

*На правах рукописи*

АРАПОВА АНАСТАСИЯ ИВАНОВНА

**ЛИЗОСОМАЛЬНЫЙ ЦИСТЕИНОВЫЙ ПРОТЕОЛИЗ МЫШЕЧНЫХ  
ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА**

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:**

**Никоноров Александр Александрович** - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский 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 «27» июня 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](http://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 проблемы

В последнее время существенно расширились представления о роли лизосомального протеолиза (Turk B., 1999; Lecher A.M. et al., 2006; Verma S., 2016), тем не менее, одной из ключевых функций лизосомальных протеиназ остается обновление белков за счет устранения неправильно синтезированных или поврежденных молекул (Строев Е.А., 1998). Известно, что в процессе «клеточного старения» происходит накопление окисленных белков (Y. Naito et al., 2010; Baraibar M.A., 2013; Afanas'ev I., 2014), что может ухудшать работу лизосомальных ферментов и в свою очередь, приводить к окислительному стрессу и запуску механизмов антиоксидантной защиты (Rajasekar P., 2007; Dunlop R. A., 2009; Serrano-Puebla, A. 2016). Следует отметить, что оценка степени окислительной модификации белков в настоящее время признается одним из наиболее надежных методов диагностики свободно-радикального повреждения (Дубинина Е.Е. 2008; Х.С. Нуцалова и др., 2012; Кузнецова В.Л., 2015). Несмотря на достаточное количество исследовательских работ, посвященных данной тематике, в настоящее время отсутствует единый подход к трактовке полученных результатов. Использование запатентованного метода (Фомина М.А. и др., 2014), позволяющего максимально полно описать все составляющие окислительной модификации белков, дает возможность не только исследовать общее содержание окислительно модифицированных белков, но и качественно и количественно охарактеризовать маркеры окислительного повреждения, а также степень изменения резервно-адаптационного потенциала.

Многофакторная регуляция активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ и взаимосвязь окислительного (Semchyshyn H.M., 2012), нитрозативного (Y. Naito et al., 2010; Baraibar M.A. et al., 2013) и карбонильного стрессов (Давыдов В.В., 2014; Blesa J. et al., 2015) ставит перед исследователем задачу комплексной оценки степени подобной взаимосвязи. На основании вышеизложенного актуальным представляется

исследование лизосомального цистеинового протеолиза на фоне изменений модификации белков мышечных тканей под влиянием модуляторов синтеза оксида азота.

## **1.2. Цель и основные задачи исследования**

**Цель исследования:** изучить влияние изменений синтеза оксида азота на состояние лизосомального цистеинового протеолиза и окислительной модификации белков в ткани грудной аорты, сердечной и скелетной мускулатуре в эксперименте.

### **Задачи исследования:**

1. Оценить процессы карбонилирования белков стенки грудной аорты, сердечной и скелетной мускулатуры крыс в условиях экспериментального изменения синтеза оксида азота (II).
2. Описать изменения активности катепсинов В, L и Н и их аутокаталитического процессинга под влиянием модуляторов синтеза оксида азота.
3. Оценить изменение проницаемости лизосомальных мембран в изучаемых экспериментальных моделях.
4. Выявить наличие корреляционных связей между процессами окислительной модификации и лизосомального цистеинового протеолиза.

## **1.3. Научная новизна**

Впервые показано, что применение модуляторов синтеза оксида азота приводит к уменьшению содержания продуктов окислительной модификации белков в ткани грудной аорты, миокарде и скелетной мышце. Впервые установлено, что модуляторы синтеза оксида азота в мышечных тканях оказывают преимущественно стимулирующее воздействие на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ. Впервые продемонстрировано, что подавление синтеза оксида азота субстратом и неселективным ингибитором NO-синтазы в изучаемых тканях приводит к дестабилизации лизосомальных мембран. Впервые показана способность карнитина проявлять мембраностабилизирующий эффект на фоне ингибитора синтеза оксида азота.

Впервые установлено наличие корреляционных связей между степенью окислительной модификации белков и активностью различных фракций лизосомальных ферментов на фоне изменений генерации оксида азота.

#### **1.4. Теоретическая и практическая значимость**

Работа носит преимущественно фундаментальный характер. Выявленные на фоне изменений синтеза оксида азота корреляционные связи между степенью окислительного повреждения белков и активностью катепсинов В, L, Н изучаемых клеточных фракций позволяет говорить о регуляции количества окислительно модифицированных белков посредством изменения активности катепсинов в экспериментальных моделях, описанных в диссертации.

Таким образом, появляется возможность более глубокого понимания механизмов тканевой адаптации на фоне нитрозативного стресса и поиска потенциально перспективных методов коррекции указанной патологии.

#### **1.5. Положения, выносимые на защиту**

1. Ингибитор синтеза оксида азота L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает выраженное снижение содержания продуктов окислительной модификации белков в ткани грудной аорты, миокарде и скелетной мышце, за счет уменьшения первичных маркеров оксидативного стресса. Карнитина хлорид, провоцируя выраженное нарастание содержания метаболитов оксида азота в изучаемых тканях, также вызывает снижение степени карбонилирования белков в миокарде и скелетной мышце с нарастанием показателей в ткани грудной аорты; изменения сопровождаются увеличением резервно-адаптационного потенциала тканей.

2. Применение субстрата синтеза оксида азота L-аргинина в дозе 500 мг/кг приводит к нарастанию общей активности катепсинов В, L, Н в ткани грудной аорты за счет лизосомальной фракции и нарастанию общей активности катепсина В на фоне снижения активности катепсинов L, Н в скелетной мышце. L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает снижение активности изучаемых ферментов в ткани грудной аорты и миокарде при повышении показателей в скелетной

мышце. Карнитина хлорид приводит к активации лизосомального цистеинового протеолиза в миокарде и скелетной мускулатуре.

