

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

АРАПОВА Анастасия Ивановна

ЛИЗОСОМАЛЬНЫЙ ЦИСТЕИНОВЫЙ ПРОТЕОЛИЗ МЫШЕЧНЫХ
ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук,
доцент
Фомина Мария Алексеевна

Рязань – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Лизосомальный цистеиновый протеолиз: ретроспектива открытий.....	14
1.2. Варианты изменения белков при влиянии на синтез оксида азота.....	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Экспериментальные модели <i>in vivo</i> и схемы введения препаратов.....	42
2.2. Метод получения биологического материала.....	45
2.3. Методы исследования.....	46
2.3.1. Метод определения концентрации метаболитов оксида азота.....	46
2.3.2. Метод оценки состояния окислительной модификации белков в тканях.....	47
2.3.3. Метод определения содержания белка.....	51
2.3.4. Метод определения активности кислой фосфатазы.....	51
2.3.5. Метод определения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ.....	52
2.3.6. Метод определения коэффициента аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ.....	54
2.3.7. Метод оценки степени проницаемости лизосомальных мембран.....	54
2.4. Статистическая обработка данных.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.1. Оценка концентрации метаболитов оксида азота.....	56
3.2. Оценка состояния окислительной модификации белков в представленных экспериментальных группах.....	59

3.2.1. Оценка содержания продуктов окислительной модификации белков в изучаемых тканях.....	60
3.2.2. Определение суммарного содержания карбонильных групп первичных и вторичных маркеров в белках исследуемых тканей	82
3.2.3. Соотношение доли первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса.....	91
3.2.4. Оценка резервно-адаптационного потенциала изучаемых тканей.....	96
3.3. Оценка состояния лизосомального цистеинового протеолиза.....	105
3.3.1. Активность и распределение катепсинов в исследуемых тканях.....	105
3.3.2. Оценка лабильности мембраны лизосом.....	121
3.3.3. Оценка степени аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ.....	133
3.4. Характеристика корреляционных связей.....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	140
ВЫВОДЫ.....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	149
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	170

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны

АДНФГ_{uv} – альдегиддинитрофенилгидразоны ультрафиолетового спектра поглощения

АДНФГ_{vs} – альдегиддинитрофенилгидразоны видимого спектра поглощения

АФК – активные формы кислорода

ГНЕ – 4-гидрокси-2-ноненаль

ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа

КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны

КДНФГ_{uv} – кетондинитрофенилгидразоны ультрафиолетового спектра

КДНФГ_{vs} – кетондинитрофенилгидразоны видимого спектра

ЛЦП – лизосомальные цистеиновые протеиназы

НСА – неседиментируемая, внелизосомальная, цитозольная активность

ОА – общая активность

ОМБ – окислительная модификация белков

СА – седиментируемая, лизосомальная активность

cNOS – конститутивная NO-синтаза

eNOS – эндотелиальная NO-синтаза

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

KB – катепсин В

KL – катепсин L

КН – катепсин Н

L-NAME - N^ω-нитро-L-аргининметилловый эфир

NOS – NO-синтаза

NO_x – оксиды азота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Протеолиз – широко распространённый в организме процесс гидролиза пептидных связей белковых молекул [68]. Внутриклеточный протеолиз протекает по большей части в специальных компартментах клетки – лизосомах, отличающихся высоким содержанием гидролитических ферментов, в том числе и протеиназ, для обозначения которых используется термин «катепсины» [81, 158, 176]. Данные последних лет показали высокую чувствительность этих органелл к большому количеству дестабилизирующих факторов.

Более пристальное исследование лизосомальных цистеиновых протеиназ в последние десятилетия доказало участие их в значимых механизмах, реализующихся и за пределами лизосом; в том числе описана способность катепсинов разрушать внеклеточный матрикс и инициировать программируемую клеточную гибель [60, 125, 127]. В настоящее время детально описан процесс пермеабилзации мембраны лизосом, в результате которого происходит высвобождение катепсинов в цитозоль при сохраненной структуре мембраны [174]. Помимо участия в общем кругообороте клеточных белков, отдельные тканевые протеазы имеют также более специфические функции, например, участвуют в презентации антигенов, прогрессии клеточного цикла, эпидермальном гомеостазе [68, 176]. При этом основной функцией тканевых протеиназ остаётся обновление белков за счет устранения поврежденных или неправильно синтезированных молекул [68].

Важнейшим механизмом повреждения белковых молекул является их окислительная модификация при свободно-радикальной патологии, существенный вклад в развитие которой вносит изменение синтеза оксида азота [142, 168]. При этом накопление окисленных белков, например, в

процессе «клеточного старения» [83, 90, 149], может ухудшать работу лизосомальных ферментов, что в свою очередь приводит к окислительному стрессу и запуску механизмов антиоксидантной защиты [108, 153, 163]. Следует отметить, что оценка степени окислительной модификации белков в настоящее время признаётся одним из наиболее надежных методов диагностики свободно-радикального повреждения [15, 28, 46].

Поскольку оценка окислительной модификации белков осуществляется весьма доступным и простым методом, в настоящее время существует достаточно много исследовательских работ, посвященных данной тематике при различных состояниях организма. Однако следует отметить, что отсутствие стандартизованного подхода к трактовке полученных результатов и ограниченное применение тех или иных составляющих метода приводит к затруднению анализа данных литературы. Использование запатентованного метода [57], максимально охватывающего составляющие ОМБ, позволяет изучить процесс окислительного повреждения с разных сторон, включая не только общую оценку изменения окислительной модификации, но и качественное и количественное изменение маркеров окислительной деструкции, а также степень изменения резервно-адаптационного потенциала.

Многофакторная регуляция лизосомных протеиназ и взаимосвязь окислительного [162], нитрозативного [146, 149] и карбонильного стрессов [22, 147] ставит перед исследователем задачу комплексной оценки степени подобной взаимосвязи.

На основании вышеизложенного актуальным представляется исследование лизосомального цистеинового протеолиза на фоне изменений окислительной деструкции протеинов мышечных тканей под влиянием модуляторов синтеза оксида азота.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является изучить влияние изменений синтеза оксида азота на состояние лизосомального цистеинового протеолиза и окислительной модификации белков в ткани грудной аорты, сердечной и скелетной мускулатуре в эксперименте.

Задачи исследования

1. Оценить процессы карбонилирования белков стенки грудной аорты, сердечной и скелетной мускулатуры крыс в условиях экспериментального изменения синтеза оксида азота (II).
2. Описать изменения активности катепсинов В, L и Н и их аутокаталитического процессинга под влиянием модуляторов синтеза оксида азота.
3. Оценить изменение проницаемости лизосомальных мембран в изучаемых экспериментальных моделях.
4. Выявить наличие корреляционных связей между процессами окислительной модификации и лизосомального цистеинового протеолиза.

Научная новизна

Впервые показано, что применение модуляторов синтеза оксида азота приводит к уменьшению содержания продуктов окислительной модификации белков в ткани грудной аорты, миокарде и скелетной мышце, однако механизмы изменений, по-видимому, различны. Ингибитор синтеза оксида азота L-NAME в дозе 25 мг/кг и субстрат синтеза оксида азота L-аргинин в дозе 500 мг/кг на фоне снижения метаболитов оксида азота демонстрируют уменьшение доли первичных маркеров оксидативного стресса. Карнитина хлорид в дозе 300 мг/кг, напротив, провоцируя нарастание содержания метаболитов оксида азота, вызывает

увеличение показателя резервно-адаптационного потенциала изучаемых тканей.

Впервые установлено, что модуляторы синтеза оксида азота в мышечных тканях оказывают преимущественно стимулирующее воздействие на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ; исключением является снижение активности изучаемых ферментов в ткани грудной аорты и миокарда под влиянием L-NAME (25 мг/кг) и снижение активности катепсинов L и H в скелетной мышце под действием L-аргинина (500 мг/кг).

Впервые продемонстрировано, что подавление синтеза оксида азота субстратом и неселективным ингибитором NO-синтазы в изучаемых тканях приводит к дестабилизации лизосомальных мембран. Впервые показана способность карнитина проявлять мембраностабилизирующий эффект и существенно нивелировать изменения, вызванные L-аргинином в скелетной мускулатуре и L-NAME в участке грудной аорты и скелетной мускулатуре

Впервые установлено наличие корреляционных связей между степенью окислительной модификации белков и активностью лизосомальных ферментов на фоне изменений генерации оксида азота. Модели с введением ингибитора оксида азота – L-NAME в дозе 25 мг/кг характеризуются статистически значимыми высокими корреляционными связями между окислительной модификацией белков и общей и цитозольной активностью катепсина H – прямая связь в аорте; и цитозольной активностью протеиназы L – обратная корреляция в миокарде. Увеличение дозы L-NAME до 200 мг/кг отмечено статистически значимой высокой степенью прямой корреляционной связью между окислительной модификацией белков и общей и лизосомальной активностью катепсина H в миокарде. Группа животных с использованием карнитина хлорида продемонстрировала обратную высокую статистически

значимую корреляцию между неседиментируемой активностью катепсина Н; и прямую высокую корреляционную связь между цитозольной фракцией катепсина L в группе с сочетанным применением карнитина и аргинина в гомогенате аорты.

Теоретическая значимость

Работа носит преимущественно фундаментальный характер. Данные представленные в диссертации позволяют понять взаимосвязь процессов активации катепсинов и окислительной деструкции протеинов, под влиянием модуляторов синтеза оксида азота: L-аргинина, L-NAME и L-карнитина. Полученные результаты могут быть применены для выяснения возможностей степени влияния на окислительную модификацию белков посредством изменения активности лизосомальных протеаз.

Практическая значимость работы

Выявленные на фоне изменений синтеза оксида азота корреляционные связи между изменением окислительного повреждения белков и активностью катепсинов В, L, Н различных клеточных фракций позволяет говорить о регуляции количества окисленных модифицированных белков посредством изменения активности катепсинов в экспериментальных моделях, описанных в диссертации.

Таким образом, появляется возможность более глубокого понимания механизмов тканевой адаптации на фоне нитрозативного стресса и поиска потенциально перспективных методов коррекции указанной патологии.

Достоверность полученных результатов

Достоверность результатов работы, обоснованность выводов и практических рекомендаций подтверждается корректным использованием

теоретических и практических данных, основанных на достаточном числе наблюдений, использовании современных методик, наборов реагентов, приборов и оборудования, применении современных методов статистической обработки материалов исследования.

Методология и методы исследования

В данной работе используются основные общенаучные и специальные методы теоретического и экспериментального характера.

Основными экспериментальными моделями работы являются: моделирование стимуляции синтеза с применением субстрата синтеза оксида азота (L-аргинин); дефицита синтеза оксида азота посредством использования его ингибитора (L-NAME); и возможной коррекции полученных изменений посредством сочетанного применения модуляторов синтеза оксида азота и карнитина (объект исследования - крысы-самцы линии Wistar массой 280-320 граммов; материал исследования гомогенаты грудной аорты, миокарда и скелетная мускулатура бедра) и метод дифференциального центрифугирования.

Методами получения результатов являются:

1. определение концентрации метаболитов оксида азота;
2. определение содержания белка;
3. определение активности кислой фосфатазы;
4. определения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ;
5. определение коэффициента аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ;
6. оценка степени проницаемости лизосомальных мембран;
7. оценка состояния окислительной модификации белков в тканях.

Помимо этого использовались математические методы статистической обработки результатов с использованием рангового критерия Манна-Уитни (U-тест). Проверка равенства медиан нескольких выборок проведена с участием критерия Краскела-Уоллиса. Оценка ранговой корреляции производилась посредством коэффициента Спирмена.

Положения, выносимые на защиту

1. Ингибитор синтеза оксида азота L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает выраженное снижение содержания продуктов окислительной модификации в ткани грудной аорты, миокарде и скелетной мышце, за счет уменьшения первичных маркеров оксидативного стресса. Карнитина хлорид, провоцируя выраженное нарастание содержания метаболитов оксида азота в изучаемых тканях, также вызывает снижение степени карбонилирования белков в миокарде и скелетной мышце с нарастанием показателей в ткани грудной аорты; изменения сопровождаются увеличением резервно-адаптационного потенциала тканей.

2. Применение субстрата синтеза оксида азота L-аргинина в дозе 500 мг/кг приводит к нарастанию общей активности катепсинов В, L, Н в ткани грудной аорты за счет лизосомальной фракции и нарастанию общей активности катепсина В на фоне снижения активности катепсинов L, Н в скелетной мышце. L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает снижение активности изучаемых ферментов в ткани грудной аорты и миокарде при повышении показателей в скелетной мышце. Карнитина хлорид приводит к активации лизосомального цистеинового протеолиза в миокарде и скелетной мускулатуре.

3. Рост значения показателя аутокаталитического процессинга демонстрирует увеличение доли проферментных форм катепсинов,

косвенно указывая на стимуляцию их синтеза в тканях под влиянием L-NAME, 25 мг/кг.

4. Подавление синтеза оксида азота субстратом и неселективным ингибитором NO-синтазы приводит к дестабилизации лизосомальных мембран; при этом карнитин проявляет мембраностабилизирующий эффект и существенно нивелирует изменения, вызванные L-аргинином в скелетной мускулатуре и L-NAME в участке грудной аорты и скелетной мускулатуре.

5. Изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ под влиянием модуляторов синтеза оксида азота статистически значимо коррелируют со степенью изменения содержания продуктов окислительной модификации белков.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены на:

- научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития» (Уфа, 2014);
- научно-практической конференции «Информационные технологии в медицине и фармакологии» (Ростов н/Д., 2014 г.);
- VII-й Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2015 г.);
- Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2016 г.);
- научно-практической конференции «Актуальные проблемы и достижения в медицине» (Самара, 2016 г.);
- IX Международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования» (Витебск, 2016 г.);

- 81-й Всероссийской итоговой молодежной научной конференции с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2016г.).

Публикации

В процессе написания диссертации по полученным данным опубликовано 15 печатных работ, из них 6 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы и приложение. Список литературы содержит 181 источник, из них 78 российских и 103 зарубежных. Объем работы составляет 191 страниц машинописного текста, содержит 51 рисунка и 32 (18 в тексте и 14 в приложении) таблицы.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Лизосомальный цистеиновый протеолиз: ретроспектива открытий

Деградация белка или протеолиз – сложный контролируемый процесс, происходящий во всех компартментах клетки [68]. Исследование протеолиза и механизмов его регуляции играет большую роль в изучении жизненной основы биологических процессов при диагностике и лечении различных патологий на молекулярном уровне. Активация протеолиза является важнейшим биохимическим этапом фундаментального патологического процесса – воспаления. Запущенный механизм воспаления неизбежно приводит к изменению в очаге среды в кислую сторону, к дестабилизации мембран лизосом, выходу в цитоплазму лизосомальных ферментов, их активации и дальнейшей деструкции ткани в очаге воспаления [73].

Есть много триггеров пермеабиллизации лизосомальной мембраны: лизосомотропные агенты (молекулы, которые накапливаются в лизосомах и вызывают дестабилизацию лизосомальных мембран), лизосомальные активные формы кислорода, которые образуются в результате реакции H_2O_2 с лизосомальными молекулами железа во время окислительного стресса. Тем не менее, лизосомальные эффекторы смерти клетки четко определены: семейство лизосомальных протеаз, состоящих из аспарагинового катепсина D и цистеиновых катепсинов [94, 96, 117, 138, 170].

Лизосомальные цистеиновые протеазы (ЛЦП), известные как катепсины, были открыты в первой половине 20 века Willstätter и Vamann, относятся к семейству папаиноподобных протеолитических ферментов (группа SA, семья C1) [123, 163], локализующихся главным образом в эндосомах и лизосомах и относятся к белкам «домашнего хозяйства» [82].

Катепсины являются ферментами класса гидролаз, основной функцией которых является катализ гидролиза пептидной связи. Повсеместное содержание в тканях человека (главным образом в печени, почках и селезенке) обеспечивает доступность исследования протеиназ. Катепсины выделяются всеми типами клеток организма, а также способны секретироваться внеклеточно, где они были обнаружены в больших количествах при различных патологических заболеваниях [41]. Ранние исследовательские работы указывали на наличие лишь неспецифических функций в лизосомах у ЛЦП, эволюция технической базы позволила выявить доказательства специфических функций тканевых протеаз в механизме биохимических процессов [157]. В течение многих лет существовало ошибочное мнение, что протеазы локализованы исключительно в лизосомах, однако, к настоящему времени катепсины были найдены в других компартментах клетки, а также внеклеточно, включая ядро [79], цитозоль [98], митохондрии [113], внеклеточное пространство [99] и плазматическую мембрану [99, 158], где они выполняют важные функции.

Семь ЛЦП: катепсины В, С, F, H, L, O и X –экскретируются всеми типами клеток организма, тогда как остальные папаиноподобные цистеиновые протеазы J, K, S, V, и W - только специфическими типами клеток (таблица 1) [179]. Обычно термин “катепсины” относят к внутриклеточным лизосомным протеиназам, хотя есть исключение (катепсин С – цитозольный фермент) [24]. В настоящее время идентифицировано 12 катепсинов человека (таблица 1), для которых определены последовательности аминокислотных остатков и для части из них – кристаллическая структура [174, 175, 176].

В зависимости от хромосомной локализации, геномной организации, аминокислотных последовательностей и присутствия аминокислотного участка в области пропептида катепсины разделены на подгруппы (таблица 1).

Таблица 1 - Лизосомальные цистеиновые протеиназы человека: классификация и распространение [24]

Катепсин	Синонимы	Распространение
Катепсин-L-подобные		
L		Широкое распространение
V	L2, U	Эпителий тимуса, яичка, роговицы
K	O, O2	Остеокласты, эпителий бронхов
S		Антигенпредставляющие клетки
H	Катепсин I	Широкое распространение
Катепсин-B-подобные		
B	B1	Широкое распространение
Катепсин-F-подобные		
F		Макрофаги
W	Лимфопаин	Лимфоциты
Катепсины неклассифицированные		
C	Дипептидил-пептидаза I	Широкое распространение
O		Остеокласты
X	катепсин Z, катепсин P	Широкое распространение
Легумаин		Активированные макрофаги, почки, селезёнка

Строение катепсинов

По строению активного центра различают следующие ЛЦП (рисунок 1): самая крупная группа характеризуется содержанием в активном центре цистеина (тиоловые амидгидролазы). Представителями являются катепсины В и С (дипептидилпептидаза), Н, L, N и S, с молекулярной массой от 25-35 тысяч; часть из них - гликопротеины. Оптимальная каталитическая активность катепсинов В, С, Н и L при рН 4,0-6,0, катепсинов N и S при рН 3,5. Функцией этой группы, осуществляющей катализ наряду с гидролизом пептидов, является так же гидролиз амидов аминокислот. Катепсин С обладает выраженной транспептидазной активностью - катализирует перенос олигопептидов на пептиды или аминокислоты [24].

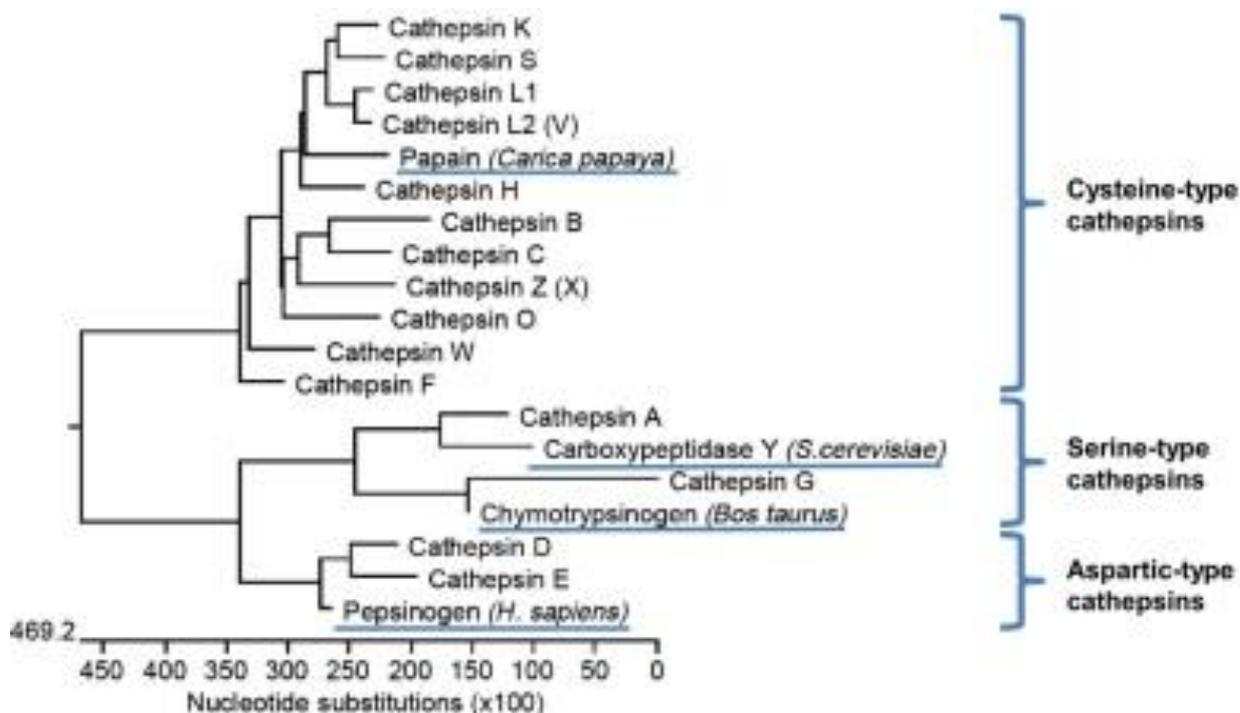


Рисунок 1. Филогенез и номенклатура катепсинов по [123]

Протеолитические ферменты, активность которых зависит от остатка цистеина, происходят как минимум из 8 различных эволюционных источников, каждый из которых формирует группу цистеиновых пептидаз с различной структурой и свойствами [48]. Различия между этими линиями очевидны не только в трехмерной, но даже в двумерной структуре

ферментов. Хотя активность большинства цистеиновых пептидаз зависит от каталитической диады Cys108 и His265, им присущи выраженные отличительные особенности, обусловленные происхождением от различных предковых пептидаз. Белки наиболее широко распространенного семейства папаина С1 (1652 последовательности, 132 белка) обнаруживаются от вирусов до высших эукариот [48].

Остаток серина в активном центре (так называемые сериновые амидгидролазы), содержат катепсин А (сериновая карбоксипептидаза А₁) и катепсин G. Кроме гидролиза пептидных связей данные ЛЦП влияют на гидролиз амидов и эфиров N-ациламинокислот, катализируя его. Оптимальная каталитическая активность катепсина А при рН 5,0-6,0, катепсина G - при рН 7,5. Ингибируются диизопропилфторфосфатом и алкилбромметилкетонами [24].

Активный центр представленный остатком аспарагиновой кислоты (так называемые карбоксильные амидгидролазы) характерен для катепсина D и катепсина E. Оптимум каталитической активности обоих ферментов находится в интервале рН 2,5-5,0. Ингибируются в присутствии Cu²⁺ диазосоединениями типа CH₃C(O)NHCHR(C(O)CHN₂) [24].

Широко известный исследователям катепсин F, в настоящее время выделен в отдельную группу [24], который катализирует расщепление протеогликанов хрящей. Он ингибируется некоторыми иммуноглобулинами, не чувствителен к действию диизопропилфторфосфата, пепстатина и реагентов, взаимодействующих с группой -SH [6, 92].

Очищенные катепсины обычно представлены дисульфидсоединенными тяжелыми и лёгкими цепями. Папаиноподобные ферменты имеют структуру, состоящую из двух доменов с удлинённым V-образным активным центром вдоль поверхностей стыка обоих доменов. Левый (L-) домен представлен тремя α-спиралями, а правый (R-) домен в основе своей имеет β-цилиндрическую структуру. Каталитический цистеин в положении 25 (нумерация папаина) расположен на N-конце главной α-спирали катепсина

и образует ионную пару с гистидином в положении 159, который расположен в β -цилиндре на противоположной стороне расщелины V-образного активного центра фермента. Каталитический механизм расщепления субстрата связанного с ферментом путём расположения вдоль расщелины активного центра катепсина сходен для всех цистеиновых протеаз. Активность лизосомальных цистеиновых протеаз регулируется несколькими путями, наиболее важными из которых являются активация профермента и ингибирование с помощью эндогенных белковых ингибиторов [180].

Различия в специфичности ферментов обусловлены локальными различиями в субстрат-связывающей области [24]. Субстрат-связывающие участки катепсинов установлены на основании исследования кинетики и кристаллических структур ингибиторов, имитирующих субстрат, связанных с активными центрами ферментов.

В настоящее время пересмотрено представление о субстрат-связывающих сайтах ЛЦП [140]. Согласно нумерации папаина, петли L-домена включают остатки Gln19-Cys25 и Arg59-Tyr67, петли R-домена содержат остатки Leu134-His159 и Asn175-Ser205 соответственно. В активном сайте расположены остатки Cys 25 His 159, а также дисульфид Cys22- Cys63 (рисунок 2). Субстрат-связывающие сайты расположены слева (S1, S3, S2') и справа (S2, S1').

Зрелые области ферментов катепсин-V-подобных и катепсин-L-подобных подгрупп достаточно схожи между собой, тогда как прообласти демонстрируют слабое сходство и значительно отличаются по длине. Прообласти катепсин-L-подобных протеиназ содержат приблизительно 100 остатков и значительно длиннее, чем пропептиды катепсин-V-подобных протеиназ (около 60 остатков) [134].

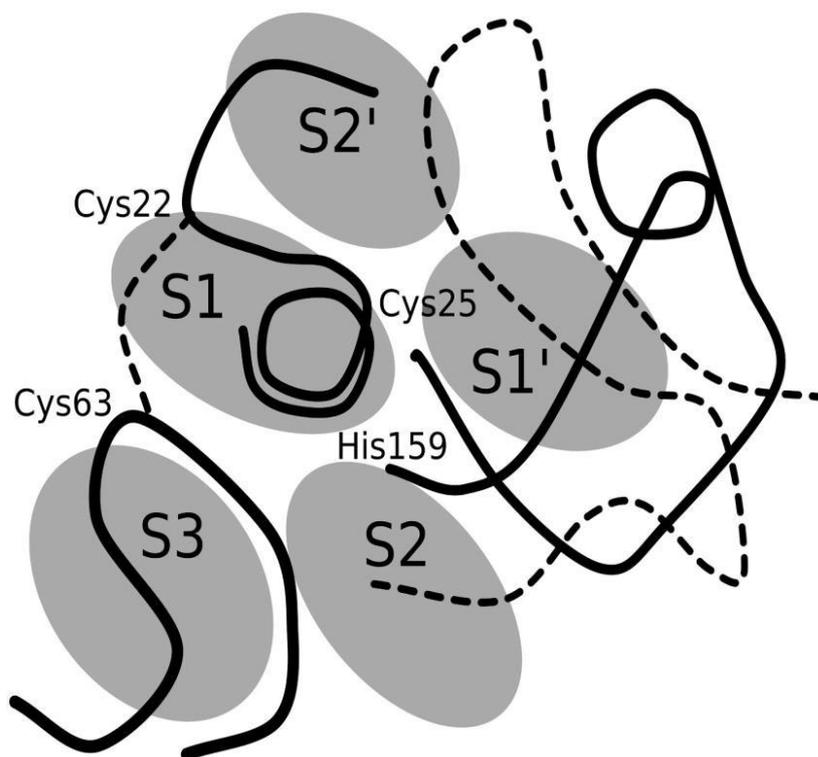


Рисунок 2. Схематическое изображение субстрат-связывающих сайтов папаиноподобных протеаз вдоль расщелины активного сайта по [105]

Катепсины активны в слабокислой среде и являются мономерными, небольшими гомологичными белками с массами 20-35 кДа, которые имеют подобные аминокислотные последовательности и третичные структуры. По своему химической структуре катепсины являются гликопротеинами [134].

Большинство из катепсинов (в частности катепсин L и другие) проявляют эндопептидазную активность [134]. Катепсин В помимо эндопептидазной характеризуется и карбоксидипептидазной активностью, а катепсин Н является одновременно аминопептидазой и эндопептидазой [173, 175]. У эндопептидаз доступ к субстрат - связывающему участку ограничен дополнительными структурами: “преграждающими” петлями в катепсине В или пептидными участками в аминопептидазах – катепсине Н [130].

Функции катепсинов

Некоторые катепсины активно участвуют в прогрессии клеточного цикла и презентации антигенов [171]. Лизосомальные протеазы за пределами

лизосом во внеклеточном пространстве ЛЦП разрушают внеклеточный матрикс и могут вызывать апоптоз при локализации в цитозоле [125, 127, 165].

В настоящее время доказано, что многие катепсины (В, D, и L) задействованы в процессах опухолевой инвазии: они или секретируются опухолевыми клетками в межклеточное пространство, вызывая деградацию определенных компонентов межклеточного матрикса, или связаны с поверхностью опухолевых клеток [84, 100]. Ингибирование этих катепсинов приводит к уменьшению роста опухоли, снижению ангиогенеза. Помимо этого ЛЦП принимают активное участие в процессах метастазирования [181], процессах формирования плаценты во время беременности [121], катепсин В доказано участвует в аутофагическом лизосомальном механизме [145].

Одним из важных и значимых в диагностике показателем воспалительного процесса, апоптоза и иммунного ответа является степень активации ЛЦП.

Иммунный ответ организма зачастую сопряжен с активацией катепсинов, поэтому их контролирование позволит уменьшить или даже исключить патологическое повреждение тканей и клеток. Тканевые протеазы участвуют в активации врожденного и приобретенного иммунитета, регулируют хронические воспаления и аутоиммунные расстройства [104, 107]. Катепсин G, химотрипсиноподобная протеиназа лейкоцитов и селезенки, например, обладает антимикробной активностью и гидролизует следующие белки: компоненты системы комплемента, иммуноглобулины и фибронектин [154].

Подобно большинству других протеаз катепсины синтезируются в виде неактивных предшественников, и активируются путем протеолитического удаления N-концевого пропептида (рисунок 3).

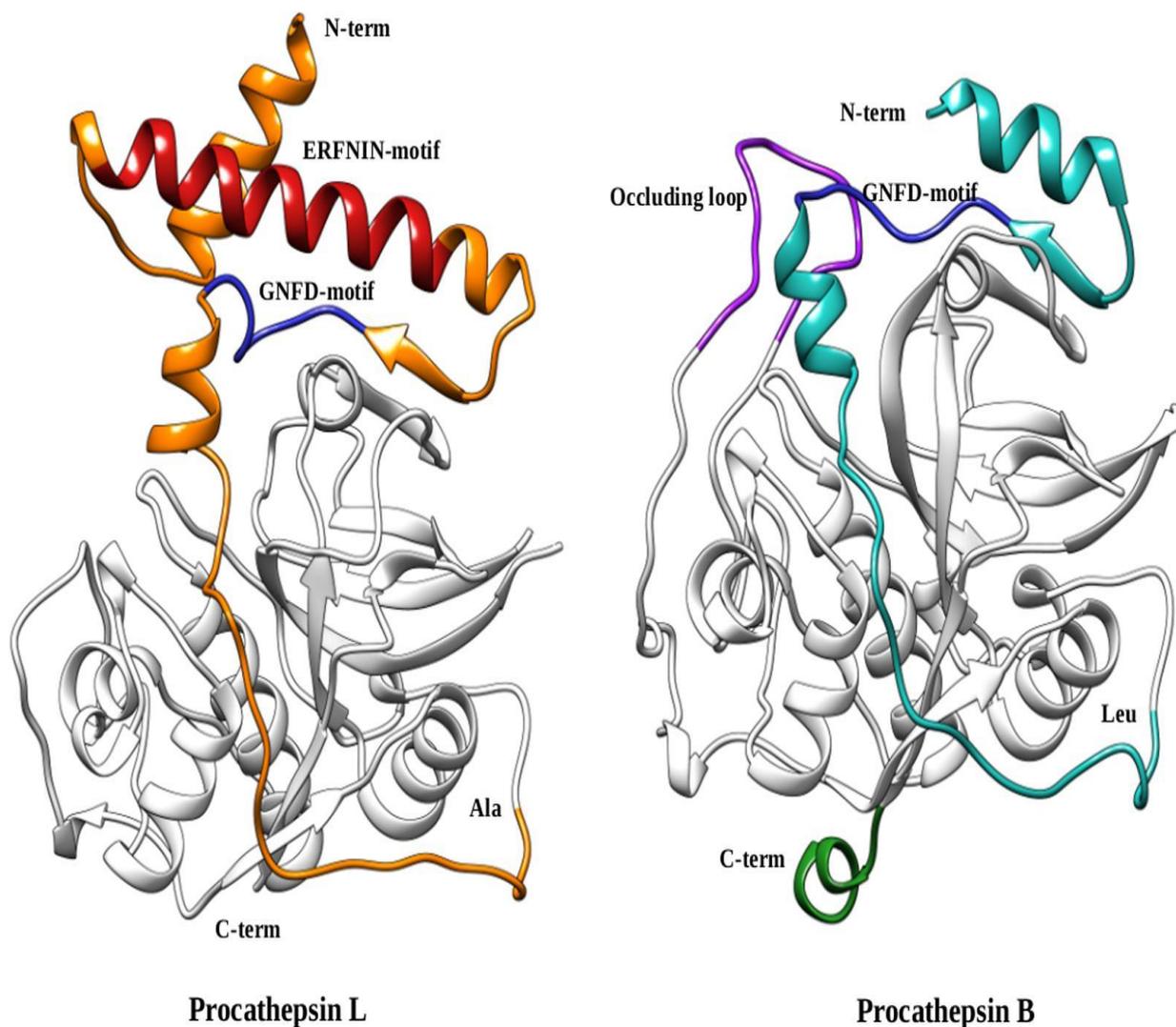


Рисунок 3. Схематическое изображение прокатепсинов L и B по [177]

Синтез и активация катепсинов

Катепсины В, L, и Н синтезируются рибосомами в виде препроэнзима. После прохождения через эндоплазматический ретикулум пропетид отделяется и прокатепсин (рисунок 4) подвергается протеолитическому превращению в активную, зрелую форму фермента в кислой среде поздних эндосом или в лизосомах, где основной функцией катепсинов считается деградация белков [114]. Лимитированный протеолиз, таким образом, является критическим этапом для контроля протеолитической активности катепсинов [87].

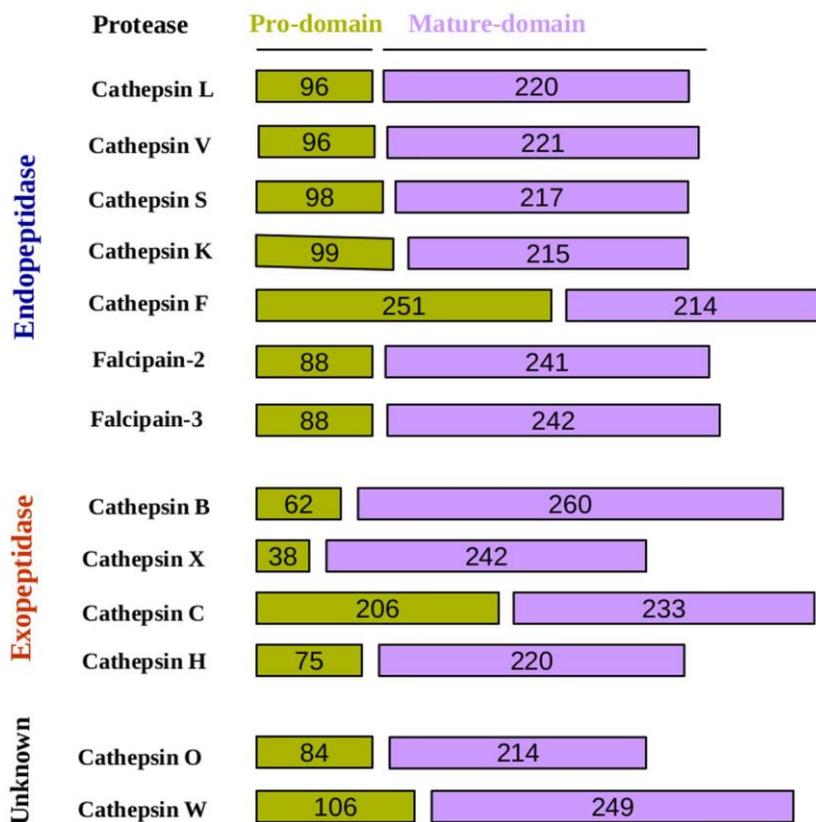


Рисунок 4. Схематическое изображение соотношения в прокатепсинах продоменов и активной части ферментов по [177]

В настоящее время широко известно, что протеолитическому отщеплению пропептида способствуют, в том числе и сами цистеиновые протеиназы [32, 156, 175]. В последние годы исследования сконцентрировались на аутокаталитическом процессинге катепсинов в кислой среде; вероятно снижение pH ослабляет взаимодействие между пропептидом и каталитической частью молекулы, экспериментальные данные были получены при взаимодействии протеаз В и L с их пропептидами [151, 173, 175]. Аутокаталитическая активация представляет собой бимолекулярный процесс, в котором одна из молекул катепсина активирует другую по типу цепной реакции [24]. В результате этого, возможно профермент претерпевает конформационные изменения, итогом является ослабление связи пропептида с активным центром при сохранной вторичной структуре [86]. Дополнительным фактором является расширение места активного центра на фоне изменения pH, экспериментальные данные

были получены для зрелого папаина, смещения пропептида окклюзионной петлей, как предполагалось для катепсина В, и/или небольшими локальными структурными изменениями в пропептиде, как у пептидазы L [173, 175].

Следует отметить, что процесс аутоактивации катепсинов В (рисунок 5) и L значительно ускоряется в присутствии различных гликозаминогликанов [86, 124, 175]. Так как гликозаминогликаны (мукополисахариды) в процессе метаболизма сосредотачиваются в лизосомах [180], они могут быть вовлечены в процессинг цистеиновых протеиназ *in vivo* за счет ослабления взаимодействий между пропептидом и каталитической частью молекулы.

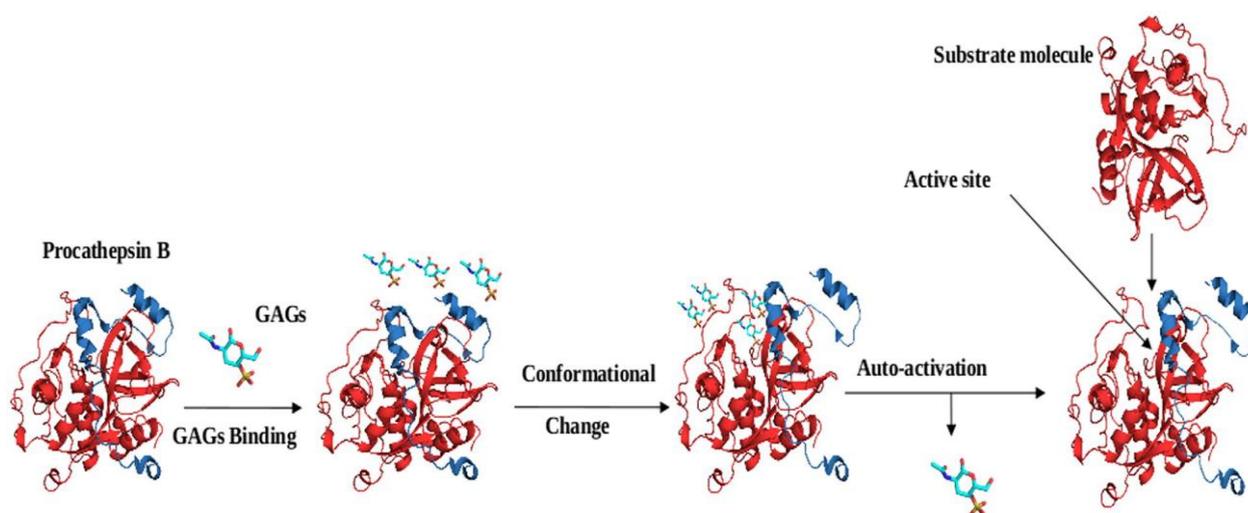


Рисунок 5. Механизм аутокаталитической активации прокатепсина В гликозаминогликанами (GAGs) [176]

На сегодняшний день, для многих цистеиновых протеиназ уже описан процесс аутокаталитической активации: катепсина В [156] и катепсина L [86]. Следует отметить, что в ранних работах посвященных изучению процессинга прокатепсинов был предположен механизм внутримолекулярного взаимодействия аутокаталитической активации цистеиновых протеиназ, однако эта гипотеза была опровергнута исследованиями кристалльных структур прокатепсинов В, L, которые показали локализацию пропептида в положении блокирующем доступ к

активному центру фермента и более того, его расположение в направлении противоположном для связывающегося субстрата [173, 175]. Дополнительные доказательства межмолекулярного механизма данной реакции были получены при более поздних исследованиях катепсина L [87, 160], а также в работе использующей катепсин В в виде модели [86]. В ряде исследований доказано, что активация прокатепсина Н является аутокаталитическим процессом, не требующим присутствия других протеиназ и заметно ускоряющимся в присутствии гликозаминогликанов [32].

Изучаемые протеиназы относительно нестабильны при нейтральных значениях рН, в связи с чем во время созревания лизосом (рН снижается до 3,8) может происходить необратимая денатурация катепсинов В и L. Кроме того, при низком рН все лиганды, включая субстрат, ингибиторы и пропептид, слабо связываются с ЛЦП; возможно, это обуславливается тем, что при созревании лизосом ферменты могут быть частично денатурированными [24].

Следует отметить, что лизосомные протеиназы подвержены многофакторной регуляции, в том числе, в связи с окислительной модификацией белков при оксидативном стрессе.

1.2. Варианты изменения белков при влиянии на синтез оксида азота

Изучение механизмов деградации окисленных белков была темой интенсивных и важных исследований в течение многих лет. Теперь уже доподлинно установлено, что только частично окисленные белки способны разворачиваться [153]. Оказавшись внутри лизосом, а также в присутствии ионов переходных металлов, окисленные белки могут вызвать цепь каскадных событий, начинающихся с ухудшения способности лизосом эффективно перерабатывать крупные органеллы, такие как митохондрии и протеасомы. Со временем накопление приводит к окислительному стрессу,

пермеабиллизации лизосомальных мембран, высвобождение протеаз, изменению проницаемости митохондриальных мембран, и, в конечном счете, апоптозу [108, 164]. Дальнейшие исследования сложных путей деградации окисленных белков может обеспечивать более глубокое понимание потенциальной перспективы методов лечения «клеточного старения» [83, 89, 149].

На протяжении всей жизни, клетки постоянно подвергаются воздействию активных форм кислорода (АФК) [93, 119], которые могут быть сформированы любым из числа процессов, протекающих в организме. Нарушение равновесия между образованием и функцией детоксикации АФК может привести к окислительному стрессу и неферментативной модификации биомолекул, таких как белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и липиды. Одним из новых перспективных направлений стало исследование окислительной модификации белков (ОМБ) при различных формах патологии. Окисление протеинов считается надежным маркером интенсивности протекания окислительного стресса *in vivo*, поскольку белки присутствуют во всех организмах [15, 28, 46].

Процесс старения заметно увеличивает рост чувствительности белков к окислению, в результате чего происходит накопление в тканях их окисленных форм. Количество белков, подвергающихся окислению в клетке, обусловлено генетически, являясь неизменной фенотипической характеристикой [31].

Поврежденные белки распознаются протеолитическими механизмами деградации их конститутивных аминокислот; однако, этот процесс не всегда может быть достаточно эффективным, о чем свидетельствует их накопление. Накопление окисленных протеинов трактуется в качестве фактора регуляции синтеза и распада белков и активации протеолитических ферментов, которые избирательно разрушают окисленные формы. Этот механизм является проявлением антиоксидантной защиты организма, поэтому оценка степени ОМБ может считаться одним из

наиболее надежных индикаторов свободно-радикального повреждения тканей, клеток и мембран [31, 69].

При патофизиологическом аспекте окисления белков свободными радикалами происходит неферментативное дезаминирование боковых радикалов основных аминокислот с формированием карбонильных групп. Кроме того, молекула белка фрагментируется и способна к образованию конгломератов по типу прионовых белков [11].

Отложения агрегированных, неправильно свернутых и окисленных белков обычно накапливаются с течением времени в клетках и тканях часто присутствуют в повышенных количествах в различных возраст-зависимых заболеваниях [90, 112].

Изменения уровня окисленных белков в настоящее время изучены при различных патологических состояниях:

- ишемический инсульт [25, 43, 44],
- у пациентов с сердечно-сосудистой патологией атеросклеротического генеза [42],
- при хронической венозной недостаточности [80],
- болезнь Паркинсона [147], болезнь Альцгеймера [167],
- центральные нейроаксиальные блокады у младенцев [50],
- у детей с ювенильным хроническим артритом [36],
- ожирение [177];
- у больных с психическими расстройствами - шизофрения [106],
- депрессия и деперсонализация [51];
- как маркера соматизации и тяжести депрессивных состояний [10],
- у больных сахарным диабетом [55],
- при токсикозе беременных [64],
- у пациенток с раком шейки матки [33],
- рак молочной железы [148],
- при раке яичников [34],

- у пациентов с остеоартрозом [37].

Установлена роль ОМБ при оксидативном стрессе в спинном мозге на этапах старения человека [101], в том числе у долгожителей Прикарпатья [40].

Повышение уровня карбонилированных белков наблюдалось:

- на фоне хронической алкогольной интоксикации в эксперименте на крысах [9],
- при моделировании инфаркта миокарда у мышей [139] и крыс [56],
- в икроножных мышцах на фоне старения в эксперименте у крыс [154],
- в период полового созревания у мышей [169],
- беременности у крыс [70],
- ожирение крыс [120],
- при экспериментальной блокаде ГАМК-рецепторов у крыс [62]

ОМБ с учетом их многообразной функциональной нагрузки в тканях в отличие от перекисного окисления липидов может носить специфический и избирательный характер [53]. Окислительная модификация белков протекает по нескольким путям: диссоциация субъединиц, локальная или глобальная трансформация, отщепление гидрофобных остатков, агрегация и фрагментация [108].

Окислительная деструкция приводит к образованию альдегидных и кетонных групп в боковых цепях, совместно именуемых карбонильными производными, которые стали визитной карточкой для окислительного стресса - и их количественным удобным показателем степени окислительного стресса [3, 28].

Особый интерес представляет окисление аминокислотных остатков с образованием карбониллов: альдегидных или кетонных производных основного и нейтрального характера [103]. На обнаружении образовавшихся дополнительных карбонильных групп основан самый распространенный метод определения продуктов окисления белков, в котором карбонильные

производные реагируют с динитрофенилгидразином. Гидразоны, получаемые в ходе реакции, определяются фотометрически [46]. Согласно литературным данным, деградированные протеины могут находиться в клетке часами и даже в некоторых случаях днями, что позволяет рассматривать окисленные белки в качестве стабильных показателей окислительного стресса [28, 35, 46, 49, 54].

В настоящее время динитрофенилгидразиновый тест является наиболее чувствительным в отношении содержания карбонильных продуктов свободно-радикального окисления в организме [11, 22, 29, 52]. Литературные источники относительно составляющих карбонильного стресса, а именно альдегидов и кетонов предоставляют противоречивую информацию. Часть авторов утверждает, что в условиях организма альдегидные группы не вносят существенный вклад в развитие окислительной деструкции белков, согласно их мнению, они окисляются или вступают в реакцию присоединения с подходящим нуклеофилом; а кетогруппы менее реакционны, в связи, с чем могут накапливаться в молекулах белка [11]. Другие же, напротив, ставят на первое место по распространению среди карбонильных продуктов метаболизма – альдегиды [22]. В связи, с чем актуальным представляется исследование содержания альдегидов и кетонов – продуктов окислительной модификации белка, как в совокупности, так и отдельно.

Выраженность окислительного повреждения белков определяют с помощью показателя содержания карбонильных групп в белках сыворотки крови [72].

При действии АФК происходит нарушение нативной конформации белков с образованием крупных белковых агрегатов или фрагментация белковой молекулы [14, 29]. Гидроксильный радикал чаще всего провоцирует агрегирование белковых молекул, а в комбинации с супероксид анион-радикалом – фрагментацию с образованием низкомолекулярных фрагментов. Агрегаты образуются при действии оксидантов, которые в

результате нарушения нативной конформации доменов ряда белков, увеличивают число гидрофобных белков на поверхности глобул.

В настоящее время механизмы окислительной модификации белков разделены на группы: конъюгация липидных пероксидов с аминокислотными остатками лизина, гистидина и цистеина протеинов; окисление с участием АФК - образование карбонильных производных, дисульфидов Cys-S-S-Cys, цистеин-сульфеновой (SO), -сульфиновой (SO_2^-), сульфоновой (SO_3^-) кислот, сульфоксида метионина (MetSO). Помимо этих процессов предложено относить к ОМБ гликирование и гликоксидацию лизиновых и аспарагиновых остатков.

Деструкции протеины могут быть подвержены так же в результате воздействия вторичных продуктов окислительного стресса – окисленные молекулы, липиды, нуклеиновые кислоты и другие белки (таблица 2).

Таблица 2 - Продукты окисления аминокислотных остатков белков по [58]

Остаток	Продукты
Фенилаланин	2,3-дигидрокси-фенилаланин, 2-, 3-, и 4-гидроксифенилаланин
Тирозин	3,4-дигидроксифенилаланин, дитирозин (2,2\ - бифенил-производные), 3- нитротирозин, хлортирозин
Триптофан	Кинуренин, 3-гидроксикинуруенин, гидропирлиндол, оксииндол, N-формил-L-кинуруенин, 3-гидоксилкинуруенин
Гистидин	2-оксогистидин, 4-ОН-глутамат, аспарагин, аспарат
Лизин	2-аминоадипиновый полуальдегид

Остаток	Продукты
Аргинин	Глутаминовый полуальдегид
Пролин	Глутаминовый полуальдегид
Треонин	2-амино-3-кетобутиловая кислота
Глутаминовая кислота	Пировиноградная кислота
Аспарагиновая кислота	Пировиноградная кислота
Лейцин	4-,5-гидропероксилейцины, 5-гидроксилейцин, 3-, 4-, 5-моногидроксилейцин производные
Валин	3-, 4-гидропероксивалины, 3-,4-гидрооксивалины, 4-гидрооксивалин
Цистеин	Нитрозотиолы, тиоловые радикалы, цистин, конъюгаты с глутатионом
Метионин	Метионинсульфоксид, метионинсульфон

Все аминокислотные остатки являются потенциальными мишенями для окисления АФК, наиболее чувствительны к процессам окисления оказались - метионин и цистеин. Даже в мягких условиях, метионин преобразуется в метионин сульфоксид (MeSOX) и цистеина окисляется до дисульфидов [108]. Большое количество биохимических систем, содержащих дисульфид редуктазы и MeSOX редуктазы, могут преобразовывать окисленные формы цистеина и метионина обратно в восстановленные формы. Это единственный известный механизм окислительной модификации белков в организме млекопитающих, функционирующий в обоих направлениях [108].

