

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Фомина М.А., Кудлаева А.М., 2016  
УДК 577.1+547.495.9+615.45-001.1/3

**ИЗУЧЕНИЕ IN VITRO-ВОЗДЕЙСТВИЯ L-КАРНИТИНА  
НА ЛИЗОСОМАЛЬНЫЙ ЦИСТЕИНОВЫЙ ПРОТЕОЛИЗ ИЗОЛИРОВАННО  
И НА ФОНЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА**

М.А.ФОМИНА, А.М. КУДЛАЕВА

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

**IN VITRO STUDIES OF L-CARNITINE ACTION ON LYSOSOMAL  
CYSTEINE PROTEOLYSIS ALONE AND IN OXIDATIVE STRESS**

M.A. FOMINA, A.M. KUDLAEVA

Ryazan State Medical University, Ryazan

Изучены показатели активности лизосомальных цистеиновых протеиназ и стабильность лизосомальной мембраны. Выделенные лизосомы *in vitro* инкубировали в растворе L-карнитина изолированно, а также при стимуляции оксидативного стресса. В контрольных группах проводили *in vitro*-инкубацию в среде выделения и с добавлением оксиданта соответственно. Активность катепсинов В, L и Н изучалась спектрофлуориметрическим методом по Barrett&Kirschke в двух фракциях – лизосомальной и внелизосомальной. В качестве основного маркера лабильности мембран использовали активность кислой фосфатазы. Было обнаружено, что *in vitro* воздействие 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 60 мин не вызывает изменений активности катепсинов В, L и Н и стабильности лизосомальной мембраны. L-Карнитин в концентрации 5 мМ при *in vitro* инкубации 60 мин вызывает снижение активности катепсина Н, повышение активности катепсина В и не влияет на активность катепсина L, при этом стабилизирует лизосомальную мембрану как изолированно, так и на фоне оксидативного стресса. 5 мМ L-карнитина повышает избирательную проницаемость мембраны для катепсина Н.

*Ключевые слова:* катепсины В, L, Н; L-карнитин, стабильность лизосомальной мембраны.

The parameters of the lysosomal cysteine proteinase activity and stability of lysosomal membrane were studied. Isolated lysosomes were incubated *in vitro* in a solution of L-carnitine alone, as well as in stimulation of oxidative stress. In vitro incubation in a medium of isolating solution and with addition of oxidant was carried out in the control groups respectively. The activity of cathepsins B, L and H was investigated by spectrofluorimetric method of Barrett & Kirschke in two fractions – lysosomal and outside of lyso-

somes. The activity of acid phosphatase used as the main marker of a membrane labilization. It has been found that *in vitro* action of 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60 min does not change the activity of cathepsins B, L and H and stability of lysosomal membrane, wherein L- carnitine in a concentration of 5 mM at 60 min *in vitro* incubation causes decrease in the activity of cathepsin H, increase in the activity of cathepsin B without affecting the activity of cathepsin L and also causes stabilization of lysosomal membrane both alone and in oxidative stress. Besides it was observed selective permeability of the membrane for cathepsin H after the action of 5 mM L-carnitine.

**Keywords:** *cathepsins B, L and H, L- carnitine, lysosomal membrane stability.*

Лизосомальные цистеиновые протеиназы (ЛЦП) относятся к семейству папаиноподобных протеолитических ферментов, локализованных в основном в лизосомах и поздних эндосомах клетки. Поскольку они обладают сильным гидролитическим потенциалом и широким спектром действия, это опосредует их участие в ряде важных клеточных процессов. Среди них можно выделить участие в антиген-презентации, ремоделирование костной ткани, активация предшественников многих белков, дифференцирование кератиноцитов и др. Нарушение секреции катепсинов ведёт к таким заболеваниям как ревматоидный артрит и остеоартрит, атеросклероз, мышечная дистрофия, болезнь Альцгеймера. ЛЦП принимают участие в процессах, связанных с раковой прогрессией, таких как апоптоз, метастазирование, опухолевый рост, инвазия и ангиогенез. Повышение активности катепсинов В и L по сравнению с нормальной тканью наблюдается в цитозольной фракции многих опухолей человека: рака легкого, желудка, прямой кишки, карциномы груди, меланомы. У больных раком легких наблюдается повышение активности катепсина Н в опухолевой ткани [1, 5]. Активно изучается участие ЛЦП в процессах опосредуемой клеточной гибели. Так, во многих работах по моделированию апоптоза обнаружена ранняя утечка катепсинов В, D и L в цитозоль, где они активируют каспазы 3 и 9, запуская данный процесс. Также имеются данные о каспазозависимом пути клеточной гибели, сигналом которого служит пермеаблизация лизосомальной мембраны (ПЛМ). Наряду с достижением избира-

