

## ВЛИЯНИЕ L-N<sup>o</sup>-НИТРОАРГИНИНА МЕТИЛОВОГО ЭФИРА И НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ *IN VITRO* НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ ЛИЗОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС

Мария Алексеевна Фомина, Анна Михайловна Кудлаева\*, Сергей Алексеевич Исаков, Александр Николаевич Рябков

Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова

Поступила 25.10.2017; принята в печать 09.11.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-1005

**Цель.** Изучение воздействия *in vitro* 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метилового эфира и 0,1 мМ натрия нитропрусида на окислительную модификацию лизосомальных белков печени половозрелых интактных крыс-самок линии Wistar.

**Методы.** В контрольных группах проводили инкубацию *in vitro* выделенных лизосом в среде выделения в течение 1, 2 и 4 ч. Опытные группы инкубировали подобным образом в растворах 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метилового эфира и 0,1 мМ натрия нитропрусида. Окислительную модификацию белков оценивали в седиментируемой фракции по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой. Резервно-адаптационный потенциал рассчитывали как разность между общей площадью под кривой карбонильных производных при металл-катализируемом окислении (принимали за 100%) и при спонтанном окислении, выраженном в процентном соотношении.

**Результаты.** Оказалось, что при 4-часовой инкубации *in vitro* 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метиловый эфир статистически значимо увеличивает общий уровень окислительной модификации белков по сравнению с контрольной группой в 2,41 раза и уменьшает резервно-адаптационный потенциал в 4,96 раза, а 0,1 мМ натрия нитропруssid увеличивает общий уровень окислительной модификации белков по отношению к контрольной группой в 2,05 раза и уменьшает резервно-адаптационный потенциал в 1,56 раза. Одним из возможных механизмов данного явления может оказаться снижение активности лизосомальных протеиназ. 2-часовая и 4-часовая инкубация *in vitro* лизосом в 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метилового эфира сопровождается увеличением доли вторичных маркеров окислительной модификации белков по отношению к 1-часовому воздействию в 1,18 и 1,35 раза соответственно. При 1-часовой инкубации *in vitro* в 0,1 мМ натрия нитропрусида происходит рост содержания вторичных маркеров окислительной деструкции белков в 1,64 раза.

**Вывод.** Воздействие 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метилового эфира и 0,1 мМ натрия нитропрусида *in vitro* приводит к отчетливым изменениям показателей окислительной модификации лизосомальных белков печени крыс.

**Ключевые слова:** окислительная модификация белков, лизосомы, резервно-адаптационный потенциал, эксперимент.

### INFLUENCE OF L-N<sup>o</sup>-NITROARGININE METHYL ESTER AND SODIUM NITROPRUSSIDE *IN VITRO* ON THE OXIDATIVE MODIFICATION OF RAT LYSSOSOME PROTEINS

M.A. Fomina, A.M. Kudlaeva, S.A. Isakov, A.N. Ryabkov

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

**Aim.** To investigate *in vitro* effects of 5 mM L-N<sup>o</sup>-nitroarginine methyl ester and 0.1 mM sodium nitroprusside on oxidative modification of lysosomal proteins of liver of intact sexually mature female rats of Wistar line.

**Methods.** In the control groups *in vitro* incubation of isolated lysosomes in the isolation medium for 1, 2 and 4 hours was carried out. Experimental groups were incubated similarly in solutions of 5 mM L-N<sup>o</sup>-nitroarginine methyl ester and 0.1 mM sodium nitroprusside. Protein oxidative modification was measured in sedimentary fraction according to R.L. Levine's method in E.E. Dubinina's modification. Reserve-adaptive capacity was calculated as the difference between total area under the curve of carbonyl derived proteins after metal-catalyzed oxidation (taken as 100%) and spontaneous oxidation, expressed as a percentage.

