

На правах рукописи

ИЛЬЧЕВА АННА СЕРГЕЕВНА

**ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА
ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ И АКТИВНОСТЬ
КАТЕПСИНОВ L и H МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Рязань – 2017

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук, доцент Фомина Мария Алексеевна

Официальные оппоненты:

Камилов Феликс Хусаинович - доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Синицкий Антон Иванович - доктор медицинских наук, доцент, доцент кафедры фармации и химии фармацевтического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «29» мая 2017 г. в 12.00 на заседании диссертационного совета Д 208.084.05 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, по адресу: 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, 34) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Жаднов В.А.

1. Общая характеристика работы

1.1. Актуальность темы

В настоящее время одним из ведущих негативных эффектов гипергомоцистеинемии признана провокация избыточной продукции свободных радикалов и, как следствие, развитие оксидативного стресса (Jakubowski H., Głowacki R., 2011). Известно, что в мышечных тканях развитие окислительного стресса приводит к интенсивному окислению миоглобина, снижению связывания ионов Ca^{2+} с тропонином и повышенному взаимодействию с другими сократительными белками (Хидирова Л.Д. и др., 2009; Абушик П.А и др., 2015; Wasawa T. et al., 1992; Peternelj T.T. et al., 2015). При этом окислительная модификация белков (ОМБ) считается одним из наиболее ранних и стабильных проявлений поражения различных тканей организма при свободно-радикальной патологии (Муравлева Л.Е., 2010; Толочко З.С., 2012; Dalle-Donne I. et al., 2006). Индикатором ОМБ являются их карбонильные производные (Муравлева Л.Е., 2010; Dukan S. et al., 2000). Одним из важнейших путей выведения и удаления модифицированных белков является протеолиз, недостаточность которого ведет к накоплению их в клетке и внеклеточном пространстве (Муравлева Л.Е., 2010; Глебов А.Н и др., 2011). В этом аспекте интерес вызывают лизосомальные цистеиновые протеиназы (катепсины) в силу их способности секретироваться во внеклеточное пространство, взаимодействовать с различными белками, в том числе и окисленными (Яровая Г.А. и др., 2011).

Основой терапии гипергомоцистеинемии являются фолиевая кислота и ее производные, витамины B_6 , B_{12} , так как их роль заложена в патогенезе данного состояния (Одинак М.М., Янишевский С.Н., Вознюк И.А., 2008; Архипкина Т.Л., 2016). В то же время, снижение эффекта воздействия повышенных концентраций гомоцистеина может быть достигнуто благодаря опосредованному влиянию на оксидативный стресс и/или протеолиз. В частности, интерес вызывают эффекты аргинина и карнитина. L-аргинин обладает способностью регулировать иммунные, метаболические процессы,

стимулировать продукцию оксида азота (Граник В.Г., 2003; Валеев В.В. и др., 2016). Для карнитина характерно снижение дефицита энергии, ингибирование синтеза церамидов и активности каспаз, участвующих совместно с катепсинами в апоптозе клетки (Копелевич В.М., 2005; Andrieu-Abadie N. et al., 1999; Mutomba M.C et al., 2000). Именно поэтому, актуальным является изучение влияния гипергомоцистеинемии и корректирующего действия аргинина и карнитина на активность лизосомального цистеинового протеолиза и окислительную модификацию белков мышечных тканей.

Цель и основные задачи исследования

Целью настоящей работы является сравнительная оценка состояния окислительного карбонилирования белков и системы лизосомального цистеинового протеолиза мышечных тканей при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности, а также при введении карнитина и аргинина.

Задачи исследования:

1. Провести комплексную оценку содержания продуктов окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности, в том числе на фоне введения карнитина и аргинина.
2. Описать состояние активности лизосомальных цистеиновых протеиназ (катепсинов L и H) мышечных тканей в изучаемых экспериментальных моделях.
3. Оценить изменения проницаемости лизосомальной мембраны при изучаемых состояниях.
4. Проанализировать взаимосвязь состояния окислительного карбонилирования белков и лизосомального цистеинового протеолиза.

1.2. Научная новизна

Впервые произведена комплексная оценка содержания карбонилированных производных белков в мышечных тканях при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности и при введении на

этом фоне карнитина и аргинина. Впервые описано состояние активности лизосомальных цистеиновых протеиназ мышечных тканей при изучаемых состояниях: выявлено повышение активности системы лизосомального цистеинового протеолиза, сопровождающееся дестабилизацией мембран лизосом в скелетной мышце и миокарде при умеренной, в сердечной и гладкомышечной мускулатуре при выраженной гипергомоцистеинемии.

1.3. Теоретическая и практическая значимость

Работа носит преимущественно фундаментальный характер: обнаруженные изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ, а также продукции окислительно-модифицированных белков в мышечных тканях при гипергомоцистеинемии дополняют представления о механизмах формирования оксидативного стресса. Снижение интенсивности процессов окислительной модификации белков в грудной аорте и скелетной мышце под влиянием аргинина и карнитина, а также уменьшение на их фоне активности катепсинов L, H, снижение проницаемости лизосомальных мембран грудной аорты и миокарда, может позволить использовать данные вещества для коррекции негативных последствий окислительного стресса в мышечных тканях или его профилактики.

Положения, выносимые на защиту

- При гипергомоцистеинемии различной степени выраженности возрастает интенсивность процессов окислительной модификации белков в сердечной, скелетной и гладкой мускулатуре. Применение аргинина и карнитина при выраженной гипергомоцистеинемии снижают степень карбонилирования белков.
- Гипергомоцистеинемия провоцирует нарастание активности катепсинов L и H в мышечных тканях, сопровождающаяся, в ряде случаев, изменением соотношения активности указанных ферментов между цитоплазматической и лизосомальной фракциями. Введение аргинина и карнитина приводит к существенной коррекции указанных изменений в

миокарде с одновременным выраженным нарастанием активности катепсина Н в грудной аорте.

- Умеренная гипергомоцистеинемия приводит к дестабилизации мембран лизосом в сердечной и скелетной мышцах, выраженная гипергомоцистеинемия – в миокарде и грудной аорте. При этом, аргинин и карнитин демонстрируют способность стабилизировать лизосомальные мембраны.

- В ряде изучаемых экспериментальных моделей обнаружены прямые корреляционные связи между окислительной модификацией белков и активностью лизосомальных цистеиновых протеиназ.