В настоящее время уже существуют работы, указывающие на взаимосвязь активации катепсинов В и L и повышением уровня ОМБ [108], однако тема не достаточно хорошо освещена.

В последние годы исследователями кроме активных форм кислорода уделяется внимание активным формам азота и, в частности, оксиду азота (NO), его роли как универсального трансммиттера в развитии различных патологических состояний [20, 65].

Оксид азота

Роль оксида азота в поддержании гомеостаза разнообразна и не ограничена только регуляцией сосудистого тонуса и ангиопротекторным эффектам [18] существуют доказанные возможности влияния NO на пролиферацию, апоптоз клеток гладких мышц сосудов, противовоспалительные эффекты [143]. Помимо указанных эффектов активно изучается механизм участия NO в свободно-радикальных процессах, где молекула оксида азота демонстрирует свою двойственность, поочередно проявляя прооксидантные [168] или антиоксидантные [142] свойства.

При физиологически значимых концентрациях оксид азота проявляет достаточно низкую реакционную способность (рисунок б), однако в ходе реакций с радикалами способен ингибировать процессы ПОЛ, оказывая, таким образом, антиоксидантное действие. В случае эквимольных концентраций или избытка супероксида NO превращается в пероксинитрит (ONOO^\cdot), являющийся сильным окислителем и приводит к перекисному окислению липидов, повреждению клеток и способствует генотоксичности NO. Таким образом, решающим фактором для токсичности оксида азота является соотношение NO и супероксида [144].



Рисунок 6. Эффект оксида азота в зависимости от концентрации модифицировано по [144]

Образуемый оксидом азота N_2O_3 вступает в реакции с амино- или тиоловыми группами белков с образованием нитрозаминов или S-нитрозотиолов [144]. Нитрозосоединения оксигемоглобина, миоглобина и различных тиолов могут являться своеобразным депо и сохранять оксид азота в биологически активном состоянии. При определенных условиях NO освобождается из них, в результате диапазон и длительность его функций в организме увеличивается [75, 144]. Поэтому, образование N_2O_3 также способствует генотоксичности NO [144].

Образование этих нитрозативных аддуктов в биологических системах (NO концентрации > 1 мкМ) называется «нитрозативный стресс».

Не смотря на некоторую общность процессов окислительного и нитрозативного стресса, следует понимать их различия. Окислительный стресс – это процесс повреждения АФК различных тканей и клеток, в условиях их отсутствия возможности нейтрализации и элиминирования. Дисбаланс может быть результатом недостатка системы антиоксидантной

защиты, вызванного нарушениями продукции или распределения антиоксидантов или избытком АФК. Ключевую роль в нитрозативном стрессе играют молекулы активных форм азота. Нитрозативный стресс может привести к изменению структур различных белков, ингибированию их биологических функций [142, 144].

Карбонильный стресс также является окислительным, но в отличие от оксидативного и нитрозативного стрессов, протекающих внутриклеточно, этот новый окислительный стресс происходит снаружи клеток, то есть во внеклеточном матриксе. Этот окислительный стресс особенно сильный в связи с тем, что ферментные системы защиты не являются такими же эффективными, как системы, находящиеся в клетках [144].

Хроническое воспаление и, связанная с ним, устойчиво высокая концентрация NO в клетке, может привести к мутагенным эффектам оксида азота, например, с помощью формирования пероксинитрита. Оксид азота может оказывать косвенное канцерогенное действие через инактивацию репарации ДНК белков, например алкил - трансферазы и ДНК-лигазы, а с помощью инактивации белка p53 – супрессора опухолей, таким образом, можно говорить о косвенном воздействии оксида азота на контроль клеточного цикла [2, 118].

В настоящее время доказан факт участия оксида азота в реакциях окислительного стресса и в механизмах антиоксидантной защиты. Разрушение окисленных протеинов рассматривается учеными как проявление вторичной антиоксидантной защиты в тканях [28, 142].

Ввиду существования уже доказанной причинно-следственной связи между оксидативным и карбонильным стрессом [22, 162] представляется интересным исследование ОМБ под действием модуляторов синтеза оксида азота.

Гиперпродукция оксида азота в наших исследованиях была изучена путем стимулирования синтеза посредством введения субстрата L-аргинина,

а ингибирование - с использованием неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргининметилового эфира [134].

Модуляторы синтеза оксида азота

Аргинин, являясь условно незаменимой аминокислотой, был выделен в 1886 г. E. Schulze и E. Steiger, структура установлена E. Schulze и E. Winterstein в 1897 г. Наиболее значимой функцией аргинина в организме является возможность быть субстратом для синтеза NO [7, 8].

Аргинин (α -амино- δ -гуанидино-валериановая кислота) - одна из самых поляризованных, положительно заряженных аминокислот. Метаболизм L-аргинина идет, как минимум, двумя альтернативными путями:

- 1) окисным (NO-синтазным) с образованием L-цитрулина и NO;
- 2) неокисным (аргиназным) с образованием L-орнитина и мочевины.

Возможно одновременное протекание этих двух процессов [7].

В данной работе акцент ставится на участие аргинина в качестве донора оксида азота, поэтому внимание обращено на связь NO и аргинина.

Образование монооксида азота (рисунок 7) происходит в результате окисления атомом кислорода L-аргинина в присутствии специфического фермента NO-синтазы [115].

В последнее время показано, что введение аргинина может приводить к усилению синтеза оксида азота в организме. Продукция NO (любой из NOS) осуществляется пропорционально доступности внеклеточного аргинина - это явление получило название: «аргининовый парадокс» [74]. Вместе с тем, при физиологических состояниях генерация оксида азота не зависит от концентрации аргинина.

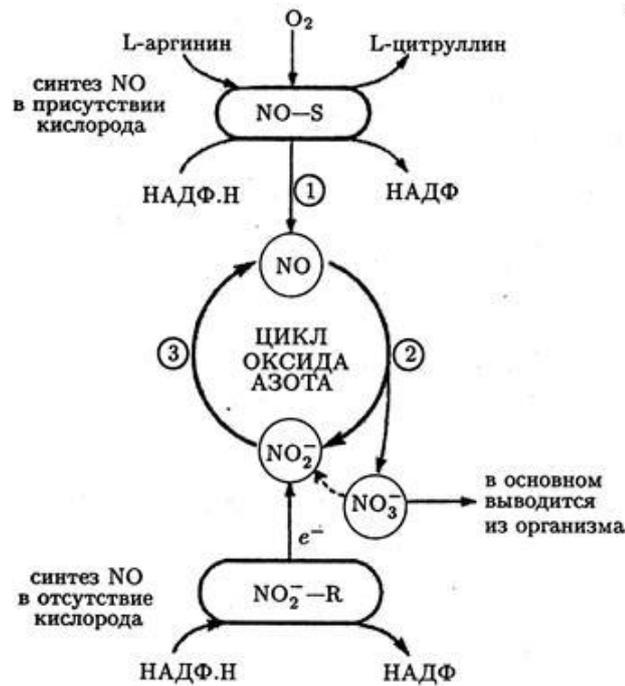


Схема образования NO и цикла оксида азота. NO-синтазная (NO-S) и нитроредуктазная (NO⁻-R) компоненты цикла оксида азота в клетках млекопитающих: 1 — образование NO в результате NO-синтазной реакции; 2 — окисление NO в ионы NO₂⁻ и NO₃⁻; 3 — восстановление NO₂⁻ в NO при участии нитроредуктазных систем

Рисунок 7. Схема образования NO и цикла оксида азота по [61]

Большинство эффектов аргинина связывают с тем, что он является предшественником оксида азота (таблица 3).

Таблица 3 - Роль оксида азота в функционировании различных систем организма [5]

Функциональные системы организма	Эффекты оксида азота
Сердечно-сосудистая система	Релаксация кровеносных сосудов мозга, сетчатки глаза, сердца, легких, почек, кишечника, кавернозной ткани, мышцы сердца
Дыхательная система, пищеварительный и уrogenитальный тракты	Релаксация гладкомышечной ткани трахеи, желудка, кишечника, мочевого пузыря, матки

Функциональные системы организма	Эффекты оксида азота
Центральная и периферическая нервные системы	Нейромодулирующая активность, определяющая долговременное потенцирование, формирование памяти, восприятие боли, зрительный анализ
Эндокринная система	Регуляция синтеза и секреции гормонов: инсулина, пролактина, тиреоидного гормона, паратиреоидного гормона, гормонов надпочечников, гормонов репродуктивного цикла
Система гемостаза	Регуляция взаимодействия лейкоцитов со стенками сосудов, регуляция активности тромбоцитов
Иммунная система	Антипатогенные реакции, неспецифическая цитотоксичность, противоопухолевая защита, патогенез токсемий, отторжение трансплантата

Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о благоприятном соотношении польза/риск L-аргинина в качестве лекарственного средства для лечения широкого круга заболеваний. L-аргинин хорошо переносится здоровыми добровольцами и пациентами при внутривенном и пероральном введении в дозах 3–8 г/день [5, 19].

В зависимости от структуры и локализации различают следующие изоформы NO-синтаз: эндотелиальные (eNOS), нейрональные (nNOS) и макрофагальные (mNOS) (таблица 4) [166].

Изоформы NOS отличаются по механизму действия и биологическому значению для организма. Поэтому их подразделяют на конститутивную (cNOS) и индуцибельную (iNOS). Нейрональная NOS является только

конститутивной, mNOS –индуцибельной формой, eNOS в 80% является конститутивной и в 20% – индуцибельной ферментативной формой.

Таблица 4 - Сравнительная характеристика NOS [45]

Характеристика	nNOS	iNOS	eNOS
Клеточная экспрессия	Нейроны, эпителиоциты, эндотелиоциты, миоциты скелетных мышц и сосудов, нейтрофилы, тромбоциты, f3-клетки поджелудочной железы	Макрофаги, нейтрофилы, эпителиоциты, кардиомиоциты, глиальные клетки, миоциты сосудов, эндотелиоциты, нейроны	Эндотелиоциты, кардиомиоциты, тромбоциты, нейроны
Субклеточная локализация	Цитоплазма, эндоплазматический ретикулум, саркоlemma	Фагосомы, пероксисомы, мембрана, ядро клетки, митохондрии	Аппарат Гольджи, мембрана клетки в области маленьких инвагинаций, которые содержат трансмембранный кавеолин, ядро клетки, митохондрии

Аналог L-аргинина – L-NAME (N-нитро-L-аргинин-метилэфир) является блокатором синтеза NO, дефицит которого приводит к повреждению мембран лизосом, что является основным путем экспрессии катепсинов. Поэтому актуальным представляется влияние модуляторов синтеза оксида азота L-аргинина и L-NAME на изменение активности катепсинов B, L, H и пермеабилзация лизосомальных мембран.

В настоящее время карнитин вновь активно изучается благодаря осознанию того, что существует доказанная возможность фармакологически воздействовать на концентрацию карнитина в тканях и как следствие влиять на оксидативные процессы.

В основном, карнитин поступает в организм с пищей, но при определенных условиях он способен образовываться в организме путем биосинтеза: в печени и почках, из которых транспортируется в другие ткани и органы. Примерно 98% L-карнитина тела присутствует в мышечной ткани [132].

Эндогенный L-карнитин в организме человека синтезируется из основной аминокислоты (лизина) с участием другой аминокислоты (метионина), трех витаминов (витамина С, никотиновой кислоты и витамина В6) и железа. Поэтому очевидно, что дефицит одного из этих нутриентов может привести к дефициту L-карнитина. Последняя стадия синтеза L-карнитина может происходить только в печени, почках и мозге, потому что фермент, регулирующий этот этап (γ -бутиробетаингидроксилаза), присутствует только в тканях указанных органов [66].

Одной из важнейших функций L-карнитина является транспорт длинноцепочных жирных кислот в митохондрии, где происходит их окисление до ацетилкоэнзима А (ацетил-КоА), являющегося субстратом для образования АТФ в цикле Кребса. Кроме основной транспортной функции, карнитин выполняет в организме ряд других функций, в том числе: повышает работоспособность, способствует увеличению силы и мышечной массы, стимулирует рост детского организма; участвует в регуляции липидов, снижает уровень холестерина в крови и предотвращает развитие атеросклероза; оказывает антиоксидантное и антигипоксическое действие; оказывает нейро-, гепато- и кардиопротекторное действие; улучшает пищеварение, восстанавливает слизистую желудочно-кишечного тракта при гастритах и панкреатите; снижает функциональную активность щитовидной железы, способствует нормализации основного обмена при гипертиреозе;

стимулирует мозговую деятельность, улучшает процессы передачи нервного импульса в синапсах и аксонах путем повышения синтеза холина и ацетилхолина; стимулирует клеточный иммунитет; тормозит дистрофические изменения сосудов сетчатки; стимулирует сперматогенез [66, 78].

Помимо перечисленных функций L-карнитин обладает способностью предотвращать индукцию апоптоза. В ходе эксперимента [150] полученные данные позволили автору рассматривать регуляцию факторов апоптоза как один из ведущих механизмов действия L-карнитина. Введение L-карнитина в эксперименте предупреждает или ослабляет выраженность апоптоза. Возможно, могут существовать другие механизмы, позволяющие L-карнитину предупреждать включение процессов отсроченной гибели клеток.

Использование L-карнитина характеризуется снижением в крови и тканях концентрации маркеров воспаления, представителями которых являются, в том числе, катепсины [38]. Однако, «двуликость» карнитина проявляется во многих его функциях, в том числе и при воспалении, участие в связях с различными органическими кислотами с дальнейшим запуском механизмов мембранотоксического действия с закислением среды, может напротив, спровоцировать увеличение активности катепсинов [49].

Общеизвестно также что L-карнитин и его ацильные производные обладают антиоксидантными свойствами, благодаря их ингибирующему действию на активность ксантинооксидазы [131]. Имеются данные о влиянии L-карнитина на апоптоз в скелетных мышцах у крыс с сердечной недостаточностью посредством ингибирования каспаз [88, 94].

Остановившись более подробно на взаимосвязях карнитина и оксида азота, в рамках данного эксперимента хотелось бы отметить, что в ходе ряда научных исследований была доказана антиоксидантная активность карнитина при различных нозологиях [97, 111, 159], в том числе и в плазме человека [129], что приводит к увеличению NO доступности [88].

Однако, это не исключает других возможностей снижения количества АФК за счет применения карнитина: увеличение биодоступности оксида азота за счет увеличения активности сNOS; разобщение окислительного фосфорилирования (повышение количества АФК снижают эндотелиальную NOS) [102, 128]; L-карнитин так же может способствовать усилению цитопротективных свойств сNOS [85].

Исследования рака молочной железы позволило выяснить взаимосвязь системы аргиназа-оксид азота с карнитином [152]. В ходе эксперимента было показано угнетение карнитином фермента с увеличением количества оксида азота.

Помимо ранее указанной антиоксидантного эффекта карнитина существует и прооксидантное действие описанное в работе [141], так же встречаются исследования указывающие на снижение карнитином карбонильных производных белков [110].

Таким образом, можно говорить о наличии механизмов влияния карнитина на карбонильный стресс напрямую и опосредованно через изменения процессов оксидативного стресса.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 100 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280-320 граммов, по 6-10 в группе. Содержание животных осуществлялось по 3-4 особи при естественном освещении в металлических клетках площадью 24 дм².

Кормление производили полноценным сухим комбикормом для лабораторных животных «Чара» (производство ЗАО «Ассортимент – Агро», Московская область, Сергиев-Посадский район, д. Тураково), воду животные получали по требованию, из оборудованных в клетках поильников. Сотрудники вивария осуществляли расчет рациона для животных согласно установленным нормам.

Уход за животными в виварии осуществлялся на основании «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993.

В соответствии с протоколами, изложенными Международным Советом Медицинских Научных Обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.) и приказе МЗРФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» осуществлялось содержание и выведение животных из эксперимента.

2.1. Экспериментальные модели *in vivo* и схемы введения препаратов

Экспериментальная модель № 1: формировалась посредством введения раствора L-аргинина («Sigma», США) в дозе 500 мг/кг, разведенного в 0,9 % растворе NaCl [76] с помощью градуированного стеклянного шприца с внутривенным зондом. Вводимый объем препарата, обусловленный массой животного, не превышал 1 мл. Препарат

вводили ежедневно в 8 утра 1 раз в сутки в течение 10 дней. Выведение из эксперимента с приготовлением гомогенатов органов реализовывали на 11-е сутки.

Экспериментальная модель № 2: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций неселективного ингибитора синтеза оксида азота N-нитро-L-аргининметилового эфира в дозе 25 мг/кг (L-NAME, «Sigma», США) [76] в виде водного раствора с помощью одноразового пластикового шприца с тонкой короткой иглой через переднюю брюшную стенку. Вводимый объем раствора зависел от веса животного: 0,5 мл на 200 граммов животной массы. Препарат вводили ежедневно в 8 утра 1 раз в сутки в течение 7 дней. Выведение из эксперимента с приготовлением гомогенатов органов реализовывали на 8-е сутки.

Экспериментальная модель № 3: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций неселективного ингибитора синтеза оксида азота N-нитро-L-аргининметилового эфира в дозе 200 мг/кг (L-NAME, «Sigma», США) [178] в виде водного раствора с помощью одноразового пластикового шприца с тонкой короткой иглой через переднюю брюшную стенку. Вводимый объем раствора зависел от веса животного: 0,5 мл на 200 граммов животной массы. Препарат вводили ежедневно в 8 утра 1 раз в сутки в течение 7 дней. Выведение из эксперимента с приготовлением гомогенатов органов реализовывали на 8-е сутки.

Экспериментальная модель № 4: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций L-NAME в дозе 25 мг/кг с 3-и по 10-е сутки на фоне внутривенного введения L-аргинина. Препараты вводили ежедневно в 8 утра 1 раз в сутки согласно схеме в течение 10 дней. Выведение из эксперимента с приготовлением гомогенатов органов реализовывали на 11-е сутки.

Уже доказанная низкая усвояемость карнитина при приёме *per os* у людей не имеет подтверждения у животных [179], однако для простоты

дальнейшей экстраполяции результатов был выбран внутрибрюшинный путь введения.

Экспериментальная модель № 5: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций карнитина хлорида (производство ФГУ «РКНПК» Минздрава России) в дозе 300 мг/кг. Препарат вводили ежедневно в 8 утра 1 раз в сутки в течение 21 дня. Выведение из эксперимента с приготовлением гомогенатов органов реализовывали на 22-е сутки.

Экспериментальная модель № 6: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг в течение 21 дня и водного раствора L-NAME в дозе 25 мг/кг с 14-е по 21-е сутки. Препараты вводили ежедневно в 8 утра 1 раз в сутки согласно схеме в течение 21 дня. Выведение из эксперимента с приготовлением гомогенатов органов реализовывали на 22-е сутки.

Экспериментальная модель № 7: формировалась посредством внутрибрюшинных инъекций карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг в течение 21 дня и внутрижелудочного введения раствора L-аргинина на 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [27] с 11-е по 21-е сутки. Препараты вводили ежедневно в 8 утра 1 раз в сутки согласно схеме в течение 21 дня. Выведение из эксперимента с приготовлением гомогенатов органов реализовывали на 22-е сутки.

Группы контролей формировались параллельно каждой серии эксперимента из животных, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями.

Контрольной группе животных осуществляли введение 0,9 % раствора NaCl: вариант введения, объемы раствора и продолжительность воздействия совпадают с обозначенными выше дозами для каждой конкретной группы эксперимента.

2.2. Метод получения биологического материала

В условиях стандартизации опытов животные были лишены пищи за 12 часов до забоя.

После введения животных в глубокий эфирный наркоз производили обескровливание и стерильно извлекали участок грудной аорты (в пределах 3 см), сердечную и скелетную мышцу передней поверхности бедра (около 500 мг). Сразу, после извлечения, препараты погружали в охлаждённый 0,25 М раствор сахарозы, освобождали от крови, жира и соединительной ткани. Далее следовало взвешивание на электронных весах (AJH-220 SE, Япония).

Процесс гомогенизации осуществлялся аппаратом «Potter S» (Sartorius, Германия) в течение 60 секунд при скорости вращения тефлонового пестика 1500 об/мин и зазоре в пределах 0,16-0,24 мм в охлаждённом 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1/10. Необходимым условием для данных процедур являлась температура не выше 4⁰С.

Качественная оценка гомогената производилась путем морфологического контроля посредством окраски мазков по Романовскому-Гимзе, дальнейшим с подсчетом числа не разрушенных клеток на 1000 освобожденных ядер на предметном стекле [59]. Число не разрушенных клеток в гомогенате не превышало 1-2%.

Центрифугирование гомогенатов в течение 10 мин при 800 g (центрифуга CM-6M ELMi, Латвия) осуществлялось для осаждения не полностью разрушенных ядер и клеток. Автоматической пипеткой собирали надосадочную жидкость в стерильные пробирки, далее для удаления митохондрий жидкость повторно центрифугировалась 15 мин при 14000 g. Следующим этапом было еще одно дополнительное центрифугирование полученного супернатанта при 20000 g в течение 30

мин (центрифуга рефрижераторная К 24 Д, ГДР) для получения чистой неседиментируемой (внелизосомальной, цитоплазматической) фракции. Осадок, состоящий из грубой фракции лизосом (седиментируемая фракция), ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона X-100 с конечной концентрацией 0,1%.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Метод определения концентрации метаболитов оксида азота

Содержание метаболитов оксида азота определяли в неседиментируемой фракции гомогената спектрофотометрией в видимой области спектра по реакции с реактивом Грисса [47].

Ход определения. Гомогенат депротеинизировали 96% этиловым спиртом в соотношении 1:2 и центрифугировали при 800 g в течение 20 мин. Для колориметрического определения нитрит-иона использовали реактив Грисса (Нева Реактив, Санкт-Петербург), растворенный в 12 % уксусной кислоте.

Для колориметрического определения нитрат-иона готовили раствор ванадия хлорида, для этого использовали растворенный VCl_3 в 1 N HCl. Реактивы готовили *ex tempore* [47].

Уровень метаболитов оксида азота (суммарную концентрацию нитратов и нитритов NO_x) определяли спектрофотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса.

Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра с регистрацией на микропланшетном анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology, США) при длине волны 540 нм и выражали в нмоль/мг белка.

Для построения калибровочной кривой использовали 1 М раствор NaNO_2 в воде, перед употреблением готовили серию разведений для построения кривой.

2.3.2. Метод оценки состояния окислительной модификации белков в тканях

Для оценки окислительной модификации белков (ОМБ) пользовались методикой определения уровня карбонильных производных по R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [52].

Метод оценки ОМБ основан на реакции взаимодействия карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, регистрирующихся с помощью спектрофотометра.

Ход определения. Для анализа использовали неседиментируемую (цитоплазматическую, внелизосомальную) фракцию, полученную в результате ультрацентрифугирования гомогената участка аорты, миокарда и скелетной мышцы.

Предварительно в материале осаждали нуклеиновые кислоты во избежание ошибочно завышенных показателей уровня карбонильных производных белков. Осаждение нуклеиновых кислот осуществляли с помощью 10% стрептомицина сульфата, в соотношении к гомогенату 1:9, экспозиция 15 мин при комнатной температуре. Далее центрифугировали в течение 10 мин при 800g и для работы использовали надосадочную жидкость.

При определении уровня карбонильных белков, образовавшихся при спонтанной окислительной модификации (спонтанная ОМБ), использовали 0,1 мл надосадочной жидкости, в которой осаждали белки 1

мл 20% трихлоруксусной кислоты, как в опыте, так и в контроле. Далее в опытную пробу вносили 1 мл 0,01 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2 М HCl, а в контрольную пробу - 1 мл 2 М HCl. Пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре 1 ч, затем центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g. Полученные осадки промывали 3 раза смесью этанол (96%) – этилацетат (1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, не прореагировавшего с карбонильными группами окисленных белков. Полученные осадки высушивали для удаления оставшегося раствора этанол-этилацетат, а затем растворяли в 8 М растворе мочевины в объеме 3 мл, для лучшего растворения к осадкам добавляли 1 каплю 2 М HCl.

Определение карбонильных белков, образующихся по металл-катализируемому механизму (индуцируемая ОМБ), проводится аналогичным образом с предварительным добавлением к опытной и контрольной пробам по 0,1 мл приготовленных *ex tempore* $4 \cdot 10^{-3}$ М FeSO₄, $11 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА, $3 \cdot 10^{-4}$ М H₂O₂, при этом взаимодействие двухвалентного железа с перекисью водорода, способствует последующему образованию радикала OH· по реакции Фентона.

Внесение в инкубационную среду ЭДТА обеспечивает сохранение в растворе окисленной формы железа. Для клеток участка аорты, миокарда и скелетной мышцы анализ осуществляли аналогичным способом.

Карбонильные производные окисленных белков регистрировали на спектрофотометре (СФ-2000, Санкт-Петербург) в ультрафиолетовой части спектра на длинах волн 230, 254, 270, 280, 356 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера), 363 нм и 370 нм (кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера), а в области видимого света - 428 и 430 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера) и 434, 524, 530, 535 нм (кетон-динитрофенилгидразоны основного характера). Перечисленные длины волн выбраны в соответствии с диапазонами, которые регистрируются динитрофенилгидразоны [126].

На основании регистрируемых экстинций строили график поглощения продуктов ОМБ и подсчитывали площадь под кривой. Комплексная оценка содержания окислительной модификации белков проводилась по авторскому патенту на изобретение [57] и определялась формулой:

$$S_{\text{омб}} = S_{\text{аднфг}}_{uv} + S_{\text{аднфг}}_{vs} + S_{\text{кднфг}}_{uv} + S_{\text{кднфг}}_{vs}$$

где

$$S_{\text{аднфг}}_{uv} = \frac{\text{Ext}_{230} + \text{Ext}_{254}}{2} \times 24 + \frac{\text{Ext}_{254} + \text{Ext}_{270}}{2} \times 16$$

$$+ \frac{\text{Ext}_{270} + \text{Ext}_{280}}{2} \times 10 +$$

$$+ \frac{\text{Ext}_{280} + \text{Ext}_{356}}{2} \times 76 + \frac{\text{Ext}_{356} + \text{Ext}_{363}}{2} \times 7$$

$$S_{\text{аднфг}}_{vs} = \frac{\text{Ext}_{428} + \text{Ext}_{520}}{2} \times 92$$

$$S_{\text{кднфг}}_{uv} = \frac{\text{Ext}_{363} + \text{Ext}_{370}}{2} \times 7 + \frac{\text{Ext}_{370} + \text{Ext}_{428}}{2} \times 58$$

$$S_{\text{кднфг}}_{vs} = \frac{\text{Ext}_{430} + \text{Ext}_{434}}{2} \times 4 + \frac{\text{Ext}_{520} + \text{Ext}_{535}}{2} \times 15$$

Все полученные результаты выражали в условных единицах/грамм белка.

Формула позволяет вычислить общее количество образовавшихся карбониллов (конечный результат вычислений), а также отдельно сумму альдегидов и кетонов – первичные и вторичные маркеры соответственно [69]: данные показатели служат характеристиками этапов окислительного стресса, природы образовавшихся карбониллов, а также функционального состояния клетки в процессе накопления окисленных белков.

Для оценки доли первичных маркеров подсчитывалась сумма АДНФГ ($S_{\text{аднфг}}_{uv} + S_{\text{аднфг}}_{vs}$), для оценки вторичных - сумма КДНФГ

$(S_{\text{кднфг}} + S_{\text{кднфг}})$, полученные результаты соотносились к общему содержанию карбонильных производных белков ($S_{\text{общ}}$).

Оценка спонтанной и металл-зависимой окислительной модификации белков на различных длинах волн поглощения может осуществляться и трактоваться отдельно, однако наибольшую информацию предоставляет параллельное осуществление указанных вариантов с последующим подсчетом отношения результатов измерения продуктов спонтанного окисления к индуцированному по реакции Фентона, принимая результаты измерения индуцированного за 100%, что характеризует резервно-адаптационный потенциал [126].

Результат подсчета отношения выражаются в виде столбчатой диаграммы (рисунок 8), трактовка осуществляется следующим образом: чем меньше доля спонтанного окисления в индуцированном, тем выше резервно-адаптационный потенциал и наоборот.

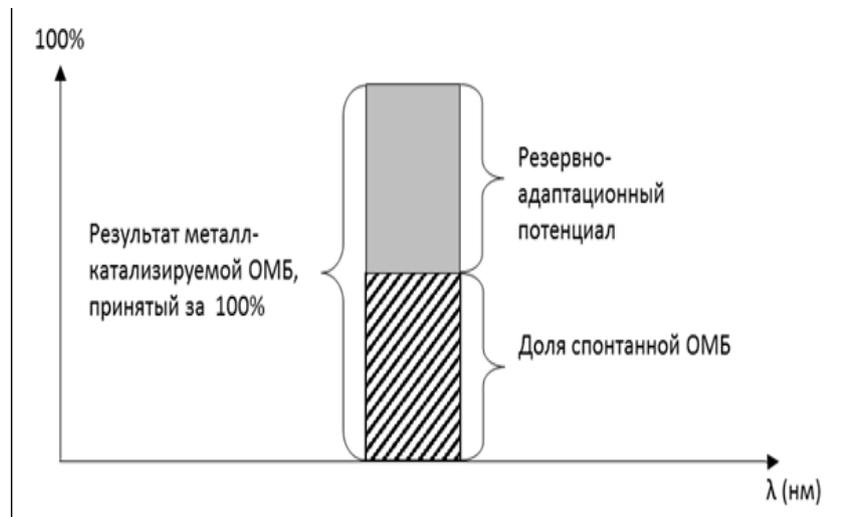


Рисунок 8. Пример выражения результатов оценки резервно-адаптационного потенциала

Критерии, содержащиеся в предлагаемом способе, дают возможность адекватно осуществить комплексную оценку содержания продуктов ОМБ: оценить общее значение ОМБ, определить количество

АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера, сопоставить первичные и вторичные маркеры ОМБ, и в результате этого предположить наиболее вероятный путь нарушения нативной конформации белков.

2.3.3. Метод определения содержания белка

Содержание белка оценивали в неседиментируемой и седиментируемой фракциях гомогенатов по методу Лоури, с использованием коммерческого набора НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург).

Метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина-Чокальтеу в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в исследуемой пробе, определяемой при 750 нм.

Содержание белка в опытной пробе определяли по калибровочному графику, для построения которого использовали входящий в состав набора калибровочный бычий сывороточный альбумин 0,25 мг/мл.

2.3.4. Метод определения активности кислой фосфатазы

Активность кислой фосфатазы определяли в неседиментируемой и седиментируемой фракциях гомогенатов унифицированным методом по «конечной точке», посредством коммерческого набора «Витал Диагностикс СПб» (Санкт-Петербург).

Количество образовавшегося в единицу времени *p*-нитрофенола, пропорциональное активности фермента, определяется при оптической плотности 405 нм.

Расчет активности фермента производили по калибровочной кривой, используя входящий в состав набора калибровочный раствор *p*-нитрофенола.

Далее подсчитывали коэффициент лабильности кислой фосфатазы (Клаб,%) как отношение активности кислой фосфатазы внелизосомальной фракции к общей активности кислой фосфатазы.

2.3.5. Метод определения 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 [91].

Принцип метода: количественное определение 7-амидо-4-метилкумарина, высвобождающегося в результате энзиматического гидролиза пептидной связи:

- $\text{N}\alpha\text{-CBZ-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin}$ («Sigma», США) для катепсина В,
- $\text{N}\alpha\text{-CBZ-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin}$ («Sigma», США) для катепсина L,
- $\text{Arg-7-amido-4-methylcoumarin}$ («Sigma», США) для катепсина Н («Sigma», США).

Преимущества данного метода связаны с высокой чувствительностью и специфичностью используемых субстратов.

Ход определения.

Готовили субстратно-буферный раствор состоящий из 8 мМ ДТТ и:

- 2 мМ ЭДТА в 0,1 М ацетатном буфере pH 6,0 для катепсина В,

- 2 mM ЭДТА в 0,1 М ацетатном буфере рН 5,5 для катепсина L,
- 2 mM ЭДТА в 0,1 М Na/K-фосфатном буфере рН 6,8 для катепсина Н.

К 0,4 мл субстратно-буферного раствора, преинкубированного 2 мин при 37⁰С, добавляли 0,1 мл исследуемого материала. Реакционную смесь инкубировали при 37⁰С 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 2 мл холодного 0,1 М ацетатного буфера рН 4,0. Контролем служила проба, содержащая те же компоненты, за исключением исследуемого материала, который вносился в конце инкубации непосредственно после добавления ацетатного буфера рН 4,0.

Количество свободного 7-амидо-4-метилкумарина измеряли на при λ_{ex} и λ_{em} , соответственно 360 нм и 440 нм против контроля. В качестве стандартного раствора использовали 7-амидо-4-метилкумарин (Sigma, США), растворенный в диметилсульфоксиде (Вектон, Санкт-Петербург). Активность ферментов в 1 мл гомогената рассчитывалась по формуле:

$$A = \frac{F_0 * C * B}{F_{st} * t * 0,1}$$

F_0 – интенсивность флуоресценции анализируемого образца;

F_{st} – интенсивность флуоресценции стандартного раствора амидо-метилкумарина;

C – концентрация 7-амидо-4-метилкумарина в стандартном растворе;

B – разведение гомогената;

t – время инкубации (сек);

0,1 – объем гомогената в пробе (мл).

Удельную активность катепсинов в аорте, миокарде, скелетной мышце выражали в нкат/г белка.

Активность кислых гидролаз в неседиментируемой и седиментируемой фракциях определяли отдельно и обозначали как, соответственно, неседиментируемую и седиментируемую активность (НСА и СА). Общую активность (ОА) вычисляли как сумму НСА и СА.

2.3.6. Метод определения коэффициента аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ

Для определения аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ реакционную смесь, включающую 8 мМ ДТТ, 2 мМ ЭДТА и 0,1 мл исследуемого материала, преинкубировали в течение 15 мин при 37⁰С. После этого к смеси добавляли 20 мкМ

- N α -CBZ-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin для катепсина В,
- N-CBZ-Phe-Arg-7-амидо-4-метилкумарина для катепсина L и
- Arg-7-amido-4-methylcoumarin для катепсина H и далее осуществлялась инкубация в течении 60 мин при 37⁰С [12].

Аутокаталитическая активация ферментов оценивалась по коэффициенту отношения значения активности катепсина после прекалитической инкубации к параллельно определяемому значению активности без преинкубации (Каса – коэффициент аутокаталитического действия).

2.3.7. Метод оценки степени проницаемости лизосомальных мембран

Коэффициент лабильности (Клаб,%) представляет собой процентное соотношение цитозольной фракции к общей активности протеазы, характеризует проницаемость мембраны лизосом, для

конкретного фермента, отражая компартиментализацию лизосомальных гидролаз.

2.4. Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов исследования проведен согласно руководствам по медицинской статистике с применением современных методов виртуального математического анализа, а именно, с помощью программ «Statistica 10.0» и «Microsoft Office Excel 2016». Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Для вариационных рядов вычисляли характеристики: медиану (Me), минимальное (min) и максимальное (max) значение, результаты представляли в формате Me [min; max]. В связи с отсутствием согласия большинства данных с нормальным распределением, оценка статистической значимости различий независимых выборок осуществлялась с использованием рангового критерия Манна-Уитни (U-тест). Проверка равенства медиан нескольких выборок проведена с участием критерия Краскела-Уоллиса. Оценка ранговой корреляции производилась посредством коэффициента Спирмена.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оценка концентрации метаболитов оксида азота

Для верификации изменений синтеза оксида азота в экспериментальных моделях осуществляли измерение концентрации его метаболитов в исследуемых мышечных тканях и плазме крови опытных крыс-самцов (таблица 5,6).

Таблица 5 - Концентрация метаболитов оксида азота в плазме крови под влиянием L-аргинина, L-NAME, карнитина отдельно и в сочетаниях (мкмоль/л)

Группа	Показатель
Контроль 1	24,22 [21,91; 28,07]
L – аргинин	55,99 [51,95; 76,98]*
Контроль 2	23,12 [19,94; 29,87]
L – NAME, 25	22,34 [20,03; 26,19]
L – NAME, 200	20,46 [18,15; 24,31]
Контроль 3	25,02 [24,01; 25,97]
L – NAME + L – аргинин	47,9 [21,52; 77,37]•
Контроль 4	21,85 [19,91; 26,57]
Карнитина хлорид	38,85 [35,39; 44,63]*
Карнитина хлорид +L – аргинин	48,48 [43,86; 57,73] *
Карнитина хлорид +L – NAME	44,25 [34,62; 60,81] * • ■

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

В результате влияния субстрата синтеза NO оказалось, что применение субстрата синтеза NO, статистически значимо повышая концентрацию его метаболитов в плазме, приводит к снижению их в тканях.

Под влиянием ингибитора синтеза оксида азота, напротив, отсутствие статистически значимых изменений содержания метаболитов в плазме сопровождалось статистически значимыми снижениями показателя во всех изучаемых тканях без явной дозозависимости.

Таблица 6 - Концентрация метаболитов оксида азота в аорте, миокарде, скелетной мускулатуре под влиянием L-аргинина, L-NAME, карнитина отдельно и в сочетаниях (нмоль/мг белка)

Показатель	Аорта	Миокард	Скелетная мускулатура
Контроль 1	41,36 [29,68; 67,86]	1,98 [1,55; 3,64]	1,66 [1,15; 2,53]
L – аргинин	23,27 [12,68; 37,53]*	1,05 [0,62; 1,31]*	0,82 [0,69; 1,23] *
Контроль 2	42,16 [28,61; 69,11]	1,89 [1,64; 3,99]	1,72 [1,28; 2,49]
L – NAME, 25	17,23 [9,22; 27,45]*	1,38 [1,19; 1,48]*	0,71 [0,56; 1,08]*
L – NAME, 200	12,95 [5,76; 24,21]*	1,21 [1,05; 1,35] *	0,59 [0,43; 0,92] *

Показатель	Аорта	Миокард	Скелетная мускулатура
Контроль 3	40,99 [29,86; 66,98]	1,87 [1,25; 3,29]	1,57 [1,31; 2,67]
L – NAME + L – аргинин	82,89 [51,74; 121,13]*▲•	3,11 [2,05; 3,44] ▲•	2,35 [1,99; 2,51] ▲•
Контроль 4	43,01 [30,01; 65,13]	2,11 [1,87; 4,05]	1,69 [1,35; 2,69]
Карнитина хлорид	96,63 [74,76; 118,65] *	3,05 [2,68; 3,36]	3,12 [2,67; 4,12] *
Карнитина хлорид + L – аргинин	134,7 [94,99; 237,34] ▲	3,81 [2,48; 4,16]*▲	4,47 [3,72; 5,50] * ▲ ■
Карнитина хлорид + L – NAME	69,39 [56,85; 86,41] *•	3,74 [3,01; 4,72]*•	3,41 [3,06; 6,81] *•

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Сочетанное применение изучаемых модуляторов демонстрирует сохранение эффекта субстрата синтеза для плазмы крови и появление статистически значимого нарастания метаболитов в тканях.

Введение карнитина, как отдельно, так и в сочетаниях с регуляторами синтеза оксида азота характеризовалось однообразной тенденцией к увеличению концентрации метаболитов оксида азота.

Показатели статистически значимо изменяются относительно контроля (исключения: группа изолированного применения карнитина в гомогенате сердца и сочетание карнитина и аргинина в гомогенате аорты); относительно соответствующих групп с применением регуляторов синтеза оксида азота (исключение составляет ткань аорты в группе сочетанного применения стимуляторов синтеза NO) и относительно карнитина в мышце сердца при совместном применении карнитина и аргинина и в плазме – при использовании карнитина и L-NAME в качестве экспериментальных веществ.

3.2. Оценка состояния окислительной модификации белков в представленных экспериментальных группах

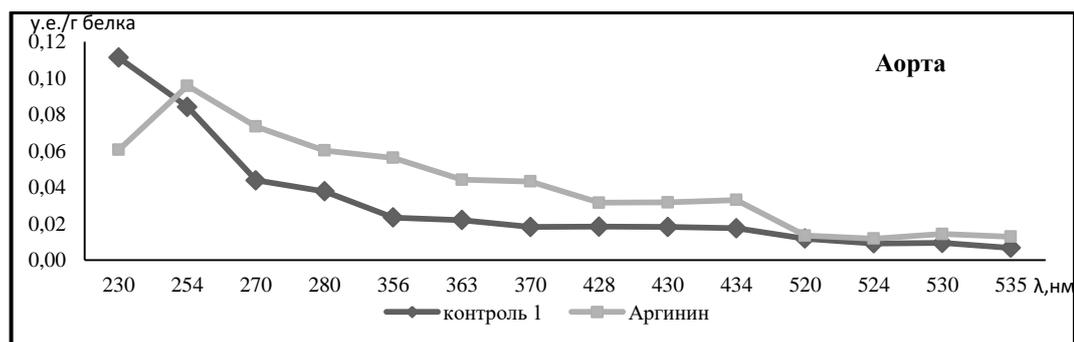
В настоящее время содержание окисленных белков активно используется для оценки окислительного стресса *in vivo*. Являясь надежным маркером интенсивности протекания окислительных реакций, продукты ОМБ могут дать существенную информацию о типе оксидантов, вовлеченных в этот процесс [46].

Карбонильные производные белков - это довольно стабильные продукты, образующиеся при участии аминокислотных остатков аргинина, лизина, пролина, треонина с образованием аддуктов Михаэля [63], помимо этого существует путь с участием аминокислотных остатков лизина, цистеина и гистидина с продуктами перекисного окисления липидов. Известно, что процесс карбонилирования аргинина и лизина сопровождается потерей одного или более атомов азота [52]. Карбонильные производные белков могут дополнительно образовываться в процессе гликооксидации/гликирования аминогрупп лизина [52].

3.2.1. Оценка содержания продуктов окислительной модификации белков в изучаемых тканях

В нашем исследовании в контрольных группах отмечается смещение площадей спектра в сторону АДНФГ (таблица 1-3 в приложении; рисунок 1-15).

Под влиянием аргинина 500 мг/кг отмечается некоторое увеличение содержания карбонильных производных в стенке грудной аорты, что позволяет сделать предположение, об окислительном повреждении аминокислотных остатков как нейтрального так и основного характера (таблица 1 в приложении, рисунок 9). Статистически значимые изменения обнаружены только для КДНФГ_{uv}.



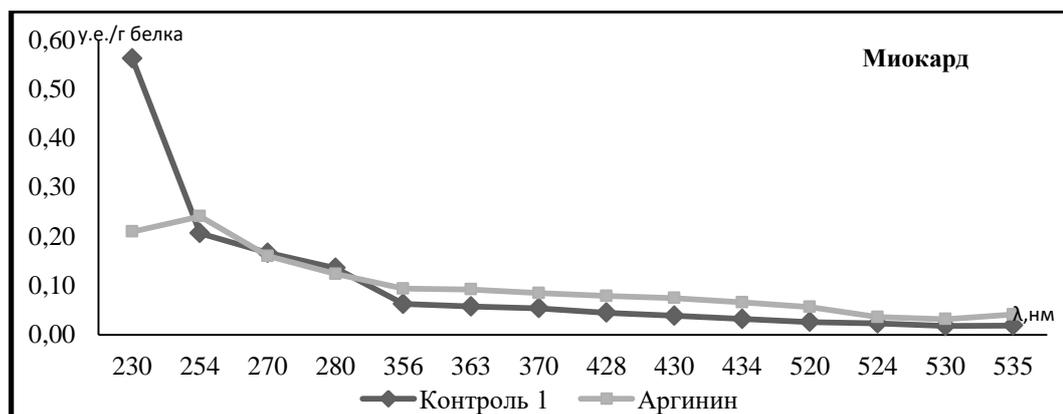
Показатель	Контроль 1		L-аргинин	
	Среднее	Интервал	Среднее	Интервал
S АДНФГ _{uv}	6,04	[5,29;7,42]	7,51	[6,17; 26,22]
S АДНФГ _{vs}	1,37	[1,01; 2,04]	2,21	[1,28; 4,16]
S КДНФГ _{uv}	1,15	[0,98; 2,02]	2,34	[1,41; 3,84] *
S КДНФГ _{vs}	0,2	[0,17; 0,32]	0,3	[0,17; 0,76]
S ОМБ	8,63	[7,73; 11,79]	12,57	[10,22; 34,98]

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 9. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в участке грудной аорты под действием L-аргинина в дозе 500 мг/кг (y.e./г белка)

Наблюдаемый статистически не значимый рост показателей общего содержания ОМБ в миокарде, сопровождается статистически значимыми изменениями компонентов спектра: снижение АДНФГ нейтрального характера; нарастание АДНФГ основного характера и обеих групп КДНФГ (таблица 2 в приложении, рисунок 10).



Показатель	Контроль 1		L-аргинин	
	Среднее	Интервал	Среднее	Интервал
S АДНФГ _{uv}	21,28	[19,58; 22,80]	18,97	[18,30; 19,10] *
S АДНФГ _{vs}	3,25	[2,28; 5,21]	6,23	[5,41; 8,02] *
S КДНФГ _{uv}	3,28	[0,99; 4,77]	5,24	[4,79; 7,79] *
S КДНФГ _{vs}	0,44	[0,42; 0,71]	0,89	[0,83; 1,27] *
S ОМБ	28,23	[23,79; 32,99]	31,33	[29,64; 36,17]

Примечание:

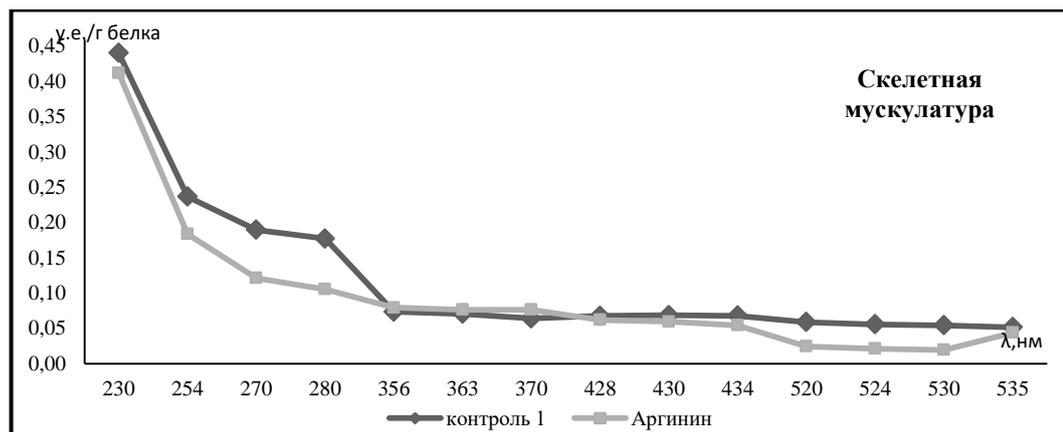
* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 10. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в миокарде под действием L-аргинина в дозе 500 мг/кг (у.е./г белка)

Снижение суммарного содержания карбонильных производных (статистически значимое) в скелетной мускулатуре (таблица 3 в приложении, рисунок 11), на фоне статистически значимого уменьшения содержания АДНФГ_{uv}, может свидетельствовать о запуске механизмов

вторичной антиоксидантной защиты [2, 69], с подавлением окислительной модификации белков в исследуемой ткани.

Под влиянием L- аргинина отмечается статистически значимое снижение суммарного содержания карбонильных производных только в скелетной мускулатуре; в ткани аорты и миокарда статистически значимых отличий не отмечается.



Показатель	Контроль 1		L-аргинин	
S АДНФГ _{ув}	23,17	[22,34; 24,78]	17,36	[14,24; 20,21] *
S АДНФГ _{vs}	6,3	[5,78; 6,81]	4,04	[2,71; 6,31]
S КДНФГ _{ув}	4,26	[4,26; 6,31]	4,5	[2,69; 5,85]
S КДНФГ _{vs}	1,06	[1,05; 1,28]	0,88	[0,34; 1,34]
S ОМБ	35,01	[33,43; 38,96]	27,08	[21,80; 33,15] *

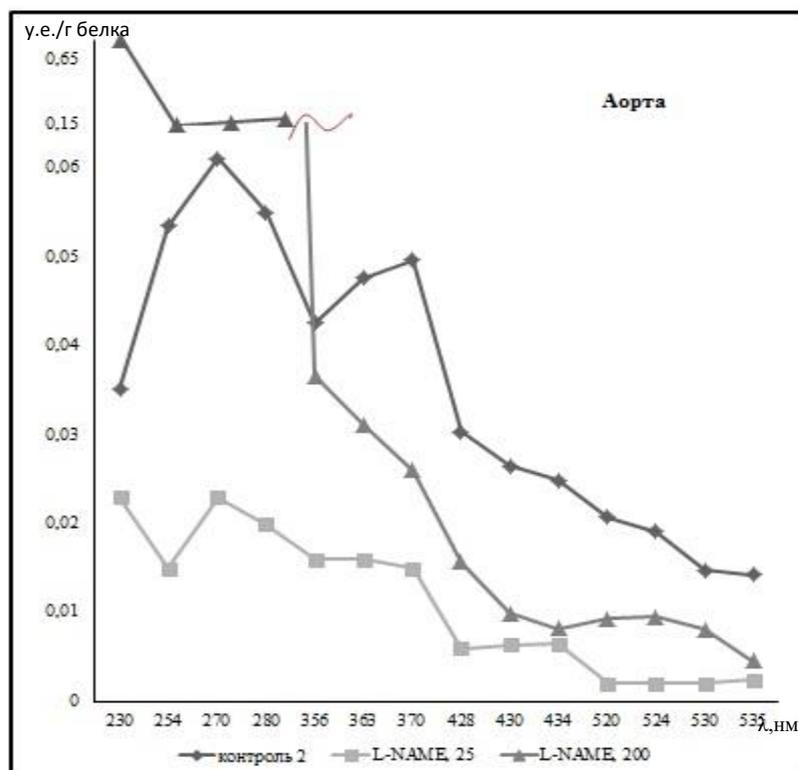
Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 11. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в скелетной мускулатуре под действием L-аргинина 500 мг/кг (y.e./г белка)

Изменения, протекающие в экспериментальной модели, созданной с помощью неселективного ингибитора NO-синтазы, могут быть охарактеризованы как подавление окислительной модификации белков ткани грудной аорты, с явным смещением спектра поглощения в сторону

альдегидных и кетонных группировок аминокислотных остатков нейтрального характера (таблица 1 в приложении, рисунок 12).