**Results.** After 4-hour *in vitro* incubation 5 mM L-N<sup>o</sup>-nitroarginine methyl ester was found to statically significantly increase the total level of protein oxidative modification compared to the control group by 2.41 times and to reduce reserve-adaptive capacity by 4.96 times, and 0.1 mM sodium nitroprusside increases the total level of protein oxidative modification compared to the control group by 2.05 times and reduces reserve-adaptive capacity by 1.56 times. One of the possible mechanisms of this phenomenon may be the reduced activity of lysosomal proteinases. 2-hour and 4-hour *in vitro* incubation of lysosomes in 5 mM L-N<sup>o</sup>-nitroarginine methyl ester is accompanied by an increase of secondary markers of the ratio of protein oxidative modification relatively to 1-hour exposure by 1.18 times and 1.35 times, respectively. At 1-hour *in vitro* incubation in 0.1 mM sodium nitroprusside, increase of secondary markers of protein oxidative degradation by 1.64 times occurs.

**Conclusion.** The *in vitro* effect of 5 mM L-N<sup>o</sup>-nitroarginine methyl ester and 0.1 mM sodium nitroprusside results in visible changes of oxidative modification of rat liver lysosomal proteins.

**Keywords:** oxidative protein modification, lysosomes, reserve-adaptive capacity, experiment.

Изучению окислительного стресса в настоящее время посвящено множество исследований. Данный процесс рассматривают

как токсическое действие активных форм кислорода или азота на биологический субстрат при снижении функций антиоксидантной защиты. Мишенью для действия реакционно-способных молекул становятся

углеводы, ненасыщенные липиды, белки и нуклеиновые кислоты, повреждение которых может происходить с помощью разных механизмов и затрагивать различные участки молекулы.

Белки подвергаются действию активных форм кислорода и азота чаще, чем липиды и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), и составляют около 68% окисленных молекул в клетке [1, 2]. Окисление белков может происходить путём прямой модификации активных форм кислорода и азота, продуктами перекисного окисления липидов (например, малоновым диальдегидом и 4-гидроксиноненалью) или в ходе реакций гликирования и глиоксидации.

Окислительная модификация приводит к образованию альдегидных и кетонных групп в боковых цепях белковой молекулы. Эти карбонильные производные служат «визитной карточкой» окислительного стресса, а их количественное определение проводят для выявления степени окислительной деструкции протеина [3].

В норме NO участвует в окислительно-восстановительной сигнализации путём изменения белков (через *s*-нитрозилирование остатков цистеина) и липидов (через нитрование жирных кислот). Однако в условиях избыточной продукции активных форм кислорода происходит их взаимодействие с NO с образованием активных форм азота, вовлечённых в окислительное и нитрозативное повреждение клетки [4].

В эксперименте одним из широко используемых спонтанных доноров NO служит натрия нитропруссид. Существует предположение, что данное соединение может проявлять прооксидантное действие не только за счёт NO, но и по причине наличия в его составе атомов железа, которые после высвобождения NO могут участвовать в реакции Фентона и способствовать образованию активных форм кислорода [5]. Дефицит синтеза NO в экспериментах часто моделируют с помощью неселективного синтетического ингибитора NO-синтазы L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метилового эфира (L-NAME). Было обнаружено, что он способен предотвращать окислительный стресс, вызванный L-ацетиларгинином, в крови, печени и почках крыс [6].

В ходе других экспериментов был выявлен дозозависимый эффект L-NAME в отношении образования карбонильных производных белков в печени крыс [7]. Однако встаёт вопрос: L-NAME проявляет данные

эффекты только за счёт ингибирования NO-синтазы или обладает собственным действием в отношении окислительной модификации белков? Объектом нашего исследования послужили выделенные суспензии лизосом, поскольку в литературе отсутствуют данные о наличии NO-синтазы в данных органеллах.

Цель работы — изучение влияния *in vitro* L-NAME и натрия нитропруссиды на окислительную модификацию белков лизосом печени крысы.

Исследование выполнено на 54 интактных конвенциональных половозрелых самках крыс линии Wistar с массой тела 280–330 г. Работа с животными проведена в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708н «Об утверждении правил лабораторной практики» и приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 №755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

*Выделение лизосом.* За 12 ч до забоя животных лишали пищи для стандартизации условий опытов. Эвтаназию животных осуществляли под медикаментозным наркозом при сохранённом дыхании и сердцебиении. Печень из каждой крысы извлекали сразу после обескровливания и помещали в охлаждённый 0,25 М раствор сахарозы (среда выделения). Орган промывали от остатков крови средой выделения, после чего готовили точную навеску из каждой печени в пределах 740–760 мг на электронных весах (AJH-220 SE, Япония).

