

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

*На правах рукописи*

**ИЛЬИЧЕВА Анна Сергеевна**

**Влияние гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию  
белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей**

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
кандидат медицинских наук,  
доцент  
Фомина Мария Алексеевна

Рязань – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b>	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	6
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	12
1.1. Гипергомоцистеинемия как фактор, провоцирующий развитие оксидативного стресса и сердечно – сосудистой патологии	12
1.1.1. Общие представления об оксидативном стрессе	12
1.1.2. Окислительное повреждение белков как возможный фактор формирования сердечно – сосудистой патологии	15
1.1.3. Гипергомоцистеинемия: современные представления о механизмах формирования и повреждающего действия	19
1.2. Некоторые аспекты влияния L – аргинина и карнитина на развитие оксидативного стресса	25
1.2.1. L – Аргинин как регулятор метаболических процессов	25
1.2.2. Влияние карнитина на метаболические процессы в организме	29
1.3. Лизосомальный цистеиновый протеолиз	32
1.3.1. Понятие о цистеиновых протеазах и их роль в развитии оксидативного стресса	32
1.3.2. Структура и классификация катепсинов	33
1.3.3. Регуляция лизосомального цистеинового протеолиза	35
1.3.4. Физиологическая роль катепсинов	36
1.3.5. Взаимосвязь протеолиза и окислительной модификации белков	40
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	43
2.1. Экспериментальные модели и схемы введения препаратов	43
2.2. Методы получения биологического материала	45

2.3. Метод определения концентрации гомоцистеина в сыворотке крови	46
2.4. Метод определения содержания белка в тканях животных	46
2.5. Определение общей активности кислой фосфатазы в тканях	47
2.6. Определение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ (катепсинов L, H)	47
2.7. Оценка активности коэффициента лабильности катепсинов L, H и кислой фосфатазы	48
2.8. Метод оценки окислительной модификации белков в тканях	49
2.9. Способ оценки долей первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса	52
2.10. Способ оценки резервно-адаптационного потенциала (РАП)	52
2.11. Статистическая обработка данных	53
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b>	54
3.1. Характеристика экспериментальных моделей	54
3.2. Характеристика состояния окислительной модификации белков мышечных тканей	55
3.2.1. Окислительная модификация белков при умеренной гипергомоцистеинемии	55
3.2.2. Окислительная модификация белков при выраженной гипергомоцистеинемии	65
3.3. Влияние L-аргинина и карнитина на окислительную модификацию белков при выраженной гипергомоцистеинемии	72

3.3.1. Влияние L-аргинина на окислительную модификацию белков при выраженной гипергомоцистеинемии	72
3.3.2. Влияние карнитина на окислительную модификацию белков при выраженной гипергомоцистеинемии	78
3.4. Характеристика лизосомального цистеинового протеолиза мышечных тканей	84
3.4.1. Лизосомальный цистеиновый протеолиз при умеренной гипергомоцистеинемии	85
3.4.2. Лизосомальный цистеиновый протеолиз при выраженной гипергомоцистеинемии	93
4. Влияние L –аргинина и карнитина на лизосомальный цистеиновый протеолиз при выраженной гипергомоцистеинемии.	96
4.1. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ миокарда при введении L – аргинина	97
4.2. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ миокарда при введении карнитина	102
5. Анализ корреляционных связей выраженности окислительной модификации белков и активности катепсинов L и H	108
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	116
<b>ВЫВОДЫ</b>	120
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	121