1.6. Степень достоверности и апробации работы

Достоверность результатов работы подтверждается использованием современных методов исследования и статистической обработки полученных результатов. Результаты исследования доложены на: международной научно-практической конференции «Медицинские науки: прошлое, настоящее, будущее» (Уфа, 2014); X юбилейной международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Пицунда, Абхазия, 2014); Российской научно-практической конференции «Зубаировские чтения: Новое в коагулологии. Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015); Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2016); Международной научно-практической конференции «Актуальные процессы формирования науки в новых условиях» (Москва, 2016); IX международной конференции «Дисфункция эндотелия. Экспериментальные и клинические исследования» (Витебск (Беларусь), 2016)

1.7. Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

1.8. Личный вклад соискателя

Все изложенные в диссертации результаты получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Определение задач, интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций.

1.9. Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения и выводов. Список литературы содержит 275 источников, из них 137 российских и 138 зарубежных. Объем работы составляет 160 страниц машинописного текста, содержит 65 рисунков и 36 таблиц.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Экспериментальные модели, получение материала для исследования

Работа выполнена на 240 гомогенатах тканей грудной аорты, левого желудочка сердца, большеберцовой мышцы 80-ти конвекциональных половозрелых крыс самцов линии Wistar с массой тела 280-330 граммов, разделенных на 5 контрольных и 5 экспериментальных групп по 8 особей в каждой. Разделение гомогенатов на лизосомальную и внелизосомальную фракции осуществляли методом дифференциального центрифугирования.

Моделирование гипергомоцистеинемии умеренной степени выраженности проводили внутрижелудочным введением метионина в течение 7 дней и 14 дней (Емельянов С.Г. и др., 2011). Моделирование выраженной гипергомоцистеинемии проводили внутрижелудочным введением метионина в течение 21 дня (Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А., 2014). Для изучения эффектов аргинина на фоне выраженной

гипергомоцистеинемии выборке животных вводили L-аргинин в течение 10 суток параллельно с введением метионина (Покровский М.В. и др., 2008). Влияние карнитина изучали в экспериментальной группе животных, получавших карнитин хлорид в течение 21 дня параллельно с введением метионина (Rajasekar P., Palanisamy N., Anuradha C.V., 2007).

2.2. Методы определения концентрации гомоцистеина в сыворотке крови, содержания белка и кислой фосфатазы в тканях животных

Концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа коммерческим набором «Axis Shield» (США); содержание белка и кислой фосфатазы определяли в седиментируемой и неседиментируемой фракциях гомогената по методу Лоури коммерческим набором НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург) и с помощью коммерческого набора «Витал Диагностикс СПб» (Россия, Санкт – Петербург) соответственно.

2.3. Определение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ (катепсинов L, H)

Активность катепсинов L, H в лизосомальной (седиментируемой) и внелизосомальной (неседиментируемой) фракциях гомогената определялась методом спектрофлуориметрической регистрации продуктов реакции (Barret A.J., Kirshke H., 1981) и обозначалась как седиментируемая активность (СА) и неседиментируемая активность (НСА) соответственно. Общая активность (ОА) рассчитывалась как сумма НСА и СА. Удельная активность протеиназ выражалась в нкат/г белка.

2.4. Оценка проницаемости лизосомальных мембран

Для оценки проницаемости лизосомальных мембран применялся расчёт коэффициента лабильности (Клаб%) как для катепсинов, так и для маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы (Пупышев А.Б., 2011). Клаб% рассчитывался как отношение активности фермента во внелизосомальной фракции (НСА) к общей активности фермента(ОА), выраженное в процентах.

2.5. Метод оценки окислительной модификации белков в тканях

Комплексную оценку продуктов окислительной модификации белков определяли путем измерения уровня карбонильных производных (Дубинина Е.Е., 2001) с последующим расчётом площадей под кривой поглощения продуктов окислительной модификации белков (Фомина М.А и др., 2014). Полученные значения выражали в условных единицах/грамм белка.

2.6. Способ оценки долей первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса

Для оценки доли первичных и вторичных маркеров окислительного стресса подсчитывалось отношение суммы альдегидных и кетонных динитрофенилгидразонов (АДФНФГ и КДФНФГ), соответственно, ультрафиолетового и видимого спектра света к общему содержанию карбонильных производных белков: $S_{\text{АДФНФГ}_{\text{uv}}} + S_{\text{АДФНФГ}_{\text{vs}}} / S_{\text{общ}}$; $S_{\text{КДФНФГ}_{\text{uv}}} + S_{\text{КДФНФГ}_{\text{vs}}} / S_{\text{общ}}$ (Фомина М.А и др., 2014).

2.7. Способ оценки резервно-адаптационного потенциала (РАП)

Для оценки резервно-адаптационных возможностей тканей использовали расчет процентного соотношения содержания карбонильных производных, измеренного при спонтанном окислении к аналогичному показателю, полученному в реакциях металл-индуцированного окисления, принимая последний за 100% (Никитина Ю.В., Мухина И.В., 2009). Значение РАП определялось как разница между металл-индуцированным и спонтанным окислением.

2.8. Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов исследований проведен с использованием программы «Microsoft Office Excel 2013» и «Statistica 10». С помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий) проводили проверку нормальности распределения данных. Результаты представляли с использованием медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей [Q1;Q3]. Статистическую значимость отличий показателей экспериментальной группы от группы сравнения оценивали по U – критерию Манна-Уитни.

Проверку равенства медиан нескольких выборок осуществляли с помощью критерия Краскела -Уоллиса. Оценку ранговой корреляции осуществляли с помощью коэффициента Спирмена.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Характеристика экспериментальных моделей

В сыворотке крови крыс, получавших метионин в течение 7 и 14 дней, установлено статистически значимое незначительное, в течение 21 дня - статистически значимое резкое нарастание показателя относительно соответствующих контролей. Экспериментальные группы с введением аргинина и карнитина демонстрировали повышение уровня гомоцистеина относительно соответствующих контрольных групп, однако результаты измерений оказались статистически значимо ниже, чем в группе, получавшей только метионин в течение 21 дня (табл. 1).