3. Рост значения показателя аутокаталитического процессинга демонстрирует увеличение доли проферментных форм катепсинов, косвенно указывая на стимуляцию их синтеза в тканях под влиянием L-NAME, 25 мг/кг.

4. Подавление синтеза оксида азота субстратом и неселективным ингибитором NO-синтазы приводит к дестабилизации лизосомальных мембран; при этом карнитин проявляет мембраностабилизирующий эффект и существенно нивелирует изменения, вызванные L-аргинином в скелетной мускулатуре и L-NAME в участке грудной аорты и скелетной мускулатуре.

5. Изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ под влиянием модуляторов синтеза оксида азота статистически значимо коррелируют со степенью изменения содержания продуктов окислительной модификации белков.

### **1.6. Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность результатов работы, обоснованность выводов и практических рекомендаций подтверждается корректным использованием теоретических и практических данных, основанных на достаточном числе наблюдений, использовании современных методик, наборов реагентов, приборов и оборудования, применении современных методов статистической обработки материалов исследования. Результаты исследования доложены на: научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития» (Уфа, 2014); научно-практической конференции «Информационные технологии в медицине и фармакологии» (Ростов н/Д., 2014); VII-й 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 РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2016); научно-практической конференции «Актуальные проблемы и достижения в медицине» (Самара, 2016); IX

Международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования» (Витебск, 2016); 81-й Всероссийской итоговой молодежной научной конференции с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2016).

### **1.7. Публикации**

В процессе написания диссертации по полученным данным опубликовано 15 печатных работ, из них 6 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

### **1.8. Личный вклад соискателя**

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

### **1.9. Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы и приложение. Список литературы содержит 181 источник, из них 78 российских и 103 зарубежных. Объем работы составляет 191 страницу машинописного текста, содержит 51 рисунок и 32 таблицы (18 в тексте и 14 в приложении).

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **2.1. Экспериментальные животные**

Работа выполнена на 88 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280-320 граммов. Животные содержались по 3-4 особи одного пола в металлических клетках площадью 24 дм<sup>2</sup> при естественном освещении, получали воду и полноценный сухой комбикорм для лабораторных животных «Чара» (производство ЗАО «Ассортимент – Агро», Московская область, Сергиев-Посадский район, д. Тураково). Приготовление кормов для животных, расчет рациона осуществлялся сотрудниками вивария в соответствии с установленными нормами.

## 2.2. Экспериментальные модели

Экспериментальная модель № 1: формировалась посредством внутрижелудочного введения раствора L-аргинина («Sigma», США) в дозе 500 мг/кг, разведенного в 0,9 % растворе NaCl (Покровский М.В. и др., 2008) в течение 10 дней. Экспериментальная модель № 2: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций неселективного ингибитора синтеза оксида азота N-нитро-L-аргининметилового эфира в дозе 25 мг/кг (L-NAME, «Sigma», США) (Покровский М.В. и др., 2008) в течение 7 дней. Экспериментальная модель № 3: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций L-NAME в дозе 200 мг/кг (L-NAME, «Sigma», США) (Wang Zun-Yi, Hakanson Rolf, 1995) в течение 7 дней. Экспериментальная модель № 4: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций L-NAME в дозе 25 мг/кг с 3-и по 10-е сутки на фоне внутрижелудочного введения L-аргинина в течение 10 дней. Экспериментальная модель № 5: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций карнитина хлорида (производство ФГУ «РКНПК» Минздрава России) в дозе 300 мг/кг в течение 21 дня (Rajasekar P., Palanisamy N., Anuradha C.V., 2007). Экспериментальная модель № 6: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг в течение 21 дня и внутрижелудочного введения раствора L-аргинина в дозе 500 мг/кг г (Дорохина Л.В., Зинчук В.В., 2000) с 11-е по 21-е сутки. Экспериментальная модель № 7: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг в течение 21 дня и водного раствора L-NAME в дозе 25 мг/кг с 14-е по 21-е сутки.

Контрольным группам животных осуществляли введение 0,9 % раствора NaCl: вариант введения, объемы раствора и продолжительность воздействия совпадают с обозначенными выше дозами для каждой конкретной группы эксперимента.

## 2.3. Получение гомогенатов тканей

В условиях стандартизации опытов животные были лишены пищи за 12 часов до забоя. После введения животных в глубокий эфирный наркоз



производили обескровливание и стерильно извлекали участок грудной аорты (в пределах 3 см), сердечную и скелетную мышцу передней поверхности бедра (около 500 мг). Сразу после извлечения, препараты погружали в охлаждённый 0,25 М раствор сахарозы, освобождали от крови, жира и соединительной ткани. Далее следовало взвешивание на электронных весах (АН-220 СЕ, Япония) и гомогенизация с помощью аппарата «Potter S» (Sartorius, Германия).

Посредством дифференциального центрифугирования получали чистую цитоплазматическую (неседиментируемую) фракцию. Осадок, представляющий собой грубую фракцию лизосом (седиментируемая фракция), ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1%.

#### **2.4. Метод определения концентрации метаболитов оксида азота**

Уровень метаболитов оксида азота определяли спектрофотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса (Метельская В.А., Гуманова Н.Г., 2005). Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра с регистрацией на микропланшетном анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology, США) при длине волны 540 нм, концентрацию выражали в нмоль/мг белка.

#### **2.5. Метод оценки состояния окислительной модификации белков в тканях**

Для оценки окислительной модификации белков (ОМБ) использовали определение уровня карбонильных производных по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой (Дубинина Е.Е. и др., 1995). По полученным результатам подсчитывали площадь под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков, которая складывалась из площадей под кривой альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ), результаты выражали в условных единицах/грамм белка (Пат. 2524667 РФ, МПК G01N33/52. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях / Фомина М.А. и др.; Ряз. гос. мед.

