

УДК 577.1 + 612.17

ЭФФЕКТЫ L-АРГИНИНА НА СОСТОЯНИЕ ЛИЗОСОМАЛЬНОГО ЦИСТЕИНОВОГО ПРОТЕОЛИЗА СЕРДЕЧНОЙ И СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦ

Арапова А.И., Фомина М.А.

ГОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Рязань, e-mail: asiaarapova@mail.ru

Изучены показатели активности, коэффициента лабильности и доли секретируемой активности, а также коэффициента аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ в миокарде и скелетной мышце крыс. Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота осуществляли путем внутривентрикулярного введения раствора L-аргинина. Контрольной группе вводили физиологический раствор. Активность катепсинов В, L и Н изучалась спектрофлуориметрическим методом по Barrett & Kirschke в двух фракциях – лизосомальной и внелизосомальной. В результате эксперимента были получены статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$), на основании которых можно сделать следующие выводы: L-аргинин в дозе 500 мг/кг вызывает нарастание активности катепсинов В и Н в скелетной мускулатуре с одновременным снижением активности катепсина L, подавление секреции катепсинов В, L, Н в скелетной мускулатуре и катепсина В в миокарде, нарастание количества проферментных форм катепсина В в миокарде с параллельным снижением их содержания в скелетной мышце.

Ключевые слова: L-аргинин, катепсины В, L, Н, активность лизосомальных цистеиновых протеиназ, лабильность лизосомальной мембраны, секретируемая активность, аутокаталитическое действие

LYSOSOMAL CYSTEINE PROTEOLYSIS MUSCLE TISSUE ON THE BACKGROUND OF L-ARGININE IN THE SIMULATION OF DEFICIT NITRIC OXIDE SYNTHESIS

Arapova A.I., Fomina M.A.

GOU VPO «Ryazan State medical university named after acad. I.P. Pavlov», Ryazan, e-mail: asiaarapova@mail.ru

The parameters of the activity, coefficient lability and the proportion secreted activity, as well as the coefficient of autocatalytic action of lysosomal cysteine proteases in the myocardium and skeletal muscle of rats. Simulation level changes nitric oxide synthesis was performed by intragastric administration of L-arginine solution. The control group received saline. The activity of cathepsins B, L and H, was investigated by spectrofluorimetric method of Barrett & Kirschke in two fractions – lysosomal and outside of lysosomes. The experiment was obtained statistically significant differences from control group ($p < 0,05$), based on which the following conclusions: L-Arginine 500 mg/kg caused increase in the activity of cathepsin B and H in the skeletal musculature with simultaneous reduction the activity cathepsin L, cathepsin B, L, H secretion inhibition, in skeletal muscle and in the myocardium of cathepsin B, rise in the number proenzyme form of cathepsin B to myocardium with parallel reduction of their content in skeletal muscle.

Keywords: L-arginine, cathepsins B, L, H, the activity of lysosomal cysteine proteinases, lysosomal membrane lability, secreted activity, autocatalytic effect

Изучение биологического влияния оксида азота (NO) началось с 80-х годов, когда Роберт Фуршготт и Дж. Завадски выяснили, что расширение кровеносных сосудов под влиянием ацетилхолина происходит только при наличии эпителиоподобных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность всех сосудов. Вещество – NO, которое они выделяют в ответ на внешние воздействия, приводит к расширению сосудов, – получило название «сосудорасширяющий эндотелиальный фактор» [6]. Роль NO в поддержании сосудистого гомеостаза: регуляция сосудистого тонуса, пролиферации и апоптоза, оксидантных процессов, NO присущи ангиопротекторные свойства [4]; ответственен за противовоспалительные эффекты, производит фибринолитический эффект [6].

Учитывая важные физиологические функции NO в организме, можно не сомневаться, что в случае заболевания этот радикал будет вовлечен в развитие многих патологических реакций. В настоящее время активно изучают следующие группы заболеваний, для развития которых характерны изменения в обмене NO: болезни сердечно-сосудистой системы, в том числе гипертонию, инфаркт миокарда, легочную гипертензию, атеросклероз; инсульты и поздние дегенеративные заболевания нервной системы; различные аутоиммунные заболевания, диабет, отторжение трансплантатов; процессы острого и хронического воспаления различных органов и тканей, особенно эндотоксемию, отек, шок; цирроз печени, болезнь почек, легких, ЖКТ; онкологические заболевания [6].

