

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Арапова А.И., Фомина М.А., 2016
УДК: 577.164.18: [612.173 + 612.744

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ L-КАРНИТИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНОВ В, L, H И ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В МЫШЕЧНЫХ ОРГАНАХ КРЫС

А.И. Арапова, М.А. Фомина

Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, ул. Высоковольтная, 9,
390026, г. Рязань, Российская Федерация

Изучено влияние L-карнитина в дозе 300 мг/кг на аорту, миокард и скелетную мышцу переднего бедра крыс, изолированно и в сочетании с регуляторами синтеза оксида азота: L-аргинин, L-NAME. Активность катепсинов В, L и H изучалась спектрофлуориметрическим методом: в седиментируемой и неседиментируемой фракциях. Окислительную модификацию белков оценивали по методу R.L. Levine в модификации E.E. Дубининой. Выявлена обратная статистически значимая сильная корреляционная связь между общей площадью модифицированных белков (ОМБ) и неседиментируемой активностью катепсина H в участке аорты под действием изолированного карнитина в дозе 300 мг/кг; и в результате воздействия L-NAME в дозе 25 мг/кг, на фоне использования карнитина 300 мг/кг отмечается прямая статистически значимая сильная корреляционная связь между изменением общей площади ОМБ и неседиментируемой активностью катепсина L.

Ключевые слова: L-карнитин, L-аргинин, L-NAME, катепсины В, L, H, аорта, миокард, скелетная мышца, крысы.

STUDY OF L-CARNITINE EFFECT ON THE ACTIVITY OF CATHEPSINS B, L, H, AND OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN MUSCLE ORGANS OF RATS

A.I. Arapova, M.A. Fomina

Ryazan state medical university named after academician I.P. Pavlov,
Vysokovoltynaya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

We studied the influence of L-carnitine in a dose of 300 mg/kg on the aorta, myocardium and skeletal muscle of the anterior thigh of rats in isolation and in combination with regulators of the synthesis of nitric oxide: L-arginine, L-NAME. Activity of cathepsins B, L and H were studied by spectrofluorimeter method: in sedimentated and non-sedimentated fractions. Oxidative modification of proteins was evaluated by the method of R. L. Levine in modification of E. E. Dubinina. There was an inverse statistically significant strong correlation between the total area of modified proteins and non-sedimentated activity of cathepsin H in the area of the aorta under the action of the isolated carnitine at a dose of 300

mg/kg; and in the influence of L-NAME at a dose of 25 mg/kg, against the use of carnitine 300 mg/kg notes statistically significant strong direct correlation between change of total area oxidative modification of proteins and non-sedimentated activity of cathepsin L.

Keywords: *L-carnitine, L-arginine, L-NAME, cathepsins B, L, H; aorta, myocardium, skeletal muscle, rats.*

L-карнитин впервые был выделен в 1905 г. В.С. Гулевичем и Р. Кримбергом из экстракта мышечной ткани. С момента открытия L-карнитина прошло более 100 лет, накоплен большой материал о его свойствах и возможностях применения.

Окислительное карбонилирование белков представляет собой процесс их ковалентной модификации, вызванной как непосредственным воздействием активных форм кислорода, так и косвенным взаимодействием с вторичными продуктами оксидативного стресса [1, 2]. Одним из наиболее значимых последствий данного феномена считается агрегация белков, способная привести не только к структурным, но и к функциональным нарушениям [1]. Участие карнитина в окислительном карбонилировании является доказанным фактом, однако работ в этой области мало.

Деградация дефектных, в том числе окислительно-модифицированных, белков происходит за счет лизомальных протеиназ. Выявление ключевых моментов взаимодействия позволит лучше понять биохимическую связь между окислительным модифицированием и лизосомальным протеолизом.

Целью данного исследования является изучение влияния L-карнитина на изменение лизосомальной активности и окислительной модификации мышечных тканей и выявление взаимосвязи между этими процессами.

Задача – проведение исследований, описание и выявление корреляционных связей окислительной модификацией белков и лизосомального протеолиза в изучаемых экспериментальных моделях.