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

ДНФГ-динитрофенилгидразоны

eNOS – эндотелиальная NO-синтаза

КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны

МДА – малоновый диальдегид

НСА-неседиментируемая активность

ОА-общая активность

ОМБ – окислительная модификация белков

ОС-окислительный (оксидативный) стресс

ПОЛ-перекисное окисление липидов

РАП-резервно-адаптационный потенциал

СА- седиментируемая активность

ADMA – ассиметричный N,N-диметиларгинин

CBS -цистатинин- $\beta$ -синтетаза

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

MTGFR- метилентетрагидрофолатредуктаза

4– HNE – 4-гидрокси-2-ноненаль

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

На сегодняшний день активно ведутся работы по изучению одного из метаболических факторов – гомоцистеина- и его роли в патогенезе сердечно – сосудистых [3,5,23,74,102], ревматологических и неврологических заболеваний [8], репродуктивной недостаточности [115], метаболического синдрома [71], сахарного диабета [109]. Установлена связь между высоким уровнем гомоцистеина и возникновением инфаркта миокарда [15,70], хронической артериальной недостаточностью атеросклеротического происхождения [24, 66], тромботическими осложнениями во время беременности [21,25], патологией почек [26,27,62], эпилепсии [118], аутоимунных [108] и миелопролиферативных заболеваний [22]. Гипергомоцистеинемия выявляется у 2-10% населения стран Европы и США и у 10-50% населения Российской Федерации [50]. В качестве причин гипергомоцистеинемии указываются генетические аномалии, пищевой дефицит витаминов группы В, в том, числе фолиевой кислоты и заболевания, ведущие к снижению уровня фолатов в организме [129,183], а также избыточное поступление метионина извне [141]. Повышенная концентрация гомоцистеина в сыворотке крови была установлена в качестве одного из провокаторов избыточной продукции свободных радикалов и, как следствие, развития оксидативного стресса (ОС) [132,199]. В результате увеличивается вероятность повреждения различных тканей и органов свободными радикалами. В настоящее время известно, что в мышечных тканях развитие окислительного стресса приводит к интенсивному окислению миоглобина, снижению связывания ионов  $Ca^{2+}$  с тропонином, повышенному взаимодействию с другими сократительными белками и нарушению сократительной способности [118,182,194,229]. При этом, окислительная модификация белков (ОМБ) считается одним из наиболее ранних и стабильных проявлений поражения различных тканей организма при свободно-радикальной патологии, коррелирующим с ингибированием ферментативной, транспортной, рецепторной функциями белков [86,95,124,149]. Показателем окислительной модификации белков являются их карбонильные производные –

необратимый продукт окислительного стресса [86,241], которые легко обнаруживаются и регистрируются в достаточно большом количестве [95]. Аккумулированные и фрагментированные белковые молекулы имеют токсические свойства, что может приводить к разрушению структур клеток.

Одним из важнейших путей выведения и удаления модифицированных белков является протеолиз [30,86], недостаточность которого ведет к их накоплению в клетке и внеклеточном пространстве. Протеазы, специфичные к модифицированным белкам вызывают большой интерес у современных ученых. В этом аспекте наиболее интересными кандидатами могут оказаться лизосомальные цистеиновые протеиназы (катепсины) в силу их способности секретироваться во внеклеточное пространство, взаимодействовать с различными белками, в том числе и окисленными [112].

На сегодняшний день, основой терапии гипергомоцистеинемии являются фолиевая кислота и ее производные, витамины В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, т. к их роль заложена в патогенезе данного состояния [6,47,83,129,185]. В то же время, снижение эффекта воздействия повышенных концентраций гомоцистеина может быть достигнуто благодаря опосредованному влиянию на окислительный стресс и/или протеолиз. В частности, интерес вызывают эффекты аргинина [97,125] и карнитина [75,131]. Так, L-аргинин обладает способностью регулировать иммунные, метаболические процессы, продуцировать оксид азота [33], а для карнитина характерно снижение дефицита энергии, ингибирование синтеза церамидов и активности каспаз, участвующих совместно с катепсинами в апоптозе клетки [54,204,246].

В связи с вышеизложенным, актуальным является изучение влияния гипергомоцистеинемии и корректирующего действия аргинина и карнитина на активность лизосомального цистеинового протеолиза и окислительную модификацию белков мышечных тканей.

#### **Цели и задачи исследования:**

**Целью** настоящей работы являлась сравнительная оценка состояния окислительного карбонилирования белков и системы лизосомального цистеинового протеолиза мышечных тканей при гипергомоцистеинемии

различной степени выраженности, а также исследование влияния карнитина и аргинина на выявленные изменения.

