

ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА И КАРНИТИНА НА АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНОВ L И H И ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ ПРИ ВЫРАЖЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Анна Сергеевна Ильичёва*, Мария Алексеевна Фомина

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

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-819

Цель. Изучить активность лизосомальных цистеиновых протеаз (катепсинов L, H) и кислой фосфатазы, изменение проницаемости, стабильности лизосомальных мембран сердечной мышцы крыс в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии выраженной степени и при введении препаратов L-аргинина и карнитина.

Методы. Исследование было выполнено на крысах-самцах линии Wistar, содержащихся в типовых условиях вивария и разделённых на три контрольные и три экспериментальные группы, по 8 особей в каждой. Экспериментальные выборки включали группу с изолированным введением метионина, группы с введением L-аргинина и карнитина на фоне метионина. Определение уровня гомоцистеина в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа. Активности катепсинов L и H определяли спектрофлуориметрическим методом. Активность кислой фосфатазы регистрировали унифицированным методом по «конечной точке».

Результаты. При моделировании тяжёлой формы гомоцистеинемии обнаружено увеличение общей активности катепсина H за счёт как лизосомальной, так и внелизосомальной фракций. Данные изменения наблюдались на фоне общего повышения проницаемости лизосомальной мембраны. При коррекции гипергомоцистеинемии препаратами L-аргинина и карнитина происходило снижение активности катепсинов L и H, отмечалось положительное влияние на стабильность лизосомальных мембран сердечной мышцы.

Вывод. Выраженная гипергомоцистеинемия сопровождается статистически значимым повышением активности катепсина H как в лизосомальной, так и в цитоплазматической фракциях, увеличением активности кислой фосфатазы в цитоплазматической фракции, что свидетельствует о феномене пермеабилзации лизосомальных мембран; карнитин и L-аргинин корректируют эффекты гипергомоцистеинемии, приводя к снижению активности катепсинов L и H и оказывая стабилизирующее влияние на лизосомальные мембраны клеток сердечной мышцы.

Ключевые слова: катепсин L, катепсин H, сердечная мышца, гипергомоцистеинемия, L-аргинин, карнитин.

EFFECT OF L-ARGININE AND CARNITINE ON CATHEPSIN L AND H ACTIVITY AND LYSOSOMAL MEMBRANES PERMEABILITY IN MYOCARDIUM IN EXPRESSED HYPERHOMOCYSTEINEMIA

A.S. Il'icheva, M.A. Fomina

Ryazan State Medical University named after I.P. Pavlov, Ryazan, Russia

Aim. To study the activity of lysosomal cysteine proteases (cathepsins L, H) and acid phosphatase, changing of permeability, stability of myocardial lysosomal membranes in rats in experimental expressed hyperhomocysteinemia model, and while administering L-arginine and carnitine.

Methods. The study was performed on male Wistar rats kept on standard vivarium conditions divided into three control and three experimental groups of 8 animals each. Experimental samples were administered methionine, or combination of L-arginine and carnitine with methionine. The level of serum homocysteine was measured by ELISA. Cathepsin L and H activity was detected by spectrofluorimetric method. Acid phosphatase activity was recorded using the «end point» method.

Results. In the model of expressed hyperhomocysteinemia the increase of cathepsin H total activity due to both lysosomal and nonlysosomal fractions was found. These changes were observed along with the general increase of lysosomal membranes permeability. When correcting hyperhomocysteinemia with L-arginine and carnitine a decrease of cathepsin L and H levels was noted as well as positive effect on the myocardial lysosomal membranes stability.

Conclusion. Expressed hyperhomocysteinemia is accompanied by statistically significant increase of both lysosomal and cytoplasmic fractions of the cathepsin H activity, indicating the lysosomal membranes permeabilisation phenomenon; L-carnitine and arginine correct hyperhomocysteinemia effects, leading to cathepsin L and H reduced activity and having a stabilizing effect on the lysosomal membranes of cardiomyocytes.

Keywords: cathepsin L, cathepsin H, cardiac muscle, myocardium, hyperhomocysteinemia, L-arginine, carnitine.

Гомоцистеин — промежуточное звено в метиониновом цикле, обладает выраженной цитотоксичностью [3]. Являясь тиолом, принимает участие в формировании смешанных дисульфидов и обладает прооксидантной активностью [4], что ведёт за собой дополнительное образование свободных радикалов и последующее развитие оксидативного стресса [3, 7].