Материалы и методы

Работа выполнена на 48 конвенциональных половозрелых крысах-самцах

линии Wistar массой 280-320 граммов. Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли в соответствии с: «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993; «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.) и приказу МЗРФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Экспериментальная группа № 1: осуществляли введение карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг внутривентриально, 1 раз в день, в течение 21 дня; группа № 2: осуществляли введение карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг внутривентриально в течение 21 дня, одновременно внутривентриально вводили L-NAME 25 мг/кг с 14-х по 21-е сутки; группа № 3: осуществляли внутривентриальное введение карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг в течение 21 дня; одновременно внутривентриально вводили раствор L-аргинина на 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [3] через стеклянный градуированный шприц с внутривентриальным зондом с 11-е по 21-е сутки.

Животным контрольной группы осуществляли введение физиологического раствора, вариант введения, объемы раствора и продолжительность воздействия совпадали с таковыми для экспериментальной группы.

Активность катепсинов В, L и H изучалась спектрофлуориметрическим методом [4]: в седиментируемой (СА) и неседиментируемой (НСА) фракциях. Общую активность (ОА) рассчитывали как сумму СА и НСА.

Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали по методу R.L. Le-

vine в модификации [5]. По полученным значениям экстинкций строили спектр окислительной модификации белков и подсчитывали площадь под кривой: раздельно алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера ($S_{\text{АДНФГ}_{\text{uv}}}$) и основного ($S_{\text{АДНФГ}_{\text{vs}}}$); и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального ($S_{\text{КДНФГ}_{\text{uv}}}$) и основного характера ($S_{\text{КДНФГ}_{\text{vs}}}$); а также их общую сумму ($S_{\text{ОМБ}}$) [6]; выражали в условных единицах на грамм белка (у.е./г белка).

Статистический анализ проведен с использованием «Statistica 10.0». При отсутствии согласия большинства данных с нормальным распределением, вычисляли: медиану (Me), минимальное (min) и максимальное (max) значение, для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали кри-

терий Манна-Уитни (U-тест). Для оценки корреляции использовали коэффициент Спирмена.

Результаты и их обсуждение

Статистически значимый рост показателей группы животных с применением карнитина относительно контрольной группы, свидетельствует о выраженном нарастании окислительной модификации (табл.1). Являясь антагонистами в действии на апоптоз – L-аргинин и карнитин [7], характеризуются в группе сочетанного воздействия резким статистически значимым снижением показателей $S_{\text{ОМБ}}$ по сравнению с изолированным введением карнитина. В модели сочетанного воздействия препаратами карнитина и L-NAME отмечается незначительное снижение показателей сочетанной группы относительно карнитина.

Таблица 1

Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и их компонентов в участке грудной аорты (у.е./г белка)

Показатель	$S_{\text{АДНФГ}_{\text{uv}}}$	$S_{\text{АДНФГ}_{\text{vs}}}$	$S_{\text{КДНФГ}_{\text{uv}}}$	$S_{\text{КДНФГ}_{\text{vs}}}$	$S_{\text{ОМБ}}$
Контроль	3,65 [2,67;5,31]	0,98 [0,58; 2,99]	1,17 [0,63; 3,08]	0,17 [0,05; 0,35]	6,68 [4,12; 11,61]
Карнитин	8,91 [6,83; 11,58] *	3,60 [2,44; 4,72] *	3,01 [1,63; 5,57] *	0,61 [0,40; 0,83] *	16,45 [11,83; 21,98] *
Карнитин + аргинин	0,82 [0,63; 1,05] *■	0,97 [0,74; 1,85] ■	0,90 [0,63; 1,42] ■	0,16 [0,11; 0,28] ■	2,88 [2,18; 4,34] *■
Карнитин + L-NAME, 25	4,78 [4,45; 9,82]	3,59 [2,07; 4,61] *	3,00 [1,76; 4,43] *	0,67 [0,30; 0,85] *	11,76 [8,96; 19,71] *

Примечание:

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

■ – статистически значимые отличия от группы карнитина ($p < 0,05$)

Карнитин изолированно и в сочетаниях с регуляторами синтеза оксида азота в участке ткани миокарда демонстрирует тенденцию статистически значимого устойчивого снижения $S_{\text{ОМБ}}$ по отношению к контролю.

Аминокислотные остатки нейтрального характера карнитин-зависимых животных и $S_{\text{ОМБ}}$ имеют статистически значимые отличия от контроля. Общеизвестно, что карнитин обладает значительными антиоксидантными эффектами в ус-

ловиях стресса, выступая в качестве протектора от окислительных повреждений тканей. Сочетанное введение препаратов – активаторов синтеза оксида азота ведет к статистически значимому снижению относительно контроля показателей $S_{\text{ОМБ}}$ и $S_{\text{АДНФГ}_{\text{uv}}}$ (табл. 2). Возможно, одной из причин может быть переизбыток синтезированного посредством аргинина и карнитина оксида азота.

