

- Оренбург. науч. центра УрО РАН. — 2014. — №2. — С. 2. [Tinkov A.A., Gatiatulina E.R., Nemereshina O.N. Comparative study of different plantaginacea species' influence on E. Coli growth *in vitro*. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN*. 2014; 2: Article 2. (In Russ.)]
2. Anderson A.S., Lage F.F., Chagas P.M. et al. Antioxidants from medicinal plants used in the treatment of obesity // *Eur. J. Med. Plants*. — 2013. — Vol. 3, N 3. — P. 429.
3. Bors W., Saran M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants // *Free Radic. Res. Commun.* — 1987. — Vol. 2, N 4-6. — P. 289-294.
4. Crujeiras A.B., Díaz-Lagares A., Carreira M.C. et al. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer // *Free Rad. Research*. — 2003. — Vol. 47, N 4. — P. 243-256.
5. Fernández-Sánchez A., Madrigal-Santillán E., Bautista M. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity // *Intern. J. Mol. Sci.* — 2011. — Vol. 12, N 5. — P. 3117-3132.
6. Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A. et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants // *J. Agric. Food Chem.* — 1998. — Vol. 46. — P. 1887-1892.
7. Hu M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma // *Meth. Enzymol.* — 1994. — Vol. 233. — P. 380-385.
8. Kadoma Y., Fujisawa S. A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method // *Molecules*. — 2008. — Vol. 13, N 10. — P. 2488-2499.
9. Keaney J.F., Larson M.G., Vasan R.S. et al. Obesity and systemic oxidative stress clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study // *Arterioscler. Thrombos. Vasc. Biol.* — 2003. — Vol. 23, N 3. — P. 434-439.
10. Kim R.S., LaBella F.S. Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation profiles of authentic lipids // *J. Lipid Res.* — 1987. — Vol. 28, N 9. — P. 1110-1117.
11. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // *Methods Enzymol.* — 1990. — Vol. 186. — P. 464-478.
12. Lyznicki J.M., Young D.C., Riggs J.A., Davis R.M. Obesity: assessment and management in primary care // *Am. Family Physician*. — 2011. — Vol. 63, N 11. — P. 2185-2200.
13. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* — 1979. — Vol. 95, N 2. — P. 351-358.
14. Placer Z.A. Lipid peroxidation *in vivo*. Nutrition. Proceedings of the Eighth International Congress // Amsterdam: Excerpta Medica. — 1970. — P. 100-105.
15. Tundis R., Loizzo M.R., Menichini F. et al. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments // *Mini Rev. Med. Chem.* — 2008. — Vol. 8, N 4. — P. 399-420.

УДК 576.385: 576.311.344: 577.15: 612.084: 612.015.11: 615.27

ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА *IN VITRO*

Мария Алексеевна Фомина, Анна Михайловна Кудлаева*

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

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-876

Цель. Изучение прямого влияния аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ *in vitro* как в эксперименте, так и при стимуляции оксидативного стресса.

Методы. Исследование проведено на 72 крысах-самках линии Wistar с массой тела 280–320 г, которых разделили на 12 серий по 6 крыс в каждой. Для анализа использовали выделенные из печени интактных животных суспензии лизосом, которые *in vitro* инкубировали в растворе сахарозы в присутствии L-аргинина, а также в присутствии L-аргинина при стимуляции оксидативного стресса. В контрольных группах проводили *in vitro* инкубацию в среде выделения и с добавлением оксиданта соответственно. Каждую серию воспроизводили трижды, инкубацию осуществляли при температуре 37 °C на водяной бане в течение 1, 2 и 4 ч. Активность катепсинов В, L и Н изучали спектрофлуориметрическим методом в двух фракциях — лизосомальной и внелизосомальной. В качестве основного маркера лабильности мембран использовали активность кислой фосфатазы.

Результаты. Применение аргинина в концентрации 5 мМ при инкубации *in vitro* сопровождалось подавлением активности катепсина Н и повреждением лизосомальной мембраны при 1-часовой инкубации, однако дальнейшее увеличение времени инкубации приводило к её стабилизации. *In vitro* воздействие 5 мМ H₂O₂ вызывало рост активности катепсинов В и L и падение активности катепсина Н без выраженных изменений распределения ферментов между вне- и интрализосомальной фракциями. На фоне оксидативного стресса 5 мМ аргинин при 2-часовой инкубации *in vitro* снижал проницаемость лизосомальной мембраны для катепсинов В, Н и L, при 4-часовой инкубации приводил к дестабилизации лизосомальной мембраны.

