ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Арапова А.И., Фомина М.А., 2014
УДК:577.1+616.153

СЕКРЕТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ L-АРГИНИНА

А.И. АРАПОВА, М.А. ФОМИНА

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

SECRETORY ACTIVITY OF LYSOSOMAL CYSTEINE PROTEASES MUSCLE TISSUE UNDER L-ARGININE

A.I. ARAPOVA, M.A. FOMINA

Ryazan State I.P. Pavlov University, Ryazan

Изучено влияние L-аргинина в дозе 500 мг/кг на секреторную активность лизосомальных цистеиновых протеиназ мышечных тканей крыс. Установлено, что воздействие L-аргинина оказывает мембрано-стабилизирующие эффекты, в большей степени за счет подавления секреции изучаемых ферментов.

Ключевые слова: *L-аргинин, лизосомальные цистеиновые протеиназы, катепсины B, L, H, пермеабилизация лизосомных мембран.*

The effect of L-arginine at a dose of 500 mg / kg on the secretory activity of lysosomal cysteine proteases muscle tissue of rats. It is established that the effect of L-arginine leads to stabilization of the lysosomal membrane, the most because inhibition of cathepsins secretion.

Keywords: *L-arginine, lysosomal cysteine proteinases, cathepsins B, L, H, permeabilization of lysosomal membranes.*

Введение

Одной из наиболее активно изучаемых проблем является прижизненная пермеабилизация лизосомных мембран (ПЛМ), которая стала еще более актуальной в связи с открытием взаимосвязи между освобождаемыми ферментами лизосом и запуском апоптоза. Дальнейшие исследования по моделированию апоптоза обнаружили увеличение содержания в цитозоле в первую очередь катепсинов, при этом лизосомы морфологически могут выглядеть интактными. Работы по ингибированию катепсинов или их генетическая опосредованная инактивация, напротив, демонстрируют торможение некоторых путей программированной клеточной гибели [13].

Активные исследования ведутся также в области изучения специфического расщепления и активации сигнальных пептидов апоптоза катепсинами лизосом, а также поиска связи окислительного стресса слабилизацией мембран лизосом [7]. В настоящее время подтверждены данные о том, что мембраны лизосом подвержены повреждающему действию транслоцирующихся в цитозоль катепсинов [16].

Несмотря на то, что какого-либо универсального механизма, сигнализирующего о гибели клетки в результате ПЛМ, в настоящее время не найдено, существуют предположения о ведущей роли высвобождающихся из лизосом катепсинов для гибели клетки и активации последующих путей сигнализации [6].

Регистрация прижизненной утечки лизосомных ферментов в цитозоль и результаты экспериментов по избирательному ингибированию активности высвобождаемых ферментов или эффектов генетически опосредованного подавления экспрессии катепсинов свидетельствует о том, что частичная ПЛМ может быть независимым фактором апоптоза [11, 14].

Поскольку нарастание активности и/или содержания лизосомальных катепсинов в цитозоле может быть вызвано как их выходом сквозь поврежденную лизосомальную мембрану, так и секрецией [10], актуальным представляется исследование вклада секреторного механизма катепсинов при изменении синтеза оксида азота. Данное вещество чаще всего рассматривается в качестве маркера эндотелиальной дисфункции [2], имеющей, по данным эпидемиологических исследований, широкую распространенность в популяции [5], однако в настоящее время происходит накопление сведений о множестве других функций оксида азота [3], в том числе и в качестве одного из факторов регуляции апоптоза [1, 8].

Цель исследования

Изучение влияние L-аргинина на секреторную активность лизосомальных цистеиновых протеиназ мышечных тканей крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на 12 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280-320 граммов. Животные содержались по 3-4 особи одного пола в металлических клетках площадью 24 дм^2 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. Содержание животных в виварии соответствовало «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993. Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли в соответствии с правилами, изложенными Международным Советом Медицинских Научных Обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.) и приказе МЗРФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота (II) субстратом NO-синтазы осуществляли путем внутрижелудочного введения раствора L-аргинина («Sigma», США) в 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [2] через стеклянный градуированный шприц с внутрижелудочным зондом. Объем вводимого раствора зависел от массы, и не превышал 1 мл. Препарат вводили 1 раз в сутки до утреннего кормления ежедневно в течение 10 дней. Выведение из эксперимента осуществляли на 11-е сутки. В качестве группы сравнения использовались лабораторные животные, которым в течение 10 дней внутрижелудочно вводили физиологический раствор.

Оценка степени секреции лизосомальных цистеиновых протеаз производилась путем анализа коэффициента W_{secr} [4]. Метод основан на одновременной оценке двух параметров – коэффициента лабильности катепсина (C_{lab}Cath) и коэффициента лабильности кислой фосфатазы (C_{lab}AP) как показателей функционального состояния лизосомальной мембраны.