#### **Задачи исследования:**

1. Провести комплексную оценку содержания продуктов окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности, в том числе на фоне введения карнитина и аргинина.
2. Описать состояние активности лизосомальных цистеиновых протеиназ (катепсинов L и H) мышечных тканей в изучаемых экспериментальных моделях.
3. Оценить изменения проницаемости лизосомальной мембраны при изучаемых состояниях.
4. Проанализировать взаимосвязь состояния окислительного карбонилирования белков и лизосомального цистеинового протеолиза

#### **Научная новизна**

Впервые произведена комплексная оценка содержания карбонилированных производных белков в мышечных тканях при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности и при введении на этом фоне карнитина и аргинина. Впервые описано состояние активности лизосомальных цистеиновых протеиназ мышечных тканей при изучаемых состояниях. Выявлено усиление активности системы лизосомального цистеинового протеолиза, сопровождающееся дестабилизацией мембран лизосом в скелетной мышце и миокарде при умеренной, в сердечной и гладкомышечной мускулатуре при выраженной гипергомоцистеинемии.

#### **Теоретическая значимость**

Работа носит преимущественно фундаментальный характер: обнаруженные изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ, а также продукции окислительно-модифицированных белков в мышечных тканях при экспериментально смоделированной гипергомоцистеинемии дополняют



представления о механизмах формирования оксидативного стресса, лежащего в основе различных острых и хронических заболеваний.

### **Практическая значимость работы**

Снижение интенсивности процессов окислительной модификации белков в гладкомышечной ткани грудной аорты и скелетной мышцы под влиянием аргинина и карнитина, а также уменьшение активности катепсинов L, H, снижение проницаемости лизосомальных мембран грудной аорты и миокарда, может позволить использовать данные вещества для коррекции негативных последствий окислительного стресса или его профилактики в мышечных тканях.

### **Достоверность полученных результатов**

Достоверность экспериментальных данных обусловлена применением современных средств и методик проведения исследований. Теоретические данные основываются на известных результатах фундаментальных и прикладных дисциплин, связанных с предметом исследования диссертации.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При гипергомоцистеинемии различной степени выраженности возрастает интенсивность процессов окислительной модификации белков в сердечной, скелетной и гладкой мускулатуре. Применение аргинина и карнитина при выраженной гипергомоцистеинемии снижают степень карбонилирования белков.

2. Гипергомоцистеинемия провоцирует нарастание активности катепсинов L и H в мышечных тканях, в ряде случаев, сопровождающаяся изменением соотношения активности указанных ферментов между цитоплазматической и лизосомальной фракциями. Введение аргинина и карнитина приводит к существенной коррекции указанных изменений в миокарде, с одновременным выраженным нарастанием активности катепсина H в грудной аорте.

Умеренная гипергомоцистеинемия приводит к дестабилизации мембран лизосом в сердечной и скелетной мышцах, выраженная гипергомоцистеинемия –

в миокарде и грудной аорте. При этом аргинин и карнитин демонстрируют способность стабилизировать лизосомальные мембраны.

3. В ряде изучаемых моделей экспериментальных моделей обнаружены прямые корреляционные связи между окислительной модификацией белков и активностью лизосомальных цистеиновых протеиназ.

### **Апробация работы**

Результаты исследования доложены на: международной научно-практической конференции «Медицинские науки: прошлое, настоящее, будущее» (Уфа, 2014); X юбилейной международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Пицунда, Абхазия, 2014); Российской научно-практической конференции «Зубаировские чтения: Новое в коагулологии. Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015); Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2016); Международной научно-практической конференции «Актуальные процессы формирования науки в новых условиях» (Москва, 2016); IX международной конференции «Дисфункция эндотелия. Эндотелиальные и клинические исследования» (Витебск, Беларусь 2016).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

### **Личный вклад соискателя**

Все результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Постановка задач, оценка полученных результатов проводились совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения,

заклучения и выводов. Список литературы содержит 275 источника, из них 137 российских и 138 зарубежных. Объем работы составляет 150 страниц машинописного текста, содержит 65 рисунков и 32 таблиц.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Гипергомоцистеинемия, как фактор, провоцирующий развитие оксидативного стресса и сердечно – сосудистой патологии**