Катепсины (лизосомальные цистеиновые протеиназы) представляют собой семей-

ство папаиноподобных протеиназ, которые активно участвуют в синтезе биологически активных пептидов, инактивации и разрушении состарившихся и аномальных белков, фагоцитозе и делении клетки, апоптозе [7, 9, 12]. Описана их роль в развитии воспаления, опухолевого роста, метастазирования, атеросклероза, ревматоидного артрита.

Одна из важнейших особенностей катепсинов — их способность к протеолизу компонентов внеклеточного матрикса [12], а также к выходу в цитоплазму сквозь избыточно проницаемую (пермеабилизо-

ванную) лизосомальную мембрану [16], в том числе на фоне оксидативного стресса [9]. В настоящее время процесс дифференцированного выхода катепсинов в цитозоль с активацией каспазозависимого пути рассматривают как один из важнейших факторов апоптоза [15].

Следует отметить, что в современных источниках содержится недостаточно сведений о роли данного процесса в патологии сердечно-сосудистой системы, однако описано участие изменения проницаемости лизосомальной мембраны при повреждении миокарда на фоне гиперинсулинемии [10].

В современной литературе есть данные о защитном действии карнитина при апоптозе, оксидативном стрессе — путём ингибирования синтеза церамидов и угнетения активности каспаз [2]. L-аргинин принимает участие в пластическом и энергетическом обмене, регуляции иммунных и метаболических процессов, обладает широким спектром биологических свойств, многофункциональностью [1, 8].

Таким образом, актуальным представляется изучение изменений активности лизосомальных цистеиновых катепсинов L, H и проницаемости лизосомальных мембран в сердечной мышце на фоне выраженной гипергомоцистеинемии и при введении препаратов карнитина и L-аргинина.

Цель исследования — изучить активность лизосомальных цистеиновых протеаз (катепсинов L и H) и кислой фосфатазы, изменение проницаемости, стабильности лизосомальных мембран сердечной мышцы крыс в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии выраженной степени и при введении препаратов L-аргинина и карнитина.

Исследование было выполнено на 48 белых конвенциональных крысах-самцах линии Wistar с массой тела 280–320 г, содержащихся в типовых условиях вивария и разделённых на шесть групп — три контрольных (по 8 животных в каждой) и три экспериментальных (по 8 животных в каждой).

Моделирование тяжёлой формы гипергомоцистеинемии осуществляли путём ежедневного внутрижелудочного введения 2 раза в сутки суспензии метионина в дозе 1,5 г/кг массы тела животного в течение 21 дня. В своём составе суспензия содержала (по массе) 25% метионина, 65% водного раствора крахмала (концентрация 1%), 10% твина-80. Вместо воды животные получали 1% раствор метионина [5]. В качестве контроль-

ной группы №1 использовали животных (n=8), получавших в течение 21 дня суспензию, не содержащую метионин (состав по массе: 10% твина-80, 1% крахмала, 89% воды).

Для изучения эффектов аргинина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии вводили аргинин *per os* 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе натрия хлорида в течение 10 сут [8] параллельно с введением метионина по схеме, описанной выше (с 12-х по 21-е сутки введения метионина). Животным контрольной группы №2 (n=8) осуществляли введение аргинина *per os* 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе натрия хлорида в течение 10 сут параллельно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше.

Влияние карнитина изучали в экспериментальной группе животных, получавших карнитина хлорид (производство ФГУ «РКНПК» Минздрава России — ЭПМБП) в дозе 300 мг/кг внутривентриально в течение 21 дня [14] параллельно с введением метионина по схеме, описанной выше. Контрольную группу №3 составили 8 животных, получавших карнитина хлорид в дозе 300 мг/кг внутривентриально в течение 21 дня параллельно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше.

Введение аргинина и карнитина в экспериментальных и контрольных группах осуществляли с интервалом 6 ч от введения соответствующей суспензии.

Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли согласно правилам, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной диагностики».

Немедленно после выведения животного из эксперимента точную навеску сердечной мышцы помещали в холодный 0,25 М раствор сахарозы в соотношении 1:100 и гомогенизировали в течение 60 с при 1500 об./мин в гомогенизаторе «Potter S», при температуре не выше 4 °С. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Для удаления митохондрий надосадочную жидкость центрифугировали в течение 15 мин при 14 000 g. Полученный супернатант дополнительно центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин для получения чистой цитоплазматической (не-

седиментируемой) фракции. Дифференциальное центрифугирование осуществлялось с использованием рефрижераторной центрифуги К24Д. Седиментируемую фракцию (осадок грубой фракции лизосом) ресуспендировали в 0,25 М растворе сахарозы с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1%.