Таблица 1

Содержание гомоцистеина в сыворотке крови (Me[Q1;Q3])

Группа	Гомоцистеин (мкмоль/л)
Контроль 1 ₇	5,9 [5,5; 6,7]
Контроль 1 ₁₄	6,1 [5,8; 7,3]
Контроль 1 ₂₁	5,8 [5,1; 6,7]
Контроль 2	5,87 [5,65; 6,77]
Контроль 3	5,9 [5,73; 6,09]
Метионин 7 дней	9,25 [7,77; 10,7]* p=0,02
Метионин 14 дней	9,95 [8,90; 11,82]* p=0,01
Метионин 21 день	293,1 [273,1; 318,2] * p=0,001
Метионин +L-аргинин	92,8 [58,75; 112,07] ***p=0,001; #p=0,002
Метионин +Карнитин	72,7 [55,27; 91,85] ***p=0,001; #p=0,002

Примечание: * -статистически значимые отличия от соответствующей контрольной группы (p<0,05); #-статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин (p<0,05)

3.2 Характеристика состояния окислительной модификации белков мышечных тканей

3.2.1 Окислительная модификация белков при умеренной гипергомоцистеинемии

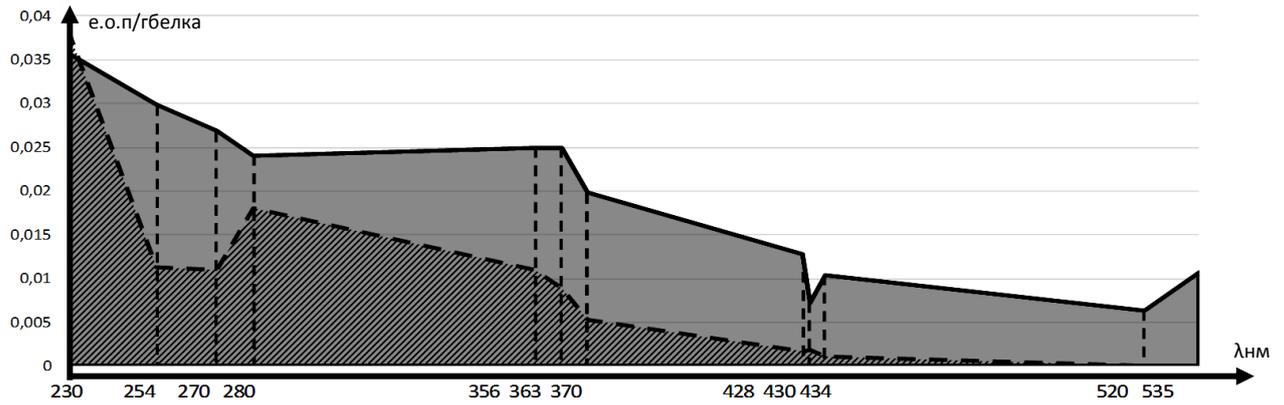
В сердечной и скелетной мышцах животных, получавших метионин в течение 7 дней, обнаружено статистически значимое нарастание общей

площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков относительно соответствующих контролей: 7,53 [5,41;8,47] е.о.п/г белка против 2,24 [2,10;3,36] е.о.п/г белка для миокарда, 14,69 [9,91;20,15] е.о.п/г белка против 6,39 [4,75;8,07] е.о.п/г белка для скелетной мышцы. Модели с введением метионина в течение 14 дней также демонстрировали статистически значимое увеличение общей площади под кривой спектра поглощения ОМБ (рис.1, 2). При оценке путей развития окислительного стресса, только в скелетной мышце получено статистически значимое увеличение доли вторичных (23,01 % [22,11;24,39] против 14,84 % [12,34; 18,45]) с соответствующим уменьшением доли первичных маркеров (76,99% [75,61;77,89] против 85,16 % [81,26; 87,12]) для выборки с 14-дневным введением метионина относительно контроля.

При сравнительном анализе площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков грудной аорты, получено статистически значимое нарастание общей площади под кривой (20,43 [19,79; 23,63] е.о.п./г белка против 5,93 [5,12; 8,56] е.о.п./г белка) при введении метионина в течение 14 дней относительно контрольной группы, а также статистически значимое снижение резервно–адаптационного потенциала 8,05 [4,64;40,67] % против 60,49 [51,95;71,28]% в контрольной группе.

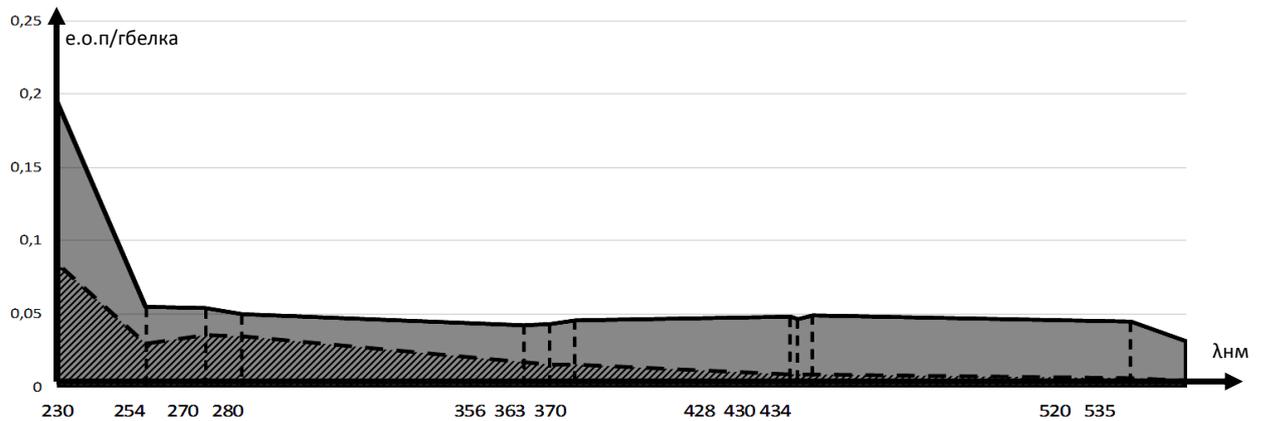
3.2.2. Окислительная модификация белков при выраженной гипергомоцистеинемии

При моделировании выраженной гипергомоцистеинемии получили статистически значимое увеличение общей площади под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ во всех гомогенатах исследуемых мышечных тканей по сравнению с контрольными.



Примечание: ___ Контроль 1₁₄; _____ Метионин 14 дней

Рис.1. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков миокарда при введении метионина в течение 14 дней относительно Контроля 1₁₄



Примечание: ___ Контроль 1₁₄; _____ Метионин 14 дней

Рис. 2. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков скелетной мышцы при введении метионина 14 дней относительно Контроля 1₁₄

В сердечной мышце общая площадь под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ статистически значимо десятикратно возросла относительно контрольной группы (22,84[19,96;24,07] против 2,32[1,94;3,48] е.о.п./г белка), в скелетной мышце и грудной аорте общая площадь под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ составила 37,83 [35,22;40,96] е.о.п./г белка и 73,03 [47,08;86,10] е.о.п./г белка, что статистически значимо выше показателей соответствующих контролей (6,39 [4,75;8,07] е.о.п./г белка для большеберцовой мышцы и 5,71[4,90;7,85] е.о.п./г белка для грудной аорты). В скелетной мышце при выраженной гипергомоцистеинемии, равно как и

при умеренной, было получено статистически значимое нарастание доли вторичных маркеров оксидативного стресса (24,35[22,25;26,27]%) относительно контроля (15,09[12,28;19,46]%) с соответствующим снижением доли первичных маркеров (75,65 [73,73;77,75]%) относительно контроля 84,91 [80,45;89,38]%). РАП статистически значимо снижался в сердечной мышце (46,60[42,69;46,88]%) и грудной аорте (30,45[15,04;33,6]%) относительно контролей (87,17[85,36;90,14]% и 62,36[52,65;71,62]% соответственно).