ун-т им. И.П. Павлова.- 2013102618/15; заявл. 21.01.2013; опубл. 27.07.2014, Бюл. № 21.- 8 с.).

## **2.6. Способ оценки доли первичных и вторичных маркеров окислительного стресса**

Для оценки доли первичных маркеров подсчитывалась сумма АДНФГ, для оценки вторичных - сумма КДНФГ, и соотносилась с общим содержанием карбонильных производных белков.

## **2.7. Способ оценки резервно-адаптационного потенциала**

Оценка резервно-адаптационного потенциала (РАП) производилась путем подсчета отношения площади под кривой спектра поглощения карбонильных производных белков при спонтанном окислении к аналогичной при окислении, индуцированном по реакции Фентона, принимая последнюю за 100 % (Никитина Ю.В., Мухина И.В., 2009).

## **2.8. Метод определения содержания белка**

Содержание белка определяли в седиментируемой и неседиментируемой фракциях гомогенатов по методу Лоури коммерческим набором НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург).

## **2.9. Метод определения активности кислой фосфатазы**

Активность кислой фосфатазы (КФ) определяли в неседиментируемой и седиментируемой фракциях гомогенатов унифицированным методом по «конечной точке», с использованием коммерческого набора «Витал Диагностикс СПб» (Санкт-Петербург).

## **2.10. Метод определения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ**

Активность катепсинов В, L и Н (КВ, КL и КН) изучалась спектрофлуориметрическим методом (System 3 Scanning Spectrofluorometr, Optical technology devices, inc. Elmstord, New York, 10523) по Barrett & Kirschke (Barrett A.J., Kirschke H., 1981). Удельную активность катепсинов в грудной аорте, миокарде, скелетной мышце выражали в нкат/г белка. Активность кислых гидролаз в неседиментируемой и седиментируемой фракциях

определяли отдельно и обозначали НСА и СА соответственно. Общую активность (ОА) вычисляли как сумму НСА и СА.

### **2.11. Метод определения коэффициента аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ**

Определение аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ осуществляли по методу описанному Борискиной М.А. (Борискина М.А., 1996). Аутокаталитическая активация ферментов оценивалась по коэффициенту ( $K_{aca}$ ) отношения значения активности катепсина после прекалитической инкубации к параллельно определяемому значению активности без преинкубации.

### **2.12. Метод оценки степени проницаемости лизосомальных мембран**

Коэффициент лабильности ( $K_{лаб, \%}$ ) представляет собой процентное соотношение активности фермента в цитозольной фракции к общей активности протеазы, характеризует проницаемость мембраны лизосом, для кислой фосфатазы и конкретного фермента, отражая компарментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ (Пупышев А.Б., 2011).

### **2.13. Статистическая обработка данных**

Статистический анализ результатов исследования проведен с использованием «Microsoft Office Excel 2010» и «Statistica 10.0». Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Результаты представляли в формате  $Me [min; max]$ , где  $Me$  - медиана,  $min$  - минимальное и  $max$  - максимальное значение. Для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест). Для проверки равенства медиан нескольких выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса. Для оценки ранговой корреляции использовали коэффициент Спирмена. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы ( $p$ ) принимали равным 0,05.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **3.1. Характеристика экспериментальных моделей**

Для верификации изменений синтеза оксида азота в экспериментальных моделях осуществляли измерение концентрации его метаболитов (таблица 1). Оказалось, что применение субстрата синтеза NO, статистически значимо повышая концентрацию его метаболитов в плазме, приводит к снижению их в изучаемых тканях. Под влиянием ингибитора синтеза оксида азота, напротив, отсутствие статистически значимых изменений содержания метаболитов оксида азота в плазме сопровождалось статистически значимыми снижениями показателя во всех изучаемых тканях без явной дозозависимости. Сочетанное применение изучаемых модуляторов демонстрирует сохранение эффекта субстрата синтеза для плазмы крови и появление статистически значимого нарастания метаболитов в тканях. Наиболее интересным оказался эффект карнитина: изолированное введение вещества привело к явным статистически значимым нарастаниям концентрации метаболитов оксида азота как в плазме, так и в тканях; более того, этот эффект сохранялся при сочетании введения карнитина как с субстратом, так и с ингибитором синтеза оксида азота.

#### **3.2. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов**

Под влиянием L-аргинина, 500мг/кг, отмечается статистически значимое снижение суммарного содержания карбонильных производных относительно контрольной группы только в скелетной мускулатуре (27,08 [21,80; 33,15] и 35,01 [33,43; 38,96] соответственно).

Неселективный блокатор NO-синтазы в дозе 25 мг/кг во всех исследуемых образцах мышечных тканей вызывает снижение содержания окислительно-модифицированных белков (таблица 2). При этом повышение дозы до 200мг/кг парадоксально возвращает показатели к исходному уровню.

Сочетанное применение субстрата синтеза оксида азота с ингибитором демонстрирует преобладание эффектов ингибитора (рисунок 1).

Таблица 1

Концентрация метаболитов оксида азота в плазме и изучаемых тканях,  
Me [min; max]

