

*ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ*

© Арапова А.И., Фомина М.А., 2015  
УДК 547.474.5 + 616.136

**АУТОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ АОРТЫ КРЫС**

А.И. АРАПОВА, М.А. ФОМИНА

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

**AUTOCATALYTIC EFFECT OF LYSOSOMAL CYSTEINE PROTEASES SMOOTH MUSCLE RAT AORTA**

A.I. ARAPOVA, M.A. FOMINA

Ryazan State Medical University, Ryazan

Изучено влияние L-аргинина, L-NAME, L-карнитина, а также их сочетаний на аутокаталитическую активность лизосомальных цистеиновых протеиназ тканей аорты крыс. Установлено, что воздействие L-аргинина в дозе 500 мг/кг не изменяет показатели коэффициентов аутокаталитического действия катепсинов В, L, H; L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает нарастание степени аутокаталитического процессинга катепсина H, однако, увеличение дозы ингибитора до 200 мг/кг приводит к нивелированию указанного эффекта. Под действием карнитина в дозе 300 мг/кг происходит стимуляция ауто-процессинга, степень изменения меньше, чем для L-NAME 25 мг/кг.

*Ключевые слова:* L-аргинин, L-NAME, L-карнитин, лизосомальные цистеиновые протеиназы, катепсины В, L, H, аутокаталитический процессинг.

The effect of L-arginine, L-NAME, L-carnitine, as well as their combinations in the autocatalytic activity of lysosomal cysteine proteases rat aortic tissue. It is found that the effect of L-arginine 500 mg/kg it does not change the performance coefficients autocatalytic action of cathepsins B, L, H; L-NAME at 25 mg/kg caused increase in the degree of autocatalytic processing cathepsin H, however, increasing the dose of the inhibitor of 200 mg/kg resulted in a reduction of this effect. Under the action of carnitine 300 mg / kg auto-protessing stimulation occurs , the rate of change is less than L-NAME 25 mg / kg.

*Keywords:* L-arginine, L-NAME, L-carnitine, lysosomal cysteine proteinases, cathepsins B, L, H, autocatalytic processing.

Лизосомальные цистеиновые протеиназы (ЛЦП) достаточно активно изучаются в рамках лизосомального протеолиза, осуществляющего полную деградацию белков до аминокислот последовательным и/или сочетанным действием отдельных ферментов. Однако немаловажную роль они играют как агенты ограниченного протеолиза, приводящего к образованию функционально активных белков, ферментов, гормонов. Интересна их функция в сигнальной трансдукции апоптоза наряду с цитозольными каспазами [9].

Помимо внутриклеточного протеолиза, лизосомальные ферменты, могут участвовать в процессах внеклеточного расщепления белков, что обусловлено секрецией лизосомальных протеиназ (катепсинов В, D, L, коллагеназы, эластазы), которые ответственны за деградацию внеклеточного матрикса в процессах воспаления, роста опухолей и неоангиогенеза [2, 7].

Критическим этапом для контроля протеолитической активности и, возможно, способности к секреции катепсинов является лимитированный протеолиз. К настоящему времени, аутокаталитический механизм активации был описан для многих цистеиновых протеиназ, таких как предшественник папаина, катепсин В, катепсин К и катепсин L [3]. Было установлено, что протеолитическое отщепление пропептида достигается действием различных протеаз, таких как пепсин, нейтрофильная эластаза, катепсин D, а также различными цистеиновыми протеиназами. В последние годы, большинство исследований сконцентрировалось на изучении аутокаталитического процессинга лизосомальных протеаз в кислой среде, так как снижение pH, предположительно, ослабляет взаимодействие между пропептидом и каталитической частью мо-

лекулы, что было показано на примере взаимодействия катепсинов В и L с их пропептидами. Как следствие, профермент, вероятно, претерпевает конформационные изменения, в результате которых связь пропептида с активным центром ослабляется при сохраненной вторичной структуре. Так же одним из механизмов данного процесса может являться расширение места активного центра за счет изменения pH, что было показано для зрелого папаина, смещения пропептидаоключионной петлей, как это уже было предложено для катепсина В, и/или небольшими локальными структурными изменениями в пропептиде, что имеет место у катепсина L [3].