Показатель	Контроль 2	L-NAME, 25	L-NAME, 200
S АДНФГ _{uv}	7,05 [3,28; 10,53]	4,2 [3,85; 8,77] ▲	23,3 [21,24; 27,83] * •
S АДНФГ _{vs}	2,36 [1,06; 3,57]	0,7 [0,48; 2,14]	1,07 [0,63; 1,53]
S КДНФГ _{uv}	2,66 [1,2; 3,61]	0,72 [0,36; 2,55] ▲	1,27 [0,73; 1,98]
S КДНФГ _{vs}	0,35 [0,17; 0,61]	0,11 [0,06; 0,31] ▲	0,14 [0,06; 0,24] *
S ОМБ	13,65 [5,72; 15,92]	5,48 [5,09; 13,69] ▲	26,55 [23,00; 29,71] * •

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 12. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в участке грудной аорты под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг и 200 мг/кг (у.е./г белка)

В группе статистически значимые отличия от контроля не отмечаются. Существующие статистически значимые данные, говорят об отличии группы подвергающейся воздействию L-NAME, 25 мг/кг от группы, формирующей свой ответ под влиянием аргинина: помимо общей площади ОМБ, это АДНФГ_{uv} и КДНФГ обоих исследуемых спектров.

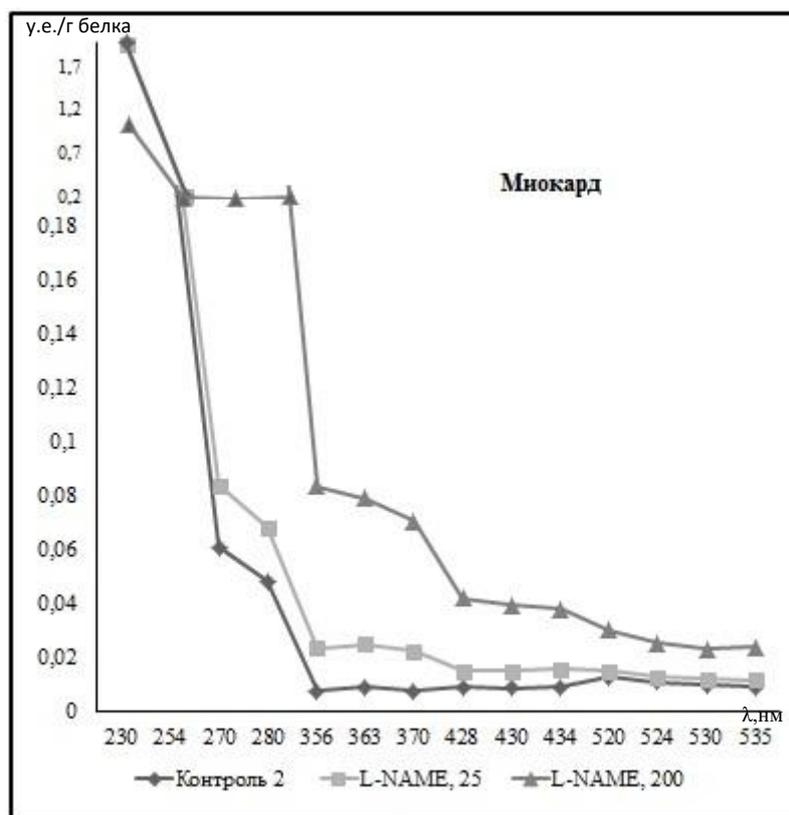
Увеличение дозы неселективного ингибитора NOS до 200 мг/кг приводит к нарастанию показателей со статистически значимыми отличиями суммарного количества динитрофенилгидразонов и АДНФГ_{uv}, а S КДНФГ_{vs} снижается относительно контрольной группы. Причем, общее количество ДНФГ нарастает в 2 и более раза превышая показатели группы с аргинином .

Данные свидетельствуют о полном нивелировании эффекта ингибитора, одной из причин может быть истощение ресурса субстрата оксида азота, при этом блокатор остается не востребован, вследствие отсутствия пути биохимического синтеза NO.

Возможен и другой путь образования NO, без участия синтазы оксида азота, в результате чего эффект ингибитора может так же остаться не задействован [7,8,19].

Дополнительно S ОМБ и АДНФГ_{uv} в группе с более высокой дозой блокатора синтеза оксида азота статистически значимо увеличивается относительно животных, получавших L-NAME, 25 мг/кг

Участок миокарда L-NAME-зависимых животных, 25 мг/кг (таблица 2 в приложении, рисунок 13) демонстрирует динамику выраженного многократного подавления окислительной деструкции относительно контрольной и аргинин-сформированной групп; все показатели статистически значимы.



Показатель	Контроль 2	L-NAME, 25	L-NAME, 200
S АДНФГ _{uv}	33,27 [25,03; 38,44]	2,65 [1,11; 5,69] * ▲	28,94 [18,82; 42,48] •
S АДНФГ _{vs}	1 [0,81; 1,09]	0,36 [0,28; 0,55] * ▲	2,12 [0,06; 6,55] •
S КДНФГ _{uv}	0,5 [0,41; 1,17]	0,7 [0,67; 0,95] ▲	2,53 [0,62; 5,86] * •
S КДНФГ _{vs}	0,2 [0,13; 0,23]	0,06 [0,04; 0,23] * ▲	0,34 [0,02; 1,12] •
S ОМБ	35,14 [26,79; 40,19]	3,73 [2,14; 6,78] * ▲	34,76 [23,78; 55,31] •

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 13. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в миокарде под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг и 200 мг/кг экспериментальных и контрольных животных (y.e./г белка)

Увеличение дозы L-NAME до 200 мг/кг вызывает незначительное снижение общего количества модифицированных белков по отношению к показателям контроля; S КДФГ_{uv} статистически значимо возрастает относительно контроля. Нарастающий карбонильный стресс приводит к увеличению значений до показателей группы с введением аргинина, сумма динитрофенилгидразонов и АДНФГ видимого спектра даже превышает значения указанной группы. Увеличение количества модифицированных белков, статистически значимое относительно более низкой дозы, связан с нивелированием действия ингибитора NO-синтаз.

Проявляя единообразие изменений с тканями аорты и миокарда, скелетная мышца демонстрирует статистически значимое снижение общего количества ОМБ и АДНФГ_{uv}, регистрирующиеся в ультрафиолетовом спектре (таблица 3 в приложении, рисунок 14). Все показатели характеризуются статистически значимым снижением относительно группы с введением аргинина.

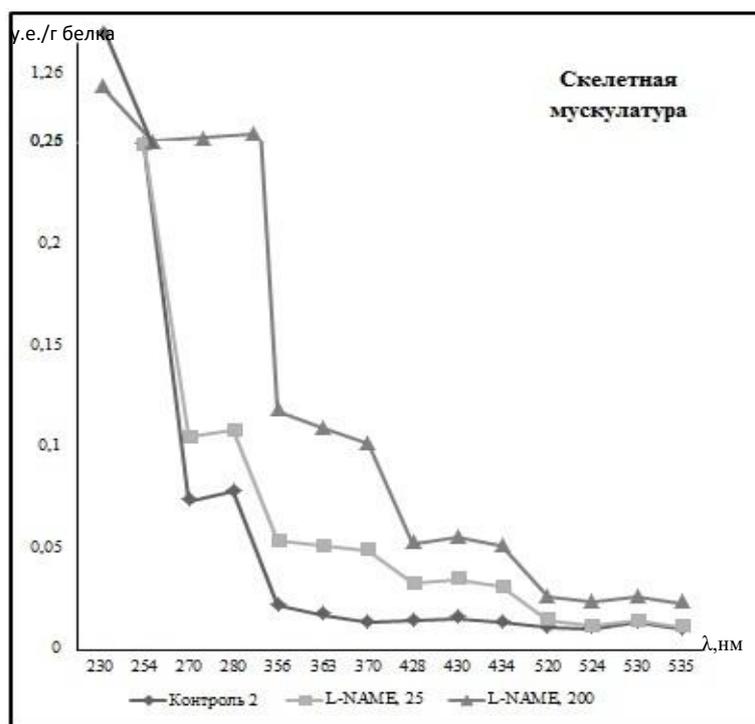
Одновременно с увеличением дозы блокатора NO-синтазы до 200 мг/кг отмечен рост всех показателей данной группы по сравнению с более низкой дозой вещества: статистически значимо изменяются - общее количество карбонильных производных белков и S АДНФГ_{uv}.

В группе с дозой L-NAME 200мг/кг показатели карбонильного стресса превышают даже контрольные значения.

Возможно, избыточное содержание ингибитора NO-синтазы запускает иные механизмы синтеза оксида азота, а так же освобождение его из собственных депо клетки по механизму обратной связи.

Неселективный блокатор NO-синтазы в дозе 25 мг/кг во всех исследуемых образцах мышечных тканей обнаруживает снижение S ОМБ. Группа животных, подвергающихся воздействию L-NAME в дозе 200 мг/кг так же проявляет единообразие изменений в тканях относительно суммы

окислительных модифицированных белков и $S_{\text{АДНФГ}}_{\text{uv}}$, статистически значимый рост показателей относительно группы с более низкой дозой.



Показатель	Контроль 2	L-NAME, 25	L-NAME, 200
$S_{\text{АДНФГ}}_{\text{uv}}$	31,87 [26,54; 35,12]	3,58 [2,04; 5,44] * ▲	41,55 [21,92; 67,48] •
$S_{\text{АДНФГ}}_{\text{vs}}$	1,16 [0,64; 2,71]	1,21 [0,53; 2,34] ▲	1,44 [0,17; 3,73]
$S_{\text{КДНФГ}}_{\text{uv}}$	0,9 [0,75; 3,60]	1,81 [1,29; 2,85] ▲	2,64 [1,02; 3,13]
$S_{\text{КДНФГ}}_{\text{vs}}$	0,22 [0,11; 0,41]	0,12 [0,05; 0,35] ▲	0,25 [0,02; 0,73]
$S_{\text{ОМБ}}$	35,81 [28,82; 37,13]	7,75 [3,90; 8,14] * ▲	44,67 [26,46; 70,69] •

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 14. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в скелетной мускулатуре под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг и 200 мг/кг (y.e./г белка)

Таким образом, неселективный блокатор NO-синтазы в дозе 25 мг/кг во всех исследуемых образцах мышечных тканей вызывает снижение содержания окислительно модифицированных белков. При этом повышение дозы до 200мг/кг парадоксально возвращает показатели к исходному уровню.

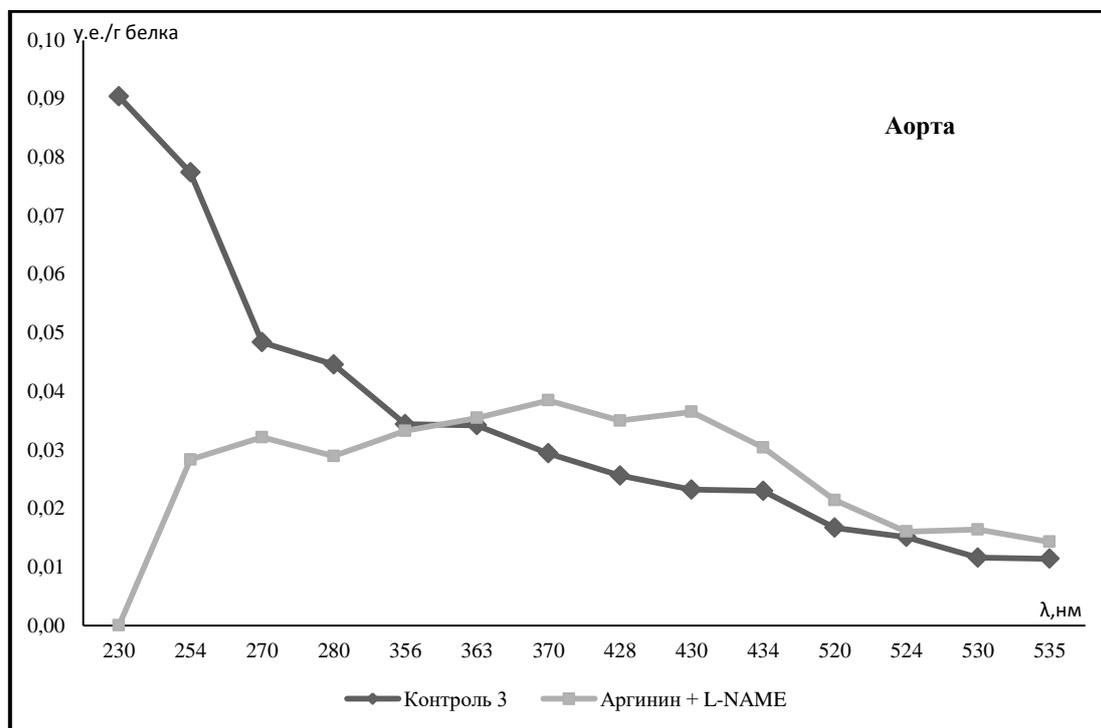
При введении L-NAME на фоне применения аргинина в участке грудной аорты наблюдается снижение суммарной площади ОМБ, статистически значимый рост КДНФГ происходит на фоне снижения АДНФГ_{uv}.

Занимая промежуточное положение, результаты группы дополнительно формируют статистически значимые отличия у: S АДНФГ_{uv} - снижается относительно экспериментальной группы с аргинином; АДНФГ_{vs} и обе группы КДНФГ - увеличиваются по сравнению с экспериментальной группой с L-NAME, 25 мг/кг (таблица 1 в приложении, рисунок 15). Преобладающие статистически значимые отличия от группы блокатора NO-синтазы говорят о снижении его эффекта.

Динамика изменений в группе совместного введения аргинина и L-NAME, 25 мг/кг в участке ткани миокарда характеризуется угнетением окислительного карбонилирования относительно контрольной группы (таблица 2 в приложении), статистически значимо отличается общая площадь окислительной модификации белков и АДНФГ нейтрального характера, резкое снижение прекрасно отражает представленный график (рисунок 16).

Следует отметить наличие для всех данных статистически значимых отличий от группы с изолированным применением модуляторов синтеза оксида азота, кроме КДНФГ основного характера (статистически значимо отличается только от L-NAME-принимавших животных), что

позволяет предположить преобладание действия ингибитора над стимулятором синтеза оксида азота.



Показатель	Контроль 3		L-аргинин + L-NAME, 25	
S АДНФГ _{uv}	6,74	[3,28; 10,53]	5,09	[4,04; 6,17] ▲
S АДНФГ _{vs}	1,95	[1,01; 3,57]	2,39	[2,11; 3,75] * •
S КДНФГ _{uv}	2,02	[0,98; 3,61]	2,64	[1,46; 3,97] * •
S КДНФГ _{vs}	0,31	[0,17; 0,61]	0,39	[0,23; 0,62] * •
S ОМБ	11,79	[5,72; 15,92]	10,16	[9,24; 13,7]

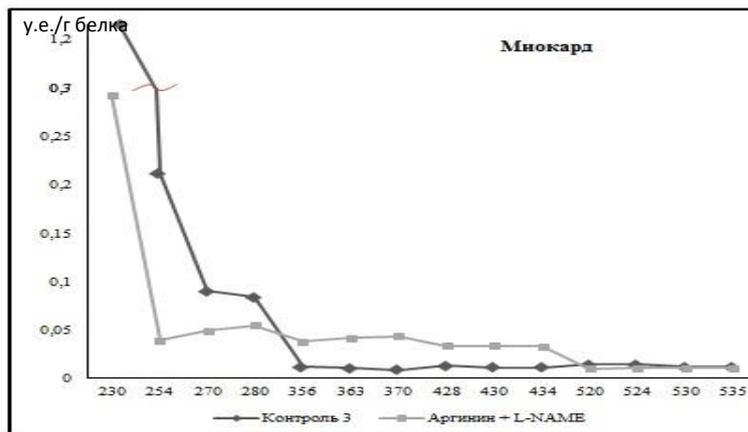
Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 15. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в участке грудной аорты под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг на фоне применения L-аргинина 500 мг/кг (y.e./г белка)



Показатель	Контроль 3		L-аргинин + L-NAME, 25	
S АДНФГ _{uv}	27,64	[19,58; 38,44]	9,48	[4,30; 12,17] * ▲ •
S АДНФГ _{vs}	1,06	[0,81; 5,21]	2,04	λ _{nm} [0,68; 5,92] ▲ •
S КДНФГ _{uv}	0,77	[0,41; 4,77]	2,58	[0,81; 4,90] ▲ •
S КДНФГ _{vs}	0,22	[0,13; 0,71]	0,28	[0,10; 1,32] •
S ОМБ	32,36	[23,79; 40,19]	13,3	[5,90; 24,31] * ▲ •

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

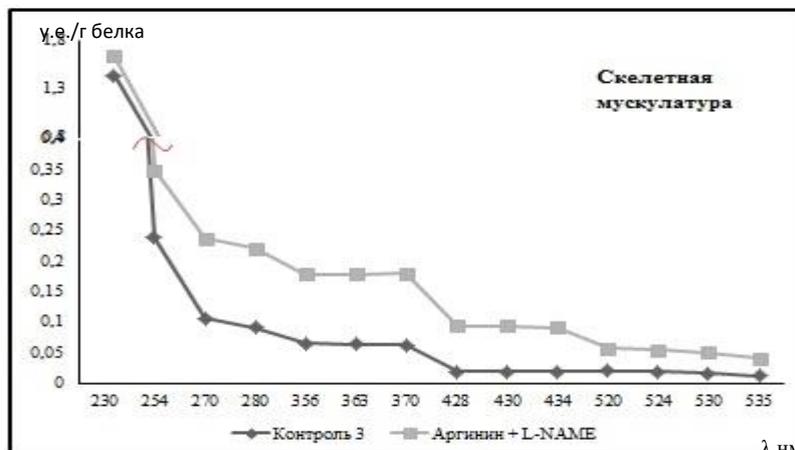
▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 16. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в миокарде под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг на фоне применения L-аргинина 500 мг/кг (у.е./г белка)

Динамика изменений суммарной площади окислительной модификации белков в скелетной мускулатуре схожа с изменениями в левом желудочке сердца крыс экспериментальной группы регуляторов синтеза оксида азота (рисунок 16 и 17). На фоне незначительного снижения S ОМБ статистически значимо отличаются от группы контроля показатели нейтральных аминокислотных остатков и S АДНФГ_{vs} (таблица

3 в приложении). Говорить о преобладании эффектов аргинина у данных животных позволяют статистически значимые отличия от животных с введением L-NAME, 25 мг/кг.



Показатель	Контроль 3		L-аргинин + L-NAME, 25	
S АДНФГ _{uv}	27,32	[22,34; 35,12]	16,92	[8,30; 24,40] * •
S АДНФГ _{vs}	1,91	[0,64; 6,81]	5,06	[3,11; 12,78] * •
S КДНФГ _{uv}	3,06	[0,75; 6,31]	6,9	[3,48; 9,38] * •
S КДНФГ _{vs}	0,34	[0,11; 1,28]	0,77	[0,39; 2,56] •
S ОМБ	35,44	[28,82; 38,96]	30,88	[16,31; 47,04] •

Примечание:

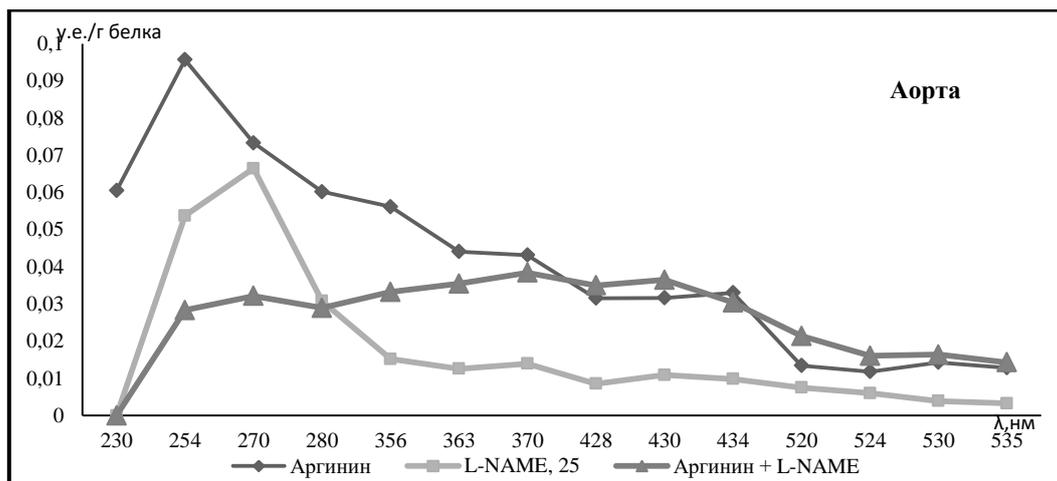
- * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)
- ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 17. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в скелетной мускулатуре под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг на фоне применения L-аргинина 500 мг/кг (у.е./г белка)

Единообразие изменений в группе введения аргинина на фоне L-NAME, 25 мг/кг характеризуется снижением S ОМБ, показатели занимают промежуточное положение между экспериментальной группой активатора

и ингибитора синтеза оксида азота (таблица 1-3 в приложении). Возможно, дальнейшее увеличение количества аргинина приведет к полному исчезновению эффекта блокатора NO-синтазы.

Анализируя графики (рисунок 18-19), полученные с помощью регистрации оптической плотности можно лишь удостовериться в ранее выдвинутой гипотезе.



Показатель	L-аргинин		L-NAME, 25		L-аргинин + L-NAME, 25	
S АДНФГ _{uv}	7,51	[6,17; 26,22]	4,2	[3,85; 8,77] ▲	5,09	[4,04; 6,17] ▲
S АДНФГ _{vs}	2,21	[1,28; 4,16]	0,7	[0,48; 2,14]	2,39	[2,11; 3,75] * •
S КДНФГ _{uv}	2,34	[1,41; 3,84] *	0,72	[0,36; 2,55] ▲	2,64	[1,46; 3,97] * •
S КДНФГ _{vs}	0,3	[0,17; 0,76]	0,11	[0,06; 0,31] ▲	0,39	[0,23; 0,62] * •
S ОМБ	12,57	[10,22; 34,98]	5,48	[5,09; 13,69] ▲	10,16	[9,24; 13,7]

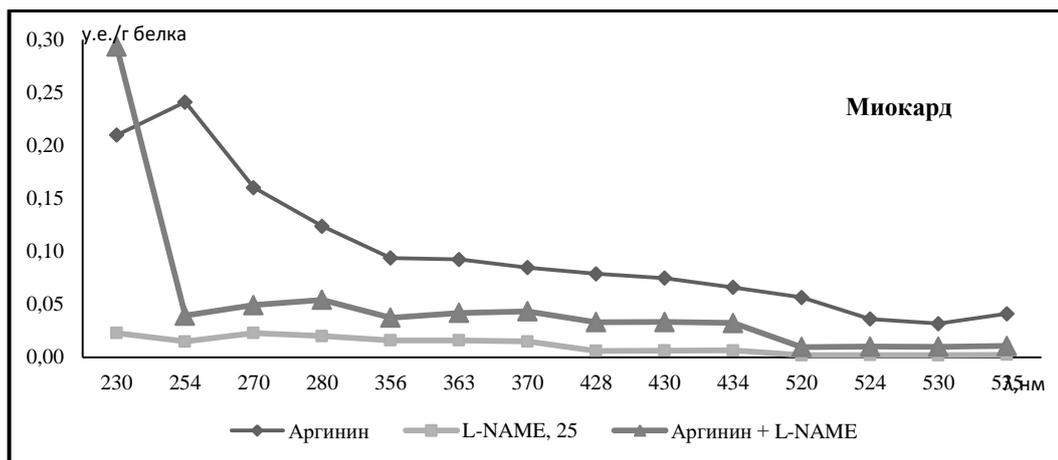
Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 18. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в участке грудной аорты под действием L-аргинина и/или L-NAME (y.e./г белка)



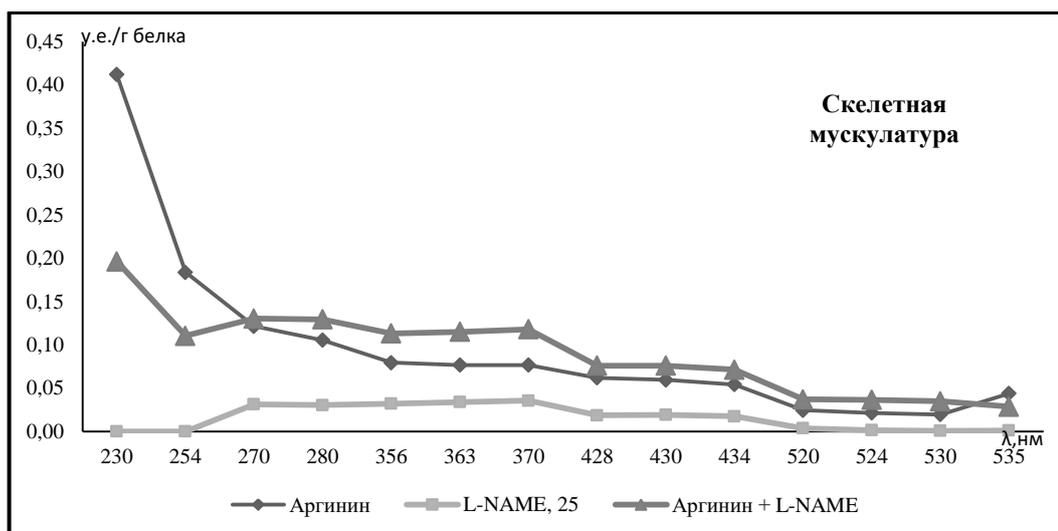
Показатель	L-аргинин	L-NAME, 25	L-аргинин + L-NAME, 25
S АДНФГ _{uv}	18,97 [18,30; 19,10] *	2,65 [1,11; 5,69] * ▲	9,48 [4,30; 12,17] * ▲•
S АДНФГ _{vs}	6,23 [5,41; 8,02] *	0,36 [0,28; 0,55] * ▲	2,04 [0,68; 5,92] ▲•
S КДНФГ _{uv}	5,24 [4,79; 7,79] *	0,7 [0,67; 0,95] ▲	2,58 [0,81; 4,90] ▲•
S КДНФГ _{vs}	0,89 [0,83; 1,27] *	0,06 [0,04; 0,23] * ▲	0,28 [0,10; 1,32] •
S ОМБ	31,33 [29,64; 36,17]	3,73 [2,14; 6,78] * ▲	13,3 [5,90; 24,31] * ▲•

Примечание:

- * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)
- ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 19. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в миокарде под действием L-аргинина и/или L-NAME (y.e./г белка)

Скелетная мускулатура характеризуется графиком (рисунок 20) с максимальными показателями группы совместного введения L-NAME, 25 мг/кг и аргинина, что может дополнительно подтверждать, гипотезу о том, что с увеличением дозы аргинина нивелируется эффект блокатора NO-синтазы.



Показатель	L-аргинин		L-NAME, 25		L-аргинин + L-NAME, 25	
S АДНФГ _{uv}	17,36	[14,24; 20,21] *	3,58	[2,04; 5,44] * ▲	16,92	[8,30; 24,40] * •
S АДНФГ _{vs}	4,04	[2,71; 6,31]	1,21	[0,53; 2,34] ▲	5,06	[3,11; 12,78] •
S КДНФГ _{uv}	4,5	[2,69; 5,85]	1,81	[1,29; 2,85] ▲	6,9	[3,48; 9,38] * •
S КДНФГ _{vs}	0,88	[0,34; 1,34]	0,12	[0,05; 0,35] ▲	0,77	[0,39; 2,56] •
S ОМБ	27,08	[21,80; 33,15] *	7,75	[3,90; 8,14] * ▲	30,88	[16,31; 47,04] •

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 20. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в скелетной мускулатуре под действием L-аргинина и/или L-NAME (у.е./г белка)

Критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal - Wallis ANOVA H) относится к непараметрическим методам и применяется в случаях, когда распределение отклика неизвестно, предназначен для проверки равенства медиан нескольких выборок. Данный критерий является многомерным обобщением критерия Манна-Уитни. Иными словами, данный критерий

позволяет выявить наличие статистически значимой разницы между несколькими группами одновременно. Следует подчеркнуть, что подобно классическому дисперсионному анализу, тест Краскела-Уоллиса позволяет сделать заключение только следующего вида: либо «сравниваемые группы статистически значимо различаются» (например, при $p < 0,05$), либо «статистически значимых различий между группами нет» (например, при $p > 0,05$), но не позволяет сказать, где именно лежат различия.

Данные показателя критерия Kruskal – Wallis ANOVA (H) позволяют дополнительно убедиться в наличии статистически значимых отличий между группами регуляторов синтеза азота, применяемых отдельно и в сочетаниях (таблица 7).

Таблица 7 - Распределение критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах с применением L-аргинина и/или L-NAME; H; p

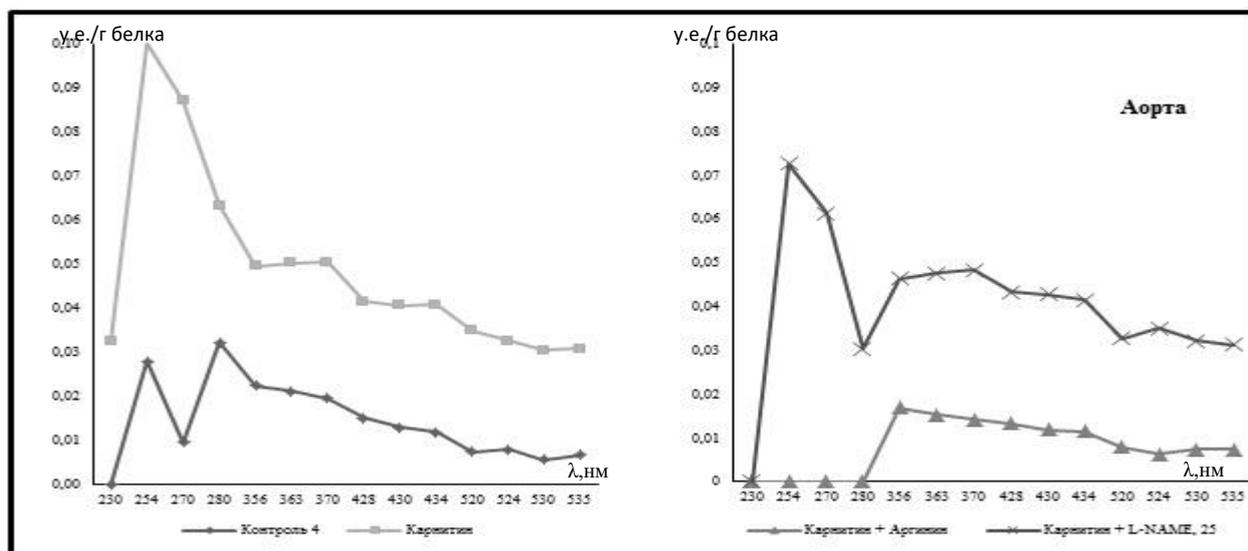
Показатель	S	S	S	S	S ОМБ
	АДНФГ _{uv}	АДНФГ _{vs}	КДНФГ _{uv}	КДНФГ _{vs}	
Аорта	H =9,09 p =0,0106*	H =7,87 p =0,0195*	H =7,40 p =0,0247*	H =8,08 p =0,0176*	H =7,35 p =0,0254*
Миокард	H =13,23 p =0,0013*	H =13,76 p =0,0010*	H =12,82 p =0,0016*	H =11,50 p =0,0032*	H =13,66 p =0,0011*
Скелетная мускулатура	H =12,60 p =0,0018*	H =13,16 p =0,0014*	H =11,94 p =0,0025*	H =12,33 p =0,0021*	H =12,60 p =0,0018*

Примечание:

* - статистически значимые отличия между группами ($p < 0,05$)

Группа животных, подвергающаяся введению карнитина в дозе 300мг/кг, характеризуется ростом всех показателей ОМБ (таблица 1 в приложении). Вероятно, именно эффект антагонизма у L-аргинина [17] и карнитина в отношении апоптоза [171] отвечает за статистически значимое

снижение показателей общей площади окислительной модификации и $S_{\text{АДНФГ}}_{\text{uv}}$ относительно контроля (таблица 1 в приложении, рисунок 21), все результаты статистически значимо отличаются от групп с использованием аргинина и карнитина.



Показатель	Контроль 4	Карнитина хлорид	Карнитина хлорид + L-аргинин	Карнитина хлорид + L-NAME, 25
$S_{\text{АДНФГ}}_{\text{uv}}$	3,65 [2,67;5,31]	8,91 [6,83; 11,58]*	0,82 [0,63;1,05]*▲■	4,78 [4,45; 9,82]
$S_{\text{АДНФГ}}_{\text{vs}}$	0,98 [0,58; 2,99]	3,6 [2,44; 4,72] *	0,97 [0,74; 1,85] ▲■	3,59 [2,07; 4,61] *•
$S_{\text{КДНФГ}}_{\text{uv}}$	1,17 [0,63; 3,08]	3,01 [1,63; 5,57] *	0,9 [0,63; 1,42] ▲	3 [1,76; 4,43] *•
$S_{\text{КДНФГ}}_{\text{vs}}$	0,17 [0,05; 0,35]	0,61 [0,40; 0,83] *	0,16 [0,11; 0,28] ▲■	0,67 [0,30; 0,85] *•
$S_{\text{ОМБ}}$	6,68 [4,12; 1,61]	16,45 [11,83;21,98]*	2,88 [2,18; 4,34] *▲■	11,76 [8,96; 19,71] *

Примечание:

- * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)
- ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Рисунок 21. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в участке грудной аорты под действием карнитина и его сочетаний с регуляторами синтеза азота (y.e./г белка)

В модели воздействия препаратами карнитина и L-NAME (рисунок 21) данные площадей окислительной модификации белков стремятся к значениям контроля и даже превышают их, статистически значимые отличия отмечаются у всех показателей, кроме S АДНФГ_{uv}.

Статистически значимое повышение показателей относительно группы введения только блокатора NO-синтаз (у S АДНФГ_{vs}, а так же у показателей кетогрупп – S КДНФГ_{uv} и S КДНФГ_{vs}) свидетельствует о нивелировании его действия.

Статистический анализ данных групп отдельно и в сочетании с модуляторами синтеза оксида азота применения карнитина посредством критерия Kruskal - Wallis ANOVA в участке грудной аорты позволяет говорить о наличии статистических различий между группами (таблица 8).

Таблица 8 - Распределение критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах под действием карнитина хлорида и его сочетаний с регуляторами синтеза азота в аорте; Н; р

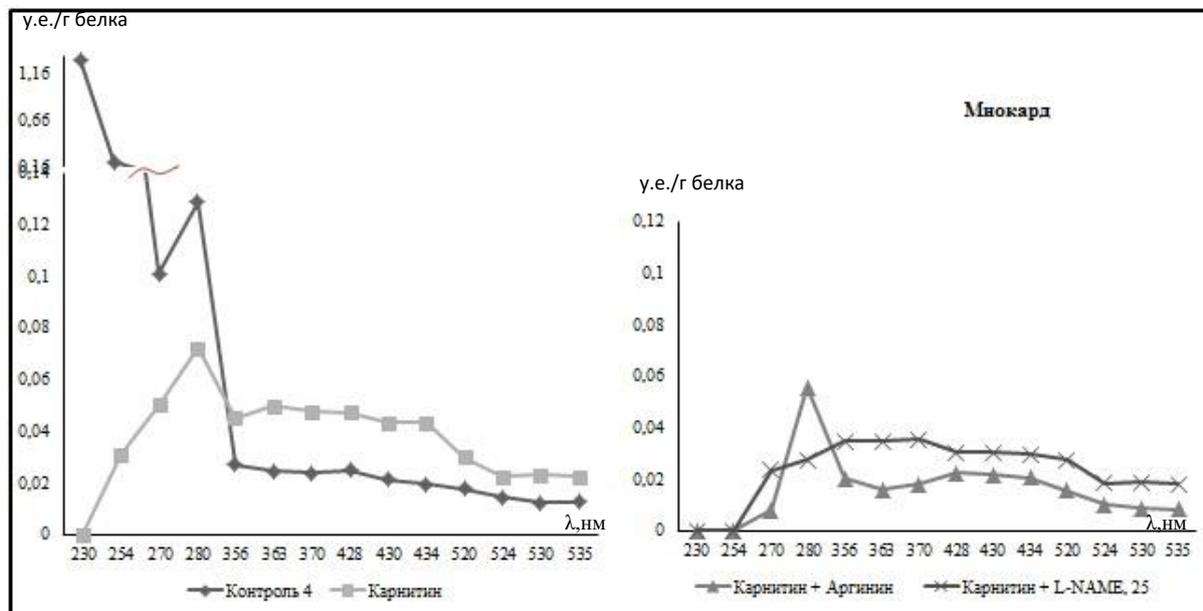
S АДНФГ _{uv}	S АДНФГ _{vs}	S КДНФГ _{uv}	S КДНФГ _{vs}	S ОМБ
Н =13,05	Н =11,56	Н =11,42	Н =11,37	Н =12,54
р =0,0015*	р =0,0031*	р =0,0033*	р =0,0034*	р =0,0019*

Примечание:

* - статистически значимые отличия между группами (р<0,05)

Карнитин в дозе 300 мг/кг в гомогенате миокарда демонстрирует статистически значимое снижение общей площади и S АДНФГ_{uv} по отношению к контрольной группе (рисунок 22). Следует отметить что, на этом фоне отмечены показатели превышающие контроль в группе S КДНФГ_{uv}. Данная картина характеризуется общеизвестным фактом наличия у карнитина антиоксидантного эффектами в миокарде в условиях стресса [122]. Таким образом, он выступает в качестве протектора от окислительных повреждений тканей [158]. В ходе научных исследований

было выяснено, что карнитин, влияя на взаимодействие системы аргиназа – оксид азота [152], обеспечивает сильное антиоксидантное действие за счет увеличения синтеза NO [109].



Показатель	Контроль 4	Карнитина хлорид	Карнитина хлорид + L-аргинин	Карнитина хлорид + L-NAME, 25
САДНФГ _{uv}	28,09 [19,58; 8,44]	6,77 [3,57; 9,61]*	3,81 [3,16; 4,69]*▲	3,65 [2,13; 4,08] *
S АДНФГ _{vs}	1,98 [0,81; 5,21]	3,4 [2,02; 6,05]	2,03 [1,43; 3,65] ▲	2,56 [1,31; 4,38] •
S КДНФГ _{uv}	1,59 [0,41; 4,77]	3,17 [1,65; 5,25] *	1,45 [1,03; 2,30] ▲	2,15 [0,69; 3,94] •
S КДНФГ _{vs}	0,31 [0,13; 0,71]	0,54 [0,16; 1,16]	0,3 [0,21; 0,64] ▲	0,44 [0,19; 0,91] •
S ОМБ	31,97 [23,79; 40,19]	13,73 [7,85; 21,89]*	8,55 [5,87; 10,45]*▲	7,98 [5,16; 13,31] *

Примечание:

- * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)
- ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Рисунок 22. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в миокарде под действием карнитина и его сочетаний с регуляторами синтеза азота (у.е./г белка)

Исходя, из этого следует предположить о суммировании эффектов препаратов при их сочетанном введении, однако, в ходе эксперимента происходит значительное снижение окислительного стресса, показатели $S_{\text{АДНФГ}_{uv}}$ и $S_{\text{ОМБ}}$ статистически значимы (таблица 2 в приложении, рисунок 22).

Все показатели статистически значимо снижаются относительно животных с применением аргинина. По-видимому, это объясняется переизбытком синтезированного посредством аргинина и карнитина оксида азота, проявляющего токсические свойства в высоких концентрациях [144] и включения биохимических механизмов защиты.

Дальнейшее статистически значимое снижение показателей общей площади окислительной модификации белков в группе животных с применением на фоне карнитина L-NAME, по сравнению с предыдущими группами, может являться признаком частичной разблокировки NO-синтаз. Статистически значимое повышение всех показателей (исключение $S_{\text{АДНФГ}_{uv}}$) относительно L-NAME-группы животных говорит о коррекции ингибитора карнитином.

Сравнительный анализ результатов в миокарде с помощью критерия Kruskal - Wallis ANOVA между изучаемыми группами карнитина не позволяет говорить о наличии статистических различий между группами (таблица 9).

Таблица 9 - Распределение критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах под действием карнитинахлорида и его сочетаний с регуляторами синтеза азота в миокарде; H; p

$S_{\text{АДНФГ}_{uv}}$	$S_{\text{АДНФГ}_{vs}}$	$S_{\text{КДНФГ}_{uv}}$	$S_{\text{КДНФГ}_{vs}}$	$S_{\text{ОМБ}}$
H =5,63 p =0,0600	H =3,17 p =0,2050	H =4,22 p =0,1211	H =2,85 p =0,2401	H =3,24 p =0,1979

Основная часть L-карнитина находится в скелетной и сердечной мышце [128], в связи, с чем графики оптических плотностей миокарда и скелетной мускулатуры (рисунок 22-23) имеют большее сходство в развитии динамики влияния препаратов на ткани, нежели участок грудной аорты.

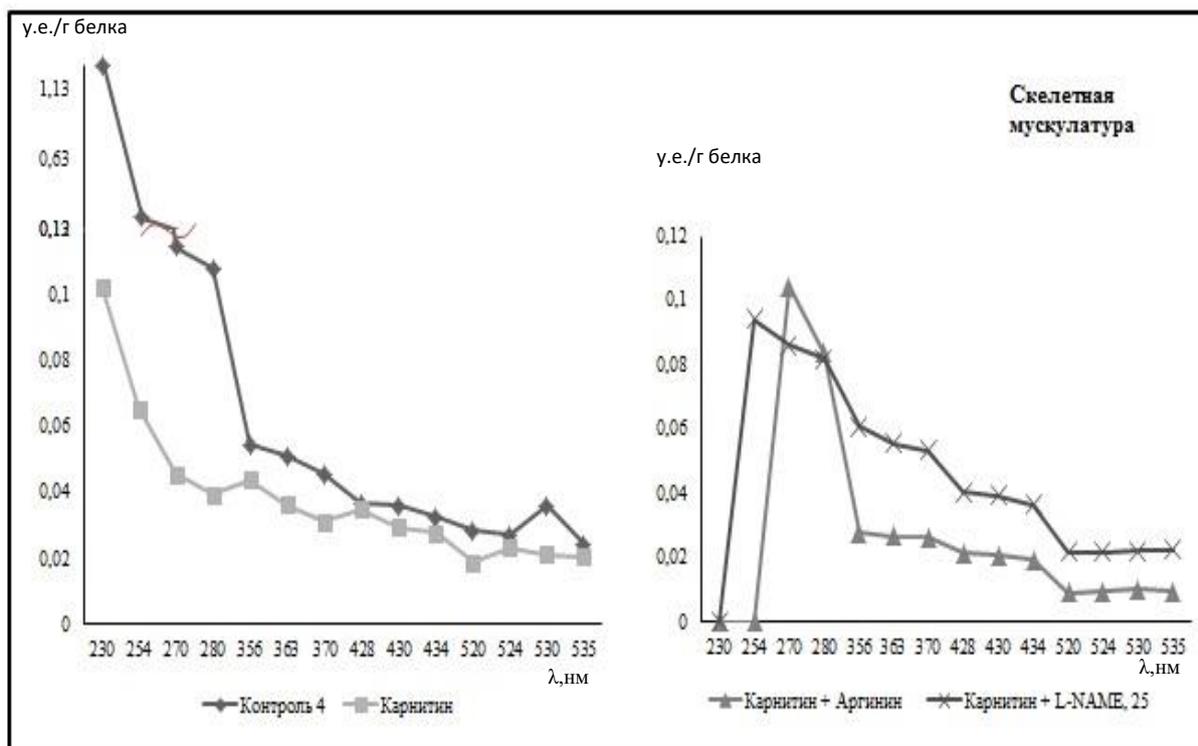
Скелетная мускулатура бедра экспериментальных животных с введением отдельно карнитина (таблица 3 в приложении, рисунок 23) демонстрирует статистически значимое снижение относительно контрольной группы общей площади и $S_{\text{АДНФГ}_{uv}}$.

Еще более выраженное подавление окислительной модификации белков относительно контроля отмечается у группы совместного введения карнитина и аргинина (статистически значимые показатели - $S_{\text{АДНФГ}_{uv}}$ и $S_{\text{ОМБ}}$). Статистически значимое снижение в группе относительно аргинин-полученных данных в данном случае, возможно, трактуется как проявление у NO цитотоксических свойств, инициирующих апоптоз [13, 30].

Подавление ОМБ в группе применения препаратов карнитина и L-NAME, 25 мг/кг (рисунок 25) против контроля наименее выражено по сравнению с другими показателями, исследуемыми в мышце. Статистически значимое снижение суммарной площади ОМБ происходит за счет статистически значимого снижения $S_{\text{АДНФГ}_{uv}}$.

Причиной статистически значимого повышения показателей в сочетанной группе относительно L-NAME-сформированной группы животных, вероятнее всего является способность карнитина повышать синтеза оксида азота, избыток которого нивелируется эффектом блокатора NO-синтазы.

$S_{\text{ОМБ}}$ дополнительно имеет статистически значимое повышение по сравнению с экспериментальной группой введения отдельного карнитина.



Показатель	Контроль 4	Карнитина хлорид	Карнитина хлорид + L-аргинин	Карнитина хлорид + L-NAME, 25
S АДНФГ _{uv}	28,61 [22,34; 35,12]	6,81 [5,45; 10,37]*	6,85 [4,04; 8,27]* [▲]	9,16 [6,05; 11,69] * [•]
S АДНФГ _{vs}	3,04 [0,64; 6,81]	2,55 [1,35; 4,24]	1,36 [1,13; 3,30] [▲]	2,81 [1,82; 4,83] [•]
S КДНФГ _{uv}	2,75 [0,75; 6,31]	2,17 [1,32; 5,10]	1,57 [1,30; 3,33] [▲]	3,07 [1,88; 5,28]
S КДНФГ _{vs}	0,54 [0,11; 1,28]	0,5 [0,29; 0,60]	0,21 [0,15; 0,59] [▲]	0,48 [0,15; 0,82] [•]
S ОМБ	34,94 [28,82; 38,96]	11,73 [9,50; 20,22]*	9,45 [6,97; 15,22]* [▲]	15,52 [10,06; 22,40]* ^{•■}

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

[▲] - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

[•] - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

[■] - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Рисунок 23. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков и их компонентов в скелетной мускулатуре под действием карнитина и его сочетаний с регуляторами синтеза азота (y.e./г белка)

Скелетная мускулатура в группах с применением карнитина демонстрирует показатели критерия Kruskal - Wallis ANOVA не характеризующие статистические различия между группами (таблица 10).

Таблица 10 - Распределение критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах под действием карнитина хлорида и его сочетаний с регуляторами синтеза азота в скелетной мускулатуре; Н; р

S АДНФГ _{uv}	S АДНФГ _{vs}	S КДНФГ _{uv}	S КДНФГ _{vs}	S ОМБ
Н =4,67	Н =3,699	Н =4,08	Н =2,84	Н =5,696
р =0,0970	р =0,1573	р =0,1299	р =0,2415	р =0,0580

3.2.2. Определение суммарного содержания карбонильных групп первичных и вторичных маркеров в белках исследуемых тканей

В настоящее время показателем, характеризующим глубину окислительного стресса, и выраженность окислительного повреждения белков является содержание карбонильных групп в белках исследуемых тканей [69, 71].

Производные альдегидов, по последним данным, принято считать ранними маркерами ОМБ, характеризующими процесс фрагментации, а кетонные – поздними маркерами [69], характеризующими степень окислительного повреждения [69] и агрегации белков, результатом которой может оказаться нарушение их нативной конформации [69]. Опасность формирования белковых фрагментов и агрегатов заключается в том, что они способны ингибировать протеолитическую систему [4].

При анализе данных регуляторов синтеза оксида азота в участке грудной аорты S АДНФГ_{uv} + S АДНФГ_{vs} и S КДНФГ_{uv} + S КДНФГ_{vs} можно сделать следующее заключение, что полученные результаты располагаются с увеличением значений в следующей последовательности: L-NAME, 25 мг/кг; аргинин + L-NAME; аргинин (таблица 11). Можно

сделать предположение, основываясь на полученных данных о том, что при стимуляции синтеза NO происходит активный рост как первичных, так и вторичных маркеров окислительного стресса. Статистически значимые нарастания относительно контроля выявлены у группы под действием аргинина, и у суммы площадей КДНФГ группы с применением L-NAME. Оба показателя экспериментальной группы с введением L-NAME имеют статистически значимые снижения по сравнению с группой животных, получавших аргинин.

Экспериментальная группа с L-NAME в дозе 200 мг/кг характеризуется значительным статистически значимым ростом ранних маркеров окислительной деструкции белков по отношению к животным, в группе контроля и принимавшим ингибитор синтеза оксида азота в дозе 25 мг/кг. Образование альдегидов происходит в условиях стимуляции свободно-радикальных превращений в клетках [22], в результате этого происходит усугубление окислительных процессов по сравнению с дозой 25 мг/кг.

При введении L-NAME на фоне применения аргинина значение суммы АДНФГ статистически значимо снижается от такового при введении аргинина, а $S_{\text{КДНФГ}_{\text{uv}}} + S_{\text{КДНФГ}_{\text{vs}}}$ статистически значимо повышается относительно показателей группы с использованием блокатора синтеза NO, что характеризует частичную блокировку NO-синтазы с преобладанием эффекта аргинина.

Показатели участка сосуда относительно групп с использованием отдельно карнитина и его сочетаний с регуляторами синтеза оксида азота (таблица 11) характеризуются нарастанием значений в следующей последовательности: карнитин + аргинин, карнитин + L-NAME, карнитин. Показатели группы животных, получавших карнитин 300 мг/кг, демонстрируют статистически значимый рост относительно контроля, что является признаком нарастания окислительной модификации белков.