Активность катепсинов L и H определяли спектрофлуориметрическим методом по A.J. Vagret и H. Kirshke [11] отдельно в седиментируемой и неседиментируемой фракциях и обозначали как седиментируемую и неседиментируемую активность соответственно.

Для оценки стабильности лизосомальной мембраны использовали коэффициент лабильности, рассчитываемый как процентное соотношение активности лизосомального фермента во внелизосомальной (неседиментируемой) фракции к общей активности, представляющей собой сумму неседиментируемой и седиментируемой активности для данного фермента [6].

Коэффициент лабильности показывает проницаемость мембраны лизосомы и характеризует, хоть и косвенно, распределение лизосомальных ферментов между первичными и вторичными лизосомами.

В качестве признанного основного маркера лабилизации лизосомальных мембран использовали активность кислой фосфатазы [16]. Активность фермента в седиментируемой и неседиментируемой фракциях гомогената измеряли унифицированным методом по «конечной точке», используя коммерческий набор «Витал Диагностикс СПб».

Содержание гомоцистеина в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора компании «AxisShield» (США).

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel и программы Statistica 10. Для каждой выборки рассчитывали медиану (Me), верхний и нижний квартили [Q1; Q3]. Статистическую значимость отличий показателей экспериментальной группы от группы сравнения оценивали по U-критерию Манна-Уитни.

При сопоставлении содержания гомоцистеина в сыворотке крови обнаружено выраженное статистически значимое нарастание показателя у животных с моделированием гипергомоцистеинемии относительно соответствующей контрольной

группы. Экспериментальные группы с введением аргинина и карнитина демонстрировали повышение уровня гомоцистеина относительно соответствующих контрольных групп, однако результаты измерений оказались статистически значимо ниже, чем в группе, получавшей изолированно метионин (табл. 1).

Таблица 1
Содержание гомоцистеина в сыворотке крови
(Me [Q1; Q3])

Группы	Гомоцистеин, мкмоль/л
Контроль 1	5,90 [5,50; 6,70]
Контроль 2	5,87 [5,65; 6,77]
Контроль 3	5,90 [5,73; 6,09]
Метионин	293,10 [273,10; 318,20]*
Метионин + L-аргинин	92,80 [58,75; 112,07]*,#
Метионин + карнитин	72,70 [55,27; 91,85]*,#

Примечание: *отличия от соответствующей контрольной группы (p < 0,05); #по сравнению с группой, получавшей метионин (p < 0,05).

В ходе анализа изменений активности катепсинов L и H выявлены следующие тенденции (табл. 2). Активность катепсина L как лизосомальной, так и цитоплазматической фракции сердечной мышцы при выраженной гипергомоцистеинемии не претерпела статистически значимых изменений относительно контроля. Одновременно активность катепсина H оказалась статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой. Указанные изменения касались как лизосомальной, так и внелизосомальной фракции гомогената сердечной мышцы.

В группе животных, получающих аргинин на фоне метионина, обнаружено статистически значимое снижение общей и седиментируемой (лизосомальной) активности обоих катепсинов, а также внелизосомальной фракции катепсина L относительно группы, изолированно получавшей метионин. При совместном введении метионина и карнитина мы выявили статистически значимое снижение активности всех фракций катепсинов относительно выборки с гипергомоцистеинемией.

При тяжёлой форме гипергомоцистеинемии нарастание активности катепсина в цитоплазматической фракции может быть вызвано общей лабилизацией лизосомальной мембраны [10, 17]. Нами был предпринят анализ активности кислой фосфатазы — маркёрного фермента лизосом (табл. 3) и

Активность катепсинов L и H в сердечной мышце (Me [Q1; Q3])