### **Цель исследования**

Изучение влияния L-аргинина, L-NAME, L-карнитина, а так же их сочетаний на аутокаталитическую активность лизосомальных цистеиновых протеиназ тканей аорты крыс

### **Материалы и методы**

Работа выполнена на 80 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280-320 граммов. В работе руководствовались «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказом МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Экспериментальная группа № 1: осуществляли путем внутрижелудочного введения раствора L-аргинина («Sigma», США) на 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [5] через стеклянный градуированный шприц с внутрижелудочным зондом. Объем вводимого раствора зависел от массы, и не превышал 1 мл. Препарат вводили 1 раз в

сутки до утреннего кормления ежедневно в течение 10 дней. Выведение из эксперимента осуществляли на 11-е сутки.

Экспериментальная группа № 2: осуществляли внутрибрюшинное введение неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME, «Sigma», США) в дозе 25 мг/кг [5] в виде водного раствора через переднюю брюшную стенку одноразовым пластиковым шприцем с тонкой короткой иглой. Объем вводимого препарата зависел от массы животного: 0,5 мл на 200 граммов массы. Препарат вводился 1 раз в сутки в утренние часы ежедневно в течение 7 дней. Выведение из эксперимента осуществлялся на 8-е сутки.

Экспериментальная группа № 3: осуществляли внутрибрюшинное введение неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME, «Sigma», США) в дозе 200 мг/кг [10] в виде водного раствора через переднюю брюшную стенку одноразовым пластиковым шприцем с тонкой короткой иглой. Объем вводимого препарата зависел от массы животного: 0,5 мл на 200 граммов животной массы. Препарат вводился 1 раз в сутки в утренние часы ежедневно в течение 7 дней. Выведение из эксперимента осуществлялся на 8-е сутки.

Экспериментальная группа № 4: осуществляли внутрибрюшинное введение L-NAME в указанных дозах с 3-и по 10-е сутки на фоне перорального введения L-аргинина. Животных выводили из эксперимента на 11-е сутки.

Экспериментальная группа № 5: осуществляли введение карнитина хлорид (производство ФГУ "РКНПК" Минздрава России) вводили в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно. Препарат вводили 1 раз в сутки до утреннего кормления ежедневно в

течение 21 дня. Выведение из эксперимента осуществляли на 22-е сутки.

Экспериментальная группа № 6: осуществляли введение карнитина хлорида (производство ФГУ "РКНПК" Минздрава России) вводили в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно в течение 21 дня, одновременно осуществляя внутрибрюшинное введение L-NAME в указанных дозах с 14-е по 21-е сутки. Животных выводили из эксперимента на 22-е сутки.

Экспериментальная группа № 7: осуществляли внутрибрюшинное введение карнитина хлорида (производство ФГУ "РКНПК" Минздрава России) в дозе 300 мг/кг в течение 21 дня; одновременно осуществляли внутрижелудочное введение раствора L-аргинина («Sigma», США) на 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [4] через стеклянный градуированный шприц с внутрижелудочным зондом с 11-е по 21-е сутки. Животных выводили из эксперимента на 22-е сутки.

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

Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ в седиментируемой (СА) и неседиментируемой (НСА) фракциях гомогената участка грудной аорты определяли отдельно. Активность катепсинов В, L, Н (KB, KL и KH) изучалась спектрофлуориметрическим методом [8].

Коэффициент аутокаталитического действия катепсинов ( $K_{aca}$ ) рассчитывался как отношение значения активности фер-

мента после прекалалитической инкубации в отсутствие субстрата к параллельно определяемому значению активности без преинкубации [2].

Статистический анализ проведен с использованием программы «Statistica 10.0». Вычисляли медиану (Me), минимальное (min) и максимальное (max) значение (Me [min; max]), для оценки статистической значимости использовали критерий Манна-Уитни (U-тест).

### Результаты и их обсуждение

С целью оценки степени аутокаталитической активации проведен сравнительный анализ коэффициента аутокаталитического действия катепсинов В, L, Н гладкой мышцы аорты крыс (табл. 1).

В условиях стимулирования дополнительного синтеза оксида азота *in vivo* введением L-аргинина, значения  $K_{aca}$  изучаемых ферментов в цитозольной и лизосомальной фракциях статистически значимо не изменяются относительно значений контрольной группы.