Полученные данные, подтверждают предположения о негативном влиянии гипергомоцистеинемии за счет формирования оксидативного стресса и истощения антиоксидантного потенциала изучаемых тканей.

3.3. Влияние аргинина и карнитина на окислительную модификацию белков при выраженной гипергомоцистеинемии

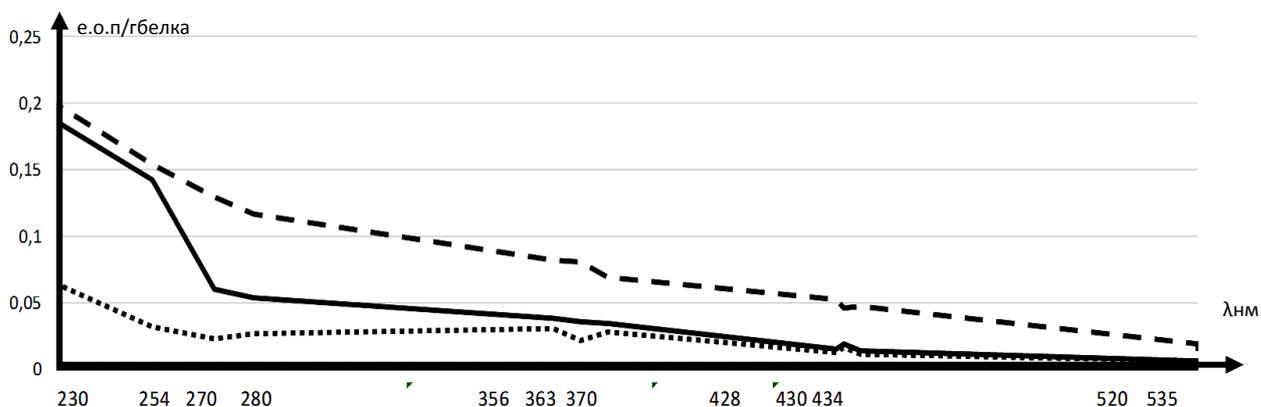
Поскольку более выраженные изменения процесса карбонилирования белков демонстрировала экспериментальная модель с 21-дневным введением метионина (выраженная гипергомоцистеинемия), эффекты влияния аргинина и карнитина изучались именно на ней.

3.3.1. Влияние аргинина на окислительную модификацию белков при выраженной гипергомоцистеинемии

В миокарде у животных, получавших аргинин на фоне метионина, обнаружено статистически значимое снижение общей площади под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ, относительно животных с выраженной гипергомоцистеинемией (рис. 3).

В скелетной мышце статистически значимое снижение продуктов окислительного изменения белков под влиянием аргинина отмечалось для АДНФГ (2,48[2,32;3,61] е.о.п./гбелка) и КДНФГ (0,37[0,29;0,50] е.о.п./гбелка) основного характера относительно аналогичных показателей (8,33[7,96;9,12] е.о.п./гбелка и 0,93[0,91;1,75] е.о.п./гбелка) выборки животных с гипергомоцистеинемией. Корректирующее влияние аргинина на резервно-адаптационный потенциал было установлено только в грудной аорте, где

данный показатель статистически значимо нарастал (45,82 [26,11;52,5]%) относительно выборки с выраженной гипергомоцистеинемией (30,45[15,04;33,60]%).

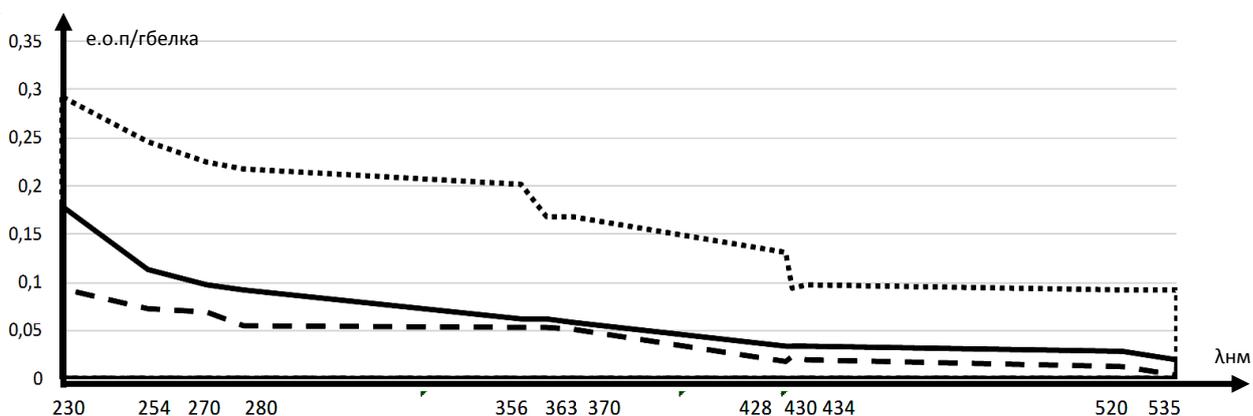


Примечание: Контроль 2; --- Метионин, ____ Метионин + Аргинин

Рис. 3. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков миокарда при введении аргинина относительно контроля 2 и группы метионин 21 день

3.3.2. Влияние карнитина на окислительную модификацию белков при выраженной гипергомоцистеинемии

В грудной аорте при введении карнитина получено статистически значимое снижение площади под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ за счет всех изучаемых составляющих, приближающихся к контрольным значениям, относительно выборки животных с гипергомоцистеинемией (рис.4).



Примечание: Контроль 3; --- Метионин, ____ Метионин + Карнитин

Рис. 4. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков грудной аорты при введении карнитина относительно контроля 3 и группы метионин 21 день

В миокарде доля вторичных маркеров статистически значимо снизилась при совместном введении метионина и карнитина (13,85 [12,42;16,25]%) относительно выборки с гипергомоцистеинемией (22,13 [20,42;23,76]%), что может приводить к уменьшению формирования агрегированных белковых конгломератов. РАП статистически значимо снизился (36,11[21,36;46,22]%) относительно выборки, получавшей изолированно метионин (46,60[42,69;46,88]%), что не показывает положительного влияния карнитина на эффекты гипергомоцистеинемии. Однако в скелетной мышце РАП в экспериментальной выборке статистически значимо увеличился (62,92[21,57;73,95]%) относительно выборки животных, получавших изолированно метионин (22,4[21,88;25,84]%), что подтверждает наше предложение о благоприятном влиянии карнитина на процессы окислительного карбонилирования белков.