Таблица 11 - Суммарное содержание первичных и вторичных маркеров окислительного стресса в аорте экспериментальных и контрольных животных (у.е./г белка); Me[*min*; *max*]

Показатель	S OMB	S АДНФГ _{uv} + S АДНФГ _{vs}	S КДНФГ _{uv} + S КДНФГ _{vs}
Контроль 1	8,63 [7,73; 11,79]	7,41 [6,56; 9,45]	1,35 [1,17; 2,34]
L-аргинин	12,57 [10,22; 34,98]	9,72 [8,14;30,39] *	2,65 [1,58; 4,60] *
Контроль 2	13,65 [5,72; 15,92]	9,41 [4,35; 12,48]	3,01 [1,37; 4,19]
L-NAME, 25	5,48 [5,09; 13,69] [▲]	4,90 [4,41; 10,91] [▲]	0,84 [0,43; 2,78]* [▲]
L-NAME, 200	26,55 [23,00; 29,71] * •	24,37 [22,21; 28,46] * •	1,42 [0,79; 2,16]
Контроль 3	11,79 [5,72; 15,92]	8,69 [4,35; 12,48]	2,33 [1,17; 4,19]
L-аргинин + L-NAME, 25	10,16 [9,24; 13,7]	7,48 [6,15; 9,92] [▲]	3,02 [1,81;4,26] •
Контроль 4	6,68 [4,12; 11,61]	4,63 [3,36; 23,26]	1,34 [0,76; 3,32]
Карнитина хлорид	16,45 [11,83; 21,98] *	12,51 [9,35; 15,91] *	3,63 [2,23; 6,06] *
Карнитина хлорид + L-аргинин	2,88 [2,18; 4,34] * [▲] ■	1,79 [1,44; 2,64] * [▲] ■	1,07 [0,74; 1,70] [▲] ■
Карнитина хлорид + L-NAME, 25	11,76 [8,96; 19,71] *	8,37 [6,89; 14,44] *	3,67 [2,07; 5,28] * •

Примечание:

- *- статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)
- ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Группа применения аргинина на фоне карнитина имеет самые низкие данные, возможно, вследствие избытка стимулирования синтеза оксида азота происходит блокировка NO-синтазы по механизму обратной связи, проявлением чего является значительное снижение маркеров ОМБ – ранние маркеры статистически значимо снижаются относительно контроля. Экспериментальная группа демонстрирует активное снижение обоих показателей относительно группы с применением аргинина и отдельно применяемого карнитина.

Введение L-NAME, 25 мг/кг на фоне приема карнитина характеризуется отсутствием эффекта ингибирования NO-синтаз, что проявляется статистически значимым ростом первичных и вторичных маркеров относительно контроля, $S \text{ КДНФГ}_{uv} + S \text{ КДНФГ}_{vs}$ дополнительно имеют статистически значимое отличие от экспериментальной группы с использованием ингибитора оксида азота.

Таким образом, полученные данные относительно участка грудной аорты во всех экспериментальных группах с применением карнитина характеризуются преобладанием АДНФГ – маркеров ранней стадии окислительной модификацией белков, характеризующие процесс фрагментации.

Характеризуя критерий Kruskal - Wallis ANOVA у групп с применением карнитина отдельно и в комбинации с регуляторами синтеза оксида азота позволяет говорить о наличии статистических различий между группами:

$$S \text{ АДНДФГ}_{uv} + S \text{ АДНДФГ}_{vs} \text{ Н} = 13,05 \text{ р} = 0,0015$$

$S \text{ КДНДФГ}_{vs} + S \text{ КДНДФГ}_{vs} \text{ Н} = 11,47 \text{ р} = 0,0032$. Воздействие в миокарде на синтез оксида азота расположило экспериментальные данные в следующем порядке по нарастающей: L-NAME, 25 мг/кг; L-аргинин + L-NAME; L-аргинин (таблица 12).

Ввиду уже доказанной причинно-следственной связи между карбонильным и оксидативным стрессом [22], можно предположить, что в результате воздействия субстрата синтеза оксида азота на сердце крыс происходит рост показателей ранних маркеров карбонильного стресса относительно контрольной группы животных (таблица 12), вследствие активации образования альдегидов, что подтверждают данные настоящего исследования; статистически значимый показатель у суммы КДНДФГ.

Группа животных, подвергшихся воздействию L-NAME, 25 мг/кг характеризуется снижением первичных маркеров окислительной деструкции (статистически значимо относительно контроля). Статистически значимое снижение относительно группы с использованием аргинина наблюдается во всех группах.

Характеризуя влияние L-NAME в дозе 200 мг/кг, было отмечено многократное увеличение окислительной модификации белков по сравнению с более низкой дозой, статистически значимый показатель у поздних маркеров. Достоверно значимые различия отмечались для обеих групп маркеров по сравнению с более низкой дозой ингибитора оксида азота.

Маркеры окислительной модификации белка группы совместного использования L-NAME на фоне введения аргинина имеют статистически значимое снижение относительно экспериментальной группы у суммы АДНДФГ. Наличие статистически значимых отличий у обеих групп по отношению к регуляторам синтеза оксида азота говорит о суммировании эффектов.

Таблица 12 - Суммарное содержание первичных и вторичных маркеров окислительного стресса в миокарде экспериментальных и контрольных животных (у.е./г белка); Me[*min*; *max*]

Показатель	S OMB	S АДНФГ _{uv} + S АДНФГ _{vs}	S КДНФГ _{uv} + S КДНФГ _{vs}
Контроль 1	28,23 [23,79; 32,99]	24,53 [22,38; 27,50]	3,72 [1,42; 5,48]
L-аргинин	31,33 [29,64; 36,17]	25,21 [24,02; 27,11]	6,13 [5,62; 9,06] *
Контроль 2	35,14 [26,79; 40,19]	34,26 [25,84; 39,54]	0,70 [0,55; 1,40]
L-NAME, 25	3,73 [2,14; 6,78] * ▲	3,01 [1,43; 6,04] * ▲	0,76 [0,71; 1,18] ▲
L-NAME, 200	34,76 [23,78; 55,31] •	31,06 [22,83; 48,33] •	2,86 [0,64; 6,98] *•
Контроль 3	32,36 [23,79; 40,19]	28,70 [22,38; 39,54]	0,99 [0,61; 5,48]
L-аргинин + L-NAME, 25	13,30 [5,90; 24,31] *▲•	11,52 [4,98; 18,09] *▲•	2,86 [0,92; 6,22] ▲•
Контроль 4	31,97 [23,79; 40,19]	30,06 [22,38; 39,54]	1,90 [0,61; 5,48]
Карнитина хлорид	13,73 [7,85; 21,89] *	10,16 [5,59; 15,59] *	3,72 [1,99; 6,30] *
Карнитина хлорид + L-аргинин	8,55 [5,87; 10,45] * ▲	5,85 [4,61; 8,34] * ▲	1,75 [1,27; 2,56] ▲
Карнитина хлорид + L-NAME, 25	7,98 [5,16; 13,31] * •	6,20 [3,44; 8,46] * •	2,59 [0,88; 4,85] •

Примечание:

*- статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

- ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Из результатов, приведенных в таблице (таблица 12), следует, что в экспериментальных группах под влиянием карнитина и его сочетаний с регуляторами синтеза азота происходит нарастание маркеров ОМБ в последовательности аналогичной участку грудной аорты: карнитин + L-аргинин, карнитин + L-NAME, карнитин.

Влияние карнитина статистически значимо снижается у маркеров ранней деструкции белка относительно контрольной группы, поздние маркеры статистически значимо повышаются в отношении уже обозначенной группы.

В группе совместного применения аргинина и карнитина, а так же L-NAME в дозе 25 мг/кг, применяемого на фоне карнитина, отмечено статистически значимое снижение ранних маркеров окислительной модификации белков против контроля. Обе группы имеют статистически значимые отличия показателей от соответствующего модулятора синтеза оксида азота.

Схожие результаты по снижению окислительного стресса в группе применения аргинин+карнитин были получены в [23].

Критерий Kruskal-Wallis ANOVA в миокарде крыс у групп с карнитином отдельно и в сочетаниях свидетельствует об отсутствии статистически значимых отличий в случае с S АДНФГ_{uv} + S АДНФГ_{vs} $H = 3,24$ $p = 0,1979$ и у S КДНФГ_{uv} + S КДНФГ_{vs} $H = 3,24$ $p = 0,1979$.

В изучаемых образцах скелетной мускулатуры крыс (таблица 13) наблюдается статистически значимое уменьшение количества первичных

маркеров в группе крыс, подвергшихся внутрижелудочному введению L-аргинина.

Показатели ингибитора NOS демонстрируют статистически значимое уменьшение $S_{\text{АДНФГ}_{uv}} + S_{\text{АДНФГ}_{vs}}$ по отношению к контролю. Обе группы маркеров статистически значимо снижаются по отношению к экспериментальной группе с использованием аргинина.

Увеличение дозы ингибитора синтеза оксида азота до 200 мг/кг приводит к многократному статистически значимому увеличению маркеров, особенно ранней ОМБ, по отношению к более низкой дозе.

Сочетанная группа с применением препаратов влияющих на NO-синтазу демонстрирует статистически значимый рост относительно ингибитора этих процессов; маркеры поздней деструкции статистически значимо нарастают относительно контроля.

С распределением показателей в группах воздействия карнитином, отдельно и в сочетаниях с применением регуляторов NO-синтазы, сложилась ситуация отличная от предыдущего варианта в тканях аорты и сердца, и группы расположились в другом порядке, по нарастающей: карнитин + аргинин, карнитин, карнитин + L-NAME.

Ранние маркеры статистически значимо снижаются против показателей контроля в группе отдельного карнитина. Сочетание аргинина и карнитина, показатели статистически значимо снижаются по отношению к аргинин-принимающим особям, скорее всего, стимулирует гиперпродукцию NO, что приводит к повреждающим эффектам, прежде всего через образования пероксинитрита; прямое связывание с белками может менять их функцию, а взаимодействие с металлосодержащими центрами необратимо повреждает ферменты [135].

Таблица 13 - Суммарное содержание первичных и вторичных маркеров окислительного стресса в скелетной мышце экспериментальных и контрольных животных (у.е./г белка); Me[*min*; *max*]

Показатель	S OMB	S АДНФГ _{uv} + S АДНФГ _{vs}	S КДНФГ _{uv} + S КДНФГ _{vs}
Контроль 1	35,01 [33,43; 38,96]	29,48 [28,12; 31,59]	5,33 [5,31; 7,37]
L-аргинин	27,08 [21,80; 33,15] *	21,39 [17,46; 26,06] *	5,38 [3,26; 7,09]
Контроль 2	35,81 [28,82; 37,13]	33,03 [27,18; 37,83]	1,12 [0,86; 4,02]
L-NAME, 25	7,75 [3,90; 8,14] * ▲	4,79 [2,57; 6,24] * ▲	1,93 [1,34; 2,99] ▲
L-NAME, 200	44,67 [26,46; 70,69] •	42,98 [23,77; 67,86] •	2,89 [1,04; 3,68] *
Контроль 3	35,44 [28,82; 38,96]	29,23 [27,96; 36,10]	3,41 [0,86; 7,37]
L-аргинин + L-NAME, 25	30,88 [16,31; 47,04] •	21,98 [11,92; 35,84] •	7,67 [4,09; 11,95]*•
Контроль 4	34,94 [28,82; 38,96]	31,65 [27,96; 36,10]	3,29 [0,86; 7,37]
Карнитина хлорид	11,73 [9,50; 20,22]*	9,35 [7,87; 14,61] *	2,66 [1,63; 5,61]
Карнитина хлорид + L-аргинин	9,45 [6,97; 15,22] * ▲	8,21 [5,29; 11,31] * ▲	1,79 [1,46; 3,92] ▲
Карнитина хлорид + L-NAME, 25	15,52 [10,06; 22,40]*•■	11,97 [7,87; 16,31]*•■	3,55 [2,19; 6,09] •

Примечание:

*- статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

- ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)
- - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

L-NAME, применяющийся на фоне карнитина демонстрирует максимальные показатели среди экспериментальных групп с карнитином в скелетной мускулатуре. Однако показатели маркеров ранней окислительной деструкции все равно остаются достоверно низкими относительно контроля. $S_{\text{АДНФГ}_{uv}} + S_{\text{АДНФГ}_{vs}}$ имеет статистически значимый рост относительно группы введения только карнитина статистически значимое повышение относительно групп с применением ингибитора синтазы оксида азота свидетельствует о преобладании эффекта карнитина.

В случае с экспериментальными группами карнитина в мышце можно сказать, однозначно обе группы не демонстрируют статистически значимые различия:

$$S_{\text{АДНДФГ}_{uv}} + S_{\text{АДНДФГ}_{vs}} \text{ Н} = 5,298 \text{ р} = 0,0707$$

$$S_{\text{КДНДФГ}_{vs}} + S_{\text{КДНДФГ}_{vs}} \text{ Н} = 4,46 \text{ р} = 0,1077.$$

3.2.3. Соотношение доли первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса

Стимуляция свободно-радикальных процессов в тканях внутренних органов вызывает усиление генерации в них эндогенных альдегидов и, как следствие этого - возникновение карбонильного стресса [22], что собственно и наблюдается нами во всех изучаемых тканях.

При изучении соотношения первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса обнаружено уменьшение доли первичных маркеров

под влиянием L-аргинина в сердечной и скелетной мускулатуре (рисунок 24). Возможно, это свидетельствует о переходе ОМБ в стадию с более низкой реакционной способностью белков: когда активные производные альдегидов уже вступили в различные биохимические реакции, а кетогруппы менее реакционные, поэтому могут накапливаться в белковых молекулах.



■ доля АДНФГ (первичные маркеры) ■ доля КДНФГ (вторичные маркеры)

Примечание:

*- статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

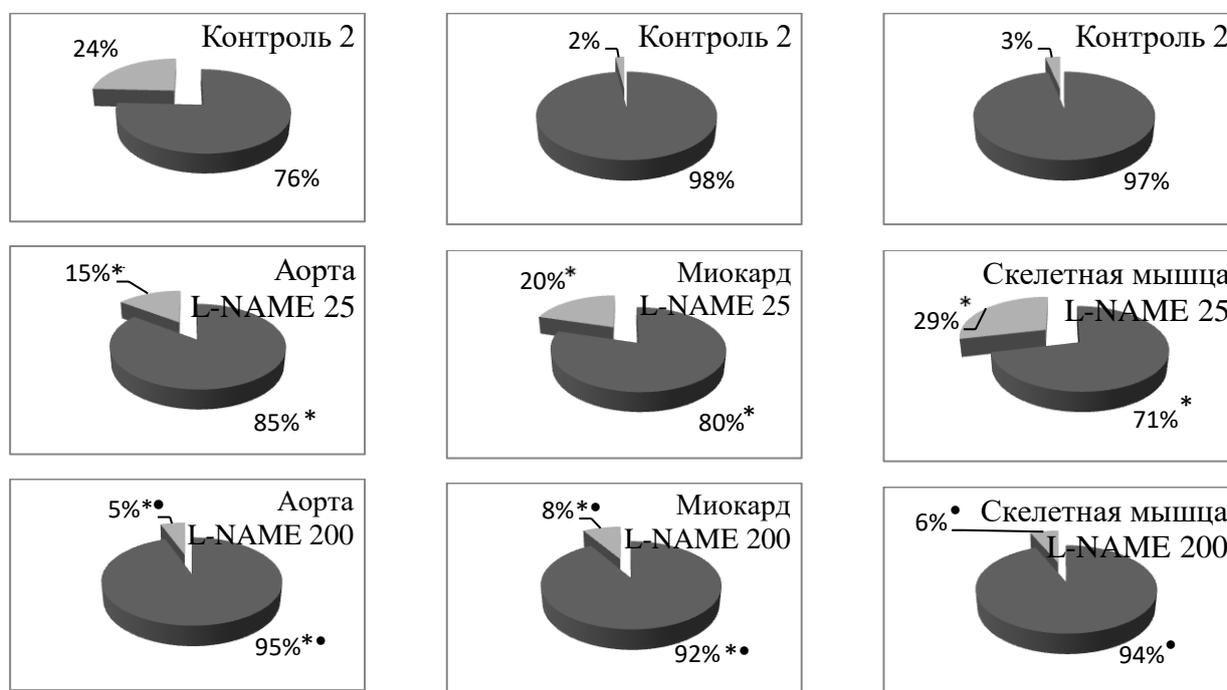
Рисунок 24. Доля первичных и вторичных маркеров относительно общего содержания карбонильных производных белков у экспериментальных и контрольных животных под воздействием L-аргинина 500 мг/кг

Изменения в ткани сосуда под действием ингибитора NO-синтазы свидетельствует о преобладании роста первичных маркеров окислительного стресса (рисунок 25), а так же о запуске процесса фрагментации белковой молекулы и нарушении нативной конформации белков с образованием крупных белковых агрегатов. Накопление белковых агрегатов обнаруживается при старении [90, 146] и ряде других

заболеваний [93], а также в условиях пониженной активности протеиназ [35].

Миокард и скелетная мускулатура напротив характеризуются статистически значимым уменьшением доли АДНФГ.

В отношении блокатора синтеза оксида азота с более высокой дозой (рисунок 25) ткани проявляют единообразие изменений в отношении увеличения доли первичных маркеров, на фоне снижения маркеров поздней деструкции - статистически значимые показатели обеих долей отмечались у аорты и миокарда.



■ доля АДНФГ (первичные маркеры) ■ доля КДНФГ (вторичные маркеры)

Примечание:

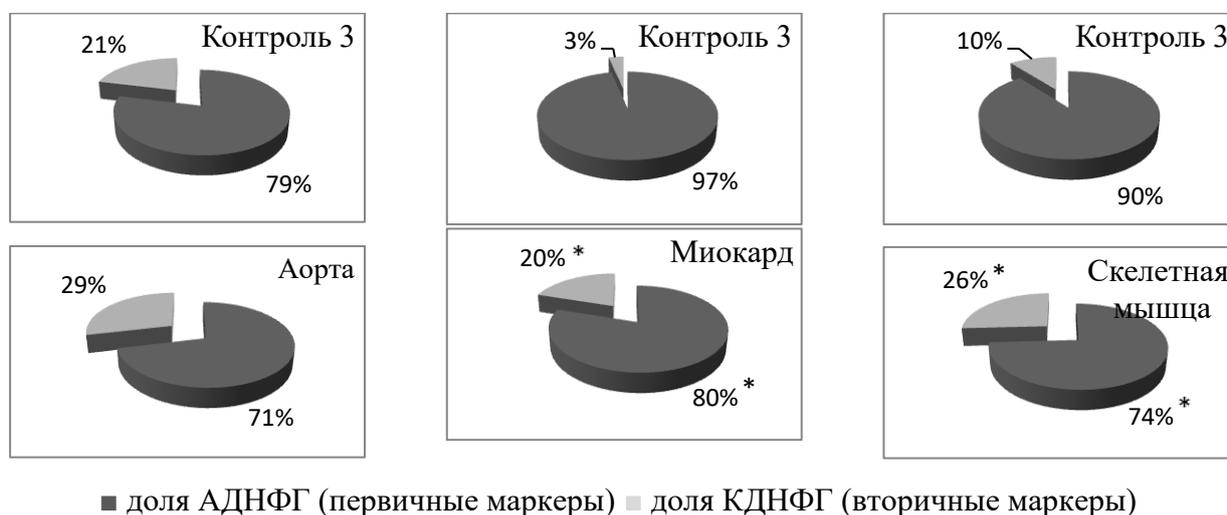
*- статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$)

Рисунок 25. Доля первичных и вторичных маркеров относительно общего содержания карбонильных производных белков у экспериментальных и контрольных животных под воздействием L-NAME, 25 мг/кг и L-NAME, 200 мг/кг

Преобладание роста вторичных маркеров окислительного стресса характерно для всех исследуемых тканей в группе введения экспериментальным животным L-NAME в дозе 25 мг/кг на фоне длительного приема L-аргинина (рисунок 26). Статистически значимыми являются результаты уменьшения доли АДНФГ и увеличения доли КДНФГ в миокарде и скелетной мускулатуре.

Уменьшение доли вторичных маркеров может свидетельствовать о снижении степени ОМБ или о повышении скорости утилизации измененного белка (вторичный антиоксидантный эффект) [16].



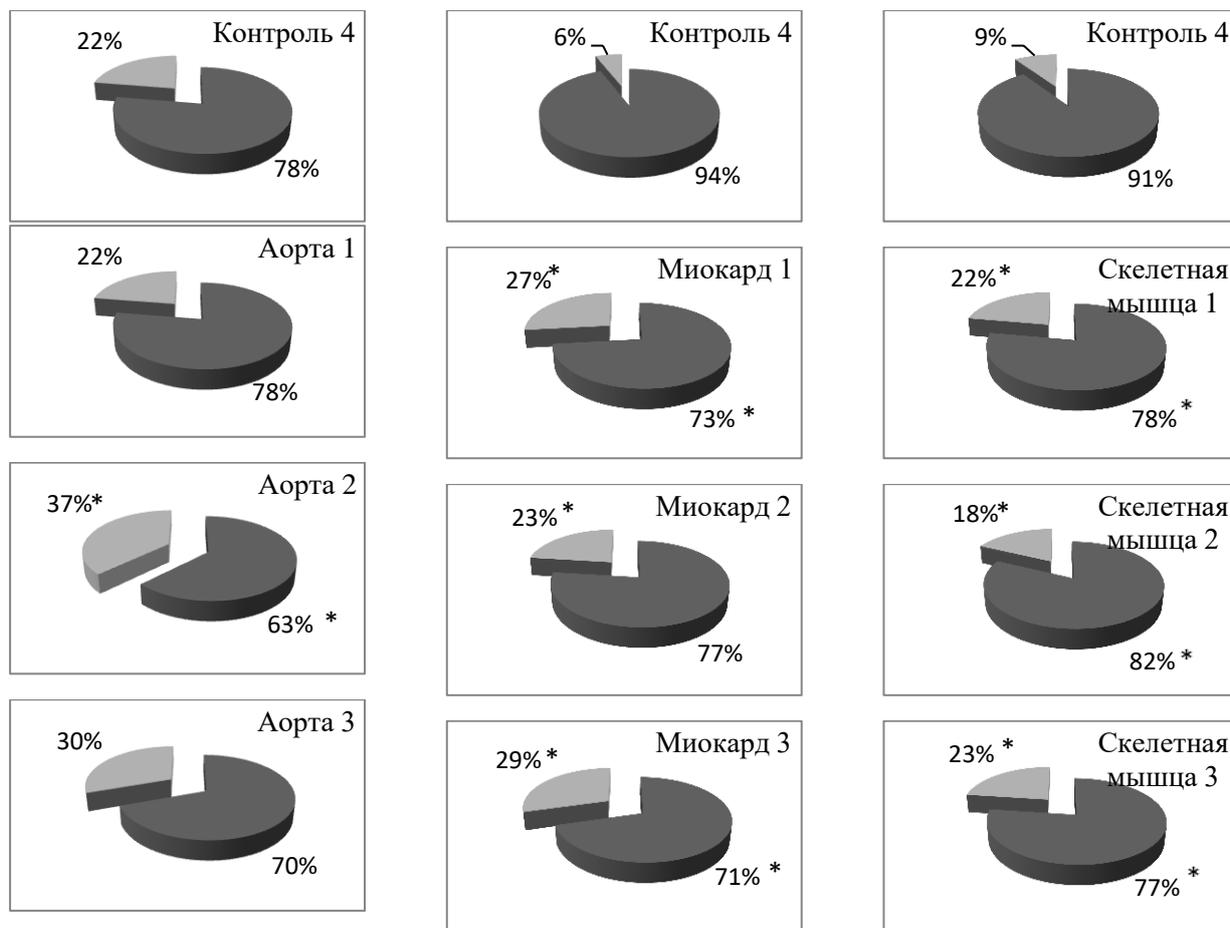
Примечание:

*- статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 26. Доля первичных и вторичных маркеров относительно общего содержания карбонильных производных белков у экспериментальных и контрольных животных под воздействием L-аргинина + L-NAME, 25 мг/кг

В отношении карнитина и групп его совместного применения с модуляторами синтеза оксида азота (рисунок 27) наблюдается завидное единообразие в отношении всех изучаемых тканей проявляющееся в виде статистически значимого снижения первичных маркеров карбонильного стресса относительно контрольных групп. В тканях с поперечно-полосатой

мускулатурой эта тенденция выражена более явно, нежели в гладкой мускулатуре сосуда.



■ доля АДНФГ (первичные маркеры) ■ доля КДНФГ (вторичные маркеры)

Примечание:

1 – группа воздействия карнитина хлорида 300 мг/кг

2 – группа воздействия карнитина хлорида 300 мг/кг и L-аргинином 500 мг/кг

3 – группа воздействия карнитина хлорида 300 мг/кг и L-NAME 25 мг/кг

*- статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 27. Доля первичных и вторичных маркеров относительно общего содержания карбонильных производных белков у экспериментальных и контрольных животных под воздействием карнитина хлорида 300 мг/кг, L-аргинина 500мг/кг, L-NAME, 25 мг/кг и их сочетанием

Если в аорте карнитин отдельно и в сочетании с блокатором синтеза оксида азота усугубляют окислительный стресс, то в сердечной и скелетной мускулатуре наблюдается обратный эффект. Группа с введением карнитина демонстрирует статистически значимый рост доли кетогрупп и снижения производных альдегидов; исключение – гомогенат аорты, статистически значимые результаты не получены. Таким образом, исходя из полученных данных в ходе эксперимента, можно подтвердить ранее доказанные исследованиями как про- [140], так и антиоксидантные свойства карнитина [96]. Сочетанное применение стимуляторов синтеза оксида азота, в исследуемых образцах тканей, демонстрирует антиоксидантный эффект препаратов.

3.2.4. Оценка резервно-адаптационного потенциала изучаемых тканей

Диагностическое значение имеет определение не только спонтанной ОМБ, указывающей на количество модифицированных аминокислот, но и металл-индуцированная окислительная модификация белковых молекул. Оценка содержания динитрофенилгидразонов при спонтанном окислении белков позволяет охарактеризовать степень окислительной деструкции белковой молекулы, а при стимулированном (металл-катализируемом) окислении – описать изменения резервно-адаптационных возможностей организма [16]. Металл-катализируемое окисление в настоящее время рассматривают как посттранскрипционную окислительную модификацию белков [29]. В организме окисление белков в норме и патологии связано с участием металлов переменной валентности [53]. Легко окисляющиеся и восстанавливающиеся ионы железа выступают донорами электронов; их высокое содержание в клетке, может инициировать окислительную деструкцию белковой молекулы [46].

Металл-катализируемое окисление – это местный специфический процесс, который протекает в нормально функционирующем организме,

его уровень является важным прогностическим показателем. Индуцированная ОМБ выявляет изменения аминокислот, входящих в состав полипептидной цепи, и модификации, связанные с конформацией молекулы и состоянием белкового окружения [14]. Необходимость изучения спонтанной и индуцируемой ионами металлов окислительной модификации белков, обусловлена возможностью произвести косвенную оценку антиоксидантных способностей белков с помощью резервно-адаптационного потенциала (РАП) [112].

Динитрозильные комплексы негемового железа (ДНКЖ) обнаружены во многих клетках и тканях, продуцирующих оксид азота. ДНКЖ являются стабильными депо оксида азота, в свою очередь низкомолекулярные ДНКЖ выполняют функцию его переносчика [20]. Таким образом, динитрозильные комплексы негемового железа могут образовываться в клетках при умеренном окислительном стрессе и тем самым формировать собственный внутриклеточный пул NO как форму запасания оксида азота. Вместе с тем при снижении уровня NO окислительный стресс активирует его выход из комплексов с последующим демпфированием повреждающего действия активных форм кислорода [26]. Исходя из данных литературы [22], можно сделать следующее предположение, аргинин, являясь донатором синтеза оксида азота, увеличивает степень окислительного/карбонильного стресса [22, 26], тем самым уменьшая степень РАП относительно групп контроля (рисунок 28). Однако, при оценке резервно-адаптационного потенциала мышечных тканей, формирующегося под влиянием аргинина, было отмечено статистически значимое нарастание РАП $S_{AДНФГ_{uv}}$ в миокарде. Вероятно, причиной таковых изменений является свойство аргинина быть предшественником оксида азота, в умеренных количествах проявляющего цитопротекторное и защитное свойства, проявляющееся в предотвращение апоптоза [136, 161]. NO ограничивает деструктивное действие стресс-реакций путем прямого уменьшения стрессорной активации свободно-

радикального окисления за счет повышения активности антиоксидантных ферментов [132]. Кроме того, NO обладает самостоятельными антиоксидантными свойствами [132].

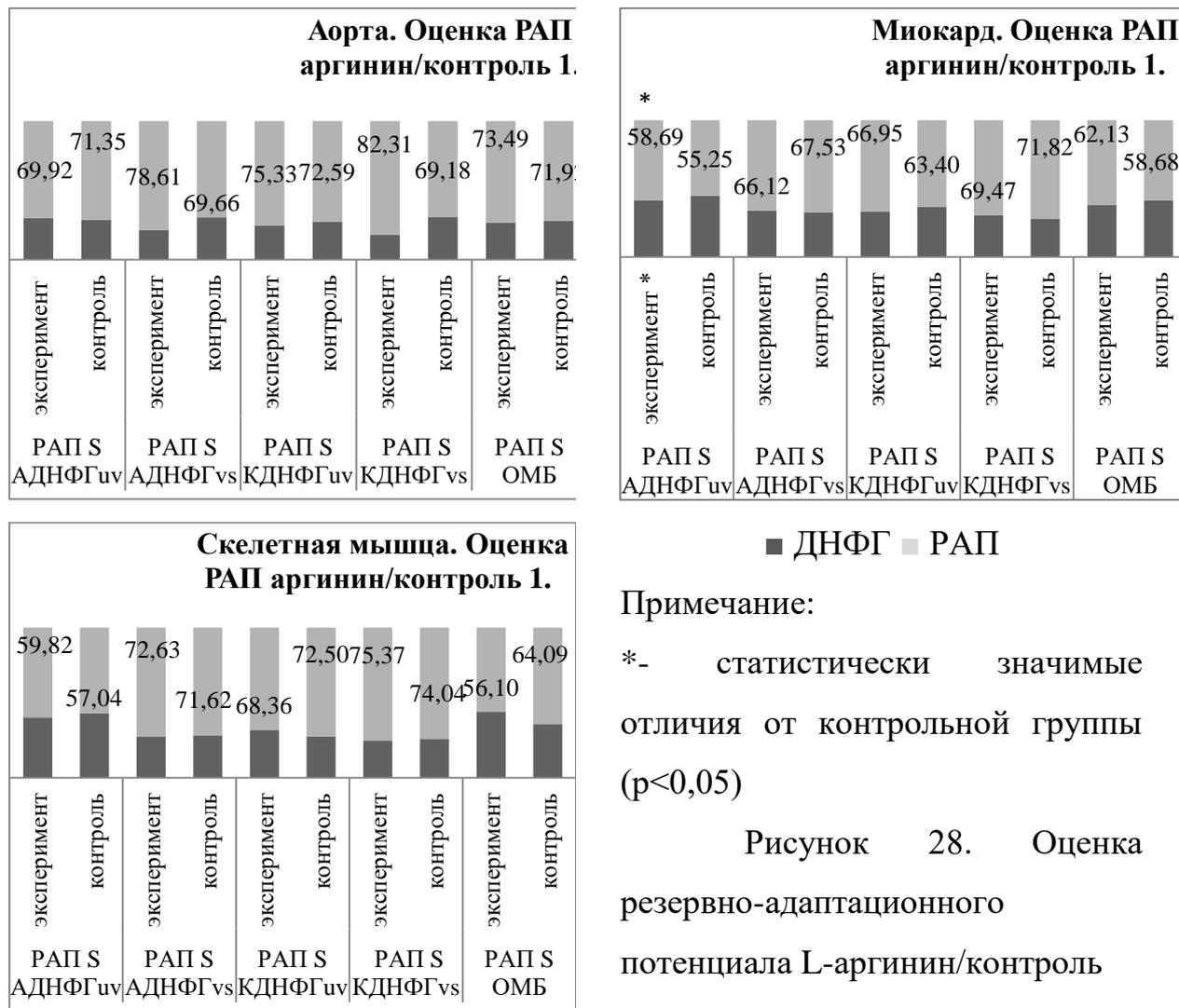


Рисунок 28. Оценка резервно-адаптационного потенциала L-аргинин/контроль

Под влиянием ингибитора синтеза оксида азота *in vitro* отмечается истощение РАП стенки аорты преимущественно за счет АДНФГ основного и КДНФГ нейтрального характера (рисунок 29). В условиях дефицита синтеза оксида азота значение РАП (все показатели статистически значимы) уменьшается в сравнение с показателями контрольной группы. Данная тенденция истощения РАП свидетельствует о недостаточной активности антиоксидантных систем и накопления поврежденных со

слабой функциональной активностью белков. Подобная динамика была выявлена ранее в спленоцитах крыс [3, 4, 116].

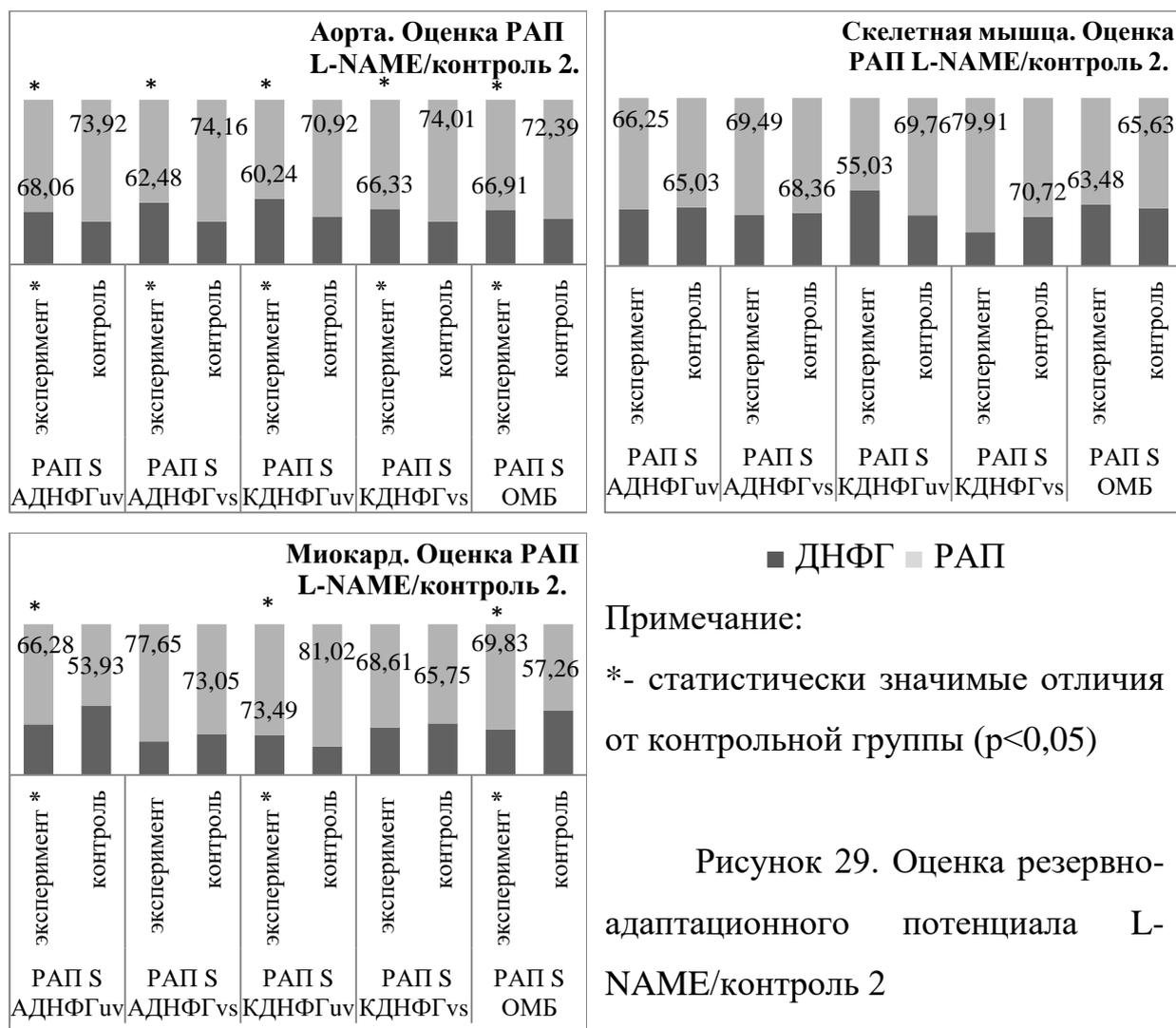


Рисунок 29. Оценка резервно-адаптационного потенциала L-NAME/контроль 2

Изменения, касающиеся левого желудочка сердца крыс экспериментальной группы блокатора синтеза оксида азота (рисунок 29) характеризуется статистически значимым повышением показателей РАП АДНФГ нейтрального характера и снижением КДНФГ нейтрального характера. Не смотря на столь неоднозначные изменения, общая динамика изменения резервно-адаптационного потенциала, характеризующаяся РАП S ОМБ статистически значимо увеличивается. Возможно, причиной таковых изменений является дефицит нитроксида, при котором динитрозильные комплексы негемового железа (ДНКЖ), содержащие

цистеин или глутатион [75], распадаются, освобождая NO из собственных депо [2, 26], что могло привести к нивелированию действия блокатора.

Стоит отметить, что увеличение дозировки ингибитора синтеза оксида азота практически не приводит к статистически значимым изменениям (рисунок 30).

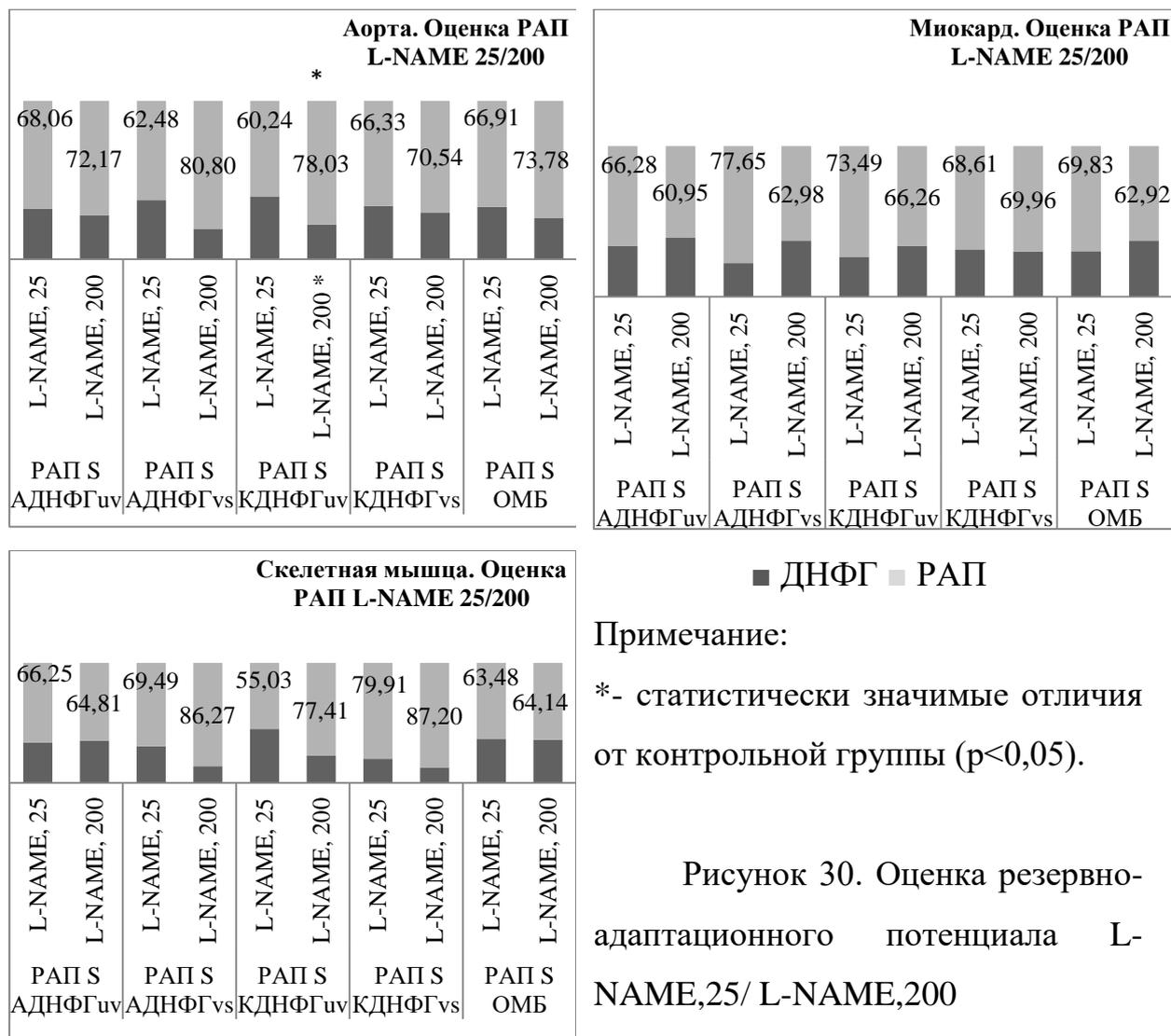


Рисунок 30. Оценка резервно-адаптационного потенциала L-NAME,25/ L-NAME,200

РАП при введении L-NAME на фоне применения аргинина в тканях аорты и миокарда (рисунок 31) повторяет в большей степени динамику изменений резервно-адаптационного потенциала в экспериментальной группе, получавшей L-NAME, а скелетная мускулатура – экспериментальной группы с аргинином. Статистически значимых данных не получено.

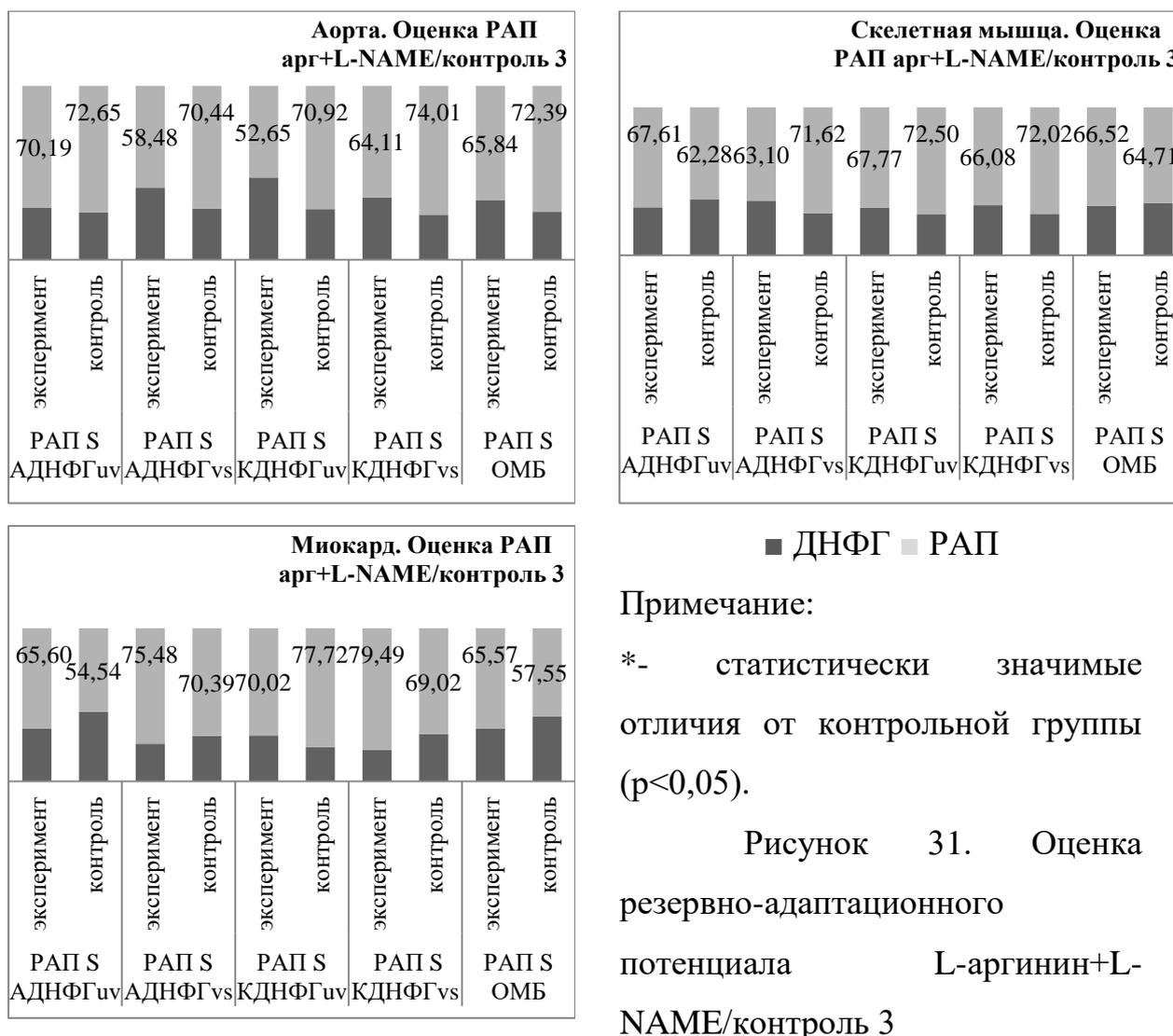


Рисунок 31. Оценка резервно-адаптационного потенциала L-аргинин+L-NAME/контроль 3

Применение только карнитина характеризуется статистически значимым изменением данных резервно-адаптационного потенциала суммарной площади ОМБ и S АДНФГ_{uv} в аорте и миокарде, скелетная мускулатура демонстрирует статистически значимые результаты только у S КДНФГ_{vs} (рисунок 32). Нарастание окислительного стресса в аорте отмечено статистически значимым снижением резервно-адаптационного потенциала, в миокарде, напротив, уровень стресса снижался и соответственно этому был получен статистически значимый рост РАП.

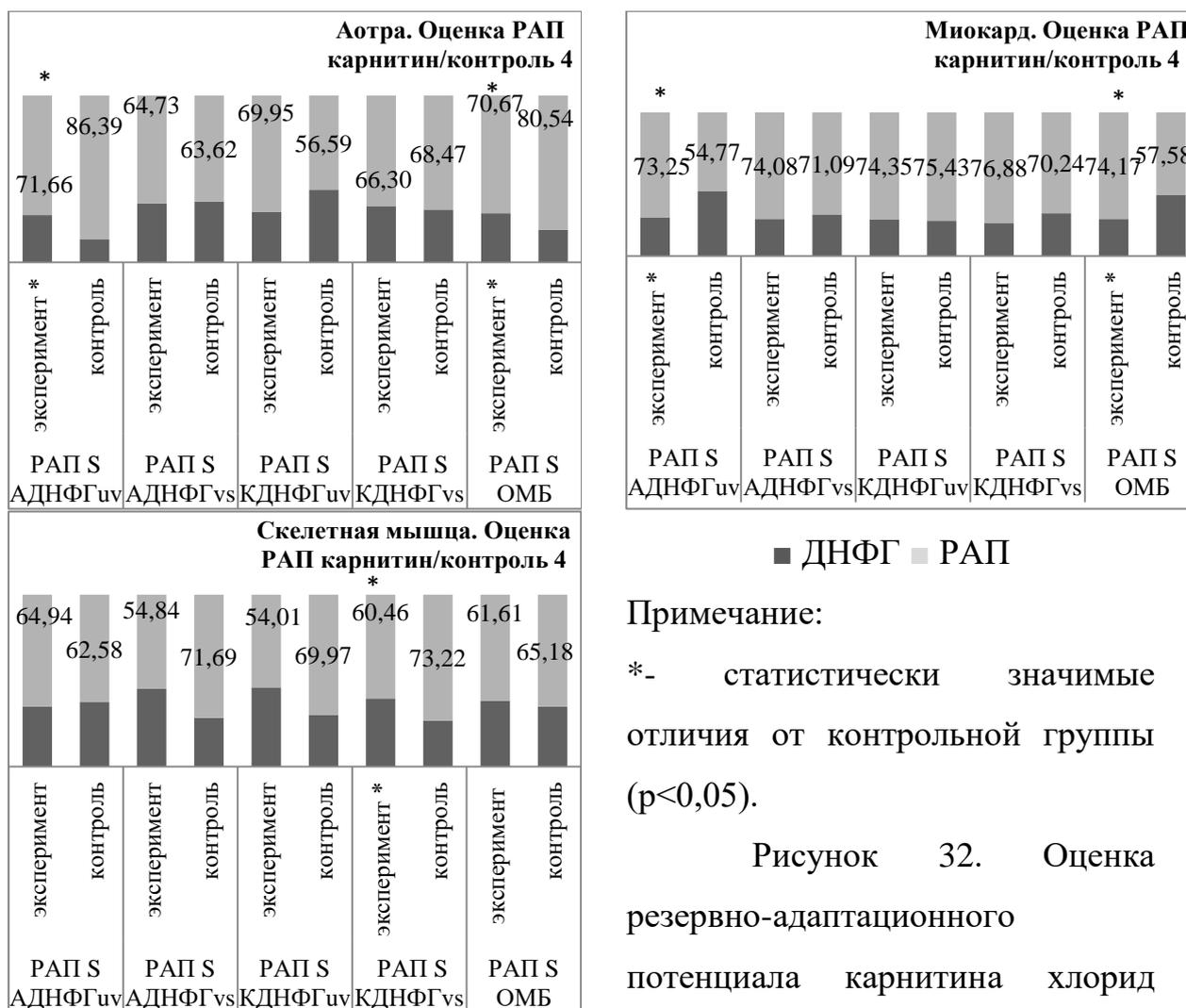


Рисунок 32. Оценка резервно-адаптационного потенциала карнитина хлорид /контроль 4

Сочетанное применение стимуляторов синтеза азота характеризуется статистически значимым нарастанием РАП общей площади окислительной модификации белков в сердечной и скелетной мышцах на фоне самого низкого показателя окислительного стресса в группах с применением карнитина; в миокарде отмечен дополнительный рост S АДНДФГ_{uv} (рисунок 33). Стоит отметить, что согласно источнику [137] влияние карнитина строится по нелинейному принципу, когда физиологические дозы не вызывают эффекта или действуют положительно, а влияние высоких доз препарата вызывают негативные явления. Незначительное снижение окислительного стресса в аорте под

действием карнитина и аргинина на резервно-адаптационный потенциал не повлияло.