Вывод. Прямое воздействие аргинина в конечной концентрации 5 мМ в течение исследуемых промежутков времени приводит к отчетливым изменениям как активности лизосомальных цистеиновых протеиназ, так и стабильности лизосомальной мембраны.

Ключевые слова: катепсины В, L и Н, L-аргинин, стабильность лизосомальной мембраны.

IN VITRO EFFECTS OF L-ARGININE ON LYSOSOMAL CYSTEINE PROTEASES ACTIVITY IN ISOLATED EXPERIMENT AND IN THE STATE OF OXIDATIVE STRESS

M.A. Fomina, A.M. Kudlaeva

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

Aim. Assessment of direct influence of arginine on lysosomal cysteine proteases activity *in vitro*, in isolation as well as the stimulation of oxidative stress.

Methods. The study was conducted on the 72 female conventional mature Wistar rats 280–320 g divided into 6 series of 12 rats each. Lysosome slurries were isolated from the liver of intact animals with a subsequent *in vitro* incubation in a sucrose solution, in the presence of L-arginine, as well as in the presence of L-arginine accompanied by the stimulation of oxidative stress. Samples of control groups were exposed *in vitro* with the addition of isolate and oxidant, respectively. Each batch was reproduced three times, incubation was performed at 37 °C in a water bath for 1, 2 and 4 hours. The activity of cathepsins B, L and H was studied using spectrofluorimetric method in two fractions – intra- and extralysosomal. Acid phosphatase activity was used as the main marker of membrane labialization.

Results. One hour Incubation with 5 mM arginine *in vitro* led to inhibition of the cathepsin H activity and lysosomal membrane damage, however, further increase in incubation time led to its stabilization. *In vitro* exposure to 5 mM H₂O₂ caused an increase in activity of cathepsins B and L and the drop in the cathepsin H activity without obvious changes in the distribution of enzymes between extra and intralysosomal fractions. In a state of oxidative stress 2-hour *in vitro* incubation with 5 mM arginine reduced the permeability of lysosomal membranes for cathepsins B, H and L; while 4-hour incubation led to the destabilization of lysosomal membranes.

Conclusion. The direct effect of arginine at a concentration of 5 mM within the 1,2 and 4-hour time intervals leads to a distinct change as a lysosomal cysteine protease activity and stability of lysosomal membranes.

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

В настоящее время отмечают прогресс в изучении роли лизосомальных ферментов при физиологических и патологических состояниях клетки. Существует предположение, что высвобождение катепсинов из лизосом служит пусковым механизмом в опосредованной лизосомами клеточной гибели. Одним из факторов пермеабилзации может оказаться окислительный стресс [4].

Кроме того, доказана роль катепсинов В и L, а также Н, S, X, К в развитии и прогрессировании злокачественных новообразований. Активность катепсинов повышается при многих типах опухолей человека, таких как рак лёгких, мозга, молочной железы, желудочно-кишечного тракта и предстательной железы. Экспрессия катепсинов В и L связана с ухудшением прогноза для пациентов с различными злокачественными образованиями. Цистеиновые протеазы принимают участие в гиперпролиферации опухолевых клеток, опухоли-индуцированном ангиогенезе, инвазии и метастазировании, являясь потенциальными мишенями для лечения рака [2].

Один из наиболее важных факторов регуляции активности лизосомальных цистеиновых протеиназ – специфические эндогенные белковые ингибиторы, которые относятся к суперсемейству цистатина [3]. Применение ингибиторов катепсинов или повышающая регуляция эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ во многих случаях способствует стабилизации лизосом [4]. В связи с этим актуален поиск соединений, изменяющих активность катепсинов и пермеабиллизацию лизосомальной мембраны.

В частности, обнаружено, что ряд аргинин-содержащих пептидов способен ингибировать активность катепсинов. Так, олигоаргинины являются специфическими

ингибиторами катепсина С [9]. Хлорметильные кетоны, синтезированные из аргинина и его производных, инактивируют катепсин В селезёнки быка [10]. Трипептид фенилаланиларгиниларгинин способен угнетать лизосомальный протеолиз в сердце крысы [12]. Кроме того показано, что аргинин угнетает протеасомную активность [8]. Благодаря высокой полярности боковой цепи, аргинин оказывает токсическое действие на мембрану бактерий. Известна роль аргинина в замедлении развития опухолей [5]. Одним из возможных механизмов указанных явлений может оказаться влияние аргинина на состояние мембран и активность лизосомальных цистеиновых протеиназ.