Группы	Активность	Катепсин L, нмоль/схг белка	Катепсин H, нмоль/схг белка
Контроль 1	HCA	0,011 [0,007; 0,015]	0,016 [0,013; 0,019]
	CA	1,730 [0,980; 2,000]	1,276 [1,096; 1,858]
	OA	1,700 [1,000; 2,010]	1,289 [1,113; 1,880]
Метионин	HCA	0,021 [0,019; 0,026]	0,111 [0,106; 0,118]*
	CA	1,064 [0,840; 1,370]	3,633 [3,248; 3,987]*
	OA	1,100 [0,860; 1,380]	3,751 [3,409; 4,094]*
Контроль 2	HCA	0,008 [0,002; 0,008]	0,009 [0,008; 0,012]
	CA	0,220 [0,200; 0,310]	0,160 [0,140; 0,240]
	OA	0,220 [0,200; 0,320]	0,160 [0,150; 0,250]
Метионин + аргинин	HCA	0,009 [0,003; 0,011]#	0,020 [0,017; 0,022]*
	CA	0,260 [0,220; 0,340]#	0,360 [0,330; 0,590] #, *
	OA	0,270 [0,230; 0,350]#	0,380 [0,350; 0,610] #, *
Контроль 3	HCA	0,008 [0,006; 0,010]	0,020 [0,017; 0,025]
	CA	0,120 [0,051; 0,172]	0,380 [0,312; 0,421]
	OA	0,131 [0,061; 0,184]	0,412 [0,323; 0,424]
Метионин + карнитин	HCA	0,013 [0,009; 0,015]#, *	0,064 [0,061; 0,073] #, *
	CA	0,183 [0,098; 0,788]#, *	1,370 [1,291; 1,732] #, *
	OA	0,198 [0,111; 0,795]#	1,404 [1,371; 1,800]#, *

Примечание: *отличия от контрольной группы (p <0,05); #по сравнению с группой, получавшей метионин (p <0,05); HCA – неседиментируемая активность; CA – седиментируемая активность; OA – общая активность (сумма HCA и CA для данного фермента).

Таблица 3

Активность кислой фосфатазы в сердечной мышце (Me [Q1; Q3])

Группа	Активность	Кислая фосфатаза, нмоль/схг белка
Контроль 1	HCA	3,397 [2,853; 3,701]
	CA	98,996 [57,332; 140,183]
	OA	102,119 [60,466; 143,765]
Метионин	HCA	6,982 [6,012; 7,640]*
	CA	79,771 [67,130; 83,980]
	OA	86,753 [71,624; 89,990]
Контроль 2	HCA	2,300 [1,991; 2,944]
	CA	56,172 [55,565; 60,539]
	OA	57,782 [57,634; 63,185]
Метионин + аргинин	HCA	2,971 [2,940; 4,120] #, *
	CA	61,332 [55,560; 68,720] #
	OA	64,242 [59,030; 72,673] #
Контроль 3	HCA	3,248 [2,441; 3,444]
	CA	116,434 [92,59; 148,023]
	OA	119,850 [95,343; 150,208]
Метионин + карнитин	HCA	4,341 [3,710; 5,090] #*
	CA	151,827 [116,920; 171,037] #
	OA	156,370 [121,463; 174,654] #

Примечание: *отличия от контрольной группы (p <0,05); #отличия от группы, получавшей метионин (p <0,05); HCA – неседиментируемая активность; CA – седиментируемая активность; OA – общая активность (сумма HCA и CA для данного фермента).

Коэффициент лабильности катепсинов L, H, кислой фосфатазы в сердечной мышце (Me [Q1; Q3])

Группа	Катепсин L, нмоль/схг белка	Катепсин H, нмоль/схг белка	Кислая фосфатаза
Контроль 1	0,73 [0,36; 1,17]	1,18 [1,06; 1,29]	3,28 [2,59; 5,27]
Метионин	2,54 [1,77; 3,30]	3,15 [2,68; 3,47]*	8,04 [6,68; 8,21]*
Контроль 2	1,37 [1,13; 3,6]	5,26 [4,87; 6,25]	3,99 [3,35; 4,73]
Метионин + аргинин	1,54 [1,26; 3,59]	4,91 [3,72; 6,03]#	5,03 [4,51; 6,09]#,*
Контроль 3	8,59 [3,06; 15,22]	6,08 [3,97; 7,79]	2,67 [1,81; 3,28]
Метионин + карнитин	8,12 [1,46; 11,70]	4,38 [4,04; 4,90]#	2,88 [2,18; 4,02]#

Примечание: *отличия от контрольной группы (p < 0,05); #отличия от группы, получавшей метионин (p < 0,05).

показателей коэффициента лабильности (табл. 4). Статистически значимое нарастание активности кислой фосфатазы в цитоплазматической фракции в экспериментальной группе (тяжёлая форма гомоцистеинемии) без однотипных изменений общей активности позволяет говорить о наличии феномена лабилизации лизосомальных мембран [16] сердечной мышцы. Активность данного фермента этой же фракции при введении карнитина и аргинина на фоне метионина достоверно снижалась относительно выборки животных с гипергомоцистеинемией.