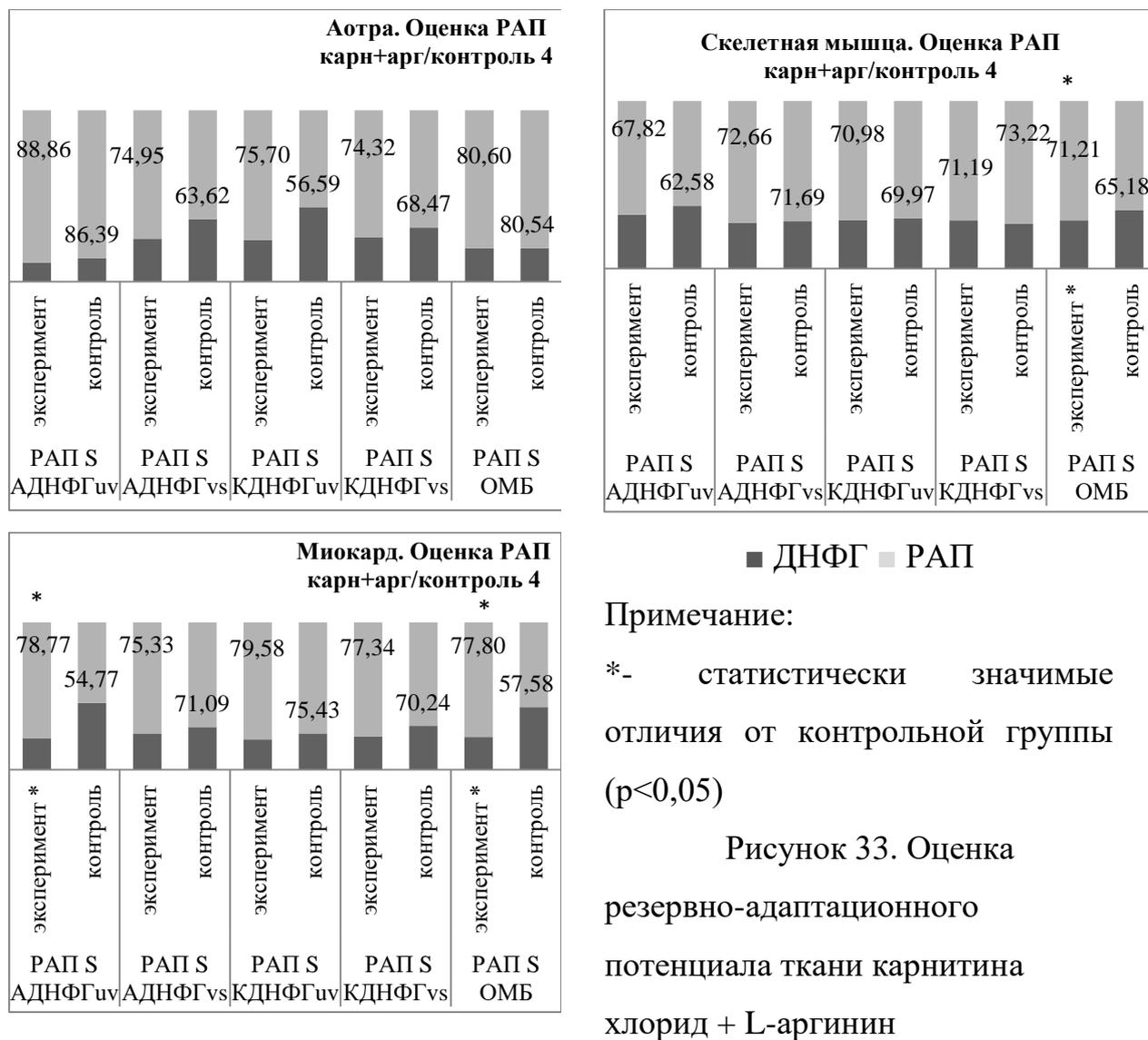


Рисунок 33. Оценка резервно-адаптационного потенциала ткани карнитина хлорид + L-аргинин

В аорте окислительный стресс при сочетании препаратов карнитин и L-NAME увеличивается относительно контрольных значений почти в два раза, незначительное статистически незначимое снижение резервно-адаптационных показателей общей площади ОМБ, происходит за счет статистически значимого уменьшения АДНФГ нейтрального характера. Вероятно, преобладающее действие ингибитора сдерживает прооксидантный эффект карнитина.

Сочетание применения карнитина и блокатора синтеза оксида азота на фоне многократного снижения окислительного стресса выявило статистически значимый рост РАП S ОМБ в мускулатуре сердца и

бедра экспериментальных животных. В миокарде рост происходит за счет статистически значимого показателя $S_{\text{АДНДФГ}_{uv}}$ (рисунок 34).

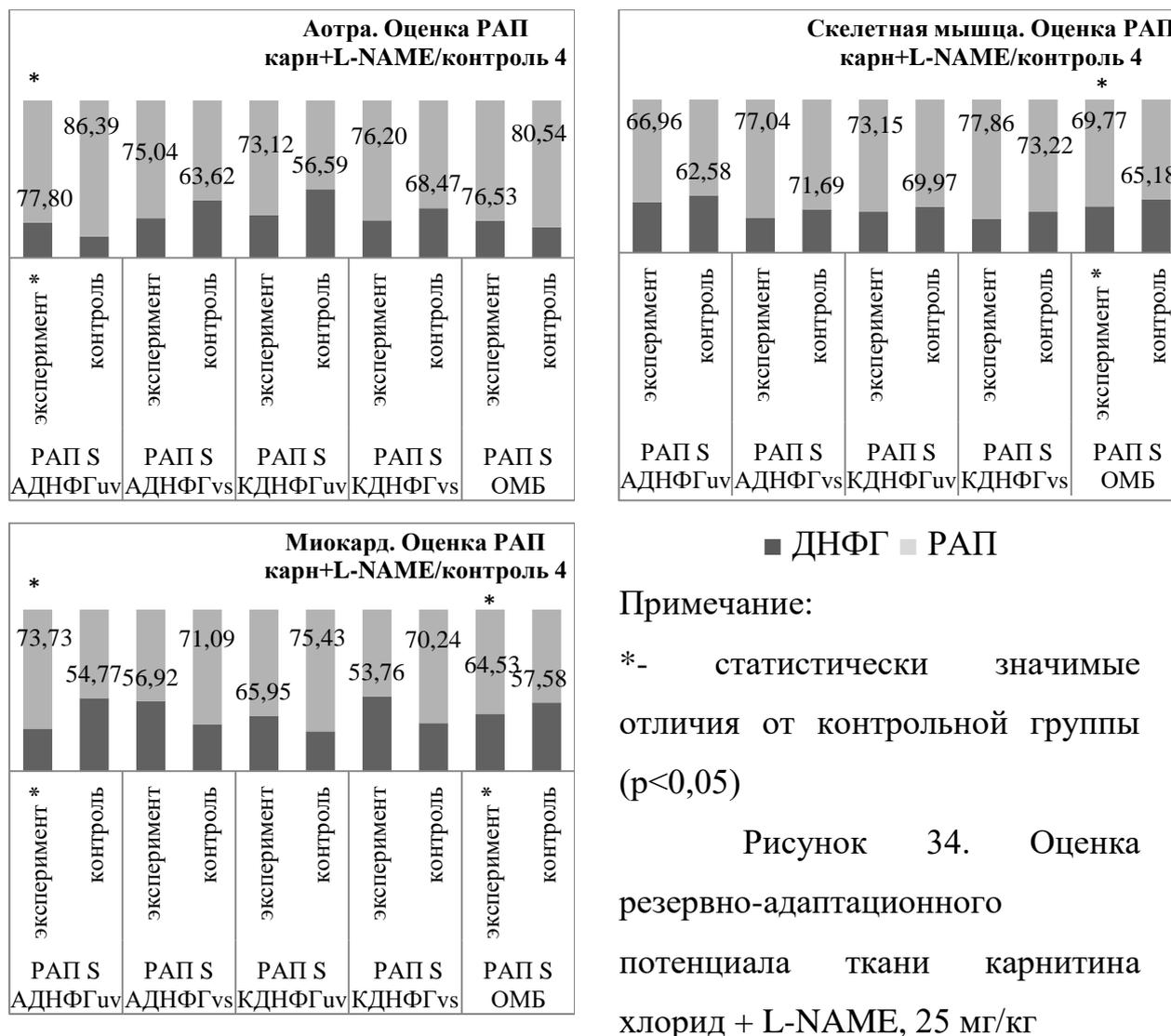


Рисунок 34. Оценка резервно-адаптационного потенциала ткани карнитина хлорид + L-NAME, 25 мг/кг

Влияние L-аргинина в дозе 500 мг/кг на изучаемые ткани выявило прямую зависимость между влиянием окислительного стресса и РАП.

Применение неселективного ингибитора синтеза оксида азота приводит к снижению окислительной деструкции стенки грудной аорты, однако, резервно-адаптационный потенциал при этом истощается. Миокард, напротив, характеризует обратной зависимостью, статистически значимое повышение РАП сопровождается снижением окислительного стресса.

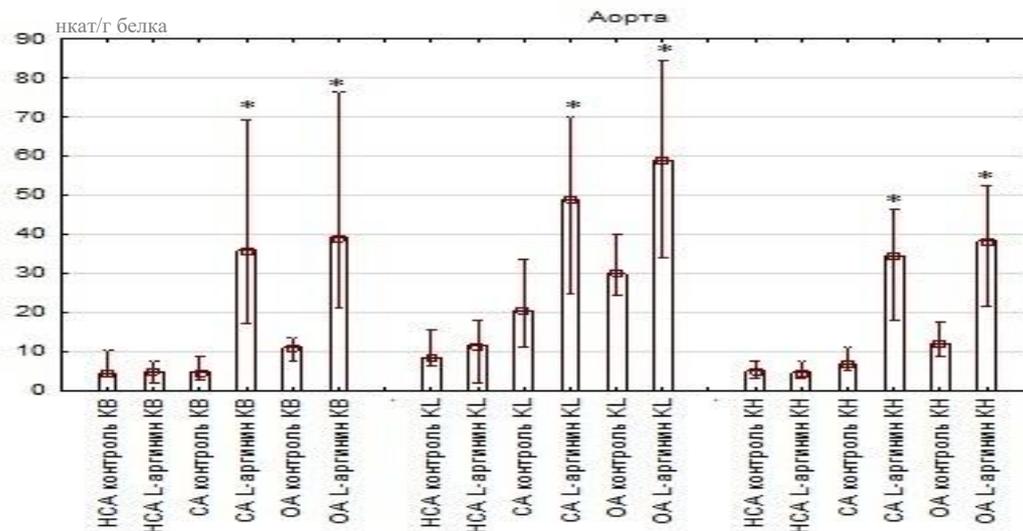
Изменения РАП в группе регуляторов синтеза оксида азота на фоне общего снижения окислительной модификации белков зависят от преобладания эффектов одного из препаратов.

Применение карнитина отдельно и в сочетаниях с аргинином и L-NAME характеризуется обратной связью между окислительным стрессом и резервно-адаптационным потенциалом.

3.3. Оценка состояния лизосомального цистеинового протеолиза

3.3.1. Активность и распределение катепсинов в исследуемых тканях

В результате оценки активности катепсинов участка аорты выявлено активное статистически значимое нарастание общей активности (ОА) протеиназ в группе животных, подвергающихся введению аргинина относительно группы контроля (рисунок 35, таблица 4 в приложении), во всех случаях изменения происходили за счет статистически значимого увеличения активности в лизосомальной фракции (СА).

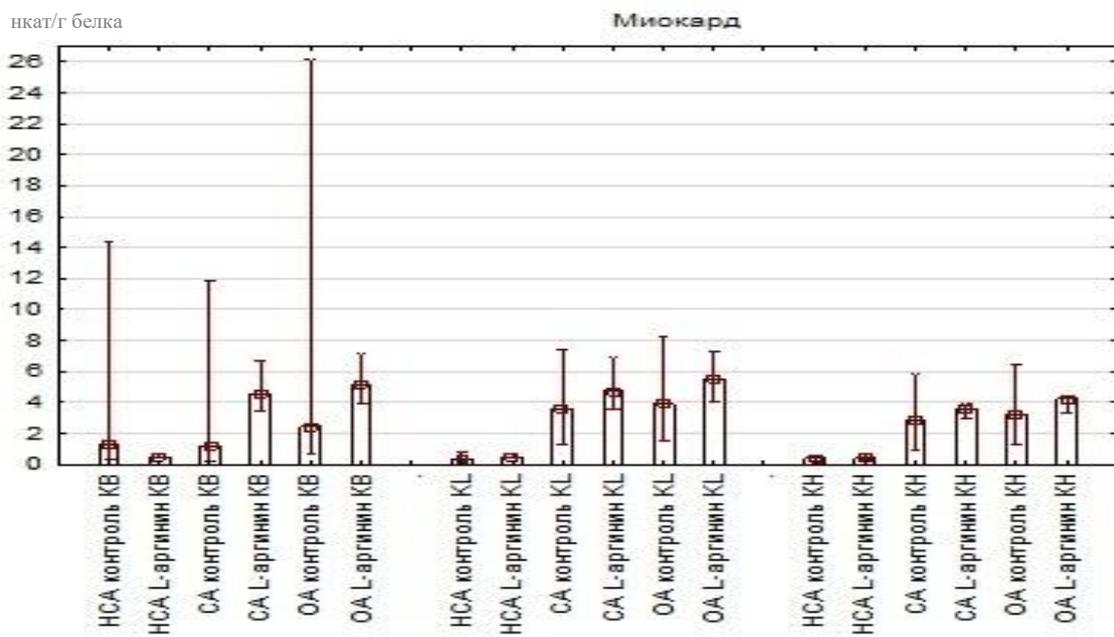


Примечание: □ - медиана; └ - максимум; ┘ - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 35. Влияние L-аргинина на активность и распределение катепсинов B, L, N в аорте; Me [min; max], нкат/г белка

Предположительно вероятной причиной изменений является комплексное разблокирование системы лизосомального цистеинового протеолиза, возможно за счет снижения активности ингибиторов [174], главной функцией которых, является предотвращения отрицательных последствий избыточного синтеза оксида азота [174].

Катепсины ткани миокарда характеризуются тенденцией снижения общей активности изучаемых ферментов (рисунок 36, таблица 5 в приложении) без статистически значимых данных.



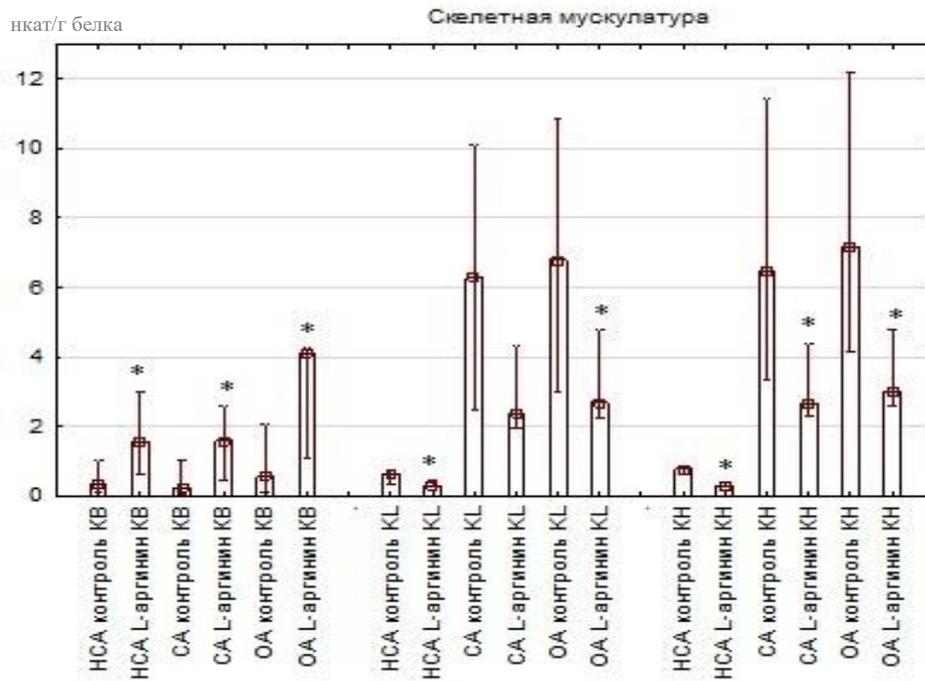
Примечание: □ - медиана; ┌ - максимум; └ - минимум

Рисунок 36. Влияние L-аргинина на активность и распределение катепсинов В, L, Н в миокарде; Me [min; max], нкат/г белка

Статистически значимые показатели катепсина В в скелетной мускулатуре, демонстрируют многократное увеличение общей активности за счет обеих фракций (рисунок 37, таблица 6 в приложении).

Катепсины L и Н, напротив, выявили общую тенденцию снижения общей активности (показатель статистически значим), за счет

статистически значимого снижения НСА у обоих ферментов и дополнительно у СА у катепсина Н.

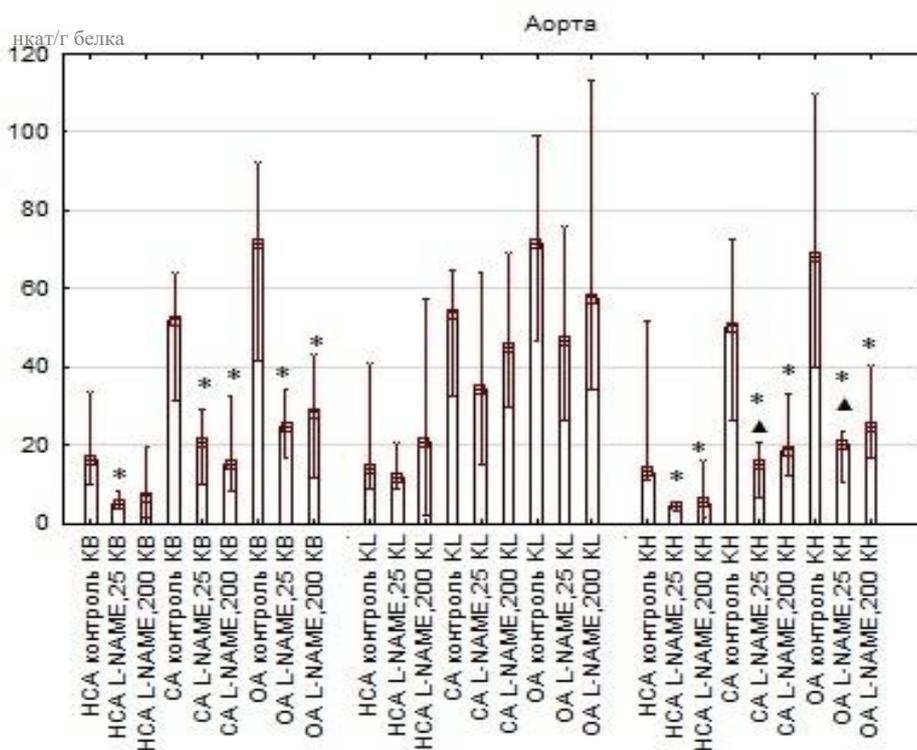


Примечание: □ - медиана; Т - максимум; ⊥ - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

Рисунок 37. Влияние L-аргинина на активность и распределение катепсинов В, L, Н в скелетной мускулатуре; Me [min; max], нкат/г белка

L - NAME - аналог L - аргинина, основной функцией которого является блокирование синтеза NO, дефицит которого может вызывать дестабилизацию лизосомальных мембран, что может явиться причиной секреции катепсинов. Однако, в результате данного эксперимента обнаружен противоположный эффект: введение препарата в дозе 25 мг/кг отмечено снижением результатов (рисунок 38, таблица 4 в приложении) в участке аорты против группы контроля; статистически значимые изменения выявлены у всех показателей KB и KN. Статистически значимые отличия от группы животных, получавших аргинин, наблюдаются у катепсина Н в лизосомальной фракции и ОА.

На фоне отсутствия статистически значимых данных разнонаправленных изменений между разными дозами ингибитора NOS, отмечается при более высокой дозировке статистически значимое снижение ОА у протеиназы В, по большей части за счет статистически значимого снижения СА при сравнении с контролем. Уменьшение обеих исследуемых фракций КН, несомненно, ведет к снижению общей активности (все показатели статистически значимы).

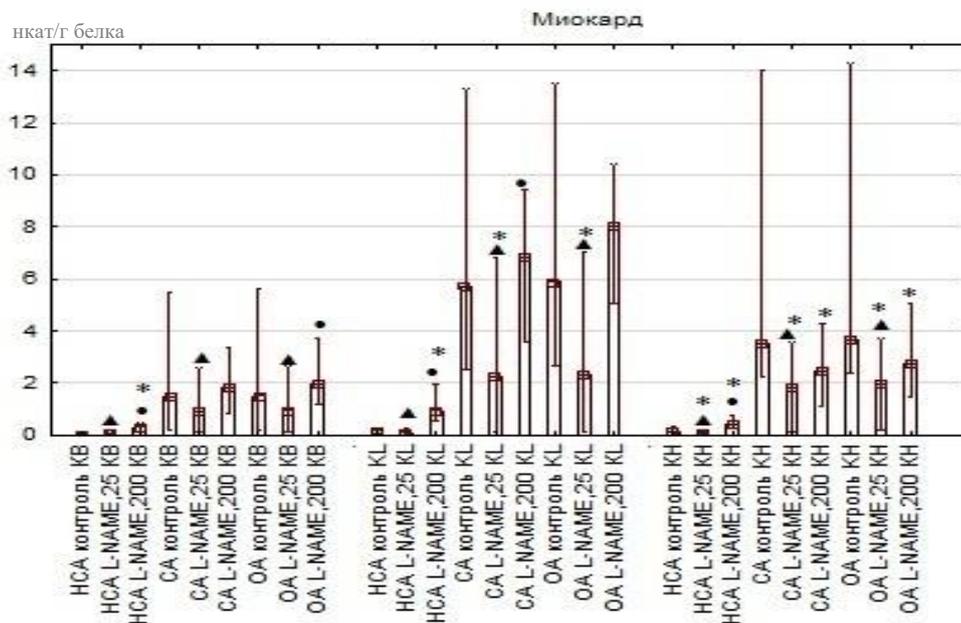


Примечание: □ - медиана; T - максимум; L - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

Рисунок 38. Влияние L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг на активность и распределение катепсинов В, L, Н в аорте; Me [min; max], нкат/г белка

Катепсины L и Н миокарда животных, получавших L-NAME в низкой дозе, характеризуются статистически значимыми снижениями результатов ОА относительно контрольных животных за счет лизосомальной фракции KL и обеих фракций КН (рисунок 39, таблица 5 в

приложении). Примечательно, что все показатели группы статистически значимо отличаются от экспериментальной группы с аргинином.



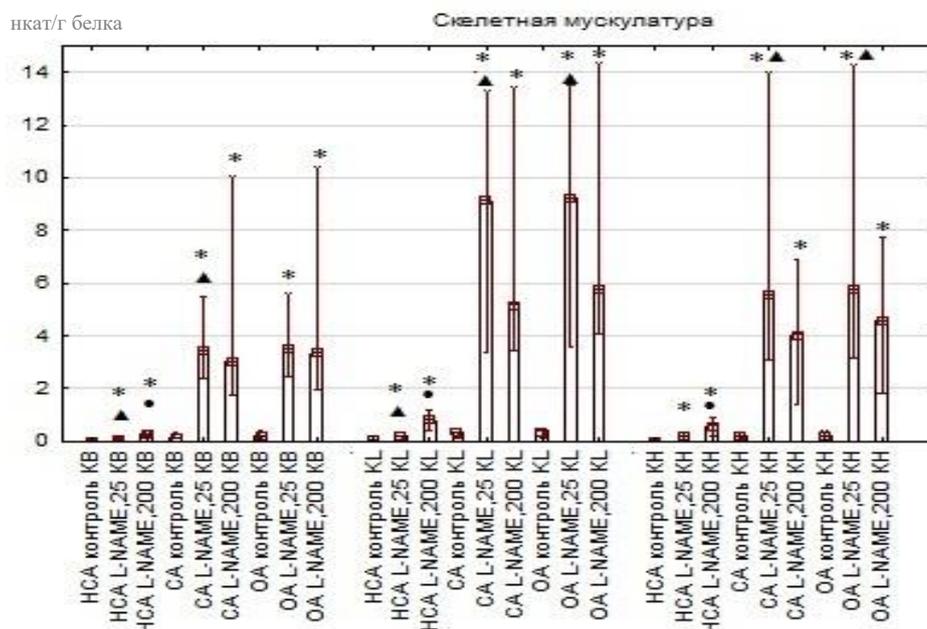
Примечание: □ - медиана; ┘ - максимум; ┘ - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); ● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$)

Рисунок 39. Влияние L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг на активность и распределение катепсинов В, L, Н в миокарде; Ме [min; max], нкат/г белка

В эксперименте с увеличением L-NAME до 200 мг/кг наблюдается дозозависимый статистически значимый прирост относительно контроля отмечен среди НСА катепсинов (рисунок 39, таблица 5 в приложении), а также у остальных показателей КН. Стоит отметить, что показатели все же не достигают контрольных значений, несмотря на активный рост по сравнению с низкой дозой препарата. Между различной дозировкой L-NAME отмечаются статистически значимые отличия (увеличение) в следующих фракциях у катепсина В – СА и ОА, а так же у KL –СА.

Общая активность скелетной мускулатуры под влиянием ингибитора синтеза оксида азота 25 мг/кг (рисунок 40, таблица 6 в приложении) отмечена снижением на фоне угнетения обеих фракций всех

протеиназ относительно контроля (показатели статистически значимы относительно контроля). Сравнение с аргинин-зависимой группой выявило статистически значимое снижение СА всех ферментов, дополнительно у цитозольной фракции катепсинов В и L и общей активности у KL и KH.



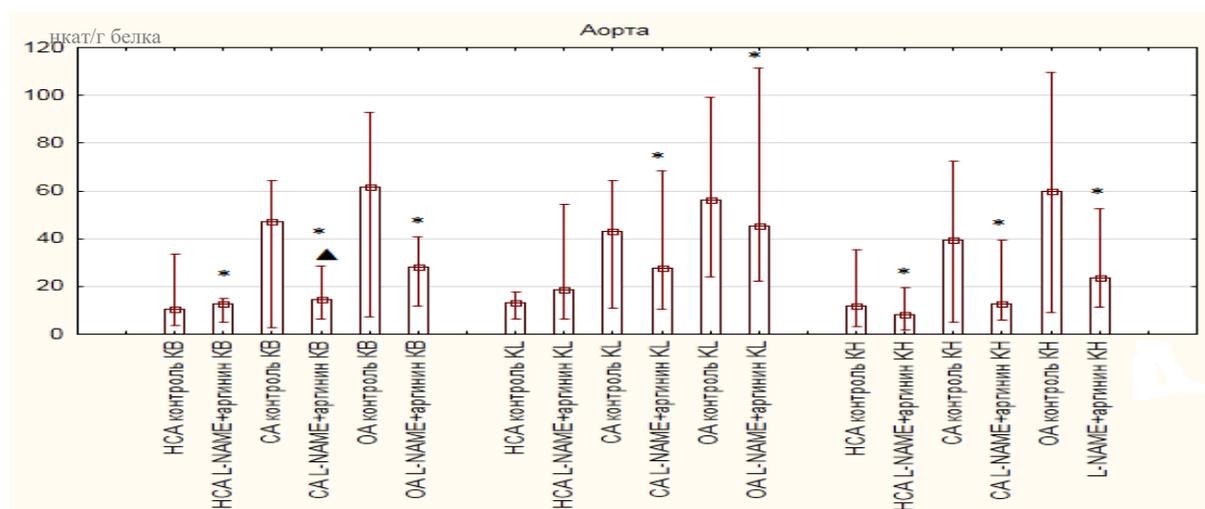
Примечание: □ - медиана; T - максимум; L - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); ● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$)

Рисунок 40. Влияние L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг на активность и распределение катепсинов В, L, Н в скелетной мускулатуре; Me [min; max], нкат/г белка

Для всех исследуемых катепсинов при нарастании дозы ингибитора NOS до 200 мг/кг (рисунок 41, таблица 6 в приложении) отмечается активная транслокация фермента из лизосомы в цитозоль, что подтверждается данными статистически значимого роста HCA, по сравнению с контрольными и показателями группы L-NAME 25 мг/кг. Контрольные и полученные результаты группы с введением ингибитора оксида азота в дозе 200 мг/кг всех протеиназ статистически значимо разнятся. Единообразие изменений характеризуется ростом относительно

экспериментальной группы с дозой ингибитора в 25 мг/кг у протеиназ В и L всех фракций. Общая активность катепсина Н в исследуемых группах животных остается ниже группы с более низкой дозой ингибитора, несмотря на активный рост СА, прирост НСА не столь значителен. Схожие изменения секреции катепсинов В и L на фоне увеличения дозы L-NAME отмечены в миокарде.

Совместное применение модуляторов синтеза оксида азота в гладкой мышце аорты (рисунок 41, таблица 4 в приложении) отмечено уменьшением ОА катепсинов В и Н по большей части за счет лизосомальной фракции (все данные статистически значимо отличаются от группы контроля), таким образом, наблюдается преобладание влияния ингибитора над активатором синтеза оксида азота.



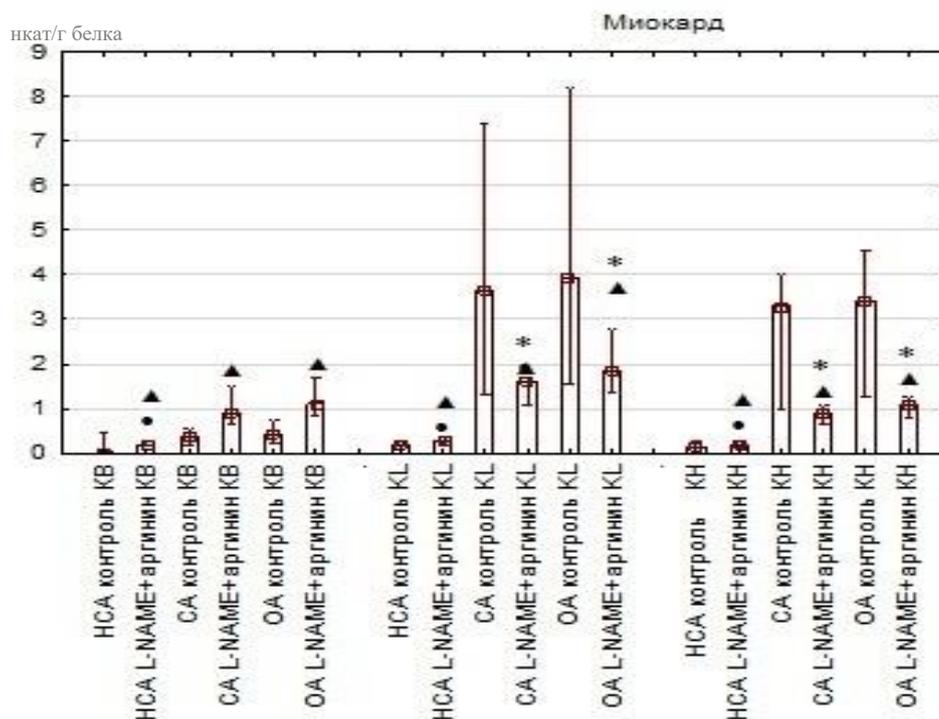
Примечание: □ - медиана; ┴ - максимум; ┬ - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$)

Рисунок 41. Влияние сочетанного применения аргинина и L-NAME на активность и распределение катепсинов В, L, Н в аорте; Me [min; max], нкат/г белка

Дополнительными данными в защиту выдвинутой теории нивелирования эффекта аргинина выступает статистически значимое снижение НСА катепсинов В и Н. Катепсин L, однако, демонстрирует

статистически значимый роста общей активности за счет увеличения СА, что говорит о преобладанием эффекта донора над блокатором синтеза NO.

Частичное нивелирование эффекта L-NAME наблюдается в сердечной мышце (рисунок 42, таблица 6 в приложении): у KL и KH снижение общей активности происходит за счет СА (все выше обозначенные показатели статистически значимы).

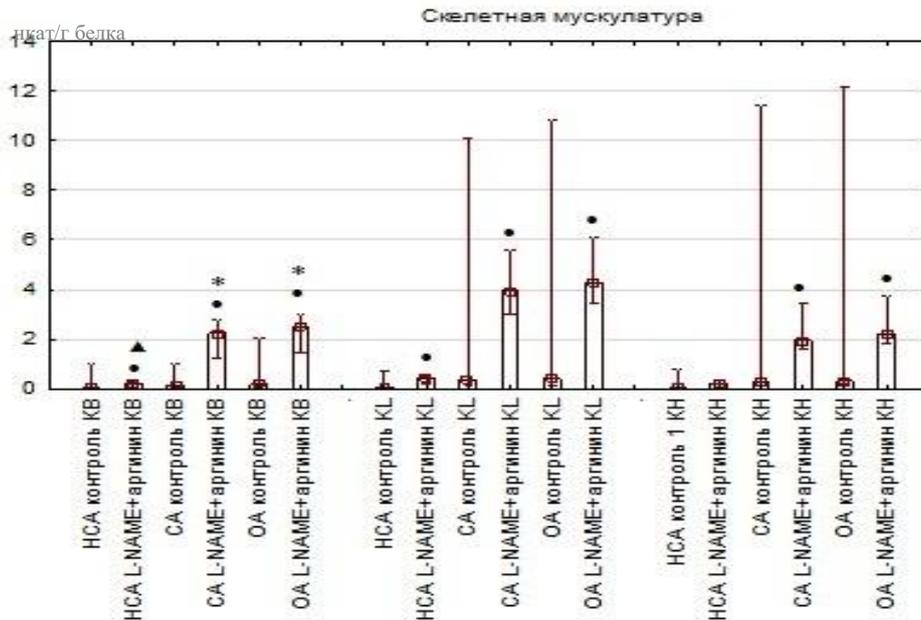


Примечание: □ - медиана; T - максимум; L - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); ● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$)

Рисунок 42. Влияние сочетанного применения аргинина и L-NAME на активность и распределение катепсинов В, L, Н в миокарде; Me [min; max], нкат/г белка

Группа совместного применения препаратов – модуляторов синтеза оксида азота, статистически значимо отличается от модели с применением аргинина, дополнительно внелизосомальные фракции имеют статистически значимое рост по сравнению с L-NAME-принимавшей группой, что лишь подтверждает преобладание эффектов аргинина.

Катепсин В (рисунок 43) в скелетной мускулатуре под влиянием регуляторов синтеза оксида азота демонстрирует статистически значимый рост общей активности за счет лизосомальной фракции фермента. Характеризуя участок скелетной мускулатуры, обращает на себя внимание статистически значимое повышение показателей изучаемой экспериментальной группы (исключение - HCA KH) относительно группы с применением L-NAME 25 мг/кг, данная тенденция аналогична изменениям протекающим в миокарде. Статистически значимое изменение (понижение) относительно группы с применением активатора синтеза оксида азота имеет лишь показатель HCA катепсина В.

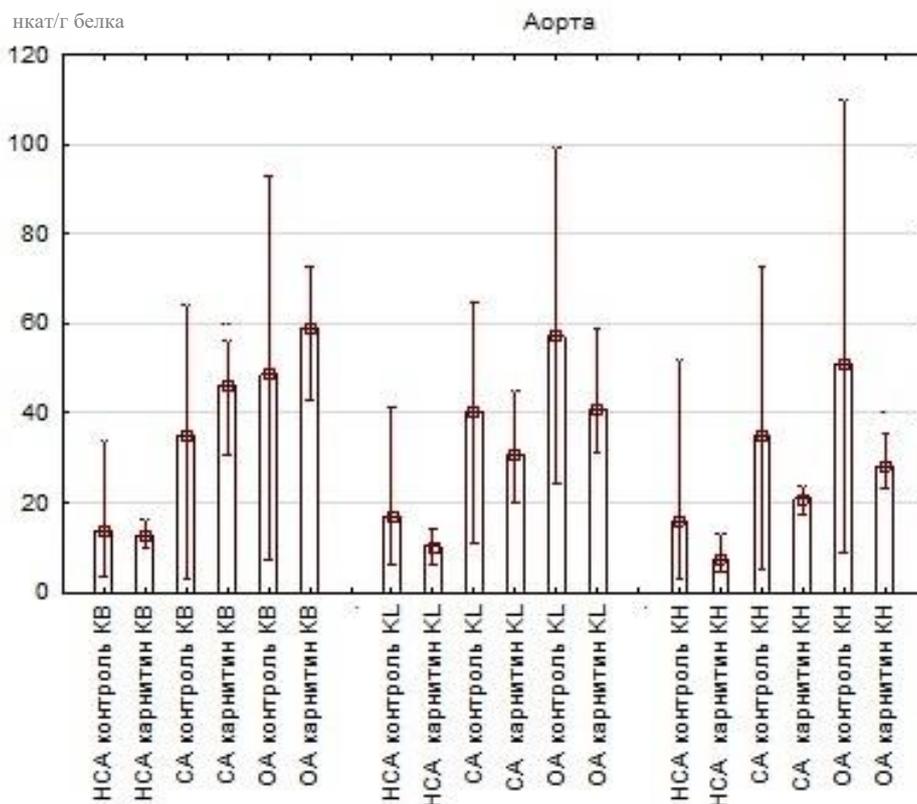


Примечание: □ - медиана; ┴ - максимум; ┘ - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); ● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$)

Рисунок 43. Влияние сочетанного применения L-аргинина и L-NAME на активность и распределение катепсинов В, L, Н в скелетной мускулатуре; Me [min; max], нкат/г белка

Несмотря на отсутствие статистически значимых показателей в группе применения отдельно карнитина в участке аорты (рисунок 44)

наблюдается тенденция к снижению показателей относительно контроля, характерная для всех групп с применением этого препарата (таблица 4 в приложении).



Примечание: □ - медиана; ┌ - максимум; └ - минимум

Рисунок 44. Влияние карнитина хлорида на активность и распределение катепсинов В, L, Н в аорте; Me [min; max], нкат/г белка

Отмечается преобладание показателей сочетанной группы карнитин+L-NAME над группой стимуляции синтеза азота (таблица 4 в приложении, рисунок 45), причиной может выступить активация цитопротективных функций cNOS по механизму обратной связи [88], в связи с тем, что избыток NO обладает цитотоксическими свойствами [21].

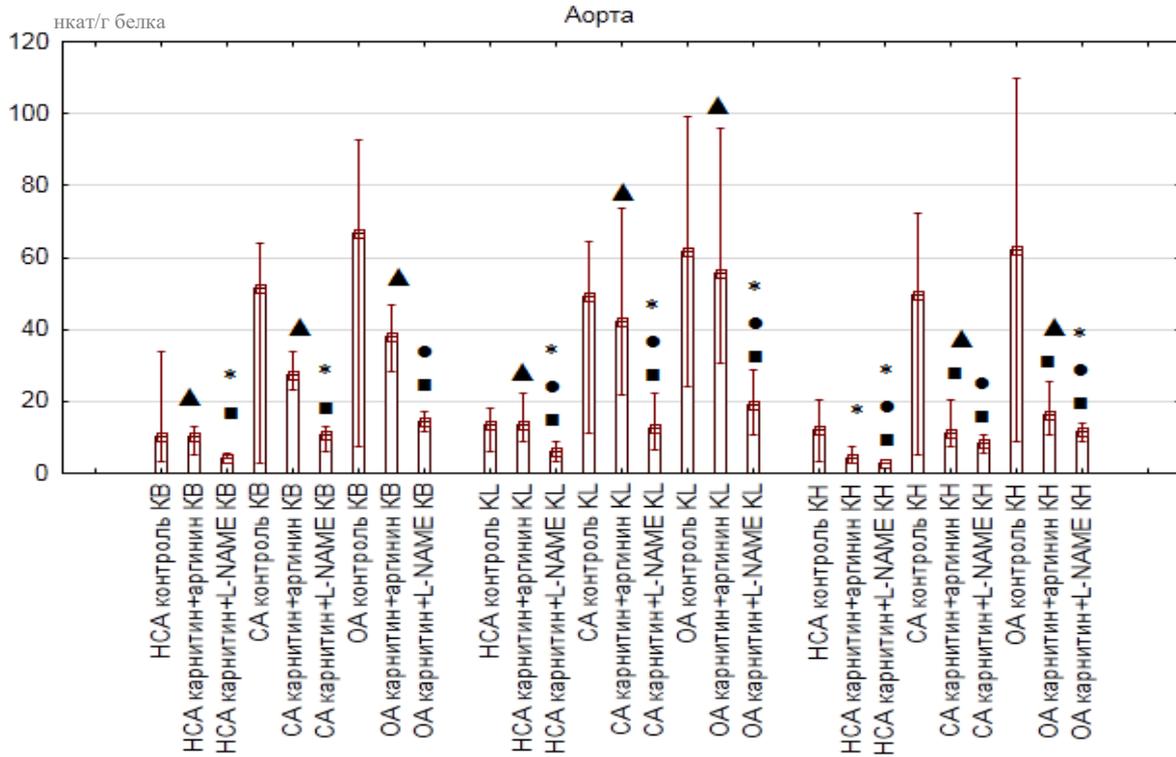
Показатели сочетанных групп демонстрируют статистически значимые отличия от группы контроля:

- статистически значимые показатели в группе №6 – НСА протеиназы Н;
- в группе №7 обе фракции у ферментов В и L, и цитозольная у катепсина Н;
- снижение общей активности: у KL и KH группы №7 - происходит за счет обеих фракций.

При сочетанном применении стимуляторов синтеза NO наблюдается статистически значимые отличия от группы животных, получающих аргинин (исключение НСА у KH). ОА протеиназы Н снижалась за счет лизосомальной фракции (статистически значимые показатели) относительно животных, принимающих только карнитин.

Возможность образования соединений с различными органическими кислотами, которые являются промежуточными продуктами окислительных процессов, демонстрирует возможность карнитина оказывать мембранотоксическое действие [49]. В результате накопления продуктов полураспада происходит закисление среда, что в свою очередь может спровоцировать увеличение активности ЛЦП. Возможно, именно протекторные функции клетки в данном случае предотвращают суммарное воздействие веществ, поэтому в сочетанной экспериментальной группе показатели ниже карнитина и аргинина.

Преобладание эффекта в экспериментальной группе карнитин + L-NAME ингибитора оксида азота характеризует факт статистически значимого снижения относительно группы, получающей L-NAME: ОА у протеиназ L и Н за счет обеих фракций. Дополнительно отмечается повсеместное статистически значимое снижение относительно группы с применением карнитина, что лишь подтверждает выдвинутое ранее предположение.



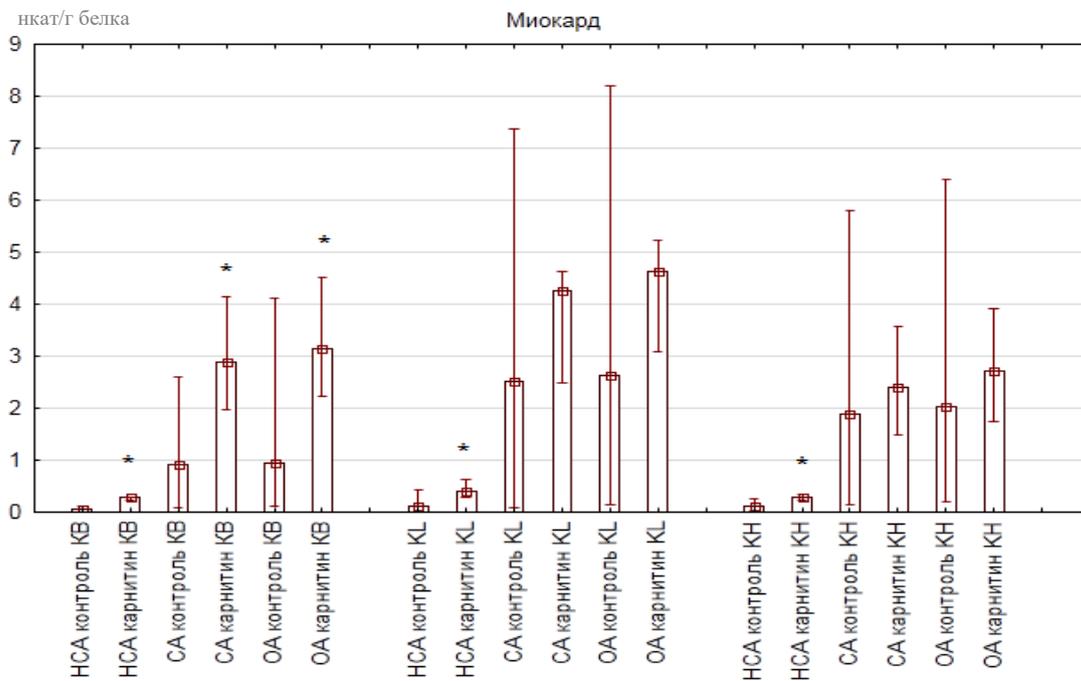
Примечание: \square - медиана; \top - максимум; \perp - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); \blacktriangle - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); \bullet - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$); \blacksquare - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Рисунок 45. Влияние сочетанного применения карнитина хлорида с регуляторами синтеза азота на активность и распределение катепсинов В, L, Н в аорте; Me [min; max], нкат/г белка

Анализ изменений критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах применения только карнитина и в сочетании с регуляторами синтеза азота в аорте демонстрирует статистически значимые различия между группами различных фракций ЛЦП (Таблица 7 в приложении).

Широко известный факт о том, что примерно 98% L-карнитина тела присутствует в мышечной ткани [132], предполагает иную картину взаимоотношений карнитин-контроль в поперечно-полосатой ткани миокарда в отличие от гладкой мускулатуры аорты (рисунок 46). «Утечку» гидролаз через лизосомальную мембрану в цитозоль подтверждает факт

статистически значимого нарастания НСА (таблица 5 в приложении). Регистрируется незначительное статистически значимое снижение ОА у КВ за счет обеих фракций фермента.



Примечание: □ - медиана; ┘ - максимум; └ - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$);

Рисунок 46. Влияние карнитина хлорида на активность и распределение катепсинов В, L, Н в миокарде; Ме [min; max], нкат/г белка

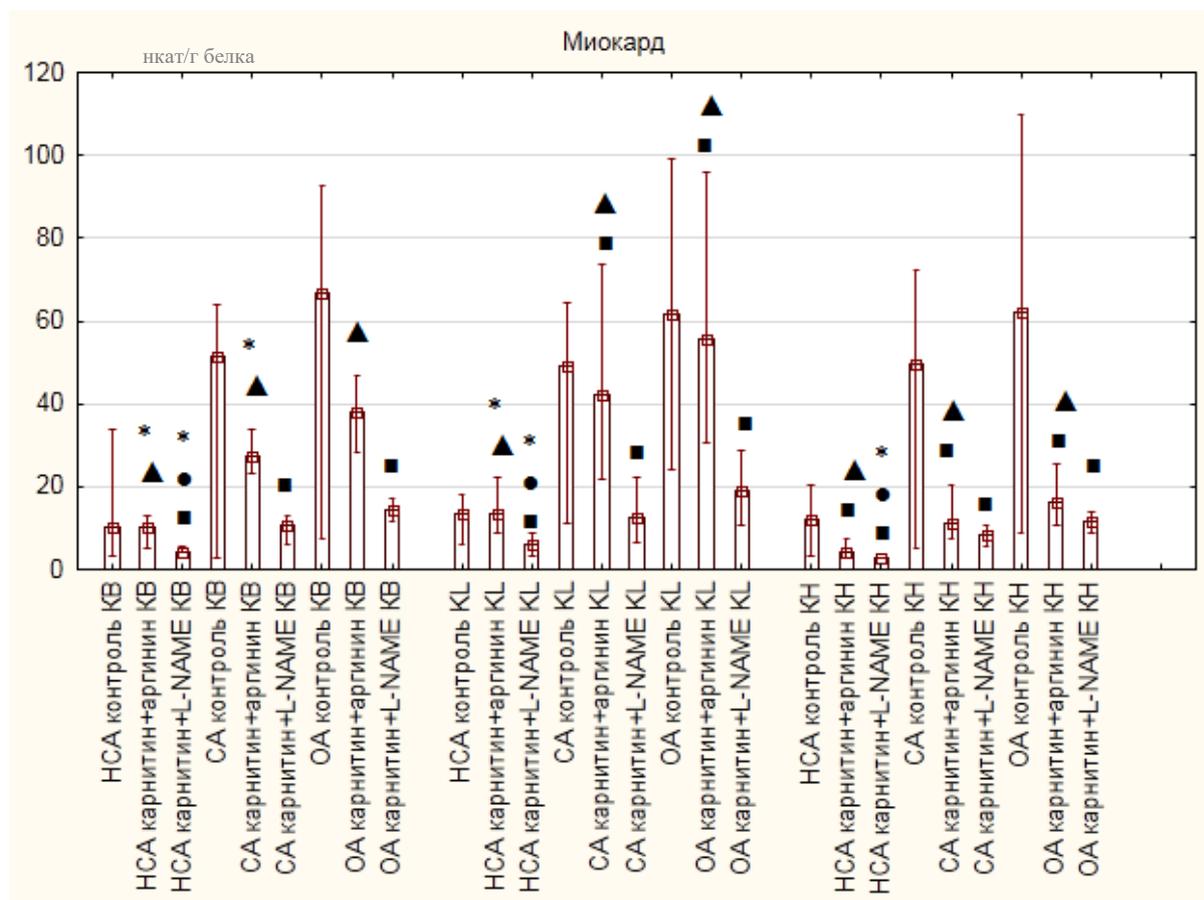
Выше обозначенную тенденцию снижения относительно контрольных показателей в группах карнитина с модуляторами синтеза оксида азота (рисунок 47) подтверждают статистически значимые показатели - экспериментальной группы №6 - НСА и СА у протеиназы В и внелизосомальной фракции у KL; и группы №7 - цитозольной фракции катепсинов L и Н.

В группах совместного применения карнитина и регуляторов NO отмечаются следующие статистически значимые изменения:

- уменьшение - все показатели группы карнитин+аргинин

- увеличение - в группе сочетания блокатора с карнитином: показателей протеиназы В и, дополнительно, внелизосомальной фракции у КЛ и КН.

Снижение результатов (статистически значимое) относительно отдельного применения карнитина отмечается: в группе совместного применения регуляторов оксида азота в СА и общей активности протеиназ L и Н, у КН дополнительно в цитозольной фракции; в группе с дополнительным применением L-NAME – у всех ЛЦП.