Показатель	Плазма крови мкмоль/л	Грудная аорта нмоль/мг белка	Миокард нмоль/мг белка	Скелетная мышца нмоль/мг белка
Контроль 1	24,22 [21,91; 28,07]	41,36 [29,68; 67,86]	1,98 [1,55; 3,64]	1,66 [1,15; 2,53]
L – аргинин	55,99 [51,95; 76,98]*	23,27 [12,68; 37,53]*	1,05 [0,62; 1,31]*	0,82 [0,69; 1,23] *
Контроль 2	23,12 [19,94; 29,87]	42,16 [28,61; 69,11]	1,89 [1,64; 3,99]	1,72 [1,28; 2,49]
L – NAME, 25	22,34 [20,03; 26,19]	17,23 [9,22; 27,45]*	1,38 [1,19; 1,48]*	0,71 [0,56; 1,08]*
L – NAME, 200	20,46 [18,15; 24,31]	12,95 [5,76; 24,21]*	1,21 [1,05; 1,35] *	0,59 [0,43; 0,92] *
Контроль 3	25,02 [24,01; 25,97]	40,99 [29,86; 66,98]	1,87 [1,25; 3,29]	1,57 [1,31; 2,67]
L – NAME + L – аргинин	47,9 [21,52; 77,37]*	82,89 [51,74; 121,13]*▲•	3,11 [2,05; 3,44] ▲•	2,35 [1,99; 2,51] ▲•
Контроль 4	21,85 [19,91; 26,57]	43,01 [30,01; 65,13]	2,11 [1,87; 4,05]	1,69 [1,35; 2,69]
Карнитин	38,85 [35,39; 44,63]*	96,63 [74,76; 118,65] *	3,05 [2,68; 3,36]	3,12 [2,67; 4,12] *
Карнитин + L – аргинин	48,48 [43,86; 57,73] *	134,7 [94,99; 237,34] ▲	3,81 [2,48; 4,16]*▲	4,47 [3,72; 5,50] * ▲■
Карнитин + L – NAME	44,25 [34,62; 60,81]*•■	69,39 [56,85; 86,41] *•	3,74 [3,01; 4,72]*•	3,41 [3,06; 6,81] *•

Примечание: \* - статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ ); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ( $p < 0,05$ ); • - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ( $p < 0,05$ ); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ( $p < 0,05$ )

Таблица 2

Сравнительный анализ общего содержания продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов (у.е./г белка); Me [min; max]

Показатель	Грудная аорта	Миокард	Скелетная мышца
Контроль 2	13,65 [5,72; 15,92]	35,14 [26,79; 40,19]	35,81 [28,82; 37,13]
L-NAME, 25	5,48 [5,09; 13,69] ▲	3,73 [2,14; 6,78] * ▲	7,75 [3,90; 8,14] * ▲
L-NAME, 200	26,55 [23,00; 29,71]*•	34,76 [23,78; 55,31] •	44,67 [26,46; 70,69] •
Контроль 4	6,68 [4,12; 1,61]	31,97 [23,79; 40,19]	34,94 [28,82; 38,96]
Карнитина хлорид	16,45 [11,83; 21,98]*	13,73 [7,85; 21,89]*	11,73 [9,50; 20,22]*
Карнитина хлорид+L- аргинин	2,88 [2,18; 4,34] *▲■	8,55 [5,87; 10,45]*▲	9,45 [6,97; 15,22]*▲
Карнитина хлорид+L- NAME	11,76 [8,96; 19,71] *	7,98 [5,16; 13,31] *•	15,52 [10,06; 22,40]*•■

Примечание: \* - статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ ); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ( $p < 0,05$ ); • - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ( $p < 0,05$ ); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ( $p < 0,05$ )

Изолированное применение карнитина хлорида приводит к статистически значимому повышению содержания карбонилированных белков в ткани аорты

при этом в ткани миокарда и скелетной мышцы показатели статистически значимо снижаются относительно контроля (таблица 2). Сочетание карнитина с ингибитором синтеза оксида азота демонстрирует схожую динамику изменений. Аргинин на фоне карнитина статистически значимо снижает уровень окислительной модификации белков всех изучаемых тканей.