Все показатели группы животных, принимающих на фоне карнитина L-NAME,

отмечали незначительное снижение результатов относительно не только контроля, но и

карнитина, что может являться признаком частичной разблокировки NO-синтаз.

Таблица 2

Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и их компонентов в миокарде (у.е./г белка)

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

Примечание:

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

■ – статистически значимые отличия от группы карнитина (p<0,05)

Участок скелетной мускулатуры экспериментального животного с введением изолированного карнитина (табл. 3) характеризуется статистически значимым снижением относительно контроля общей площади и S АДНФГ_{uv}. Экспериментальная группа с сочетанным введением карнитина и аргинина поддерживает тенденцию к снижению относительно контроля. Возможно, в данном случае нужно рас-

сматривать NO как цитотоксический фактор, индуцирующий апоптоз. Сочетанная группа препаратов карнитина и L-NAME, 25 мг/кг демонстрирует снижение относительно контроля у показателей общей ОМБ и S АДНФГ_{uv}; причиной повышения относительно группы с введением карнитина, является, вероятно, истощение субстрата у группы с применением изолированного препарата.

Таблица 3

Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и их компонентов в скелетной мускулатуре (у.е./г белка)

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

Примечание:

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

■ – статистически значимые отличия от группы карнитина (p<0,05)

Показатели активностей катепсинов В, L, Н группы карнитина изолированно и в сочетании с модуляторами синтеза азота в сосуде характеризуются динамикой снижения показателей относительно контроля; статистически значимых изменений группа №1 в участке аорты не демонстрирует.

Преобладание результатов активностей протеиназ сочетанной группы стимуляции синтеза азота над группой с блоком NO-синтазы (рис.1), возможно объясняется активацией цитопротективных

свойств cNOS по механизму обратной связи. Статистически значимые снижения показателей у карнитин-принимавших животных на фоне аргинина относительно группы изолированного применения препарата отмечались у общей активности протеиназы Н за счет СА. Экспериментальная группа карнитин + L-NAME повсеместно демонстрирует статистически значимое снижение относительно группы с применением только карнитина, вероятнее всего проявляется эффект ингибитора NO-синтазы.