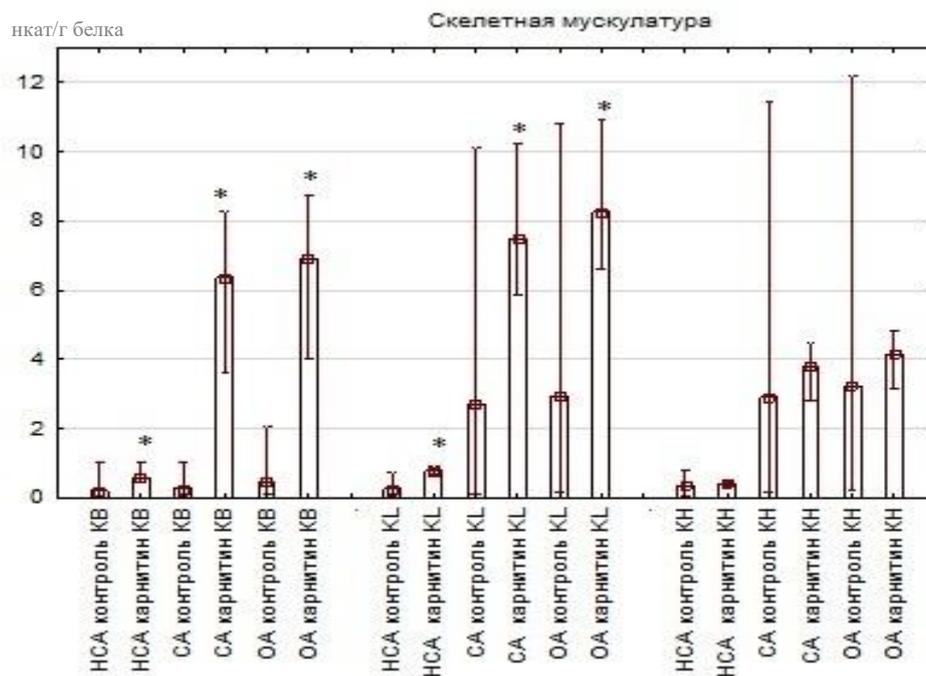
Примечание: □ - медиана; T - максимум; L - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); ● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Рисунок 47. Влияние сочетанного применения карнитина хлорида с регуляторами синтеза азота на активность и распределение катепсинов В, L, Н в миокарде; Me [min; max], нкат/г белка

Анализируя данные критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах применения карнитина отдельно и в сочетании с регуляторами синтеза азота в миокарде указывает на статистически значимые различия между показателями катепсинов (таблица 8 в приложении).

В противовес аорте и миокарду (рисунок 46-47) применение карнитина в случае со скелетной мышцей (рисунок 48) демонстрирует активный прирост ОА ферментов В и L за счет обеих фракций с преобладанием лизосомальной фракции над цитозольной (таблица 6 в приложении); все показатели статистически значимы.

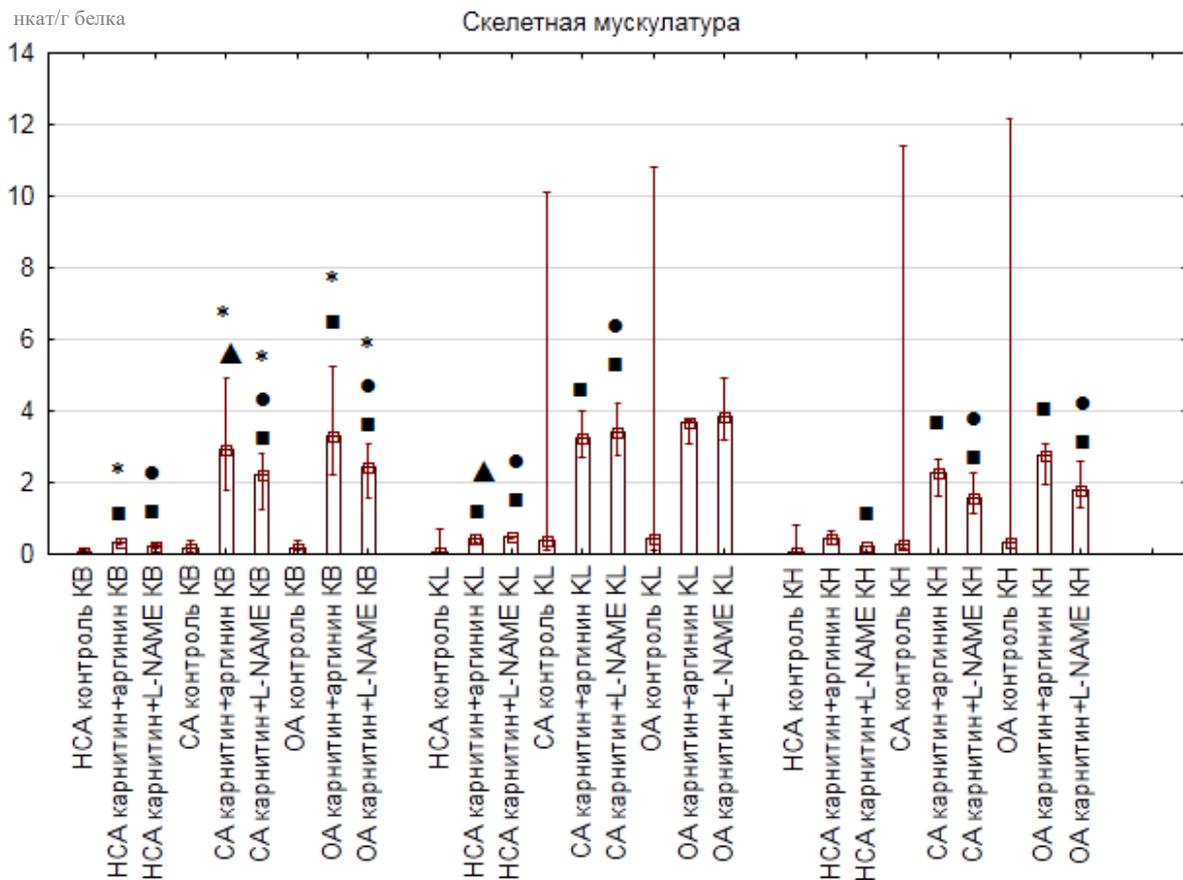
В настоящее время существуют исследования, указывающие на активацию карнитином iNO-синтазы [88], фермента с цитотоксическими свойствами, хотя нельзя исключать иные механизмы, влияющие на изменение апоптоза, вследствие активации ЛЦП [39, 141].



Примечание: □ - медиана; T - максимум; L - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

Рисунок 48. Влияние применения карнитина хлорида на активность и распределение катепсинов В, L, N в скелетной мускулатуре; Me [min; max], нкат/г белка

Механизмы изменения активностей катепсинов в мышечной ткани бедра животного под влиянием карнитина в сочетаниях с модуляторами оксида азота имеют сходства как с изменениями в аорте – динамика изменения КН, (таблица 6 в приложении), так с изменениями в миокарде – протеиназы В и L (рисунок 49). Группы сочетанного применения карнитина с регуляторами синтеза оксида азота статистически значимо изменяются относительно контроля только в случае с катепсином В: увеличение ОА за счет СА.



Примечание: □ - медиана; T - максимум; ⊥ - минимум; * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); ● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Рисунок 49. Влияние сочетанного применения карнитина хлорида с регуляторами синтеза азота на активность и распределение катепсинов В, L, H в скелетной мускулатуре; Me [min; max], нкат/г белка

В группе совместного использования стимуляторов синтеза NO статистически значимое снижение показателей относительно введения только аргинина регистрируется в обеих фракциях протеиназы В и цитозольной фракции KL. Помимо этого в группе с дополнительным введением блокатора синтеза оксида азота на фоне применения карнитина отмечен статистически значимый прирост результатов (исключение НСА у КН) относительно введения исключительно только ингибитора NO-синтаз. Полученные данные позволяют говорить о частичной коррекции влияния ингибитора NO карнитином, в связи с его возможностью воздействия на систему аргиназа – оксид азота [152].

Статистически значимые отличия от введения карнитина наблюдаются у всех исследуемых катепсинов в группе №6 (исключение НСА у протеиназы Н) и №7.

Показатели критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах применения карнитина отдельно и в сочетании с регуляторами синтеза азота в скелетной мускулатуре демонстрируют наличие статистически значимых различий между показателями ЛЦП (таблица 9 в приложении).

3.3.2. Оценка лабильности мембраны лизосом

Для трактовки результатов и выяснения причин изменения активности цитозольной фракции катепсинов была предпринята попытка оценки показателя коэффициента лабильности (Клаб,%), как индикатора степени проницаемости лизосомальной мембраны. Широко известно, что именно степень прикрепления ферментов лизосом к мембране характеризует ее стабильность, которая оценивается по маркерным ферментам, одним из наиболее изученных является кислая фосфатаза [60]. Исследователи доказали, что не выраженная степень окислительного стресса влечет за собой лишь частичное повреждение лизосом, что в

дальнейшем может индуцировать апоптоз, однако, при высокой интенсивности окислительных процессов повреждение приводит к некрозу [154].

Помимо прямой зависимости целостности мембраны лизосом и уровнем фермента, как у кислой фосфатазы [59]; у ЛЦП существует дополнительный механизм секреции - сквозь не поврежденную мембрану [157]. Обобщая выше сказанное, можно отметить две причины выхода протеаз за пределы органеллы – это либо изменение секреторной функции конкретного катепсина, либо изменение общей проницаемости мембраны лизосом [133]. Коэффициент лабильности в свою очередь демонстрирует относительное распределение катепсинов между отдельными фракциями катепсинов по обе стороны мембраны, а так же проницаемость лизосом для отдельных гидролаз.

При изучении пермеабиллизации мембраны лизосом на основе показателей коэффициента лабильности обнаружено разнонаправленное действие данного показателя для изучаемых ферментов в группах с применением L-аргинина (таблица 8-10). Выявленное статистически значимое повышение ОА у показателей кислой фосфатазы в аорте наблюдается за счет активного нарастания лизосомальной фракции и снижения цитоплазматической, что отражает статистически значимое уменьшение показателя Клаб,% (таблица 4-6 в приложении), характеризующего снижение проницаемости мембраны лизосом.

Для ткани миокарда статистически значимых результатов не обнаружено.

В скелетной мускулатуре, напротив, происходит статистически значимый рост показателя Клаб,% кислой фосфатазы.

Наиболее явные изменения наблюдаются у катепсина В, данный фермент демонстрирует высокие показатели коэффициента лабильности в контрольной группе; эффект L-аргинина проявляется выраженным

статистически значимым снижением этого параметра в аорте и сердечной мышце.

В экспериментальной модели с введением L-аргинина в гладкой мускулатуре сосуда обнаружено, что на фоне статистически значимого снижения значений Клаб,% для изучаемых катепсинов В и Н данная группа демонстрирует общую стабилизацию лизосомальной мембраны при отсутствии существенного вклада в механизмы секреции. Это несомненно согласуется с ранее полученными с данными о секреции протеиназы В при различных патологиях [82, 161, 172]. Возможность сохранять стабильность при физиологических значениях рН катепсина В [165], не гарантирует развития отсроченного апоптоза. Помимо этого существуют возможности с помощью ЛЦП запуска механизмов программированной клеточной гибели посредством активации других медиаторов.

Для катепсина L в сосуде не обнаружено статистически значимых изменений изучаемых показателей.

Отсутствие вклада секреторного механизма и выхода ферментов во внелизосомальную фракцию характеризует ткань аорты, отмеченная статистически значимыми снижениями показателя Клаб, % катепсина Н и кислой фосфатазы (таблица 14). Возможно, статистически значимое снижение кислой фосфатазы и коэффициента лабильности в этом случае можно трактовать как проявление общего стабилизирующего действия L-аргинина на лизосомальную мембрану.

Миокард на фоне статистически значимого снижения Клаб% для катепсина В (изменения показателя для кислой фосфатазы статистически не значимы), скорее всего демонстрирует подавление секреции фермента через неповрежденную мембрану (таблица 14, таблица 5 в приложении).

Протеиназы L и Н в сердечной мышце не показали статистически значимых изменений коэффициента лабильности. Незначительное снижение Клаб,%, на фоне небольшого прироста ОА, позволяет сделать

предположение об отсутствии влияния аргинина на процесс секреции ферментов в миокарде.

Скелетная мускулатура позволяет предположить выход ЛЦП через поврежденную мембрану (статистически значимый рост Клаб,% только кислой фосфатазы); процесс дестабилизации сопровождается статистически значимый рост НСА у всех исследуемых катепсинов.

В целом, результаты исследования подтверждают тезис о дифференциальной проницаемости лизосомальной мембраны для цистеиновых протеиназ и позволяют говорить о двойственной роли L-аргинина на процесс лизосомальной пермеабилзации.

Таблица 14 - Изменение показателей проницаемости лизосомальной мембраны в аорте, миокарде и скелетной мускулатуре под влиянием L-аргинин; Me [min; max], нкат/г белка

Показатель		Аорта		Миокард		Скелетная мускулатура	
		Контроль	L-аргинин	Контроль	L-аргинин	Контроль	L-аргинин
КФ	К лаб, %	43,2	12,1	13,9	18,2	8,1	12,4
		[31,7; 63,6]	[11,0; 20,8]	[12,4; 17,3]	[14,9; 26,7]	[4,7; 9,9]	[10,2; 13,5]
			*				*
КВ	К лаб, %	44,4	9,99	54,4	10,9	58,7	57,9
		[35,7; 78,5]	[5,95; 24,7]	[47,3; 70,5]	[6,7; 12,6]	[50,6; 65,9]	[37,6; 73,4]
			*		*		
КЛ	К лаб,	28,8	17,8	10,6	8,8	9,2	11,4
		[15,6; 58,3]	[3,9; 26,4]	[4,5; 15,2]	[6,2; 13,5]	[4,4; 17,8]	[9,2; 11,9]
КН	К лаб, %	36,5	11,5	10,5	10,3	9,9	9,1
		[31,5; 60,1]	[8,2; 22,8]	[9,1; 21,2]	[9,9; 15,95]	[6,3; 19,3]	[7,7; 11,4]
			*				

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

При введении L-NAME, 25 мг/кг участок аорты демонстрирует статистически значимые отличия от группы контроля: снижение общей активности за счет лизосомальной фракции у кислой фосфатазы (таблица 4 в приложении). Статистически значимое отличие от экспериментальной группы с использованием аргинина характеризуется: снижением ОА за счет СА у кислой фосфатазы (таблица 4 в приложении), рост цитозольной фракции в сочетании с увеличением показателя коэффициента лабильности, характеризует увеличение к лизосомальным мембранам.

При увеличении дозы L-NAME до 200 мг/кг в участке аорты у кислой фосфатазы и протеиназ статистически достоверных данных против контроля не обнаружено. Одновременный статистически значимый рост показателей коэффициентов лабильности кислой фосфатазы: снижение ОА и СА (таблица 5 в приложении); и протеиназ демонстрирует процесс дестабилизации лизосомальной мембраны под действием ингибитора оксида азота (таблица 15).

С увеличением дозы блокатора NO происходит дальнейший статистически значимый рост показателей Клаб, %, что говорит об усугублении процесса дестабилизации мембран лизосом, в результате чего можно говорить о прямом дозозависимом эффекте пермеабиллизации.

Статистически значимые изменения кислой фосфатазы в скелетной мускулатуре у L-NAME-зависимых животных (таблица 6 в приложении) относительно контрольной группы обусловлены снижением общей активности, происходящей за счет обеих субклеточных фракций. Показатель коэффициента лабильности статистически значимо увеличивается относительно контроля, что свидетельствует о лабилизации мембраны лизосом (таблица 15). Динамика статистически значимого увеличения К лаб, % протеиназ и кислой фосфатазы говорит о запуске механизма лабилизации мембраны лизосом.

Таблица 15 - Изменение показателей проницаемости лизосомальной мембраны в аорте, миокарде и скелетной мускулатуре под влиянием L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг; Me [min; max], нкат/г белка

Показатель	Аорта			Миокард			Скелетная мускулатура		
	Контроль	L-NAME, 25	L-NAME, 200	Контроль	L-NAME, 25	L-NAME, 200	Контроль	L-NAME, 25	L-NAME, 200
КФ К лаб., %	29,4 [17,6; 45,3]	43,4 [40,6; 46,2] ▲	29,3 [4,8; 46,8]	5,0 [1,9; 8,1]	7,7 [4,4; 54,7] *	11,7 [7,0; 63,6]*	3,3 [1,9; 4,5]	22,2 [6,9; 54,7] * ▲	14,2 [9,3; 19,3] *
КВ К лаб., %	24,7 [13,9; 39,3]	17,4 [14; 44,2]	26,7 [5,2; 61,2]	2,4 [0,9; 4,8]	4,7 [3,2; 23,9] *	9,4 [6,8; 33,6]*	1,8 [1,0; 2,8]	13,8 [6,0; 23,9] * ▲	8,3 [3,3; 11,1] •
КЛ К лаб., %	24,9 [12,2; 42,9]	27,0 [14,0; 47,6]	29,2 [4,2; 55,4]	2,6 [0,9; 6,2]	5,2 [2,9; 28,1] *	10,2 [8,2; 30,2]*	1,9 [0,9; 5,5]	13,6 [9,0; 28,1] *▲	8,3 [3,3; 11,1] •
КН К лаб., %	33,5 [14,1; 47,1]	24,2 [12,8; 39,8] ▲	24,7 [3,6; 41,5]	3,1 [2,1; 4,9]	6,6 [4,2; 19,3] *	13,9 [8,4; 29,9]*	2,3 [2,1; 4,0]	16,9 [9,1; 19,3] *▲	12,5 [5,8; 24,5] •

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$);

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$);

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$)

Изменения в мышце в группе с увеличением до 200 мг/кг L-NAME статистической значимости у протеиназ не обнаружили, однако увеличение показателя лабильности кислой фосфатазы позволяет предположить наличие мембранодестабилизирующего действия блокатора NOS. Все показатели группы статистически значимо отличаются от результатов экспериментальной группы с меньшей дозой, возможно, здесь стоит предположить обратный дозозависимый эффект дестабилизации.

Таким образом, на основании выше изложенного, можно сделать выводы о возможности дестабилизации лизосомальных мембран в изучаемых тканях крыс-самцов под влиянием ингибитора NO-синтазы в дозах 25 и 200 мг/кг.

Характеристика кислой фосфатазы в группе модуляторов синтеза NO в аорте отмечает статистически значимые отличия у ОА, снижение за счет лизосомальной фракции (таблица 4 в приложении). Мембраностабилизирующее действие с преобладанием эффекта L-NAME характеризует статистически значимый рост показателя коэффициента лабильности протеиназы В; отмечены статистически значимые отличия в группе показателей от аргинин-принимавших животных. Сходные процессы происходят с катепсинами L и H (показатели статистически не значимы).

Все показатели Клаб,% миокарда группы животных, получавших аргинин + L-NAME, демонстрируют рост (таблица 16). Выявленные изменения статистически значимого увеличения Клаб,% кислой фосфатазы свидетельствуют о понижении устойчивости (лабилизации) лизосомальной мембраны [132]. Отсутствие статистически значимых изменений показателя Клаб,% дополнительно говорит об отсутствии вклада секреторного механизма в процесс у катепсинов В и Н. Статистически значимый рост показателя Клаб,% у протеиназы L на фоне снижения

общей активности подтверждает ранее высказанное предположение о «выходе» фермента в цитозоль через поврежденную мембрану. В группе преобладают статистические отличия от группы блокатора синтеза оксида азота над группой его донора, показатели выше исходных, что говорит о частичном проявлении действия ингибиторного эффекта в сочетанном введении модуляторов синтеза азота.

Таблица 16 - Изменение показателей проницаемости лизосомальной мембраны в аорте, миокарде и скелетной мускулатуре под влиянием L-аргинина и L-NAME; Me [min; max], нкат/г белка

Показатель		Аорта		Миокард		Скелетная мускулатура	
		Контроль	L-NAME + L-аргинин	Контроль	L-NAME + L-аргинин	Контроль	L-NAME + L-аргинин
КФ	К лаб, %	32,2 [17,6; 63,6]	35,2 [27,8; 57,1] ▲	7,9 [4,4; 17,3]	23,3 [17,5; 25,1] * •	9,6 [4,7; 54,7]	10,0 [6,9; 12,5] •
		30,8 [13,9; 78,5]	40,1 [27,95; 56,2] * ▲ •	4,4 [3,2; 70,5]	18,2 [11,3; 25,4] ▲ •	19,7 [6,0; 65,9]	9,1 [8,0; 14,6] * ▲ •
КЛ	К лаб, %	28,6 [12,2; 58,3]	40,9 [18,5; 53,6] ▲	4,3 [2,9; 15,2]	15,4 [9,4; 19,9]* •	12,6 [4,4; 28,1]	8,8 [5,5; 13,8] •
		34,0 [14,1; 60,1]	29,8 [12,8; 62,9] ▲	5,9 [4,2; 21,2]	17,3 [14,9; 20,0]* ▲ •	14,3 [6,3; 19,3]	10,4 [8,0; 12,2] •

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$);

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$);

- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME($p < 0,05$)

Характеризуя скелетную мышцу, статистически значимых отличий Клаб,% от контроля у кислой фосфатазы не выявлено, однако статистически значимый рост ОА происходит больше за счет лизосомальной фракции, чем цитозольной (таблица 6 в приложении). Отсутствие статистически значимых изменений Клаб,% у кислой фосфатазы на фоне снижения коэффициентов лабильности протеиназ (статистически значимого у КВ) свидетельствует о мембраностабилизирующем действии (таблица 14). У Клаб,% кислой фосфатазы и протеиназ отмечено статистически значимое снижение показателей относительно экспериментальной группы №2, это может свидетельствовать о преобладании эффекта блокатора NO-синтазы над донатором оксида азота.

Отсутствие статистически значимых изменений Клаб,% образцов тканей в группе карнитин-зависимых животных (таблица 17), на фоне статистически не значимо снижающихся показателей Клаб,% ЛЦП говорит об отсутствии мембранодестабилизирующего механизма в участке грудной аорта, ОА протеиназ статистически не значимо снижается (таблица 4 в приложении).

Сердечная мышца, напротив демонстрирует статистически не значимый незначительный рост Клаб,% кислой фосфатазы, что при условии роста ОА, может свидетельствовать об активации процесса лабильности мембраны (таблица 5 в приложении).

Статистически значимое снижение Клаб,% у катепсина В свидетельствует о процессе стабилизации мембраны (таблица 17).

Таблица 17 - Изменение показателей проницаемости лизосомальной мембраны в аорте, миокарде и скелетной мускулатуре под влиянием L-карнитина; Me [min; max], нкат/г белка

Показатель		Аорта		Миокард		Скелетная мускулатура	
		Контроль	L-карнитин	Контроль	L-карнитин	Контроль	L-карнитин
КФ	К лаб, %	33,6	26,4	8,8	13,5	17,4	9,8
		[17,6; 63,6]	[18,6; 28,2]	[4,4; 54,7]	[10,5; 13,9]	[4,7; 54,7]	[8,6; 12,0]
КВ	К лаб, %	31,0	22,3	8,4	8,6	31,8	7,9
		[13,9; 78,5]	[17,4; 28,99]	[3,2; 70,5]	[7,9; 12,0]	[6,0; 65,9]	[5,1; 14,1] *
КЛ	К лаб, %	28,9	23,9	7,2	8,5	12,9	9,7
		[12,2; 58,3]	[18,7; 36,1]	[2,9; 28,1]	[7,2; 19,6]	[4,4; 28,1]	[6,6; 12,1]
КН	К лаб, %	32,0	25,2	9,1	11,5	13,9	9,5
		[14,1; 60,1]	[16,1; 37,5]	[4,2; 21,2]	[7,7; 14,4]	[6,3; 19,3]	[6,5; 11,8]

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Статистически значимых изменений коэффициента лабильности в тканях сосуда, сердечно и скелетной мускулатуры под действием карнитина и регуляторов синтеза оксида азота не обнаружено (таблица 18).

Анализ результатов аорты группы карнитин + аргинин позволяет предполагать отсутствие вклада не только механизма дестабилизации мембраны, но и изменения секреторной функции. Статистически значимое повышение показателя Клаб,% в участке сосуда у протеиназы В под

влиянием карнитина и L-NAME, без изменения коэффициента лабильности кислой фосфатазы говорит об активации секреторного механизма в процессе пермеабиллизации мембраны.

Таблица 18 - Изменение показателей проницаемости лизосомальной мембраны в аорте, миокарде и скелетной мускулатуре под влиянием карнитина хлорида в сочетании с регуляторами синтеза оксида азота; Me [min; max], нкат/г белка

Показатель	Аорта			Миокард			Скелетная мускулатура		
	Контроль	Карнитина хлорид + аргинин	Карнитина хлорид + L-NAME	Контроль	Карнитина хлорид + аргинин	Карнитина хлорид + L-NAME	Контроль	Карнитина хлорид + аргинин	Карнитина хлорид + L-NAME
КФ	33,6 [17,6; 63,6]	25,8 [19,4; 28,8]	28,8 [24,97; 40,9] •	8,8 [4,4; 54,7]	16,1 [10,7; 21,2] ■	14,3 [12,9; 16,0]	17,42 [4,7; 54,7]	11,7 [9,3; 13,5]	8,6 [7,4; 9,3] • ■
КВ	31,0 [13,9; 78,5]	25,1 [14,2; 30,6]	28,1 [17,6; 48,2] *	8,4 [3,2; 70,5]	9,1 [6,9; 15,5]	10,6 [6,7; 14,5] ■	31,79 [6,0; 65,9]	9,8 [6,7; 20,6] * ▲	9,6 [7,3; 20,3] * •
КЛ	28,9 [12,2; 58,3]	27,1 [18,6; 37,3]	30,5 [20,5; 56,3]	7,2 [2,9; 28,1]	11,7 [9,2; 16,3]	10,8 [9,6; 12,7]	12,94 [4,4; 28,1]	12,2 [9,0; 14,3]	12,5 [8,7; 15,1] •
КН	32,0 [14,1; 60,1]	26,7 [20,9; 40,2] ▲	26,4 [20,5; 47,7]	9,1 [4,2; 21,2]	22,6 [11,4; 37,6] * ▲ ■	13,6 [8,3; 16,3]	13,85 [6,3; 19,3]	17,9 [9,9; 21,4] ▲ ■	12,0 [6,4; 15,9] •

Примечание:

- * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$);
- ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$);
- - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$);
- - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Динамика изменений в миокарде характеризуется статистически не значимым ростом Клаб,% кислой фосфатазы (таблица 18). Единственным статистически значимым показателем среди групп под действием карнитина в сочетаниях с модуляторами оксида азота является рост Клаб,% катепсина Н в группе с использованием аргинина и карнитина, что позволяет предположить секрецию фермента через неповрежденную мембрану лизосом.

Активное статистически значимое снижение секреции катепсина В у животных, принимавших карнитин с модуляторами синтеза оксида азота, в мышце бедра отмечается на фоне статистически не значимого Клаб,%. Экспериментальная группа с блокатором NOS характеризуется повсеместным снижением показателей относительно L-NAME-зависимых животных (таблица 6 в приложении), данные показатели демонстрируют снижение эффекта ингибитора синтеза оксида азота.

Наличие отличий от группы отдельного карнитина в сочетанных моделях карнитина с регуляторами синтеза оксида азота у изучаемых тканей предполагает преобладание эффекта карнитина над модуляторами синтеза оксида азота. Остановиваясь на показателях критерия Kruskal – Wallis ANOVA коэффициента лабильности в группах применения карнитина отдельно и в сочетании с регуляторами синтеза оксида азота следует отметить наличие статистически значимых различий между группами сердечной и скелетной мышц у кислой фосфатазы и катепсина Н (таблица 7-9 в приложении).

Довольно значимым является факт сильной размытости границ прижизненной пермеабиллизации лизосомальных мембран, соответствующей индукции апоптоза, в настоящее время доказанным является, что стабильность мембраны лизосом может сохраняться даже при 15% лабилизации [107].

3.3.3. Оценка аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ

Способность изучаемых ферментов к аутокаталитической активации определяли посредством сравнительного анализа коэффициентов аутокаталитического действия протеиназ В, L, Н в аорте, миокарде и скелетной мускулатуре (таблица 10-12 в приложении).

При дополнительном стимулировании синтеза NO введением L-аргинина, значения K_{aca} ферментов аорты и миокарда в цитозольной и лизосомальной фракциях статистически значимо не изменяются относительно значений контрольной группы. Скелетная мускулатура демонстрирует статистически значимое нарастание показателей K_{aca} (таблица 12 в приложении) для катепсина Н в цитозольной фракции, следует заметить, что значительное увеличение НСА говорит о высокой степени аутопроцессинга данного фермента.

Неселективный блокатор NOS - L-NAME стимулирует аутопроцессинг катепсинов изучаемых тканей. При этом в аорте увеличение K_{aca} для катепсина Н отмечено статистически значимыми отличиями от контроля в обеих фракциях (таблица 10 в приложении); все показатели K_{aca} миокарда (таблица 11 в приложении) характеризуются статистически значимым увеличением по сравнению с контрольной группой (исключение – НСА катепсина L); в скелетной мышце отмечается статистически значимое нарастание K_{aca} у протеиназ В и Н (таблица 12 в

приложении). Таким образом, в эксперименте с моделированием дефицита синтеза NO в организме возникает функциональная потребность в активных ферментах. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными для ткани тимуса и селезёнки [1].

С ростом дозы ингибитора NOS до 200 мг/кг (таблица 10-12 в приложении) в аорте аутокаталитическая активность катепсина Н незначительно статистически значимо растет в лизосомальной фракции, а в миокарде статистически значимо увеличивается K_{aca} у протеиназы Н как в цитозольной, так и в лизосомальной фракциях, относительно группы контроля. Возможно, это связано с более высокой аутокаталитической активностью профермента катепсина Н и регистрацией результата в связи с этим в быструю фазу аутопроцессинга [32]. В скелетной мускулатуре все показатели K_{aca} протеиназы В так же статистически значимо увеличиваются относительно группы контроля.

В модели с использованием L-NAME 25 мг/кг на фоне L-аргинина катепсина В и L в изучаемых тканях демонстрируют угнетение аутопроцессинга, что свидетельствует о существенном увеличении количества неактивных молекул фермента в лизосомах и цитоплазме в описываемых условиях. Статистически значимое снижение коэффициента относительно контроля наблюдается в гладкой мускулатуре сосуда для катепсина L в неседиментируемой фракции; в миокарде у внелизосомальной фракции KB и обеих фракций протеиназы Н. Изменения, происходящие при введении L-NAME на фоне применения аргинина в скелетной мышце, характеризуются статистически значимым увеличением показателей седиментируемой фракции у катепсина В и обеих фракций протеиназы Н. Наличие статистически значимых отличий у изучаемых тканей относительно регуляторов синтеза оксида азота свидетельствует о суммировании эффектов.

Участие в аутокаталитическом процессинге ЛЦП карнитина отдельно и в сочетаниях с регуляторами синтеза оксида азота характеризуется угнетением аутопроцессинга протеиназы В в изучаемых тканях крыс (таблица 10-12 в приложении).

Отмечаемая степень изменений у катепсина В в аорте (статистически значимое снижение СА относительно контроля) и цитозольной фракции у катепсина В; седиментируемой и неседиментируемой фракций у катепсина L в миокарде и внелизосомальной фракции катепсина В в мышце ниже, чем в контрольных группах, возможной причиной является меньшая доля зимогенов и, как результат, активное состояние большей части протеиназ.

Под влиянием карнитина происходит стимуляция аутопроцессинга протеиназ L и H в аорте и катепсина H в скелетной мышце (статистически значимый рост фракций указанных ферментов) по сравнению с контролем.

Применение карнитина и его сочетания с аргинином в аорте характеризуется динамикой статистически значимого снижения K_{aca} у СА протеиназы В; у цитозольной фракции KB и лизосомальной фракции KL в миокарде; в цитозольной фракции KB в мышце, вероятно характеризующееся суммированием эффектов используемых препаратов и перевода большинства зимогенов в активное состояние. Таким образом, аргинин в процессе преинкубация вызывает расщепление активных форм, а не процессинг проферментов.

Характеризуя протеиназу L аорты и миокарда экспериментальной группы №6, следует заметить, что значительное увеличение НСА у исследуемых коэффициентов говорит о высокой степени аутопроцессинга данного фермента.

Снижение K_{aca} СА KL при сочетании карнитина с L-NAME 25 мг/кг сосуда, а так же протеиназ В и L сердечной и скелетной мышцы по отношению к экспериментальной группе №2 может объясняться

сохранением некоторого количества проферментов, для которых характерна очень низкая каталитическая активность, которая может быть достаточной для инициирования цепной реакции, катализируемой возрастающим количеством каталитически активных ферментных молекул [12].

Стимуляция аутопроцессинга катепсина Н под влиянием карнитина и его сочетанных групп проявляет единообразие изменений в исследуемых тканях; сочетанные группы имеют статистически значимые повышения относительно групп контроля, соответствующего регулятора синтеза оксида азота и карнитина (таблица 10-12 в приложении), возможно в данном случае происходит расщепление уже активных форм, а не активация проферментов.

3.4. Характеристика корреляционных связей

Анализируя процессы спонтанной ОМБ в участке грудной аорты крысы на фоне изменения активности изучаемых катепсинов (рисунок 50), отмечена сильная статистически значимая корреляция между изменением общей площади ОМБ и:

1. прямая
 - 1.1. седиментируемой активностью катепсина Н в группе с применением ингибитора оксида азота в дозе 25 мг/кг
 - 1.2. общей активностью катепсина Н в группе с применением ингибитора оксида азота в дозе 25 мг/кг
 - 1.3. неседиментируемой активностью катепсина L в группе с сочетанным применением карнитина и аргинина
2. обратная
 - 2.1 неседиментируемой активностью катепсина Н в группе с использованием карнитина.

Помимо указанных показателей отмечается высокая обратная корреляция (таблица 13 в приложении) в группе животных с введением карнитина между S ОМБ и общей активностью протеиназы В, а также НСА катепсина L.

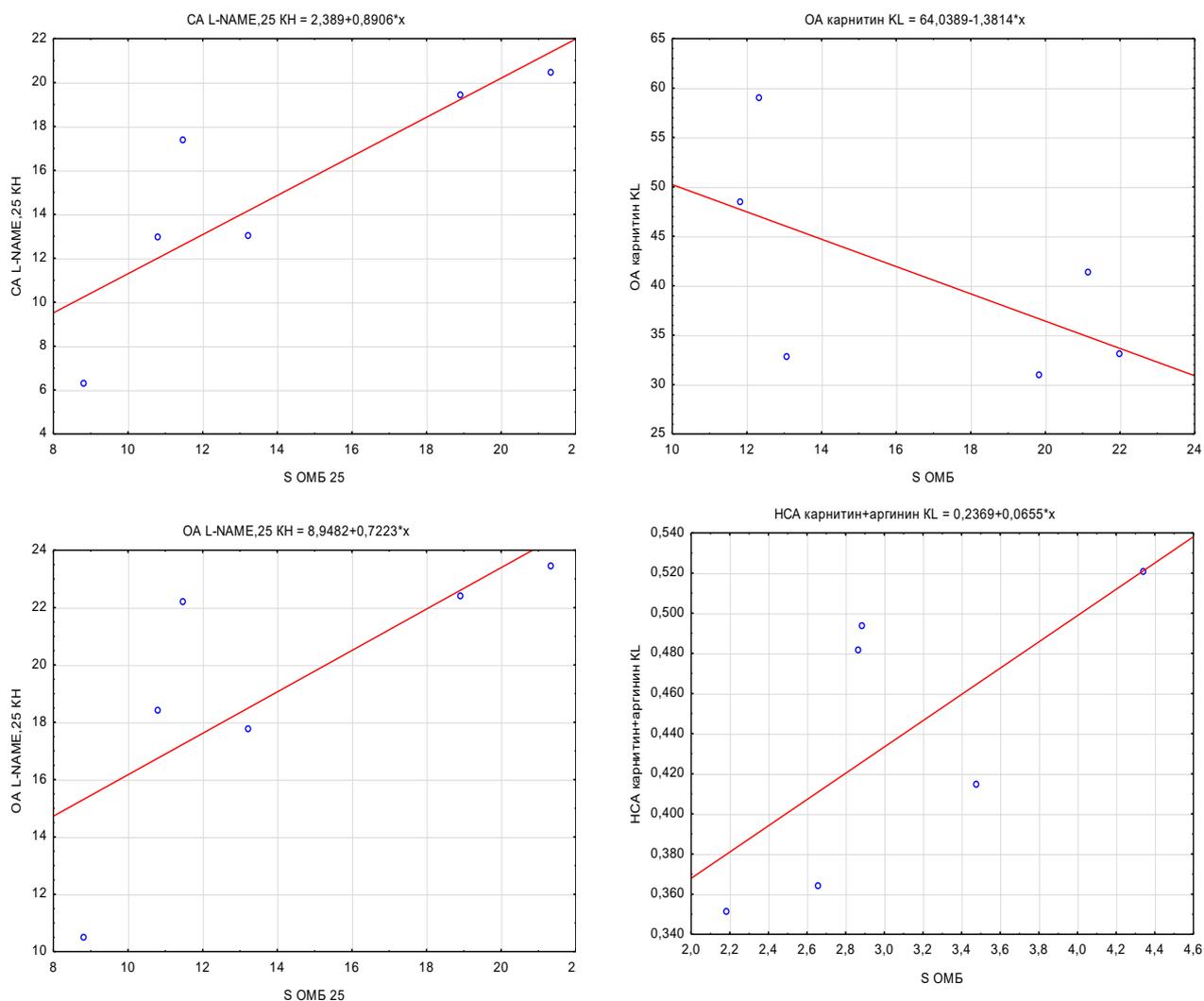


Рисунок. 50. Графики корреляционной связи между общей площадью ОМБ и фракциями катепсинов В, L, Н в участке грудной аорты

Миокард характеризуется сильной степенью статистически значимой корреляции (рисунок 51) S ОМБ и группой:

1. введения ингибитора оксида азота в дозе 25 мг/кг у НСА катепсина L (обратная корреляция);

2. введения ингибитора в дозе 200 мг/кг и СА, а так же ОА протеиназы Н (прямая корреляция) соответственно.

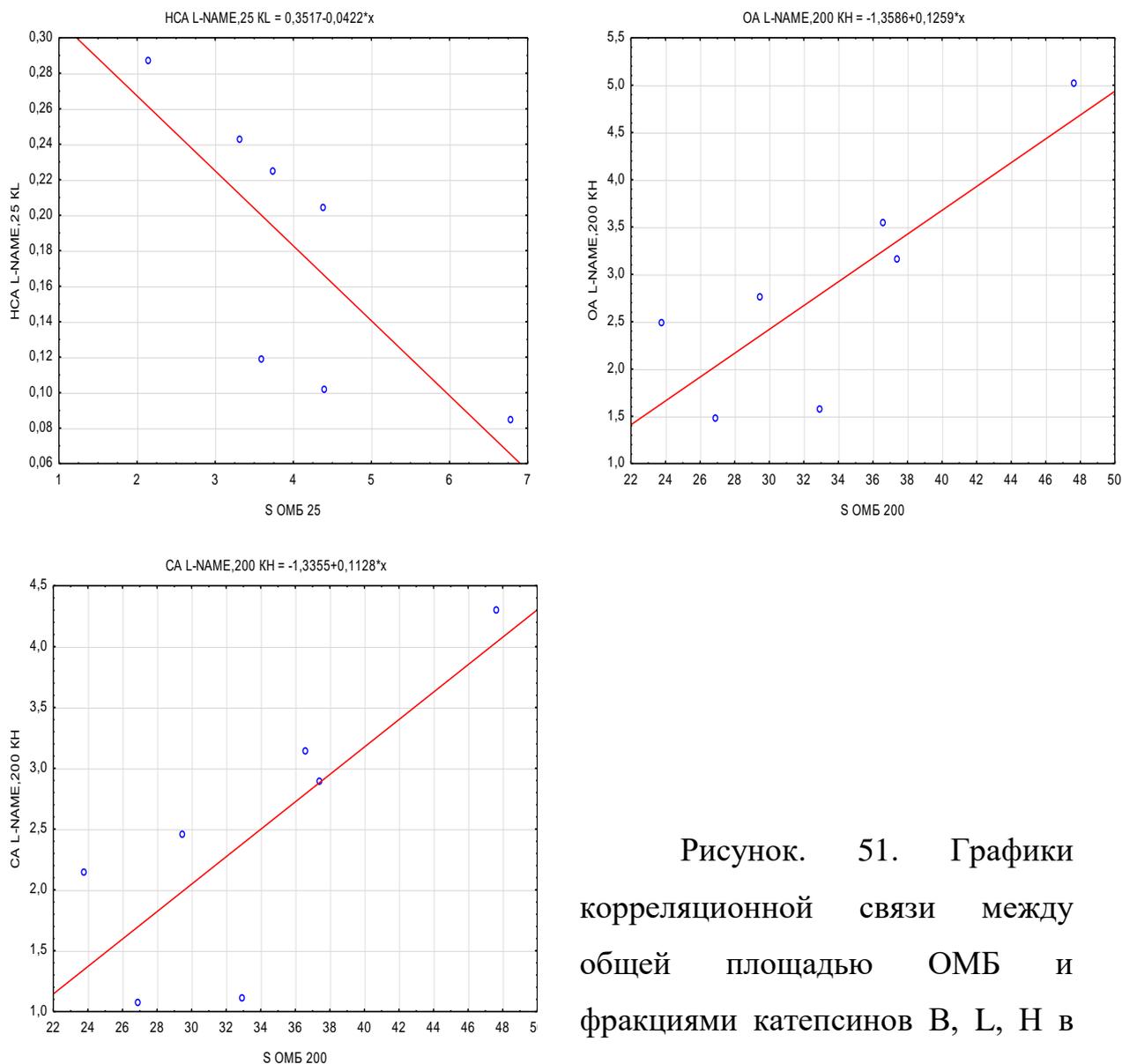


Рисунок. 51. Графики корреляционной связи между общей площадью ОМБ и фракциями катепсинов В, L, Н в миокарде

Помимо этого в сердечной мышце отмечается высокая степень корреляционных связей без статистической значимости (таблица 14 в приложении): прямая - между общей площадью ОМБ и цитозольной фракцией катепсинов В и Н в экспериментальной модели с аргинином; обратная – с L-NAME, 25 мг/кг во внелизосомальной фракции протеиназы

В; карнитин-зависимая группа отмечает прямую связь у цитозольной фракции катепсина Н, а гомогенаты, с применением карнитина в сочетании с ингибитором NOS демонстрируют обратную связь НСА катепсина Н.

В скелетной мускулатуре статистически значимых корреляционных связей не обнаружено (таблица 15 в приложении). Однако, стоит отметить высокую степень корреляции между общей площадью окислительной модификации белков и: прямая корреляция отмечена у отдельного применения регуляторов синтеза оксида азота (аргинин и L-NAME) в цитозольной фракции; карнитин-зависимая группа демонстрирует обратную корреляцию у СА и ОА протеиназы L; модель с использованием препаратов карнитина и аргинина имеет тоже отрицательную обратную корреляцию у показателя общей активности катепсина Н; карнитин, совместно вводимый с ингибитором NOS характеризуется отрицательной корреляционной связью в СА и ОА у протеиназы В.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лизосомальные цистеиновые протеиназы относятся к семейству папаиноподобных протеолитических ферментов, локализованных в основном в лизосомах и поздних эндосомах клетки. В эукариотической клетке лизосома является одним из компартментов для утилизации белков [145].

Повсеместное распространение в организме, доступные методики исследования, широкий круг функций и специфичность некоторых сделали катепсины объектом пристального внимания в несколько последних десятилетий [174].

Активность ЛЦП подвержена мультифакторной регуляции [175] и может меняться в связи с изменением синтеза самого фермента, изменения степени аутокатализа, характерного для данной группы ферментов, а также в результате окислительной модификации белков при оксидативном стрессе [162, 165].

Активация протеолиза является важнейшим биохимическим механизмом фундаментального патологического процесса – воспаления [73]. Изменение реакции среды в очаге воспаления в сторону закисления приводит к пермеабиллизации мембран лизосом, выходу в цитоплазму ЛЦП и их активации [49]. Способность секретироваться во внеклеточную среду потенцирует избирательный протеолиз [87].

В данной работе были исследованы показатели активности катепсинов В, L и Н в гомогенатах тканей аорты, миокарда и скелетной мускулатуры крыс-самцов под влиянием регуляторов синтеза оксида азота: L-аргинин, L-NAME, L-карнитин – отдельно и в различных сочетаниях, изменение механизмов аутокатализа при применении этих препаратов. Оценен вклад процессов окислительной модификации белков и концентрации конечных метаболитов оксида азота в регуляцию активности изучаемых ферментов. Выявлены механизмы взаимосвязи между окислительной деструкцией и резебно-

адаптационного потенциалом. Кроме того, проведена оценка связи активности ЛЦП и степени окислительной модификации белков под воздействием выше обозначенных веществ.

Оценивая взаимосвязь оксидативного, нитрозативного и карбонильного стрессов наибольшее внимание следует обращать на окислительную модификацию белков [22,147].

Под влиянием L-аргинина, 500мг/кг, отмечается статистически значимое снижение суммарного содержания карбонильных производных только в скелетной мускулатуре. Изменения в скелетной мускулатуре свидетельствуют о запуске механизмов вторичной антиоксидантной защиты [2, 69], с подавлением ОМБ. Одновременно отмечается увеличение содержания карбонильных производных в стенке грудной аорты и миокарда, что позволяет сделать предположение, об окислительном повреждении аминокислотных остатков как нейтрального так и основного характера.

Неселективный блокатор NO-синтазы в дозе 25 мг/кг во всех исследуемых образцах мышечных тканей вызывает снижение содержания окислительно-модифицированных белков. При этом повышение дозы до 200мг/кг парадоксально возвращает показатели к исходному уровню, что может быть связано с регуляцией синтеза NO в изучаемых тканях посредством дополнительных молекулярных механизмов, включающих NO-синтазо-зависимое увеличение транспорта L-аргинина в клетку и вовлечение аргиназы как ферментной системы, конкурирующей с NOS за общий субстрат [7,8,19]. Сочетанное применение субстрата синтеза оксида азота с ингибитором демонстрирует преобладание эффектов ингибитора.

Изолированное применение карнитина хлорида приводит к статистически значимому повышению содержания карбонилированных белков в ткани аорты, при этом в ткани миокарда и скелетной мышцы показатели статистически значимо снижаются относительно контроля. Сочетание карнитина с ингибитором синтаза оксида азота приводит к снижению

содержания окислительно-модифицированных белков только в миокарде и скелетной мышце. Эти наблюдения укладываются в представления о способности карнитина проявлять не только антиоксидантные [78, 85, 110, 132], но и прооксидантные [88] эффекты.

Карбонильный стресс в отличие от оксидативного характеризуется не просто стимуляцией свободно-радикальных процессов в тканях, но и усилением генерации в них эндогенных альдегидов [22], называемых так же первичными маркерами оксидативного стресса [69]. При анализе соотношения альдегидных и кетонных производных в изучаемых экспериментальных моделях обнаружено следующее: под влиянием аргинина происходит статистически значимое снижение первичных маркеров в миокарде и скелетной мускулатуре. Действие ингибитора синтеза оксида азота приводит к статистически значимому нарастанию первичных маркеров оксидативного стресса в аорте при этом их содержание в миокарде и скелетной мускулатуре статистически значимо снижается. Сочетанное введение субстанций демонстрирует эффекты сходные с эффектами аргинина.

Изолированное введение карнитина приводит к статистически значимому снижению первичных маркеров в скелетной и сердечной мускулатуре без изменений таковых в аорте, что, возможно, и является причиной описанного под влиянием субстанции снижения содержания окислительно модифицированных белков в скелетной мышце и миокарде. Сочетание карнитина с субстратом и ингибитором синтеза оксида азота помимо этого снижает содержание альдегидных производных в аорте.

В описании оксидативного стресса значение имеет не только фоновое содержание карбонильных производных, но и оценка возможности ткани противостоять подобным повреждениям.

Не смотря на продемонстрированные ранее значительные изменения содержания ОМБ под влиянием ингибитора оксида азота оценка РАП показывает отсутствие его изменений в скелетной мышце; и

разнонаправленность изменений в аорте – уменьшение и в миокарде – нарастание. Изменение дозировки субстанции не приводит к статистически значимым изменениям. Сочетанное применение аргинина с L-NAME демонстрирует доминирование эффекта аргинина. Продемонстрированные ранее преимущественно антиоксидантные эффекты карнитина как изолированно, так и в сочетании с модуляторами синтеза оксида азота проявляются также в преимущественно статистически значимом увеличении показателя РАП в изучаемых тканях.

Под влиянием субстрата синтеза оксида азота наблюдается явное статистически значимое нарастание активности всех изучаемых ферментов в ткани грудной аорты за счет лизосомальной фракции. В скелетной мускулатуре нарастание активности катепсина В сопровождается снижением активности катепсинов L и H, при этом изменения касаются как седиментируемой так и неседиментируемой фракции. Это соотносится с ранее продемонстрированной для других тканей способностью лизосомальных цистеиновых протеиназ к изменению активности и компарментализации под влиянием модуляторов синтеза оксида азота [1, 3].

Интересным наблюдением мы считаем, что парадоксальный эффект повышения дозировки ингибитора оксида азота на содержание продуктов окислительной модификации белков, сопровождается, как выяснилось, столь же парадоксальными изменениями активности лизосомальных цистеиновых протеиназ. Так в тканях грудной аорты и миокарда применение L-NAME в дозе 25 мг/кг демонстрирует снижение активности относительно контроля, при этом увеличение дозировки до 200 мг/кг приводит к нарастанию показателей как минимум относительно более низкой дозы. Исключением оказалась скелетная мускулатура, в которой наблюдался рост активности изучаемых ферментов под действием L-NAME 25 мг/кг, однако, при этом увеличение дозировки несколько снижало показатели. Таким образом, можно говорить о взаимосвязи процессов окислительного повреждения белков и лизосомального

цистеинового протеолиза, причём изменения активности ферментов могут оказаться причиной изменения содержания продуктов окислительной модификации белков [3].

Сочетанное применение субстрата и ингибитора синтеза NO характеризуется преобладанием эффекта L-NAME.

Несмотря на отсутствие статистически значимых изменений активности изучаемых ферментов при изолированном применении карнитина в ткани грудной аорты; наблюдается статистически значимое снижение показателей относительно контроля в группах сочетанного применения.

Для ткани миокарда описано статистически значимое увеличение общей активности ЛЦП при изолированном применении карнитина хлорида за счет обеих клеточных фракции. Сочетанное применение карнитина с модуляторами синтеза оксида азота демонстрирует снижение общей активности ферментов за счет снижения лизосомальной фракции, сопровождающегося нарастанием их активности в цитозоле.

Скелетная мышца, как и миокард, характеризуется значительным ростом ОА всех изучаемых ферментов за счет обеих фракций, с преобладанием лизосомальной фракции над цитозольной при изолированном применении карнитина хлорида. Полученные в результате сочетанного воздействия карнитина с регуляторами синтеза оксида азота данные позволяют говорить о нарастании активности ферментов в цитозоле в группе донаторов оксида азота и о частичной коррекции эффекта ингибитора синтеза NO карнитином, в связи с его возможностью воздействия на систему аргиназа – оксид азота [...]. Карнитин в сочетании с L-аргинином во всех типах гомогенатов может быть охарактеризован переизбытком синтеза оксида азота посредством активации синтеза его стимуляторами, в больших количествах проявляющего цитотоксические функции [145], возможен путь активации карнитином iNO-синтазы [88] или запуск иных биохимических механизмов защиты, провоцирующих апоптоз [13, 30].

