стресса продемонстрировало несколько иную динамику (Рисунок 85, Таблица 24).

Таблица 24

Значения показателей содержания продуктов окислительного карбонилирования белков при *in vitro*-воздействии L-аргинина изолированно и на фоне окислительного стресса, е.о.п./мг белка (Me[Q₁;Q₃])

Группа		Собщ	АДФФГсумм	КДФФГсумм
1 час	L-аргинин	0,55[0,01;0,58]	0,37[0,09;0,48]	0,10[0,02;0,13]
	L-аргинин+H ₂ O ₂	2,73[1,90;3,59]* p=0,008	1,90[1,60;2,72]* p=0,008	0,83[0,30;0,87]* p=0,008
2 часа	L-аргинин	5,32[4,82;5,98]	4,51[0,08;4,85]	0,95[0,52;1,28]
	L-аргинин+H ₂ O ₂	2,87[1,36;4,17]	2,16[0,99;3,26]	0,72[0,36;0,91]
4 часа	L-аргинин	7,39[3,66;9,01]	6,64[2,75;8,64]	0,47[0,40;0,75]
	L-аргинин+H ₂ O ₂	11,33[11,10;15,58]* p=0,04	8,95[7,87;11,97]	3,48[2,16;3,61]* p=0,04

* - изменения статистически значимы относительно результатов, полученных для изолированного действия L-аргинина

Так, снижение показателей содержания продуктов окислительной модификации белков при действии L-аргинина на фоне окислительного стресса относительно наблюдений с изолированным *in vitro*-воздействием пероксида водорода начало формироваться уже после 1 часа инкубации, однако все показатели оказались статистически значимо выше значений, полученных при изолированном действии L-аргинина. Таким образом, антиокислительные

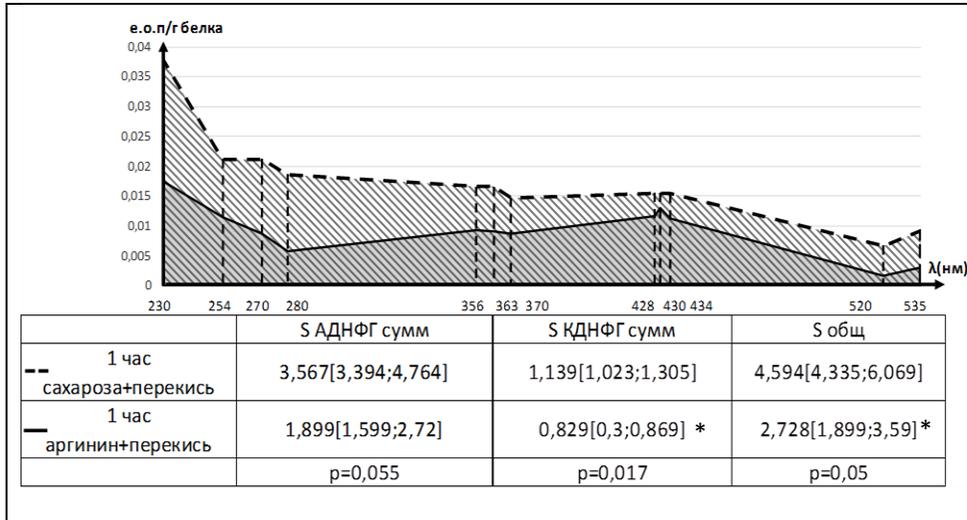
эффекты L-аргинина начали проявляться, однако степень изменений оказалась не столь выраженной, как при его изолированном воздействии.

Однако максимально антиокислительные эффекты L-аргинина проявились при 2-часовой инкубации, при которой изолированное влияние пероксида водорода вызвало наиболее выраженное нарастание продуктов окислительного карбонилирования белков.

В этом случае добавление L-аргинина в инкубационную среду практически полностью устранило окислительные эффекты пероксида водорода, приблизив значения показателей содержания ОМБ к значениям, полученным для изолированного применения субстанции.

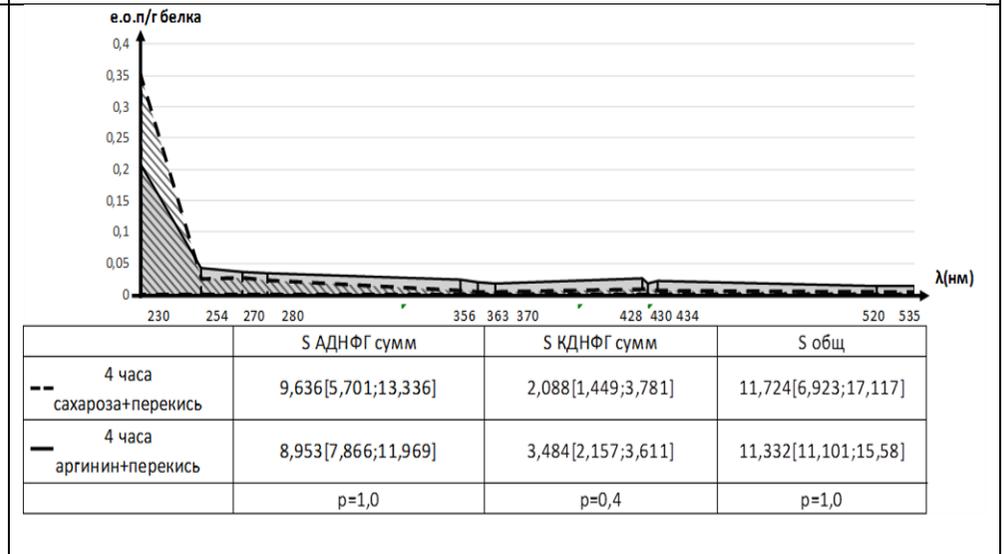
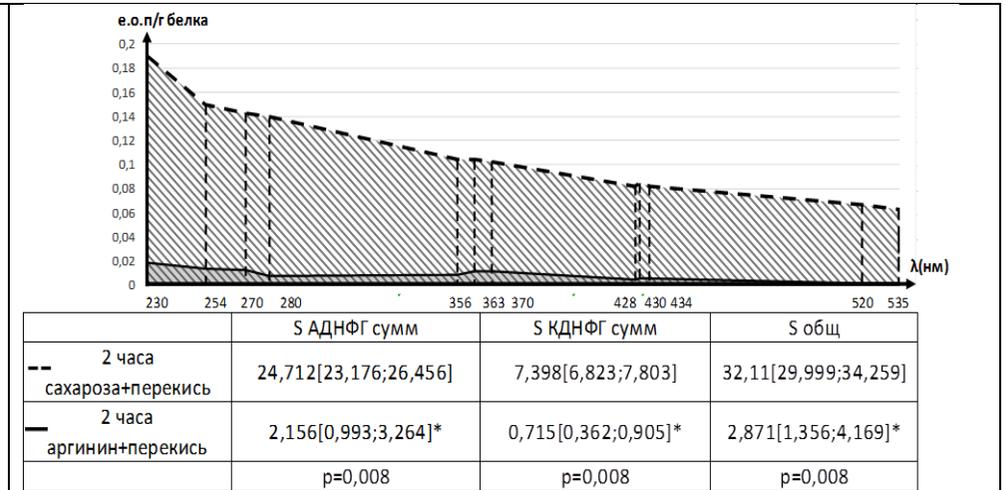
Поскольку при 4-часовом изолированном воздействии L-аргинин проявлял уже проксидантное действие, его сочетание в инкубационной среде с пероксидом водорода при данной продолжительности сформировало значения показателей уровня ОМБ, близкие к диапазону таковых, полученных для изолированного влияния пероксида водорода, при этом значения S общ и содержание вторичных маркеров окислительного стресса (КДНФГ) оказались статистически значимо выше полученных при изолированном действии L-аргинина.

Анализ соотношения первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса продемонстрировал, что даже значительные изменения количественных показателей уровня окислительно модифицированных протеинов в описываемых моделях происходят, по-видимому, с равномерным повышением продуктов окислительного карбонилирования, не проявляясь статистически значимыми изменениями долей альдегидных и кетонных форм.



Примечание: * - изменения статистически значимы относительно соответствующих контрольных наблюдений

Рисунок 85. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в лизосомах печени крыс в динамике воздействия L-аргинина на фоне *in vitro*-индуцированного окислительного стресса

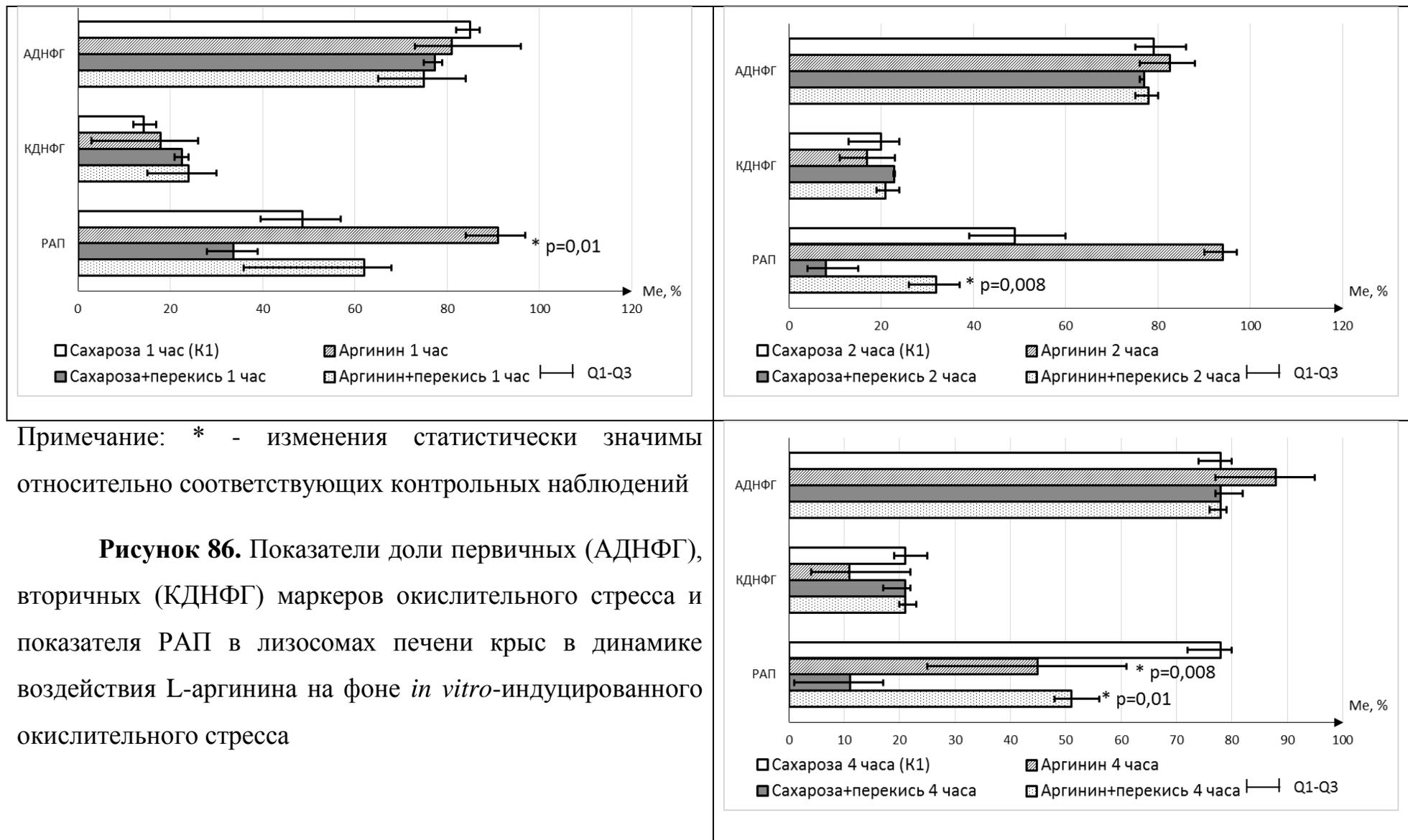


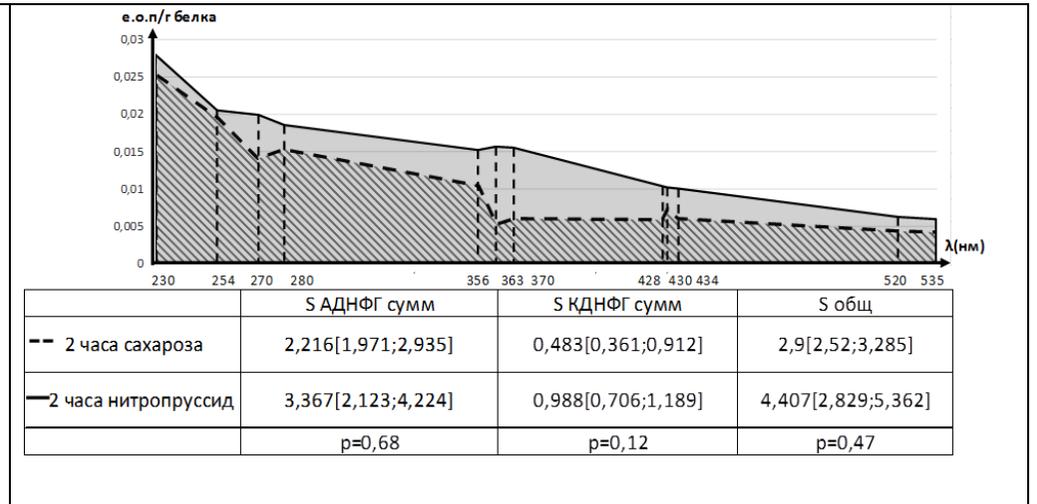
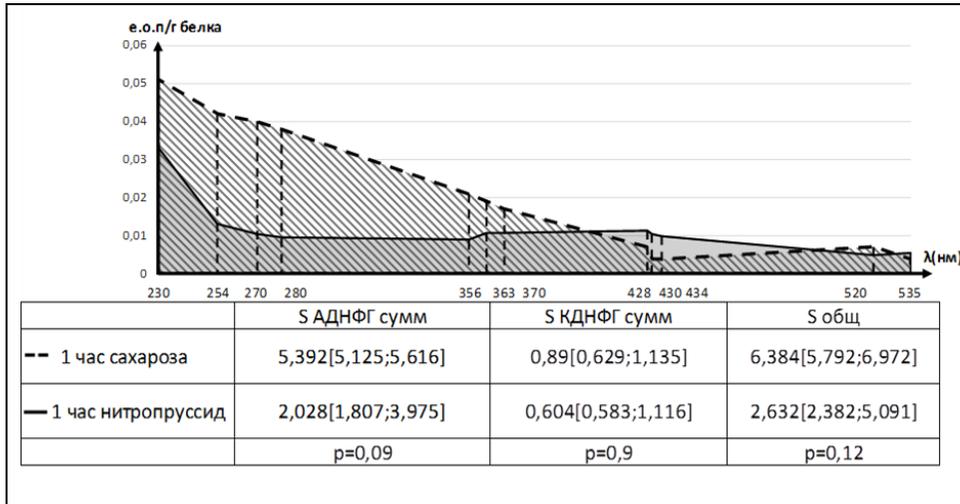
Отдельно следует отметить лишь формирующиеся под действием L-аргинина изменения показателя РАП: антиокислительные эффекты субстанции при изолированном 1-часовом воздействии и 2-часовом действии на фоне окислительного стресса проявились здесь статистически значимыми повышениями РАП, прооксидантный 4-часовой эффект изолированного действия – ожидаемым снижением показателя. Однако применение L-аргинина на фоне *in vitro*- индуцированного окислительного стресса, практически не корректируя количественные показатели уровня спонтанно образованных продуктов окислительной модификации белков, привело, тем не менее, к статистически значимому нарастанию значения РАП, демонстрируя наличие резерва не окисленных белков, что можно расценивать как положительный эффект субстанции (Рисунок 86).

Исследование показателей содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в динамике *in vitro*- воздействия нитропруссид натрия на изолированные лизосомы печени крыс продемонстрировало отсутствие статистически значимых их изменений при 1 и 2 часовой инкубации в сочетании со статистически значимым нарастанием относительно контрольных наблюдений при 4 часовом воздействии (Рисунок 87).

Однако следует отметить, что при 1 часовой инкубации наблюдалась тенденция к снижению показателей относительно контроля, которая подтвердилась обнаружением статистически значимым снижением доли первичных (АДФГ) маркеров окислительного стресса (Рисунок 88).

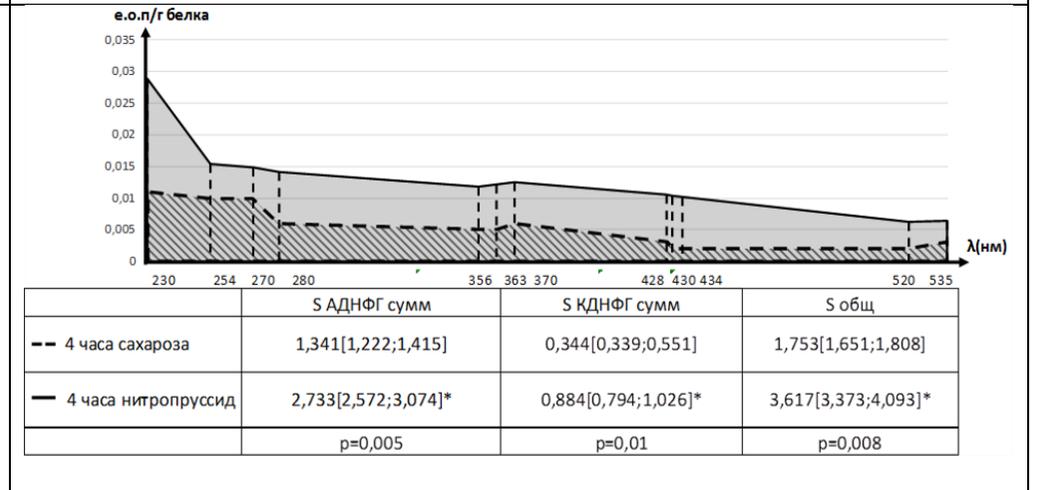
При этом явное проокислительное действие нитропруссид натрия на белки лизосом при 4 часовом *in vitro*- воздействии проявилось также статистически значимым снижением показателя РАП относительно контрольных значений (Рисунок 88).

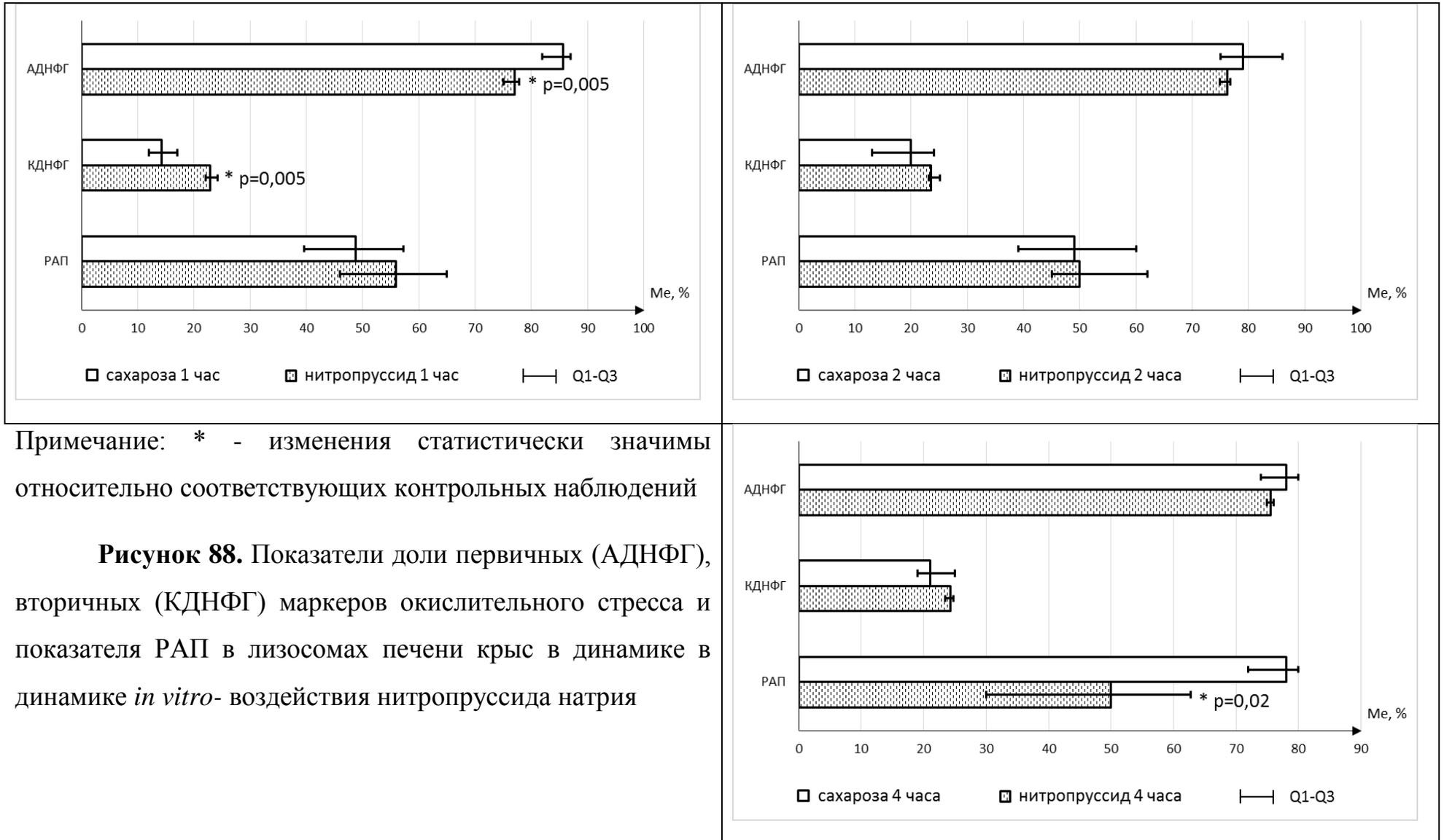




Примечание: * - изменения статистически значимы относительно соответствующих контрольных наблюдений

Рисунок 87. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в лизосомах печени крыс в динамике *in vitro*- воздействия нитропруссид натрия





Таким образом, 5 мМ пероксид водорода при *in vitro*- воздействии на лизосомы печени крыс индуцирует окислительную модификацию их белков, наиболее выраженную при 2 часовой инкубации и, в меньшей степени, при 4 часовом воздействии. L-аргинин демонстрирует протективные эффекты в отношении окислительной модификации белков, проявляющиеся при 1 часовом изолированном действии, а также способность практически полностью корректировать вызываемое пероксидом водорода выраженное нарастание продуктов окислительного карбонилирования белков при 2 часовой инкубации; при этом удлинение воздействия субстанции до 4 часов влечет за собой прооксидантные эффекты, сохраняющиеся и при сочетании с пероксидом водорода. Нитропруссид натрия, формируя при 1 часовом воздействии тенденцию к снижению содержания продуктов окислительной модификации белков, выражающуюся в статистически значимом снижении первичных маркеров окислительного стресса, при 4 часовом воздействии оказывает на белки прооксидантный эффект.