Аргинин – условно незаменимая аминокислота, которая является субстратом для синтеза NO [9]. При низких концентрациях в плазме крови L-аргинин избирательно улучшает эндотелиальную функцию; при среднем уровне концентрации может оказывать прямую вазодилатацию вследствие стимуляции секреции инсулина и гормона роста; высокие уровни L-аргинина вызывают неспецифическую вазодилатацию [1]. Перспективность использования L-аргинина как полужаменимой аминокислоты в терапии ряда патологий известна давно [2, 4]. Однако в какой степени достигаемые эффекты (снижение артериального давления, коррекция эндотелиальной дисфункции при гиперхолестеринемии, терапия гломерулонефрита) опосредуются через NO, остается пока невыясненным.

Смерть клетки является одной из центральных проблем биологии и медицины, она может происходить двумя путями: путем апоптоза и в результате воздействия внешних факторов. Имеется значительное число научных публикаций, убедительно свидетельствующих об эффективном защитном действии NO против клеточного апоптоза. В настоящее время хорошо известно, что важным и значимым в диагностике показателем апоптоза (через активацию каспаз) является степень активации лизосомальных цистеиновых протеиназ. Экспрессия катепсинов часто связывают с развитием апоптоза [3]. Будучи секретированными или связанными с плазматической мембраной, катепсины способны разрушать белковые компоненты мембран и внеклеточного матрикса. Активация лизосомальных протеаз свидетельствует об иммунном ответе организма, их контроль позволит избежать патологических повреждений клеток и тканей [10].

Цель – определение изменения секреции лизосомальных цистеиновых протеиназ в миокарде и скелетной мышце крысы на фоне введения L-аргинина и в группе контроля.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 12 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280–320 граммов. Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота (NO) субстратом NO-синтазы в экспериментальной группе ($n = 6$) 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. Контрольной группе параллельно ($n = 6$) внутрижелудочно вводили физиологический раствор.

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».

Активность кислых гидролаз в седиментируемой (СА) и неседиментируемой (НСА) фракциях определяли отдельно. Общую активность (ОА) рассчитывали как сумму СА и НСА. Коэффициент лабильности (К лаб, %) – это процентное отношение НСА к ОА, характеризует проницаемость лизосомальной мембраны для изучаемого фермента.

Активность катепсинов В, L и Н (KB, KL, KN) изучалась спектрофлуориметрическим методом по Barrett & Kirschke [9].

Метод оценки степени секреции лизосомальных цистеиновых протеаз основан на одновременной оценке двух параметров – коэффициент лабильности катепсина и коэффициент лабильности кислой фосфатазы как показателей функционального состояния лизосомальной мембраны. Затем рассчитывается безразмерный биохимический показатель – доля секретрируемой активности лизосомальных цистеиновых протеаз – коэффициент W_{secr} : возрастание (положительное значение) данного показателя говорит о секреции катепсинов за счет проницаемости мембраны, а уменьшение (отрицательное значение) свидетельствует о нарушении целостности лизосомальной мембраны [7].

Степень аутокаталитического действия катепсинов оценивалась по коэффициенту отношения значения активности фермента после прекалитической инкубации к параллельно определяемому значению активности без преинкубации (K_{aca} – коэффициент аутокаталитического действия).

Статистический анализ результатов исследования проведен с использованием программы «Statistica 10.0». Поскольку отмечалось отсутствие согласия большинства данных с нормальным распределением, вычисляли характеристики: медиану (Me), минимальное (min) и максимальное (max) значения, результаты представлены в формате Me [min; max], для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна – Уитни (U-тест).

Результаты исследования и их обсуждение

При оценке изменений активности изучаемых ферментов (табл. 1) обнаружено, что влияние L-аргинина не приводит к статистически значимым изменениям изучаемых показателей, за исключением статистически значимого снижения активности катепсина В в цитоплазматической (неседиментируемой) фракции.

В то же время в скелетной мускулатуре практически все изменения активности катепсинов оказались статистически значимыми. Так, общая активность катепсинов В и Н в скелетной мышце под влиянием L-аргинина нарастала, при этом изменения касались как лизосомальной (седиментируемой), так и цитоплазматической (несе-

диментируемой) фракций. При этом изменения активности катепсина L оказались противоположенными: выраженное сни-

жение общей и неседиментируемой активности с умеренным снижением седиментируемой активности.