Таким образом, целью исследования стало изучение прямого влияния аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ *in vitro* как изолированно, так и при стимуляции оксидативного стресса.

Выделение лизосом. В исследование включены 72 конвенциональные половозрелые интактные самки крыс линии Wistar с массой тела 280–320 г. За 12 ч до забоя животных лишали пищи для стандартизации условий опытов. Эвтаназию животных осуществляли методом обескровливания под эфирным рауш-наркозом при сохранённых дыхании и сердцебиении.

Печень извлекали немедленно после обескровливания, помещая орган в охлаждённый 0,25 М раствор сахарозы (среда выделения). Печень промывали от остатков крови средой выделения, после чего готовили точные навески фрагментов печени в пределах 740–760 мг на электронных весах (АН-220 СЕ, Япония). Полученный материал измельчали, добавляя холодный 0,25 М раствор сахарозы в соотношении 1:9, и гомогенизировали в течение 35 с тefлоновым пестиком при 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 ЕЛМ1, Латвия) для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость отбирали пипеткой в отдельные гильзы и центрифугировали 15 мин при 13 000 об./мин для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант — дополнительно при 15 500 об./мин в течение 30 мин (центрифуга рефрижераторная К 24Д, ГДР). Осадок, представляющий собой грубую фракцию лизосом, ресуспендировали в 0,25 М растворе сахарозы и использовали для *in vitro* исследования.

Инкубация. Полученные суспензии лизосом печени в 0,25 М сахарозе разделяли на 12 серий по 6 проб в каждой:

– серия 1 — суспензия лизосом в 0,25 М растворе сахарозы (серия сравнения);

– серия 2 — суспензия лизосом в 0,25 М растворе сахарозы с добавлением аргинина в конечной концентрации 5 мМ;

– серия 3 — суспензия лизосом в 0,25 М растворе сахарозы с добавлением водорода пероксида (перекиси водорода) в конечной концентрации 5 мМ;

– серия 4 — суспензия лизосом в 0,25 М растворе сахарозы с добавлением водорода пероксида (перекиси водорода) в конечной концентрации 5 мМ и аргинина в конечной концентрации 5 мМ.

Каждую серию воспроизводили трижды. Инкубацию осуществляли при 37 °С на водяной бане в течение 1, 2 и 4 ч.

После инкубации лизосомы повторно осаждали центрифугированием при 15 500 об./мин в течение 30 мин. Затем отбирали надосадочную жидкость (неседиментируемую фракцию), а осадок (седиментируемую фракцию) ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением тритона X-100 в конечной концентрации 0,1%. Полученные аликваты замораживали и хранили до момента исследования при температуре -20 °С не более 1 мес.

Определение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ. Активность катепсинов В, L и Н изучали спектрофлуориметрическим методом (System 3 Scanning Spectrofluorometr, Optical technology devices, «Inc. Elmstord», New York, 10523) по Barrett и Kirschke [6]. Принцип метода — количественное определение 7-амидо-4-метилкумарина, высвобождающегося в результате ферментативного гидролиза пептидной связи: N α -CBZ-

Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина В, N α -CBZ-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина L, Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина Н («Sigma», США). Преимущества данного метода связаны с высокой чувствительностью и специфичностью используемых субстратов. Количество свободного 7-амидо-4-метилкумарина измеряли на спектрофлуориметре при λ_{ex} и λ_{em} соответственно 360 и 440 нм против контроля.

В качестве стандартного раствора использовали 7-амидо-4-метилкумарин («Sigma», США), растворённый в диметилсульфоксиде («Вектон», Санкт-Петербург). Удельную активность катепсинов выражали в нмоль амидо-метилкумарина/с-г белка. Содержание белка определяли по методу Лоури коммерческим набором НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург). Описанное определение активности ферментов осуществляли отдельно для седиментируемой и неседиментируемой фракций и обозначали для каждого катепсина как седиментируемую и неседиментируемую активность соответственно.

Оценка стабильности лизосомальной мембраны. Для оценки стабильности лизосомальной мембраны традиционно используют коэффициент лабильности (Клаб), рассчитываемый как соотношение активности лизосомального фермента во внелизосомальной (неседиментируемой) фракции к общей активности, представляющей собой сумму неседиментируемой и седиментируемой активности для данного фермента [4].