Таким образом, показано развитие интенсивного окислительного повреждения белков с возможной персистенцией фрагментированных и дополнительным формированием агрегированных протеинов, истощением резервно-адаптационного потенциала исследуемых мышечных тканей, а также продемонстрировано корректирующее влияние аргинина и карнитина на данные процессы при выраженной гипергомоцистеинемии.

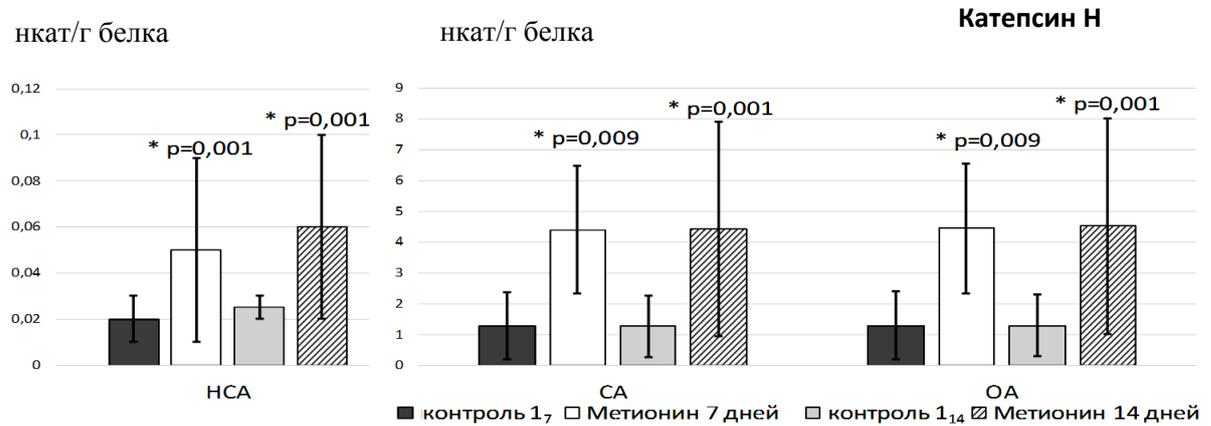
3.4. Характеристика лизосомального цистеинового протеолиза мышечных тканей

3.4.1 Лизосомальный цистеиновый протеолиз мышечных тканей при умеренной гипергомоцистеинемии

В сердечной мышце обнаружено статистически значимое повышение активности только катепсина Н при 7- и 14-дневном введении метионина относительно контрольных групп (рис.5).

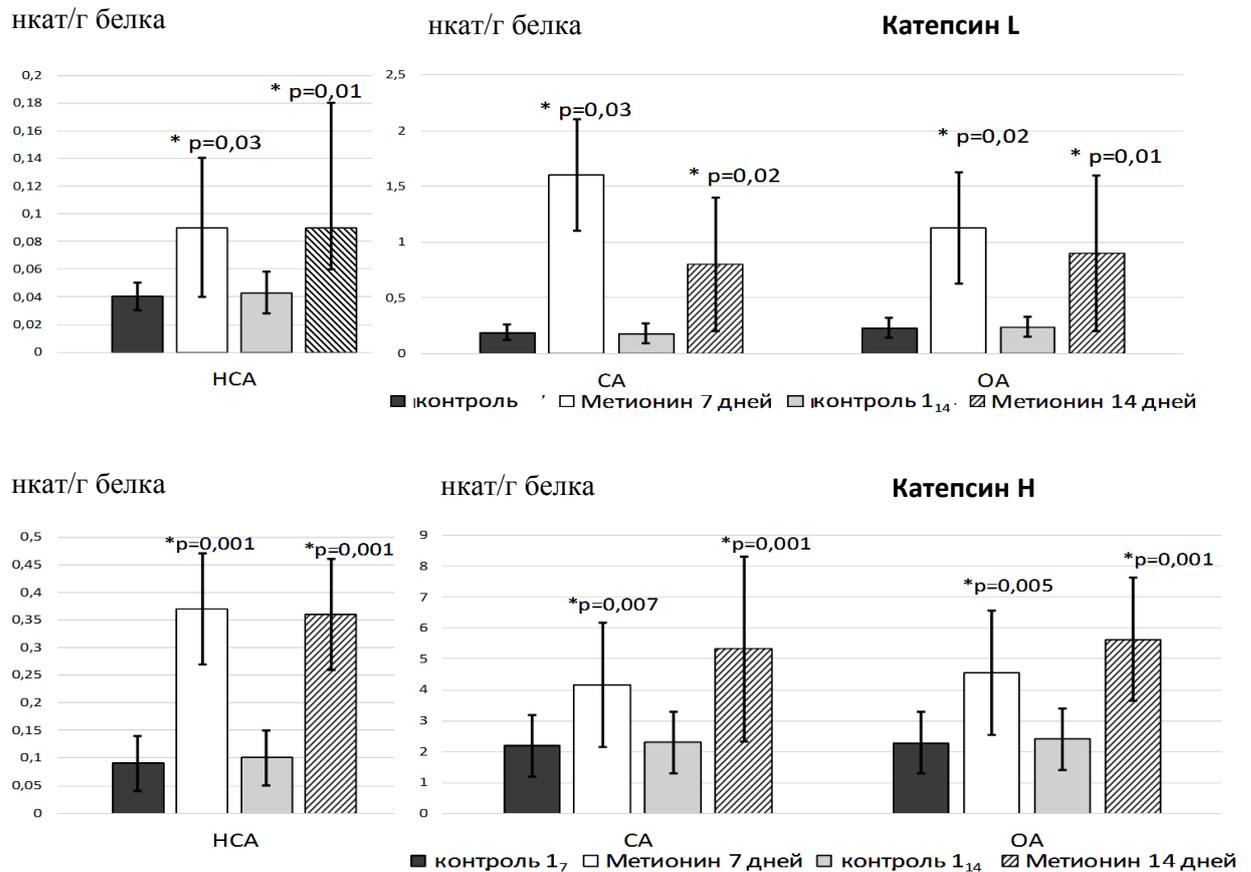
Активность катепсинов L, Н скелетной мышцы статистически значимо выросла в группах 7-ми и 14-дневного введения метионина относительно соответствующих контрольных групп (рис.6).