Для формирования представлений о возможных механизмах выявленных изменений активности катепсинов оценивали степень аутокаталитической активации [57, 107]. Показатель позволяет косвенно оценить содержание проферментных форм в образцах.

Оказалось, что под влиянием аргинина коэффициенты аутокаталитического действия не демонстрируют статистически значимых отличий относительно значений контрольной группы. Неселективный блокатор NO-синтазы L-NAME приводит к увеличению показателя аутопроцессинга катепсинов изучаемых тканей, что свидетельствует о значительном содержании проферментных форм в образцах. Увеличение дозы до 200 мг/кг вновь демонстрирует парадоксальный эффект приближения показателя к контрольным значениям. Изменение показателей коэффициентов аутокаталитического действия в моделях с использованием L-NAME 25 мг/кг на фоне L-аргинина демонстрирует наличие статистически значимых отличий у изучаемых тканей относительно изолированного применения регуляторов синтеза оксида азота. Обнаруживаемые для ряда наблюдений снижения показателя аутокаталитического действия под влиянием карнитина могут объясняться фоновой высокой активацией изучаемых ферментов при которой прекалитическая инкубация приводит не к активации проферментов а к расщеплению активных форм [33, 57].

Для трактовки результатов и в том числе для выяснения причин изменения активности катепсинов в лизосомальной фракции была предпринята оценка показателя коэффициента лабильности (Клаб,%) для изучаемых ферментов. Одновременно описаны коэффициенты лабильности для кислой фосфатазы как маркерного фермента лизосом, выход которого в цитозольную фракцию, до сих пор связывают исключительно с неселективным изменением проницаемости лизосомальной мембраны [60].

Мы отмечаем мембраностабилизирующий эффект аргинина для миокарда и ткани грудной аорты, выражающийся в снижении показателя

коэффициента лабильности. Под влиянием ингибитора NO-синтазы в дозе 25 и 200 мг/кг происходит явная дестабилизация лизосомальных мембран в миокарде и скелетной мышце, причем изменения по-видимому не селективны. В качестве основной причины дестабилизации можно рассматривать снижение синтеза оксида азота, возможным вариантом развития сценария в данном случае может быть увеличение синтеза оксида азота по механизму обратной связи [46].

Для ткани аорты нарастание коэффициента лабильности для кислой фосфатазы практически не сопровождается изменениями данного показателя для катепсинов. Одновременное введение индукторов синтеза и ингибирования NO характеризуется некоторой мембраностабилизацией, однако эффект L-NAME продолжает преобладать: во всех тканях показатели активностей протеиназ стремятся занять промежуточное положение между индивидуально сформированными группами модуляторов синтеза оксида азота. Изолированное применение карнитина практически не изменило коэффициент лабильности. Тем не менее, введение карнитина существенно нивелирует мембранодестабилизирующий эффект ингибитора синтеза оксида азота, в частности для ткани грудной аорты и скелетной мускулатуры, что в целом соотносится с представлениями о механизмах его действия на мембраны: участие в транспорте жирных кислот, кроме того, к этому эффекту может приводить продемонстрированная в нашем исследовании способность карнитина стимулировать синтез оксида азота посредством воздействия на систему аргиназа - оксида азота [66, 152].

Модели с введением ингибитора оксида азота в дозе 25 мг/кг характеризуются статистически значимыми высокими корреляционными связями между окислительной деструкцией белков и ОА и НСА катепсина Н – прямая связь в аорте; и НСА протеиназы L - обратная корреляция в миокарде. Увеличение дозы ингибитора до 200 мг/кг отмечено статистически значимой высокой степенью прямой корреляционных связей у СА и ОА у КН в миокарде.

Группа карнитин-зависимых животных отличалась обратной сильной статистически значимой корреляцией между неседиментируемой активностью катепсина Н при введении и прямой высокой корреляционной связью между НСА протеиназы L в группе с сочетанным применением карнитина и аргинина в гомогенате аорты.

Таким образом, в заключение необходимо указать на доказанную связь между процессами активации лизосомальных цистеиновых протеиназ и степенью окислительного стресса. Данное исследование позволит в дальнейшем тщательнее разобраться в механизмах их влияния на апоптоз и посредством воздействия на организм увеличить резервно-адаптационные силы клетки, и как следствие, продолжительность жизни организма.

ВЫВОДЫ

1. Применение как ингибиторов, так и стимуляторов синтеза оксида азота приводит к снижению содержания продуктов окислительной модификации белков в ткани грудной аорты, миокарде и скелетной мышце. При этом механизмы изменений, по-видимому, различны: под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг и L-аргинина в дозе 500 мг/кг происходит уменьшение доли первичных маркеров оксидативного стресса, карнитина хлорид в дозе 300 мг/кг, провоцируя нарастание содержания метаболитов оксида азота, вызывает увеличение показателя резервно-адаптационного потенциала изучаемых тканей.

2. Преимущественным эффектом модуляторов синтеза оксида азота на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ является стимулирующее воздействие. Исключениями являются снижение активности изучаемых ферментов в ткани грудной аорты и миокарда под влиянием L-NAME (25 мг/кг) и снижение активности катепсинов L и H в скелетной мышце под действием L-аргинина (500 мг/кг). Сопровождающий указанные изменения рост значения показателя аутокаталитического процессинга демонстрирует увеличение доли проферментных форм катепсинов, косвенно указывая на стимуляцию их синтеза.

3. Подавление синтеза оксида азота субстратом и неселективным ингибитором NO-синтазы приводит к дестабилизации лизосомальных мембран; при этом карнитин демонстрирует мембраностабилизирующий эффект и существенно нивелирует изменения, вызванные L-аргинином в скелетной мускулатуре и L-NAME в сердечной и скелетной мускулатуре.

4. Изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ под влиянием модуляторов синтеза оксида азота статистически значимо коррелируют со степенью изменения содержания продуктов окислительной модификации белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаленихина, Ю.В. Влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность и аутопроцессинг катепсина В в иммунокомпетентных органах крыс в условиях *in vitro* [Текст] / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина // Наука молодых (*Eruditio Juvenium*).- 2014.- №1.- С.53-59.

2. Абаленихина, Ю. В. Корректирующее действие L-аргинина на окислительную модификацию белков селезенки крыс в условиях моделирования дефицита синтеза NO [Текст] / Ю.В. Абаленихина // Бюллетень Северного государственного медицинского университета.- 2013.- №. 1.-С. 109-110.

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

4. Абаленихина, Ю.В. Окислительная модификация белков селезенки крыс при экспериментальном дефиците синтеза оксида азота разной выраженности [Текст] / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина // Фундаментальные исследования.- 2013.- № 11(9).- С. 1850-1855.

5. Алмакаева, Л.Г. Аргинин и его применение в медицине и фармации [Текст] / Л.Г. Алмакаева, Е.В. Литвинова // Ліки України плюс.- 2011. - №1.- С.23-26.

6. Антонов, В.К. Химия протеолиза [Текст] / В.К. Антонов.- М.: Наука, 1991.- 504 с.

7. Аргинин в медицинской практике (Обзор литературы) [Текст] / Ю.М. Степанов [и др.] // Журн. АМН України.- 2004.- Т.10, №. 2.- С. 339-351.

8. Бабушкина, А.В. L-аргинин с точки зрения доказательной медицины [Текст] / А.В. Бабушкина // Укр. мед. часопис.- 2009.- Т.6, № 74.- С. 43-48.

9. Беленичев, И.Ф. Содержание маркёров окислительной модификации и нитрозилирования белков в головном мозге при введении цереброкурина, кортексина и церебролизина на фоне алкогольной интоксикации [Текст] / И.Ф. Беленичев, Е.П. Соколик // Запорожский мед. журн.- 2011.-Т.13, № 3.- С.5-7. ,

10. Биохимические критерии как маркёр соматизации и тяжести депрессивных состояний [Текст] / А.Л. Малев [и др.] // Современная медицина и фармацевтика: Актуальные проблемы и перспективы развития: сб. материалов XXX Междунар. науч. - практ. конф. и II этап Чемпионата в мед. и фарм. наук (Лондон, 16 Августа– 23 Августа, 2012).- Лондон, 2012.- Электрон. дан. – Режим доступа: <http://gisap.eu/ru/node/1373>.

11. Боев, К.В. Свободно-радикальное окисление белков: методологические аспекты количественной оценки окислительной модификации по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [Текст] / К.В. Боев, Д.В. Василенко, А.И. Маслов // Universum: Химия и биология: электрон. науч. журн.- 2014.- № 1 (2).- Режим доступа: <http://7universum.com/ru/nature/archive/search-2/item/839>.

12. Борискина, М.А. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у больных хроническими лейкозами в динамике заболевания [Текст]: дис...канд. мед. наук / М.А. Борискина.- Рязань, 1996.- 150 с.

13. Брюне, Б. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути [Текст] / Б. Брюне, К. Сан-дау, А. фон Кнетен // Биохимия.- 1998.- Т.63, вып.7.- С.966-975.

14. Ведунова, М.В. Влияние низких терапевтических доз озона на уровень окислительной модификации белков [Текст] / М.В. Ведунова, А.И.

Сазанов, К.Н. Конторщикова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.- 2010.- № 2.- С.504-507.

15. Взаимосвязь концентрации селена в плазме крови и уровня оксидативного стресса и системного воспалительного ответа у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой в остром периоде [Текст] / Х.С. Нуцалова [и др.] // Тольяттинский мед. консилиум- 2012.- № 5-6.- Электрон. дан.- Режим доступа: http://www.critical.ru/toliatti/page.php?chapter=2012_05&ref=05.

16. Владимирский, Е.В. Клиническая эффективность и безопасность включения в рацион питания пациентов с кардиоваскулярной патологией диетического профилактического продукта «масло «Гармоникум с живицей» [Текст] / Е.В. Владимирский, Е.Н. Бородина, Н.М. Абашева // Современные проблемы науки и образования.- 2013.- № 5.- Электрон. дан.- Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=10489>.

17. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза [Текст] / Н.В. Рязанцева [и др.] // Цитология.- 2012.- № 2.- С.105-111.

18. Головченко, Ю.И. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции [Текст] / Ю.И. Головченко, М.А. Трещинская // Consilium medicum Ukraina.- 2008.- №11.- С.38-40.

19. Горчакова, Н.О. Біохімія аргініну, фармакологічна дія і застосування в клінічній практиці його похідних [Текст] / Н.О. Горчакова, А.С. Ягупова, І.С. Чекман // Науковий вісник НМУ ім.О.О.Богомольця.- 2006.- №4.- С.238-246.

20. Граник, В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств: монография [Текст] / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев.- М.: Вузовская книга, 2004.- 360 с.

21. Гречушников, В.Б. Биологическая роль оксида азота как медиатора воспаления в гастродуоденальной патологии, ассоциированной с *Helicobacter*

pylori [Текст] / В.Б. Гречушников, Д.В. Гречушникова // Лечебное дело.- 2013.- №2.- С.46-49.

22. Давыдов, В.В. Карбонильный стресс как неспецифический фактор патогенеза (обзор литературы и собственных исследований) [Текст] / В.В. Давыдов, А.И. Божков // Журнал НАМН України.- 2014.- Т.20, №1.- С.25-34.

23. Дзугкоев, С.Г. Влияние L-карнитина и его комбинации с L-аргинином на функцию эндотелия при экспериментальном сахарном диабете [Текст] / С.Г. Дзугкоев // Здоровье и образование в XXI веке.- 2014.- №3.- С.15-16.

24. Дилакян, Э.А. Лизосомные цистеиновые протеиназы при неопластической трансформации [Текст] / Э.А. Дилакян, И.В. Цветкова // Биомедицинская химия.- 2005.- № 5.- С.485-500.

25. Динамика показателей окислительной модификации белков сыворотки крови в остром периоде разных подтипов ишемического инсульта [Текст] / Е.Ю. Кравцова [и др.] // Наука и здравоохранение.- 2011.- №5.- С.21-23.

26. Динитрозильные комплексы железа – естественные доноры оксида азота в организме [Текст] / В.И.Капелько [и др.] // Патологія. – 2008.- Т.5, №3.- С. 76.- Электрон. дан.- Режим доступа: http://nbuv.gov.ua/j-pdf/pathology_2008_5_3_58.pdf.

27. Дорохина, Л.В. Прооксидантно-антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы [Текст] / Л.В. Дорохина, В.В. Зинчук // Весці НАН РБ. Сер.біял. нав.- 2000.- №4.- С.87-90.

28. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях [Текст] / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохім. журн.- 2008.- Т. 80, №6.- С.5-18.

29. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение).

Физиологические и клинико-биохимические аспекты [Текст] / Е.Е. Дубинина.- СПб.: Издательство «Медицинская пресса», 2006.- 400 с.

30. Едранов, С.С. Межклеточные мессенджеры в регуляции репаративных процессов и апоптоза [Текст] / С.С. Едранов // ВНМТ.- 2012.- №1.- С.19-21.

31. Еременко, Р.Ф. Оценка влияния корректора белкового обмена экстракта из травы люцерны посевной на процессы окисления белков [Текст] / Р.Ф. Еременко, Л.Н. Малоштан // Медицина и образование в Сибири.- 2014.- №2.- Электрон. дан.- Режим доступа: <http://ngmu.ru/cozo/mos/article/pdf.php?id=1351>.

32. Иванов, Е.В. Особенности экспрессии индуцибельной NO-синтазы в сердце крыс в разных моделях инфаркта миокарда [Текст] / Е.В. Иванов, М.П. Давыдова, С.А. Гаврилова // Кислород и свободные радикалы: материалы Республиканской научно-практической конференции.- Гродно: ГрГМУ, 2014.- С.77-79.

33. Изучение механизма аутокаталитической активации прокатепсина Н in vitro [Текст] / О.С. Васильева [и др.] // Электронный журнал «Исследовано в России».- 2002.- С. 1092-1102.- Режим доступа: <http://elibrary.lt/resursai/Uzsienio%20leidiniai/MFTI/2002/100.pdf>.

34. Изучение содержания карбонильных производных белков плазмы крови у больных раком шейки матки для оценки течения заболевания [Текст] / П.С. Качесова [и др.] // Сибирский онкол. журн.- 2010.- №5 (41) (Прил.1).- С.55-56.

35. Интенсивность хемилюминисценции, состояние антиоксидантной системы и окислительная модификация белков плазмы крови при развитии рецидива рака яичников [Текст] / И.А. Горошинская [и др.] // Сибирский онкол. журн.- 2013.- № 4 (58).- С. 45- 49.

36. Исмаилова, Ж.Г. Окислительная модификация белков плазмы крови при гипотермии на фоне введения даларгина [Текст]: дис... канд. биол. наук / Ж.Г. Исмаилова.- Махачкала, 2004.-137с.

37. Использование биохимических показателей для оценки качества и эффективности лечебных мероприятий у больных остеоартрозом коленного сустава [Текст] / М.Г. Мещерякова [и др.] // Биомедицинская химия.- 2012.- Т. 58, № 2.- С.230-236.

38. Исследование антиоксидантного статуса у больных остеоартрозом коленных суставов до и после специфической фармакотерапии [Текст] / Я.Г. Трилис [и др.] // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения.- 2010.- №1.- С.377.

39. Камчатнов, П.Р. Применение карнитина (Элькар) в клинической практике [Текст] / П.Р. Камчатнов // Электронный ресурс: Medi.ru.– 2011.- Режим доступа: <http://archive.is/WEhWi#selection-87.0-104.0>.

40. Ковалева, О.В. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? [Текст] / О.В. Ковалева, М.С. Шитова, И.Б. Зборовская // Клиническая онкогематология.- 2014.- №2.- С.103-113.

41. Козовый, Р.В. Показатели окислительной модификации белков сыворотки крови и активности ферментов глутатионовой системы у долгожителей Прикарпатья [Текст] / Р.В. Козовый, Г.М. Эрстенюк // Фундаментальные исследования.- 2014.- № 2.- С. 77-81.

42. Коровин, М.С. Роль лизосомальных цистеиновых протеиназ в опухолевой прогрессии [Текст] / М.С. Коровин, В.В. Новицкий, О.С. Васильева // Бюл. Сиб. медицины.- 2009.- №2.- С.85-91.

43. Котова, Ю.А. Окисленные модифицированные белки сыворотки крови у пациентов с дислипидемией на фоне гипертонической болезни [Текст] / Ю.А. Котова, А.А. Зуйкова, А.Н. Пашков // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация.- 2015.- № 4.- С.90-93.

44. Кравцова, Е.Ю. Корреляция клинических показателей и окислительной модификации белков при ишемическом инсульте у лиц трудоспособного возраста [Текст] / Е.Ю. Кравцова, Г.А. Мартынова, Ю.И. Кравцов // Междунар. неврол. журн.- 2011.- Вып.8, №46.- Электрон. дан.- Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/25687>.

45. Кравцова, Е.Ю. Окислительная модификация белков как биохимический маркер прогноза ишемического инсульта [Текст] / Е.Ю. Кравцова, Д.Ю. Соснин, Г.А. Мартынова // Медицинский альманах.- 2012.- №2.- С.95-97.

46. Кузнецова, В.Л. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия [Текст] / В.Л. Кузнецова, А.Г. Соловьева // Современные проблемы науки и образования.- 2015.- № 4.- Электрон. дан.- Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21037>.

47. Луцак, В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма [Текст] / В.И. Луцак // Биохимия.- 2007.- Т.72, №8.- С.995-1017.

48. Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови [Текст] / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клинич. лаб. диагностика.- 2005.- №6.- С. 15- 18.

49. Немова, Н.Н. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов [Текст] / Н.Н. Немова, Л.А. Бондарева // Биомедицинская химия.- 2008.- Т. 54, №. 1.- С. 42-57.

50. Никитина, Ю.В. Изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в раннем онтогенезе [Текст] / Ю.В. Никитина, И.В. Мухина // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.- 2009.- №6(1).- С.124-131.

51. Окислительная модификация белка у новорожденных и младенцев, оперированных в условиях многокомпонентных анестезий с центральными нейроаксиальными блокадами [Текст] / М.Ю. Курочкин [и др.] // Медицина

неотложных состояний».- 2012.- Вып.2, №41.- Электрон. дан.- Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/27417>.

52. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) [Текст] / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопр. мед. химии.- 2000.- Т.46, № 4.- С. 398-409.

53. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения [Текст] / Е.Е.Дубинина [и др.] // Вопр. мед. химии.- 1995.- Т.41, № 1.- С.24-26.

54. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона [Текст] / Е.Е. Дубинина [и др.] // Биохимия.- 2002.- Т. 67, вып.3.- С.413-421.

55. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования [Текст] / Л.Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования.- 2010.- №1.- С.74-78.

56. Оксидантный стресс у больных с сахарным диабетом 2-го типа, сочетанным с обострением хронического пиелонефрита [Текст] / Ю.А. Манищенкова [и др.] // Междунар. эндокринолог. журн.- 2013.- Т.3, №51.- Электрон. дан.- Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/36261>.

57. Пат. 2524667 РФ. МПК G01N 33/52. Способ комплексной оценки содержания продуктов ОМБ в тканях и биологических жидкостях [Текст]/ М.А. Фомина [и др.]; Ряз гос. мед. ун-т им. акад. И.П. Павлова. - 2013102618/15; заявл.21.01.2013; опубл.27.07.2014, Бюл. № 21.- 8 с.

58. Подольникова, Ю.А. Особенности свободнорадикального статуса молока коров урбанизированной территории (на примере Омской области) [Текст]: дис... канд. биол. наук / Ю.А. Подольникова.- Омск, 2015.- 142 с.

59. Покровский, А.А. Лизосомы [Текст] / А.А. Покровский, В.А. Тутельян.- М.: Наука, 1976.- 378с.

60. Пупышев, А.Б. Пермеабилитация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор [Текст] / А.Б. Пупышев // Цитология.- 2011.- Т. 53, № 4.- С. 313-324.

61. Реутов, В.П. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота [Текст] / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина // Биохимия.- 1998.- Т.63, №7.- С.1029-1040.

62. Семенова, О.Г. Свободнорадикальное окисление белков в головном мозге крыс при экспериментальной блокаде ГАМК-рецепторов [Текст] / О.Г. Семенова, А.В. Притворова, А.В. Вьюшина // Фармация и фармакология.- 2015.- Т.3 (Прил.1).- С.94-95.

63. Смит, В. Органический синтез. Наука и искусство: пер. с англ. [Текст] / В. Смит, А. Бочков, Р. Кейпл.- М.: Мир, 2001.- 573 с.

64. Состояние протеолиза, окислительная модификация белков и липидов плазмы крови при токсикозе беременных [Текст] / О.Е. Акбашева [и др.] // Здоровье и образование в XXI веке.- 2012.- №2.- С.28.

65. Сосунов, А.А. Оксид азота как межклеточный посредник [Текст] / А.А. Сосунов // Соросовский образовательный журнал.- 2000.- №12.- С.27-34.

66. Спасов, А.А. Стереофармакологические особенности карнитина [Текст] / А.А. Спасов, И.Н. Иежица // Русский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.- 2005.- Т.91, № 12.- С.1469-1480.

67. . Стариков, Ю.В. Роль молекул оксида азота в программированной гибели нейтрофилов при окислительном стрессе [Текст]: автореф. дис.... канд. мед. наук / Ю.В. Стариков.– Новосибирск, 2008. – 22 с.

68. Строев, Е.А. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в различных фракциях лейкоцитов периферической крови у больных инсулиннезависимым сахарным диабетом [Текст] / Е.А. Строев, М.А. Борискина // Вопр. биологической, медицинской и фармацевтической химии.- 1998.- №2.- С.29-31.

69. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) [Текст] / Ю.И. Губский [и др.] // Современные проблемы токсикологии.-2005.- Т. 8, №3.- С. 20-27.

70. Торяник, Э.Л. Особенности динамики показателей окислительной модификации белка и активности каталазы в плазме крови у SHR самок крыс на фоне беременности [Текст] / Э.Л. Торяник // Наука и современность.- 2011.- №10-1.- С.177-181.

71. Урясьев, О.М. Роль оксида азота в регуляции дыхательной системы [Текст] / О.М. Урясьев, А.И. Рогачиков // Наука молодых (Eruditio Juvenium).- 2013.- № 2.- С.133-140.

72. Фролова, М.Ю. Возможности метода определения карбонильных групп белков сыворотки крови для оценки состояния "окислительного стресса" в клинической практике [Текст]: дис... канд. биол. наук / М.Ю. Фролова. – СПб., 2003.- 148 с.

73. Швальб, П.Г. Системный подход к патогенезу хронической венозной недостаточности нижних конечностей [Текст] / П.Г. Швальб // Ангиология и сосудистая хирургия.- 2002.- Т.8, №3.- С. 30-35.

74. Шейбак, В.М. Аргинин и иммунная система – возможные механизмы взаимодействия [Текст] / В.М. Шейбак, А.Ю. Павлюковец // Вестник ВГМУ.- 2013.- №1.- С.6-13.

75. Шумаев, К.Б. Роль динитрозильных комплексов железа в защите биомолекул и клеточных структур от окислительного, нитрозативного и карбонильного стресса [Текст]: автореф. дис... д-ра биол. наук / К.Б. Шумаев.– М., 2010.- 50 с.

76. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота [Текст] / М.В. Покровский [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология.- 2008.- Т.71, №2.- С. 29-31.

77. Якушин, С.С. Значение оценки эндотелиальной функции на популяционном уровне (по данным исследования МЕРИДИАН-РО) [Текст] / С.С. Якушин, Е.В. Филиппов // Наука молодых (Eruditio Juvenium).- 2013.- №3.- С.48-55.

78. L-карнитин: свойства, препараты, медицинское применение [Текст] / Л.В. Яковлева [и др.] // Український журнал клінічної та лабораторної медицини.- 2011.- Вып.6, № 2.- С.17-24.

79. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor [Text] / B. Goulet [et al.] // Molecular cell.- 2004.- Vol.14.- №2.- P.207-219.

80. A plasma oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency [Text] / L. Condezo-Hoyos [et al.] // Journal of Vascular Surgery.- 2013.- Vol.57, №.1.- P. 205-213.

81. Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity [Text] / B. Turk [et al.] // European Journal of Biochemistry.- 1999.- Vol.259.- №3.- P.926-932.

82. Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D [Text] / J.W. Van der Stappen [et al.] // Int. J. Cancer.- 1996.- Vol.67, №4.- P.547-554.

83. Afanas'ev, I. New Nucleophilic Mechanisms of Ros-Dependent Epigenetic Modifications: Comparison of Aging and Cancer [Text] / I. Afanas'ev // Aging and Disease.- 2014.- Vol.5, № 1.- P.52-62.

84. Aggarwal, N. Cathepsin B: Multiple roles in cancer [Text] / N. Aggarwal, B. F. Sloane // Prot. Clin. Appl.- 2014.- Vol.8.- P.427-437.

85. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage [Text] / L.A. Calò [et al.] // Int. J. Cardiol.- 2006.- Vol.107, №1.- P. 54-60.

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

87. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro [Text] / R. Menard [et al.] // J Biol Chem.- 1998.- Vol. 273, №8.- P.4478-4484.

88. Bahgat, Ashraf K. Gastroprotective Effect of L-Carnitine on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats: The Involvement of Antioxidant Mechanisms and Nitric Oxide [Text] / Ashraf K. Bahgat // Med. J. Cairo Univ.- 2009.- Vol. 77, №4.- P.43-51.

89. Ballabio A. The awesome lysosome / A. Ballabio // EMBO Mol. Med.- 2016.- Vol.8, № 2.- P.73-76.

90. Baraibar, M.A. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging [Text] / M.A. Baraibar, R. Ladouce, B. Friguet // Journal of Proteomics.- 2013.-Vol.92.- P. 67-70.

91. Barrett, A.J. Cathepsin B, Cathepsin H, cathepsin L [Text] / A.J. Barrett., H. Kirschke // Methods in Enzymol.- 1981.- Vol. 80.- P.535-561.

92. Barrett, A.J. Handbook of Proteolytic Enzymes (Second Edition) Vol. 1: Aspartic and Metallo Peptidases / A.J. Barrett, J.F. Woessner, N.D. Rawlings.- London: Academic Press,2004.- 984 p.

93. Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly [Text] / L. Zuo [et al.] // Acta Physiologica.- 2015.- Vol.214, №. 3.- P.329-348.

94. Biomarkers of protein oxidation in human disease [Text] / A. Garcia-Garcia [et al.] // Curr Mol Med.- 2012.-Vol.12, №60.- P.681-697.

95. Broker, L.E. Cell death independent of caspases: a review [Text] / L.E. Broker, F.A. Kruyt, G. Giaccone // Clin. Cancer.- 2005.- Vol.11, №9.- P.3155-3162.

96. Brunk, U.T. Lysosomal involvement in apoptosis [Text] / U.T. Brunk, J. Neuzil, J.W. Eaton // Redox.- 2001.- Vol.6.- P.91-97.

97. Carnitine Supplementation Effects on Nonenzymatic Antioxidants in Young Rats Submitted to Exhaustive Exercise Stress [Text] / S.A. Bucioli [et al.] // Journal of Strength & Conditioning Research.- 2012 .-Vol.26, №6.- P.1695-1700.

98. Cathepsin B and D expression in squamous cell carcinoma [Text] / A. Kawada [et al.] // British Journal of Dermatology.- 1996.- Vol.135, №6.- P.905-910.

99. Cathepsin B localizes to plasma membrane caveolae of differentiating myoblasts and is secreted in an active form at physiological pH [Text] / D. T. Jane [et al.] // Biological chemistry.- 2006.- Vol. 387, №. 2.- P.223-234.

100. Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis [Text] / B. Bian [et al.] // Mol. Carcinog.- 2016.- Vol. 55, № 5.- P.671-687.

101. Characterization of the glycosylated human cerebrospinal fluid proteome [Text] / M. Ramírez-Boo [et al.] // J. Proteomics.- 2012.- Vol.75, № 15.- P.4766-4782.

102. Chatterjee, A. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation [Text] / A. Chatterjee, J.D. Catravas // Vascul. Pharmacol.- 2008.- Vol.49, №4-6.- P.134-140.

103. Čolak, E. New markers of oxidative damage to macromolecules [Text] / E. Čolak // JMB.- 2008.- Vol.27, №1.-P.1-16.

104. Conus, S. Cathepsins and their involvement in immune responses [Text] / S. Conus, S. Hans-Uwe // Swiss medical weekly.- 2010.- Vol.140.- P.1-12.

105. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues [Text] / G. Droga-Mazovec [et al.] // Journal of Biological Chemistry.- 2008.- Vol.283, №27.- P.19140-19150.

106. Dietrich-Muszalska, A. Textbook of Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease [Text] / A.

Dietrich-Muszalska, D. Armstrong, R. D. Stratton.- Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2016.- 600 p.

107. Disruptive effect of chloroquine on lysosomes in cultured rat hepatocytes [Text] / A.Michihara [et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. - 2005.- Vol. 28, №6.- P.947-951.

108. Dunlop, R. A. Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation [Text] / R. A. Dunlop, U. T. Brunk, K.J. Rodgers // *IUBMB life*.- 2009.- Vol. 61,№ 5.- P. 522-527.

109. Effects of acute L-carnitine supplementation on nitric oxide production and oxidative stress after exhaustive exercise in young soccer players [Text] / N. Atalay Guzel [et al.] // *J Sports Med Phys Fitness*.- 2015.- Vol.55, №1-2.- P.9-15.

110. Effects of L-carnitine on oxidative stress responses in patients with renal disease [Text] / I.G. Fatouros [et al.] // *Med Sci Sports Exerc*.-2010.- Vol.42, №10.- P.1809-1818.

111. El-Ashmawy, N.E. A review on the role of L-carnitine in the management of tamoxifen side effects in treated women with breast cancer [Text] / N.E. El-Ashmawy, R.M. Khalil // *Tumour Biol*.- 2014.-Vol.35, №4.- P.2845-2855.

112. Ergin, V. Carbonyl Stress in Aging Process: Role of Vitamins and Phytochemicals as Redox Regulators [Text] / V. Ergin, R.E. Hariry, Ç. Karasu // *Aging and Disease*.- 2013.- Vol. 4, №5.- P.279-294.

113. Exon Skipping of Cathepsin B mitochondrial targeting of a lysosomal peptidase provokes cell death [Text] / K. Müntener [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*.- 2004.- Vol.279, №39.- P.41012-41017.

114. Fehrenbacher, N. Lysosomes as targets for cancer therapy [Text] / N. Fehrenbacher, M. Jaattela // *Cancer*.- 2005.- Vol.65, №8.- P.2993-2995.

115. Fleming, I. Biology of Nitric Oxide Synthases [Text] / I. Fleming // *Comprehensive Physiology*.- 2011.- P.56–80.

116. Fomina, M.A. Cathepsins B, L and H splenocytes as the secondary antioxidant systems in the conditions of carbonyl stress [Text] / M.A. Fomina, Y.V. Abalenikhina // *Advances in Biochemistry*.- 2015.- Vol.3, №1.- P.5-8.
117. Guicciardi, M.E. Lysosomes in cell death [Text] / M.E. Guicciardi, M. Leist, G.J. Gores // *Oncogene*.- 2004.- №23.- P. 2881-2890.
118. Habib, S. Biochemistry of Nitric Oxide [Text] / S. Habib, A. Ali // *Indian Journal of Clin. Biochem*.- 2011.- Vol.26, № 1.- P.3-17.
119. Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine [Text] / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge.- Oxford, USA: University Press, 2015.- 905p.
120. HNE Michael adducts to histidine and histidine-containing peptides as biomarkers of lipid-derived carbonyl stress in urines: LC-MS/MS profiling in Zucker obese rats [Text] / M. Orioli [et al.] // *Anal Chem*.-2007.- Vol.79, №23.- P.9174-9184.
121. Identification and characterization of a dense cluster of placenta-specific cysteine peptidase genes and related genes on mouse chromosome 13 [Text] / J. Deussing [et al.] // *Genomics*.- 2002.- Vol.79, №2.- P.225-240.
122. Immunohistochemical determination of the extracellular matrix modulation in a rat model of choline-deprived myocardium: the effects of carnitine [Text] / A. Strilakou [et al.] // *Fundamental & Clinical Pharmacology*.- 2016.- Vol.30.- P.47-57.
123. Inherited diseases caused by mutations in cathepsin protease genes [Text] / S. Ketterer [et al.] // *The FEBS Journal*.- 2016.- URL: <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>.
124. Ishidoh, K. Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro [Text] / K. Ishidoh, E. Kominami // *Biochem Biophys Res Commun*.- 1995.- Vol. 217.- P. 624-631.
125. Jaattela, M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression [Text] / M. Jaattela // *Oncogene*.- 2004.- Vol.23, №16.- P. 2746-2756.

126. Jones, L.A. Spectrophotometric Studies of Some 2,4-Dinitrophenylhydrazones [Text] / L.A. Jones, J.C. Holmes, R.B. Seligman // Analytical chemistry.- 1956.- Vol. 28, №2.- P.191-198.
127. Koblinski, J.E. Unraveling the role of proteases in cancer [Text] / J.E. Koblinski, M. Ahram, B.F. Sloane // Clin Chim Acta.- 2000.- Vol.291, №2.- P. 113-135.
128. Koeck, T. L-Carnitine alters nitric oxide synthase activity in fibroblasts depending on the peroxisomal status [Text] / T. Koeck, K. Kremser // Int. J. Biochem. Cell. Biol.-2003.- Vol.35, №2.- P. 149-56.
129. Kolodziejczyk, J. L-carnitine protects plasma components against oxidative alterations [Text] / J. Kolodziejczyk, J. Saluk-Juszczak, B. Wachowicz // Nutrition.- 2011.- Vol.27, №6.- P.693-699.
130. Labunets, G. Substrate specificity of cathepsin H in untransformed tissues of mammary gland and in tissues of moderately differentiated forms of lobular infiltrating breast cancer [Text] / G.Labunets, I. Vovchuk, V. Beskodarnaya // International scientific review.- 2016.- Vol.1, №11.- P.14-18.
131. L-carnitine ameliorates gentamicin-induced renal injury in rats [Text] / J.D. Kopple [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant.-2002.- Vol.17.- P.2122-2131.
132. L-carnitine exerts a cytoprotective effect against H₂O₂ -induced oxidative stress in the fathead minnow muscle cell line [Text] / Q. Wang [et al.] // Aquaculture Research.- 2016.- Vol.47.- P. 1365-2109.
133. Lysosomal labilization [Text] / A. Terman [et al.] // IUBMB Life.- 2006.- Vol. 58.- P.531-539.
134. McGrath, M.E. The lysosomal cysteine proteases [Text] / M.E. McGrath // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.- 1999.- Vol. 28.- P.181-204.
135. Measurement of NO in biological samples [Text] / C. Csonka [et al.] // British Journ. of Pharmacology.- 2015.- Vol.172.- P.1620-1632.

136. Mechanisms of nitrite reduction to nitric oxide in the heart and vessel wall [Text] / J. L. Zweier [et al.] // Nitric oxide.- 2010.- Vol.22, №2.- P.83-90.
137. Merry, T. L. Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training? [Text] / T. L. Merry, M. Ristow // J Physiol.- 2016.- Vol.594, №18.- P.5135-51-47.
138. Mrschik, M. Lysosomal proteins in cell death and autophagy [Text] / M. Merschik, K.M. Ryan // FEBS Journal.-2015.- Vol.282.- P.1858-1870.
139. Myocardial infarction in mice alters sarcomeric function via post-translational protein modification [Text] / B.S. Avner [et al.] // Mol Cell Biochem.- 2012.- Vol.363, №1-2.- P.203-215.
140. Neurath, H. Evolution of proteolytic enzymes [Text] / H. Neurath // Science.- 1984.- Vol. 224.- P. 350-357.
141. Neurobehavioral effects of L-carnitine and its ability to modulate genotoxicity and oxidative stress biomarkers in mice [Text] / E. Wassermann [et al.] // Pharmacology Biochemistry and Behavior.- 2013.- Vol.110.- P. 40–45.
142. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in PCD Signaling [Text] / V. Locato [et al.] // Advances in Botanical Research. – 2016.- Vol.77.- P. 165-192.
143. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis [Text] / H. T. Chung [et al.] // Biochemical and biophysical research communications.- 2001.- Vol.282.- P.1075-1079.
144. Nitrogen monoxide: MAK Value Documentation, 2010 [Text] // The MAK Collection for Occupational Health and Safety.- 2014.- P.1-37.
145. Novel steps in the autophagic-lysosomal pathway [Text] / F. Saetre [et al.] // FEBS Journal.- 2015.-Vol.282, №.11.- P.2202-2214.
146. Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging [Text] / M.A. Baraibar [et al.] // Experimental Gerontology.- 2013.- Vol.48, №7.- P.620-625.

147. Oxidative stress and Parkinson's disease [Text] / J. Blesa [et al.] // Front. in neuroanat.- 2015.- Vol.9.- P.91.
148. Oxidative stress induced carbonylation in human plasma [Text] / A.G. Madian [et al.] // Journ. of Proteomics.-2011.- Vol.74, №11, P.2395-2416.
149. Oxidative stress markers [Text] / Y. Naito [et al.] // Anti-Aging Medicine.- 2010.- Vol. 7, №. 5.- P. 36-44.
150. Pivotal role of Harakiri in the induction and prevention of gentamicin-induced hearing loss [Text] / G. M. Kalinec [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.– 2005.– Vol.102, №. 44.– P.16019-16024.
151. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide [Text] / T.Fox [et al.] // Biochemistry.- 1992.- Vol.31.- P.12571-12576.
152. Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide [Text] / H. Erbas [et al.] // Cell biology international.- 2007.- Vol.31, №.11.- P.1414-1419.
153. Protein damage, repair and proteolysis [Text] / N. Chondrogianni [et al.] // Molecular aspects of medicine.- 2014.- Vol.35.- P.1-71.
154. Protein thiol oxidation does not change in skeletal muscles of aging female mice [Text] / H. Tohma [et al.] // Biogerontology.- 2014.- Vol.15, №1.- P. 87-98.
155. Rajasekar, P. 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 [Text] / P. Rajasekar, N. Palanisamy, C.V. Anuradha // Clinical and Experimental Hypertension.- 2007.- Vol. 29, №.8.– P. 517-530.
156. Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro [Text] / A.D. Rowan [et al.] // J. Biol Chem.- 1992.- Vol.267.- P.15993-15999.
157. Rawlings, N.D. MEROPS: the protease database [Text] / N.D. Rawlings, E. O'Brien, A.J. Barrett // Nucleic Acids Research.- 2002.- Vol.30.- №1.- P.343-346.

158. RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ mediates cell-adhesive properties [Text] / A.M. Lechner [et al.] // Journal of Biological Chemistry.- 2006.- Vol.281, №51.- P.39588-39597.
159. Ribas, G.S. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders [Text] / G.S. Ribas , C.R. Vargas, M. Wajner // Gene.- 2014.- Vol.533, №2.- P.469-476.
160. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII [Text] / U. Felbor [et al.] // EMBO J.- 2000.- Vol.19, №6.- P.1187-1194.
161. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells [Text] / R. Lemaire [et al.] // Br. J. Rheumatol.- 1997.- Vol.36, №7.- P.735-743.
162. Semchyshyn, H.M. Oxidative stress - molecular mechanisms and biological effects. Interplay between oxidative and carbonyl stresses: molecular mechanisms, biological effects and therapeutic strategies of protection, oxidative stress - molecular mechanisms and biological effects. [Text] / H.M. Semchyshyn, V. I. Lushchak.- Rijeka, Croatia: InTech, 2012.- P.15-46.
163. Serrano-Puebla, A. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: new evidence and implications for health and disease [Text] / A. Serrano-Puebla, P. Boya // Annals of the New York Academy of Sciences.- 2016.- Vol.1371.- P.30-44.
164. Stephens, F.B. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle [Text] / F.B. Stephens, D. Constantin-Teodosiu, P.L. Greenhaff // The Journal of Physiology.- 2007.- Vol.581, №2.- P.431-444.
165. Stoka, V. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis [Text] / V. Stoka, V. Turk, B. Turk // Biol. Chem.- 2007.- Vol.388, №6.- P.555-560.

166. Structural and biological studies on bacterial nitric oxide synthase inhibitors [Text] / J.K. Holden [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2013.- Vol.110, №45.- P.18127-18131.
167. Sultana, R. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain [Text] / R. Sultana, M. Perluigi, D. A. Butterfield // Free Radic. Biol. Med.-2013.-Vol.62.- P.157-169.
168. Szabõ, C. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics [Text] / C. Szabõ, H. Ischiropoulos, R. Radi // Nature reviews drug discovery.- 2006.- Vol. 6.- P. 662-680.
169. Testosterone depletion increases the susceptibility of brain tissue to oxidative damage in a restraint stress mouse model [Text] / S.-W. Son [et al.] // Journal of Neurochemistry.-2016.- Vol.136, №1.- P.106–117.
170. The role of lysosome in cell death regulation [Text] / F. Yu [et al.] // Tumor Biology.- 2015.- Vol.282.- P.1858–1870.
171. Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L [Text] / T. Reinheckel [et al.] // Biol Chem.- 2001.- Vol. 382, №5.- P. 735-741.
172. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent [Text] / N.W. Werne-burg [et al.] // Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.- 2002.- Vol.283, №4.- P.G947-G956.
173. Turk, B. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers [Text] / B. Turk, D. Turk, V. Turk // Biochim. Biophys. Acta.- 2000.- Vol.1477, №1-2.- P.98-111.
174. Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities [Text] / V. Turk, B. Turk, D. Turk // The EMBO journal.- 2001.- Vol.20, №17.- P.4629-4633.
175. Turk, M. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers [Text] / M. Turk // Biochimica et Biophysica Acta. - 2012. - Vol. 1824, №1.- P.68-88.

176. Verma, S. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets [Text] / S. Verma, R. Dixit, K. C. Pandey // *Frontiers in pharmacology*.- 2016.- Vol. 7. - URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00107>.
177. Vincent, H. K. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity[Text] / H.K. Vincent, K.E. Innes, K.R. Vincent // *Diabetes, Obesity and Metabolism*.- 2007.- Vol.9.- P.813-839.
178. Wang, Zun-Yi. Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation. [Text] / Zun-Yi Wang, Rolf Hakanson // *British Journal of Pharmacology*.- 1995.- Vol.116.-P.2447-2450.
179. Werner, F. Matrix Proteases in Health and Disease. Secreted Cysteine Cathepsins - Versatile Players in Extracellular Proteolysis [Text] / F. Werner, K. Sachse., T. Reinheckel.- Weinheim: John Wiley & Sons, 2012.- P. 283-297.
180. Winchester, B. The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment [Text] / B. Winchester, A. Vellodi, E. Young // *Biochem Soc Trans*.- 2000.- Vol.28, №2.- P.150-154.
181. Xing, Q. Nitric oxide regulates cell behavior on an interactive cell-derived extracellular matrix scaffold [Text] / Q. Xing // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.- 2015.- Vol.103, №. 12.- P.3807-3814.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1 - Площадь под кривой спонтанной окислительной модификации белков аорты (у.е./г белка). Ме [min; max]

Показатель		Контроль 1	L-аргинин	Контроль 2	L-NAME, 25	L-NAME, 200	Контроль 3	L-аргинин + L-NAME, 25
S АДНФГ _{uv}	Спонтанная	6,04 [5,29; 7,42]	7,51 [6,17; 26,22]	7,05 [3,28; 10,53]	4,2 [3,85; 8,77] ▲	23,3 [21,24; 27,83] * •	6,74 [3,28; 10,53]	5,09 [4,04; 6,17] ▲
	Металлзависимая	15,82 [14,05; 17,97]	21,06 [17,25; 24,42]	19,11 [12,72; 21,63]	10,01 [7,67; 14,41] * ▲	66,8 [35,54; 121,45] * •	17,97 [12,72; 21,63]	11,82 [9,59; 16,58]*
S АДНФГ _{vs}	Спонтанная	1,37 [1,01; 2,04]	2,21 [1,28; 4,16]	2,36 [1,06; 3,57]	0,7 [0,48; 2,14]	1,07 [0,63; 1,53]	1,95 [1,01; 3,57]	2,39 [2,11; 3,75] * •
	Металлзависимая	4 [1,72; 5,31]	7,16 [5,68; 13,97] *	5,75 [4,08; 6,77]	1,35 [0,51; 3,18] * ▲	3,93 [1,94; 9,21] •	4,51 [1,72; 6,77]	3,84 [2,01; 6,90]
S КДНФГ _{uv}	Спонтанная	1,15 [0,98; 2,02]	2,34 [1,41; 3,84] *	2,66 [1,2; 3,61]	0,72 [0,36; 2,55] ▲	1,27 [0,73; 1,98]	2,02 [0,98; 3,61]	2,64 [1,46; 3,97] * •
	Металлзависимая	4,35 [2,03; 4,85]	5,26 [3,93; 13,05]	5,58 [3,95; 7,09]	1,17 [0,55; 3,41] * ▲	5,01 [3,98; 7,22] •	4,71 [2,03; 7,09]	3,86 [1,52; 8,82]
S КДНФГ _{vs}	Спонтанная	0,2 [0,17; 0,32]	0,3 [0,17; 0,76]	0,35 [0,17; 0,61]	0,11 [0,06; 0,31] ▲	0,14 [0,06; 0,24] *	0,31 [0,17; 0,61]	0,39 [0,23; 0,62] * •
	Металлзависимая	0,6 [0,16; 0,87]	1,39 [1,00; 2,91] *	1,09 [0,67; 1,17]	0,26 [0,08; 0,53] * ▲	0,48 [0,12; 1,74]	0,74 [0,16; 1,17]	0,6 [0,31; 1,06]
S ОМБ	Спонтанная	8,63 [7,73; 11,79]	12,57 [10,22; 34,98]	13,65 [5,72; 15,92]	5,48 [5,09; 13,69] ▲	26,55 [23,00; 29,71] * •	11,79 [5,72; 15,92]	10,16 [9,24; 13,7]
	Металлзависимая	25,78 [17,96; 26,97]	35,52 [29,29; 50,20] *	31,26 [21,42; 35,92]	12,34 [8,81; 21,33] * ▲	76,54 [47,86; 132,69] * •	28,1 [17,96; 35,92]	19,59 [13,43; 29,95]

Продолжение таблицы 1.

Показатель		Контроль 4		Карнитина хлорид		Карнитина хлорид + L-аргинин		Карнитина хлорид + L-NAME, 25	
S АДНФГ _{uv}	Спонтанная	3,65	[2,67;5,31]	8,91	[6,83; 11,58] *	0,82	[0,63; 1,05] *▲■	4,78	[4,45; 9,82]
	Металлзависимая	24,86	[21,63; 27,26]	23,4	[18,08; 27,34]	5,9	[5,15; 7,94] *▲■	18,14	[14,62; 20,47] *●■
S АДНФГ _{vs}	Спонтанная	0,98	[0,58; 2,99]	3,6	[2,44; 4,72] *	0,97	[0,74; 1,85] ▲■	3,59	[2,07; 4,61] *●
	Металлзависимая	2,11	[1,63; 3,21]	5,79	[4,55; 9,69]*	3,44	[2,35; 5,81] *▲■	10,59	[7,03; 12,10] *●■
S КДНФГ _{uv}	Спонтанная	1,17	[0,63; 3,08]	3,01	[1,63; 5,57] *	0,9	[0,63; 1,42] ▲■	3	[1,76; 4,43] *●
	Металлзависимая	1,56	[1,17; 3,07]	6,95	[4,25; 11,21]*	2,62	[1,89; 5,59]	8,28	[5,98; 9,91] *●
S КДНФГ _{vs}	Спонтанная	0,17	[0,05; 0,35]	0,61	[0,40; 0,83] *	0,16	[0,11; 0,28] ▲■	0,67	[0,30; 0,85] *●
	Металлзависимая	0,34	[0,21; 0,57]	1,16	[0,54; 1,46]*	0,64	[0,26; 0,92] ▲■	2,01	[1,06; 2,39] *●
S ОМБ	Спонтанная	6,68	[4,12; 11,61]	16,45	[11,83; 21,98] *	2,88	[2,18; 4,34] *▲■	11,76	[8,96; 19,71] *
	Металлзависимая	28,66	[25,06; 32,75]	38,28	[29,31; 48,46]*	12,51	[9,76; 20,11] *▲■	38,02	[29,60; 44,75] *●

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином (p<0,05)

● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг (p<0,05)

■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином (p<0,05)

Таблица 2 - Площадь под кривой спонтанной окислительной модификации белков сердца (у.е./г белка); Ме [min; max]

Показатель		Контроль 1	L-аргинин	Контроль 2	L-NAME, 25	L-NAME, 200	Контроль 3	L-аргинин + L-NAME, 25
S АДФФГ _{uv}	Спонтанная	21,28 [19,58; 22,80]	18,97 [18,30; 19,10] *	33,27 [25,03; 38,44]	2,65 [1,11; 5,69] * ▲	28,94 [18,82; 42,48] •	27,64 [19,58; 38,44]	9,48 [4,30; 12,17] * ▲
	Металлзависимая	26,09 [24,99; 27,69]	26,56 [25,80; 28,60]	38,6 [34,66; 43,33]	5,69 [3,47; 9,60] * ▲	55,03 [31,75; 84,18] •	35,74 [24,99; 43,33]	17,7 [8,74; 41,64] •
S АДФФГ _{vs}	Спонтанная	3,25 [2,28; 5,21]	6,23 [5,41; 8,02] *	1 [0,81; 1,09]	0,36 [0,28; 0,55] * ▲	2,12 [0,06; 6,55] •	1,06 [0,81; 5,21]	2,04 [0,68; 5,92] ▲ •
	Металлзависимая	7,29 [5,22; 7,99]	10,56 [7,66; 17,44] *	2,54 [2,02; 4,67]	1,2 [0,64; 1,43] * ▲	5,13 [1,27; 13,37] •	4,36 [2,02; 7,99]	7,13 [2,34; 19,30] •
S КДФФГ _{uv}	Спонтанная	3,28 [0,99; 4,77]	5,24 [4,79; 7,79] *	0,5 [0,41; 1,17]	0,7 [0,67; 0,95] ▲	2,53 [0,62; 5,86] * •	0,77 [0,41; 4,77]	2,58 [0,81; 4,90] ▲ •
	Металлзависимая	5,8 [5,21; 6,90]	9,74 [6,45; 13,13] *	2,34 [1,60; 4,58]	1,98 [1,32; 2,21] ▲	5,72 [1,50; 12,83]	3,86 [1,60; 6,90]	6,13 [2,60; 14,11] •
S КДФФГ _{vs}	Спонтанная	0,44 [0,42; 0,71]	0,89 [0,83; 1,27] *	0,2 [0,13; 0,23]	0,06 [0,04; 0,23] * ▲	0,34 [0,02; 1,12] •	0,22 [0,13; 0,71]	0,28 [0,10; 1,32] •
	Металлзависимая	1,22 [0,92; 1,34]	1,88 [1,23; 3,71]	0,42 [0,30; 0,99]	0,15 [0,07; 0,16] * ▲	0,92 [0,26; 2,47] •	0,84 [0,30; 1,34]	1,22 [0,35; 3,87] •
S ОМБ	Спонтанная	28,23 [23,79; 32,99]	31,33 [29,64; 36,17]	35,14 [26,79; 40,19]	3,73 [2,14; 6,78] * ▲	34,76 [23,78; 55,31] •	32,36 [23,79; 40,19]	13,3 [5,90; 24,31] * ▲
	Металлзависимая	40,23 [39,05; 41,60]	48,63 [41,14; 62,88] *	43,69 [41,04; 53,58]	9,49 [5,50; 12,87] * ▲	73,4 [34,78; 112,85] •	42,1 [39,05; 53,58]	32,4 [14,02; 78,92] •

Продолжение таблицы 2.