Таблица 1

Влияние L-аргинина на показатели активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в сердечной и скелетной мышцах (нмоль/с х г белка), Me [min; max]

Ткань		Миокард		Скелетная мускулатура	
		Контроль	L-аргинин	Контроль	L-аргинин
KB	HCA	1,08 [0,25; 3,9]	0,15* [0,12; 0,31]	0,45 [0,07; 0,92]	1,53* [0,60; 3,05]
	CA	0,96 [0,24; 4,64]	1,28 [1,05; 3,06]	0,21 [0,05; 0,70]	1,30* [0,57; 2,97]
	OA	2,00 [0,58; 10,32]	1,54 [1,17; 3,19]	0,72 [0,12; 1,51]	3,00* [1,16; 6,02]
KL	HCA	0,41 [0,26; 0,82]	0,57 [0,35; 0,90]	0,64 [0,48; 0,85]	0,28* [0,27; 0,49]
	CA	6,42 [1,68; 7,67]	5,02 [2,11; 7,46]	5,53 [3,89; 11,21]	3,62 [2,81; 4,59]
	OA	6,84 [1,94; 8,47]	5,37 [2,62; 8,03]	6,17 [4,37; 12,06]	3,90* [3,18; 5,08]
KH	HCA	0,32 [0,18; 0,51]	0,41 [0,39; 0,49]	0,26 [0,23; 0,28]	0,57* [0,5; 0,63]
	CA	2,25 [1,71; 3,48]	3,12 [2,14; 3,89]	3,23 [1,44; 4,74]	5,23* [4,92; 8,01]
	OA	2,57 [1,89; 3,99]	3,5 [2,54; 4,38]	3,48 [1,69; 5,02]	5,73* [5,45; 8,64]

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

Оценка показателей проницаемости лизосомальной мембраны (табл. 2) демонстрирует статистически значимое снижение $K_{\text{лаб}}^{\%}$ для катепсина В в сердечной и скелетной мышцах по сравнению с группами контроля. 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. Известно, что доля внелизосомальной активности и коэффициент лабильности лизосомальной мембраны для каждого из катепсинов может изменяться по двум причинам: изменение общей проницаемости лизосомальной мембраны и изменение степени секреции индивидуального фермента.

Таблица 2

Влияние L-аргинина на показатели коэффициентов лабильности и доли внелизосомальной активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в мышечных тканях, Me [min; max]

Ткань		Миокард		Скелетная мускулатура	
		Контроль	L-аргинин	Контроль	L-аргинин
KB	$K_{\text{лаб}}^{\%}$	54,7 [39,8; 59,1]	10,5 * [3,98; 17,1]	62,2 [53,9; 71,1]	50,7* [46,4; 56,7]
	W_{secr}	0,73 [0,62; 0,87]	-0,8* [-2,73; 0,04]	0,87 [0,82; 0,93]	0,77* [0,71; 0,79]
KL	$K_{\text{лаб}}^{\%}$	8,1 [5,4; 13,6]	12,8 [6,4; 19,6]	10,4 [7; 11,2]	8,4 [6,2; 11,6]
	W_{secr}	-0,62 [-1,78; 0,26]	-1,09 [-1,77; 0,24]	0,21 [0,05; 0,39]	-0,41* [-1,02; -0,06]
KH	$K_{\text{лаб}}^{\%}$	11,2 [9,5; 14,99]	11,3 [11; 15,9]	7,2 [5,5; 15,2]	8,7 [7,3; 10,7]
	W_{secr}	-0,24 [-0,59; 0,44]	-0,62 [-0,67; -0,27]	0,04 [-0,17; 0,34]	-0,39* [-0,58; -0,21]

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

Сочетание анализа изменений коэффициента лабильности лизосомальной мембраны с W_{secr} (табл. 2) позволяет предполагать, что причиной выявленных сдвигов в сердечной и скелетной мышцах является уменьшение степени секреции катепсина В (статистически значимые снижения W_{secr} в изучаемых органах) через неповрежден-

ную мембрану, которая обладает дифференциальной проницаемостью для всех лизосомальных цистеиновых протеиназ. В случае с катепсинами L и H в миокарде статистически значимых данных $K_{\text{лаб}}^{\%}$ и W_{secr} не обнаружено.