3.5.2. Влияние *in vitro*- индуцированного окислительного стресса и модуляторов генерации оксида азота на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемость лизосомальной мембраны

Обнаруженные выше изменения уровня окислительной модификации белков изолированных лизосом печени крыс при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе, действии L-аргинина и нитропруссиде натрия сочетались с изменениями активности лизосомальных цистеиновых протеиназ и ее компартментализации.

Поскольку особенностью данных моделей является отсутствие цитоплазматической фракции, внелизосомальная (неседиментируемая) активность изучаемых ферментов здесь формируется только за счет выхода их молекул сквозь мембраны лизосом в среду инкубации, что позволяет наиболее полно оценить процесс проницаемости лизосомальной мембраны. Единственным дополнительным фактором остается прямое воздействие изучаемых субстанций

на молекулы катепсинов, что предоставляет возможность проверить ряд ранее высказанных для *in vivo*- экспериментов предположений о наличии такого рода самостоятельных влияний.

Оказалось, что при инкубации лизосом в течение 1 часа (Таблица 25) 5 мМ H_2O_2 , не вызвав статистически значимых изменений содержания окислительно модифицированных белков, к статистически значимым изменениям активности и распределения цистеиновых катепсинов также не приводила. При этом изолированное действие L-аргинина, вызывавшее при указанной продолжительности инкубации снижение содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в лизосомах, привело к статистически значимому нарастанию седиментируемой и общей активности катепсина L с одновременным снижением неседиментируемой активности фермента. Таким образом, в отсутствие окислителей самостоятельный эффект L-аргинина при его протективном действии на белки проявился снижением выхода катепсина L во внелизосомальную фракцию и активацией фермента внутри лизосом. Однако присутствие в среде инкубации пероксида водорода полностью нивелировало вызываемые L-аргинином изменения общей активности и уменьшило изменения седиментируемой активности, без влияния на снижение неседиментируемой активности катепсина L. Изолированное влияние L-аргинина на активность катепсина H при этом проявилось подавлением как общей, так и седиментируемой и неседиментируемой активности фермента, при добавлении в среду инкубации пероксида водорода все изменения, вызванные L-аргинином, сохранились.

Изменения активности и распределения катепсинов В, L, Н лизосом печени крыс при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе и действии L-аргинина при 1 часовой инкубации, нкат/г белка (Me[*min*;max])

		Сахароза	Сахароза+ H ₂ O ₂	L-аргинин	L-аргинин+ H ₂ O ₂
Катепсин В	ОА	0,28[0,21;0,47]	0,64[0,10;0,97]	0,59[0,38;0,74]	1,14[0,42;1,58]
	СА	0,18[0,00;0,21]	0,35[0,02;0,80]	0,42[0,10;0,44]	0,90[0,19;1,10]
	НСА	0,26[0,00;0,28]	0,18[0,03;0,32]	0,25[0,17;0,34]	0,24[0,22;0,27]
Катепсин L	ОА	2,82[2,13;3,67]	2,77[2,58;3,26]	4,81[4,61;5,80]*	2,91[2,59;2,92]•
	СА	1,35[1,30;2,93]	2,09[1,32;2,28]	4,62[4,40;5,76]*	2,55[2,45;2,80]▲•
	НСА	0,83[0,71;1,44]	0,97[0,60;1,34]	0,21[0,19;0,51]*	0,16[0,14;0,37]*▲
Катепсин Н	ОА	2,26[1,89;2,33]	1,96[1,80;2,13]	1,29[1,13;1,39]*	1,13[1,04;1,34]*▲
	СА	1,31[1,19;1,82]	1,25[1,14;1,33]	0,78[0,64;1,01]*	0,69[0,59;1,01]*▲
	НСА	0,68[0,52;0,72]	0,78[0,67;0,90]	0,42[0,33;0,53]*	0,37[0,35;0,40]*▲

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно инкубации в сахарозе (контрольные наблюдения); ▲ - изменения статистически значимы относительно инкубации с 5 мМ H₂O₂; • - изменения статистически значимы относительно изолированного действия L-аргинина ($p \leq 0,05$)

При 2 часовой инкубации (Таблица 26), приведшей к максимальному нарастанию продуктов окислительной модификации белков под действием 5 мМ пероксида водорода, ответом лизосомального протеолиза оказалось выраженное, статистически значимое нарастание активности катепсинов В и L, затронувшее как седиментируемую, так и неседиментируемую фракцию.

Изменения активности и распределения катепсинов В, L, Н лизосом печени крыс при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе и действии L-аргинина при 2 часовой инкубации, нкат/г белка (Me[*min*;max])

		Сахароза	Сахароза+ H ₂ O ₂	L-аргинин	L-аргинин+ H ₂ O ₂
Катепсин В	ОА	0,44[0,26;0,91]	1,45[0,94;1,68]*	1,67[0,40;2,32]	1,26[0,71;2,30]
	СА	0,15[0,01;0,28]	0,58[0,45;0,79]*	1,62[0,25;2,32]	1,07[0,52;1,85]*
	НСА	0,12[0,00;0,50]	0,76[0,32;0,84]*	0,06[0,00;0,13]	0,18[0,17;0,19] ^{▲•}
Катепсин L	ОА	0,74[0,40;0,96]	2,84[2,13;4,04]*	1,95[1,86;2,29]*	2,13[1,45;2,81]*
	СА	0,15[0,07;0,73]	1,71[1,15;1,94]*	1,86[1,31;2,15]*	1,84[1,45;2,23]*
	НСА	0,09[0,08;0,50]	1,57[0,76;2,01]*	0,15[0,13;0,53]	0,10[0,04;0,29] [▲]
Катепсин Н	ОА	2,46[2,33;2,54]	1,42[1,11;1,70]*	0,59[0,48;0,73]*	2,53[1,81;2,54] [•]
	СА	0,95[0,92;0,99]	0,91[0,78;1,15]	0,18[0,00;0,35]*	1,91[1,51;2,27] ^{▲•}
	НСА	1,53[1,34;1,65]	0,56[0,36;0,79]*	0,37[0,29;0,46]*	0,35[0,30;0,35]*

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно инкубации в сахарозе (контрольные наблюдения); [▲] - изменения статистически значимы относительно инкубации с 5 мМ H₂O₂; [•] - изменения статистически значимы относительно изолированного действия L-аргинина (p≤0,05)

Однако на этом фоне общая активность катепсина Н продемонстрировала статистически значимое снижение относительно контроля, причем изменения затронули только неседиментируемую фракцию, что может оказаться следствием прямого окислительного повреждения молекул фермента, вышедших из лизосом в среду инкубации.

Изолированное действие L-аргинина в течение 2 часов сформировало изменения активности цистеиновых катепсинов, практически полностью повторяющие таковые, зарегистрированные для 1 часового воздействия:

статистически значимое повышение общей и седиментируемой активности катепсина L в сочетании с общим подавлением активности катепсина H.

Важно отметить, что для общей и седиментируемой активности катепсина L эффекты пероксида водорода и L-аргинина при их отдельном применении для 2 часовой инкубации оказались однотипными, но сочетание факторов к суммированию эффектов не привело: значения активности оказались сопоставимыми с таковыми, полученными при изолированном применении агентов. Однако для неседиментируемой активности катепсина L, сочетание в среде инкубации пероксида водорода с L-аргином сформировало результаты, близкие к таковым для изолированного действия L-аргинина, практически, воспрепятствовав обнаруженному при действии 5 мМ H_2O_2 повышенному выходу молекул фермента из лизосом в среду инкубации. Наиболее интересными оказались изменения седиментируемой активности катепсина H: если самостоятельным эффектом L-аргинина в отсутствие окислителей оказалось тотальное снижение активности фермента, то применение субстанции на фоне *in vitro*- индуцированного окислительного стресса вызвало выраженное нарастание интрализосомальной активности катепсина, причем значения статистически значимо превысили таковые, полученные как для контрольных наблюдений, так и для отдельного применения агентов. Возможно, этот эффект и является частью механизма описанной выше коррекции L-аргином содержания окислительно модифицированных белков в лизосомах при 2 часовом *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе.

Инкубация продолжительностью 4 часа (Таблица 27), характеризовавшаяся умеренным повышением содержания продуктов окислительного карбонилирования белков при действии 5 мМ H_2O_2 , продемонстрировала столь же умеренные, но совпадающие по направленности с обнаруженными при 2 часовой инкубации изменения активности ферментов: для катепсинов B и L сохранилось повышение общей и седиментируемой активности, для катепсина L – также и повышение неседиментируемой активности. Снижение активности катепсина H при данной продолжительности инкубации

распространилось на седиментируемую фракцию, снижение активности фермента в неседиментируемой фракции оказалось статистически не значимым относительно контрольных наблюдений.

Таблица 27

Изменения активности и распределения катепсинов В, L, Н лизосом печени крыс при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе и действии L-аргинина при 4 часовой инкубации, нкат/г белка (Me[*min*;max])

		Сахароза	Сахароза+ H ₂ O ₂	L-аргинин	L-аргинин+ H ₂ O ₂
Катепсин В	ОА	0,70[0,57;0,90]	0,98[0,93;1,31]*	0,78[0,15;1,18]	0,67[0,35;1,06]
	СА	0,52[0,47;0,80]	0,93[0,90;0,93]*	0,65[0,00;0,90]	0,43[0,09;0,79] [▲]
	НСА	0,05[0,04;0,20]	0,06[0,06;0,07]	0,15[0,13;0,28]	0,26[0,22;0,30]* [▲]
Катепсин L	ОА	2,61[2,33;2,68]	3,97[3,68;4,12]*	2,19[1,10;2,81]	1,83[0,54;2,70] [▲]
	СА	2,20[1,83;2,58]	2,78[2,76;3,30]*	1,97[1,04;2,76]	1,24[0,13;2,33] [▲]
	НСА	0,41[0,29;0,54]	0,82[0,68;0,91]*	0,00[0,00;0,14]*	0,19[0,18;0,37] ^{▲•}
Катепсин Н	ОА	1,74[1,52;1,91]	1,19[0,94;1,27]*	0,93[0,78;1,21]*	0,36[0,30;0,70]* ^{▲•}
	СА	1,01[0,76;1,13]	0,51[0,50;0,58]*	0,52[0,47;0,78]*	0,00[0,00;0,43]* ^{▲•}
	НСА	0,83[0,71;0,88]	0,56[0,48;0,69]	0,41[0,33;0,43]*	0,32[0,25;0,37]* [▲]

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно инкубации в сахарозе (контрольные наблюдения); [▲] - изменения статистически значимы относительно инкубации с 5 мМ H₂O₂; [•] - изменения статистически значимы относительно изолированного действия L-аргинина (p≤0,05)

L-аргинин, изолированное действие которого на белки лизосом при данной продолжительности инкубации сменилось прооксидантным, сформировал здесь статистически значимое снижение внелизосомальной активности катепсина L, не продемонстрировав наблюдавшегося ранее влияния на его активность в

лизосомальной фракции; однако подавляющее действие на лизосомальную и внелизосомальную активность катепсина Н сохранилось.

При этом действие L-аргинина на фоне пероксида водорода привело к статистически значимому относительно изолированного применения 5 мМ H_2O_2 нарастанию неседиментируемой активности катепсина В и скорректировало вызванное инкубацией с 5 мМ H_2O_2 повышение его седиментируемой активности. Для катепсина L применение L-аргинина также полностью скорректировало вызываемое инкубацией с пероксидом водорода повышение общей и седиментируемой активности, для неседиментируемой активности значения оказались ниже таковых, зарегистрированных после 4 часовой инкубацией с 5 мМ H_2O_2 , но превышали показатели, полученные для изолированного действия L-аргинина.

В отношении катепсина Н мы наблюдали суммирование эффектов: сочетание в среде инкубации L-аргинина и пероксида водорода, вызывавших при данной продолжительности воздействия однонаправленные подавляющие эффекты на активность фермента, привело к выраженному, статистически значимому и относительно контроля, и относительно отдельного применения агентов снижению активности.

In vitro- воздействие нитропруссид натрия (Таблица 28) в течение 1 часа, не вызывая статистически значимых изменений содержания окислительно модифицированных белков, сформировало изменения активности цистеиновых катепсинов: статистически значимо снизилась внелизосомальная активность катепсина L, а также общая, седиментируемая и неседиментируемая активность катепсина Н. При увеличении продолжительности инкубации до 2 часов происходило выраженное, статистически значимое нарастание общей и седиментируемой активности катепсина L, снижение активности катепсина Н сохранялось. Инкубация лизосом в присутствии нитропруссид натрия в течение 4 часов, вызывавшая статистически значимое нарастание содержания продуктов окислительного карбонилирования белков, привела к снижению общей и седиментируемой активности катепсина L, а также седиментируемой активности

катепсина В. Наиболее вероятной причиной таких изменений здесь представляется окислительное повреждение молекул фермента. Угнетение активности катепсина Н, сохранившееся и при данной продолжительности инкубации, скорее всего, является следствием прямого угнетающего влияния нитропрусида натрия или его дериватов.

Исследование состояния проницаемости лизосомальных мембран при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе с оценкой влияния L-аргинина проводилось сравнительным анализом показателей доли внелизосомальной активности изучаемых катепсинов и маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы. Оказалось (Таблица 29), что при продолжительности инкубации 1 час 5 мМ пероксид водорода не оказывает влияния на проницаемость лизосомальной мембраны для цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы.

Изменения активности и распределения катепсинов В, L, Н лизосом печени крыс в динамике *in vitro*-воздействия
нитропруссидом натрия, нкат/г белка (Ме[Q₁; Q₃])

		1 час		2 часа		4 часа	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Кат. В	ОА	0,28[0,21;0,47]	0,56[0,50;0,60]	0,44[0,26;0,91]	0,40[0,37;0,48]	0,70[0,57;0,90]	0,54[0,34;0,67]
	СА	0,18[0,00;0,21]	0,37[0,30;0,41]	0,15[0,01;0,28]	0,33[0,30;0,35]	0,52[0,47;0,80]	0,36[0,30;0,39]*
	НСА	0,26[0,00;0,28]	0,21[0,18;0,30]	0,12[0,00;0,50]	0,09[0,06;0,15]	0,05[0,04;0,20]	0,22[0,17;0,28]
Кат. L	ОА	2,82[2,13;3,67]	3,23[2,92;3,38]	0,74[0,40;0,96]	3,89[3,22;4,28]*	2,61[2,33;2,68]	1,63[1,36;1,66]*
	СА	1,35[1,30;2,93]	2,75[2,32;2,89]	0,15[0,07;0,73]	3,44[2,95;3,63]*	2,20[1,83;2,58]	1,23[1,08;1,49]*
	НСА	0,83[0,71;1,44]	0,41[0,24;0,61]*	0,09[0,08;0,50]	0,37[0,29;0,52]	0,41[0,29;0,54]	0,20[0,13;0,36]
Кат. Н	ОА	2,26[1,89;2,33]	0,82[0,66;0,85]*	2,46[2,33;2,54]	0,91[0,77;1,10]*	1,74[1,52;1,91]	1,10[1,06;1,14]*
	СА	1,31[1,19;1,82]	0,66[0,49;0,69]*	0,95[0,92;0,99]	0,78[0,64;0,82]*	1,01[0,76;1,13]	0,96[0,92;0,97]*
	НСА	0,68[0,52;0,72]	0,16[0,14;0,17]*	1,53[1,34;1,65]	0,24[0,09;0,30]*	0,83[0,71;0,88]	0,18[0,13;0,20]*

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно контрольных наблюдений ($p \leq 0,05$)

Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы при *in vitro*- индуцированном окислительном стрессе, %
(Me [Q₁; Q₃])

Группа	1 час			
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н	К. фосфатаза
Сахароза	39,1[9,3;85,2]	36,2[33,1;40,7]	37,4[26,0;37,5]	25,3[18,1;27,3]
Сахароза+ H ₂ O ₂	28,3[23,5;43,3]	31,5[19,1;50,1]	36,6[34,1;40,9]	19,7[18,7;23,9]
L-аргинин	38,1[27,9;86,2]	4,6[3,9;10,1]*	35,0[27,2;42,5]	38,0[35,3;43,3]*
L-аргинин+H ₂ O ₂	30,6[17,9;84,5]	6,6[5,5;8,5]* [▲]	34,7[25,2;41,3]	36,9[34,2;40,6]* [▲]
Нитропруссид Na	39,0[34,3;41,9]	12,7[7,0;18,0]*	20,4[17,1;25,5]	16,6[14,1;19,5]
	2 часа			
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н	К. фосфатаза
Сахароза	64,1[13,7;78,8]	42,9[14,7;82,2]	59,1[55,2;62,6]	27,1[26,4;28,8]
Сахароза+ H ₂ O ₂	45,4[35,9;62,3]	48,1[37,1;54,7]	33,7[29,1;39,2]*	17,4[15,5;20,9]*
L-аргинин	3,1[0,2;78,8]	14,1[6,3;34,2]	76,4[50,2;100,0]	20,1[14,0;25,4]*
L-аргинин+H ₂ O ₂	19,5[15,3;26,1] [▲]	8,8[1,0;13,7] [▲]	16,8[10,1;24,6]* [▲]	15,5[13,0;26,8]*
Нитропруссид Na	20,9[2,8;32,3]	11,0[8,3;13,9]	21,7[10,9;30,0]*	11,5[11,2;18,3]*
	4 часа			
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н	К. фосфатаза
Сахароза	10,8[6,7;13,3]	16,9[11,6;20,6]	50,6[38,3;54,4]	27,6[24,1;30,2]
Сахароза+ H ₂ O ₂	4,8[4,6;12,8]	24,6[19,9;29,8]*	54,6[46,0;58,0]	23,5[23,2;25,4]
L-аргинин	23,6[21,3;100,0]*	0,0[0,0;5,5]*	39,6[35,6;43,9]	20,9[19,7;21,8]*
L-аргинин+H ₂ O ₂	34,2[22,8;85,5]* [▲]	40,2[9,9;91,4]	100,0[53,2;100,0]	39,4[33,8;40,5] * [▲] •
Нитропруссид Na	38,3[32,7;62,4]	16,5[8,7;23,2]	16,1[11,8;17,3]*	10,6[10,4;10,9]*

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно инкубации в сахарозе (контрольные наблюдения); [▲] - изменения статистически значимы относительно инкубации с 5 мМ H₂O₂; • - изменения статистически значимы относительно изолированного действия L-аргинина (p≤0,05)

При этом L-аргинин при изолированном воздействии уже после 1 часа инкубации демонстрирует способность уменьшать долю внелизосомальной активности катепсина L, что в данной модели следует трактовать именно как подтверждение высказанного ранее предположения об уменьшении проницаемости лизосомальной мембраны для конкретного фермента; одновременно общая проницаемость лизосомальной мембраны, оцениваемая по Клаб маркерного фермента – кислой фосфатазы – увеличивается. Оба описанных эффекта L-аргинина сохраняются при сочетании его в инкубационной среде с пероксидом водорода. Действие нитропруссиды натрия при данной продолжительности инкубации проявилось лишь снижением доли внелизосомальной активности катепсина L без статистически значимых изменений общей проницаемости лизосомальной мембраны.