Показатель		Контроль 4		Карнитина хлорид		Карнитина хлорид + L-аргинин		Карнитина хлорид + L-NAME, 25	
S АДНФГ _{uv}	Спонтанная	28,09	[19,58; 38,44]	6,77	[3,57; 9,61] *	3,81	[3,16; 4,69] * ▲	3,65	[2,13; 4,08] *
	Металлзависимая	33,75	[24,99; 43,33]	15,44	[12,00; 18,78] *	14,58	[13,55; 17,84] * ▲ ■	9,14	[7,48; 13,91] * • ■
S АДНФГ _{vs}	Спонтанная	1,98	[0,81; 5,21]	3,4	[2,02; 6,05]	2,03	[1,43; 3,65] ▲	2,56	[1,31; 4,38] •
	Металлзависимая	4,57	[2,02; 7,99]	9,73	[8,28; 12,98] *	6,74	[4,47; 9,39] ▲	4,55	[2,02; 6,73] •
S КДНФГ _{uv}	Спонтанная	1,59	[0,41; 4,77]	3,17	[1,65; 5,25] *	1,45	[1,03; 2,30] ▲	2,15	[0,69; 3,94] •
	Металлзависимая	3,95	[1,60; 6,90]	7,32	[6,70; 10,07] *	6,15	[5,01; 8,71] *	4,5	[2,12; 6,48] •
S КДНФГ _{vs}	Спонтанная	0,31	[0,13; 0,71]	0,54	[0,16; 1,16]	0,3	[0,21; 0,64] ▲	0,44	[0,19; 0,91] •
	Металлзависимая	0,79	[0,30; 1,34]	1,95	[1,56; 2,70] *	1,04	[0,54; 2,02]	0,75	[0,39; 1,13] •
S ОМБ	Спонтанная	31,97	[23,79; 40,19]	13,73	[7,85; 21,89] *	8,55	[5,87; 10,45] * ▲	7,98	[5,16; 13,31] * •
	Металлзависимая	43,06	[39,05; 53,58]	32,55	[30,57; 44,53] *	27,67	[24,46; 36,96] * ▲ ■	20,04	[12,39; 26,44] * • ■

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином (p<0,05)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг (p<0,05)

■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином (p<0,05)

Таблица 3 - Площадь под кривой спонтанной окислительной модификации белков скелетной мышцы (у.е./г белка); Me [min; max]

Показатель		Контроль 1	L-аргинин	Контроль 2	L-NAME, 25	L-NAME, 200	Контроль 3	L-аргинин+ L-NAME, 25
S АДФФГ _{uv}	Спонтанная	23,17 [22,34; 24,78]	17,36 [14,24; 20,21] *	31,87 [26,54; 35,12]	3,58 [2,04; 5,44] * ▲	41,55 [21,92; 67,48] •	27,32 [22,34; 35,12]	16,92 [8,30; 24,40] * •
	Металлзависимая	31,21 [30,22; 32,89]	25,26 [13,95; 41,16]	38,6 [34,66; 43,33]	5,69 [3,47; 9,60] * ▲	55,03 [31,75; 84,18] •	52,1 [30,22; 78,74]	38,42 [20,88; 51,39] * •
S АДФФГ _{vs}	Спонтанная	6,3 [5,78; 6,81]	4,04 [2,71; 6,31]	1,16 [0,64; 2,71]	1,21 [0,53; 2,34] ▲	1,44 [0,17; 3,73]	1,91 [0,64; 6,81]	5,06 [3,11; 12,78] •
	Металлзависимая	17,04 [14,58; 17,60]	8,77 [1,17; 20,63]	2,54 [2,02; 4,67]	1,2 [0,64; 1,43]	5,13 [1,27; 13,37] * •	4,92 [1,17; 17,60]	15,02 [5,40; 25,79] * •
S КДФФГ _{uv}	Спонтанная	4,26 [4,26; 6,31]	4,5 [2,69; 5,85]	0,9 [0,75; 3,60]	1,81 [1,29; 2,85] ▲	2,64 [1,02; 3,13]	3,06 [0,75; 6,31]	6,9 [3,48; 9,38] * •
	Металлзависимая	12,04 [11,23; 13,62]	10,28 [1,04; 13,77]	2,34 [1,60; 4,58]	1,98 [1,32; 2,21]	5,72 [1,50; 12,83] * •	5,09 [1,48; 13,62]	14,82 [8,28; 24,28] * •
S КДФФГ _{vs}	Спонтанная	1,06 [1,05; 1,28]	0,88 [0,34; 1,34]	0,22 [0,11; 0,41]	0,12 [0,05; 0,35] ▲	0,25 [0,02; 0,73]	0,34 [0,11; 1,28]	0,77 [0,39; 2,56] •
	Металлзависимая	3,03 [2,65; 3,72]	1,5 [0,26; 4,25]	0,42 [0,30; 0,99]	0,15 [0,07; 0,16]	0,92 [0,26; 2,47] * •	0,94 [0,19; 3,72]	2,8 [0,53; 5,16]
S ОМБ	Спонтанная	35,01 [33,43; 38,96]	27,08 [21,80; 33,15] *	35,81 [28,82; 37,13]	7,75 [3,90; 8,14] * ▲	44,67 [26,46; 70,69] •	35,44 [28,82; 38,96]	30,88 [16,31; 47,04] •
	Металлзависимая	63,59 [59,67; 66,59]	45,5 [16,43; 74,84]	43,69 [41,04; 53,58]	9,49 [5,50; 12,87] * ▲	73,4 [34,78; 112,85] •	63,64 [54,94; 89,64]	68 [38,51; 101,10] •

Продолжение таблицы 3.

Показатель		Контроль 4	Карнитина хлорид	Карнитина хлорид + L-аргинин	Карнитина хлорид + L-NAME, 25
S АДНФГ _{uv}	Спонтанная	28,61 [22,34; 35,12]	6,81 [5,45; 10,37] *	6,85 [4,04; 8,27] * ▲	9,16 [6,05; 11,69] * •
	Металлзависимая	49,86 [30,22; 78,74]	14,75 [8,16; 17,49] *	12,82 [9,86; 15,78] * ▲	19,36 [16,48; 21,62] * ■
S АДНФГ _{vs}	Спонтанная	3,04 [0,64; 6,81]	2,55 [1,35; 4,24]	1,36 [1,13; 3,30] ▲	2,81 [1,82; 4,83] •
	Металлзависимая	8,03 [1,17; 17,60]	4,36 [2,51; 6,78]	6,05 [3,22; 8,37]	12,05 [8,16; 15,49] * • ■
S КДНФГ _{uv}	Спонтанная	2,75 [0,75; 6,31]	2,17 [1,32; 5,10]	1,57 [1,30; 3,33] ▲	3,07 [1,88; 5,28]
	Металлзависимая	6,45 [1,48; 13,62]	4,08 [2,37; 6,54]	6,39 [3,70; 7,04]	9,92 [7,56; 11,79] ■
S КДНФГ _{vs}	Спонтанная	0,54 [0,11; 1,28]	0,5 [0,29; 0,60]	0,21 [0,15; 0,59] ▲	0,48 [0,15; 0,82] •
	Металлзависимая	1,55 [0,19; 3,72]	0,83 [0,31; 1,33]	1,07 [0,41; 2,34]	2,2 [1,28; 3,81] * ■
S ОМБ	Спонтанная	34,94 [28,82; 38,96]	11,73 [9,50; 20,22] *	9,45 [6,97; 15,22] * ▲	15,52 [10,06; 22,40] * • ■
	Металлзависимая	65,9 [54,94; 89,64]	26,03 [14,46; 29,49] *	27,29 [18,15; 32,78] *	46,2 [33,47; 48,88] ■

Примечание:

* - статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином (p<0,05)

• - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг (p<0,05)

■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином (p<0,05)

Таблица 4 - Изменение активностей катепсинов В, L, Н под влиянием регуляторов азота и/или карнитина хлорида в аорте; Me [min; max], нкат/г белка

Показатель	Кислая фосфатаза				Катепсин В			
	НСА	СА	ОА	К лаб, %	НСА	СА	ОА	К лаб, %
Контроль1	570,19 [499,52; 1218,05]	700,57 [620,95; 1360,00]	1563,46 [1120,48; 1992,65]	43,2 [31,7; 63,6]	4,25 [3,43; 10,23]	4,54 [2,80; 8,70]	10,94 [7,36; 13,53]	44,4 [35,7; 78,5]
L – аргинин	320,15 [217,51; 477,39] *	1828,24 [1542,86; 3840,00] *	2106,51 [1947,51; 4317,39] *	12,1 [11,0; 20,8]*	4,65 [1,74; 7,46]	35,74 [17,26; 69,32] *	38,95 [21,26; 76,37] *	9,99 [5,95; 24,7] *
Контроль2	577,26 [423,57; 1808,48]	1940 [1017,14; 2509,09]	2557,26 [1440,72; 4317,57]	29,4 [17,6; 45,3]	16,38 [9,96; 33,72]	52,07 [31,47; 64,09]	71,46 [41,80; 92,63]	24,7 [13,9; 39,3]
L – NAME, 25	736,87 [725,79; 771,12] ▲	955,74 [898,72; 1080,00] * ▲	1699,83 [1633,42; 1819,04] * ▲	43,4 [40,6; 46,2]▲	5,06 [3,70; 8,06] *	20,87 [10,16; 28,94] *	24,75 [17,03; 33,96] *	17,4 [14; 44,2]
L – NAME, 200	337,63 [191,78; 1149,96]	2274,35 [240,00; 9315,56]	2842,47 [446,07; 9786,51]	29,3 [4,8; 46,8]	7,04 [1,46; 19,34]	15,16 [8,36; 32,30] *	28,34 [11,66; 43,08] *	26,7 [5,2; 61,2]
Контроль3	577,26 [423,57; 1808,48]	1611,43 [620,95; 2509,09]	2376,73 [1120,48; 4317,57]	32,2 [17,6; 63,6]	10,23 [3,43; 33,72]	47,21 [2,80; 64,09]	61,6 [7,36; 92,63]	30,8 [13,9; 78,5]
L – NAME + L – аргинин	223,26 [152,16; 448,98] •	412,61 [166,81; 596,57] * ▲	726,06 [380,38; 895,43] *▲ •	35,2 [27,8; 57,1]▲	12,55 [5,01; 14,75] *	14,4 [6,37; 28,64] * ▲	27,95 [11,63; 40,59] *	40,1 [27,95; 56,2]*▲•
Контроль4	822,03 [423,57; 1808,48]	1615,63 [620,95; 2509,09]	2437,67 [1120,48; 4317,57]	33,6 [17,6; 63,6]	15,54 [3,43; 33,72]	41,48 [2,80; 64,09]	57,02 [7,36; 92,63]	31 [13,9; 78,5]
Карнитина хлорид	187,19 [140,72; 264,03] *	545,76 [426,12; 769,41] *	733,78 [584,46; 1033,44] *	26,4 [18,6; 28,2]	12,78 [10,19; 16,29]	47,39 [30,49; 56,17]	59,03 [42,95; 72,46]	22,3 [17,4; 28,99]
Карнитина хлорид +L – аргинин	155,97 [134,17; 195,06] * ▲	448,4 [342,86; 810,00] * ▲	605,36 [481,82; 1005,06] * ▲	25,8 [19,4; 28,8]	10,38 [5,20; 12,92] ▲	27,41 [23,14; 58,39] ▲	37,87 [28,34; 68,02] ▲	25,1 [14,2; 30,6]
Карнитина хлорид +L – NAME	154,39 [135,00; 214,80] * •	388,32 [270,64; 475,79] * • ■	557,05 [405,64; 643,14] * • ■	28,8 [24,97; 40,9] •	4,37 [2,41; 5,54] * ■	10,83 [5,96; 20,33] * ■	14,59 [11,50; 24,68] • ■	28,1 [17,6; 48,2] *

Продолжение таблицы 4.

Показатель	Катепсин L				Катепсин H			
	НСА	СА	ОА	К лаб, %	НСА	СА	ОА	К лаб, %
Контроль1	8,25 [6,22; 15,49]	20,43 [11,06; 33,62]	29,83 [24,24; 39,83]	28,8 [15,6; 58,3]	5,00 [3,24; 7,39]	6,83 [4,91; 10,99]	12,02 [8,87; 17,30]	36,5 [31,5; 60,1]
L – аргинин	11,41 [1,76; 17,80]	48,93 [24,90; 70,10] *	58,71 [33,83; 84,53] *	17,8 [3,9; 26,4]	4,55 [3,01; 7,34]	34,42 [17,90; 46,50] *	38,17 [21,65; 52,19] *	11,5 [8,2; 22,8] *
Контроль2	14,11 [8,98; 41,16]	53,78 [32,78; 64,54]	71,66 [46,89; 99,20]	24,9 [12,2; 42,9]	13,32 [11,19; 51,67]	50,39 [26,40; 72,49]	68,04 [39,71; 109,81]	33,5 [14,1; 47,1]
L – NAME, 25	11,68 [9,00; 20,69]	34,11 [15,22; 63,97]	46,58 [26,31; 75,75]	27,0 [14,0; 47,6]	4,47 [2,96; 5,43] *	15,21 [6,32; 20,46] * ▲	20,30 [10,50; 23,46] * ▲	24,2 [12,8; 39,8] ▲
L – NAME, 200	20,72 [2,06; 57,54]	44,93 [29,72; 69,27]	57,78 [34,25; 113,32]	29,2 [4,2; 55,4]	5,45 [1,26; 16,21] *	18,86 [12,16; 33,16] *	24,92 [16,97; 40,28] *	24,7 [3,6; 41,5]
Контроль3	13,02 [6,22; 41,16]	43,03 [11,06; 64,54]	56,04 [24,24; 99,20]	28,6 [12,2; 58,3]	11,87 [3,24; 51,67]	39,59 [4,91; 72,49]	59,99 [8,87; 109,81]	34,0 [14,1; 60,1]
L – NAME + L – аргинин	18,61 [6,17; 54,37]	27,64 [10,32; 68,60] *	45,39 [22,27; 111,26] *	40,9 [18,5; 53,6] ▲	8,16 [2,02; 19,59] *	12,65 [5,81; 39,49] *	23,46 [11,15; 52,76] *	29,8 [12,8; 62,9] ▲
Контроль4	18,57 [6,22; 41,16]	47,39 [11,06; 64,54]	62,69 [24,24; 99,20]	28,9 [12,2; 58,3]	18,45 [3,24; 51,67]	40,93 [4,91; 72,49]	59,38 [8,87; 109,81]	32,0 [14,1; 60,1]
Карнитина хлорид	9,73 [6,18; 13,91]	30,03 [19,78; 45,14]	37,26 [30,98; 59,05]	23,9 [18,7; 36,1]	5,92 [4,54; 13,19]	21,89 [17,31; 23,73]	27,33 [23,03; 35,22]	25,2 [16,1; 37,5]
Карнитина хлорид +L – аргинин	13,27 [8,69; 22,11] ▲	42,07 [21,85; 73,83] ▲	55,68 [30,55; 95,94] ▲	27,1 [18,6; 37,3]	4,38 [3,02; 7,48] *	11,00 [7,44; 20,25] ▲ ■	16,25 [10,59; 25,61] ▲ ■	26,7 [20,9; 40,2] ▲
Карнитина хлорид +L – NAME	5,97 [3,48; 8,64] * ■	12,43 [6,70; 22,20] * ■	19,22 [10,74; 28,71] * ■	30,5 [20,5; 56,3]	2,88 [2,72; 5,06] * ■	8,13 [5,54; 10,87] * ■	11,80 [8,82; 13,80] * ■	26,4 [20,5; 47,7]

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); • - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Таблица 5 - Изменение активностей катепсинов В, L, Н под влиянием регуляторов азота и/или карнитина хлорида в миокарде; Me [min; max], нкат/г белка

Показатель	Кислая фосфатаза				Катепсин В			
	НСА	СА	ОА	К лаб, %	НСА	СА	ОА	К лаб, %
Контроль1	61,13 [43,43; 63,05]	385,24 [207,44; 442,30]	446,54 [250,86; 505,02]	13,9 [12,4; 17,3]	1,34 [0,35; 14,32]	1,14 [0,19; 11,87]	2,44 [0,63; 26,19]	54,4 [47,3; 70,5]
L – аргинин	68,12 [54,62; 79,72]*	309,48 [187,12; 358,79]	370,25 [255,24; 438,50]	18,2 [14,9; 26,7]	0,49 [0,45; 0,62]	4,52 [3,42; 6,72]	5,13 [3,91; 7,21]	10,9 [6,7; 12,6] *
Контроль2	18,39 [12,90; 23,23]	365,8 [261,91; 845,71]	380,91 [283,44; 862,31]	5 [1,9; 8,1]	0,03 [0,01; 0,09]	1,47 [0,21; 5,51]	1,5 [0,22; 5,60]	2,4 [0,9; 4,8]
L – NAME, 25	14,37 [1,35; 29,89] ▲	169,85 [4,41; 477,04] *	185,54 [7,76; 499,07] * ▲	7,7 [4,4; 54,7] *	0,05 [0,01; 0,11] ▲	0,91 [0,09; 2,60] ▲	0,95 [0,11; 2,69] ▲	4,7 [3,2; 23,9] *
L – NAME, 200	117,82 [50,20; 326,53] * ●	668,66 [187,25; 1246,32] * ●	718,85 [513,79; 1411,34] * ●	11,7 [7,0; 63,6] *	0,3 [0,13; 0,49] * ●	1,84 [0,79; 3,34]	1,97 [1,19; 3,68] ●	9,4 [6,8; 33,6] *
Контроль3	22,24 [13,81; 63,05]	305,62 [158,78; 477,04]	331,42 [175,22; 505,02]	7,9 [4,4; 17,3]	0,09 [0,04; 14,32]	1,63 [0,19; 11,87]	1,78 [0,63; 26,19]	4,4 [3,2; 70,5]
L – NAME + L – аргинин	54,84 [48,29; 69,32]* ●	198,18 [143,89; 274,64]	260,63 [192,18; 339,68] ▲	23,3 [17,5; 25,1] * ●	0,2 [0,16; 0,26] ▲ ●	0,91 [0,64; 1,50] ▲	1,11 [0,86; 1,69] ▲	18,2 [11,3; 25,4] ▲ ●
Контроль4	18,25 [1,35; 63,05]	216,73 [4,41; 477,04]	243,33 [7,76; 505,02]	8,8 [4,4; 54,7]	0,05 [0,01; 14,32]	0,91 [0,09; 11,87]	0,95 [0,11; 26,19]	8,4 [3,2; 70,5]
Карнитина хлорид	69,08 [52,65; 88,76] *	457,45 [325,57; 602,03] *	521,24 [378,22; 690,80] *	13,5 [10,5; 13,9]	0,28 [0,24; 0,37] *	2,89 [1,96; 4,14] *	3,15 [2,23; 4,51] *	8,6 [7,9; 12,0]
Карнитина хлорид +L – аргинин	71,15 [54,52; 96,6] *	395,98 [254,51; 496,98] *	454,05 [320,81; 588,08] *	16,1 [10,7; 21,2] ■	0,22 [0,15; 0,31] * ▲	2,3 [1,24; 2,78] * ▲	2,58 [1,47; 2,99] ▲	9,1 [6,9; 15,5]
Карнитина хлорид +L – NAME	57,45 [50,82; 71,63] * ●	363,97 [286,81; 428,80] * ■	426,32 [341,34; 500,43] * ● ■	14,3 [12,9; 16,0]	0,2 [0,13; 0,25] * ● ■	1,75 [1,45; 2,26] ■	1,92 [1,62; 2,46] ■	10,6 [6,7; 14,5] ■

Продолжение таблицы 5.

Показатель	Катепсин L				Катепсин H			
	НСА	СА	ОА	К лаб, %	НСА	СА	ОА	К лаб, %
Контроль1	0,34 [0,17; 0,83]	3,61 [1,32; 7,37]	3,92 [1,56; 8,20]	10,6 [4,5; 15,2]	0,4 [0,17; 0,58]	2,83 [0,98; 5,81]	3,19 [1,24; 6,40]	10,52 [9,1; 21,2]
L – аргинин	0,45 [0,41; 0,74]	4,74 [3,58; 6,88]	5,48 [3,99; 7,34]	8,8 [6,2; 13,5]	0,44 [0,34; 0,68]	3,58 [2,93; 3,91]	4,25 [3,38; 4,35]	10,3 [9,9; 15,95]
Контроль2	0,17 [0,08; 0,22]	5,7 [2,52; 13,31]	5,87 [2,69; 13,53]	2,6 [0,9; 6,2]	0,12 [0,07; 0,32]	3,53 [2,27; 13,98]	3,67 [2,38; 14,30]	3,1 [2,1; 4,9]
L – NAME, 25	0,09 [0,03; 0,29] ▲	2,22 [0,10; 6,79] * ▲	2,3 [0,13; 7,02] * ▲	5,2 [2,9; 28,1] *	0,11 [0,03; 0,18] * ▲	1,82 [0,15; 3,56] * ▲	1,95 [0,19; 3,73] * ▲	6,6 [4,2; 19,3] *
L – NAME, 200	0,94 [0,53; 1,93] * •	6,81 [3,55; 9,45] •	8,02 [5,08; 10,44]	10,2 [8,2; 30,2] *	0,4 [0,26; 0,73] * •	2,46 [1,08; 4,30] *	2,76 [1,48; 5,02] *	13,9 [8,4; 29,9] *
Контроль3	0,21 [0,09; 0,83]	3,61 [1,32; 7,37]	3,92 [1,56; 8,20]	4,3 [2,9; 15,2]	0,16 [0,10; 0,58]	2,37 [0,98; 5,81]	2,48 [1,24; 6,40]	5,9 [4,2; 21,2]
L – NAME + L – аргинин	0,27 [0,17; 0,33] ▲ •	1,61 [1,09; 2,51] * ▲	1,83 [1,36; 2,79] * ▲	15,4 [9,4; 19,9] * •	0,2 [0,12; 0,22] ▲ •	0,89 [0,66; 1,08] * ▲	1,1 [0,77; 1,27] * ▲	17,3 [14,9; 20,0] * ▲ •
Контроль4	0,12 [0,03; 0,83]	2,52 [0,10; 7,37]	2,64 [0,13; 8,20]	7,2 [2,9; 28,1]	0,11 [0,03; 0,58]	1,88 [0,15; 5,81]	2,04 [0,19; 6,40]	9,1 [4,2; 21,2]
Карнитина хлорид	0,41 [0,27; 0,63] *	4,27 [2,49; 4,62]	4,64 [3,09; 5,24]	8,5 [7,2; 19,6]	0,28 [0,23; 0,34] *	2,41 [1,49; 3,58]	2,73 [1,74; 3,92]	11,5 [7,7; 14,4] •
Карнитина хлорид +L – аргинин	0,35 [0,26; 0,40] * ▲	2,58 [1,72; 3,48] ▲ ■	2,95 [2,02; 3,83] ▲ ■	11,7 [9,2; 16,3]	0,19 [0,11; 0,20] ▲ ■	0,59 [0,32; 1,36] ▲ ■	0,78 [0,51; 1,54] ▲ ■	22,6 [11,4; 37,6] * ▲ ■
Карнитина хлорид +L – NAME	0,27 [0,20; 0,32] * • ■	2,18 [1,84; 2,32] ■	2,47 [2,03; 2,61] ■	10,8 [9,6; 12,7]	0,24 [0,17; 0,27] * • ■	1,47 [1,29; 1,85] ■	1,68 [1,54; 2,02] ■	13,6 [8,3; 16,3]

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); • - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Таблица 6 - Изменение активностей катепсинов В, L, Н под влиянием регуляторов азота и/или карнитина хлорида в скелетной мускулатуре; Me [min; max], нкат/г белка

Показатель	Кислая фосфатаза				Катепсин В			
	НСА	СА	ОА	К лаб, %	НСА	СА	ОА	К лаб, %
Контроль1	39,11 [36,49; 43,59]	471,83 [364,31; 736,00]	512,63 [404,52; 772,49]	8,1 [4,7; 9,9]	0,33 [0,07; 1,04]	0,23 [0,04; 1,01]	0,55 [0,10; 2,05]	58,7 [50,6; 65,9]
L – аргинин	45,64 [36,41; 55,12]	296,17 [273,03; 403,15]	342,41 [309,44; 448,79]	12,4 [10,2; 13,5] *	1,56 [0,62; 3,01] *	1,59 [0,45; 2,59] *	4,09 [1,06; 4,28] *	57,9 [37,6; 73,4]
Контроль2	15,86 [12,90; 21,44]	453,47 [363,84; 845,71]	469,33 [376,73; 862,31]	3,3 [1,9; 4,5]	0,07 [0,04; 0,09]	3,47 [2,38; 5,51]	3,52 [2,44; 5,60]	1,8 [1,0; 2,8]
L – NAME, 25	2,45 [1,35; 5,33] * ▲	8,44 [4,41; 29,88] * ▲	11,29 [7,76; 32,09] * ▲	22,2 [6,9; 54,7] * ▲	0,02 [0,01; 0,05] * ▲	0,15 [0,09; 0,35] * ▲	0,18 [0,11; 0,37] *	13,8 [6,0; 23,9] * ▲
L – NAME, 200	88,5 [36,15; 165,89] * •	606,74 [150,76; 1613,33] *	702,58 [186,91; 1779,22] *	14,2 [9,3; 19,3] •	0,28 [0,22; 0,34] * •	3,04 [1,73; 10,07] *	3,35 [1,94; 10,41] *	8,3 [3,3; 11,1] * •
Контроль3	4,18 [1,35; 43,59]	23,04 [4,41; 736,00]	24,82 [7,76; 772,49]	9,6 [4,7; 54,7]	0,04 [0,01; 1,04]	0,15 [0,04; 1,01]	0,18 [0,10; 2,05]	19,7 [6,0; 65,9]
L – NAME + L – аргинин	55 [48,81; 64,68] * ▲ •	474,52 [400,47; 709,40] * ▲	531,38 [457,56; 761,61] * ▲	10 [6,9; 12,5] •	0,23 [0,18; 0,30] ▲ •	2,24 [1,24; 2,79] * •	2,51 [1,46; 3,04] * •	9,1 [8,0; 14,6] * ▲ •
Контроль4	17,47 [1,35; 43,59]	211,74 [4,41; 736,00]	229,2 [7,76; 772,49]	17,4 [4,7; 54,7]	0,19 [0,01; 1,04]	0,26 [0,04; 1,01]	0,45 [0,10; 2,05]	31,8 [6,0; 65,9]
Карнитина хлорид	71,98 [65,39; 75,72] *	650,4 [478,78; 804,10] *	720,21 [544,17; 879,83] *	9,8 [8,6; 12,0]	0,49 [0,44; 1,01] *	6,45 [3,58; 8,27] *	7,23 [4,02; 8,71] *	7,9 [5,1; 14,1] *
Карнитина хлорид +L – аргинин	63,26 [58,88; 68,33] * ▲ ■	476,39 [414,12; 605,64] * ▲ ■	544,09 [478,63; 667,65] * ▲ ■	11,7 [9,3; 13,5]	0,34 [0,26; 0,46] ▲ ■	2,9 [1,77; 4,90] * ▲ ■	3,28 [2,23; 5,25] * ■	9,8 [6,7; 20,6] * ▲
Карнитина хлорид +L – NAME	83,23 [67,11; 96,83] * •	894,14 [688,30; 1072,43] * • ■	976,11 [756,37; 1168,89] * • ■	8,6 [7,4; 9,3] • ■	0,25 [0,18; 0,32] • ■	2,25 [1,25; 2,81] * • ■	2,46 [1,57; 3,06] * • ■	9,6 [7,3; 20,3] * •

Продолжение таблицы 6.

Показатель	Катепсин L				Катепсин H			
	НСА	СА	ОА	К лаб, %	НСА	СА	ОА	К лаб, %
Контроль1	0,61 [0,33; 0,72]	6,27 [2,44; 10,11]	6,79 [2,97; 10,84]	9,2 [4,4; 17,8]	0,77 [0,64; 0,80]	6,48 [3,36; 11,42]	7,18 [4,16; 12,19]	9,9 [6,3; 19,3]
L – аргинин	0,28 [0,26; 0,44] *	2,38 [1,95; 4,34]	2,68 [2,22; 4,78] *	11,4 [9,2; 11,9]	0,28 [0,24; 0,37] *	2,67 [2,30; 4,39] *	3,01 [2,58; 4,76] *	9,1 [7,7; 11,4]
Контроль2	0,19 [0,08; 0,22]	9,12 [3,35; 13,31]	9,25 [3,54; 13,53]	1,9 [0,9; 5,5]	0,19 [0,07;0,32]	5,59 [3,06;13,98]	5,79 [3,14;14,30]	2,3 [2,1;4,0]
L – NAME, 25	0,05 [0,03;0,06] * ▲	0,33 [0,10;0,36] * ▲	0,38 [0,13;0,41] * ▲	13,6 [9,0;28,1] * ▲	0,04 [0,03;0,04] *	0,19 [0,15;0,36] * ▲	0,23 [0,19;0,39] * ▲	16,9 [9,1;19,3] * ▲
L – NAME, 200	0,82 [0,41;1,17] * •	5,18 [3,46;13,43] *	5,77 [4,07;14,39] *	8,3 [3,3; 11,1] •	0,59 [0,20;0,88] * •	4,05 [1,36;6,86] *	4,55 [1,81;7,75] *	12,5 [5,8;24,5] •
Контроль3	0,05 [0,03;0,72]	0,36 [0,10;10,11]	0,41 [0,13;10,84]	12,6 [4,4;28,1]	0,04 [0,03;0,80]	0,29 [0,15;11,42]	0,32 [0,19;12,19]	14,3 [6,3;19,3]
L – NAME + L – аргинин	0,45 [0,22;0,52] •	3,93 [3,00;5,58] •	4,25 [3,48;6,11] •	8,8 [5,5;13,8] •	0,22 [0,19;0,33]	1,95 [1,58;3,42] •	2,18 [1,80;3,75] •	10,4 [8,0;12,2] •
Контроль4	0,26 [0,03;0,72]	2,69 [0,10;10,11]	2,95 [0,13;10,84]	12,9 [4,4;28,1]	0,32 [0,03;0,80]	2,9 [0,15;11,42]	3,22 [0,19;12,19]	13,9 [6,3;19,3]
Карнитина хлорид	0,75 [0,66;0,91] *	7,41 [5,86;10,23] *	8,12 [6,62;10,95] *	9,7 [6,6;12,1]	0,38 [0,31;0,45]	3,93 [2,80;4,50]	4,31 [3,17;4,81]	9,5 [6,5;11,8]
Карнитина хлорид +L – аргинин	0,45 [0,35;0,52] ▲ ■	3,25 [2,69;4,00] ■	3,69 [3,11;4,49] ■	12,2 [9,0;14,3]	0,43 [0,27;0,63]	2,29 [1,63;2,65] ■	2,78 [1,94;3,10] ■	17,9 [9,9;21,4] ▲ ■
Карнитина хлорид +L – NAME	0,45 [0,28;0,69] • ■	3,17 [2,74;4,23] • ■	3,57 [3,21;4,92] • ■	12,5 [8,7;15,1] •	0,21 [0,08;0,31] ■	1,39 [1,13;2,26] • ■	1,61 [1,29;2,58] • ■	12 [6,4;15,9] •

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); • - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME, 25 мг/кг ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Таблица 7 - Распределение критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах применения карнитина хлорида отдельно и в сочетании с регуляторами синтеза оксида азота в аорте; H; p

КФ	НСА	H =2,95 p =0,2291
	СА	H =6,22 p =0,0446
	ОА	H =5,98 p =0,0504
	К лаб,%	H =1,51 p =0,4703
КВ	НСА	H =12,57 p =0,0019
	СА	H =12,78 p =0,0017
	ОА	H =13,05 p =0,0015
	К лаб,%	H =2,33 p =0,3123
КЛ	НСА	H =9,98 p =0,0068
	СА	H =10,43 p =0,0054
	ОА	H =11,79 p =0,0028
	К лаб,%	H =1,72 p =0,4233
КН	НСА	H =9,27 p =0,0097
	СА	H =12,43 p =0,0020
	ОА	H =12,77 p =0,0017
	К лаб,%	H =0,71 p =0,7000

Таблица 8 - Распределение критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах применения карнитина хлорида отдельно и в сочетании с регуляторами синтеза оксида азота миокарде; H; p

КФ	НСА	H =2,47 p =0,2912
	СА	H =3,52 p =0,1720
	ОА	H =3,59 p =0,1661
	К лаб, %	H =6,00 p =0,0498
КВ	НСА	H =8,67 p =0,0131
	СА	H =7,05 p =0,0294
	ОА	H =7,05 p =0,0294
	К лаб, %	H =0,19 p =0,9107
КЛ	НСА	H =8,67 p =0,0131
	СА	H =10,05 p =0,0066
	ОА	H =9,92 p =0,0070
	К лаб, %	H =2,67 p =0,2636
КН	НСА	H =11,24 p =0,0036
	СА	H =12,77 p =0,0017
	ОА	H =14,00 p =0,0009
	К лаб, %	H =8,05 p =0,0179

Таблица 9 - Распределение критерия Kruskal – Wallis ANOVA в группах применения карнитина хлорида отдельно и в сочетании с регуляторами синтеза оксида азота в скелетной мускулатуре; H; p

КФ	НСА	H =8,84 p =0,0120
	СА	H =13,13 p =0,0014
	ОА	H =12,74 p =0,0017
	К лаб, %	H =10,15 p =0,0062
КВ	НСА	H =12,36 p =0,0021
	СА	H =12,88 p =0,0016
	ОА	H =12,88 p =0,0016
	К лаб, %	H =0,89 p =0,6412
КЛ	НСА	H =10,78 p =0,0046
	СА	H =11,42 p =0,0033
	ОА	H =11,38 p =0,0034
	К лаб, %	H =4,35 p =0,1136
КН	НСА	H =10,43 p =0,0054
	СА	H =13,35 p =0,0013
	ОА	H =14,362 p =0,0008
	К лаб, %	H =8,05 p =0,0179

Таблица 10 - Изменение показателей коэффициентов аутокаталитического действия катепсинов В, L и H аорты крыс; Me [min; max]

Показатель	НСА KB	СА KB	НСА KL	СА KL	НСА KH	СА KH
Контроль1	1,03 [0,75; 1,16]	2,19 [0,92; 2,77]	1,2 [0,88; 2,23]	0,83 [0,75; 1,08]	0,98 [0,81; 1,04]	1,22 [0,92; 1,91]
L-аргинин	1,21 [0,42; 1,39]	1,12 [0,49; 1,39]	1,33 [0,44; 8,03]	1,35 [0,48; 2,12]	1,23 [0,96; 1,57]	0,94 [0,73; 1,64]
Контроль2	1,02 [0,78; 1,65]	1,17 [0,95; 1,60]	0,67 [0,44; 1,14]	0,64 [0,48; 0,90]	0,78 [0,49; 1,03]	0,79 [0,61; 1,18]
L-NAME, 25	1,91 [0,46; 5,76]	1,79 [1,00; 2,22]	0,64 [0,41; 0,85] [▲]	0,88 [0,63; 1,06]	5,08 [3,38; 8,21] * [▲]	4,7 [1,26; 14,14] ^{*[▲]}
L-NAME, 200	0,7 [0,38; 1,54]	0,78 [0,34; 1,63] [•]	0,99 [0,52; 1,23]	0,96 [0,45; 1,17]	1,01 [0,81; 1,72] •	1 [0,75; 1,22] ^{*[•]}
Контроль3	1,02 [0,75; 1,65]	1,18 [0,92; 2,77]	0,88 [0,44; 2,23]	0,8 [0,48; 1,08]	0,9 [0,49; 1,04]	1,01 [0,61; 1,91]
L-NAME + L- аргинин	1,13 [0,63; 1,29]	1,05 [0,35; 1,97]	0,77 [0,54; 1,85] *	0,88 [0,73; 1,78]	1,25 [0,73; 1,78] •	0,89 [0,67; 1,21] •
Контроль4	1,07 [0,75; 1,65]	1,49 [0,92; 2,77]	0,98 [0,44; 2,23]	0,75 [0,48; 1,08]	0,84 [0,49; 1,04]	1,04 [0,61; 1,91]
Карнитина хлорид	0,97 [0,82; 1,62]	0,96 [0,75; 1,22] *	1,44 [0,92; 2,06] *	1,62 [1,30; 2,15] *	2,12 [1,10; 2,48] *	2,09 [1,74; 2,76] *
Карнитина хлорид +L – аргинин	0,9 [0,67; 1,09]	0,99 [0,73; 1,15] *	1,81 [1,02; 2,23] *	1,57 [0,54; 2,62]	0,73 [0,48; 1,02] ▲ ■	0,92 [0,74; 1,31] ■
Карнитина хлорид +L – NAME	1,39 [0,97; 2,05]	1,38 [0,90; 1,91]	0,6 [0,57; 1,10] ■	1,24 [0,66; 1,40] * ■	1,7 [1,17; 2,07] * [•]	1,49 [1,38; 1,64] * ■

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); • - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Таблица 11 - Изменение показателей коэффициентов аутокаталитического действия катепсинов В, L и H миокарда крыс; Me [min; max]

Показатель	НСА KB	СА KB	НСА KL	СА KL	НСА KH	СА KH
Контроль1	0,2 [0,01; 0,34]	2,84 [0,11; 7,65]	1,16 [0,98; 3,95]	1,15 [0,26; 2,17]	1,01 [0,42; 1,48]	0,95 [0,39; 2,25]
L – аргинин	0,26 [0,24; 0,69]	0,31 [0,24; 0,46]	1,22 [0,84; 1,57]	1,08 [0,31; 1,40]	1 [0,78; 1,26]	0,86 [0,66; 1,09]
Контроль2	1,1 [0,48; 1,56]	0,88 [0,31; 1,82]	0,94 [0,69; 1,37]	0,89 [0,60; 1,06]	0,54 [0,35; 0,66]	0,47 [0,38; 0,56]
L – NAME, 25	0,99 [0,73; 1,36] * ▲	1,04 [0,71; 1,41] * ▲	1,26 [0,84; 1,57]	1,08 [1,05; 1,35] *	0,6 [0,29; 0,83] *	0,51 [0,31; 0,84] *
L – NAME, 200	0,84 [0,01; 1,36]	1,04 [0,11; 7,65]	1,19 ●	1,08 [0,26; 2,17]	0,78 [0,29; 1,48] * ●	0,69 [0,31; 2,25] * ●
Контроль3	2,05 [1,48; 2,80]	0,77 [0,56; 1,18]	1,28 [1,01; 1,55]	1,17 [0,95; 1,52]	1,43 [1,07; 1,90]	1,49 [1,17; 2,11]
L – NAME + L – аргинин	1,12 [0,92; 1,44] * ▲ ●	0,29 [0,18; 1,03] ▲ ●	0,5 [0,38; 0,7]	0,48 [0,37; 0,77]	0,7 [0,52; 0,81] * ●	0,92 [0,81; 1,02] * ▲ ●
Контроль4	2,05 [1,48; 2,80]	0,77 [0,56; 1,18]	1,28 [1,01; 1,55]	1,17 [0,95; 1,52]	1,43 [1,07; 1,90]	1,49 [1,17; 2,11]
Карнитина хлорид	0,99 [0,33; 1,16]	0,22 [0,15; 0,85] *	0,97 [0,85; 1,22] *	1,0 [0,93; 1,25] *	2,58 [2,34; 3,61]	4,35 [3,16; 7,57]
Карнитина хлорид + L – аргинин	1,15 [0,60; 1,39] ▲	0,28 [0,21; 1,05] *	1,25 [1,12; 1,41] * ■	1,28 [1,12; 1,44] ■	3,03 [2,49; 4,54] * ▲ ■	3,0 [2,60; 3,52] * ▲ ■
Карнитина хлорид + L – NAME	0,8 [0,63; 1,50]	1,22 [0,62; 1,77] * ●	0,85 [0,66; 1,15] ■	0,9 [0,53; 3,11] ■	2,22 [1,50; 4,73] * ● ■	3,19 [0,94; 5,09] * ● ■

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); ● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Таблица 12 - Изменение показателей коэффициентов аутокаталитического действия катепсинов В, L и H скелетной мускулатуры крыс; Me [min; max]

Показатель	НСА KB	СА KB	НСА KL	СА KL	НСА KH	СА KH
Контроль1	1,25 [0,13; 2,91]	14,54 [1,13; 60,51]	2,26 [0,39; 5,72]	0,1 [0,02; 0,97]	0,24 [0,13; 0,36]	0,22 [0,01; 0,43]
L – аргинин	0,13 [0,06; 0,39]	1,94 [1,49; 4,55]	8,57 [2,51; 11,86]	0,58 [0,42; 1,38]	13,34 [1,74; 29,34] *	1,33 [0,22; 2,14]
Контроль2	0,8 [0,16; 1,23]	0,4 [0,16; 1,41]	1,08 [0,49; 2,25]	1,01 [0,70; 1,51]	0,48 [0,21; 0,75]	0,46 [0,29; 0,85]
L – NAME, 25	1,96 [0,97; 4,39] * ▲	2,39 [1,11; 3,49] * ▲	1,17 [0,77; 1,27] ▲	1,18 [0,53; 2,73]	1,18 [1,00; 1,26] * ▲	1,24 [0,99; 1,45] *
L – NAME, 200	0,85 [0,66; 1,38] *	1,07 [0,45; 1,96] *	0,98 [0,38; 1,96]	1,32 [0,53; 1,56]	1,29 [0,51; 3,95]	1,08 [0,66; 2,16] ●
Контроль3	1,9 [0,13; 4,39]	3,08 [1,11; 60,51]	1,17 [0,39; 5,72]	0,79 [0,02; 2,73]	1,06 [0,13; 1,26]	1,03 [0,01; 1,45]
L – NAME + L – аргинин	2,67 [2,04; 3,25] ▲ ●	0,34 [0,21; 0,71] * ▲	1,12 [0,57; 2,13] ▲	0,8 [0,55; 1,06]	2,07 [1,58; 2,41] * ●	2,05 [1,63; 2,37] * ●
Контроль4	1,87 [0,13; 4,39]	10,46 [1,11; 60,51]	1,73 [0,39; 5,72]	0,91 [0,02; 2,73]	0,8 [0,13; 1,26]	0,82 [0,01; 1,45]
Карнитина хлорид	0,97 [0,47; 1,22] *	0,78 [0,69; 1,16]	0,69 [0,30; 1,36]	0,66 [0,59; 1,44]	1,25 [1,10; 2,15] *	1,44 [0,99; 2,71] *
Карнитина хлорид + L – аргинин	0,9 [0,58; 1,08] ▲	0,76 [0,44; 1,38] * ▲	1,09 [0,81; 1,46] ▲	0,91 [0,68; 1,05]	1,86 [1,17; 2,69] *	1,9 [1,56; 2,41] *
Карнитина хлорид + L – NAME	1,03 [0,73; 1,28]	1,13 [0,77; 2,66] * ●	0,89 [0,74; 1,03]	0,93 [0,86; 1,20]	2,78 [2,24; 5,53] * ● ■	2,59 [1,84; 4,07] * ● ■

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); ▲ - статистически значимые отличия от группы с аргинином ($p < 0,05$); ● - статистически значимые отличия от группы с введением L-NAME ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы с карнитином ($p < 0,05$)

Таблица 13 - Показатели корреляционной связи между общей площадью ОМБ и фракциями катепсинов В, L, Н в аорте

Аорта		Катепсин В			Катепсин L			Катепсин Н		
Показатель		НСА	СА	ОА	НСА	СА	ОА	НСА	СА	ОА
L-аргинин	Spearman	-0,03	0,12	0,09	-0,03	-0,60	-0,60	-0,20	0,12	0,14
	p-value	0,96	0,83	0,87	0,96	0,21	0,21	0,70	0,83	0,79
L-NAME, 25	Spearman	0,14	0,60	0,49	-0,09	0,54	0,54	-0,60	<i>0,94</i>	<i>0,83</i>
	p-value	0,79	0,21	0,33	0,87	0,27	0,27	0,21	<i>0,00</i>	<i>0,04</i>
L-NAME, 200	Spearman	0,00	0,40	0,40	-0,40	0,60	0,00	-0,40	0,00	0,00
	p-value	1,00	0,60	0,60	0,60	0,40	1,00	0,60	1,00	1,00
L-аргинин + L-NAME,25	Spearman	0,03	-0,31	-0,37	0,20	-0,14	-0,09	0,31	-0,37	-0,37
	p-value	0,96	0,54	0,47	0,70	0,79	0,87	0,54	0,47	0,47
Карнитина хлорид	Spearman	-0,49	-0,60	-0,77	-0,77	-0,49	-0,49	<i>-0,94</i>	0,09	-0,43
	p-value	0,33	0,21	0,07	0,07	0,33	0,33	<i>0,00</i>	0,87	0,40
Карнитина хлорид + L-аргинин	Spearman	-0,03	0,26	0,26	<i>0,83</i>	-0,43	-0,20	-0,31	0,66	-0,03
	p-value	0,96	0,62	0,62	<i>0,04</i>	0,40	0,70	0,54	0,16	0,96
Карнитина хлорид+L-NAME,25	Spearman	0,09	0,09	0,09	-0,09	0,49	0,26	-0,09	0,49	0,26
	p-value	0,87	0,87	0,87	0,87	0,33	0,62	0,87	0,33	0,62

Таблица 14 - Показатели корреляционной связи между общей площадью ОМБ и фракциями катепсинов В, L, Н в миокарде

Миокард	Показатель	Катепсин В			Катепсин L			Катепсин Н		
		НСА	СА	ОА	НСА	СА	ОА	НСА	СА	ОА
L-аргинин	Spearman	0,00	-0,30	-0,30	0,70	0,10	0,10	0,80	0,10	0,50
	p-value	1,00	0,62	0,62	0,19	0,87	0,87	0,10	0,87	0,39
L-NAME, 25	Spearman	-0,61	-0,43	-0,43	-0,89	-0,32	-0,32	0,50	0,18	0,18
	p-value	0,15	0,34	0,34	0,01	0,48	0,48	0,25	0,70	0,70
L-NAME, 200	Spearman	-0,04	0,21	0,21	-0,25	0,25	0,21	0,32	0,79	0,79
	p-value	0,94	0,64	0,64	0,59	0,59	0,64	0,48	0,04	0,04
L-аргинин + L-NAME,25	Spearman	0,37	0,37	0,54	0,60	0,26	0,37	0,03	0,49	0,49
	p-value	0,47	0,47	0,27	0,21	0,62	0,47	0,96	0,33	0,33
Карнитина хлорид	Spearman	-0,37	0,14	0,14	-0,20	-0,54	-0,54	0,77	0,14	0,49
	p-value	0,47	0,79	0,79	0,70	0,27	0,27	0,07	0,79	0,33
Карнитина хлорид + L-аргинин	Spearman	-0,60	0,14	0,14	-0,49	0,14	0,26	-0,03	-0,09	-0,09
	p-value	0,21	0,79	0,79	0,33	0,79	0,62	0,96	0,87	0,87
Карнитина хлорид+L-NAME,25	Spearman	-0,71	-0,20	-0,20	0,03	-0,54	-0,20	0,66	-0,49	-0,49
	p-value	0,11	0,70	0,70	0,96	0,27	0,70	0,16	0,33	0,33

Таблица 15 - Показатели корреляционной связи между общей площадью ОМБ и фракциями катепсинов В, L, Н в скелетной мускулатуре

Скелетная мускулатура		Катепсин В			Катепсин L			Катепсин Н		
Показатель		НСА	СА	ОА	НСА	СА	ОА	НСА	СА	ОА
L-аргинин	Spearman	0,80	0,20	0,50	0,10	-0,20	-0,20	-0,70	0,10	0,10
	p-value	0,10	0,75	0,39	0,87	0,75	0,75	0,19	0,87	0,87
L-NAME, 25	Spearman	-0,77	-0,14	-0,14	-0,37	-0,26	-0,26	0,03	-0,09	-0,09
	p-value	0,07	0,79	0,79	0,47	0,62	0,62	0,96	0,87	0,87
L-NAME, 200	Spearman	-0,40	-0,29	-0,29	-0,17	-0,26	-0,40	-0,17	0,00	0,00
	p-value	0,32	0,49	0,49	0,69	0,53	0,32	0,69	1,00	1,00
L-аргинин + L-NAME,25	Spearman	0,14	0,49	0,49	0,09	-0,37	-0,37	0,20	0,37	0,37
	p-value	0,79	0,33	0,33	0,87	0,47	0,47	0,70	0,47	0,47
Карнитина хлорид	Spearman	-0,31	-0,26	-0,26	-0,26	-0,77	-0,71	-0,66	0,37	0,20
	p-value	0,54	0,62	0,62	0,62	0,07	0,11	0,16	0,47	0,70
Карнитина хлорид + L-аргинин	Spearman	-0,49	-0,26	-0,66	-0,66	-0,26	-0,49	-0,37	-0,66	-0,71
	p-value	0,33	0,62	0,16	0,16	0,62	0,33	0,47	0,16	0,11
Карнитина хлорид+L-NAME,25	Spearman	-0,71	0,26	-0,77	-0,37	-0,37	-0,20	-0,49	-0,37	-0,26
	p-value	0,11	0,62	0,07	0,47	0,47	0,70	0,33	0,47	0,62