Полученный материал измельчали ножницами и помещали в стеклянный стакан гомогенизатора «Potter S» (Sartorius, Германия), добавляя холодный 0,25 М раствор сахарозы в соотношении 1:9, и гомогенизировали в течение 35 с тефлоновым пестиком при 900 об./мин и зазоре в пределах 0,16–0,24 мм.

Данные процедуры проводили при температуре не выше 4 °С.

Полученные гомогенаты центрифугировали 15 мин при 800 g (центрифуга CM-6M ELMi, Латвия) для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость отбирали пипеткой в отдельные гильзы и центрифугировали 15 мин при

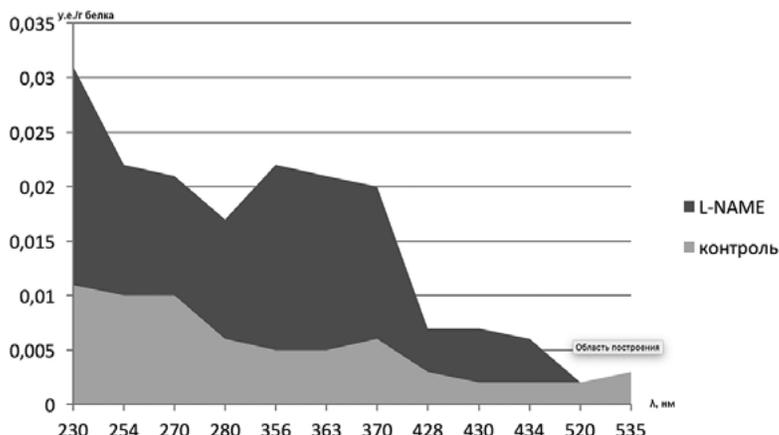


Рис. 1. Кривая спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков лизосом печени крыс под влиянием 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргина метилового эфира (L-NAME) при 4-часовой *in vitro* инкубации по сравнению с контролем (у.е./г белка), Me

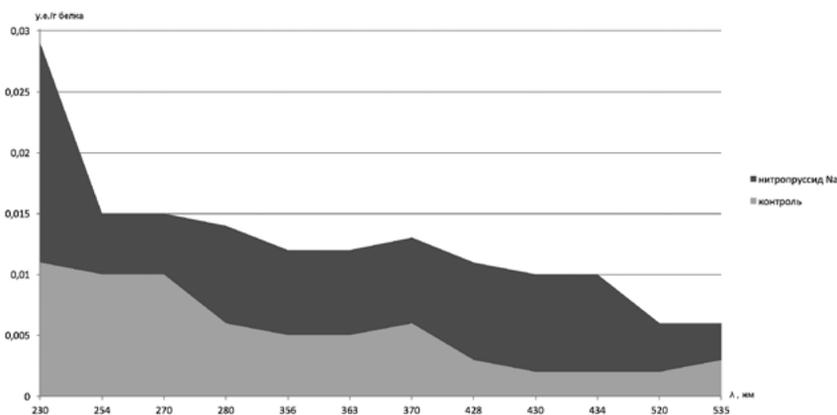


Рис. 2. Кривая спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков лизосом печени крыс под влиянием 0,1 мМ натрия нитропруссид при 4-часовой инкубации *in vitro* (у.е./г белка), Me

14 000 g для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант — дополнительно при 20 000 g в течение 30 мин (центрифуга рефрижераторная К 24 Д, ГДР). Осадок, представляющий собой грубую фракцию лизосом, ресуспендировали в 2 мл среды инкубации и использовали для исследования *in vitro*.

**Инкубация.** Полученные 54 суспензии лизосом в 0,25 М сахарозе разделяли на 9 серий, по 6 проб в каждой. Инкубацию проводили в среде исследуемых соединений на водяной бане в течение 1, 2 и 4 ч при температуре 37 °С. Контрольные серии инкубировали в среде выделения (сахарозе) также в течение 1, 2 и 4 ч при температуре 37 °С.

– Серия 1 (контрольная группа): 2 мл 0,25 М сахарозы — инкубация 1 ч.

– Серия 2: 1,9 мл 0,25 М сахарозы с добавлением 0,1 мл раствора L-NAME с конечной концентрацией 5 мМ — инкубация 1 ч.