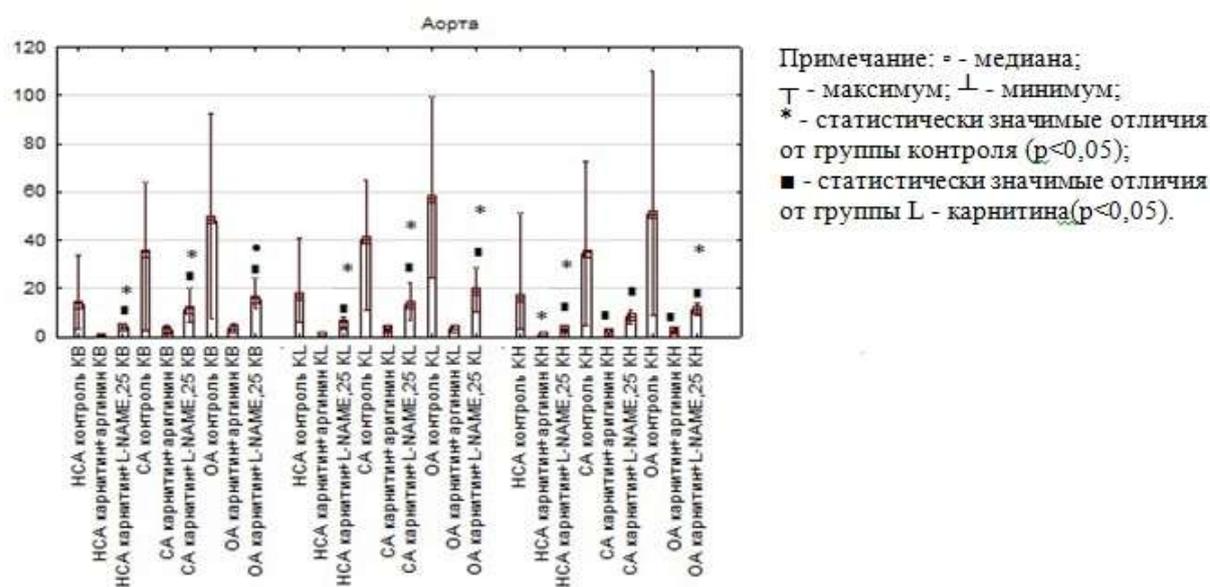
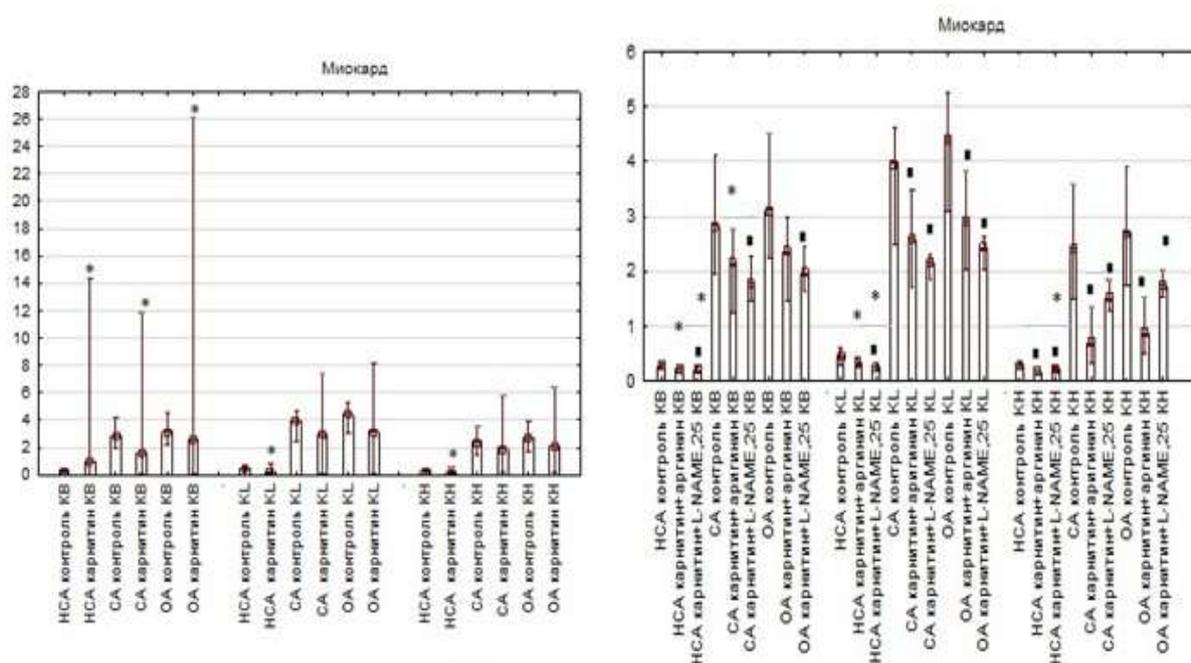


Рис. 1. Влияние применения карнитина с регуляторами синтеза азота на активность и распределение катепсинов В, L, Н в аорте, нмоль/с*г белка

Значительный статистически значимый рост ОА ферментов в миокарде (рис. 2) происходит за счет обеих фракций у группы изолированного карнитина. Статистически значимое нарастание цитозольной фракции у катепсинов L и Н говорит о повышении проницаемости лизосомальной мембраны для фермента. Характеризуя тенденцию изменений в сочетанных группах карнитина (рис.2), отмечается снижение показателей относительно контроля, что статистически значимо отражено в показателях – группы №2 и №3. Статистически значимое снижение результатов относительно примене-