Заключение о подавлении секреции катепсинов L и H скелетной мускулатуры

в данной экспериментальной модели с нарушением целостности лизосомальной мембраны позволяют сделать статистически значимое снижение показателя W_{seccr} на фоне малых изменений показателей коэффициентов лабильности этих ферментов.

Миокард демонстрирует статистически значимое нарастание показателей K_{aca} (рисунок) под действием L-аргинина для катепсина В в обеих субклеточных фракциях: НСА: 0,71 [0,34; 1,11] – 5,55 [1,7; 6,34]; СА 0,83 [0,31; 1,78] – 1,13 [0,59; 1,7] контрольная и опытная проба соответственно, следует заметить, что значительное увеличение НСА у исследуемых коэффициентов говорит о высокой степени аутопроцессинга данного фермента. Изменения коэффициентов для катепсинов L и Н в сердечной мышце оказались статистически не значимыми, однако катепсин Н повторяет изменения катепсина В, которые протекают не так ярко, что может говорить об аутокаталитической активации с созданием активных форм из проферментов.

В скелетной мышце, напротив, у катепсина В отмечается статистически значимое резкое снижение показателей K_{aca} по сравнению с данными контрольной группы крыс в неседиментируемой и в седиментируемой фракциях: НСА 2,66 [0,54; 8,92] – 0,54 [0,11; 1,22]; СА 1,54 [0,11; 6,88] – 0,61 [0,35; 1,12] контрольная и опытная проба соответственно, что может быть результатом аутокаталитического расщепления или связыванием с растворимыми формами ингибиторов в процессе преинкубации в лизосомах и цитоплазме.

В то же время для катепсина L в данной ткани получено статистически значимое нарастание коэффициентов в седиментируемой (лизосомальной) фракции 0,09 [0,02; 0,38] – 1,16 [0,92; 1,52] контрольная и опытная проба соответственно, изменения наблюдаются при нарастании проферментных форм, что является фактором запуска аутокаталитического процессинга.

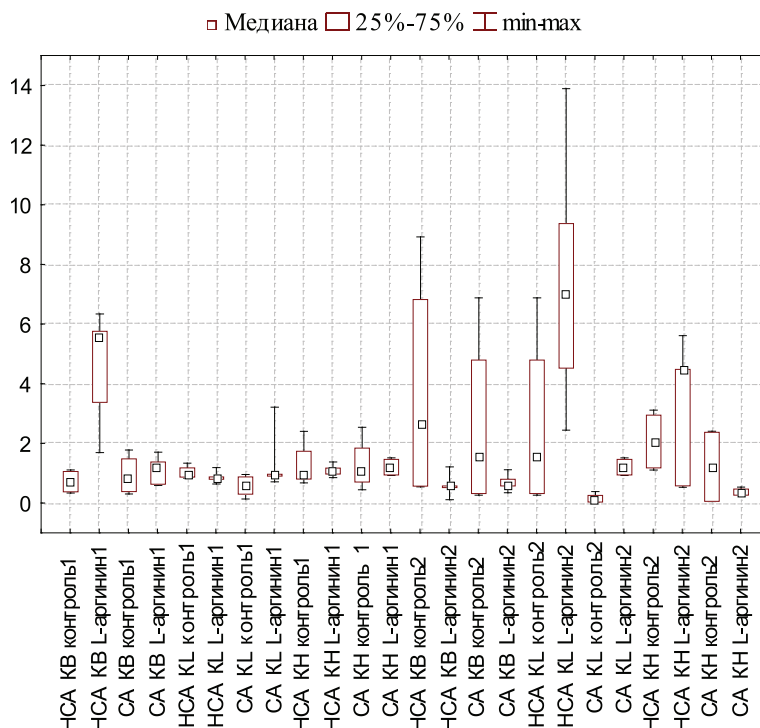


Диаграмма размаха коэффициента аутокаталитического действия миокарда (1) и скелетной мускулатуры (2)

Таким образом, введение субстрата синтеза NO L-аргинина приводит к изменению содержания в мышечных тканях проферментных и активных форм лизосомальных цистеиновых катепсинов; наибольшей чувствительностью при этом обладает катепсин В.