– Серия 3: 1,9 мл 0,25 М сахарозы с добавлением 0,1 мл раствора натрия нитропруссид с конечной концентрацией 0,1 мМ — инкубация 1 ч.

– Серия 4 (контрольная группа): 2 мл 0,25 М сахарозы — инкубация 2 ч.

– Серия 5: 1,9 мл 0,25 М сахарозы с добавлением 0,1 мл раствора L-NAME с конечной концентрацией 5 мМ — инкубация 2 ч.

– Серия 6: 1,9 мл 0,25 М сахарозы с добавлением 0,1 мл раствора натрия нитропруссид с конечной концентрацией 0,1 мМ — инкубация 2 ч.

– Серия 7 (контрольная группа): 2 мл 0,25 М сахарозы — инкубация 4 ч.

– Серия 8: 1,9 мл 0,25 М сахарозы с добавлением 0,1 мл раствора L-NAME с конечной концентрацией 5 мМ — инкубация 4 ч.

– Серия 9: 1,9 мл 0,25 М сахарозы с добавлением 0,1 мл раствора натрия нитропруссид с конечной концентрацией

Уровень продуктов окислительной модификации белков лизосом печени крыс под влиянием 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метилового эфира (L-NAME) и 0,1 мМ натрия нитропруссид по сравнению с контролем (у.е./г белка), Me [Q1; Q3]

Вещество	S АДНФГ н.	S КДНФГ н.	S АДНФГ о.	S КДНФГ о.	S общ.
5 мМ L-NAME	2,83* [1,98; 5,21] p=0,008114	0,93* [0,78; 1,06] p=0,013711	0,39 [0,26; 0,58]	0,05 [0,02; 0,08]	4,27* [3,00; 6,82] p=0,022480
0,1 мМ натрия нитропруссид	1,95* [1,88; 2,28] p=0,008114	0,74* [0,69; 0,88] p=0,022480	0,8 [0,65; 0,83]	0,14 [0,11; 0,15]	3,62* [3,37; 4,10] p=0,013711
Контроль (сахароза)	1,07 [0,62; 1,18]	0,31 [0,30; 0,51]	0,24 [0,22; 0,56]	0,08 [0,05; 0,10]	1,77 [1,62; 1,82]

Примечание: \*статистическая значимость различий с показателями контрольной группы (p < 0,05); S АДНФГ н. — площадь под кривой спектра поглощения альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера; S КДНФГ н. — площадь под кривой спектра поглощения кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера; S АДНФГ о. — площадь под кривой спектра поглощения альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера; S КДНФГ о. — площадь под кривой спектра поглощения кетон-динитрофенилгидразонов основного характера; S общ. — общая площадь под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков.

0,1 мМ — инкубация 4 ч.

После инкубации лизосомы повторно осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 20 000 g. Затем осадок (сидиментируемая фракция) ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1% и использовали для исследования.

Окислительную модификацию белков оценивали по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [8]. По полученным данным строили кривую спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков с расчётом площади под кривой [9], выраженной в условных единицах на 1 г белка (у.е./г белка).

Содержание белка определяли по методу Лоури коммерческим набором НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург).

Резервно-адаптационный потенциал рассчитывали как разность между общей площадью под кривой карбонильных производных протеинов при металл-катализируемом окислении (принимали за 100%) и при спонтанном окислении, выраженном в процентном соотношении [9].

Сравнивали показатели исследуемых серий с показателями контрольных групп с соответствующей продолжительностью инкубации. Также оценивали изменения изучаемых показателей с течением времени под действием L-NAME и натрия нитропруссид.

Результаты представляли в виде медианы (Me) и верхнего и нижнего квартилей [Q1; Q3]. Для проверки статистической значимости различий значений в контрольной и опытной группах при парных срав-

нениях использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни, а при тройных сравнениях — непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при p < 0,05.

Было обнаружено, что 5 мМ L-NAME и 0,1 мМ натрия нитропруссид статически значимо увеличивают уровень окислительной модификации белков по сравнению с контрольной группой при 4-часовой *in vitro* инкубации (рис. 1, 2).