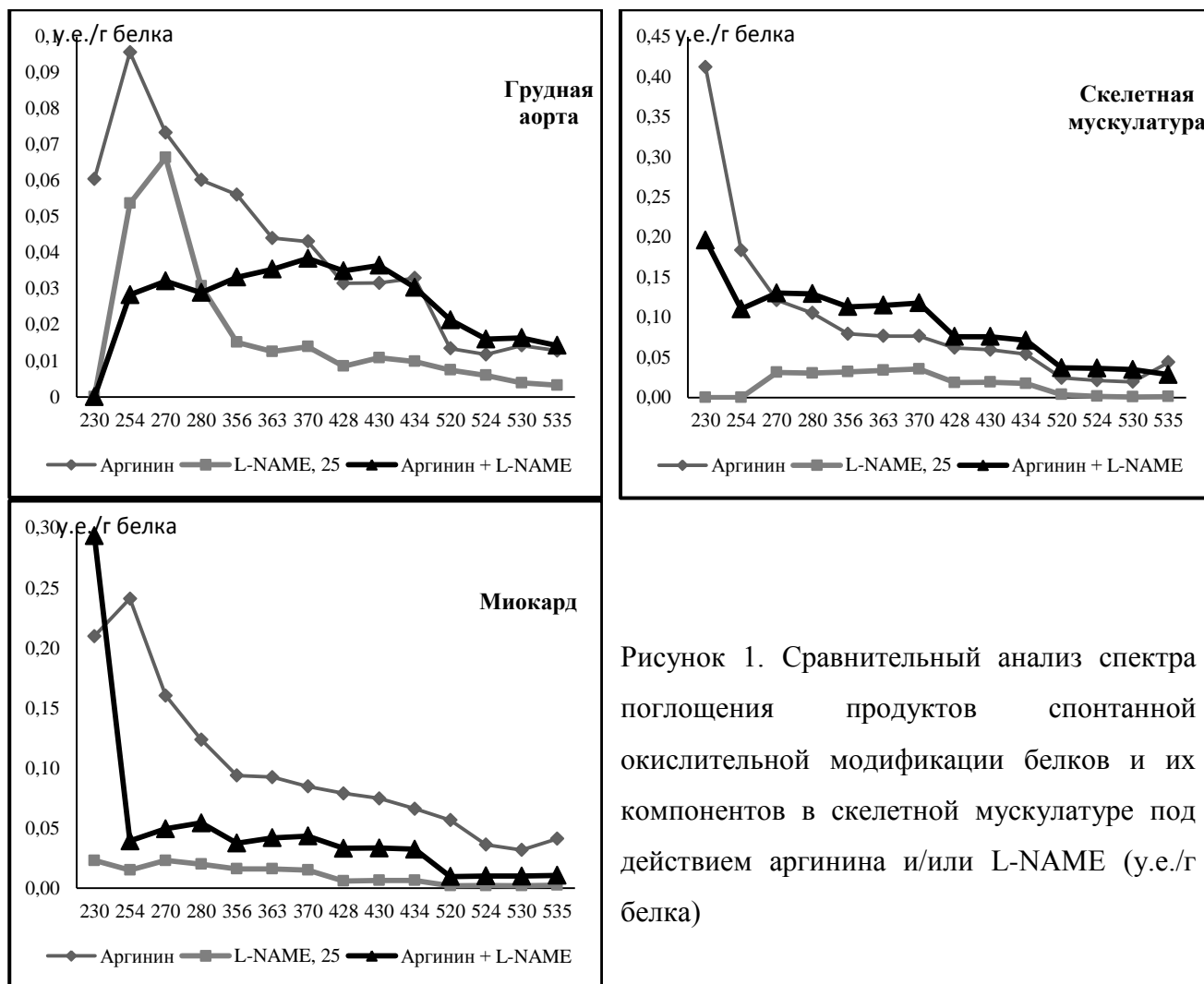


Рисунок 1. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в скелетной мускулатуре под действием аргинина и/или L-NAME (у.е./г белка)

### 3.3. Доля первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса относительно общего содержания карбонильных производных белков у экспериментальных и контрольных животных

При анализе соотношения альдегидных и кетонных производных в изучаемых экспериментальных моделях обнаружено следующее: под влиянием аргинина происходит статистически значимое снижение первичных маркеров в миокарде и скелетной мускулатуре. Действие ингибитора синтеза оксида азота приводит к статистически значимому нарастанию первичных маркеров

оксидативного стресса в аорте при этом их содержание в миокарде и скелетной мускулатуре статистически значимо снижается (таблица 3).

Таблица 3

Доля первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса относительно общего содержания карбонильных производных белков; Me [min;max]

Показатель		Контроль		Эксперимент	
		АДНФГ	КДНФГ	АДНФГ	КДНФГ
Грудная аорта	L-NAME, 200	0,76[0,75;0,78]	0,24[0,21;0,26]	0,95[0,91;0,96]*	0,05[0,03;0,08]*
	Карнитина хлорид+L-аргинин	0,78[0,71;0,84]	0,22[0,15;0,28]	0,63[0,59;0,66]*	0,37 [0,33;0,4]*
Миокард	Аргинин	0,87[0,83;0,94]	0,13[0,05;0,16]	0,8[0,74;0,81]*	0,2[0,18;0,25]*
	L-NAME,25	0,98[0,96;0,98]	0,02[0,01;0,03]	0,8[0,66;0,89]*	0,2[0,1;0,33]*
	L-NAME, 200	0,98[0,96;0,98]	0,02[0,01;0,03]	0,92[0,84;0,97]*	0,08[0,02;0,15]*
	Карнитина хлорид	0,94[0,83;0,98]	0,06[0,01;0,16]	0,73[0,71;0,77]*	0,27[0,22;0,18]*
	Карнитина хлорид+L-аргинин	0,94[0,83;0,98]	0,06[0,01;0,16]	0,77[0,74;0,85]*	0,23[0,14;0,25]*
	Карнитина хлорид+L-NAME	0,94[0,83;0,98]	0,06[0,01;0,16]	0,71[0,62;0,84]*	0,29[0,15;0,37]*
Скелетная мышца	Аргинин	0,85[0,81;0,84]	0,15[0,15;0,18]	0,8[0,74;0,85]*	0,2[0,14;0,25]*
	L-NAME,25	0,97[0,87;0,97]	0,03[0,02;0,12]	0,71[0,59;0,81]*	0,29[0,18;0,4]*
	Карнитина хлорид	0,91[0,81;0,97]	0,09[0,02;0,18]	0,78[0,72;0,82]*	0,22[0,17;0,27]*
	Карнитина хлорид+L-аргинин	0,91[0,81;0,97]	0,09[0,02;0,18]	0,82[0,74;0,85]*	0,18[0,14;0,25]*
	Карнитина хлорид+L-NAME	0,91[0,81;0,97]	0,09[0,02;0,18]	0,77[0,71;0,81]*	0,23[0,18;0,28]*

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

Изолированное введение карнитина приводит к статистически значимому снижению первичных маркеров в скелетной и сердечной мускулатуре без изменений таковых в аорте. Сочетание карнитина с субстратом и ингибитором синтеза оксида азота помимо этого снижает содержание альдегидных производных в аорте.

### 3.4. Оценка резервно-адаптационного потенциала ткани

Несмотря на продемонстрированные ранее значительные изменения содержания окислительно модифицированных белков под влиянием ингибитора оксида азота, оценка РАП показывает отсутствие его изменений в скелетной мышце и разнонаправленность изменений в грудной аорте – уменьшение (эксперимент 66,91% – контроль 72,39%) и в миокарде –

нарастание (эксперимент 69,83% – контроль 57,26%). Изменение дозировки ингибитора не приводит к статистически значимым изменениям. Сочетанное применение аргинина с L-NAME демонстрирует доминирование эффекта аргинина. Продемонстрированные ранее преимущественно антиоксидантные эффекты карнитина как изолированно (миокард: эксперимент 74,17% – контроль 57,58%), так и в сочетании с модуляторами синтеза оксида азота, проявляются в преимущественно статистически значимом увеличении показателя РАП в изучаемых тканях (с аргинином – миокард: эксперимент 77,80% – контроль 57,58%; мышца эксперимент 71,21% – контроль 65,18%; с L-NAME – миокард: эксперимент 64,53% – контроль 57,58%; мышца: эксперимент 69,77% – контроль 65,18%)

### **3.5. Оценка состояния лизосомального цистеинового протеолиза**

Под влиянием субстрата синтеза оксида азота наблюдается явное статистически значимое нарастание активности всех изучаемых ферментов в ткани грудной аорты за счет лизосомальной фракции. В скелетной мускулатуре нарастание активности катепсина В сопровождается снижением активности катепсинов L и H, при этом изменения касаются как седиментируемой, так и неседиментируемой фракции. Это соотносится с ранее продемонстрированной для других тканей способностью лизосомальных цистеиновых протеиназ к изменению активности и компарментализации под влиянием модуляторов синтеза оксида азота (рисунок 2А).