тельной проницаемости лизосомальной мембраны, одним из факторов выхода катепсинов в цитозоль является лабильность мембраны, которую может вызвать окислительный стресс [2, 6].

В связи с этим актуальным является поиск соединений, обладающих антиоксидантными свойствами и способными стабилизировать лизосомальную мембрану. В этом отношении особый интерес представляет L-карнитин. Так, в ряде исследований были обнаружены его антиоксидантные эффекты [9, 10, 13]. Кроме того, L-карнитин в физиологических концентрациях способен повышать стабильность мембраны эритроцитов [8]. Также 5 мМ L-карнитин оказывает защитное действие при апоптозе, что обусловлено ингибированием синтеза церамидов и активности каспаз 3, 7 и 8 [12]. Было показано, что на фоне гипергомоцистеинемии L-карнитин приводит к снижению активности катепсинов L и H и оказывает стабилизирующее влияние на лизосомальную мембрану клеток сердечной мышцы [3]. Таким образом, актуальным является изучение влияния L-карнитина на лизосомальный цистеиновый протеолиз и состояние лизосомальной мембраны.

Целью нашего исследования явилось изучение прямого влияния L-карнитина на лизосомальный цистеиновый протеолиз *in vitro*, как изолированно, так и при стимуляции оксидативного стресса.

#### **Материалы и методы**

**Выделение лизосом.** За 12 часов до забоя животных лишали пищи для стандартизации условий опытов. Эвтаназия животных осуществлялась методом бес-

кровливания под эфирным рауш-наркозом при сохраненном дыхании и сердцебиении. Печень извлекали немедленно после обескровливания, помещая орган в охлажденный 0.25 М раствор сахарозы (среда выделения). Печень промывали от остатков крови средой выделения, после чего готовили точные навески участков печени в пределах 740-760 мг на электронных весах (АН-220 СЕ, Япония). Полученный материал предварительно измельчали ножницами и помещали в стеклянный стакан гомогенизатора «Potter S» (Sartorius, Германия), добавляя холодный 0.25 М раствор сахарозы в соотношении 1:9 и гомогенизировали в течение 35 секунд тefлоновым пестиком 900 об/мин и зазоре в пределах 0.16-0.24 мм. Описанные процедуры проводили при температуре не выше 4 °С. Полученные гомогенаты центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин (центрифуга СМ-6М ЕLMI, Латвия) для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость отбирали пипеткой в отдельные гильзы и центрифугировали 15 мин при 13000 об/мин для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант – дополнительно при 15500 об/мин в течение 30 мин (центрифуга рефрижераторная К 24 Д, ГДР). Осадок, представляющий собой грубую фракцию лизосом, ресуспендировали в 2 мл 0.25 М сахарозы и использовали для *in vitro* исследования.

*Инкубация.* Полученные суспензии лизосом печени в 0.25 М сахарозе разделяли на серии по 6 проб в каждой:

Серия 1(серия сравнения): 2 мл 0.25 М сахароза.

Серия 2: 1,9 мл 0.25 М сахарозы с добавлением раствора 0.1 мл карнитина с конечной концентрацией 5 мМ.

Серия 3(серия сравнения): 2 мл раствора перекиси водорода в сахарозе с конечной концентрацией 5мМ.