Поскольку для лизосомальных цистеиновых протеиназ описан механизм секреции [7], в качестве основного маркера лабильности мембран использовали активность кислой фосфатазы [11]. Её определяли унифицированным методом по «конечной точке», используя коммерческий набор «Витал Диагностикс СПб» (Санкт-Петербург).

Для каждой выборки определяли значение медианы и верхнего и нижнего квартилей. Результаты представляли в формате Me [Q₁; Q₃]. Для проверки статистической значимости различий значений в контрольной и опытной группах использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Оказалось, что прямое воздействие аргинина в конечной концентрации 5 мМ в течение исследуемых промежутков времени приводит к отчётливым изменениям как активности лизосомальных цистеиновых

Влияние 5 мМ аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ (нмоль/с·г) белка и состоянии лизосомальной мембраны, Me [min; max]

Показатель	1 ч		2 ч		4 ч		
	Сахароза, n=6	Аргинин, n=6	Сахароза, n=6	Аргинин, n=6	Сахароза, n=6	Аргинин, n=6	
Катепсин В	НСА	0,26 [0,00; 0,28]	0,25 [0,17; 0,34]	0,12 [0; 0,50]	0,06 [0; 0,13]	0,063 [0,06; 0,07]	0,15* [0,13; 0,28]
	СА	0,18 [0,00; 0,21]	0,42 [0,10; 0,44]	0,15 [0,01; 0,28]	1,62 [0,25; 2,32]	0,52 [0,47; 0,80]	0,65 [0,00; 0,90]
	ОА	0,28 [0,21; 0,47]	0,59 [0,38; 0,74]	0,44 [0,26; 0,91]	1,67 [0,40; 2,32]	0,7 [0,57; 0,90]	0,78 [0,15; 1,18]
	Клаб, %	37,26 [0,00; 100,00]	38,08 [27,86; 86,24]	64,09 [13,74; 78,81]	3,11 [0,15; 76,40]	10,83 [6,69; 13,25]	23,62* [21,27; 100,00]
Катепсин L	НСА	0,83 [0,71; 1,44]	0,21* [0,19; 0,51]	0,1 [0,08; 0,5]	0,15 [0,13; 0,53]	0,41 [0,29; 0,54]	0,00* [0,00; 0,14]
	СА	1,35 [1,30; 2,93]	4,62* [4,40; 5,76]	0,15 [0,07; 0,73]	1,86* [1,31; 2,15]	2,2 [1,83; 2,58]	1,97 [1,04; 2,76]
	ОА	2,82 [2,13; 3,67]	4,81* [4,61; 5,80]	0,74 [0,40; 0,96]	1,95* [1,86; 2,29]	2,61 [2,33; 2,68]	2,19 [1,10; 2,81]
	Клаб, %	33,34 [32,98; 39,09]	4,63* [3,92; 10,10]	42,85 [14,65; 82,17]	14,11 [6,32; 34,2]	16,85 [11,60; 20,56]	0,00* [0,00; 0,00]
Катепсин Н	НСА	0,68 [0,52; 0,72]	0,42* [0,33; 0,53]	1,53 [1,34; 1,65]	0,37* [0,29; 0,46]	0,83 [0,71; 0,88]	0,41* [0,33; 0,43]
	СА	1,31 [1,19; 1,82]	0,78* [0,64; 1,01]	0,95 [0,92; 0,99]	0,18* [0,00; 0,35]	1,01 [0,76; 1,13]	0,52* [0,47; 0,78]
	ОА	2,26 [1,89; 2,33]	1,29* [1,13; 1,39]	2,46 [2,33; 2,54]	0,59* [0,48; 0,73]	1,74 [1,52; 1,91]	0,93* [0,78; 1,21]
	Клаб, %	37,35 [22,20; 37,38]	34,96 [27,19; 42,45]	59,07 [55,16; 62,58]	76,42 [50,22; 100,00]	50,56 [38,27; 54,43]	39,64 [35,57; 43,90]
Кислая фосфатаза	НСА	55,83 [52,20; 84,99]	108,47* [98,87; 109,38]	57,9 [55,88; 64,96]	55,56 [42,21; 71,19]	75,25 [70,54; 79,17]	92,77* [85,46; 98,04]
	СА	229,54 [196,22; 269,43]	152,61* [142,04; 187,56]	152,91 [150,61; 160,36]	226,50* [216,11; 288,25]	189,61 [159,65; 217,97]	365,56* [325,98; 370,06]
	ОА	314,53 [313,05; 321,63]	258,80* [229,48; 300,02]	216,51 [206,91; 224,11]	297,40* [266,22; 343,52]	270,38 [225,22; 291,28]	456,16* [412,81; 474,31]
	Клаб, %	23,54 [16,23; 27,02]	38,01* [35,32; 43,25]	27,12 [26,35; 28,80]	20,07* [13,95; 25,41]	27,62 [24,13; 30,22]	20,87* [19,73; 21,78]