#### **1.1.1. Общие представления об оксидативном стрессе**

Одной из наиболее значимых особенностей острых и хронических заболеваний, процессов старения выступает оксидативный/нитрозативный стресс [64,121,219], развивающийся в условиях увеличения активных форм кислорода/азота (АФК/АФА), впоследствии приводящего к снижению антиоксидантной защиты клетки, имеющую многоуровневую систему [58,134]. Последняя выражается в наличии низкомолекулярных внутри- и внеклеточных антиоксидантов, степени активности таких ферментов, как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза [16,58]. Кроме того, большую роль играют экзогенные антиоксиданты [59,137,212,213]. Процессы свободно-радикального окисления стимулируют и пролонгируют различные патологические состояния и заболевания [61]. Повышенная концентрация окисленных макромолекул, особенно при длительной персистенции в организме, формирует различные патологические процессы, сопровождающиеся повышенным катаболизмом. Глобальным последствием ОС является повреждение структуры нуклеиновых кислот [237], липидов, белков, нарушения синтеза простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов [41,42,43], что является мощным толчком к провокации множества клеточных ответов.

ОС лежит в основе этиопатогенеза атеросклероза, сердечной, почечной недостаточности [7,90,114,137,226], гипертонической болезни [111,124], кардиопатий [60,61,63,72,253], офтальмологических и нейродегенеративных заболеваний [34,59,71], сахарного диабета [61,88], болезней органов дыхания [19,82,84,105,270], а также является следствием фармакотерапии [60]. Во всех случаях имеет место генерация вторичных АФК/АФА, которые стимулируют развитие некроза или апоптоза клеток [98,114]. Патологические процессы, возникающие в результате повреждающего действия свободных радикалов, могут носить ярко выраженный характер в результате перекисного окисления липидов

(ПОЛ), приводящего к изменению свойств биологических мембран [30,99,149], усилению повреждения клетки, образованию таких продуктов, как малоновый диальдегид (МДА), 4-гидрокси-2-ноненаль (4- HNE), 2-акролеин, изофосфат [87,149,168,220]. Реакция ПОЛ запускается в результате воздействия первичного свободного радикала. Метиленовая группа ненасыщенных жирных кислот теряет атом водорода, после чего кислород попадает в ловушку липидного радикала, образуя  $ROO^{\bullet}$ , которые способны соединяться друг с другом и повреждать мембранные белки, продолжая отбирать атом водорода от боковых цепей жирных кислот, расположенных по соседству, тем самым распространяя цепную реакцию [87]. Эти процессы могут протекать до того момента, пока есть кислород и ненасыщенные жирные кислоты [16]. В реакциях ПОЛ имеет место расщепление углеродных связей, в результате чего МДА [30,72,149], способный взаимодействовать с тиоловыми группами белков, сшивать аминокислоты и липиды, что приводит к образованию агрегированных протеиновых молекул, хромолипидов, 4-HNE [34,149]. Вторичные продукты ПОЛ, а именно, гидроперекиси липидов, являются довольно стабильными соединениями, но под действием ряда факторов могут претерпевать дальнейшее окисление, таким образом, инициируя новые процессы ПОЛ [42,43,72,87].

Дыхательная цепь митохондрий является главным поставщиком свободных радикалов [30,90], которые инициируют перекисное окисление в цитоплазматическом ретикулуме. При этом, увеличивается проницаемость мембран клетки для кальция, в результате усиливается повреждение митохондрий [174]. Постоянное действие свободных радикалов оказывает цитотоксический эффект, ведущий за собой появление и прогрессирование различных патологий [87,122,126,137,144]. В аэробных механизмах имеется система защиты против действия активных кислородных радикалов [59,87], выражающаяся в поддержании равновесия между продукцией свободных радикалов и антиоксидантов. При разбалансировании этой системы и возникает ОС [30].