При 2 часовой инкубации мы обнаружили статистически значимое снижение общей проницаемости лизосомальной мембраны при действии пероксида водорода и нитропруссиды натрия в сочетании со снижением доли внелизосомальной активности катепсина H. Это важное, на наш взгляд, наблюдение мы считаем подтверждением ранее высказанного предположения о формировании феномена повышения жесткости лизосомальных мембран при окислительном повреждении их белков. Дополнительно необходимо подчеркнуть, что при 4 часовой инкубации, когда степень повышения уровня продуктов окислительного карбонилирования белков лизосом под действием пероксида водорода становится существенно менее выраженной, а под действием нитропруссиды натрия – возрастает, описанные изменения проницаемости мембран практически исчерпываются для первого соединения и сохраняются для второго.

L-аргинин при изолированном применении в инкубации с продолжительностью 2 часа также продемонстрировал способность снижать общую проницаемость лизосомальной мембраны, что, скорее всего, следует отнести к собственным эффектам субстанции. Более того, добавление L-аргинина в среду, содержащую провокатор окислительного стресса, приводившее к

существенной коррекции уровня окислительно поврежденных белков в лизосомах при 2 часовой инкубации, здесь проявилось его дополнительными эффектами: к сохранившемуся снижению общей проницаемости лизосомальной мембраны добавилось выраженное снижение доли внелизосомальной активности всех изучаемых цистеиновых катепсинов. Это могло оказаться дополнительным фактором, приведшим к вышеописанной коррекции за счет расщепления окислительно поврежденных белков.

Поскольку L-аргинин при 4 часовом изолированном воздействии продемонстрировал прооксидантные свойства в отношении белков лизосом, добавление субстанции в среду, содержащую 5 мМ H_2O_2 , привело, по-видимому, к суммированию окислительных эффектов на мембраны лизосом. Самым важным изменением мы считаем здесь обнаружение выраженного нарастания Клуб кислой фосфатазы, значения которого статистически значимо превысили не только диапазоны, полученные для контрольных наблюдений, но и уровни, полученные для отдельного применения субстанций.

Таким образом, на основании результатов *in vivo*- и *in vitro*- исследований вероятным представляется, что для проницаемости лизосомальных мембран имеет значение степень окислительного повреждения их белков: умеренное окислительное повреждение снижает проницаемость, например, за счет формирования белок-белковых сшивок [139], выраженное – повышает проницаемость, вызывая ее лабильзацию и/или разрушение лизосом [96, 320].

3.5.3. Зависимость активности катепсинов В, L, Н и показателей проницаемости лизосомальной мембраны от выраженности окислительного повреждения белков при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе и применении модуляторов генерации оксида азота

При анализе зависимости изучаемых показателей от общего содержания продуктов окислительно карбонилированных белков (Таблица 30) на фоне *in vitro*- индукции окислительного стресса инкубацией лизосом печени крыс в присутствии 5 мМ пероксида водорода обнаружены статистически значимые

линейные корреляционные связи для общей и неседиментируемой активности катепсинов L и H, а также для Клаб катепсина H и кислой фосфатазы.

При этом характер связей для катепсина L оказался прямым, демонстрируя тот факт, что степень нарастания активности фермента зависела от выраженности окислительной модификации белков и подтверждая предположение об адаптивном характере этих изменений. Для катепсина H связь оказалась обратной, что указывает на прогрессивное угнетение активности фермента по мере нарастания содержания окислительно модифицированных белков, что также укладывается в высказанную ранее версию о чувствительности данного фермента к окислительному повреждению. Обнаруженная здесь же обратная корреляционная связь доли внелизосомальной активности катепсина H с общим содержанием продуктов окислительной модификации протеинов скорее всего, является отражением зависимости внелизосомальной активности от окислительного повреждения, хотя не исключена возможность и снижения избирательной проницаемости лизосомальной мембраны для данного фермента при окислительном стрессе.

Интересно, что обнаруженная статистически значимая зависимость показателя общей проницаемости лизосомальной мембраны – Клаб кислой фосфатазы – от уровня содержания продуктов окислительной модификации белков также оказалась суммарно отрицательной. Этот факт подчеркивает наличие феномена снижения проницаемости лизосомальной мембраны при определенном уровне окислительного стресса, однако данная тема явно требует дополнительной углубленной проработки в дальнейших исследованиях.

Результаты корреляционного анализа зависимости показателей активности катепсинов В, L, Н и проницаемости лизосомальной мембраны от общего содержания продуктов окислительного карбонилирования белков (Собщ) при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе и применении модуляторов генерации оксида азота

	Воздействующая субстанция					
	5 мМ Н ₂ О ₂		5 мМ L-аргинин		0,1 мМ нитропруссид Na	
	R	p	R	p	R	p
Кат. В ОА	0,29	0,09	-0,059	0,73	-0,20	0,23
Кат. В СА	0,13	0,45	-0,01	0,94	-0,29	0,09
Кат. В НСА	0,29	0,09	-0,10	0,55	0,19	0,26
Кат. L ОА	0,36	0,03	-0,39	0,02	0,16	0,35
Кат. L СА	0,13	0,44	-0,43	0,009	0,04	0,81
Кат. L НСА	0,55	0,0006	-0,04	0,83	0,21	0,21
Кат. Н ОА	-0,42	0,01	0,03	0,88	-0,008	0,96
Кат. Н СА	-0,02	0,91	0,05	0,79	0,17	0,33
Кат. Н НСА	-0,52	0,001	-0,22	0,19	-0,19	0,27
Кат. В Клаб	0,15	0,39	-0,11	0,54	0,21	0,23
Кат. L Клаб	0,29	0,09	0,17	0,33	0,17	0,34
Кат. Н Клаб	-0,35	0,03	-0,07	0,68	-0,33	0,048
Кисл. фосфатаза Клаб	-0,56	0,0005	-0,36	0,03	-0,11	0,52

Обнаруженные при *in vitro*- воздействии L-аргинина статистически значимые обратные линейные зависимости общей и седиментируемой активности катепсина L и содержания продуктов окислительной модификации белков можно считать подтверждением предположения о том, что самостоятельный протективный эффект L-аргинина в отношении окислительного повреждения протеинов может быть связан с его способностью интенсифицировать расщепление модифицированных белков через активацию лизосомального протеолиза. Важно отметить, что для Клаб кислой фосфатазы связь с уровнем окислительно модифицированных белков под действием L-аргинина осталась отрицательной – скорее всего, как проявление способности L-аргинина при длительном воздействии оказывать прооксидантный эффект с дальнейшим универсальным для окислительного повреждения снижением проницаемости лизосомальной мембраны.

При *in vitro*-воздействии нитропрусида натрия единственной статистически значимой оказалась зависимость от S общ Клаб катепсина H, подчеркивая, что обнаруженная стойкая способность данного соединения подавлять проницаемость лизосомальной мембраны для указанного фермента, скорее всего, является не собственным эффектом субстанции, а результатом вызываемого ею повышения уровня окислительно поврежденных белков.

Таким образом, *in vitro*- исследования подтвердили связь окислительной модификации белков с изменениями активности цистеиновых катепсинов и проницаемостью лизосомальной мембраны, продемонстрировав различия ответа ферментов на окислительный стресс. Кроме того, на данном этапе окончательно сформировалось предположение об этапности изменений проницаемости лизосомальной мембраны при различной выраженности окислительного стресса, а также были получены подтверждения версий о самостоятельном защитном действии L-аргинина в отношении окислительного повреждения белков и об изменении с его участием активности и компарментализации цистеиновых катепсинов, как механизма указанных протективных эффектов.

3.6. Возможности оценки селективного изменения компарментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ

В качестве показателя распределения лизосомальных ферментов между вне- и интрализосомальной фракцией традиционно используется коэффициент лабильности лизосомальной мембраны, представляющий собой долю активности фермента во внелизосомальной фракции в его общей активности [61].

Нарастание значений коэффициента лабильности для части маркерных ферментов лизосом, в частности, кислой фосфатазы, продолжает трактоваться как маркер лабилизации (общего повышения проницаемости) лизосомальной мембраны [205, 253], однако все большее внимание исследователей привлекает процесс пермеабиллизации, при котором выход части интрализосомальных компонентов в цитозоль не сопровождается значительным повреждением лизосомальной мембраны [63, 352, 379]. Следует отметить, что среди множества предлагаемых в настоящее время маркеров пермеабиллизации лизосомальных мембран особое значение придается измерению активности лизосомальных цистеиновых протеиназ [279], поскольку считается, что малые размеры молекул этих ферментов [156] дают им преимущество проникновения даже сквозь слабо дестабилизированные мембраны.

Таким образом, изменение компарментализации для каждого из катепсинов, выражаемое через долю внелизосомальной активности (коэффициент лабильности лизосомальной мембраны) имеет две базовые причины: изменение общей проницаемости лизосомальной мембраны (лабилизация) и пермеабиллизация лизосомальной мембраны с изменением её проницаемости для индивидуального фермента. Возможно, именно этот факт и является причиной ранее описанных нами рассогласований между значениями доли внелизосомальной активности лизосомальных цистеиновых протеиназ и кислой фосфатазы.

Вследствие этого возникает необходимость в новом числовом показателе, который, учитывая общее состояние лизосомальной мембраны, дает возможность оценить степень избирательного изменения её проницаемости для лизосомальных

цистеиновых протеиназ. Для решения данной задачи нами был предложен коэффициент селективного изменения компартментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ ($K_{СКА}$) [68]

Предлагаемый способ оценки селективного изменения компартментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ основан на сочетанном измерении долей неседиментируемой активности ($K_{лаб}$) индивидуального катепсина (*Cath*) и кислой фосфатазы (*AP*). Значение соотношения

$$\frac{K_{лаб AP}}{K_{лаб Cath}}$$

в условиях равномерного выхода из лизосом кислой фосфатазы и изучаемого катепсина приближено к 1, поэтому для оценки селективного изменения компартментализации активности катепсина целесообразно производить трактовку отклонения полученного значения от 1 в положительную или отрицательную сторону.

Методика расчета предлагаемого показателя. Коэффициент селективного изменения компартментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ ($K_{СКА}$) определяется формулой:

$$K_{ска} = 1 - \frac{K_{лаб AP}}{K_{лаб Cath}}$$

где:

$K_{лаб Cath}$ – доля неседиментируемой активности индивидуального катепсина;

$K_{лаб AP}$ – доля неседиментируемой активности кислой фосфатазы;

1 – значение соотношения $\frac{K_{лаб AP}}{K_{лаб Cath}}$ в условиях равномерного выхода из лизосом кислой фосфатазы и изучаемого катепсина, то есть при отсутствии селективного изменения компартментализации активности последнего.

Возможности трактовки результатов применения предлагаемого показателя с примерами использования.

Возможны три диапазона значения $K_{СКА}$:

1. $K_{СКА} \sim 0$, если $\frac{K_{\text{лаб AP}}}{K_{\text{лаб Cath}}} \sim 1$, т.е. $K_{\text{лаб AP}} \sim K_{\text{лаб Cath}}$

Данное условие выполняется при равномерном выходе во внелизосомальную фракцию конкретного катепсина и кислой фосфатазы. Ситуация может существовать в 2 вариантах:

а) выход ферментов во внелизосомальную фракцию обусловлен только **частичным повреждением** лизосомальных мембран **в процессе приготовления гомогенатов тканей**; в этом случае доля внелизосомальной активности кислой фосфатазы, как и доля внелизосомальной активности катепсина имеют низкие значения, например, для интактной печени крыс 5-7% [59] Таблица 31).

Таблица 31

Расчет и трактовка показателя $K_{СКА}$ на примере ткани легкого (Контроль 4: суспензионная основа, содержащая Твин-80 per os 21 сутки)

Показатель	Значение	Анализ полученных результатов
$НСА_{Cath} B$	0,0035 нкат/г белка	Доли внелизосомальной активности кислой фосфатазы и катепсина В ткани легкого приблизительно равны: $K_{\text{лаб AP}} \sim K_{\text{лаб Cath}}$ (0,0197 ~ 0,0196), поэтому $K_{\text{лаб AP}} / K_{\text{лаб Cath}} \sim 1$ (1,005 ~ 1) $K_{СКА} \sim 0$ (-0,005 ~ 0) ВЫВОД: Выход катепсина В во внелизосомальную фракцию обусловлен только частичным повреждением лизосомальных мембран в процессе приготовления гомогената ткани легкого, о чем свидетельствует $K_{СКА} \sim 0$, а так же низкие значения долей внелизосомальной активности.
$СА_{Cath} B$	0,1752 нкат/г белка	
$ОА_{Cath} B$	0,1787 нкат/г белка	
$K_{\text{лаб Cath}} B$	0,0196	
$НСА_{AP}$	12,99 нкат/г белка	
$СА_{AP}$	647,29 нкат/г белка	
$ОА_{AP}$	660,28 нкат/г белка	
$K_{\text{лаб AP}}$	0,0197	
$K_{СКА}$	$K_{\text{лаб AP}} / K_{\text{лаб Cath}} = 0,0197/0,0196 = 1,005$ $K_{СКА} = 1 - 1,005 = -0,005$	

б) выход ферментов во внелизосомальную фракцию обусловлен **глубоким повреждением** лизосомальной мембраны. В этом случае доли внелизосомальной активности ферментов имеют высокие значения (Таблица 32).

Таблица 32

Расчет и трактовка показателя $K_{СКА}$ на примере инкубации суспензии лизосом печени в 0,25 М сахарозе с добавлением 5мМ H_2O_2 и 5мМ L-аргинина (4 часа)

Показатель	Значение	Анализ полученных результатов
$НСА_{Cath}B$	0,36 нкат/г белка	Доли внелизосомальной активности кислой фосфатазы и катепсина В после инкубации суспензии лизосом приблизительно равны:
$СА_{Cath}B$	0,50 нкат/г белка	
$ОА_{Cath}B$	0,86 нкат/г белка	
$K_{лаб} Cath B$	0,42	$K_{лаб} AP \sim K_{лаб} Cath$ (0,39 ~0,42),
$НСА_{AP}$	65,84 нкат/г белка	поэтому $K_{лаб} AP / K_{лаб} Cath \sim 1$ (0,93 ~ 1)
$СА_{AP}$	105,10 нкат/г белка	
$ОА_{AP}$	170,94 нкат/г белка	$K_{СКА} \sim 0$ (0,07 ~ 0)
$K_{лаб} AP$	0,39	ВЫВОД: Выход катепсина В во внелизосомальную фракцию обусловлен глубоким повреждением лизосомальной мембраны, о чем свидетельствует $K_{СКА} \sim 0$ и высокие значения долей внелизосомальной активности ферментов.
$K_{СКА}$	$K_{лаб} AP / K_{лаб} Cath =$ 0,39 / 0,42 = 0,93 $K_{СКА} = 1 - 0,93 = 0,07$	

2. $K_{СКА} > 0$, если $\frac{K_{лаб} AP}{K_{лаб} Cath} < 1$, т.е. $K_{лаб} AP < K_{лаб} Cath$

Данное условие выполняется при **пермеабиллизации лизосомальной мембраны**, проявляющейся в селективном изменении её проницаемости для индивидуального катепсина: $K_{лаб} AP$ значительно ниже, чем $K_{лаб} Cath$, который возрастает за счет увеличения активности конкретного катепсина во внелизосомальной фракции (Таблица 33).

Расчет и трактовка показателя $K_{СКА}$ на примере ткани почки
(Экспериментальная группа 1: L-NAME 25 мг/кг, 7 суток внутрибрюшинно)

Показатель	Значение	Анализ полученных результатов
НСА _{CathL}	0,0731 нкат/г белка	$K_{лаб} AP < K_{лаб} Cath$ (0,031 < 0,057) $K_{лаб} AP / K_{лаб} Cath < 1$ (0,54 < 1) $K_{СКА} > 0$ (0,46 > 0)
СА _{CathL}	1,2039 нкат/г белка	
ОА _{CathL}	1,2769 нкат/г белка	
$K_{лаб} Cath L$	0,057	
НСА _{AP}	21,27 нкат/г белка	ВЫВОД: Выход катепсина L во внелизосомальную фракцию является селективным и обусловлен пермеабиллизацией лизосомальной мембраны, о чем свидетельствует $K_{СКА} > 0$, как числовое выражение большей степени повышения значения доли внелизосомальной активности катепсина L относительно доли внелизосомальной активности кислой фосфатазы.
СА _{AP}	673,02 нкат/г белка	
ОА _{AP}	694,28 нкат/г белка	
$K_{лаб} AP$	0,031	
$K_{СКА}$	$K_{лаб} AP / K_{лаб} Cath =$ 0,031 / 0,057 = 0,54 $K_{СКА} = 1 - 0,54 = 0,46$	

3. $K_{СКА} < 0$, если $\frac{K_{лаб} AP}{K_{лаб} Cath} > 1$, т.е. $K_{лаб} AP > K_{лаб} Cath$

Современный уровень знания о лизосомальных цистеиновых протеиназах позволяет предположить, что данное условие выполняется при **воздействии факторов, снижающих активность изучаемого катепсина во внелизосомальной фракции**. В этих случаях степень селективного изменения проницаемости лизосомальной мембраны оценить при помощи предлагаемого коэффициента невозможно, признаком оценки степени повреждения мембраны является степень нарастания $K_{лаб} AP$ (Таблица 34).

Однако не исключено, что дальнейшие углубленные исследования таких ситуаций обнаружат причины, действительно затрудняющие выход конкретного катепсина из лизосом при наличии частичного повреждения их мембран.

Расчет и трактовка показателя $K_{СКА}$ на примере ткани печени (Экспериментальная группа 4: изолированная гипергомоцистеинемия)

Показатель	Значение	Анализ полученных результатов
$НСА_{CathL}$	0,0175 нкат/г белка	$K_{лаб}AP > K_{лаб}Cath$ (0,070 > 0,016) $K_{лаб} AP / K_{лаб} Cath > 1$ (4,38 > 1) $K_{СКА} < 0$ (-3,38 < 0)
$СА_{CathL}$	1,0652 нкат/г белка	
$ОА_{CathL}$	1,0827 нкат/г белка	
$K_{лаб} Cath L$	0,016	
$НСА_{AP}$	15,49 нкат/г белка	ВЫВОД: возможной причиной выявленных изменений является избирательное подавление активности катепсина L во внелизосомальной фракции. Степень селективного изменения проницаемости лизосомальной мембраны для катепсина L оценить при помощи предлагаемого коэффициента невозможно, о степени повреждения лизосомальной мембраны следует судить по значению $K_{лаб} AP$.
$СА_{AP}$	206,00 нкат/г белка	
$ОА_{AP}$	221,49 нкат/г белка	
$K_{лаб} AP$	0,070	
$K_{СКА}$	$K_{лаб} AP / K_{лаб} Cath =$ 0,070 / 0,016 = 4,38 $K_{СКА} = 1 - 4,38 = -3,38$	

Таким образом, сочетанная трактовка предложенного коэффициента селективной компартиментализации активности ($K_{СКА}$) и показателя доли внелизосомальной активности для конкретной лизосомальной протеиназы дает возможность косвенно, но количественно оценить избирательную проницаемость лизосомальной мембраны для индивидуального фермента, в том числе при воздействии различных агентов и/или факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Непрерывное совершенствование технологий исследования в сочетании с расширением информационного пространства привели в последние десятилетия к целому ряду концептуальных изменений в области фундаментальной и медицинской биохимии.

В частности, представления об окислительном стрессе существенно обогатились обнаружением процесса окислительной модификации белков, что не только предоставило новые, чувствительные и стабильные маркеры для диагностики свободнорадикальных патологий и подтверждения эффекта антиоксидантной терапии, но и стало основой для дальнейшего существенного углубления понимания механизмов множества известных к настоящему времени адаптивных и патологических процессов, ассоциированных с окислительным стрессом. В настоящее время происходит активное накопление данных о месте и роли окислительной модификации белков в тканевых, клеточных и системных изменениях на фоне окислительного стресса, а также ведутся исследования механизмов защиты от аккумуляции токсичных для клетки продуктов окислительного повреждения протеинов. Наиболее перспективными направлениями в этой области на данный момент считаются выявление уникальных мишеней окислительной модификации протеинов и конкретизация представлений о механизмах утилизации продуктов процесса.

Одновременно, активно и успешно разрабатываемое с 1990-х годов направление по изучению лизосомальных цистеиновых протеиназ в качестве участников патогенеза целого ряда медико-социально значимых заболеваний, таких как злокачественные новообразования, атеросклероз, остеопороз, нейродегенеративные патологии, в последнее время получило новый импульс развития. Обнаружение участия ЛЦП в апоптозе переключило внимание исследователей с традиционно изучаемых экстрацеллюлярных эффектов данной группы ферментов на внутриклеточные (цитоплазматические), повысило интерес к механизмам управления их активностью, заставило пересмотреть вклад ЛЦП в патогенез онкопатологий и положило начало новому и перспективному научному

направлению, связанному с исследованиями феномена пермеабилзации лизосомальной мембраны и факторов, способных оказывать влияние на данный процесс.