Примечание: *статистически значимые отличия от группы контроля ($p \leq 0,05$); НСА – неседиментируемая активность; СА – седиментируемая активность; ОА – общая активность; Клаб – коэффициент лабильности лизосомальной мембраны.

протеиназ, так и стабильности лизосомальной мембраны (табл. 1).

Так, введение аргинина в среду инкубации приводило к статистически значимому снижению общей активности катепсина Н относительно серии сравнения. Данная тенденция наблюдалась на фоне всех изучаемых интервалов инкубации. Однако наиболее выраженные различия зарегистрированы после 2 ч инкубации – общая активность катепсина Н снизилась на 76,0% ($p=0,01$). Это даёт основание предположить, что аргинин в концентрации 5 мМ оказывает ингибирующее воздействие на указанный фермент.

При этом в отношении катепсина L

наблюдалась обратная картина: при инкубации *in vitro* в среде 5 мМ аргинина росла общая активность фермента после 1 ч (на 70,8%, $p=0,02$) и 2 ч (на 161,6%, $p=0,03$) инкубации. Однако дальнейшее увеличение времени инкубации не привело к статистически значимым изменениям данного показателя. Для катепсина В статистически значимых изменений общей активности обнаружено не было.

При оценке показателей проницаемости лизосомальной мембраны выявлено статистически значимое снижение неседиментируемой активности и Клаб для катепсина L по мере увеличения времени инкубации. Отсутствие статистически значимых отли-

Влияние оксидативного стресса на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ (нмоль/с-г белка) и состояние лизосомальной мембраны, Me [min; max]

Показатель		1 ч		2 ч		4 ч	
		Сахароза, n=6	Сахароза/перекись водорода, n=6	Сахароза, n=6	Сахароза/перекись водорода, n=6	Сахароза, n=6	Сахароза/перекись водорода, n=6
Катепсин В	НСА	0,26 [0,00; 0,28]	0,18 [0,03; 0,32]	0,12 [0,00; 0,50]	0,76* [0,32; 0,84]	0,06 [0,06; 0,07]	0,05 [0,04; 0,20]
	СА	0,18 [0,00; 0,21]	0,35 [0,02; 0,80]	0,15 [0,01; 0,28]	0,58* [0,45; 0,79]	0,52 [0,47; 0,80]	0,93* [0,90; 0,93]
	ОА	0,28 [0,21; 0,47]	0,64 [0,10; 0,97]	0,44 [0,26; 0,91]	1,45* [0,94; 1,68]	0,7 [0,57; 0,90]	0,98 [0,93; 1,31]
	Клаб, %	37,26 [0,00; 100]	28,34 [23,45; 43,31]	64,09 [13,74; 78,81]	45,35 [35,94; 62,28]	10,83 [6,69; 13,25]	4,78 [4,64; 12,78]
Катепсин L	НСА	0,83 [0,71; 1,44]	0,97 [0,60; 1,34]	0,09 [0,08; 0,50]	1,57* [0,76; 2,01]	0,41 [0,29; 0,54]	0,82* [0,68; 0,91]
	СА	1,35 [1,30; 2,93]	2,09 [1,32; 2,28]	0,15 [0,07; 0,73]	1,71* [1,15; 1,94]	2,2 [1,83; 2,58]	2,78 [2,76; 3,30]
	ОА	2,82 [2,13; 3,67]	2,77 [2,58; 3,26]	0,74 [0,40; 0,96]	2,84* [2,13; 4,04]	2,61 [2,33; 2,68]	3,97 [3,68; 4,12]
	Клаб, %	33,34 [32,98; 39,09]	31,54 [19,05; 50,07]	42,85 [14,65; 82,17]	48,07 [37,11; 54,74]	16,85 [11,6; 20,56]	24,58* [19,91; 29,84]
Катепсин Н	НСА	0,68 [0,52; 0,72]	0,78 [0,67; 0,90]	1,53 [1,34; 1,65]	0,56* [0,36; 0,79]	0,83 [0,71; 0,88]	0,56 [0,48; 0,69]
	СА	1,31 [1,19; 1,82]	1,25 [1,14; 1,33]	0,95 [0,92; 0,99]	0,91 [0,78; 1,15]	1,01 [0,76; 1,13]	0,51* [0,50; 0,58]
	ОА	2,26 [1,89; 2,33]	1,96 [1,80; 2,13]	2,46 [2,33; 2,54]	1,42* [1,11; 1,70]	1,74 [1,52; 1,91]	1,19* [0,94; 1,27]
	Клаб, %	37,35 [22,20; 37,38]	36,6 [34,10; 40,90]	59,07 [55,16; 62,58]	33,68* [29,07; 39,15]	50,56 [38,27; 54,43]	54,64 [46,02; 57,97]
Кислая фосфатаза	НСА	55,83 [52,20; 84,99]	72,65 [62,28; 75,44]	57,9 [55,88; 64,96]	36,71* [29,97; 40,66]	75,25 [70,54; 79,17]	79,41 [75,13; 92,74]
	СА	229,54 [196,22; 269,43]	260,5 [239,62; 278,30]	152,91 [150,61; 160,36]	163,72 [156,43; 163,78]	189,61 [159,65; 217,97]	258,65* [258,25; 263,29]
	ОА	314,53 [313,05; 321,63]	336,67 [301,37; 341,13]	216,51 [206,91; 224,11]	194,80 * [182,94; 206,50]	270,38 [225,22; 291,28]	342,70 * [328,62; 350,99]
	Клаб, %	23,54 [16,23; 27,02]	19,67 [18,66; 23,88]	27,12 [26,35; 28,80]	17,42* [15,47; 20,91]	27,62 [24,13; 30,22]	23,54 [23,17; 25,35]