В грудной аорте при 7-дневном введении метионина обнаружено статистически значимое повышение активности катепсина Н за счет лизосомальной фракции (2,66[2,19;3,74] нкат/г белка) относительно данного показателя контрольной выборки (1,07[0,32;1,71] нкат/г белка).



Примечание: *Статистически значимые отличия от соответствующего контроля ($p < 0,05$)

Рис. 5. Активность катепсина Н миокарда, нкат/ г белка(Ме[Q1;Q3])



Примечание: *- статистически значимые отличия от соответствующего контроля ($p < 0,05$)

Рис.6. Активность катепсинов L и Н скелетной мышцы, нкат/ г белка (Ме[Q1;Q3])

При 14-дневном введении метионина обнаружены статистически значимые изменения активности катепсинов L и H также за счет лизосомальных фракций (4,36[3,37;5,14] нкат/г белка и 5,99[4,49;7,59] нкат/г белка соответственно) относительно соответствующих показателей контрольных групп (0,54[0,24;1,66] нкат/г белка и 1,11[0,41;1,70] нкат/г белка).

Для оценки стабильности лизосомальных мембран, использовали активность кислой фосфатазы, а также рассчитывали коэффициенты лабильности кислой фосфатазы и катепсинов (Пупышев А.Б., 2011; Repnik U., Hafner Ćesen M., Turk B., 2014).

В грудной аорте получено статистически значимое снижение коэффициента лабильности для кислой фосфатазы и катепсина H в обеих экспериментальных группах и коэффициента лабильности для катепсина L при 14-дневном введении метионина относительно контроля 1 (табл.2).

Таблица 2

Сравнительная характеристика коэффициентов лабильности кислой фосфатазы и катепсинов L и H в грудной аорте, % (Ме [Q1;Q3])

		Клаб,% Кислой фосфатазы	Клаб, %	
			Катепсин L	Катепсин H
Грудная аорта	Контроль 1 ₇	16,99[15,35;19,88]	21,63[18,71;22,56]	34,03[20,35;51,05]
	Метионин 7 дней	6,03 [4,87;7,88]* p=0,003	11,54[4,76;19,75]	5,91[4,40;7,70]* p=0,001
	Контроль 1 ₁₄	17,12[15,49;21,45]	21,83[17,81;23,61]	35,13[21,45;50,03]
	Метионин 14 дней	5,59 [5,25;5,91]* p=0,001	4,98[4,20;7,67]* p=0,01	5,66[4,79;6,68]* p=0,001

*Примечание**:-статистически значимые отличия от соответствующей контрольной группы (p<0,05).

3.4.2. Лизосомальный цистеиновый протеолиз при выраженной гипергомоцистеинемии

При выраженной гипергомоцистеинемии установлены статистически значимые увеличения активности изучаемых протеиназ (табл. 3).

Анализируя коэффициент лабильности ферментов при выраженной гипергомоцистеинемии, были получены статистически значимые результаты

для коэффициентов лабильности кислой фосфатазы в миокарде (8,05 [6,68;8,21] %) относительно контрольной группы (3,31[2,89;6,17] %), в грудной аорте (24,76 [18,22;30,04] % против контроля 17,02 [16,43;20,18] %), подтверждающие феномен пермеабиллизации мембран лизосом.

Таблица 3

Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии, Me [Q1;Q3]

		КатепсинL Нкат/г белка		Катепсин H Нкат/г белка	
		Контроль 1 ₂₁	Метионин 21 день	Контроль 1 ₂₁	Метионин 21 день
Миокард	HCA	0,01[0,01;0,01]	0,02[0,02;0,03]* p=0,02	0,02[0,01;0,02]	0,11[0,11;0,12]* p=0,004
	CA	1,74[0,99;2,01]	1,06[0,84;1,37]	1,28[1,10;1,86]	3,63[3,25;3,99]* p=0,004
	OA	1,75[1,00;2,02]	1,10[0,87;1,38]	1,29[1,11;1,88]	3,75[3,41;4,09]* p=0,004
Скелетная мышца	HCA	0,04[0,01;0,06]	0,13[0,07;0,14]* p=0,014	0,09[0,07;0,12]	0,19[0,14;0,22]* p=0,009
	CA	0,19[0,07;0,41]	1,09[0,83;2,18]* p=0,04	2,19[1,83;2,37]	2,57[2,15;2,91]
	OA	0,23[0,09;0,42]	1,26[0,91;2,28]* p=0,023	2,28[1,91;2,45]	2,77[2,35;3,11]
Грудная аорта	HCA	0,04[0,01;0,06]	0,37[0,27;0,62]* p=0,014	0,09[0,07;0,12]	0,46[0,34;0,60]* p=0,009
	CA	0,19[0,07;0,41]	2,52[1,16;3,66]* p=0,04	2,19[1,83;2,37]	1,07[0,32;1,71]
	OA	0,23[0,09;0,42]	3,18[1,43;4,22]* p=0,023	2,28[1,91;2,45]	1,48[0,74;2,26]

Примечание: * -статистически значимые отличия от Контроля 1₂₁ (p<0,05).

Поскольку изменения исследуемых параметров претерпевали значительные отличия именно при выраженной гипергомоцистеинемии, нами была предпринята оценка изменения лизосомального цистеинового протеолиза при введении аргинина и карнитина на фоне моделирования гипергомоцистеинемии 21-дневным введением метионина.

3.4.3. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ миокарда при введении аргинина

В миокарде введение животным аргинина на фоне метионина сопровождалось статистически значимым снижением общей активности катепсина L и H, приближающейся к контрольным значениям, относительно аналогичного показателя для выборки животных с гипергомоцистеинемией (рис.7). В скелетной мышце нами были обнаружены статистически значимое снижение общей активности только для катепсина H (1,91[1,38;2,27] нкат/г белка) относительно группы животных, изолированно получавшей метионин (2,77[2,35;3,11] нкат/г белка). В исследуемом гомогенате грудной аорты для катепсина H получен статистически значимый рост общей активности (4,49 [3,18;4,89] нкат/г белка) в экспериментальной группе относительно соответствующего показателя группы животных с гипергомоцистеинемией (1,48[0,74;2,26] нкат/г белка), что, к сожалению, демонстрирует отсутствие корректирующего влияния аргинина на эффекты гомоцистеина в грудной аорте.

Снижение проницаемости лизосомальных мембран в миокарде подтверждается статистически значимым снижением коэффициента лабильности кислой фосфатазы в группе животных, получавших совместно аргинин и метионин (5,03 [4,51;6,09] %) относительно выборки с гипергомоцистеинемией (8,05 [6,68;8,21] %).

