

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Абаленихина Ю.В., Фомина М.А., 2014
УДК 577.1:612.017.1

**ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА
НА АКТИВНОСТЬ И АУТОПРОЦЕССИНГ КАТЕПСИНА
В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНАХ КРЫС
В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

Ю.В. АБАЛЕНИХИНА, М.А. ФОМИНА

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

**THE IMPACT OF MODULATORS OF THE SYNTHESIS OF NITRIC OXIDE
IN THE ACTIVITY, AUTOPROCESSING CATHEPSIN
IN IMMUNOCOMPETENT ORGANS OF RATS
IN CONDITIONS OF *IN VITRO***

JU.V. ABALENIHINA, M.A. FOMINA

Ryazan State I.P. Pavlov University, Ryazan

*Изучено *in vitro* влияние L-аргинина и N-нитро-L-аргинин-метилового эфира на активность и аутопроцессинг катепсина В тимуса и селезенки крыс. Полученные результаты демонстрируют активацию катепсина В в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота, при этом увеличивается доля активных молекул. Под действием L-аргинина активность катепсина В не изменяется, при этом снижается доля активных молекул, что демонстрирует формирование адаптивного иммунитета в условиях *in vitro* стимуляции синтеза оксида азота.*

Ключевые слова: катепсин В, L-аргинин, N-нитро-L-аргинин-метиловый эфир.

Influence L-arginine and N-nitro-L-arginine methyl ester, and the activity of cathepsin B autoproducting thymus and spleen of rats is studied. These results demonstrate the activation of cathepsin B in conditions of nitric oxide synthesis deficiency that leads to increasing the fraction of active molecules. The activity of cathepsin B does not change under the action of L-arginine, thus the fraction of active molecules is decreased, that demonstrates the formation of adaptive immunity modeling of nitric oxide synthesis in vitro.

Keywords: cathepsin B, L-arginine, N-nitro-L-arginine methyl ester.

Введение

Цистеиновые протеиназы известны как класс тиоловых протеиназ, которые содержат остатки цистеина в активном центре. Одним из самых крупных и интересных считается семейство папаиноподобных протеолитических ферментов, локализующихся главным образом в лизосомах, имеющих оптимальную кислую среду для максимальной активности катепсинов. В настоящее время, в связи с тем, что защитная функция лизосом характеризуется их участием в лизисе микроорганизмов и вирусов, есть все основания утверждать – этап лизосомального переваривания является неотъемлемой частью общего универсального механизма естественного иммунитета [7, 9].

Таким образом, протеазы вовлечены в процесс формирования иммунного ответа, в регуляции которого участвует оксид азота как молекула, имеющая окислительно-восстановительный потенциал [12]. В организме человека и животных NO образуется в результате ферментативной реакции

из L-аргинина под действием NO-синтаз. Одним из антагонистов синтеза оксида азота является N-нитро-L-аргинин-метиловый эфир (L-NAME), представляющий собой конкурентный эндогенный ингибитор индуцибельной NO-синтазы.

Цель исследования

Изучение влияния L-аргинина и L-NAME на активность и аутопроцессинг катепсина В тимуса и селезенки крыс.

Материалы и методы

Исследование проводили на конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280-320 г.

Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли в соответствии с правилами, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Для получения клеточного биологического материала животных вводили в глубокий наркоз, производили обескровливание и стерильно извлекали тимусы и селезенки, далее выделяли тимоциты (спленоциты) согласно рекомендациям [3]. Тимоциты (спленоциты) инкубировали *in vitro* в полной питательной среде, содержащей 5 мМ L-NAME (n=8) или 5 мМ L-аргинин (n=8) 24 часа при температуре 37⁰С [4]. Контрольная группа представляла собой тимоциты (спленоциты), инкубированные в тех же условиях в полной питательной среде (n=8). После инкубации полученные клетки осаждали при 600 g ресуспендировали в 0,25М сахарозе, в полученный материал добавляли Тритон X-100, что представляло собой пробу для определения общей активности (ОА) катепсинов.

Активность катепсина В определяли спектрофлуориметрическим методом по Barrett & Kirschke [6]. Активность катепсинов выражали в нмоль/с×г белка.

Оценка аутокаталитической активации проводилась путем преинкубирования биологического материала в реакционной смеси, не содержащей субстрат, в течение 15 минут при 37⁰С с последующим добавлением последнего [1]. Для сравнения степени аутокаталитической активации катепсинов подсчитывали коэффициент отношения значения активности ферментов после

прекаталитической инкубации к значению активности без преинкубации.