При этом сопоставление научных данных, полученных разными группами исследователей, демонстрирует как минимум частичное пересечение ситуаций, для которых показана вовлеченность окислительного стресса и протеолиза с участием цистеиновых катепсинов, кроме того, окислительный стресс упоминается рядом авторов в качестве фактора пермеабилзации лизосомальной мембраны, а участие ЛЦП – в качестве возможного агента утилизации окислительно поврежденных белков.

Все вышеизложенное послужило мотивом к планированию и осуществлению нами комплекса исследований, направленных на изучение состояния и механизмов изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при окислительном стрессе и установление роли ЛЦП в адаптации к окислительному повреждению белков.

Следует отметить, что в самом начале работы потребность в количественной детекции степени и характера окислительной модификации белков, запланированных к использованию в качестве маркеров развития окислительного стресса, продемонстрировала нам, что стандартный метод спектрофотометрической регистрации продуктов реакции карбонильных групп с 2,4-динитрофенилгидразином наряду с целым рядом технологических преимуществ, предоставляющих значительный эмпирический материал, не дает возможности сделать заключение об общем содержании карбонильных производных белков и их компонентов в изучаемом материале, что затрудняет дальнейшую трактовку и сопоставление полученных результатов. В связи с вышеизложенным, первой задачей исследования стала разработка нового подхода к анализу данных, что и было успешно реализовано: предложенный способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях защищен патентом РФ, для облегчения его внедрения нами были составлены методические рекомендации которые в

настоящее время используются как в практической работе, так и в научных исследованиях.

Основной блок исследований связи цистеиновых катепсинов с окислительным стрессом включил в себя несколько этапов.

На первом этапе нами был получен положительный ответ на вопрос о наличии чувствительности цистеиновых катепсинов к окислительному стрессу. Так, исследование общей активности катепсинов В, L, Н в фракционированных лейкоцитах крови после инкубации в среде, содержащей 5 мМ H_2O_2 , продемонстрировало наличие изменений изучаемых показателей, после чего в стенке пораженной и интактной вены при экспериментальном венозном тромбозе, а также в тимоцитах и спленоцитах после инкубации с ингибитором синтеза NO было обнаружено сочетание нарастания продуктов окислительной модификации белка и общей активности катепсинов В, L, Н. Это позволило сформулировать предположение об участии ЛЦП в адаптации к окислительному стрессу и продемонстрировало необходимость дальнейших исследований, позволяющих выявить субклеточное распределение активности ферментов при окислительном стрессе и состояние проницаемости лизосомальной мембраны.

Исходя из этого, на втором этапе осуществлялось *in vivo*-моделирование ситуаций, сопряженных с окислительным стрессом и его возможной коррекцией: применение ингибитора и субстрата синтеза оксида азота и экспериментальная гипергомоцистеинемия.

Оказалось, что блокирование синтеза оксида азота вызывает нарастание продуктов окислительной модификации белков в цитоплазматической фракции гомогенатов ткани печени, почки и легкого, более того, обнаружены статистически значимые обратные корреляционные связи между общим содержанием ОМБ и концентрацией метаболитов оксида азота в изучаемом материале, что демонстрирует мало изученные к настоящему моменту антиоксидантные эффекты оксида азота, как минимум в отношении белков.

Описанное повышение ОМБ сочеталось для изучаемых тканей с изменениями активности цистеиновых катепсинов, однако эффекты оказались

преимущественно подавляющими, а в ткани легкого изменений активности ЛЦП обнаружено не было.

Поскольку одним из механизмов регуляции активности ЛЦП является протеолитический процессинг, проведен анализ показателя K_{ACA} , позволяющий получить представление о вкладе соотношения проферментных и каталитически активных форм ЛЦП в изменения их активности. Оказалось, что снижение активности на фоне нарастания ОМБ в данной модели сочетается с повышением показателя K_{ACA} , что в этих условиях можно трактовать как замедление протеолитического процессинга, приводящее к снижению количества активных молекул ферментов.

Важно отметить, что для ткани легкого, где нарастание уровня ОМБ не сочеталось с изменениями активности цистеиновых катепсинов, показатели K_{ACA} оказались также повышенными – т.е. ответ в виде замедления протеолитического процессинга при окислительном стрессе в этой ткани также наблюдается.

При оценке состояния проницаемости лизосомальной мембраны обнаружено, что под действием ингибитора синтеза оксида азота происходит снижение общей проницаемости лизосомальной мембраны для ткани почки в сочетании с повышением доли внелизосомальной активности катепсинов В, L, Н. Это наблюдение позволило на данном этапе сформулировать предположение о наличии селективного выхода катепсинов в цитоплазму в данной модели.

Наличие взаимосвязи процессов окислительной модификации белков и изменений активности цистеиновых катепсинов в данной модели было подтверждено обнаружением многочисленных, преимущественно обратных, корреляций между изучаемыми признаками.

Изолированное применение субстрата NO-синтазы L-аргинина позволило выявить целый ряд его значимых эффектов: обнаружено, что L-аргинин при изолированном введении вызывает снижение содержания ОМБ в ткани печени, причем этот эффект не сочетался с изменениями содержания метаболитов оксида азота и, следовательно, не может объясняться антиоксидантным действием NO. Кроме того, введение L-аргинина приводило к повышению внелизосомальной

активности цистеиновых катепсинов в изучаемых тканях, что может иметь значение для участия этих ферментов в утилизации поврежденных белков цитоплазмы, а также потенциально оказывать проапоптогенное действие.

Выявление положительных эффектов L-аргинина побудило к исследованию его потенциального корректирующего воздействия на изучаемые нами процессы при экспериментальной гипергомоцистеинемии, являющейся признанным фактором формирования окислительного стресса.

Нами было обнаружено, что экспериментальная гипергомоцистеинемия провоцирует нарастание продуктов окислительной модификации белков в ткани печени, почки, миокарде, но не в ткани легкого. При этом степень изменения в миокарде оказалась наиболее выраженной и положительно коррелировала с уровнем гипергомоцистеинемии, что согласуется с представлениями о гипергомоцистеинемии как факторе риска кардиоваскулярной патологии и расширяет возможности понимания механизмов подобной связи.

Важным результатом мы считаем обнаружение разнонаправленных изменений активности ЛЦП в данной модели: умеренное повышение ОМБ в ткани печени и почки сочеталось, как и в модели с ингибированием синтеза оксида азота, с снижением внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов, в то время как выраженное нарастание ОМБ в миокарде оказалось ассоциированным с нарастанием активности ЛЦП в цитоплазматической фракции, что следует трактовать уже не как адаптивную реакцию, а скорее как проявление развивающегося повреждения органелл и клеток.

Кроме того, на этой модели получены также разнонаправленные изменения показателей проницаемости лизосомальной мембраны, позволившие сформулировать тезис о значимости степени выраженности окислительного стресса для направления изменения проницаемости лизосомальных мембран и подтвердить предположение о повреждении лизосом как причине нарастания внелизосомальной активности ЛЦП в миокарде.

Предположение о способности L-аргинина оказывать корректирующее действие на состояние окислительной модификации белков и изменения

активности цистеиновых катепсинов в данной модели получило свое подтверждение: применение L-аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии практически полностью скорректировало уровень ОМБ в ткани печени и почки и частично – в миокарде. Параллельно, L-аргинин в значительной степени корректировал выявленные на фоне изолированной гипергомоцистеинемии изменения активности цистеиновых катепсинов в изучаемых тканях, в большей степени за счет изменений компарментализации ферментов. Дополнительным положительным эффектом аргинина оказалась его способность снижать выраженность гипергомоцистеинемии, что также может оказаться частью механизма развития его положительных эффектов.

Анализ корреляционных связей позволил дополнительно подтвердить наличие взаимозависимости изменений активности ЛЦП и проницаемости лизосомальной мембраны с состоянием окислительной модификации белков, но и продемонстрировать, что в качестве причины выявленных изменений следует в большей степени рассматривать окислительный стресс, чем прямое токсическое влияние гомоцистеина.

Завершающим этапом исследования стала прямая оценка изменений, происходящих в изолированных лизосомах печени крыс при *in vitro*-провокации окислительного стресса инкубацией в среде, содержащей 5 мМ пероксид водорода. Дополнительно, *in vitro*-моделирование использовалось нами для проверки выдвинутых ранее предположений о возможной протективной роли L-аргинина в отношении окислительной модификации белков, не связанной с участием в синтезе оксида азота, а также о его самостоятельном влиянии на активность цистеиновых катепсинов и состояние лизосомальной мембраны. Изучение возможного самостоятельного вклада оксида азота в изменения исследуемых параметров, проведено на этом этапе с использованием инкубаций лизосом с широко применяемым спонтанным донором NO – натрия нитропруссидом.

Обнаружено, что 5 мМ пероксид водорода при *in vitro*-воздействии на лизосомы печени крыс индуцирует окислительную модификацию их белков,

наиболее выраженную при 2 часовой инкубации, что сочеталось с нарастанием активности катепсинов В и L как в седиментируемой, так и в неседиментируемой фракции в сочетании с признаками снижения показателя проницаемости лизосомальной мембраны.

Для L-аргинина подтверждена способность оказывать протективные эффекты в отношении окислительной модификации белков, проявляющиеся при 1 часовом изолированном действии, а также способность практически полностью корректировать вызываемое пероксидом водорода выраженное нарастание продуктов окислительного карбонилирования белков и частично – сочетающиеся с ним изменения активности ЛЦП при 2 часовой инкубации; однако при этом обнаружено, что удлинение воздействия субстанции до 4 часов влечет за собой прооксидантные эффекты, сохраняющиеся и при сочетании с пероксидом водорода.

В целом, на основании полученных данных, можно предположить, что положительные эффекты L-аргинина могут оказаться как проявлением антиоксидантных свойств самой субстанции или синтезирующегося из нее оксида азота, так и результатом воздействия L-аргинина на лизосомальный протеолиз, выражающегося в ускорении протеолитического процессинга, повышении проницаемости лизосомальных мембран и, возможно, прямом активирующем действии, что в сумме приводит к повышению утилизации поврежденных белков.

Таким образом, комплекс *in vivo*- и *in vitro*- исследований позволил обнаружить взаимосвязь окислительной модификации белков и изменений активности и компарментализации цистеиновых катепсинов, продемонстрировать вовлеченность в выявленные изменения сдвига соотношения проферментных и активных форм ЛЦП и проницаемости лизосомальной мембраны. Кроме того, полученные результаты дают основание предполагать, что для проницаемости лизосомальных мембран имеет значение степень окислительного повреждения их белков: умеренное окислительное повреждение снижает проницаемость, например, за счет формирования белок-белковых

сшивок, выраженное – повышает проницаемость, вызывая ее лабильзацию и/или разрушение лизосом.

Перспективы исследований и дальнейшая разработка темы

Данное исследование не только позволило получить убедительные доказательства связи изменений активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ с выраженностью окислительной модификации белков, как проявления окислительного стресса, но и сформулировать целый ряд предположений, проверка которых может стать основой дальнейшей разработки данной темы и вектором перспективных исследований по смежным тематикам.

1. Проверка гипотезы о вовлеченности цистеиновых катепсинов в утилизацию поврежденных белков требует проведения *in vitro*- исследований с использованием очищенных ферментов и различных белковых субстратов, что одновременно внесет вклад в развитие исследований в области дифференциального карбонилирования белков и их чувствительности к протеолизу.
2. Обнаружение нарушения соотношения проферментных и активных форм цистеиновых катепсинов при окислительном стрессе может дополнить представления о механизмах протеолитического процессинга при условии *in vitro*- подтверждения замедления расщепления проэнзимов при действии окислителей.
3. Обнаружение способности L-аргинина снижать содержание окислительно модифицированных белков и влиять на активность цистеиновых катепсинов и проницаемость лизосомальной мембраны может иметь важное значение для биологии и медицины, но дальнейшее изучение механизмов этих феноменов требует целого комплекса как *in vivo*-, так и *in vitro*- исследований.
4. Обнаруженное снижение проницаемости лизосомальных мембран при умеренной выраженности окислительного стресса требует дальнейшей

проверки гипотезы об этапности пермеабилзации в зависимости от степени окислительного повреждения белков мембран лизосом.

5. Продемонстрированные в исследовании расогласования между показателями доли внелизосомальной активности маркерного фермента лизосом кислой фосфатазы и цистеиновых катепсинов стали основанием для предложенного нами коэффициента селективной компартиментализации активности катепсинов, который следует использовать в дальнейших исследованиях с целью выявления феномена пермеабилзации лизосомальных мембран.
6. Полученные результаты могут стать основой для дальнейших исследований механизмов развития процессов, ассоциированных с окислительным стрессом и/или изменениями активности цистеиновых катепсинов, а также для разработки и тестирования новых препаратов с потенциальным антиоксидантным, про- и антиапоптогенным действием.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, позволяющий дать количественную характеристику общего уровня продуктов окислительного карбонилирования протеинов и содержания их отдельных фракций, а также предоставляющий возможность определения доли первичных и вторичных маркеров окислительного стресса и объективизирующий расчет показателя резервно-адаптационного потенциала (РАП).
2. Установлено увеличение общей активности цистеиновых катепсинов В, L, Н моноядерных (*in vivo* и *in vitro*) и полиморфноядерных лейкоцитов (*in vivo*), тимоцитов и спленоцитов (*in vitro*), стенки тромбированных и интактных вен (*in vivo*) в условиях окислительного стресса.
3. Применение неселективного ингибитора NO-синтазы L-N^o-нитро-аргинина метилового эфира (L-NAME) приводит к нарастанию общего содержания окислительно модифицированных белков в цитоплазматической фракции гомогенатов печени, почки, легкого, сопровождающемуся количественным нарастанием АДНФГ, сочетающимся для ткани печени и легкого с увеличением доли АДНФГ в общем пуле продуктов карбонилирования протеинов и, для ткани печени, снижением значения РАП.
4. L-аргинин при изолированном введении вызывает снижение содержания окислительно модифицированных белков в ткани печени без статистически значимых изменений концентрации метаболитов NO; в ткани почки применение L-аргинина вызывает подавление синтеза оксида азота, что сочетается с изменениями содержания окислительно модифицированных белков, однотипными с полученными при применении L-NAME.
5. При экспериментальной гипергомоцистеинемии выявлена интенсификация образования ОМБ в цитоплазматической фракции гомогенатов печени, почки и, в наибольшей степени, в миокарде, где повышение общего содержания окислительно карбонилированных белков положительно

коррелировало с уровнем гипергомоцистеинемии и сопровождалось нарастанием не только первичных (АДНФГ), но и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса. В ткани легкого изменений содержания окислительно модифицированных белков на данной модели не выявлено.

6. Ингибирование синтеза оксида азота оказывает преимущественно подавляющие эффекты на активность катепсинов В, L, Н в ткани печени, почки и легкого, что сопровождается признаками повышения доли проферментных форм и снижения общей проницаемости лизосомальной мембраны.
7. L-аргинин вызывает повышение внелизосомальной активности катепсина L в ткани печени, катепсинов В, L, Н в ткани легкого (для катепсинов В и Н – в сочетании с нарастанием лизосомальной активности), а также лизосомальной активности катепсина Н в ткани почки.
8. Экспериментальная гипергомоцистеинемия сопровождается снижением внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов в ткани печени и почки, при этом цитоплазматическая активность катепсинов В, L, Н в миокарде возрастает. Направленность изменений активности сочетается с направленностью изменений проницаемости лизосомальной мембраны: умеренное повышение содержания окислительно модифицированных белков ассоциировано для ткани почки с показателями, свидетельствующими о снижении проницаемости лизосомальной мембраны; обнаруженное для миокарда значительное повышение содержания окислительно модифицированных белков – с признаками лабильности лизосомальной мембраны.
9. При *in vitro*-индукции окислительного стресса прямым воздействием на суспензию лизосом H_2O_2 максимальные изменения содержания окислительно модифицированных белков выявлены после 2 часов инкубации, что сопровождалось нарастанием активности катепсинов В и L как в седиментируемой, так и в неседиментируемой фракции в сочетании с показателями, свидетельствующими о снижении проницаемости

лизосомальной мембраны. Донор NO нитропруссид натрия после 4 часов инкубации вызывал увеличение содержания окислительно модифицированных белков в лизосомах, что сочеталось с подавлением лизосомальной активности изучаемых ферментов.

10. Установлено, что L-аргинин на моделях *in vitro*- и *in vivo*- проявлял способность существенно корректировать вызванные индукторами окислительного стресса повышение содержания окислительно модифицированных белков и изменения активности/ компартиментализации цистеиновых катепсинов. Обнаружена способность данной аминокислоты вызывать выход цистеиновых катепсинов в цитоплазму и способствовать их протеолитическому процессингу.
11. Зависимость изменений активности/компартиментализации цистеиновых катепсинов, а также показателей проницаемости лизосомальной мембраны от выраженности окислительной модификации белков при окислительном стрессе подтверждается выявленными множественными статистически значимыми корреляционными связями между изучаемыми признаками.
12. Предложен коэффициент селективной компартиментализации активности ($K_{СКА}$), позволяющий при сочетанной оценке с показателем доли внелизосомальной активности для конкретной лизосомальной протеиназы количественно оценить проницаемость лизосомальной мембраны для индивидуального фермента.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В исследованиях, использующих измерение содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в качестве маркера окислительного стресса, рекомендуется для повышения научной информативности и объективизации результатов использовать разработанный способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях.
2. Обнаруженная обратная зависимость содержания окислительно поврежденных белков от концентрации метаболитов оксида азота для ткани печени, почки, легкого свидетельствует об антиоксидантных свойствах NO в отношении протеинов этих тканей, что рекомендуется учитывать при разработке и применении препаратов, действие которых основанных на антиоксидантных эффектах NO.
3. Выявленные зависимости изменений активности и внутриклеточного распределения цистеиновых катепсинов от выраженности процесса окислительного повреждения белков рекомендуется учитывать как при планировании исследований, связанных с изучением вклада данной группы ферментов в патологические и адаптивные процессы, так и при разработке и тестировании препаратов, использующих цистеиновые катепсины в качестве мишеней.
4. При дальнейшем изучении процесса пермеабилзации лизосомальных мембран рекомендуется использовать полученные сведения о его зависимости от выраженности окислительного стресса; также рекомендуется проведение исследований, связанных с изучением окислительной модификации белков мембран лизосом в качестве фактора изменения их прижизненной проницаемости.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны

АМК – 7 - амино-4- метилкумарин

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

ГАГ - гликозаминогликаны

ДНКЖ – динитрозильные комплексы негемового железа

ДТТ - дитиотреитол

$K_{СКА}$ – коэффициент селективной компартиментализации активности

$K_{АСА}$ – коэффициент аутокаталитического действия

КДНФГ. – кетон-динитрофенилгидразоны

Клаб – коэффициент лабильности

КФ – кислая фосфатаза

ЛЦП – лизосомальные цистеиновые протеиназы

МЯЛ – моноядерные лейкоциты

НСА – неседиментируемая активность

ОА – общая активность

ОМБ – окислительно модифицированные белки

ПВММ – пермеабиллизация внешней митохондриальной мембраны

ПЛМ – пермеабиллизация лизосомальной мембраны

ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты

РАП – резервно-адаптационный потенциал

СА – седиментируемая активность

ФНО – фактор некроза опухоли

ADMA – асимметричный диметиларгинин

L-NA – N^o-нитро-L-аргинин

L-NAME – метиловый эфир L-N^o-нитроаргинина

L-NMMA – монометиларгинин

NOS – NO-синтаза

Собщ. – общий уровень карбонильных производных белков

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаленихина, Ю.В. Влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность и аутопроцессинг катепсина В иммуно-компетентных органов крыс в условиях *in vitro* [Текст] / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина // Наука молодых (Eruditio Juvenium).– 2014.– №1.– С. 53-59.
2. Абаленихина, Ю.В. Окислительная модификация белков и активность катепсина Н тимоцитов крыс в условиях *in vitro* модулирования синтеза оксида азота (II) [Текст] / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина // Казанский медицинский журнал. – 2014. – Т. 95, №4. – С. 553-557.
3. Абаленихина, Ю.В. Окислительная модификация белков и лизосомальный цистеиновый протеолиз иммунокомпетентных органов крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота [Текст]: дис... канд. биол. наук / Ю.В. Абаленихина. – Рязань, 2015.
4. Антиоксидантное и прооксидантное действие доноров и метаболитов оксида азота [Текст] / Л.Л. Гудков [и др.] // Биофизика.– 2007.– Т.52, вып.3.– С. 503-509.
5. Асташина, Н.Б. Прогнозирование исходов дентальной имплантации на основе изучения уровня продуктов окислительной модификации белков слюны [Текст] / Н.Б. Асташина, Д.В. Плюхин, А.В. Делец // Проблемы стоматологии. – 2017. – Т.13, №3. – С. 47-52.
6. Безрукова, Д.А. Окислительная модификация белков слюны и сыворотки крови детей с атопическим дерматитом [Текст] / Д.А. Безрукова, А.А. Джумагазиев, Н.А. Степина // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – Т.6, №3. – С. 220-222.
7. Боев, К.В. Свободно-радикальное окисление белков: методологические аспекты количественной оценки окислительной модификации по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [Текст] / К.В. Боев, Д.В. Василенко, А.И. Маслов // Universum: Химия и биология: электрон.науч. журн. – 2014. – Т.1, № 2. – С. 4-6.