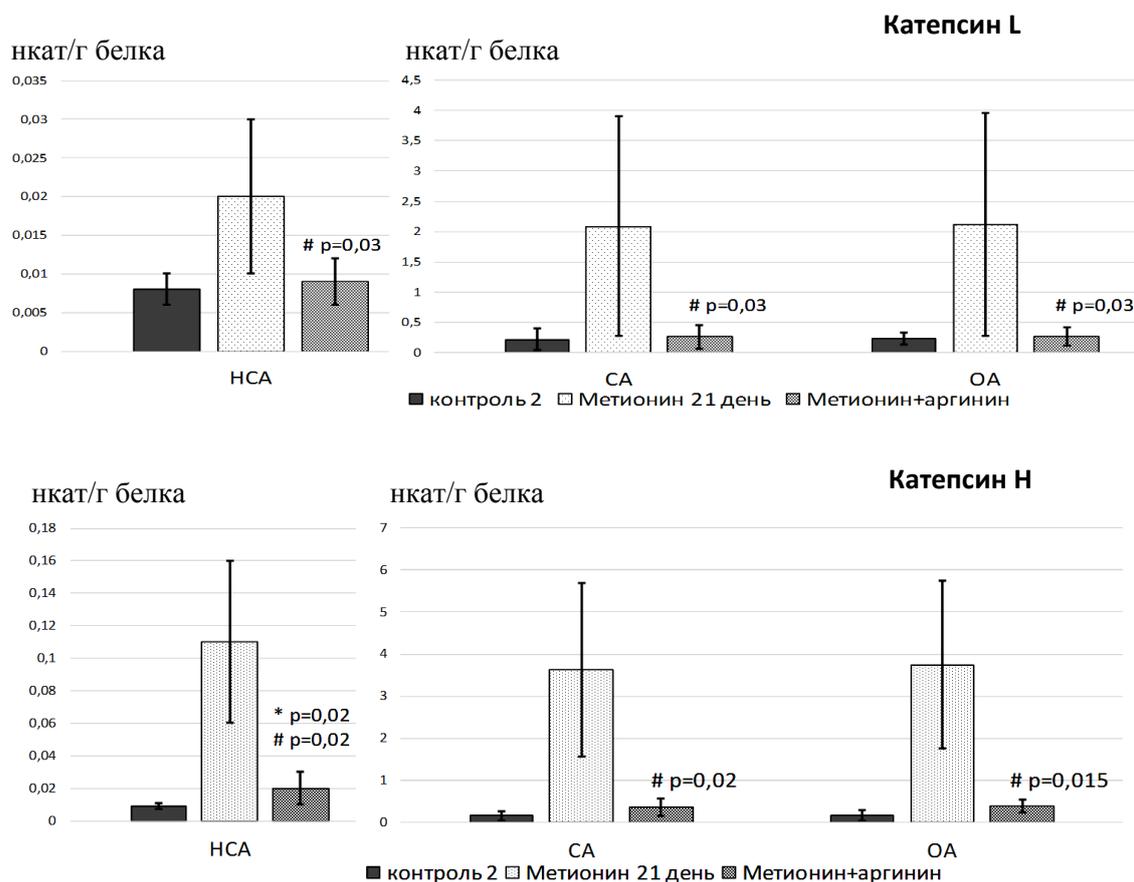
3.4.4. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ миокарда при введении карнитина

При совместном введении метионина и карнитина мы обнаружили статистически значимое снижение активности всех фракций катепсинов L и H миокарда относительно выборки с гипергомоцистеинемией (рис.8).

В грудной аорте для катепсина L установлено статистически значимое снижение только неседиментируемой активности (0,05[0,02;0,11] нкат/г белка) относительно аналогичного показателя (0,37[0,27;0,62] нкат/г белка) в группе животных с гипергомоцистеинемией. Однако, общая и

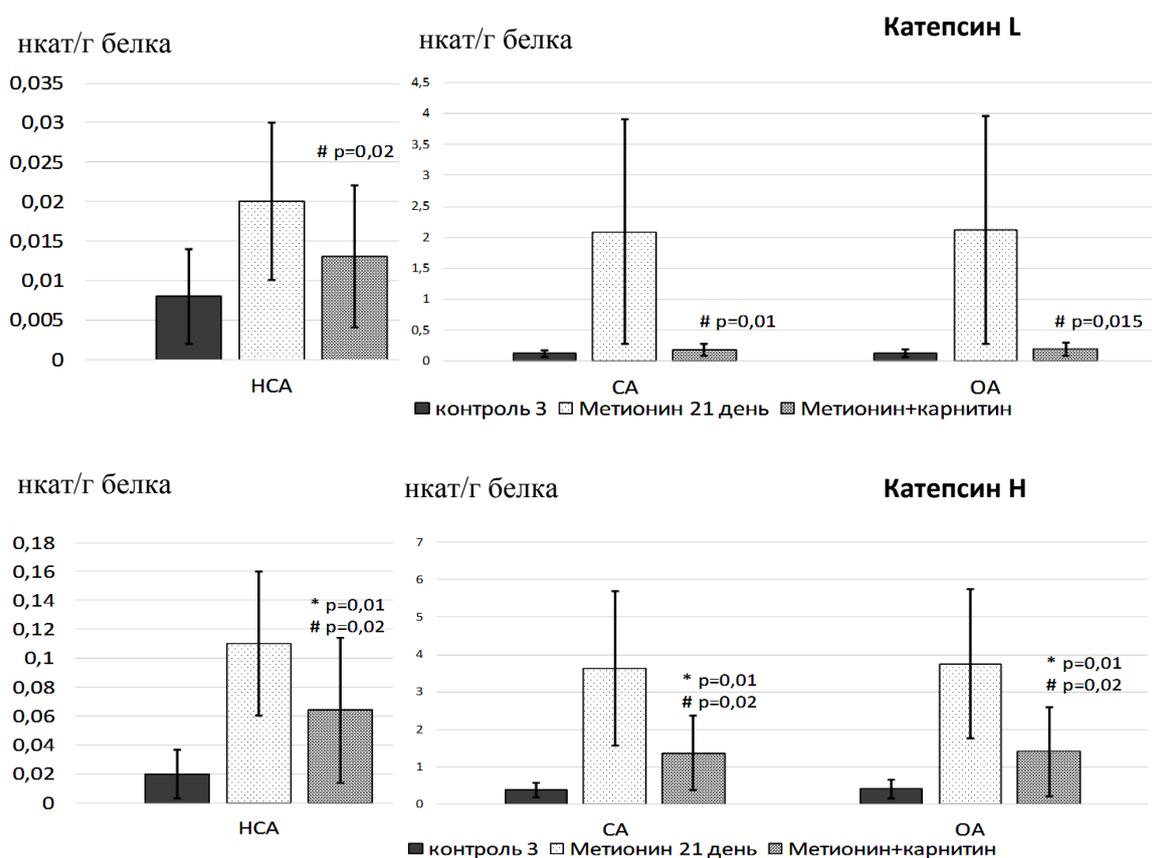
седиментируемая активность катепсина Н статистически значимо выросла (7,52 [5,95;8,20] нкат/г белка и 7,44[5,91;8,11] нкат/г белка соответственно) относительно общей и седиментируемой активности фермента у животных с гипергомоцистеинемией (1,48[0,74;2,26] нкат/г белка и 1,07 [0,32;1,71] нкат/г белка), что отвергает предположение о корректирующем влиянии карнитина на активность протеиназ в гладкомышечной ткани.