Содержание оксида азота определяли спектрофотометрией в видимой области спектра по реакции с реактивом Грисса [2].

Для каждой выборки вычисляли характеристики: медиану (Me), минимальное (min) и максимальное значение (max). Поскольку отмечалось отсутствие согласия данных с нормальным распределением (W-критерий), для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест).

Результаты и их обсуждение

Как показывают результаты выполненных исследований, концентрации метаболитов оксида азота, как для тимоцитов, так и для спленоцитов отмечается одинаковая тенденция: инкубация в среде с 5 мМ аргинином способствует увеличению количества NO₂⁻ и NO₃⁻, внесение L-NAME в инкубационную среду влечет понижение концентрации метаболитов оксида азота (табл. 1).

В экспериментальной группе спленоцитов, инкубированных в среде с добавлением L-аргинина статистически значимых различий общей активности катепсина В (14,4 [14,2; 15,3], p=0,24) относительно значений контрольной группы (15,2 [12,6; 17,2]) отмечено не было.

В экспериментальной группе спленоцитов, инкубированных в пол-

ной питательной среде с добавлением 5 м ML-NAME, отмечается следующая тенденция: увеличение общей

активности катепсина В (23,3 [21,7; 23,3], $p=0,016$) относительно значений контрольной группы (15,2 [12,6;17,2]).

Таблица 1

Концентрация метаболитов оксида азота (мкМ/10⁶ клеток) спленоцитов и тимоцитов крыс в условиях *in vitro* -модулированного синтеза оксида азота (Me [min; max])

Экспериментальная модель	Тимоциты	Спленоциты
Контроль	24,9 [20,4; 32,7]	6,11 [5,7; 8,81]
L-аргинин (5 мМ)	40,0 [35,1; 42,1]*** ($p=0,01$) # ($p=0,009$)	32,7[24,9;38,9]*** ($p=0,01$) # ($p=0,003$)
L-NAME (5 мМ)	15,4 [12,7; 17,3]* ($p=0,03$)	4,9 [4,3; 5,7]* ($p=0,04$)

Примечание: * – статистически значимые различия относительно контроля ($p \leq 0,05$);
– статистически значимые различия относительно L-NAME 5 мМ ($p \leq 0,05$).

Коэффициент активации контрольной группы составил 0,38[0,15; 0,59] для катепсина В и статистически значимо повышается в группе L-аргинин: 1,79 [0,48; 2,21] ($p=0,002$). Коэффициент активации в группе L-NAME составил 0,28 [0,23; 0,31] ($p=0,02$), что статистически значимо ниже относительно контрольного значения.

В экспериментальной группе тимоцитов, инкубированных в среде с L-аргинином статистически значимых различий общей активности катепсина В (15,9 [13,1; 20,8], $p=1,00$) относительно значения контрольной группы (16,6 [13,3; 25,6]) отмечено не было.

В экспериментальной группе тимоцитов, инкубированных в полной питательной среде с добавлением 5 м М L-NAME, отмечается увеличение общей активности катепсина В (18,7 [16,9;

27,5], $p=0,036$) относительно значений контрольной группы (16,6 [13,3; 25,6]).

Коэффициент активации катепсина В тимоцитов в контрольной группе составил 1,15 [1,11; 1,25] и статистически значимо повышается в группе L-аргинин: 1,27 [1,07; 1,33] ($p=0,05$). Коэффициент активации в группе L-NAME составил 0,64 [0,55; 0,87] ($p=0,03$), что статистически значимо ниже относительно контрольного значения.

Таким образом, в условиях *in vitro* моделирования дефицита синтеза оксида азота общая активность катепсина В как в тимоцитах, так и спленоцитах статистически значимо снижается по сравнению с контролем, при этом преобладает доля активных молекул катепсина.

Активация катепсина В может свидетельствовать об индукции им-

мунного ответа. Катепсины, являясь иммунными модуляторами, способны формировать иммунный ответ по двум путям: прямой (деградация патогенов в пределах фаголизосом) и косвенный (активация ключевых рецепторов узнавания) [9]. Таким образом, повышение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ-спленоцитов и тимоцитов крыс в условиях *in vitro* моделирования дефицита синтеза оксида азота может быть связано с необходимостью обеспечить рецепторы лигандами для обеспечения иммунной реакции.