Необходимо отметить, что при совместном введении метионина и карнитина мы получили статистически значимое снижение активности кислой фосфатазы только для внелизосомальной фракции, при этом общая активность резко повышалась за счёт лизосомальной фракции. Одной из причин обнаруженного феномена может оказаться такой малоизученный в настоящее время процесс, как увеличение количества лизосом [13] под влиянием карнитина.

Сравнивая группы животных, получавшие аргинин с метионином и только метионин, мы обнаружили статистически значимое снижение как общей активности, так и лизосомальной и цитоплазматической фракций под влиянием аргинина.

Коэффициент лабильности нарастал в группе животных с гипергомоцистеинемией относительно контроля 1 как для изучаемых катепсинов, так и для кислой фосфатазы (см. табл. 4), что указывает на дестабилизацию лизосомальной мембраны при данной экспериментальной патологии.

Повышение проницаемости лизосомальных мембран при тяжёлой форме гомоцистеинемии может быть связано с развитием окислительного стресса [9]. Помимо этого, мембраны лизосом способны повреждаться

кальпаинами и каспазами [17], совместное действие которых с катепсинами индуцирует развитие клеточного апоптоза [7].

При коррекции эффектов гипергомоцистеинемии аргинином и карнитином мы выявили статистически значимое снижение коэффициента лабильности кислой фосфатазы относительно группы, получавшей изолированно метионин, что может свидетельствовать о стабилизирующем влиянии этих веществ на лизосомальные мембраны благодаря их цитопротективным особенностям. Однако, оценивая коэффициент лабильности изучаемых катепсинов в этих группах, мы наблюдали статистически значимое увеличение показателя для катепсина H по сравнению с группой животных, получавшей только метионин. Вероятно, это можно объяснить выходом ферментов в цитозоль без нарушения целостности мембраны лизосом. В современной литературе описан подобный выход ферментов благодаря образованию белковых пор в лизосомальной мембране [12].

ВЫВОДЫ

1. Выраженная гипергомоцистеинемия сопровождается статистически значимым повышением активности катепсина H как в лизосомальной, так и в цитоплазматической фракциях, нарастанием значений коэффициентов лабильности и статистически значимым повышением активности кислой фосфатазы в цитоплазматической фракции, что свидетельствует о наличии феномена лабилизации лизосомальных мембран миокарда.

2. Карнитин и L-аргинин корректируют эффекты гипергомоцистеинемии, приводя к снижению активности катепсинов L и H и оказывая стабилизирующее влияние на лизосомальные мембраны клеток сердечной мышцы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Граник В.Г. Метаболизм L-аргинина (обзор) // Хим.-фарм. ж. — 2003. — Т. 37, №3. — С. 3–20. [Granik V.G. Molecular-biological problems of drug design and mechanism of drug action: metabolism of L-arginine (a review). *Pharmaceutical chemistry journal*. 2003; 37 (3): 111–127.]

2. Копелевич В.М. Витаминоподобные соединения L-карнитин и ацетил-L-карнитин: от биохимических исследований к медицинскому применению // Украин. биохим. ж. — 2005. — Т. 77, №4. — С. 25–45. [Kopelevich V.M. Vitamine-like substances L-carnitine and acetyl-L-carnitine: from biochemical studies to medicine. *Ukrainskiy biokhimicheskiy zhurnal*. 2005; 77 (4): 25–45. (In Russ.)]

3. Костюченко Г.И. Гипергомоцистеинемия: клиническое значение, возрастные особенности, диагностика и коррекция // Клини. геронтол. — 2007. — Т. 13, №4. — С. 32–40. [Kostuchenko G.I. Hyperhomocysteinemia: clinical significance, age characteristics, diagnosis and correction. *Klinicheskaya gerontologiya*. 2007; 13 (4): 32–40. (In Russ.)]

4. Маслов А.П., Теляков А.Т., Кузнецова А.В. Гипергомоцистеинемия и повышенный риск сердечно-сосудистых осложнений у больных ИБС с атерогенной гиперхолестеринемией // Сибир. мед. ж. (Томск). — 2009. — №4-2. — С. 25–30. [Maslov A.P., Telyakov A.T., Kouznetsova A.V. Hyperhomocysteinaemia and increased risk of cardiovascular complications in patients having ischemic heart disease with atherogenic hypercholesterolemia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Tomsk)*. 2009; 4(2): 25–30. (In Russ.)]

5. Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс // Рос. мед.-биол. вестн. им. И.П. Павлова. — 2014. — №4. — С. 42–46. [Medvedev D.V., Zvyagina V.I., Fomina M.A. Modeling of severe hyperhomocysteinemia in rats. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik im. akademika I.I. Pavlova*. 2014; 4: 42–46. (In Russ.)]

6. Панин Л.Е., Маянская Н.Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск: Наука СО, 1987. — 198 с. [Panin L.E., Mayanskaya N.N. *Lizosomy: rol v adaptatsii i vosstanovlenii*. (Lysosomes: role in adaptation and restoration.) Novosibirsk: Nauka SO. 1987; 198 p. (In Russ.)]

7. Паунова С.С. Апоптоз — физиология и патология // Нефрол. и диализ. — 2004. — №2. — С. 132–136.

[Paunova S.S. Apoptosis — physiology and pathology. *Nefrologiya i dializ*. 2004; 2: 132–136. (In Russ.)]

8. Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И., Артюшкова Е.Б. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота // Эксперим. и клин. фармакол. — 2008. — Т. 71, №2. — С. 29–31. [Pokrovskiy M.V., Pokrovskaya T.G., Kochkarov V.I., Artyushkova E.B. Endothelioprotective properties of L-arginine on a nitric oxide deficiency model. *Ekspierimtal'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2008; 71 (2): 29–31. (In Russ.)]

9. Путьшев А.Б. Пермеабилзация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор // Цитология. — 2011. — Т. 53, №4. — С. 313–324. [Pupyshov A.B. Lysosomal membrane permeabilization as apoptogenic factor. *Tsitologiya*. 2011; 53 (4): 313–324. (In Russ.)]

10. Хидирова Л.Д., Маянская М.Н., Антонов А.Р., Маянская С.Д. Гиперинсулинемия в повреждении миокарда // Международ. ж. прикладн. и фундамент. исслед. — 2009. — №4. — С. 95. [Khidirova L.D., Mayanskaya M.N., Antonov A.R., Mayanskaya S.D. Hyperinsulinemia in myocardial injury. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy*. 2009; 4: 95. (In Russ.)]

11. Barret A.J., Kirshke H. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L // *Methods in Enzymol.* — 1981. — Vol. 80. — P. 535–561.

12. Felbor U., Dreier L., Bryant R.A. et al. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII // *EMBO J.* — 2000. — Vol. 19, N 6. — P. 1187–1194.

13. Jin M., Klionsky D.J. Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosome // *FEBS Letters.* — 2014. — Vol. 588. — P. 2457–2463

14. Rajasekar P., Palanisamy N., Anuradha C.V. Increase in nitric oxide and reduction in blood pressure, protein kinase C beta II and oxidative stress by L-carnitine: a study in the fructose-fed hypertensive rat // *Clin. Exp. Hypertens.* — 2007. — Vol. 29, N 8. — P. 517–530.

15. Repnik U., Turk B. Lysosomal-mitochondrial crosstalk during cell death // 2010. — Vol. 10, N 6. — P. 662–669. — DOI: 10.1016/j.mito.2010.07.008.

16. Terman A., Kurz T., Gustafsson B., Brunket U. Lysosomal labilization // *IUBMB Life.* — 2006. — Vol. 58, N 9. — P. 531–539.

17. Yap Y.W., Whiteman M., Bay B.H. et al. Hypochlorous acid induces apoptosis of cultured cortical neurons through activation of calpains and rupture of lysosomes // *J. Neurochem.* — 2006. — Vol. 98. — P. 1597–1609.

УДК 615.273.53: 615.32: 615.076.9

ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕПТИДНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА ИЗ САПРОПЕЛЯ

Евгений Павлович Калинин*, Даниэль Игоревич Бояринцев, Сергей Леонидович Галян

Тюменский государственный медицинский университет, г. Тюмень, Россия

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-824

Цель. Получить экстракт сапропеля, содержащий пептидный антикоагулянт, провести его очистку от соэкстрагируемых соединений, подтвердить химическую природу очищенного антикоагулянта, дать характеристику аминокислотного состава и оценить его воздействие на свёртывающую активность крови в пробирочных тестах и влияние на показатели гемостаза лабораторных животных.

Методы. Источником антикоагулянта послужил сапропель озера Тараскуль (Тюменская область). Получали и очищали эффектор по разработанной нами методике, включающей экстракцию, осаждение гуминовых кислот высаливанием и удаление фульвокислот и низкомолекулярных фракций гуминовых кислот ионообменной хроматографией. Оценку чистоты и гомогенности полученного антикоагулянта проводили с помощью высоко-