8. Борискина, М.А. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у больных хроническими лейкозами в динамике заболевания [Текст]: дис. канд. мед. наук / М.А. Борискина. – Рязань, 1996. – 150 с.
9. Вавилов, Н.В. Методические аспекты определения окислительной модификации белка [Текст] / Н.В. Вавилов, Ю.И. Шилов, А.П. Годовалов // Медицинский альманах. – 2018. – №2(53). – С. 19-22.
10. Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как основа для создания лекарств разнообразного терапевтического действия: физико-химическое и биологическое обоснование этого направления [Текст] / А.Ф. Ванин // Биофизика.– 2017.– Т.62, вып.4.– С. 629-656.
11. Влияние L-N^ω-нитроаргинина метилового эфира и нитропруссид натрия *in vitro* на окислительную модификацию белков лизосом печени крыс [Текст] / М.А.Фомина [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2017. – Т. 98, №6. – С. 1005-1011.
12. Влияние аллоксана на систему глутатиона и окислительную модификацию белков в адипоцитах при экспериментальном диабете [Текст] / В.В. Иванов [и др.] // Бюл. Сиб. медицины. – 2011. – № 3. – С. 44-47.
13. Генерация супероксидных радикалов комплексом III митохондрий сердца и антиоксидантное действие динитрозильных комплексов железа при разном парциальном давлении кислорода [Текст] / А.Л. Дудылина [и др.] // Биофизика.– 2016.– Т.61, вып.2.– С. 304-309.
14. Гипергомоцистеинемия как предиктор прогрессирования хронического пиелонефрита [Текст] / А.А. Протопопов [и др.] // Клиническая нефрология.– 2013.– №6.– С. 33-36.
15. Глушков, В.С. Модификация структуры мембран клеток крови как модулятор изменения проницаемости мембран для АДФ при их сдвиговой деформации [Текст] / В.С. Глушков, С.А. Сторожок, А.М. Петровец // Известия Челябинского научного центра УрО РАН. – 2004. – №1. – С. 225-231.

16. Глущенко, С.В. Патогенетические механизмы развития неалкогольной жировой болезни печени [Текст] / С.В. Глущенко // Новости медицины и фармации.– 2012.– №414: Гастроэнтерология.– С. 48-49.
17. Граник, В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств: монография [Текст] / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. – М.: Вузовская книга, 2004. – 360 с.
18. Диденко, Н.В. Влияние оксида азота и динитрозильных комплексов железа на активность антиоксидантных ферментов в крови *in vitro* [Текст] / Н.В. Диденко, А.Г. Соловьева, К.Л. Беляева // Биорадикалы и антиоксиданты.– 2018.– Т.5, №1.– С. 24-29.
19. Диденко, Н.В. Влияние различных концентраций динитрозильных комплексов железа на активность антиоксидантных ферментов в крови *in vitro* [Текст] / Н.В. Диденко, А.Г. Соловьева, П.В. Перетягин // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.– 2017.– Т.7, №4.– С. 44-50.
20. Дорохина, Л.В. Прооксидантно-антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы [Текст] / Л.В. Дорохина, В.В. Зинчук // Весці НАН РБ. Сер.біял. нав. – 2000. – №4. – С. 87-90.
21. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты [Текст] / Е.Е. Дубинина. – СПб.: Издательство «Медицинская пресса», 2006. – 400 с.
22. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы и лейкоцитов крови в динамике экспериментального тромбоза у крыс [Текст] / Н.В. Фомина [и др.] // Фундаментальные исследования.– 2013.– №2-1.– С. 197-200.
23. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ стенки сосудов в динамике экспериментального тромбоза у крыс [Текст] / Н.В. Фомина [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова.– 2013.– Т. 8, №1.– С. 73-76.

24. Изменение содержания продуктов окислительной модификации белков и липидов в опухолевой ткани на разных стадиях рака легкого [Текст] / Р.Н. Белоногов [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – Т.147, № 5. – С. 562-563.

25. Изменение спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков печени крыс в условиях дефицита синтеза оксида азота различной выраженности [Текст] / С.А. Теплов [и др.] // Наука молодых (Eruditio Juvenium).– 2016.– №1.– С. 50-54.

26. Ильичева, А.С. Влияние L-аргинина и карнитина на активность катепсинов L и H и проницаемость лизосомальной мембраны в сердечной мышце при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96, №5. – С. 819-824.

27. Ильичева, А.С. Влияние гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей [Текст]: дис... канд. мед. наук / А.С. Ильичева. – Рязань, 2017.

28. Ильичева, А.С. Оценка активности катепсинов L, H и степени их секреции в сердечной мышце при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина // Фундаментальные исследования.– 2014.– №10-9.– С. 1725-1728.

29. Ильичева, А.С. Состояние окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.– 2015.– №1.– С. 45-51.

30. Ильичева, А.С. Характеристика продуктов окислительного повреждения белков миокарда на фоне гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина, Д.В. Медведев // Наука молодых (Eruditio Juvenium).– 2014.– №4.– С. 37-43.

31. *In vitro*-эффекты нитропруссиды натрия и L-N^ω-нитроаргинина метилового эфира на активность лизосомальных цистеиновых

протеиназ и проницаемость мембраны лизосом [Текст] / М.А. Фомина [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 2018. – №1. – С. 43-46.

32. Камилов, Ф.Х. Влияние внутридермального введения гиалуроновой кислоты на интенсивность окислительной модификации белков кожи экспериментальных животных [Текст] / Ф.Х. Камилов, О.М. Капулер, А.Г. Галеева // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – №2. – С. 210-213.

33. Короткова, Н.В. Активность катепсинов L и H при заболеваниях вен нижних конечностей [Текст]: дис... канд. мед. наук / Н.В. Короткова. – Рязань, 2015.

34. Костюченко, Г.И. Гипергомоцистеинемия: клиническое значение, возрастные особенности, диагностика и коррекция [Текст] / Г.И. Костюченко // Клинич. геронтология.– 2007.– Т.13, №4.– С.32-40.

35. Кравцова, Е.Ю. Окислительная модификация белков как биохимический маркер прогноза ишемического инсульта [Текст] / Е.Ю. Кравцова, Д.Ю. Соснин, Г.А. Мартынова // Медицинский альманах. – 2012. – №2. – С. 95-97.

36. Кудлаева, А.М. Изучение *in vitro*-воздействия L-аргинина на лизосомальный цистеиновый протеолиз изолированно и на фоне оксидативного стресса [Текст] / А.М. Кудлаева, М.А. Фомина // Материалы XIV Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при патологии и адаптации. Дни молекулярной медицины на Дону»: Ростов-на-Дону, 2015. – С. 51-55.

37. Кудлаева, А.М. Влияние L-аргинина и L-карнитина на окислительную модификацию лизосомальных белков печени крыс [Текст] / А.М. Кудлаева, М.А. Фомина, С.А. Исаков // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науке о Земле.– 2017.– Т. 27, №3.– С. 368-374.

38. Ланкин, В.З. Важная роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе // Кардиология.– 2016.– №12.– С. 97-105.

39. Лепихова, Т.Н. Свойства и механизм действия декапептида, соответствующего кортикотропин-подобной последовательности иммуноглобулина G1 человека [Текст]: автореф... канд. биол. наук / Т.Н. Лепихова. – Пушино, 2001. – 21 с.
40. Лобашевский, А.Л. Выделение полиморфноядерных лейкоцитов из малых объёмов крови после осаждения декстраном [Текст] / А.Л. Лобашевский // Лабораторное дело. – 1983. – № 11. – С.28 – 31.
41. Луцак, В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма [Текст] / В.И. Луцак // Биохимия. – 2007. –Т. 72, вып. 8. – С. 995-1017.
42. Матвеева, Е.Л. Биохимические показатели перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в синовиальной жидкости пациентов с эндопротезированием коленного сустава [Текст] / Е.Л. Матвеева, Е.С. Спиркина, И.А. Талашова // Успехи современного естествознания. – 2015. – №6. – С.39-42.
43. Медведев, Д.В. Значение оксида азота в развитии вторичной митохондриальной дисфункции при экспериментальной гипергомоцистеинемии [Текст]: дис... канд. биол. наук / Д.В. Медведев. – Рязань, 2017.
44. Медведев, Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс [Текст] / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, М.А. Фомина // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.– 2014.– №4.– С. 42-46.
45. Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови [Текст] / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клинич. лаб. диагностика. – 2005. – №6. – С. 15- 18.
46. Модуляция апоптоза мононуклеаров в условиях окислительного стресса [Текст] / В.В. Новицкий [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 2008.– Т.145, №3.– С. 251-254.

47. Никитина, Ю.В. Изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в раннем онтогенезе [Текст] / Ю.В. Никитина, И.В. Мухина // Вестн. Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2009. – № 6 (1). – С. 124–131.
48. Новиков, Д.К. Клеточные методы иммунодиагностики [Текст] / Д.К. Новиков, В.И. Новикова. – Минск, 1979. – 222 с.
49. Об участии лейкоцитов в патогенезе первичных форм хронических заболеваний вен нижних конечностей / И.Ю. Богачев [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Т.17, №3. – С. 71-74.
50. Окислительная модификация белков и система глутатиона при модуляции редокс-статуса клеток эпителия молочной железы [Текст] / Е.А. Степовая [и др.] // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, вып. 1. – С. 64-68.
51. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения [Текст] / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т.41, № 1. – С.24-26.
52. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования [Текст] / Л.Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2010. – №1. – С. 74-78.
53. Окислительная модификация белков эритроцитов крови больных хронической болезнью почек до и после диализа [Текст] / Л.Е. Муравлева [и др.] // Международный журнал экспериментального образования. – 2010. – №11. – С. 98.
54. Окислительное карбонилирование белков стенки сосудов в динамике экспериментального венозного тромбоза [Текст] / Н.В. Фомина [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. – №1. – С. 29-34.
55. Окислительный стресс в модуляции апоптоза нейтрофилов в патогенезе острых воспалительных заболеваний [Текст] / Н.В. Рязанцева [и др.] // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2010. – Т.30, №5. – С. 58-63.

56. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания [Текст] / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, И.А. Бондарь, В.А. Труфакин.– Новосибирск: АРТА, 2008.– 284 с.
57. Осяева, М.К. Окислительный стресс при гипертермии / М.К. Осяева, А.К. Тихазе, В.З. Ланкин // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.– 2016.– Т.1, №3(109), Часть II.– С. 124-127.
58. Оценка окислительной модификации белков у больных хроническими распространенными дерматозами [Текст] / Т.В. Копытова [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. – 2014. – №2. – С. 41-44.
59. Панин, Л.Е. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении [Текст] / Л.Е. Панин, Н.Н. Маянская. – Новосибирск: Издательство «Наука» СО, 1987.
60. Патент 2524667 РФ, МКИ G01N33/52. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях [Текст] / М.А. Фомина [и др.]. – заявл. 21.01.2013; опубл. 27.07.2014. – Бюл. № 21. – 9 с.
61. Покровский, А.А. Лизосомы [Текст] / А.А. Покровский, В.А. Тутельян. – М.: Наука, 1976.
62. Покровский, А.В. Значение гипергомоцистеинемии при сосудистых заболеваниях [Текст] / А.В. Покровский, Р.М. Догужиева // Анналы хирургии.– 2009.– №1.– С. 5-8.
63. Пупышев, А.Б. Пермеабиллизация лизосомных мембран как апоптогенный фактор [Text] / А.Б. Пупышев // Цитология.– 2011.– Т. 53, № 4.– С. 313-324.
64. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов [Текст] / Е.А. Степовая [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 2008.– Т.146, №12.– С. 646-650.
65. Реутов, В.П. Проблемы оксида азота и цикличности в биологии и медицине [Текст] / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицын // Успехи совр. биологии.– 2005.– Т.125, №1.– С. 41-65.

66. Роль индукции и ингибирования синтеза оксида азота в регуляции апоптоза нейтрофилов крови в условиях окислительного дисбаланса [Текст] / Н.В. Рязанцева [и др.] // Биомедицинская химия.– 2010.– Т. 56, №5.– С. 587-595.
67. Соотношение между липопероксидацией и окислительной модификации белка в печени в динамике тридцатисуточной гипокинезии [Текст] / Т.Г. Тимофеева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – №2. – С. 143-146.
68. Способ оценки селективного изменения компарментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ [Текст] / М.А. Фомина [и др.] // Наука молодых (Eruditio Juvenium).– 2018.– Т.6, №2.– С. 277-284.
69. Стариков, Ю.В. Роль молекул оксида азота в программированной гибели нейтрофилов при окислительном стрессе [Текст]: автореф. дис.... канд. мед. наук / Ю.В. Стариков.– Новосибирск, 2008. – 22 с.
70. Структурные изменения сосудистой стенки при экспериментальном моделировании венозного тромбоза [Текст] / Ю.С. Небылицин [и др.] // Медицинский журнал. –2007. – №4. – С. 82-86.
71. Тихомирова, Ю.Р. Показатели липидного обмена и окислительной модификации белков при метаболических нарушениях [Текст] / Ю.Р. Тихомирова, К.Н. Конторщикова // Биорадикалы и Антиоксиданты. – 2015. – Т.2, №1. – С. 62-66.
72. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю.И. Губский [и др.] // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т. 8, №3. – С. 20-27.
73. Толочко, З.С. Окислительная модификация белков в крови крыс при повреждении капсаицин-чувствительных нервов и изменении уровня оксида азота [Текст] / З.С. Толочко, В.К. Спиридонов // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 1. – С. 77- 84.
74. Участие тиолдисульфидной системы в регуляции окислительной модификации белков в нейтрофилах при окислительном стрессе [Текст] / Е.А.

Степовая [и др.] // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2010. – Т. 30, № 5. – С. 64-69.

75. Фомина, М.А. Влияние L-аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ в эксперименте и при стимуляции оксидативного стресса *in vitro* [Текст] / М.А. Фомина, А.М. Кудлаева // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96, №5. – С. 876-882.

76. Фомина, М.А. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота [Текст] / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 192 с.

77. Фомина, Н.В. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ лейкоцитов при *in vitro* моделированном оксидативном стрессе [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина // Цитокины и воспаление. – 2012. – Т. 11, №3. – С. 156-158.

78. Функциональные свойства и окислительная модификация белков нейтрофилов и плазмы крови при внебольничной пневмонии [Текст] / Е.А. Степовая [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. – 2010. – № 3. – С. 18-21.

79. Шевелькова, А.А. Особенности окислительной модификации белков и функционального состояния эритроцитов при беременности, осложненной хронической плацентарной недостаточностью [Текст] / А.А. Шевелькова, Э.К. Айламазян, И.И. Евсюкова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2015. – Т. 64, вып. 5. – С. 62-68.

80. Шматко, Н.Ю. Новые полимерные материалы на основе миметиков природных доноров монооксида азота (NO) [Текст] / Н.Ю. Шматко // Успехи в химии и химической технологии. – 2015. – Т. 29, №10. – С. 84-86.

81. Шмелева, В.М. Состояние окислительной и антиокислительной систем у больных с атеросклерозом при наличии и отсутствии гипергомоцистеинемии [Текст] / В.М. Шмелева, Л.П. Рыбакова // Казан. мед. журн. – 2008. – Т.89, №3. – С. 281-285.

82. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота [Текст] / М.В. Покровский [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т.71, №2. – С. 29-31.
83. 1,2,4-thiadazole: a novel cathepsin B inhibitor [Text] / R. Leung-Toung [et al.] // Bioorg. Med. Chem.– 2003.–Vol.11.– P. 5529-5537.
84. 2-Phenyl-9H-purine-6-carbonitrile derivatives as selective cathepsin S inhibitors [Text] / J.Q. Cai [et al] // Bioorg. Med. Chem. Lett.– 2010.– Vol.20.– P. 4447-4450.
85. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter I and endothelial nitric-oxide synthase may explain the “arginine paradox” [Text] / K.K. McDonald [et al.] // J. Biol. Chem.– 1997.– Vol. 272.– P. 31213-31216.
86. A mammalian functional nitrate reductase that regulate nitrite and nitric oxide homeostasis [Text] / E.A. Jansson [et al.] // Nature Chemical Biology. – 2008. – № 4. – P. 411-417.
87. A X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis of its specificity [Text] / D. Musil [et al.] // EMBO J.– 1991.– Vol.10.– P. 2321-2330.
88. Abrahamson, M. Cystatins [Text] / M. Abrahamson, M. Alvarez-Fernandez, C.M. Natanson // Biochem. Soc. Symp.– 2003.– Vol.70.– P. 179-199.
89. Acid-dependent viral entry [Text] / A. Vázquez-Calvo [et al.] // Virus Res.– 2012.– Vol.167.– P. 125–137. doi:10.1016/j.virusres.2012.05.024
90. Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial hyaline cartilage in osteoarthritis [Text] / Y.T. Kontinen [et al] // Arthritis Rheum.– 2002.– Vol.46.– P. 953-960.
91. Adaptor protein LAPF recruits phosphorylated p53 to lysosomes and triggers lysosomal destabilization in apoptosis [Text] / N. Li [et al.] // Cancer Res.– 2007.– Vol.67.– P. 11176–11185. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2333
92. Aggarwal, N. Cathepsin B multiple roles in cancer [Text] / N. Aggarwal, B.F. Sloane // Proteomics Clin. Appl.– 2014.– Vol.8.– P. 427-437.

93. Alderton, W.K. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition [Text] / W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 357. – P. 593-615.
94. Alvares, B. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins [Text] // B. Alvares, R. Radi // *Amino Acids.* – 2003. – Vol. 25. – P. 295-311.
95. An N-terminal domain of adenovirus protein VI fragments membranes by inducing positive membrane curvature [Text] / O. Maier [et al.] // *Virology.* – 2010. – Vol. 402. – P. 11–19. doi:10.1016/j.virol.2010.03.043
96. Antunes, F. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture [Text] / F. Antunes, E. Cadenas, U.T. Brunk // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 356. – P. 549-555.
97. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide [Text] / J.S. Beckman [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 87. – P. 1620-1624.
98. Asmase Regulates Autophagy and Lysosomal Membrane Permeabilization and its Inhibition Prevents Early Stage Nonalcoholic Steatohepatitis [Text] / R. Fucho [et al.] // *J. Hepatol.* – 2014. – Vol. 61, № 5. – P. 1126-1134.
99. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study [Text] / F. Schulze [et al.] // *Am. Heart J.* – 2006. – Vol. 152. – P. 493-498.
100. Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity [Text] / J.R. Pungercar [et al.] // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276. – P. 660-668.
101. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process [Text] / J. Rozman [et al.] // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 459. – P. 358-362.
102. Avicinylation (thioesterification): a protein modification that can regulate the response to oxidative and nitrosative stress [Text] / V. Haridas [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 10088-10093.

103. Aykac-Toker, G. Effect of peroxynitrite on glutaredoxin [Text] / G. Aykac-Toker, S. Bulgurcuoglu, N. Kocak-Toker // *Hum. Exp. Toxicol.*– 2001.– Vol. 20.– P. 373-376.
104. Aziridide-based inhibitors of cathepsin L: synthesis, inhibition activity, and docking studies [Text] / R. Vicik [et al.] // *Chem. Med. Chem.*– 2006.– Vol.1.– P.1126-1141.
105. BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells [Text] / P. Rammer [et al.] // *Mol. Cancer Ther.*– 2010.–Vol.9.– P. 24–32. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0559
106. Baraibar, M.A. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging [Text] / M.A. Baraibar, R. Ladouce, B. Friguet // *Journal of Proteomics.* – 2013. –Vol.92. – P. 67-70.
107. Barbarin, A. Procathepsin L secretion, which triggers tumor progression, is regulated by Rab4A in human melanoma cells [Text] / A. Barbarin, R. Frade // *Biochem. J.*– 2011.– Vol. 437, № 1.– P. 97-107.
108. Barrett, A.J. Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L [Text] / A.J. Barrett, H. Kirschke // *Methods in Enzymol.* – 1981. – Vol. 80. – P.535-561.
109. Baylis, C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease [Text] / C. Baylis // *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*– 2006.– Vol. 2, № 4.– P. 209-220.
110. Benzoylalanine derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability [Text] / T. Sasaki [et al.] // *J. Med. Chem.*– 2003.– Vol. 46.– P. 2404-2412.
111. Berlett, B.S. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress [Text] / B.S. Berlett, E.R. Stadtman // *The journal of biological chemistry.* – 1997. –Vol. 272, № 33. – P. 20313–20316.
112. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis [Text] / M.E. Guicciardi [et al.] // *Gastroenterology.*– 2005.– Vol.129.– P. 269–284.