Возможно, активация катепсина В, как сигнальной молекулы, связана с запуском процесса апоптоза в условиях угнетения синтеза оксида азота (NO). Известно, что угнетение синтеза NO приводит к развитию окислительного стресса и повышению активности ядерного фактора транскрипции NF- κ B, который регулирует активность генов, ответственных за развитие воспалительного ответа [10]. По представлениям «классического» апоптоза, каспаза-8 вызывает выход из лизосом активного катепсина В, который вызывает активацию гибели клеток путем частичного расщепления проапоптозных белков, в результате чего происходит их активация [11], возможно в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота происходит высвобождение апоптозных белков.

Кроме этого, активность катепсина В как протеиназы, разрушающей дефектные молекулы белков, может увеличиваться в ответ на повышение поврежденных белков вследствие развития оксидативного стресса.

Одновременно нами было установлено, что активность катепсина В в условиях *in vitro* стимулирования синтеза оксида азота не изменяется. Избыток субстрата синтеза NO обеспечивает явление адаптации, поддерживая на неизменном уровне активность лизосомальных цистеиновых протеиназ.

К настоящему времени аутокаталитический механизм активации был описан для многих цистеиновых протеиназ, в том числе и для катепсина В [5]. Все лизосомальные протеиназы превращаются в активную зрелую форму в результате ограниченного протеолиза. Результаты изучения активации лизосомальных цистеиновых протеиназ показывают, что неселективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы- L-NAME влияет на ауто-процессинг данной группы ферментов. Внесение L-NAME в инкубационную среду способствует активации созревания зимогенов, так как большая часть протеиназ находится в активном состоянии. Представленный факт демонстрирует, что в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота организм испытывает функциональную потребность в протеиназах.

В условиях *in vitro* моделирования дополнительного синтеза оксида азота молекулы катепсинов находятся в неактивном состоянии, о чем свидетельствует повышение коэффициента активации. Изложенный факт свидетельствует о том, что в лизосомах происходит накопление прокатепсинов, которые могут перейти в активные формы, то есть в ответ на патологическое состояние организма с целью коррекции.

Важно отметить, L-аргинин и L-NAME оказывают одинаковое влияние на активность и аутопроцессинг катепсина В тимуса и селезенки крыс, что свидетельствует об общих закономерностях реакции центрального и периферических иммунных органов.

Выводы

1. В условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота активность катепсина В увеличивается с преобладанием доли активных молекул, возможно, вследствие развития воспалительных процессов и апоптоза, а так же – как защитный механизм в ответ на появление поврежденных белков активными формами кислорода.

2. В условиях *in vitro* моделирования дополнительного синтеза оксида азота изменение активности катепсина В не отмечается, при этом снижается доля активных молекул, что демонстрирует формирование адаптивного иммунитета.

Литература

1. Борискина М.А. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у больных хроническими лейкозами в динамике заболевания: дис. ... канд. мед. наук. – Рязань, 1996. – 150 с.

2. Метельская В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – №6. – С. 15-18.

3. Полякова В.О. Геропротекторное и регуляторное действие пептидов на клетки тимуса: дис. ... к.б.н. – СПб., 2003. – 119 с.

4. Стариков Ю.В. Роль молекул оксида азота в программированной гибели нейтрофилов при окислительном стрессе: автореф. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 2008. – 22 с.

5. Autocatalytic processing of recombinant human cathepsin B is a bimolecular process / J. Rozman [et al.] // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 459. – P. 358-362.

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

7. Conus Sébastien. Cathepsins and their involvement in immune responses / Sébastien Conus, Hans-Uwe Simon // Swiss Medical Weekly. – 2010. – P. 1-12.

8. In vitro effects of nitric oxide donors on apoptosis and oxida-

tive/nitrative protein modifications in ADP-activated platelets / A. Sener [et al.] // Hum. Exp. Toxicol. – 2013. – Vol. 32(3). – P. 225-235.

9. Manoury Be'ne'dicte. Serine and Cysteine Proteases and Their Inhibitors as Antimicrobial Agents and Immune Modulators / Be'ne'dicte Manoury, Ali Roghanian, Jean-Michel Sallenave. – 2011. – P. 27-50.

10. Regulation of programmed cell death by NF-kappa B and its role in tumorigenesis and therapy / Y. Fan [et al.] // Adv. Exp. Med Biol. – 2008. – Vol. 615. – P. 223-250.

11. Role of cathepsin B in dengue virus-mediated apoptosis / A. Morchang Biochem [et al.] // Biophys Res Commun. – 2013. – Vol. 16; 438(1): 20-5.

12. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response // Journal of Leukocyte Biology. – 2011. – Vol. 89. – P. 873-891.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Абаленихина Юлия Владимировна – ассистент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

Фомина Мария Алексеевна – канд. мед. наук, доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.