Статистический анализ результатов исследования проведен согласно руководствам по медицинской статистике, с использованием программы «Microsoft Office Excel 2010» и «Statistica 10.0». Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Для корреляционных рядов с отсутствием согласия данных с нормальным распределением вычисляли характеристики: медиану (Me), минимальное (min) и максимальное (max)

значение, результаты представляли в формате Me [min; max]. Поскольку отмечалось отсутствие согласия большинства данных с нормальным распределением, для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест).

Результаты и их обсуждение

Оценка степени секреции лизосомальных цистеиновых протеиназ (W_{secr}), трактуется следующим образом: возрастание (положительное значение) данного биохимического показателя говорит о секреции лизосомальных цистеиновых протеиназ за счет проницаемости мембраны, а уменьшение (отрицательное значение) свидетельствует о нарушении целостности лизосомальной мембраны [4]. Одной из составляющих метода является оценка коэффициента лабильности катепсина ($К_{лаб}$,%), который характеризует общую проницаемость лизосомальной мембраны для данного фермента, поэтому возникает необходимость совместной трактовки показателей $К_{лаб}$,% и W_{secr}.Доля внелизосомальной активности и коэффициент лабильности лизосомальной мембраны для каждого из катепсинов может изменяться за счет изменения общей проницаемости лизосомальной мембраны [12] и изменения степени секреции индивидуального фермента.

При анализе показателей коэффициентов лабильности и доли секретируемой активности катепсинов B, L, H в описываемой экспериментальной модели в мышечных органах выявлены следующие тенденции(табл. 1).

Таблица 1

Влияние L-аргинина на степень секреции лизосомальных цистеиновых протеиназ в различных мышечных органах, Me [min; max]

		Миокард		**Грудная аорта**		**Скелетная мышца**	
		Контроль	L-аргинин	Контроль	L-аргинин	Контроль	L-аргинин
Кат. B	$К_{лаб}$,%	54,7 [39,8; 59,1]	10,6* [4,0; 17,1]	53,2 [33,3; 82,9]	13,1* [5,0; 23,2]	62,2 [53,9; 71,1]	50,7* [46,4; 56,7]
	W_{secr}	0,73 [0,62; 0,87]	−0,80* [−2,73; 0,04]	−0,06 [−0,43; 0,14]	−0,11 [−1,20; 0,41]	0,87 [0,82; 0,93]	0,77* [0,71; 0,79]
Кат. L	$К_{лаб}$,%	8,1 [5,4; 13,6]	12,8 [6,4; 19,6]	62,1 [33,4; 83,7]	15,9* [9,8; 40,1]	10,4 [7,0; 11,2]	8,4 [6,2; 11,6]
	W_{secr}	−0,62 [−1,78; 0,26]	−1,09 [−1,77; 0,24]	0,02 [−0,16; 0,17]	0,30 [−0,29; 0,94]	0,21 [0,05; 0,39]	−0,41* [−1,02; −0,06]
Кат. H	$К_{лаб}$,%	11,2 [9,5; 15,0]	11,3 [11,0; 15,9]	61,9 [19,8; 78,3]	14,4* [9,6; 29,0]	7,2 [5,5; 15,1]	8,7 [7,3; 10,7]
	W_{secr}	−0,24 [−0,59; 0,44]	−0,62 [−0,67; −0,27]	−0,02 [−0,86; 0,14]	0,21 [−0,15; 0,44]	0,04 [−0,17; 0,34]	−0,39* [−0,58; −0,21]

Примечание: *– статистически значимые отличия от группы контроля ($p<0,05$).

Действие L-аргинина в дозе 500 мг/кг в большинстве случаев приводит к уменьшению доли внелизосомальной фракции изучаемых катепсинов в мышечных тканях. Наиболее яркие изменения касаются катепсина В. Так, обнаружено, что данный фермент демонстрирует высокие показатели коэффициента лабильности лизосомальной мембраны в контрольной группе; эффект L-аргинина проявляется выраженным статистически значимым снижением этого параметра. Анализ изменений W_{secr} позволяет предполагать, что причиной выявленных сдвигов в сердечной и скелетной мышце является уменьшение степени секреции катепсина В (статистически значимые снижения W_{secr} в изучаемых органах). Это наблюдение согласуется с данными [12, 15, 16], описывающими вклад секреции катепсина В в развитие различных патологий.

Однако следует помнить о том, что высвобождающийся катепсин В какое-то время сохраняет стабильность при физиологических значениях pH [13], что в свою очередь не гарантирует отсутствие дальнейшего развития апоптоза. Не следует забывать и о возможности лизосомальных цистеиновых протеиназ запускать механизм активации программированной клеточной гибели посредством активации других медиаторов.