Так, 5 мМ L-NAME увеличивает содержание альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (АДНФГ н.) и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (КДНФГ н.) в 2,64 и 3 раза соответственно. 0,1 мМ натрия нитропруссид проявляет схожий эффект: происходит рост уровня АДНФГ н. в 1,82 раза и КДНФГ н. в 2,39 раза по отношению к группе контроля. Статистически значимо увеличивается общее содержание карбонильных производных при данной продолжительности инкубации: в среде, содержащей 5 мМ L-NAME, — в 2,41 раза, в среде, содержащей 0,1 мМ натрия нитропруссид, — в 2,05 раза (табл. 1). Возможно, при 4-часовом воздействии *in vitro* оба вещества проявляют прооксидантное действие в отношении белков лизосом за счёт окисления нейтральных аминокислот.

Считают, что сумма АДНФГ служит показателем ранней окислительной деструкции белковой молекулы, а сумма КДНФГ — вторичный маркёр, отражающий степень позднего повреждения белка [10]. В отношении 5 мМ L-NAME было обнаружено статистически значимое увеличение доли вторич-

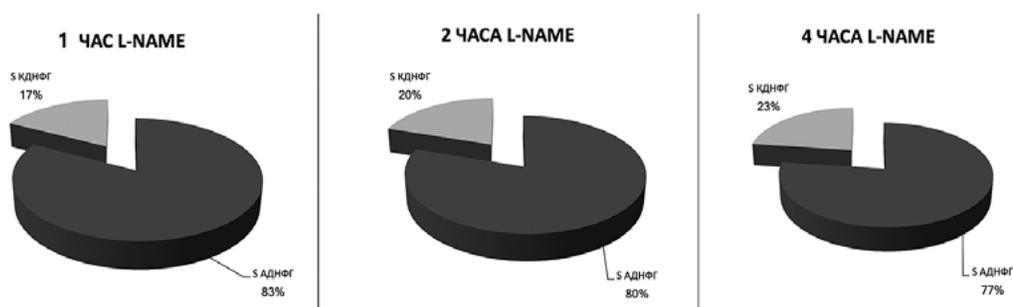


Рис. 3. Доля первичных и вторичных маркеров относительно общего содержания карбонильных производных белков лизосом, образующихся при воздействии 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метилового эфира (L-NAME) с течением времени; S КДНФГ — площадь под кривой спектра поглощения кетон-динитрофенилгидразонов; S АДНФГ — площадь под кривой спектра поглощения альдегид-динитрофенилгидразонов

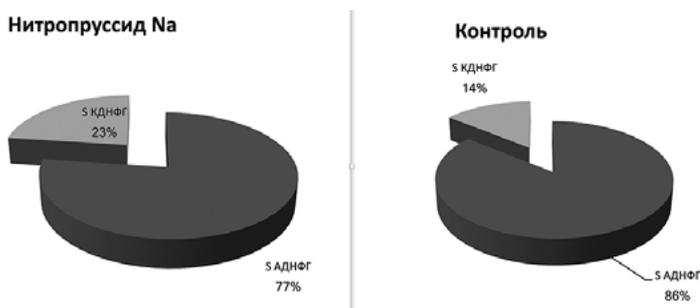


Рис. 4. Доля первичных и вторичных маркеров относительно общего содержания карбонильных производных белков лизосом, образующихся при 1-часовом воздействии 0,1 мМ натрия нитропруссид и сахарозы; S КДНФГ — площадь под кривой спектра поглощения кетон-динитрофенилгидразонов; S АДНФГ — площадь под кривой спектра поглощения альдегид-динитрофенилгидразонов