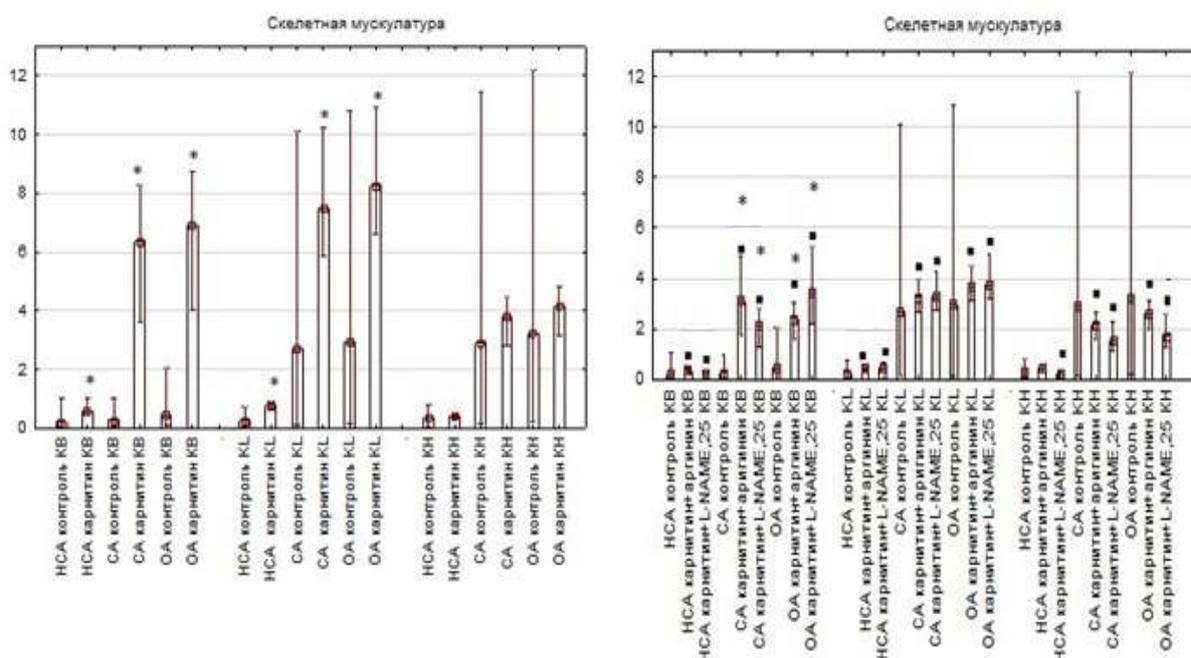
ния карнитина отмечено в группах с использованием аргинина и в группе с L-NAME (у всех ферментов).

В скелетной мускулатуре под влиянием карнитина наблюдается статистически значимый рост ОА ферментов В и L, происходящий за счет обеих фракций, с преобладанием СА над HSA (рис. 3). Существуют исследования об активации карнитином iNO-синтазы [8], обладающей цитотоксическим эффектом, хотя не исключены и другие возможные механизмы, которые могут включать изменение апоптоза вследствие активации лизосомальных протеиназ.



Примечание: ▬ - медиана; ⊤ - максимум; ⊥ - минимум; * - статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы L - карнитина ($p < 0,05$)

Рис. 2. Влияние изолированного и сочетанного применения карнитина на активность и распределение катепсинов В, L, Н в миокарде, нмоль/с*г белка



Примечание: ▬ - медиана; ⊤ - максимум; ⊥ - минимум; * - статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$); ■ - статистически значимые отличия от группы L - карнитина ($p < 0,05$)

Рис. 3. Влияние изолированного и сочетанного применения карнитина с регуляторами синтеза азота на активность и распределение катепсинов В, L, Н в скелетной мускулатуре, нмоль/с*г белка

Статистически значимый рост показателей общей активности в группе сочетанного введения регуляторов синтеза азота у катепсина В совмещен со статистически значимым увеличением лизосомальной фракции. Статистически значимые отличия от изолированного введения карнитина наблюдаются повсеместно у протеиназы В, L и H в группе №2 (исключение НСА у протеиназы H) и №3.

Анализируя процессы спонтанной ОМБ в аорте и их влияние на активность изучаемых ферментов, отмечается статистически значимая сильная корреляционная связь между изменением S ОМБ и: НСА катепсина H в группе с использованием карнитина (обратная); НСА катепсина L в группе с применением карнитина и L-NAME (прямая).

Помимо указанных показателей отмечается высокая обратная статистически не значимая корреляция в группе с использованием карнитина между S ОМБ и ОА катепсина В, а также НСА протеиназы L.

Миокард характеризуется высокой степенью статистически не значимой корреляции с S ОМБ и: группой изолированного введения карнитина – отмечается прямая связь у НСА катепсина H, а карнитин в сочетании с ингибитором синтеза оксида азота характеризуется обратной связью цитозольной фракции катепсина H.

В скелетной мускулатуре присутствуют высокие корреляции не отмечен-

ные статистической значимостью между общей площадью ОМБ и: карнитин-зависимая группа отмечает обратную корреляционную связь у лизосомальной фракции и общей активности катепсина L; применение карнитина и аргинина отмечено так же отрицательной обратной корреляцией у показателя ОА протеиназы H; карнитин в сочетании с ингибитором синтеза оксида азота демонстрирует изменения у катепсина В – отрицательная корреляционная связь в цитозольной фракции и общей активности фермента.