Интересным наблюдением мы считаем, что парадоксальный эффект повышения дозировки ингибитора оксида азота на содержание продуктов окислительной модификации белков, сопровождается, как выяснилось, столь же парадоксальными изменениями активности лизосомальных цистеиновых протеиназ (рисунок 2Б). Так, в тканях грудной аорты и миокарда применение L-NAME в дозе 25 мг/кг демонстрирует снижение активности относительно контроля, при этом увеличение дозировки до 200 мг/кг приводит к нарастанию показателей как минимум относительно более низкой дозы. Исключением



оказалась скелетная мускулатура, в которой наблюдался рост активности изучаемых ферментов под действием L-NAME 25 мг/кг, однако, при этом увеличение дозировки несколько снижало показатели.

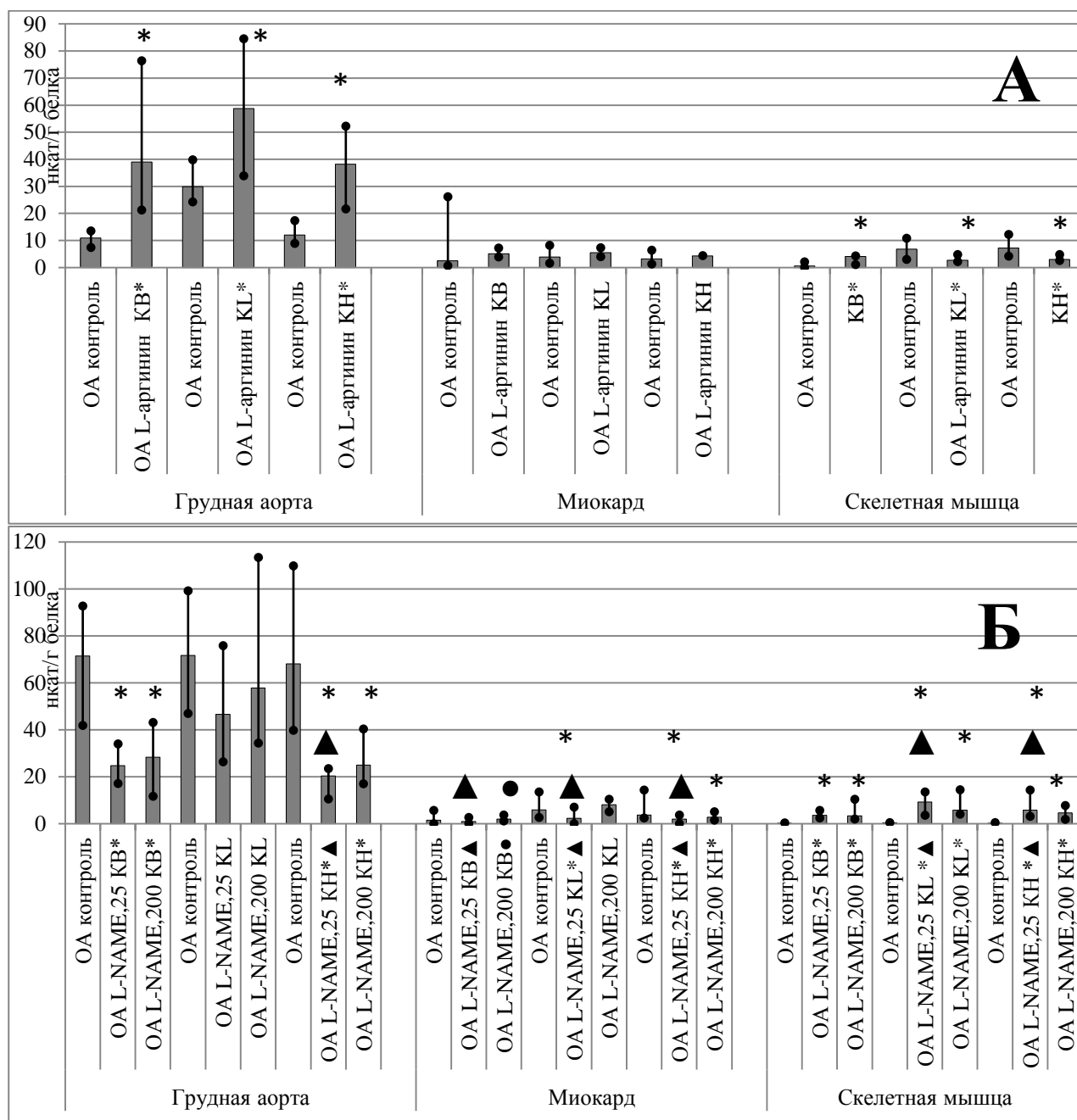
Сочетанное применение субстрата и ингибитора синтеза NO характеризуется преобладанием эффекта L-NAME.