Примечание: *статистически значимые отличия от группы контроля (p < 0,05); НСА – неседиментируемая активность; СА – седиментируемая активность; ОА – общая активность; Клаб – коэффициент лабильности лизосомальной мембраны.

чий описываемых показателей при 2-часовой инкубации может быть связано с выраженным снижением неседиментируемой активности и Клаб в группе сравнения. Для катепсина Н статистически значимых изменений изучаемых показателей выявлено не было. В отношении катепсина В наблюдалось статистически значимое увеличение неседиментируемой активности на 130,2% (p=0,02) и Клаб на 118,1% (p=0,02) только после 4-часовой инкубации в среде 5 мМ аргинина.

Поскольку доля внелизосомальной активности (неседиментируемой) и Клаб лизосомальной мембраны для каждого из катепсинов могут изменяться по двум при-

чинам (изменение общей проницаемости лизосомальной мембраны и изменение степени секреции индивидуального фермента) [1], для оценки стабильности лизосомальной мембраны был проанализирован Клаб по маркерному ферменту лизосом – кислой фосфатазе. Было обнаружено, что после 1 ч инкубации в среде 5 мМ аргинина происходит повреждение лизосомальной мембраны, однако дальнейшее увеличение времени инкубации приводит к её стабилизации.

При моделировании оксидативного стресса (табл. 2) путём введения в среду инкубации 5 мМ водорода пероксида (перекиси водорода) в течение 1 ч не выявлено

Влияние 5 мМ аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ (нмоль/с-г белка) и состояние лизосомальной мембраны на фоне оксидативного стресса, Me [min; max]