Для катепсинов L и H в миокарде не обнаружено статистически значимых изменений изучаемых показателей, при этом в скелетной мышце на фоне отсутствия изменений коэффициента лабильности лизосомальной мембраны наблюдается статистически значимое снижение W_{secr}, что также можно расценивать как подавление секреции этих ферментов.

В грудной аорте для всех изучаемых ферментов тенденция оказалась однонаправленной: действие L-аргинина привело к выраженному статистически значимому снижению коэффициента лабильности лизосомальной мембраны, при этом высокие значения данного показателя в контрольной группе не сопровождались положительными значениями W_{secr}, что говорит об отсутствии вклада секреторного механизма в выход ферментов во внелизосомальную фракцию для данного органа. Возможно, по этой причине статистически значимых изменений W_{secr} ни для одного из изучаемых ферментов в грудной аорте не получено и снижение коэффициентов лабильности в этом случае можно трактовать как проявление общего стабилизирующего действия L-аргинина на лизосомальную мембрану.

В целом, результаты исследования подтверждают тезис о дифференциальной проницаемости лизосомальной мембраны для цистеиновых протеиназ и позволяют говорить о положительной роли L-аргинина на процесс лизосомальной пермеабилизации.

В настоящее время пермеабилизация лизосомальных мембран и ассоциированный с ней апоптоз чаще всего изучается в экспериментальной онкологии [8, 15], где повышенная экспрессия катепсинов может считаться одним из доказанных фактов [9]. Однако, данный процесс имеет, по-видимому, гораздо более широкое распространение и поиск его регуляторов может дать стимул к разработке препаратов для лечения и профилактики ряда заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых патологий.

Выводы

1. L-аргинин в дозе 500 мг/кг в сердечной и скелетной мускулатуре способствует уменьшению выхода катепсина В в цитоплазматическую фракцию за счет уменьшения вклада секреторного механизма.
2. Степень секреции катепсинов L и H в скелетной мышце под действием L-аргинина снижается.
3. Действие L-аргинина на грудную аорту приводит к общей стабилизации лизосомальных мембран.

Литература

1. Брюне Б. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонические сигнальные пути / Б. Брюне, К. Сандау, А. фон Кнетен // Биохимия. – 1998. – Т. 63, вып. 7. – С. 966-975.
2. Покровский М.В. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота. / М.В. Покровский [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71, № 2. – С. 29-31.
3. Урясьев О.М. Роль оксида азота в регуляции дыхательной системы / О.М. Урясьев, А.И. Рогачиков // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2013. – № 2. – С. 133-140.
4. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. Способ оценки степени секреции лизосомальных цистеиновых протеиназ. Заявка на выдачу патента № 2013 125 639 (037767), приоритет от 03.06.2013.
5. Якушин С.С. Значение оценки эндотелиальной функции на популяционном уровне (по данным исследования МЕРИДИАН-РО) / С.С. Якушин, Е.В. Филлипов // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2013. – № 3. – С. 48-55.
6. Broker L.E. Cell death independent of caspases: a review / L.E Broker., F.A. E Kruyt., G. Giaccone // Clin. Cancer. – 2005. – Res. 11 – P. 155-3162.
7. Brunk U.T. Lysosomal involvement in apoptosis / U.T. Brunk, J. Neuzil, J.W. Eaton // Redox. – 2001. – Rep. 6. – P. 91-97.
8. Chun Hun-Taeg Nitric Oxide as a Bioregulator of Apoptosis / Hun-Taeg Chung [et al.] // Biochemical and

Biophysical Research Communications. – 2001. – Vol. 282. – P. 1075-1079.

9. Fehrenbacher N. Lysosomes as targets for cancer therapy / N. Fehrenbacher, M. Jaattela // Cancer. – 2005. – Res. 65 – P. 2993-2995.

10. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII / U. Felbor [et al.] // EMBO J. – 2000. – Vol. 19, №6. – P. 1187-1194.

11. Guicciardi M.E. Lysosomes in cell death / M.E. Guicciardi, M. Leist, G.J. Gores // Oncogene. – 2004. – № 23. – P. 2881-2890.

12. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells / R. Lemaire [et al.] // Br J Rheumatol. – 1997. – Vol. 36, №7. – P. 735-743.

13. Stoka V. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis / V. Stoka, V. Turk, B. Turk // Biol. Chem. – 2007. – № 388. – P. 555-560.

14. Lysosomal labilization / A. Terman [et al.] // IUBMB Life. – 2006. – № 58. – P. 531-539.

15. Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated bycathepsin D / J.W. Van der Stappen [et al.] // Int. J. Cancer. – 1996. – Vol. 67, № 4. – P. 547-554.

16. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomalpermeabilization is cathepsin B dependent / N.W. Werneburg [et al.] // Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2002. – № 283. – P. 947-956.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Арапова А.И. – заочный аспирант кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: asiaarapova@mail.ru.

Фомина М.А. – к.м.н., доц. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: marya.fom@yandex.ru.