Выводы

1. Обратная статистически значимая сильная корреляционная связь между общей площадью модифицированных белков и неседиментируемой активностью катепсина H выявлена в участке аорты под действием изолированного карнитина в дозе 300 мг/кг.

2. В результате воздействия L-NAME в дозе 25 мг/кг, на фоне использования карнитина 300 мг/кг отмечается прямая статистически значимая сильная корреляционная связь между изменением общей площади модифицированных белков и неседиментируемой активностью катепсина L в аорте.

3. В миокарде и скелетной мускулатуре высокая степень обнаруженных корреляций статистически не значима.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность и аутопроцессинг катепсина в иммунокомпетентных органах крыс в условиях *in vitro* // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2014. №1. С. 53-59.
2. Ильичева А.С., Фомина М.А. Состояние окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии //

Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2015. №. 1. С. 45-51.

3. Дорохина Л.В., Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы // Вестні НАН РБ. Сер. біял. нав. 2000. №. 4. С. 87-90.
4. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L // Methods in enzymology. 1981. Vol. 80. P. 535-561.

5. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.С. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии. 1995. Т. 41, №. 1. С. 24-26.
6. Пат. 2524667 РФ. МПК G01N 33/52. Способ комплексной оценки содержания продуктов ОМБ в тканях и биологических жидкостях / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина, Н.В. Фомина, А.А. Терентьев; Ряз гос. мед. ун-т им. акад. И.П. Павлова. – 2013102618/15; заявл. 21.01.2013; опубл.27.07.2014, Бюл. № 21. 8 с.
7. Ковалева О.В., Шитова М.С., Зборовская И.Б. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? // Клиническая онкогематология. 2014. №2. С. 103-113.
3. Dorohina LV, Zinchuk VV. Prooksidantno-antioksidantnoe ravnovesie u krys pri gipotermii v usloviyah korrekcii L-arginin-NO sistemy [Prooxidant-antioxidant balance in rats under hypothermia in conditions of correction of L-arginine-NO system]. *Vesci HAH RB. Ser. biyal. nav. [Bulletin of the NAN of Belarus. Ser. Bal. NAV.]*. 2000; 4: 87-90. (in Russian)
4. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods in enzymology*. 1981; 80: 535-561.
5. Dubinina EE, Burmistrov SO, Moves DA, Porotov IS. Okislitel'naya modifikaciya belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniya [Oxidative modification of proteins of human serum, the method of its determination]. *Voprosy medicinskoj himii [Questions of medical chemistry]*. 1995; 41(1): 24-26. (in Russian)

References

1. Abalenihiina YuV, Fomina MA. Vliyanie modulyatorov sinteza oksida azota na aktivnost' i autoprocessing katepsina v immunokompetentnyh organov krys v usloviyah in vitro [The effect of modulators of nitric oxide synthesis and on the activity of cathepsin autoprocessing in immune organs of rats in vitro]. *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium) [Science of the young (Eruditio Juvenium)]*. 2014; 1: 53-59. (in Russian)
2. Il'icheva AS, Fomina MA. Sostoyanie okislitel'nogo karbonilirovaniya belkov myshechnyh tkanej pri vyrazhennoj gipergomocisteinemii [Oxidative carbonylative proteins of muscle tissue during severe hyperhomocysteinemia]. *Rossiiskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2015; 1: 45-51. (in Russian)
6. Fomina MA, Abalenihiina YuV, Fomina NV, Terent'ev AA. *Sposob kompleksnoj ocenki sodержaniya produktov OMB v tkanyah i biologicheskikh zhidkostyah [Method of complex assessment of the content of POM products in tissues and biological fluids]*. Pat. 2524667 RF. МПК G01N 33/52. (in Russian)
7. Guzel NA, Orer EG, Bircan SF, Cevher CS. Effects of acute L-carnitine supplementation on nitric oxide production and oxidative stress after exhaustive exercise in young soccer players. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. 2015.
8. Kovaleva OV, Shitova MS, Zborovskaya IB. Autofagiya: kletochnaya gibel' ili sposob vyzhivaniya? [Autophagy: cell death or survival strategy?]. *Klinicheskaya onkogematologiya [Clinical Oncohematology]*. 2014; 2: 103-113.

Арапова А.И. – заочный аспирант кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

E-mail: asiaarapova@mail.ru

Фомина М.А. – к.м.н., доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

E-mail: marya.fom@yandex.ru