113. Biomarkers of protein oxidation in human disease [Text] / A. Garcia-Garcia [et al.] // *Curr. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 12, № 6. – P. 681-697.
114. Blomgar, R. Cathesin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization [Text] / R. Blomgar, L. Zheng, O. Stendahl // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2007. – Vol. 81. – P. 1213-1223.
115. Böger, R.H. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor [Text] / R.H. Böger // *Cardiovascular Research.* – 2003. – Vol. 59. – P. 824-833.
116. Boya, P. Lysosomal function and dysfunction: Mechanism and disease [Text] / P. Boya // *Antioxid Redox Sig.* – 2012. – Vol. 17. – P. 766–774.
117. Brattström, L. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? [Text] / L. Brattström, D.E.L. Wilcken // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2000. – Vol. 72. – P. 315–23.
118. Brix, K. Lysosomal proteases: revival of the sleeping beauty / K. Brix // *Lysosomes* / ed.: P. Saftig. – Georgetown (TX): Springer, 2005. – P. 50-59.
119. Brömme, D. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects [Text] / D. Brömme, F. Lecaille // *Expert. Opin. Investig. Drug.* – 2009. – Vol. 18. – P. 585-600.
120. Brömme, D. Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis [Text] / D. Brömme, S. Wilson // *Extracellular Matrix Degradation* / eds.: W.C. Parks, R.P. Mecham. – Berlin: Springer, 2011. – P. 23-51.
121. Brosman, M.E. Renal arginine metabolism [Text] / M.E. Brosman, J.T. Brosman // *J. Nutr.* – 2004. – Vol. 134 (Suppl. 10) . – P. 2791-2795.
122. Butterfield, D. A. Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease [Text] / D.A. Butterfield, I. Dalle-Donne // *Mass Spectrometry Reviews.* – 2014. – Vol. 33. – P. 1–6.
123. Cai, Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health [Text] / Z. Cai, L.-J. Yan // *Journal of Biochemical and Pharmacological Research.* – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 15-26.

124. Calpains mediate epithelial-cell death during mammary gland involution: mitochondria and lysosomal destabilization [Text] / T. Arnandis [et al.] // *Cell Death Differ.*– 2012.– Vol.19, № 9.– P. 1536-48. doi: 10.1038/cdd.2012.46.
125. Caplin, B. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in the biology of disease: markers, mediators and regulators? [Text] / B. Caplin, J. Leiper // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*– 2012.– Vol. 32, № 6.– P. 1343-1353.
126. Cathepsin B Activity Initiates Apoptosis via Digestive Protease Activation in Pancreatic Acinar Cells and Experimental Pancreatitis [Text] / M. Sandler [et al.] // *J Biol Chem.* – 2016. – Vol. 291, № 28. – P.14717-31. doi: 10.1074/jbc.M116.718999.
127. Cathepsin B inhibition interferes with metastatic potential of human melanoma: an *in vitro* and *in vivo* study [Text] / P. Matarrese [et al.] // *Mol. Cancer.*– 2010.– Vol.9.– P.207.
128. Cathepsin B inhibition limits bone metastasis in breast cancer [Text] / N.P. Withana [et al.] // *Cancer Res.*– 2012.– Vol.72.– P. 1199-1209.
129. Cathepsin C inhibitors: property optimization and identification of a clinical candidate [Text] / M. Furber [et al.] // *J. Med. Chem.*– 2014.– Vol. 57.– P. 2357-2367.
130. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease [Text] / S.P. Lutgens [et al.] // *FASEB J.*– 2007.– Vol.21.– P. 3029-3041.
131. Cathepsin K deficiency in pycnodysostosis results in accumulation of non-digested phagocytosed collagen in fibroblasts [Text] / V. Everts [et al.] // *Calcif. Tissue Int.*– 2003.– Vol.73.– P.380-386.
132. Cathepsins and cystatin C in atherosclerosis and obesity [Text] / J.C. Lafarge [et al.] // *Biochimie.*– 2010.– Vol. 92.– P. 1580-1586.
133. Cathepsins D and L reduce the toxicity of advanced glycation end products [Text] / S. Grimm [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.*– 2012.– Vol.52.– P. 1011-1023.
134. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters [Text] / F. Verrey [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2004. – Vol. 447. – P. 532-542.

135. Caveolar localization of arginine regeneration enzymes, argininesuccinate synthase, and lyase, with endothelial nitric oxide synthase [Text] / B.R. Flam [et al.] // Nitric Oxide. – 2001. – Vol.5. – P. 187-197.

136. Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis [Text] / S. Shiva [et al.] // Nature Chemical Biology. – 2006. – № 2. – P. 486-493.

137. Chang, C.I. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages [Text] / C.I. Chang, J.C. Liao, L. Kuo // Am. J. Physiol.– 1998.– Vol. 274.– P. H342-H348.

138. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues [Text] / H. Li [et al.] // Biochemistry. – 2003. – Vol. 42. – P. 1150-1159.

139. Chasis, J.A. Erythrocyte Membrane Deformability and Stability. Two Distinct Membrane Properties that are Independently Regulated by Skeletal Protein Associations [Text] / J.A. Chasis, N. Mohands // J. Cell. Biol. – 1986. – Vol. 103. – P. 343.

140. Ciechanover, A. Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting [Text] /A. Ciechanover // Biochim. Biophys. Acta.– 2012.– Vol.1824.– P. 2-12.

141. Circulating microparticles carry a functional endothelial nitric oxide synthase that is decreased in patients with endothelial dysfunction [Text] / P. Horn [et al.] // J. Am. Heart Assoc. – 2013. – № 2. – P.e003764.

142. Cirino, G. W. Nitric Oxide and Inflammation [Text] / G.W. Cirino, E. Distrutti, L. John // Inflammation& Allergy - Drug Targets.– 2006.– №5.– P.115-119.

143. Čolak, E. New markers of oxidative damage to macromolecules [Text] / E. Čolak // JMB. – 2008. – P. 1-16.

144. Conformation flexibility and allosteric regulation of cathepsin K [Text] / M. Novinec [et al.] // Biochem. J.– 2010.– Vol.429, №2.– P. 379-389.

145. Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide [Text] / M. Brutori [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2004. – Vol. 1655. – P. 365-371.
146. Conus, S. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses [Text] / S. Conus, H.U. Simon // *Biochem. Pharmacol.*– 2008.– Vol.76.– P. 1374-1382.
147. Converging evidence of mitochondrial dysfunction in a yeast model of homocysteine metabolism imbalance [Text] / K. Arum [et al.] // *The Journal of Biological chemistry.*– 2011.– Vol. 286, №24.– P. 21779-21795.
148. Cortese-Krott, M.M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? [Text] / M.M. Cortese-Krott, M. Kelm // *Redox Biology.* – 2014. – Vol. 2. – P. 251-258.
149. Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease [Text] / G. Guncar [et al.] // *Structure.*– 2000.– Vol.8.– P. 305-313.
150. Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine [Text] / J. Sivaraman [et al.] // *J. Mol. Biol.*– 2000.– Vol.295.– P. 939-951.
151. Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 angstrom resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defined cathepsin H aminopeptidase function [Text] / G. Guncar [et al.] // *Structure.*– 1998.– Vol.6.– P. 51-61.
152. Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite [Text] / S.N. Savvides [et al.] // *J. Biol. Chem.*– 2002.– Vol. 277.– P. 2779-2784.
153. Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen [Text] / M. Podobnik [et al.] // *J. Mol. Biol.*– 1997.– Vol.271.– P. 774-788.
154. Cyclic ketone inhibitors of the cysteine protease cathepsin K [Text] / R.W. Marquis [et al.] // *J. Med. Chem.*– 2001.– Vol.44.– P. 725-736.

155. Cystatins of parasitic organisms [Text] / C. Klotz [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.*– 2011.– Vol. 712.– P. 208-221.
156. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers [Text] / V. Turk [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1824. – P. 68–88.
157. Cysteine protease cathepsins in atherosclerosis-based vascular disease and its complications [Text] / X.W. Cheng [et al.] // *Hypertension.*– 2011.– Vol.58.– P. 978-986.
158. Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer [Text] / J. Kos [et al.] // *Int. J. Biol. Markers.*– 2000.– Vol.15.– P. 84-89.
159. Deoxymoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration [Text] / S. Shiva [et al.] // *Circulation Research.* – 2007. – Vol. 100. – P. 654-661.
160. Derivatives of 6-cinnamamido-quinoline-4-carboxamide impair lysosome function and induce apoptosis [Text] / H.H. Kuo [et al.] // *Oncotarget.*– 2016.– Vol.7, № 25.– P. 38078-38090. doi: 10.18632/oncotarget.9348.
161. Design of selective cathepsin inhibitors [Text] / P.A. Bethel [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.*– 2009.– Vol.19.– P. 4622-4625.
162. Design, synthesis, and optimization of novel epoxide incorporating peptidomimetics as selective calpain inhibitors [Text] / I.T. Schiefer [et al.] // *J. Med. Chem.*– 2013.– Vol.56.– P. 6054-6068.
163. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins [Text] / R.L. Levine [et al.] // *Methods of enzymology.* – 1990. – Vol. 186. – P. 464–78.
164. Determination of cathepsin B expression may offer additional prognostic information for ovarian cancer patients [Text] / A. Scorilas [et al.] // *Biol. Chem.*– 2002.– Vol.383.– P. 1297-1303.
165. Development of cell-active non-peptidyl inhibitors of cysteine cathepsins [Text] / D. Dana [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.*– 2013.– Vol.21.– P. 2975-2987.

166. Differential Carbonilation of Proteins as a Function of *in vivo* Oxidative Stress [Text] / A.S. Madian [et al.] // J. Proteom Res.– 2011.– Vol.10, № 9.– P. 3959-3972.
167. Dinavahi, R. Relationship of homocysteine with cardiovascular disease and blood pressure [Text] / R. Dinavahi, B. Falkner // J. Clin. Hypertens (Greenwich). – 2004.– Vol. 6, № 9.– P. 494-498.
168. Dinitrosyl iron complexes - structure and biological functions [Text] / H. Lewandowska [et al.] // Postepy Biochem.– 2010.– Vol. 56, № 3.– P. 298-304.
169. Dipeptidyl nitrile inhibitors of cathepsin L [Text] / N. Asaad [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett.– 2009.– Vol.19.– P. 4280-4283.
170. Doerflinger, M. BH3-only proteins: a 20-year stock-take [Text] / M. Doerflinger, J.A. Glab, H. Puthalakath // FEBS J. – 2015. – Vol.282. – P. 1006–1016. DOI: 10.1080/15376510701624001
171. Dudzinski, D. Life History of eNOS: Partners and Pathways [Text] / D. Dudzinski, T. Michel // Cardiovasc. Res.– 2007.– Vol. 75, № 2.– P. 247-260.
172. Duongle, T. Cathepsin K Inhibition: A New Mechanism for the Treatment of Osteoporosis [Text] / T. Duongle, A.T. Leung, B. Langdahl // Calcif. Tissue Int.– 2016.– Vol. 98, № 4.– P. 381-97.
173. Effect of glutamate on lysosomal membrane permeabilization in primary cultured cortical neurons [Text] / M. Yan [et al.] // Mol Med Rep. – 2016. – Vol. 13, № 3. – P. 2499-505. doi: 10.3892/mmr.2016.4819.
174. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets [Text] / O.Vasiljeva [et al.] // Curr. Pharm. Des.– 2007.– Vol.13.– P. 387-403.
175. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs [Text] / G. Wu [et al.] // J. Nutr.– 1997.– Vol. 127.– P. 2342-2349.
176. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with

cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension [Text] / H. Brunner [et al.] // *J. Hypertens.*– 2005.– Vol. 23.– P. 233-246.

177. Equistatin, a protease inhibitor from the sea anemone *Actinia equine*, is composed of three structural and functional domains [Text] / B. Strukelj [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 2000.– Vol. 269.– P. 732-736.

178. ESeroS-GS Protects Neuronal Cells from Oxidative Stress by Stabilizing Lysosomes [Text] / Na Yang [et al.] // *Molecules.* – 2016. – Vol. 21, № 6. – P. 637. doi:10.3390/molecules21060637

179. Eskelinen, E.-L. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease [Text] / E.-L. Eskelinen, P. Saftig // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1793. – P. 664–673.

180. Exogenous Nitric Oxide (NO) Interferes with Lead (Pb)-Induced Toxicity by Detoxifying Reactive Oxygen Species in Hydroponically Grown Wheat (*Triticum aestivum*) Roots [Text] / G. Kaur [et al.] // *Plos One.* – 2015.– Vol.10, №9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0138713>

181. Feng, C. Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: Electron Transfer and Interdomain Interactions [Text] / C. Feng // *Coord. Chem. Rev.*– 2012.– Vol. 256, № 3-4.– P. 393-411.

182. Ferri, K.F. Organelle-specific initiation of cell death pathways [Text] / K.F. Ferri, G. Kroemer // *Nat. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 3. – P. E255–E263.

183. Fomina, M.A. Cathepsins B, L and H splenocytes as the secondary antioxidant systems in the conditions of carbonyl stress [Text] / M.A. Fomina, Y.V. Abalenikhina // *Advances in Biochemistry.*– 2015.– Vol.3, №1.– C. 5-8.

184. Fonović, M. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation [Text] / M. Fonović, B. Turk // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2014.– Vol.1840, №8.– P. 2560-2570.

185. Ford, P.C. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide [Text] / P.C. Ford, D.A. Wink, D.M. Stanbury // FEBS.– 1993.– Vol. 326.– P. 1-3.

186. Förstermann, U. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms [Text] / U. Förstermann, H. Kleinert // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. – 1995. – Vol. 352. – P. 351-364.

187. Förstermann, U. Nitric oxide synthases: Regulation and function [Text] / U. Förstermann, W.C. Sessa // European Heart Journal.– 2012.– P.829-837.

188. Fuchs, R. Uncoating of human rhinoviruses [Text] / R. Fuchs, D. Blaas // Rev. Med. Virol.– 2010.– Vol.20.– P. 281–7. doi:10.1002/rmv.654

189. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine [Text] / A. Lass [et al.] // Mol. Pharmacol.– 2002.– Vol. 61.– P. 1081-1088.

190. Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interaction [Text] / D. Caglic [et al.] // J. Biol. Chem.– 2007.– Vol.282.– P. 33076-33085.

191. Gocheva, V. Cysteine Cathepsins and the cutting edge of cancer invasion [Text] / V. Gocheva, J.A. Joyce // Cell Cycle.– 2007.– Vol.6.– P. 60-64.

192. Goldberg, A.L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins [Text] / A.L. Goldberg // Nature.– 2003.– Vol.426.– P. 895-899.

193. Guoyao, W.U. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond [Text] / W.U. Guoyao, S.M. Morris, Jr // Biochem. J.– 1998.– Vol. 336.– P. 1-17.

194. Guthikonda, S. Homocysteine: role and implications in atherosclerosis [Text] / S. Guthikonda, W.G.Haynes // Curr. Atheroscler. Rep.– 2006.– Vol. 8, № 2.– P. 100-106.

195. Habib, S. Biochemistry of nitric oxide [Text] / S. Habib, A. Ali // Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2011. – Vol. 26, № 1.– P. 3-17.

196. Haglund, K. Ubiquitylation and cell signaling [Text] / K. Haglund, I. Dikis // *EMBO J.*– 2005.– Vol.24.– P. 3353-3359.
197. Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress [Text] / B. Halliwell // *Biochem. Soc. Trans.*– 2007.– Vol.35.– P. 1147-1150.
198. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation [Text] / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.*– 2011.– Vol.144.– P. 646-674.
199. Haplo, L. BH3-only proteins in apoptosis at a glance [Text] / L. Haplo, A. Strasser, S. Cory // *J. Cell Sci.*– 2012.– Vol.125.– P. 1081–1087. doi:10.1242/jcs.090514
200. Hasilik, A. Intracellular trafficking of lysosomal proteins and lysosomes [Text] / A. Hasilik, C. Wrocklage, B. Schroder // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*– 2009.– Vol. 47.– P. S18-S33.
201. Hawkins, C.L. Quantification of protein modification by oxidants [Text] / C.L. Hawkins, Ph.E. Morgan, M.J. Davies // *Free Radical Biology&Medicine.* – 2009. – Vol.46. – P. 965-988.
202. Heparin normalizes allergen-induced nitric oxide deficiency and airway hyperresponsiveness [Text] / H. Maarsingh [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 142. – P. 1293-1299.
203. Hershko, C. Mechanism of iron toxicity [Text] / C. Hershko // *Food and Nutrition Bulletin.*– 2007.– Vol. 28, №4.– P. S500-S509.
204. High molecular weight kininogen activates B(2) receptor signaling pathway in human vascular endothelial cells [Text] / D. Kolte [et al.] // *J. Biol. Chem.*– 2011.– Vol.286.– P. 24561-24571.
205. Hønsi, T.G. Activity and localisation of the lysosomal marker enzymes acid phosphatase, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, and beta-galactosidase in the earthworms *Eisenia fetida* and *E. veneta* [Text] / T.G. Hønsi, J. Stenersen // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*– 2000.– Vol. 125, № 3.– P. 429-437.
206. Hook, G.R. The cysteine protease inhibitor, E64d, reduces brain

amyloid- β and improves memory deficits in Alzheimer's disease animal models by inhibiting cathepsin B, but not BACE1, β -secretase activity [Text] / G.R. Hook, V. Hook, M. Kindy // J. Alzheimers Dis.– 2011.– Vol.26.– P.387-408.

207. Hossain, M. Inhibition of nitric oxide synthesis enhances leukocyte rolling and adhesion in human microvasculature [Text] / M. Hossain, S.M. Qadri, L. Liu // Journal of Inflammation.– 2012.– Vol. 9.– P. 28-36.

208. Human neuroglobin function as a redox-regulated nitrite reductase [Text] / M. Tiso [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2011. – Vol. 286. – P. 18277-18289.

209. Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsin L and S but not by autocatalytic processing [Text] / S.W. Dahl [et al.] // Biochemistry.– 2001.– Vol.40.– P. 1671-1678.

210. Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease [Text] / M.M. Cortese-Krott [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 120. – P. 4229-4237.

211. Huntington, J.A. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation [Text] / J.A. Huntington, R.J. Read, R.W. Carrell // Nature.– 2000.– Vol.407.– P. 923-926.

212. Hurpin is a selective inhibitor of lysosomal cathepsin L and protects keratinocytes from ultraviolet-induced apoptosis [Text] / T. Welss [et al.] // Biochemistry.– 2003.– Vol. 42.– P. 7381-7389.

213. Ibiza, S. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses [Text] / S. Ibiza, J.M. Serrador // Inmunología.– 2008.– Vol. 27, № 3.– P. 103-117.

214. Ide, N. Vascular endothelial dysfunction [Text] / N. Ide, K. Node // Nihon Rinsho.– 2009.– Vol.67,№ 4.– P. 701-706.

215. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain [Text] / K. Brak [et al.] // J. Am. Chem. Soc.– 2008.– Vol.130.– P. 6404-6410.

216. Identification of cytoskeleton-associated proteins essential for lysosomal stability and survival of human cancer cells [Text] / L. Groth-Pedersen [et al.] // PLoS ONE.– 2012.– Vol.7.– e45381. doi:10.1371/journal.pone.0045381

217. Imaging Pulmonary Inducible Nitric Oxide Synthase Expression with PET [Text] / H.J. Huang [et al.] // J. Nucl. Med.– 2015.– Vol.56.– P. 76-81.

218. Impairment of lysosomal integrity by B10, a glycosylated derivative of betulinic acid, leads to lysosomal cell death and converts autophagy into a detrimental process [Text] / P. Gonzalez [et al.] // Cell Death Differ.– 2012.– Vol.19.– P. 1337–1346. doi:10.1038/cdd.2012.10

219. Inactivation of human Cu, Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical [Text] / B. Alvares [et al.] // Free Radic. Biol. Med.– 2004.– Vol. 37.– P. 813-822.

220. Increased cathepsin K levels in human atherosclerotic plaques are associated with plaque instability [Text] / C.F. Zhao [et al.] // Exp. Ther. Med.– 2017.– Vol.14.– P. 3471-3476.

221. Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting anxiogenic-like effect of predator exposure [Text] / A.C. Campos [et al.] // Behav. Brain Res.– 2013.– Vol. 256.– P. 391-397.

222. Induction of Lysosomal Biogenesis in Atherosclerotic Macrophages Can Rescue Lipid-Induced Lysosomal Dysfunction and Downstream Sequelae [Text] / R. Emanuel [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2014.– Vol.34, № 9.– P. 1942–1952.

223. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats [Text] / J. Zhou [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2009. – Vol. 29. – P. 863–869.

224. Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins [Text] / T. Sasaki [et al.] // J. Enzyme Inhib. Med. Chem.– 1990.–

Vol.3.– P. 195-201.

225. Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen [Text] / K. Masumoto [et al.] // J. Biol. Chem.– 2003.– Vol. 278.– P. 45296-45304.

226. Innate immune recognition triggers secretion of lysosomal enzymes by macrophages [Text] / R.L. Lackman [et al.] // Traffic.– 2007.– Vol.8.– P. 1179-1189.

227. Interaction of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase [Text] / N. Kuzkaya [et al.] // J. Biol. Chem.– 2003.– Vol. 278.–P. 22546-22554.

228. Investigation into the distinct subcellular effects of docosahexaenoic acid loaded low-density lipoprotein nanoparticles in normal and malignant murine liver cells [Text] / L.R. Moss [et al.] // Biochim. Biophys. Acta.– 2016.– Vol.1860, Is. 11 (part A).– P. 2363-2376.

229. Jakubowski, H. Chemical biology of homocysteinethiolactone and related metabolites [Text] / H. Jakubowski, R. Głowacki // Adv. Clin. Chem. – 2011. – Vol. 55. – P. 81-103.

230. Jin, M. Regulation of autophagy: Modulation of the size and number of autophagosomes [Text] / M. Jin, D.J. Klionsky // FEBS Letters.– 2014.– Vol.588.– P. 2457-2463.

231. Jones, A.L. Histidine-rich glycoprotein: a novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems [Text] / A.L. Jones, M.D. Hulett, C.R. Parish // Immunol. Cell Biol.– 2005.– Vol.83.– P. 106-118.

232. Jones, L.A. Spectrophotometric Studies of Some 2,4-Dinitrophenylhydrazones [Text] / L.A. Jones, J.C. Holmes, R.B. Seligman // Analytical chemistry. – 1956. – Vol. 28, №2. – P. 191-198.

233. Joshi, M.S. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide [Text] / M.S. Joshi, J.L. Ponthier, J.R. Lancaster Jr // Free Radic. Biol. Med.–

1999. – Vol. 27, № 11-12. – P. 1357-66.

234. Jung, T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I: Structure of proteasomes [Text] / T. Jung, T. Grune // *Redox Biology*. – 2013. – №1. – P. 178–182.

235. Jung, T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II – protein oxidation and proteasomal degradation [Text] / T. Jung, A. Höhn, T. Grune // *Redox Biology*. – 2014. – №2. – P. 99–104.

236. Jung, T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III – Redox regulation of the proteasomal system [Text] / T. Jung, A. Höhn, T. Grune // *Redox Biol.* – 2014. – №2. – P. 388–394.

237. Kanner, J. Nitric oxide an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin [Text] / J. Kanner, S. Harel, R. Granit // *Lipids*. – 1992. – Vol. 27. – P.46-49.

238. Kanner, J. Nitric oxide as an antioxidant [Text] / J. Kanner, S. Harel, R. Granit // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1991. – Vol. 289. – P. 130-136.

239. Karlsson, M. Attenuation of iron-binding proteins in ARPE-19 cells reduces their resistance to oxidative stress [Text] / M. Karlsson, T. Kurz // *Acta Ophthalmol.* – 2016. – Vol.94, № 6. – P. 556-64. doi: 10.1111/aos.13076.

240. Keto-1,3,4-oxadiazoles as cathepsin K inhibitors [Text] / J.T. Palmer [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2006. – Vol. 16. – P. 2909-2914.

241. Kiffin, R. Oxidative Stress and Autophagy [Text] / R. Kiffin, U. Bandyopadhyay, A.M. Cuervo // *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*. – 2005. – Vol. 8, №1&2. – P. 152-162.

242. Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors [Text] / G. Lalmanach [et al.] // *Biochimie*. – 2010. – Vol.92. – P. 1568-1579.

243. Kordis, D. Phylogenomic analysis of the cystatin superfamily in eukaryotes and procaryotes [Text] / D. Kordis, V. Turk // *BMC Evol. Biol.* – 2009. – Vol.9. – P. 266.

244. Krumdieck, C.L. Mechanisms of Homocysteine Toxicity on Connective Tissues: Implication for Morbidity of Aging [Text] / C.L. Krumdieck, C.W. Prince // The journal of nutrition. – 2000. – P. 365-368.

245. L-arginine increases plasma homocysteine in apoE^{-/-}/iNOS^{-/-} double knockout mice [Text] / D.E. Handy [et al.] // Cell .Mol. Biol. (Noisy-le-grand) .– 2004.– Vol.50, № 8.–P. 903-909.

246. L-arginine infusion decreases plasma total homocysteine concentrations through increased nitric oxide production and decreased oxidative status in Type II diabetic patients [Text] / M.C. Faldetta [et al.] // Diabetologia.– 2002.– Vol. 45.– P. 1120–1127.

247. L-Arginine supplementation improves rats' antioxidant system and exercise performance [Text] / E.P. Silva Jr [et al.] // Free Radic. Res.– 2017.– Vol. 51, № 3.– P. 281-293.

248. Lee, A. Parallel solution-phase synthesis of mechanism-based cysteine protease inhibitors [Text] / A. Lee, J.A. Ellman // Org. Lett.– 2001.– Vol.3.– P. 3707-3709.

249. Leoncini, G. Effects of homocysteine on L-arginine transport and nitric oxide formation in human platelets [Text] / G. Leoncini, R. Pascale, M.G. Signorello // Eur. J. Clin. Invest.– 2003.– Vol. 33, № 8.–P. 713-719.

250. Leukocyte cathepsin S is a potent regulator of both cell and matrix turnover in advanced atherosclerosis [Text] / R. Nooijer [et al.] // Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2009.– Vol.29.– P. 188-194.

251. Li, H. Characterization of the magnitude and mechanism of aldehyde oxidase-mediated nitric oxide production from nitrite [Text] / H. Li, T.K. Kundu, J.L. Zweier // The Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284. – P. 33850-33858.

252. Li, Z. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resistant chondroitin sulfates [Text] / Z. Li, W.S. Hou, D. Brömme // Biochemistry.– 2000.– Vol.39, №3.– P. 529-536.

253. Lin, Sh. A method for determining the stability of lysosomal membranes in the digestive cells of *Mytilus edulis* [Text] / Sh. Lin, D.J. Steichen Jr. // Mar. Ecol. Prog. Ser.– 1994.– Vol. 115.– P. 237-241.
254. Lin, Y. Intralysosomal Iron Induces Lysosomal Membrane Permeabilization and Cathepsin D-Mediated Cell Death in Trabecular Meshwork Cells Exposed to Oxidative Stress [Text] / Y. Lin, D.L. Epstein, P.B. Liton // IOVS.– 2010.– Vol.51, №12.– P. 6483-6495.
255. LoPachin, R.M. Molecular Mechanisms of the Conjugated a,b-Unsaturated Carbonyl Derivatives: Relevance to Neurotoxicity and Neurodegenerative Diseases [Text] / R.M. LoPachin, D.S. Barber, T. Gavin // Toxicological sciences. – 2008. – Vol. 104, № 2. – P. 235–249.
256. L-Ornithine causes NO deficiency and airway hyperresponsiveness in perfused guinea pig tracheal preparation *in vitro* [Text] / H. Maarsingh [et al.] // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. – 2007. – Vol.375. – P. 151.
257. Lozach, P.Y. Late-penetrating viruses [Text] / P.Y. Lozach, J. Huotari, A. Helenius // Curr.Opin.Virol.– 2011.– Vol.1.– P. 35-43. doi:10.1016/j.coviro.2011.05.004
258. Lübke, T. Proteomics of the Lysosome [Text] / T. Lübke, P. Lobel, D. Sleat // Biochim. Biophys. Acta.– 2009.– Vol.1793, № 4.– P. 625-635.
259. Lundberg, J.O. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics [Text] / J.O. Lundberg, E.Weitzberg, M.T. Gladwin // Nature Reviews Drug Discovery.– 2008. – № 7. – P. 156-167.
260. Lüneburg, N. The Endothelial ADMA/NO Pathway in Hypoxia-Related Chronic Respiratory Diseases [Text] / N. Lüneburg, L. Harbaum, J.K. Hennigs // Biomed. Res. Int.– 2014.– P. 501-612.
261. Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts [Text] / C. Tu [et al.] // Cancer Res.– 2008.– Vol.68.– P.9147-9156.

262. Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer [Text] / V. Turk [et al.] // *Adv. Enzyme Regul.* – 2002. – Vol.42. – P. 285-303.
263. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis [Text] / J. Liu [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*– 2004.– Vol.24.– P. 1359-1366.
264. Lysosomal Cysteine Proteinase Cathepsin S as a Potential Target for Anti-Cancer Therapy [Text] / Wun-Shaing W. Chang [et al.] // *J. Cancer Mol.*– 2007.– Vol.3, № 1.– P. 5-14.
265. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis [Text] / X. Yuan [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 2002.– Vol.99.– P. 6286–6291. doi:10.1073/pnas.092135599
266. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis [Text] / M. Zhao [et al.] // *Eur. J. Biochem.*– 2003.–Vol.270.– P. 3778–3786. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03765.x
267. Lysosomal Labilization [Text] / A. Terman [et al.] // *IUBMB Life.*– 2006.– Vol.58, № 9.– P. 531-539.
268. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion [Text] / P. Boya [et al.] // *J. Exp. Med.*– 2003.– Vol.197.– P. 1323–1334.
269. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis [Text] / J.P. Luzio [et al.] // *J. Cell Sci.*– 2000.– Vol.113.– P. 1515-1524.
270. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death [Text] / U. Repnik [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1824. – P. 22–33.
271. Madian, A.S. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites [Text] / A.S. Madian, F.E. Regnier // *J. Proteom Res.*– 2010.– Vol.9, № 8.– P. 3766-3780.
272. Major histocompatibility complex class II-associated p41 chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L [Text] / T. Bevec [et al.] // *J. Exp. Med.*– 1996.– Vol.183.– P. 1331-1338.

273. Maly, D.J. Combinatorial strategies for targeting protein families: application of proteases [Text] / D.J. Maly, L.L. Huang, J.A. Ellman // *Chem. BioChem.*– 2002.– Vol.3.– P. 17-37.

274. Marcus, J. Homocysteine lowering and cardiovascular disease risk: Lost in translation [Text] / J. Marcus, M.J. Sarnak, V. Menon // *Can. J. Cardiol.*– 2007.–Vol. 23, № 9.– P. 707-710.

275. Martinez-Vicente, M. Protein degradation and aging [Text] / M. Martinez-Vicente, G. Sovak, A. M. Cuervo // *Experimental Gerontology.* – 2005. –Vol. 40. – P. 622–633.

276. Maryanoff, B.E. Inhibitors of proteases and amide hydrolases that employ an α -ketoheterocycle as a key enabling functionality [Text] / B.E. Maryanoff, M.J. Constanzo // *Bioorg. Med. Chem.*– 2008.– Vol.16.– P.1562-1595.

277. McBride, A.E. State of arg: protein methylation at arginine come of age [Text] / A.E. McBride, P.A. Silver // *Cell.*– 2001.– Vol.106.– P. 5-8.

278. Meade, B. R. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides [Text] / B.R. Meade, S.F. Dowdy // *Adv. Drug Deliv. Rev.*– 2007.– Vol.59.– P. 134–140. doi:10.1016/j.addr.2007.03.004

279. Measuring cysteine cathepsin activity to detect lysosomal membrane permeabilization [Text] / U. Replik [et al.] // *Cold Spring Harb Protoc.* – 2015. doi: 10.1101/pdb. prot087114.

280. Mechanisms of the pro- and anti-oxidant action of nitric oxide in atherosclerosis [Text] / R.P. Patel [et al.] // *Cardiovascular Research.*– 2000.– Vol. 47.– P. 465-474.

281. Meyer, J. High-performance liquid chromatographic determination of nitric oxide synthase-related arginine derivatives in vitro and in vivo [Text] / J. Meyer, N. Richter, M. Hecker // *Annal. Biochem.*– 1997.– Vol.247.– P. 11-16.

282. Mihelic, M. Two decades of thyroglobulin type-1 domain research [Text] / M. Mihelic, D. Turk // *Biol. Chem.*– 2007.– Vol.388.– P. 1123-1130.

283. Milstien, S. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function [Text] / S. Milstien, Z.Katusic // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 263. – P. 681-684.

284. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes [Text] / P.R. Castello [et al.] // *Cell Metabolism.* – 2006. – № 3. – P. 277-287.

285. Modification of peptide and protein cysteine thiol groups by conjugation with a degradation product of ascorbate [Text] / P. Kay [et al.] // *Chemical Research in Toxicology.* – 2013. – Vol. 26, № 9. – P. 1333-1339.

286. Mohamed, M.M. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer [Text] / M.M. Mohamed, B.F. Sloane // *Nat. Rev. Cancer.* – 2006. – Vol.6. – P. 764-775.

287. Molecular and biochemical characterization of nitric oxide synthase isoforms and their intracellular distribution in human peripheral blood mononuclear cells [Text] / R. Saluja [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813. – P. 1700-1707.

288. Molecular cloning and Characterization of human endothelial nitric oxide synthase [Text] / P.A. Marsden [et al.] // *FEBS Lett.* – 1992. – Vol. 307. – P. 287-293.

289. Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L and S at physiological pH and redox conditions [Text] / S. Jordans [et al.] // *BMC Biochem.* – 2009. – №10. – P. 23.

290. Montaser, M. CA-074 but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells [Text] / M. Montaser, G. Lalmanach, L. Mach // *Biol. Chem.* – 2002. – Vol.383. – P. 1305-1308.

291. Mori, M. Regulation of Nitric oxide Synthesis and Apoptosis by Arginase and Arginine Recycling [Text] / M. Mori // *J. Nutr.* – 2007. – Vol.137, № 6 (Suppl 2). – P. 1616S-1620S.

292. Morris, S.M., Jr. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginase [Text] / S.M. Morris, Jr // *British Journal of Pharmacology*.– 2009.– Vol.157.– P. 922-930.
293. Mössner, J. Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine [Text] / J. Mössner, R. Hammermann, K. Racké // *Pulm. Pharmacol. Ther.*– 2001.– Vol.14.– P. 297-305.
294. Mount, P.F. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis [Text] / P.F. Mount, D.A. Power // *Acta Physiol. (Oxf)* .– 2006.– Vol. 187.– P. 433-446.
295. Multifunctional roles for serum protein fetuin-A in inhibition of human smooth muscle cell calcification [Text] / J.L. Reynolds [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.*– 2005.– Vol.16.– P. 2920-2930.
296. Murad, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling [Text] / F. Murad // *Biosci. Rep.* – 2004. – Vol. 24, № 4-5. – P. 452-474.
297. Nagaraj, N.S. Hypoxia inhibits TRAIL-induced tumor cell apoptosis: involvement of lysosomal cathepsins [Text] / N.S. Nagaraj, N. Vigneswaran, W. Zacharias // *Apoptosis.* – 2007. – Vol. 12, № 1. – P.125-39.
298. Nakamura, T. Protein S-nitrosylation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases [Text] / T. Nakamura, S.A. Lipton // *Trends Pharmacol. Sci.*– 2016.– Vol. 37, № 1.– P. 73–84.
299. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities [Text] / C. Nathan // *Nat Rev Immunol.*– 2006.– Vol.6 .– P. 173-182.
300. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease [Text] / M.T. Heneka [et al.] // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2001. – Vol.60. – P. 906-916.
301. Newman, Z. L. CA-074Me protection against anthrax lethal toxin [Text] / Z.L. Newman, S.H. Leppla, M. Moayeri // *Infect. Immun.*– 2009.– Vol.77.– P. 4327–4336. doi:10.1128/IAI.00730-09

302. Ngo, J.K. Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging [Text] / J.K. Ngo, L.C. Pomatto, K.J. Davies // *Redox Biol.*– 2013.– Vol.1.– P. 258-264.

303. Niforou, K. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance [Text] / K. Niforou, C. Cheimonidou, I.P. Trougakov // *Redox Biology.*– 2014.– Vol.2.– P. 323-332.

304. Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way [Text] / S.G. Hummel [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine.*– 2006.– Vol.40.– P.501-506.

305. Nitric oxide as a Pro-apoptotic as well as Anti-apoptotic Modulator [Text] / Byung-Min Choi [et al.] // *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.*– 2002.–Vol.35, №1.– P. 116-126.

306. Nitric Oxide in Cell Survival: A Janus Molecule [Text] / V. Calabrese [et al.] // *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING.*– 2009.– Vol.11, №11.– P.2717-2739.

307. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system [Text] / F.L. Ricciardolo [et al.] // *Physiol. Rev.*– 2004.– Vol.84,№ 3.– P. 731-765.

308. Nitric oxide regulates endothelium-dependent vasodilator responses in rabbit hindquarters vascular bed in vivo [Text] / G.A. Cohen [et al.] // *Am. J. Physiol.*– 1996.– Vol. 271.– P. H133-H139.

309. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia [Text] / A.F. Vanin [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS.* – 2007. – Vol. 64. – P. 96-103.

310. Nitric oxide, a biological double-faced janus- Is this good or bad? [Text] / T. Thippeswamy [et al.] // *Histol Histopathol.* –2006.– Vol.21.– P.445-458.

311. Nitric oxide, cell signaling and cell death [Text] / G.A. Blaise [et al.] // *Toxicology.*– 2005.– Vol. 208, Is. 2.– P. 177-192.

312. Nitrite reductase activity of cytochrome C [Text] / S. Basu [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2008. – Vol. 283. – P. 32590-32597.

313. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury [Text] / U.B. Hendhen-Cotta [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – P. 10256-10261.

314. NO synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity [Text] / S. Gambaryan [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2008. – № 6. – P. 1376-1384.

315. Novel Mechanism of Cytotoxicity for the Selective Selenosemicarbazone, 2-Acetylpyridine 4,4-Dimethyl-3-selenosemicarbazone (Ap44mSe): Lysosomal Membrane Permeabilization [Text] / Z. Al-Eisawi [et al.] // J. Med. Chem.– 2016.– Vol.59, № 1.– P. 294-312. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01399.

316. Novinec, M. Cysteine Cathepsin Activity Regulation by Glycosaminoglycans [Text] / M. Novinec, B. Lenarčič, B. Turk // Biomed. Res. Int.– 2014.– Article ID 309718.

317. N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization [Text] / B.R. Crane [et al.] // EMBO J.– 1999.– Vol. 18.– P.6271-6281.

318. Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: development history and design and participant characteristics of LOFT, the long-term odanacatib fracture trial [Text] / H.G. Bone [et al.] // Osteoporos. Int.– 2015.– Vol.26.– P. 699-712.

319. Oliveira, A.S. Cysteine Proteinases and Cystatins [Text] / A.S. Oliveira, J. Xavier-Filho, M.P. Sales // Brazilian Archives of Biology and Technology.– 2003.– Vol.46, №1.– P. 91-104.

320. Ölliner, K. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage [Text] / K. Ölliner, U.T. Brunk // Free Radic. Biol. Med.– 1995.– Vol. 19.– P. 565-574.

321. Oredsson, S.M. Poliamine dependence of normal cell-cycle progression [Text] / S.M. Oredsson // Biochem. Soc. Trans.– 2003.– Vol.31.– P. 366-370.

322. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling [Text] / S.B. Wall [et al.] // Frontiers in Physiology. – 2012. – Vol.3. – Article 369.

323. Oxidative stress induced carbonilation in human plasma [Text] / A.S. Madian [et al.] // *Proteomics*.– 2011.– Vol.74, № 11.– P. 2395-2416.
324. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* – 2007.– Vol. 87. – P. 315-424.
325. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and NO [Text] / R. Radi [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1991.– Vol. 288.– P. 481-487.
326. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influences on peroxynitrite mediated oxidations [Text] / A. Denicola [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1996.– Vol. 333.– P. 49-58.
327. pH Heterogeneity of human and rabbit atherosclerotic plaques; a new insight into detection of vulnerable plaque [Text] / M. Naghavi [et al.] // *Atherosclerosis*.– 2002.– Vol.164.– P. 27-35.
328. Pham-Huy, L.A. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health [Text] / L.A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy // *Int. J. Biomed. Sci.*– 2008.– Vol.4, №2.– P. 89-96.
329. Pišlar, A. Cysteine cathepsins in neurological disorders [Text] / A. Pišlar, J. Kos // *Mol. Neurobiol.*– 2014.– Vol.49.– P.1017-1030.
330. Plasma homocysteine is elevated in COPD patients and is related to COPD severity [Text] / T.A.R Seemungal [et al.] // *International Journal of COPD*.– 2007.– Vol. 2, № 3.– P. 313–321.
331. Polydatin, a natural polyphenol, protects arterial smooth muscle cells against mitochondrial dysfunction and lysosomal destabilization following hemorrhagic shock [Text] / X. Wang [et al.] // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2012. – Vol. 302, № 7. – P. R805-14. doi: 10.1152/ajpregu.00350.2011.
332. Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides / J. Guay [et al.] // *Eur. J. Biochem.*– 2000.– Vol.267.– P. 6311-6318.