Серия 4: 1,9 мл раствора перекиси водорода в сахарозе с конечной концентрацией 5мМ с добавлением раствора 0.1 мл карнитина с конечной концентрацией 5 мМ.

Пробы всех серий инкубировались в течение часа при  $t=37$  градусов в водяной бане. После инкубации лизосомы повторно осаждали центрифугированием при 15500 об/мин в течение 30 мин. Затем отбирали надосадочную жидкость (неседиментируемая фракция, НСФ), а осадок (седиментируемая фракция, СФ) ресуспендировали в 0.25 М сахарозе с добавлением Тритона Х-100 в конечной концентрации 0.1%. Полученные аликвоты замораживали и хранили до момента исследования при температуре -20 °С не более 1 месяца.

*Определение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ.* Активность катепсинов В, L и Н изучалась спектрофлуориметрическим методом (System 3 Scanning Spectrofluorometr, Optical technology devices, inc. Elmstord, New York, 10523) по Barrett & Kirschke [7]. Удельную активность катепсинов выражали в нмоль амидометилкумарина/сек.·г. белка. Содержание белка определяли по методу Лоури коммерческим набором НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург). Описанное измерение активности ферментов осуществлялось отдельно для седиментируемой и неседиментируемой фракции и обозначалось для каждого катепсина как седиментируемая и неседиментируемая активность (СА и НСА) соответственно.

*Оценка стабильности лизосомальной мембраны.* Для оценки стабильности лизосомальной мембраны традиционно используется коэффициент лабильности (Клаб), рассчитываемый как соотношение активности лизосомального фермента во внелизосомальной (неседиментируемой) фракции к общей активности (ОА), представляющей собой сумму НСА и СА для данного фермента [4]. Поскольку для лизосомальных цистеиновых протеиназ описан механизм секреции [14], в качестве основного маркера лабилизации мембран использовали активность кислой фосфатазы (КФ) [11]. Активность фермента измеряли унифицированным методом по «конечной точке», используя коммерческий набор «Витал Диагностика Спб» (Санкт-Петербург).

Для каждой выборки определяли значение медианы и верхнего и нижнего квартилей. Результаты представляли в формате Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]. Для проверки статистической значимости отличий значений в контрольной и опытной группах использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и их обсуждение

Обнаружено, что *in vitro* – провокация оксидативного стресса, моделируемая путем введения в среду инкубации 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, не привела к статистически значимым изменениям изучаемых показателей.

Одновременно оказалось, что прямое воздействие карнитина в конечной концентрации 5 ммоль/л в течение 60 минут приводит к отчетливым изменениям как активности лизосомальных цистеиновых протеиназ, так и стабильности лизосомальной мембраны.

Так, введение карнитина в среду инкубации приводило к статистически значимому росту общей активности катепсина В (1,38 [1,26; 1,67] против 0,37 [0,21; 0,6]) за счет роста активности в неседиментируемой фракции (1,12 [0,91; 1,33] против 0,26 [0; 0,28]). На фоне введения в среду инкубации перекиси водорода наблюдалось значительное снижение активности данного фермента в седиментируемой фракции (0,085 [0,07; 0,12] против 0,348 [0,24; 0,43]) и падение общей активности (0,919 [0,75; 1,18] против 1,38 [1,26; 1,67]). Также отмечалось повышение Клаб для катепсина В (87,38 [84,69; 90,52] против 74,87 [70,76; 78,00]).

При этом в отношении катепсина Н наблюдалась другая картина: прямое воздействие 5 мМ карнитина приводило к падению активности фермента в седиментируемой фракции относительно серии сравнения (0,17 [0,04; 0,23] против 1,31 [1,19; 1,82]) и снижению общей активности (1,13 [1,09; 1,29] против 2,26 [1,89; 2,33]). Также наблюдалось статистически значимое повышение значения Клаб относительно серии сравнения (86,24 [79,46; 97,45] против 37,35 [22,20; 37,38]). Анало-

гичные изменения наблюдались на фоне введения в среду инкубации 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Для катепсина L статистически значимых изменений активности выявлено не было.