Несмотря на отсутствие статистически значимых изменений активности изучаемых ферментов при изолированном применении карнитина в ткани грудной аорты, наблюдается статистически значимое снижение показателей относительно контроля в группах сочетанного применения (с L-NAME эксперимент 19,22 [10,74; 28,71] и 11,8 [8,82; 13,80] – контроль 62,69 [24,24; 99,20] и 59,38 [8,87; 109,81] катепсинов L и H соответственно). Для ткани миокарда (эксперимент 3,15 [2,23; 4,51] - контроль 0,95 [0,11; 26,19] для катепсина B) описано статистически значимое увеличение общей активности ЛЦП при изолированном применении карнитина хлорида за счет обеих клеточных фракции. Скелетная мышца (эксперимент 7,23 [4,02; 8,71]; 3,28 [2,23; 5,25]; 2,46 [1,57; 3,06] в соответствии с изучаемыми группами карнитина - контроль 0,45 [0,10; 2,05] у катепсина B; эксперимент 8,12 [6,62; 10,95] - контроль 2,95 [0,13; 10,84] у катепсина L у карнитина хлорида изолированно) характеризуется значительным ростом общей активности всех изучаемых ферментов за счет обеих фракций.

Мы отмечаем мембраностабилизирующий эффект аргинина для ткани грудной аорты и для миокарда (KB эксперимент 10,9 [6,7; 12,6] – контроль 54,4 [47,3; 70,5]), выражающийся в снижении показателя коэффициента лабильности. Под влиянием ингибитора NO-синтазы в дозе 25 и 200 мг/кг происходит явная дестабилизация лизосомальных мембран в миокарде и скелетной мышце, причем изменения, по-видимому, не селективны (таблица 4).

Для ткани грудной аорты нарастание коэффициента лабильности для кислой фосфатазы практически не сопровождается изменениями данного показателя для катепсинов. Изолированное применение карнитина практически

не изменило коэффициент лабильности. Однако, введение карнитина существенно нивелирует мембранодестабилизирующий эффект ингибитора синтеза оксида азота, в частности для ткани грудной аорты и скелетной мускулатуры (таблица 4).



Примечания: \* - статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ ); ▲ - статистически значимые отличия от аргинин-зависимой группы ( $p < 0,05$ ); ● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ( $p < 0,05$ )

Рисунок 2. Влияние сочетанного применения L-аргинина, 500 мг/кг и L-NAME, 25 и 200 мг/кг на активность и распределение катепсинов В, L, Н; Me [min; max], нкат/г белка

Таблица 4

Изменение показателей проницаемости лизосомальной мембраны в аорте, миокарде и скелетной мускулатуре (Клаб,%); Ме [min; max]

Показатель		КФ	КВ	КЛ	КН
Грудная аорта	Контроль 1	43,2 [31,7; 63,6]	44,4 [35,7; 78,5]	28,8 [15,6; 58,3]	36,5 [31,5; 60,1]
	L-аргинин	12,1 [11,0; 20,8]*	9,99[5,95; 24,7]*	17,8 [3,9; 26,4]	11,5 [8,2; 22,8] *
	Контроль 4	33,6 [17,6; 63,6]	31 [13,9; 78,5]	28,9 [12,2; 58,3]	32 [14,1; 60,1]
	Карнитина хлорид + L-NAME	28,8 [24,97; 40,9]•	28,1 [17,6; 48,2] *	30,5 [20,5; 56,3]	26,4 [20,5; 47,7]
Миокард	Контроль 2	5 [1,9; 8,1]	2,4 [0,9; 4,8]	2,6 [0,9; 6,2]	3,1 [2,1; 4,9]
	L-NAME, 25	7,7 [4,4; 54,7]*	4,7 [3,2; 23,9] *	5,2 [2,9; 28,1] *	6,6 [4,2; 19,3] *
	L-NAME, 200	11,7 [7,0; 63,6]*	9,4 [6,8; 33,6]*	10,2 [8,2; 30,2]*	13,9 [ 8,4; 29,9]*
Скелетная мышца	Контроль 2	3,3 [1,9; 4,5]	1,8 [1,0; 2,8]	1,9 [0,9; 5,5]	2,3 [2,1; 4,0]
	L-NAME, 25	22,2 [6,9; 54,7] *▲	13,8 [6,0; 23,9] * ▲	13,6 [9,0; 28,1] *▲	16,9 [9,1; 19,3] *▲
	L-NAME, 200	14,2 [ 9,3; 19,3]* •	8,3 [3,3; 11,1] •	8,3 [3,3; 11,1] •	12,5 [5,8; 24,5] •
	Контроль 4	17,42 [4,7; 54,7]	31,79 [6,0; 65,9]	12,94 [4,4;28,1]	13,85 [6,3;19,3]
	Карнитина хлорид + L-NAME	8,6 [7,4; 9,3] •■	9,6 [7,3; 20,3] * •	12,5 [8,7;15,1] •	12 [6,4;15,9] •

Примечания: \* - статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ ); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ( $p < 0,05$ ); • - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ( $p < 0,05$ ); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ( $p < 0,05$ )

Модели с введением ингибитора оксида азота в дозе 25 мг/кг характеризуются статистически значимыми высокими корреляционными связями между окислительной модификацией белков и ОА и НСА катепсина Н – прямая связь в аорте; и НСА катепсина L - обратная корреляция в миокарде. Увеличение дозы ингибитора до 200 мг/кг отмечено статистически значимой высокой степенью прямой корреляционных связей у СА и ОА у КН в миокарде. Участок грудной аорты у животных, получающих карнитин изолированно, а так же в сочетании с аргинином, характеризуется обратной сильной статистически значимой корреляцией между степенью окислительного повреждения белков и НСА катепсина Н и прямой высокой корреляционной связью между тем же показателем и НСА катепсина L соответственно.