Показатель		1 ч		2 ч		4 ч	
		Сахароза/ перекись водо- рода, n=6	Аргинин/ перекись водо- рода, n=6	Сахароза/ перекись водо- рода, n=6	Аргинин/ перекись водо- рода, n=6	Сахароза/ перекись водо- рода, n=6	Аргинин/ перекись водо- рода, n=6
Катепсин В	НСА	0,18 [0,03; 0,32]	0,24 [0,22; 0,27]	0,76 [0,37; 0,84]	0,18* [0,17; 0,19]	0,05 [0,04; 0,20]	0,26 [0,22; 0,30]
	СА	0,35 [0,80; 0,02]	0,9 [0,19; 1,10]	0,58 [0,45; 0,79]	1,07 [0,52; 1,85]	0,93 [0,90; 0,93]	0,43 [0,09; 0,79]
	ОА	0,64 [0,10; 0,97]	1,14 [0,42; 1,58]	1,45 [0,94; 1,68]	1,26 [0,71; 2,30]	0,98 [0,93; 1,31]	0,67 [0,35; 1,06]
	Клаб, %	28,34 [23,45; 43,31]	30,55 [17,92; 84,75]	45,35 [35,94; 62,28]	19,49* [15,25; 26,07]	4,78 [4,64; 12,78]	34,20* [22,79; 85,48]
Катепсин L	НСА	0,97 [0,60; 1,34]	0,16* [0,14; 0,37]	1,57 [0,76; 2,01]	0,10* [0,04; 0,29]	0,82 [0,68; 0,91]	0,19* [0,16; 0,37]
	СА	2,09 [1,32; 2,28]	2,55 [2,45; 2,80]	1,71 [1,15; 1,94]	1,84 [1,45; 2,23]	2,78 [2,76; 3,30]	1,24* [0,13; 2,33]
	ОА	2,77 [2,58; 3,26]	2,91 [2,59; 2,92]	2,84 [2,13; 4,04]	2,13 [1,45; 2,81]	3,97 [3,68; 4,12]	1,83* [0,54; 2,70]
	Клаб, %	31,54 [19,05; 50,07]	6,64* [5,51; 8,47]	48,07 [37,11; 54,74]	8,79* [1,00; 13,70]	24,58 [19,91; 29,84]	40,16 [9,87; 91,39]
Катепсин Н	НСА	0,78 [0,67; 0,90]	0,37* [0,35; 0,40]*	0,56 [0,36; 0,79]	0,35 [0,30; 0,35]	0,56 [0,48; 0,69]	0,32* [0,25; 0,37]
	СА	1,25 [1,14; 1,33]	0,69 [0,59; 1,01]	0,91 [0,78; 1,15]	1,91 [1,51; 2,27]	0,51 [0,50; 0,58]	0 [0,00; 0,43]
	ОА	1,96 [1,80; 2,13]	1,13* [1,04; 1,34]	1,42 [1,11; 1,70]	2,53 [1,81; 2,54]	1,19 [0,94; 1,27]	0,36* [0,30; 0,70]
	Клаб, %	36,6 [34,10; 40,90]	34,67 [25,20; 41,26]	33,68 [29,07; 39,15]	16,79* [10,06; 24,62]	54,64 [46,02; 57,97]	100 [53,23; 100,00]
Кислая фосфатаза	НСА	72,65 [62,28; 75,44]	90,20* [88,72; 101,66]	36,71 [29,97; 40,66]	71,78* [53,48; 97,78]	79,41 [75,13; 92,74]	63,55* [62,75; 65,34]
	СА	260,5 [239,62; 278,30]	156,52* [151,45; 159,95]	163,72 [156,43; 163,78]	296,30* [291,80; 320,00]	258,65 [258,25; 263,29]	102,76* [95,21; 124,77]
	ОА	336,67 [301,37; 341,13]	243,90* [234,56; 269,13]	194,8 [182,94; 206,50]	365,19* [345,28; 404,64]	342,70 [328,62; 350,99]	169,43* [159,96; 188,17]
	Клаб, %	19,67 [18,66; 23,88]	36,85* [34,23; 40,59]	17,42 [15,47; 20,91]	15,49 [12,98; 26,78]	23,54 [23,17; 25,35]	39,36* [33,84; 40,48]

Примечание: *статистически значимые отличия от группы контроля (p ≤ 0,05); НСА – неседиментируемая активность; СА – седиментируемая активность; ОА – общая активность; Клаб – коэффициент лабильности лизосомальной мембраны.

статистически значимых изменений.

Увеличение времени инкубации до 2 ч привело к увеличению общей активности на 229,0% (p=0,04) и 282,1% (p=0,01), а также активности в неседиментируемой фракции на 529,2% (p=0,03) и 1564,9% (p=0,02), в седиментируемой фракции на 286,7% (p=0,01) и 1070,5% (p=0,02) катепсинов В и L соответственно, что может быть связано с повышением степени секреции данных ферментов.

В отношении катепсина Н наблюдалась обратная картина: 2-часовая инкубация в среде 5 мМ водорода пероксида (перекиси водорода) вызвала снижение общей активности фермента на 42% (p=0,03) и активнос-

ти в неседиментируемой фракции на 63,1% (p=0,01) с одновременным снижением Клаб на 43% (p=0,02). Возможным механизмом данного явления может оказаться окислительная модификация белков лизосомальной мембраны с уменьшением её проницаемости для изучаемых ферментов.