Выводы

1. L-аргинин в дозе 500 мг/кг вызывает нарастание активности катепсинов В и Н в скелетной мускулатуре с одновременным снижением активности катепсина L.

2. Введение L-аргинина приводит к снижению секреции всех изучаемых катеп-

синов в мышечной ткани и катепсина В в миокарде.

3. L-аргинин вызывает нарастание количества проферментных форм катепсина В в миокарде с параллельным снижением их содержания в скелетной мышце.

Список литературы

1. Головченко Ю.И. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции / Ю.И. Головченко, М.А. Трещинская // *Consilium medicum Ukraina* – 2008 – № 11 – С. 38–40.
2. Горчакова Н.О. Біохімія аргініну, фармакологічна дія і застосування в клінічній практиці його похідних / Н.О. Горчакова, А.С. Ягупова, І.С. Чекман // *Науковий вісник НМУ ім. О.О. Богомольця*. – 2006. – № 4. – С. 238–246.
3. Коровин М.С. Роль лизосомальных цистеиновых протеиназ в опухолевой прогрессии / М.С. Коровин, В.В. Новицкий, О.С. Васильева // *Бюл. Сиб. медицины*. – 2009. – № 2. – С. 85–91.
4. Марков Х.М. L-аргинин – оксид азота в терапии болезней сердца и сосудов // *Кардиология*. – М., 2005 – № 6. – С. 87–95.
5. Покровский М.В. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.И. Корчаков [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2008. – Т. 71, № 2. – С. 29–31.
6. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник // *Соросовский образовательный журнал*. – 2000. – Т. 6, № 12 – С. 27–34.
7. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. Способ оценки степени секреции лизосомальных цистеиновых протеиназ. Заявка на выдachu патента № 2013 125 639 (037767), приоритет от 03.06.2013.
8. Barrett A.J. Cathepsin B, Cathepsin H, cathepsin L // *Methods in Enzymol.* – 1981. – Vol. 80. – P. 535–561.
9. Chatterjee A. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation / A. Chatterjee, J.D. Catravas // *Vascul. Pharmacol.* – 2008 – Vol. 49(4–6) – P. 134–140.
10. Conus S. Cathepsins and their involvement in immune responses / S. Conus, S. Hans-Uwe // *Swiss medical weekly*. – 2010. – P. 1–12.

References

1. Golovchenko Ju.I., Treshhinskaja M.A. *Consilium medicum Ukraina*, 2008, no. 11, pp. 38–40.
2. Gorchakova N.O., Jagupova A.S., Chekman I.S. *Naukovij visnik NMU im. O.O. Bogomolcja*, 2006, no. 4, pp. 238–246.
3. Korovin M.S., Novickij V.V., Vasileva O.S. *Bjul. Sib. Mediciny*, 2009, no. 2, pp. 85–91.
4. Markov H. M. *Kardiologija*, 2005, no. 6, pp. 87–95.
5. Pokrovskij M.V., Pokrovskaja T.G., Korchakov V.I. [et al.] *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija*, 2008, Vol. 71, no.2, pp. 29–31.
6. Sosunov A.A. *Sorosovskij obrazovatelnyj zhurnal*, 2000, Vol. 6, no.12, pp. 27–34.
7. Fomina M.A., Abalenihipina J.V. A method for evaluating the degree of secretion of lysosomal cysteine proteases. A patent application number 2013 125 639 (037 767), a priority from 03.06.2013.
8. Barrett A.J., Kirschke H. *Methods in Enzymol*, 1981, Vol. 80, pp. 535–561.
9. Chatterjee A., Catravas J.D. *Vascul. Pharmacol.*, 2008, Vol. 49(4–6), pp. 134–140.
10. Conus S., Hans-Uwe S. *Swiss medical weekly*, 2010, pp. 1–12.

Рецензенты:

Емельянова А.С., д.б.н., профессор кафедры технологии производства и переработки продукции животноводства, ФГБОУ ВПО «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева», г. Рязань;

Демихов В.Г., д.м.н., профессор, директор Рязанского филиала, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва», г. Рязань.

Работа поступила в редакцию 10.12.2014.