333. Potent and selective inhibition of human cathepsin K leads to inhibition of bone resorption *in vivo* in a nonhuman primate [Text] / G.B. Stroup [et al.] // J. Bone Miner Res.– 2001.– Vol.16.– P. 1739-1746.
334. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor [Text] / K. Husnjak [et al.] // Nature.– 2008.– Vol.453.– P. 481-488.
335. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress [Text] / I. Dalle-Donnea [et al.] // Clinica Chimica Acta.– 2003.– Vol.329.– P.23–38.
336. Protein modifications by electrophilic lipoxidation products: Adduct formation, chemical strategies and tandem mass spectrometry for their detection and identification [Text] / Y.V. Vasil'ev [et al.] // Mass Spectrometry Reviews. – 2013. – Vol. 33, № 3. – P. 157-182.
337. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide [Text] / S.R. Jaffrey [et al.] // Nat. Cell Biol.– 2001.– Vol. 3.– P. 193-197.
338. Proteomic and Carbonylation Profile Analysis of Rat Skeletal Muscles following Acute Swimming Exercise [Text] / F. Magherini [et al.] // PLOS ONE. – 2013. –Vol. 8, Is. 8. – P. e71839. URL: www.plosone.org
339. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species [Text] / A. De Milito [et al.] // Cancer Res.– 2007.– Vol.67.– P. 5408—5417.
340. Purdel, N.C. Current Methods Used in Protein Carbonil Assay [Text] / N.C. Purdel, D. Margina, M.Llie // Annual Research&Review in Biology. – 2014. – Vol.4, №12. –P. 2015-2026.
341. Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line [Text] / P.A. Sherman [et al.] // Biochemistry. – 1993. – Vol. 32. – P. 11600-11605.
342. Racké, K. L-arginine Metabolic Pathways [Text] / K. Racké, M. Warnken // The Open Nitric Oxide Journal.– 2010.– Vol.2.– P. 9-19.
343. Radi, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant [Text] / R.Radi // J Biol Chem.– 2013.– Vol. 288, №37.– P. 26464-26472.

344. Radi, R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects [Text] / R. Radi // *Accounts of Chemical Research*. – 2013. – Vol.46. – P.550–559.

345. Raja, B. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent of pepper on nitric oxide, antioxidants and lipid peroxidation markers in L-NAME induced hypertensive rats [Text] / B. Raja, S. Kumar, M. Saravana // *Int. J. Res. Pharm. Sci.* – 2010. – Vol.1, №3. – P. 300-307.

346. Rassaf, T. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues [Text] / T. Rassaf, M. Feelisch, M. Kelm // *Free Radic. Biol. Med.*– 2004.–Vol. 36, № 4 .– P.413-22.

347. Reactivity of peroxynitrite and NO with LDL [Text] / H. Botti [et al.] // *IUBMB Life*.– 2005.– Vol. 57.– P. 407-412.

348. Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans [Text] / O. Vasiljeva [et al.] // *FEBS Lett.*– 2005.– Vol.579.– P. 1285-1290.

349. Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide [Text] / E. Godat [et al.] // *Biol. Chem.*– 2008.– Vol.389.– P. 1123-1126.

350. Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans [Text] / Z. Li [et al.] // *J. Biol. Chem.*– 2004.– Vol.279.– P.5470-5479.

351. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase [Text] / A. Pautz [et al.] // *Nitric Oxide*.– 2010.– Vol. 23, № 2.– P. 75-93.

352. Repnik, U. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: Concepts and challenges [Text] / U. Repnik, M. Česen Hafner, B. Turk // *Mitochondrion*. – 2014. – Vol.19. – P. 49–57.

353. Resistance of cathepsin L compared to elastase to proteolysis when complexed with the serpin endopin 2C, and recovery of cathepsin L activity [Text] / S.R. Hwang [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 2006.– Vol.340.– P. 1238-1243.

354. Retinal proteins modified by 4-hydroxynonenal: Identification of molecular targets [Text] / R.J. Kapphahn [et al.] // *Experimental Eye Research*. – 2006. – Vol. 83. – P. 165e-175.
355. Reversible post-translational modification of protein by nitrated fatty acids *in vivo* [Text] / C. Batthyany [et al.] // *J. Biol. Chem.*– 2006.– Vol. 281.– P. 20450-20463.
356. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases [Text] / D. Turk [et al.] // *Biol. Chem.*– 1998.– Vol.379.– P.137-147.
357. Reyers, I. Venostasisinduced thrombosis in rat is not influenced by circulating platelet or leukocyte number [Text] / I. Reyers, G. de Gaetano, M.B. Donati // *Agents Action*. – 1989. – Vol.28. – P. 137–141.
358. Role of nitric oxide in immunity – A Review [Text] / A.K. Singh [et al.] // *Journal of Animal Science*.– 2011.– Vol.24.– P 97-102.
359. Role of the occluding loop in cathepsin B activity [Text] / C. Illy [et al.] // *J. Biol. Chem.*– 1997.– Vol.272.– P. 1197-1202.
360. Roshy, S. Pericellular cathepsin B and malignant progression [Text] / S. Roshy, B.F. Sloane, K. Moin // *Cancer Metastasis Rev.*– 2003.– Vol.22, № 2-3.– P. 271-86.
361. Rzychon, M. Modes of inhibition of cysteine proteases [Text] / M. Rzychon, D. Chimel, J. Stec-Niemczyk // *Acta Biochimica Polonica*.– 2004.– Vol.51, №4.– P. 861-873.
362. Saftig, P. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function [Text] / P. Saftig, J. Klumperman // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*– 2009.– Vol. 10.– P. 623-635.
363. Sanders, R.D. Biologic effects of nitrous oxide: a mechanistic and toxicologic review [Text] / R.D. Sanders, J. Weimann, M. Maze // *Anesthesiology*. – 2008. – Vol. 109, № 4. – P. 707-722.
364. Sase, K. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets [Text] / K. Sase, T. Michel // *Life Sci*. – 1995. – Vol.57, № 22. – P. 2049-2055.

365. Schirmeister, T. Cysteine protease inhibitors containing small rings [Text] / T. Schirmeister, A. Klockow // *Mini Rev. Med. Chem.*– 2003.– Vol.3.– P. 585-596.

366. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins [Text] / T. Cirman [et al.] // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 3578–3587.

367. Sensing cytosolic RpsL by macrophages induces lysosomal cell death and termination of bacterial infection [Text] / W. Zhu [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2015. – Vol. 11. – P. e1004704.

368. Serrano-Puebla, A. Targeting the Lysosome Lysosomal membrane permeabilization in cell death: new evidence and implications for health and disease [Text] / A. Serrano-Puebla, P. Boya // *Annals of the New York academy of sciences.* – 2015. – P.1–15. doi: 10.1111/nyas.12966

369. Shaw, E. Cysteiny proteinases and their selective inactivation [Text] / E. Shaw // *Adv. Enzymol. Areas Mol. Biol.*– 1990.– Vol.63.– P. 271-347.

370. Shiva, S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function [Text] / S. Shiva // *Redox Biology.* – 2013. – № 1. – P. 40-44.

371. Siklos, M. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors [Text] / M. Siklos, M. BenAissa, G.R.J. Thatcher // *Acta Pharmaceutica Sinica B.*– 2015.– Vol.5, № 6.– P. 506-519.

372. Simonovic, M. Crystal structure of viral serpin crmA provides insights into its mechanism of cysteine proteinase inhibition [Text] / M. Simonovic, P.G.W. Gettins, K. Volz // *Protein Sci.*– 2000.– Vol. 9.– P. 1423-1427.

373. Sphingolipid rheostat alterations related to transformation can be exploited for specific induction of lysosomal cell death in murine and human glioma [Text] / R. Mora [et al.] // *Glia.*– 2010.– Vol.58.– P. 1364–1383.

374. Sphingosine mediates TNF α -induced lysosomal membrane permeabilization and ensuing programmed cell death in hepatoma cells [Text] / C. Ullio [et al.] // *J. Lipid Res.*– 2012.– Vol.53.– P. 1134–1143. doi:10.1194/jlr.M022384

375. Stadtman, E.R. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease [Text] / E.R. Stadtman, B.S. Berlett // *Drug. Metab. Rev.*– 1998.– Vol.30.– P. 225-243.
376. Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo [Text] / P.A. Kreuzaler [et al.] // *Nat. Cell Biol.*– 2011. – Vol. 13. – P. 303–309. doi:10.1038/ncb2171.
377. Steverding, D. The cathepsin B-selective inhibitors CA-074 and CA-074Me inactivate cathepsin L under reducing condition [Text] / D. Steverding // *Open Enzyme Inhib. J.*– 2011.– Vol.4.– P. 11-16.
378. Stoka, V. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis [Text] / V. Stoka, V. Turk, B. Turk // *Biol. Chem.*– 2007.– Vol.388.– P. 555-560.
379. Strategies for Assaying Lysosomal Membrane Permeabilization [Text] / U. Repnik [et al.] // *Cold Spring Harb Protoc.* – 2016. – P. 494-499.
380. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1) [Text] / A.V. Hall [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 33082-33090.
381. Structure-activity analysis of cathepsin K/chondroitin 4-sulfate interactions [Text] / M.M. Cherney [et al.] // *J. Biol. Chem.*– 2011.– Vol. 286.– P. 8988-8998.
382. Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases [Text] / D. Turk [et al.] // *EMBO J.*– 2001.– Vol.20.– P. 6570-6582.
383. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment [Text] / R. Coulombe [et al.] // *EMBO J.*– 1996.– Vol.15.– P. 5492-5503.
384. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate [Text] / B.R. Crane [et al.] // *Science.*– 1998.– Vol. 279.– P. 2121-2126.
385. Studies on aromatic compounds: inhibition of calpain I by biphenyl derivatives and peptide-biphenyl hybrids [Text] / A. Montero [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lettv.*– 2004.– Vol.14.– P. 2753-2757.
386. Stuehr, D.J. Mammalian nitric oxide synthase [Text] / D.J. Stuehr // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1411. – P. 217-230.

387. Su, Y. Substrate inhibition of nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells in culture [Text] / Y. Su, M. Couch, E.R. Block // Nitric Oxide.– 1997.– Vol. 1, № 6.– P. 469-475.

388. Substrate profiling of cysteine proteases using a combination peptide library identifies functionally specificities [Text] / Y. Choe [et al.] // J. Biol. Chem.– 2006.– Vol.281.– P. 12824-12832.

389. Subversion of a lysosomal pathway regulating neutrophil apoptosis by a major bacterial toxin, pyocyanin [Text] / L.R. Prince [et al.] // J. Immunol.– 2008.– Vol.180.– P.3502–3511.

390. Sumoza-Toledo, A. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling [Text] / A. Sumoza-Toledo, R. Penner // J. Physiol. – 2011. – Vol. 589. – P.1515–1525. doi:10.1113/jphysiol.2010.201855

391. Suzuki, Y. Protein Carbonilation [Text] / Y. Suzuki, M.Carini, D.Butterfield // Antioxidants & redox signaling. – 2010. – Vol. 12, №3. – P.322-325.

392. Synthesis of a 24-membered cyclic peptide-biphenyl hybrid [Text] / A. Montero [et al.] // Eur.J. Organ. Chem.– 2007.–Vol.2007.– P. 1301-1308.

393. Szabõ, C. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics [Text] / C. Szabõ, H. Ischiropoulos, R. Radi // NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY. – 2006. – Vol. 6. – P. 662-680.

394. Taylor, B.S. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function [Text] / B.S. Taylor, L.H. Alarcon, T.R. Billiar // Biochemistry (Mosc).– 1998.– Vol.63, № 7.– P. 766-781.

395. Teitelbaum, S.L. Bone Resorption by Osteoclasts [Text] / S.L. Teitelbaum // Science.– 2000.– Vol.289.– P. 1504-1508.

396. Temple, A. Identification of Specific Protein Carbonylation Sites in Model Oxidations of Human Serum Albumin [Text] / A. Temple, T.-Y. Yen, S. Gronert // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2006. –Vol. 17, №8. – P. 1172-1180.

397. Terman, A. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death [Text] / A. Terman, T. Kurz // Antioxid. Redox Signal.– 2013.– Vol.18.– P. 888–898.

398. The alpha- amino group of L-arginine mediates its antioxidant effect [Text] / S. Wallner [et al.] // *Eur. J. Clin Invest.*– 2001.– Vol. 31.– P. 98-102.
399. The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence [Text] / A. Ziegler [et al.] // *Biochemistry.*– 2005.–Vol.44.– P. 138–148. doi:10.1021/bi0491604
400. The crystal and molecular structures of cathepsin K: chondroitin sulfate complex [Text] / Z. Li [et al.] // *J. Mol. Biol.*– 2008.– Vol.383, №1.– P. 78-91.
401. The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64 [Text] / A. Fujishima [et al.] // *FEBS Lett.*– 1997.– Vol. 407.– P. 47-50.
402. The cysteine protease cathepsin B is a key drug target and cysteine protease inhibitors are potential therapeutics for traumatic brain injury [Text] / G.R. Hook [et al.] // *J. Neurotrauma.*– 2014.– Vol.31.– P. 515-529.
403. The design of peptidyl diazomethane inhibitors to distinguish between the cysteine proteinases calpain II, cathepsin L and cathepsin B [Text] / C. Crawford [et al.] // *Biochem J.*– 1988.– Vol.253.– P. 751-758.
404. The Effect of L-Arginine and Creatine on Vascular Function and Homocysteine Metabolism [Text] / E. Jahangir [et al.] // *Vasc. Med.*–2009.– Vol. 14, № 3.– P. 239–248.
405. The endolysosomal system in cell death and survival [Text] / U. Repnik [et al.] // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2013. – Vol. 5. – P. a008755.
406. The erythrocyte as a regulator of vascular tone [Text] / M.I. Ellsworth [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1995. – Vol. 269. – P. H2155-H2161.
407. The expression of type-1 and type-2 nitric oxide synthase in selected tissues of the gastrointestinal tract during mixed mycotoxicosis [Text] / M. Gajęcka [et al.] // *Toxins (Basel).*– 2013.– Vol. 5,№ 11.– P. 2281-2292.
408. The granzyme B-Serpinb9 axis controls the fate of lymphocytes after lysosomal stress [Text] / C.H. Bird [et al.] // *Cell Death Differ.*– 2014.– Vol. 21, № 6.– P. 876-87. doi: 10.1038/cdd.2014.7.

409. The immunomodulation of inducible nitric oxide in scallop *Chlamys farreri* [Text] / Q. Jiang [et al.] // *Fish Shellfish Immunol.*– 2013.– Vol. 34,№1.– P. 100-108.
410. The major isoforms of Bim contribute to distinct biological activities that govern the processes of autophagy and apoptosis in interleukin-7 dependent lymphocytes [Text] / S.M. Ruppert [et al.] // *Biochim.Biophys.Acta.*–2012.– Vol.1823.– P. 1877–1893. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.017
411. The metabolism of L-arginine and its significance for endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine [Text] / M. Hecker [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1990.– Vol. 87.– P. 8612-8616.
412. The S2 subsites of cathepsine K and L and their contribution to collagen degradation [Text] / F. Lecaille [et al.] // *Protein Sci.*– 2007.– Vol. 16.– P. 662-670.
413. The solvation properties of nitric oxide [Text] / M. Abraham [et al.] // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*– 2000.– Vol. 2.– P. 2067-2070.
414. Transformation-Associated Changes in Sphingolipid Metabolism Sensitize Cells to Lysosomal Cell Death Induced by Inhibitors of Acid Sphingomyelinase [Text] / N. Petersen [et al.] // *Cancer Cell.*– 2013.– Vol.24.– P. 379–393.
415. Transport limitations of nitric oxide inhibition of platelet aggregation under flow [Text] / J.L. Sylman [et al.] // *Ann. Biomed. Eng.*– 2013.–Vol. 41,№ 10.– P. 2193-2205.
416. Tuning and predicting biological affinity: aryl nitriles as cysteine protease inhibitors [Text] / V. Ehmke [et al.] // *Org. Biomol. Chem.*– 2012.– Vol.10.– P. 5764-5768.
417. Turk, B. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers [Text] / B. Turk, V. Turk, D. Turk // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2000.– Vol.1477.– P. 98-111.
418. Turk, B. Regulation cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators [Text] / B. Turk, D. Turk, G.S. Salvesen // *Curr. Pharm. Des.*– 2002.– Vol.8.– P. 1623-1637.

419. Turk, B. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors [Text] / B. Turk, V. Turk, D. Turk // *Biol. Chem.*– 1997.– Vol.378.– P. 141-150.
420. Turk, V. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance [Text] / V. Turk, V. Stoka, D. Turk // *Front. Biosci.*– 2008.– Vol.13.– P. 5406-5420.
421. Turk, V. Cysteine cathepsins (proteases) – on the main stage of cancer? [Text] / V. Turk, J. Kos, B. Turk // *Cancer Cell.*– 2004.– Vol.5.– P. 409-410.
422. Turk, V. Lysosomal Cysteine Proteases and Their Protein Inhibitors: Recent Developments [Text] / V. Turk, B. Turk // *Acta Chim. Slov.*– 2008.– Vol.55.– P.727-738.
423. Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities [Text] / V. Turk, B. Turk, D. Turk // *EMBO J.*– 2001.– Vol.20.– P. 4629-4633.
424. Ubiquitination and selective autophagy [Text] / S. Shaid [et al.] // *Cell Death and Differentiation.*– 2013.– Vol.20.– P. 21-30.
425. Undas, A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence [Text] / A. Undas, J. Brozek, A. Szczeklik // *Thromb. Haemost.*– 2005.– Vol.94, № 5.– P. 907-15.
426. Upregulation of cathepsin S in psoriatic keratinocytes [Text] / A. Schonefuss [et al.] // *Exp. Dermatol.*– 2010.– Vol.19, № 8.– P. e80-e88.
427. Vincent, S.R. Nitric oxide neurons and neurotransmission [Text] / S.R. Vincent // *Prog. Neurobiol.*– 2010.– Vol.90, № 2.– P. 246-255.
428. Virus-mediated release of endosomal content in vitro: different behavior of adenovirus and rhinovirus serotype 2 [Text] / E. Prchla [et al.] // *J. Cell Biol.*– 1995.– Vol.131.– P. 111–123. doi:10.1083/jcb.131.1.111
429. Wiederanders, B. Functions of propeptide parts of cysteine proteases [Text] / B. Wiederanders, G. Kaulmann, K. Schilling // *Curr. Protein Pept. Sci.*– 2003.– Vol.4.– P. 309-326.
430. Wijkmans, J. Inhibitors of cathepsin K: a patent review (2004-2010) [Text] / J. Wijkmans, J. Gossen // *Expert. Opin Ther. Pat.*– 2011.– Vol.21.– P. 1611-1629.

431. Wodrich, H. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly [Text] / H. Wodrich, L. Gerace, G. Nemerow // *J. Virol.*– 2005.– Vol.79.– P. 1992–2000. doi:10.1128/JVI.79.4.1992-2000.2005
432. Yan, L.J. Analysis of oxidative modification of proteins [Text] / L.J. Yan // *Curr. Protoc. Protein Sci.* – 2009. – Unit14.4. – Chapter 14.
433. Yang, Z. Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma [Text] / Z. Yang, J.L. Cox // *Cancer Cell Int.*– 2007.– Vol. 7.– P. 8.
434. Yasuda, Y. The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics [Text] / Y. Yasuda, J. Kaleta, D. Bromme // *Adv. Drug Deliv. Rev.*– 2005.– Vol.57.– P. 973-993.
435. Zani, B.G. Transport of extracellular L-arginine via cationic amino acid transporter is required during in vivo endothelial NO production [Text] / B.G. Zani, H.G. Bohlen // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*– 2005.– Vol. 289.– P. H1381-H1390.
436. Zhao, C.F. The function of cathepsins B, D, and X in atherosclerosis [Text] / C.F. Zhao, D.M. Herrington // *Am. J. Cardiovasc. Dis.*– 2016.– Vol.6, № 4.– P. 163-170.
437. Zhu, H. Heat shock protein 70.1 (Hsp70.1) affects neuronal cell fate by regulating lysosomal acid sphingomyelinase [Text] / H. Zhu, T. Yoshimoto, T. Yamashima // *J. Biol. Chem.*– 2014.– Vol. 289, № 40.– P. 27432-43. doi: 10.1074/jbc.M114.560334.
438. zVLL-CHO at low concentrations acts as a calpain inhibitor to protect neurons against okadaic acid-induced neurodegeneration [Text] / S.Y. Yoon [et al.] // *Neurosci. Lett.*– 2012.– Vol.509.– P. 33-38.