Неселективный ингибитор индукцибельной NO-синтазы- L-NAME *in vivo* стимулирует аутопроцессинг катепсинов В, L, Н; при этом повышение  $K_{aca}$  для катепсина Н демонстрирует статистически значимые отличия от контроля как в лизосомальной, так и в цитоплазматической фракции. Это может свидетельствовать, о том, что в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота организм испытывает функциональную потребность в активных протеиназах. Полученные данные согласуются с результатами, полученными ранее для ткани тимуса и селезенки [1].

Увеличение дозы L-NAME до 200 мг/кг приводит к снижению степени аутокаталитического процессинга, что может объясняться истощением ресурса зимогенов.

В условиях сочетанного применения L-NAME 25 мг/кг на фоне L-аргинина для катепсина Н в обеих фракциях обнаруживается статистически значимое снижение  $K_{aca}$  относительно группы L-NAME 25 мг/кг, что свидетельствует о корректирующем действии субстрата синтеза NO.

Участие в аутокаталитическом процессинге ЛЦП карнитина характеризуется стимуляцией аутопроцессинга КЛи КН, однако степень изменений оказалась ниже, чем под влиянием L-NAME 25 мг/кг, что может указывать на меньшую долю зимогенов и, как следствие, существование большей части протеиназ в активном состоянии. Значения  $K_{aca}$  при сочетании карнитина с аргинином L-NAME 25 мг/кг вызывает снижение  $K_{aca}$  (в большей степени для КН), что может объясняться суммированием эффектов указанных веществ с переводом большей доли зимогенов в активное состояние, при этом под влиянием аргинина преинкубация вызывает не процессинг проферментов, а расщепление активных форм. Снижение  $K_{aca}$  при сочетании карнитина с L-NAME 25 мг/кг может объясняться сохранением некоторого количества проферментов, для которых характерна очень низкая каталитическая активность, которая может быть достаточной для инициирования цепной реакции, катализируемой возрастающим количеством каталитически активных ферментных молекул [2].

### Выводы

1. Воздействие аргинином на ткани аорты крысы статистически значимых изменений показателей аутокаталитического процессинга не вызывает.

2. Применение ингибитора синтеза оксида азота L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает нарастание степени аутокатали-

**Коэффициенты аутокаталитического действия катепсина В, L и H  
ткани аорты крыс, Me [min; max]**

Показатель	Контроль	L – аргинин	Контроль	L-NAME 25	L-NAME 200	Контроль	L-NAME +L-аргинин	Контроль	Карнитин	L-аргинин +карнитин	L-NAME карнитин
НСАК В	1,03 [0,75; 1,16]	1,21 [0,42; 1,39]	1,02 [0,78; 1,65]	1,91 [0,46; 5,76]	0,70 [0,38; 1,54]	1,02 [0,75; 1,65]	1,13 [0,63; 1,29]	1,07 [0,75; 1,65]	0,97 [0,82; 1,62]	0,90 [0,67; 1,09]	1,39 [0,97; 2,05]
СА KB	2,19 [0,92; 2,77]	1,12 [0,49; 1,39]	1,17 [0,95; 1,60]	1,79 [1,00; 2,22]*	0,78 [0,34; 1,63] •	1,18 [0,92; 2,77]	1,05 [0,35; 1,97]	1,49 [0,92; 2,77]	0,96 [0,75; 1,22] •	0,99 [0,73; 1,15] •	1,38 [0,90; 1,91]
НСА КЛ	1,20 [0,88; 2,23]	1,33 [0,44; 8,03]	0,67 [0,44; 1,14]	0,64 [0,41; 0,85] ▲	0,99 [0,52; 1,23]	0,88 [0,44; 2,23]	0,77 [0,54; 1,85]	0,98 [0,44; 2,23]	1,44 [0,92; 2,06] •	1,81 [1,02; 2,23]*•▼	0,60 [0,57; 1,10] ■
СА КЛ	0,83 [0,75; 1,08]	1,35 [0,48; 2,12]	0,64 [0,48; 0,90]	0,88 [0,63; 1,06]	0,96 [0,45; 1,17]	0,80 [0,48; 1,08]	0,88 [0,73; 1,78]	0,75 [0,48; 1,08]	1,62 [1,30; 2,15] *•▼	1,57 [0,54; 2,62]	1,24 [0,66; 1,40] ■
НСА KH	0,98 [0,81; 1,04]	1,23 [0,96; 1,57]	0,78 [0,49; 1,03]	5,08 [3,38; 8,21] * ▲	1,01 [0,81; 1,72] •	0,90 [0,49; 1,04]	1,25 [0,73; 1,78] * •	0,84 [0,49; 1,04]	2,12 [1,10; 2,48] ▲•	0,73 [0,48; 1,02]*▲•▼	1,70 [1,17; 2,07] ▲•
СА KH	1,22 [0,92; 1,91]	0,94 [0,73; 1,64]	0,79 [0,61; 1,18]	4,70 [1,26; 14,14] ▲	1,00 [0,75; 1,22] •	1,01 [0,61; 1,91]	0,89 [0,67; 1,21] * •	1,04 [0,61; 1,91]	2,09 [1,74; 2,76] *▲▼	0,92 [0,74; 1,31] •■	1,49 [1,38; 1,64] * ▼■