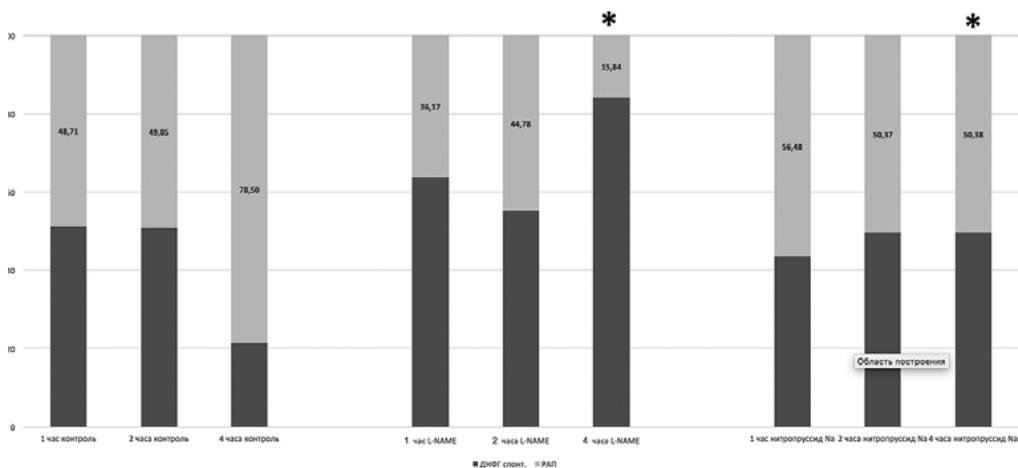


Рис. 5. Оценка резервно-адаптационного потенциала (РАП) суспензии лизосом контроль/натрия нитропруссид/ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метилового эфира (L-NAME) через 1, 2 и 4 ч от начала инкубации (%); \*статистически значимые отличия от соответствующей контрольной группы ( $p < 0,05$ ); ДНФГ спонт. — общее содержание динитрофенилгидразонов, образованных при спонтанном окислении белков

ных маркеров при 2-часовой и 4-часовой инкубации по отношению к 1-часовому воздействию в 1,18 раза ( $p=0,045328$ ) и 1,35 раза ( $p=0,045328$ ) соответственно (рис. 3). Однако по отношению к группам контроля статистически значимых различий выявлено не было.

1-часовое влияние натрия нитропрусси-

да вызвало статистически значимый рост содержания вторичных маркеров окислительной деструкции белков в 1,64 раза ( $p=0,013711$ ) по отношению к группе контроля (рис. 4).

Увеличение времени инкубации до 2 и 4 ч не привело к статистически значимым

изменениям данных показателей.

Помимо спонтанной окислительной модификации белков, демонстрирующей исходный уровень окислительного повреждения белков биологического объекта [10], в исследуемых пробах изучали металл-катализируемую окислительную модификацию белков, по которой судили о резервно-адаптационных возможностях изучаемого объекта [9]. Так, было выявлено, что 4-часовая инкубация *in vitro* суспензии лизосом в 5 мМ L-NAME приводит к снижению резервно-адаптационного потенциала по сравнению с соответствующей группой контроля в 4,96 раза ( $p=0,008114$ ), а инкубация в среде 0,1 мМ натрия нитропрусида — в 1,56 раза ( $p=0,022480$ ; рис. 5).

Одним из возможных механизмов снижения резервно-адаптационного потенциала может оказаться ингибирование активности протеолитических ферментов лизосом, участвующих в утилизации окислительно-модифицированных молекул [11].

Известно, что при снижении активности катепсина В в печени крыс возрастает уровень окислительной модификации белков [12], у катепсин D-дефицитных людей и мышей происходит накопление убиквитинированных белков, что свидетельствует о снижении способности разрушать повреждённые белки [13], а катепсин L может принимать участие в деградации окисленных белков селезёнки крыс в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота [14].

В ходе ряда исследований было обнаружено, что производные окислительно-модифицированных протеинов инактивируют тиоловые катепсины [13, 15]. В связи с этим можно предположить, что окислительно-модифицированные белки, образованные в ходе 4-часовой инкубации *in vitro* в среде 5 мМ L-NAME и 0,1 мМ натрия нитропрусида, способны ингибировать активность лизосомальных протеиназ, что может приводить к накоплению повреждённых белков и сопровождается снижением резервно-адаптационного потенциала.

## ВЫВОДЫ

1. 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метиловый эфир и 0,1 мМ натрия нитропруssid увеличивают окислительную модификацию белков лизосом печени крыс и снижают резервно-адаптационный потенциал по сравнению с контролем при 4-часовой *in vitro* инкубации.

2. 2-часовая и 4-часовая инкубация *in vitro*

*in vitro* в 5 мМ L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метиловом эфире сопровождается увеличением доли вторичных маркёров окислительной модификации белков по отношению к 1-часовому воздействию.