В отношении кислой фосфатазы наблюдалось падение значения коэффициента лабильности лизосомальной мембраны (Клаб кислой фосфатазы) как для серии 2, так и для серии 4 относительно соответствующих серий сравнения (9,52 [7,18; 12,03] и 23,54 [16,23; 27,02] против 7,93 [5,31; 9,79] и 19,67 [18,66; 23,88] соответственно). Этот факт свидетельствует о стабилизации лизосомальной мембраны.

Можно предположить, что разнонаправленное действие карнитина на активность катепсина В и Н и отсутствие статистически значимых изменений показателей в отношении катепсина L объясняется различиями в первичной структуре указанных протеиназ.

#### Выводы

1) *In vitro* воздействие 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 60 мин не вызывает изменений активности катепсина В, L и Н и стабильности лизосомальной мембраны.

2) Карнитин в концентрации 5 мМ при *in vitro* инкубации 60 мин вызывает снижение активности катепсина Н, повышение активности катепсина В и не влияет на активность катепсина L.

3) 5 мМ карнитин *in vitro* стабилизирует лизосомальную мембрану как изолированно, так и на фоне оксидативного стресса. При этом увеличивается избирательная проницаемость мембраны для катепсина Н.

#### Литература

1. Абаленихина Ю.В. Окислительная модификация белков и изменение активности катепсина L селезенки крыс в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина, С.А. Исаков // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №1. – С.45-49.

2. Арапова А.И. Аутокаталитические эффекты лизосомальных цистеиновых протеиназ гладкой мышцы аорты крыс /

А.И. Арапова, М.А. Фомина // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2015. – №4. – С. 27-33.

3. Ильичёва А.С. Влияние L-аргинина и карнитина на активность катепсинов L и H и проницаемость лизосомальной мембраны в сердечной мышце при выраженной гипергомоцистеинемии / А.С. Ильичёва, М.А. Фомина // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Вып. 5. – С. 819-824.

4. Покровский А.А. Лизосомы / А.А. Покровский, В.А. Тутельян. – М.: Наука, 1976. – 378 с.

5. Потеряева О.Н. Участие цистеиновых протеиназ и их ингибиторов в развитии злокачественных опухолей (обзор литературы) / О.Н. Потеряева // Медицина и образование в Сибири. – 2009. – № 1. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://ngmu.ru/cozo/mos/article/abauthors.php?id=327>

6. Пупышев А.Б. Пермеабиллизация лизосомных мембран как апоптогенный фактор / А.Б. Пупышев // Цитология. – 2011. – Т. 53, №4. – С. 313-324.

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

8. Effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the human erythrocyte membrane stability and deformability / Arduino Arduini [et al.] // Life Sciences. – 1990. – Vol. 47, Issue 26. – P. 2395-2400.

9. Effects of L-carnitine on high glucose-induced oxidative stress in retinal ganglion cells / Y. Cao [et al.] // Pharmacology. – 2014. – Vol. 94, № 3-4. – P. 123-130.

10. Effects of carnitine on oxidative stress response to intravenous iron administration to patients with CKD: impact of haptoglobin phenotype / Z. Armaly [et al.] // BMC Nephrology. – 2015. – Vol. 16. – P. 135.

11. Lysosomal Labilization / A. Terman [et al.] // IUBMB Life. – 2006. – Vol. 58, № 9. – P. 531-539.

12. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine / M.C. Mutomba [et al.] // FEBS Letters. – 2000. – Vol. 478, № 1-2. – P. 19-25.

13. Ribas G.S. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders / G.S. Ribas, C.R. Vargas, R.M. Wajne // Niger J Clin Pract. – 2014. – Vol. 533, № 2. – P. 469-476.

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

---

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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](mailto:marya.fom@yandex.ru)

Кудлаева Анна Михайловна – ассист. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: [anyakudlaeva@mail.ru](mailto:anyakudlaeva@mail.ru)