*Примечание:* \*- статистически значимые отличия от группы контроля (p<0,05); ▲ – статистически значимые отличия от группы аргинина (p<0,05); • – статистически значимые отличия от группы L-NAME (p<0,05); ▼ – статистически значимые отличия от группы аргинина + L-NAME (p<0,05); ■ – статистически значимые отличия от группы L- карнитина(p<0,05)

ческого процессинга катепсина H в ткани аорты; увеличение дозы ингибитора до 200 мг/кг приводит к нивелированию указанного эффекта.

3. Под действием карнитина наблюдается стимуляция аутопроцессинга, однако степень изменений ниже, чем в группе L-NAME 25 мг/кг. Сочетанное применение карнитина с регуляторами синтеза оксида азота приводит к суммированию эффектов.

### Литература

1. Абаленихина Ю.В. Влияние модуляторов синтеза оксида азота на актив-

ность и ауто-процессинг катепсина в иммуно-компетентных органах крыс в условиях invitro / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2014 – №1. – С. 53-59.

2. Арапова А.И. Секреторная активность лизосомальных цистеиновых протеиназ мышечных тканей под действием L-аргинина / А.И. Арапова, М.А. Фомина // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2014. – № 4. – С. 30-36.

3. Борискина М. А. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у больных хроническими лейкозами в динамике заболевания: авторе-

ферат дис. ... канд. мед. наук / М.А. Борискина. – Рязань, 1996. – 139 с.

4. Васильева О.С. Изучение механизма аутокаталитической активации прокатепсина Н in vitro [Электронный ресурс] / О.С. Васильева [и др.] // Исследовано в России: Российский электронный журнал. – 2002. – Т. 5. – С. 1092-1102. – Режим доступа: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/> (15.08.2014)

5. Дорохина Л.В. Прооксидантно-антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы / Л.В. Дорохина, В.В. Зинчук // Весті НАН РБ. Сер. біял. нав. – 2000. – №4. – С. 87-90.

6. Ильичева А.С. Состояние окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии/ А.С. Ильичева, М.А. Фомина // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2015. – № 1. – С. 45-51.

7. 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.

8. Пупышев А.Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель: функциональные и регуляторные аспекты / А.Б. Пупышев // Цитология. – 2014. – Т. 56, №3. – С. 179-196.

9. Чикин В.Г. Активность лизосомальных ферментов при неосложненном послеродовом периоде и эндометрите / В.Г. Чикин, А.А. Ерохина, В.В. Пчелинцев // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – №2. – С. 32-36.

10. Barrett A.J. Cathepsin B, Cathepsin H, cathepsin L / A.J. Barrett., H. Kirschke // Methods in Enzymol. – 1981. – Vol. 80. – P. 535-561.

11. Turk B. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers / B. Turk, D. Turk, V. Turk // Biochim. Biophys. Acta – 2000. – Vol. 1477. – P. 98-111.

12. Wang, Zun-Yi. Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation / Zun-Yi Wang, Rolf Hakanson // British Journal of Pharmacology. – 1995. – Vol. 116. – P. 2447-2450.

---

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Арапова Анастасия Ивановна – заочный аспирант кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.  
E-mail: asiaarapova@mail.ru

Фомина Мария Алексеевна – к.м.н., доц. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.  
E-mail: marya.fom@yandex.ru