## ВЫВОДЫ

1. Применение как ингибиторов, так и стимуляторов синтеза оксида азота приводит к снижению содержания продуктов окислительной модификации белков в ткани грудной аорты, миокарде и скелетной мышце. При этом механизмы изменений, по-видимому, различны: под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг и L-аргинина в дозе 500 мг/кг происходит уменьшение доли первичных маркеров оксидативного стресса, карнитина хлорид в дозе 300 мг/кг, провоцируя нарастание содержания метаболитов оксида азота, вызывает увеличение показателя резервно-адаптационного потенциала изучаемых тканей.
2. Преимущественным эффектом модуляторов синтеза оксида азота на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ является стимулирующее воздействие. Исключениями являются снижение активности изучаемых ферментов в ткани грудной аорты и миокарда под влиянием L-NAME (25 мг/кг) и снижение активности катепсинов L и H в скелетной мышце под действием L-аргинина (500 мг/кг). Сопровождающий указанные изменения рост значения показателя аутокаталитического процессинга демонстрирует увеличение доли проферментных форм катепсинов, косвенно указывая на стимуляцию их синтеза.
3. Подавление синтеза оксида азота субстратом и неселективным ингибитором NO-синтазы приводит к дестабилизации лизосомальных мембран; при этом карнитин демонстрирует мембраностабилизирующий эффект и существенно нивелирует изменения, вызванные L-аргинином в скелетной мускулатуре и L-NAME в сердечной и скелетной мускулатуре.
4. Изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ под влиянием модуляторов синтеза оксида азота статистически значимо коррелируют со степенью изменения содержания продуктов окислительной модификации белков.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**  
**Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах,**  
**рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки**  
**России**

1. Арапова, А.И. Эффекты L-аргинина на состояние лизосомального цистеинового протеолиза сердечной и скелетной мышц [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // *Фундаментальные исследования.*– 2014.-№ 10.-С. 1269-1273.
2. Арапова, А.И. Изменение активности и компартментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ сердечной мышцы под действием карнитина и регуляторов синтеза оксида азота [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // *Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье".*- 2015.– № 4.- С. 69-75.
3. Арапова, А.И. Окислительная модификация белков сердечной и скелетной мускулатуры крыс под влиянием субстрата синтеза оксида азота [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина// *Вестник Пермского университета. Серия биология.*- 2016.- Вып.1.- С. 75-80.
4. Арапова, А.И. Окислительная модификация белков аорты крыс под действием модуляторов синтеза оксида азота [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // *Врач-аспирант.*- 2016.- №2.1(75).- С.167-175.
5. Арапова, А.И. Влияние L-аргинина и L-NAME на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемость лизосомальной мембраны в аорте крыс [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // *Казанский мед. журнал.*- 2016. – Вып.2.- Т.97. - С.250-255.
6. Арапова, А.И. Изучение влияния L-карнитина на изменение активности катепсинов В, L, Н и окислительной модификации белков в мышечных органах крыс [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова.*- 2016.- Т.24, №2. - С.13-20.

### **Работы, опубликованные в других рецензируемых журналах**

1. Арапова, А.И. Секреторная активность лизосомальных цистеиновых протеиназ мышечных тканей под действием L-аргинина [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // Наука молодых (Eruditio Juvenium).- 2014.- № 4.- С. 30-36.
2. Арапова, А.И. Аутокаталитические эффекты лизосомальных цистеиновых протеиназ гладкой мышцы аорты крыс [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // Наука молодых (Eruditio Juvenium).- 2015.- № 4.- С. 27-32.

### **Материалы научных конференций**

1. Арапова, А.И. Аутокаталитические эффекты лизосомальных цистеиновых протеиназ мышечных тканей под действием L-аргинина [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития/ Сб. научн. тр. по итогам междунар. научно-практ. конф. (Уфа, 5 сент. 2014 г.). - Нижний Новгород, 2014. – С.41-44.
2. Арапова, А.И. Оценка стабильности мембран аорты крыс под действием L-аргинина [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // Информационные технологии в медицине и фармакологии/Сб. научн. тр. по итогам междунар. научно-практ. конф. (Ростов-на-Дону, 2014.)- Нижний Новгород, 2014. – С.58-60.
3. Арапова, А.И. Лизосомальный цистеиновый протеолиз сердечной мышцы крыс в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // Здоровье человека в XXI веке. VII-я Российская научно- практическая конференция: Сб. научн. статей (Казань, 3-4 апреля 2015 г.) Под общ. ред. профессора Ксембаева С.С. – Казань, 2015.- С.631-636.
4. Арапова, А.И. Аутокаталитический процессинг лизосомальных цистеиновых протеиназ миокарда крыс [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева: материалы Всероссийской научно-практ. конф. студентов и молодых спец. с междунар. участием / редкол.: И.В. Матвеева, В.И. Звягина, М.А. Фомина, В.В.

Давыдов; ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. - Рязань: РИО РязГМУ, 2016.- С 15-21.

5. Арапова, А.И. Окислительная модификация белков скелетной мускулатуры крыс под действием L-карнитина / А.И. Арапова, М.А. Фомина// Актуальные проблемы и достижения в медицине [Текст] / Сб. научн. тр. по итогам междунар. научно-практ. конф. № 3. ( Самара, 2016). - Нижний Новгород, 2016.- С.90-93.

6. Арапова, А.И. Окислительная модификация белков и изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ под действием регуляторов синтеза оксида азота в аорте крыс [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина// Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: материалы IX Международной научно-практической конференции, Витебск, 27 мая 2016 г. / Вит. гос. мед. ун-т ; редкол.: С.С. Лазуко (гл. ред.) [и др.]. - Витебск: ВГМУ, 2016. - С.176-179.

7. Арапова, А.И. Изменение окислительной модификации белков и активности катепсинов В, L, Н миокарда крыс под действием карнитина и регуляторов синтеза оксида азота [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // Сетевое издание. Вестник БГМУ: 81 Всероссийская итоговая молодежная научная конференция с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины».- 2016. - №4.- С.103-108. - Электрон. дан.- Режим доступа:[https://vk.com/doc-111858379\\_437718517?hash=37605cfcbe8eab5d7&dl=7299c60575c8f60f56](https://vk.com/doc-111858379_437718517?hash=37605cfcbe8eab5d7&dl=7299c60575c8f60f56).