Также было обнаружено, что 5 мМ аргинин способен изменять эффекты 5 мМ водорода пероксида (табл. 3). Так, при 2-часовой инкубации аргинин вызывал снижение активности катепсинов В и L в неседиментируемой фракции на 75,6% (p=0,01) и 237,7% (p=0,02) соответственно, а также снижался Клаб лизосомальной мембраны у всех иссле-

дуемых ферментов.

Можно предположить, что при 2-часовой инкубации на фоне оксидативного стресса аргинин способен понижать проницаемость лизосомальной мембраны для катепсинов В, L и Н. Однако при 4-часовой инкубации наблюдалась тенденция к снижению активности изучаемых ферментов и повышению лабильности лизосомальной мембраны.

ВЫВОДЫ

1. Аргинин в концентрации 5 мМ при инкубации *in vitro* подавляет активность катепсина Н и приводит к повреждению лизосомальной мембраны при 1-часовой инкубации, однако дальнейшее увеличение времени инкубации приводит к её стабилизации.

2. Воздействие *in vitro* 5 мМ H_2O_2 вызывает рост активности катепсинов В и L и падение активности катепсина Н без выраженных изменений распределения ферментов между вне- и интрализосомальной фракциями.

3. На фоне оксидативного стресса 5 мМ аргинин при 2-часовой инкубации *in vitro* снижает проницаемость лизосомальной мембраны для катепсинов В, Н и L, при 4-часовой инкубации приводит к дестабилизации лизосомальной мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арапова А.И., Фомина М.А. Эффекты L-аргинина на состояние лизосомального цистеинового протеолиза сердечной и скелетной мышц // *Фундаментал. исслед.* — 2014. — №10. — С. 1269–1273. [Arapova A.I., Fomina M.A. Effects of L-arginine on the lysosomal proteolysis of myocardium and skeletal muscle. *Fundamentalnie issledovaniya*. 2014; 10: 1269–1273. (In Russ.)]

2. Васильева О.С. Комплексное участие цистеиновых катепсинов в раковой прогрессии [Электронный ресурс] // *Электрон. научн. ж. «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ»* 677. — <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2009/055.pdf> (дата обращения: 07.12.2014). [Vasil'eva O.S. Complex role of cysteine cathepsins in cancer progression]. *Elektronniy nauchniy zhurnal «ISSEDOVANO V ROSSII»* 677. — <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2009/055.pdf> (access date: 07.12.2014). (In Russ.)]

3. Дилакян Э.А., Цветкова И.В. Лизосомные цистеиновые протеиназы при неопластической трансформации // *Биомед. хим.* — 2005. — Т. 51, вып. 5. — С. 485–500. [Dilakyan E.A., Tsvetkova I.V. Lysosome cysteine proteases in neoplastic transformation. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2005; 51 (5): 485–500. (In Russ.)]

4. Пупышев А.Б. Пермеабиллизация лизосомных мембран как апоптогенный фактор // *Цитология.* — 2011. — Т. 53, №4. — С. 313–324. [Pupyshv A.B. Permeabilisation of lysosome membranes as proapoptotic factor. *Tsitologiya*. 2011; 53 (4): 313–324. (In Russ.)]

5. Степанов Ю.М., Кононов И.Н., Журбина А.И., Филиппова А.Ю. Аргинин в медицинской практике (обзор литературы) // *Ж. АМН Украины.* — 2004. — Т. 10, №1. — С. 340–352. [Stepanov Yu.M., Kononov I.N., Zhurbina A.I., Filippova A.Yu. Arginine in medical practice (literature review). *Zhurnal AMN Ukraini*. 2004; 10 (1): 340–352. (In Russ.)]

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

7. 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.

8. Hamel F.G., Upward J.L., Siford G.L. et al. Inhibition of proteasome activity by selected amino acids // *Metabolism.* — 2003. — Vol. 52, N 7. — P. 810–814.

9. Horn M., Pavlik M., Doleckova L. et al. Arginine-based structures are specific inhibitors of cathepsin C. Application of peptide combinatorial libraries // *Eur. J. Biochem.* — 2000. — Vol. 267, N 11. — P. 3330–3336.

10. Shaw E., Kettner C. The specificity of cathepsin B // *Acta Biol. Med. Ger.* — 1981. — Vol. 40, N 10–11. — P. 1503–1511.

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

12. Zhang L., Lockwood T.D. Phenylalaninylargininylarginine: a novel tripeptide exerting Zn(2+)-dependent, insulinimetic inhibitory action on myocardial proteolysis // *Biochem J.* — 1993. — Vol. 293, pt. 3. — P. 801–805.