3. При 1-часовой инкубации *in vitro* в 0,1 мМ натрия нитропрусида происходит рост содержания вторичных маркёров окислительной деструкции белков по сравнению с контролем.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rinalducci S., Murgiano L., Zolla L. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *J. Experim. Botany*. 2008; 59 (14): 3781–3801. DOI: 10.1093/jxb/ern252.
2. Nagaoka Y., Otsua K., Okada F. et al. Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides. *Biochem. Biophys. Res. Communications*. 2005; 331 (1): 215–223. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.03.146.
3. Stadtman E.R. Protein oxidation and aging. *Free Radic*. 2006; 40 (12): 1250–1258. DOI: 10.1080/10715760600918142.
4. Hsieh H., Liu C., Huang B. et al. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J. Biomed. Sci*. 2014; 21: 3. DOI: 10.1186/1423-0127-21-3.
5. Nazari Q.A., Mizuno K., Kume T. et al. *In vivo* brain oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice. *J. Pharmacol. Sci*. 2012; 120: 105–111. DOI: 10.1254/jphs.12143FP.
6. Sasso S., Dalmedico L., Delwing-Dal M. et al. Effect of N-acetylarginine, a metabolite accumulated in hyperargininemia, on parameters of oxidative stress in rats: protective role of vitamins and L-NAME. *Cell. Biochem. Funct*. 2014; 32 (6): 511–519. DOI: 10.1002/cbf.3045.
7. Теплов С.А., Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. и др. Изменение спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков печени крыс в условиях дефицита синтеза оксида азота различной выраженности. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2016; (1): 50–54. [Teplov S.A., Abalenikhina Yu.V., Fomina M.A. et al. Changes in the spectrum of absorption of oxidative modification of proteins in rat liver with shortage of nitric oxide synthesis of different expressions. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2016; (1): 50–54. (In Russ.)]
8. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А. и др. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения. *Вопр. мед. химии*. 1995; 41 (1): 24–26. [Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A. et al. Oxidative modification of human serum proteins. A method of determining it. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1995; 41 (1): 24–26. (In Russ.)]
9. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В., Терентьев А.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях. Патент №2524667. Бюлл. №21 от 27.07.2014. [Fomina M.A., Abalenikhina Yu.V.,

Fomina N.V., Terent'ev A.A. *Method of complex assessment of the content of oxidative protein modification products in tissues and biological fluids*. Patent №2524667. Bulletin №21 issued at 27.07.2014. (In Russ.)]

10. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы). *Соврем. пробл. токсикол.* 2005; 8 (3): 20–27. [Gubskiy Yu.I., Belenichev I.F., Levitskiy E.L. et al. Toxicologic consequences of protein oxidative modification in different pathologic states (literature review). *Sovremennye problemy toksikologii.* 2005; 8 (3): 20–27. (In Russ.)]

11. Dunlop R.A., Brunk U.T., Rodgers K.J. Oxidized proteins: Mechanisms of removal and consequences of accumulation. *Life.* 2009; 61 (5): 522–527. DOI: 10.1002/iub.189.

12. Siemieniuk E., Kolodziejczyk L., Skrzydlewska E. Oxidative modifications of rat liver cell components during fasciola hepatica infection. *Toxicology*

*Mechanisms and Methods.* 2008; 18 (6): 519–524. DOI: 10.1080/15376510701624001.

13. Lee J., Giordano S., Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *Biochem. J.* 2012; 441 (2): 523–540. DOI: 10.1042/BJ20111451.

14. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А., Исаков С.А. Окислительная модификация белков и изменение активности катепсина L селезёнки крыс в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота. *Рос. мед.-биол. Вестн. им. акад. И.П. Павлова.* 2013; (1): 44–48. [Abalenikhina Yu.V., Fomina M.A., Isakov S.A. Oxidizing updating of proteins and change of activity cathepsin L rats spleen in the conditions of modeling deficiency of nitric oxide synthesis. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova.* 2013; (1): 44–48. (In Russ.)]

15. Zeng J., Dunlop R.A., Rodgers K.J. et al. Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols. *Biochem. J.* 2006; 398: 197–206. DOI:10.1042/BJ20060019.

## Правила для авторов —

на сайте «Казанского медицинского журнала»:

<http://journals.eco-vector.com/kazanmedj>