Во всех изучаемых мышечных тканях обнаружено статистически значимое снижение коэффициента лабильности кислой фосфатазы в группе, совместно получавших метионин с карнитином относительно выборки с гипергомоцистеинемией, что позволяет предположить снижение эффекта дестабилизации лизосомальной мембраны под действием карнитина (табл.4).



Примечание: * -статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$);
-статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ($p < 0,05$)

Рис. 7. Изменение активности катепсинов L и H миокарда при введении аргинина, нкат/г белка



Примечание:

* -статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$);

-статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ($p < 0,05$)

Рис.8. Изменение активности катепсина L и H миокарда при введении карнитина, нкат/г белка

При анализе полученных результатов установлены прямые положительные корреляционные связи между общим содержанием продуктов окислительной модификации белков и активностью лизосомальной доли катепсина L миокарда ($R=0,97$) и грудной аорты ($R=0,90$), а также общей активностью катепсина L грудной аорты ($R=0,90$) при выраженной гипергомоцистеинемии.

Таким образом, активность лизосомальных цистеиновых протеиназ увеличивается при гипергомоцистеинемии и сопровождается выходом в цитоплазму катепсинов L и H. Аргинин и карнитин оказывают неизбирательные, но благоприятные эффекты на лизосомальный цистеиновый протеолиз и окислительную модификацию белков в различных мышечных тканях.

Сравнительный анализ коэффициента лабильности кислой фосфатазы мышечных тканей при введении карнитина (Me[Q1;Q3])

Миокард			Скелетная мышца			Грудная аорта		
Контроль 3	Метионин 21	Метионин+ карнитин	Контроль 3	Метионин 21	Метионин+ карнитин	Контроль 3	Метионин 21	Метионин+ карнитин
2,67 [1,81;3,28]	8,05 [6,68;8,21]	2,88 [2,18;4,02] [#] p=0,004	5,93 [4,69;6,66]	6,03 [4,87;7,88]	3,10 [2,69;4,27] ^{* #} *p=0,005 #p=0,005	2,67 [1,81;3,28]	24,76 [18,22;30,04]	2,13 [1,92;2,30] [#] p=0,001

*Примечание:** -статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05);
статистически значимые отличия от группы метионин 21 день (p<0,5)

ВЫВОДЫ

1. Гипергомоцистеинемия различной степени выраженности приводит к накоплению продуктов окислительной модификации белков в мышечных тканях. L-аргинин и карнитин уменьшают интенсивность процессов карбонилирования белков, при этом для миокарда наиболее выраженным эффектом обладает аргинин, для грудной аорты –карнитин.

2. Активность катепсинов L и H мышечных тканей при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности имеет тенденцию к нарастанию. Введение аргинина и карнитина приводит к существенной коррекции указанных изменений в миокарде, с одновременным выраженным нарастанием активности катепсина H в грудной аорте.

3. При гипергомоцистеинемии различной степени выраженности обнаруживаются признаки дестабилизации лизосомальных мембран мышечных тканей, корректируемые карнитином. Для аргинина этот эффект обнаружен только в ткани миокарда.

4. При выраженной гипергомоцистеинемии в миокарде и грудной аорте установлены прямые положительные корреляционные связи между общим содержанием продуктов окислительной модификации белков и активностью лизосомальной доли катепсина L.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки России

1. **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.- С.1725-1728.
2. **Ильичева, А.С.** Влияние L-аргинина и карнитина на активность катепсинов L, 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.
3. **Ильичева, А.С.** Состояние окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина // **Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.** – 2015.- №1.- С.45-51.
4. **Ильичева, А.С.** Оценка корректирующего воздействия аргинина и карнитина на активность и распределение катепсинов L, H скелетной и гладкой мышц при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина, С.А. Исаков // **Пермский медицинский журнал.**- 2016.- Т.33, №2.- С.82-89.

Работы, опубликованные в других рецензируемых журналах

1. **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.

Материалы научных конференций

1. **Ильичева, А.С.** Изменение активности катепсинов Li H в сердечной мышце крыс в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина, В.И. Звягина // **Сб. статей Междунар. науч.-**

практ. конф. «Медицинские науки: прошлое, настоящее, будущее» / под ред. А.А. Сукиасян.-Уфа: АЭТЕРНА, 2014.- С. 3-7.

2. **Ильичева, А.С.** Окислительная модификация белков миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина, Д.В. Медведев // Сб. науч. тр. по материалам X юбил. Междунар. конф. «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» / ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ. - Пицунда (Абхазия), 2014.- С.21.

3. **Ильичева, А.С.** Изменение активности лизосомального цистеинового протеолиза миокарда крыс при тяжелой форме гоомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина // Сб. науч. статей по материалам Всерос. науч.-практ. конф. студентов и молодых специалистов с Междунар. участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» / под ред. И.В. Матвеевой [и др.]; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.- Рязань: РИО РязГМУ, 2016.- С.34-38.

4. **Ильичева, А.С.** Окислительная модификация белков грудной аорты крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии различной степени выраженности [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина, А.А. Егоров // Сб. науч. тр. по материалам 9-й Междунар. конф. «Дисфункция эндотелия. Экспериментальные и клинические исследования»/ под ред. С.С. Лазуко [и др.]- Витебск: ВГМУ, 2016.- С.179-182.

5. **Ильичева, А.С.** Оценка активности катепсинов L и H мышечных тканей при умеренной гипергомоцистеинемии [Текст] / М.А. Фомина, А.С. Ильичева // Сб. статей Междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные процессы формирования науки в новых условиях» / под ред. Р.Н. Шайбакова [и др.]- М.: РИО ЕФИР, 2016.- С. 118-121.