К активным формам кислорода относят  $O_2^-$ ,  $HO_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ . Эти свободные радикалы многоэтапно восстанавливаются из молекулярного кислорода и

являются не стабильными молекулами [41,42,43]. Молекулярный кислород достаточно стабилен, так как на внешней орбите имеет два электрона с антипараллельными спинами. Наряду с тем, что кислород участвует в синтезе АТФ в процессах окислительного фосфорилирования, он является еще и токсичным, вследствие появления активных форм кислорода, инициирующих и стимулирующих свободнорадикальные реакции [41,42,43,58,87]. АФК мгновенно реагируют с нуклеиновыми кислотами, белками, углеводами, липидами и являются медиаторами повреждения клетки [60,61,72]. Помимо этого, ряд авторов относят окисленные молекулы к биологически стареющим формам [117,138,139,149].

Оксид азота, несущий функции расслабления гладких мышц сосудов, дезагрегации тромбоцитов, регуляции секреторной, репродуктивной систем организма, определяет образование АФА [121,134,188]. Вызывая вазодилатацию, оксид азота параллельно стимулирует продукцию митохондриями АФА, влияние которых оказывает окислительное воздействие на фосфолипиды мембран, что приводит к нарушению целостности клеток [30]. Процесс взаимодействия NO с кислородным радикалом, ведет к образованию пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), обладающего способностями нитровать белки [65]. В результате этого, нарушается энергетическая функция митохондрий [10,67,68,90,166,255], впоследствии приводящая к нарушению функционирования различных органов [172,262]. По данным L. Jin et al. (2007), формирование пероксинитрита наблюдается при повышении концентрации гомоцистеина в сыворотке крови.

Но, не надо забывать и о полезных свойствах свободных радикалов. Например, имеются данные о их роли вторичных мессенджеров в поддержании стабильности биологических мембран, регуляции активности протеинкиназ, влиянии на процессы фосфорилирования белков, транскрипции, апоптоза [30,59,87,198,274,275].

Само определение «оксидативный стресс» необходимо связывать с нарушением баланса, подразумевающего помимо повышенной выработки свободных радикалов еще и, подавление работы антиоксидантных систем

[18,59,60,87,137,144,274]. Конечно, нельзя не учитывать тот момент, что в разных тканях и органах, активность систем выработки и утилизации свободных радикалов различная. Например, в тех тканях, где отмечается повышенный метаболизм кислорода, имеет место повышенная выработка АФК наряду с повышенной активностью «антирадикальных» систем и жирорастворимых антиоксидантов [116,257]. К примеру, при повышенной выработке нейтрофилами АФК, для выполнения защитной «киллерной» функции, усиливается экспрессия супероксиддисмутазы, восстановленного глутатиона [59]. Таким образом, регуляторная функция АФК/АФА имеет определенное патофизиологическое значение [43,58,134] и должна определяться сбалансированностью систем их генерации и утилизации [59,76,89].

### **1.1.2. Окислительное повреждение белков как возможный фактор формирования сердечно – сосудистой патологии**

В окислительном повреждении белков важные роли принадлежат оксиду азота, гипохлориту, супероксидрадикалу, пероксинитриту [86,273]. В процесс окислительного изменения белков вовлекаются гистидин, метионин, цистеин, триптофан, аргинин, пролин, которые легко окисляются под действием АФК/АФА [95,149]. В результате этого воздействия сульфгидрильные группы в метионине и цистеине заменяются на дисульфидные и сульфоновые [42,86,95,149,153]. Причем, это обратимый процесс, зависящий от потенциала энергии и восстановленных форм глутатиона и тиоредоксина в клетке [198]. По мнению ряда авторов [229,234,237,240,242,250], ОМБ могут вызвать множество реакционно способных изменений, таких как радикальные продукты  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{R}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{RS}^\bullet$ ,  $\text{ROS}^\bullet$ ,  $\text{RSOO}^\bullet$ ,  $\text{RSSR}^{\bullet-}$ , нерадикальные кислородсодержащие вещества  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ROOH}$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{O}=\text{NOCO}_2$ ,  $\text{O}_2\text{NOCO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^+$ , а также МДА и 4 – HNE [87, 144]. Окислительное изменение белков можно разделить по трем механизмам [41,43]:

- изменение белков под действием ионизирующей радиации;
- изменение белков под действием АФК, образуемых в ходе химических реакций;

- изменение белков под действием металлзависимого окисления.

Окислительное повреждение белков может развиваться по нескольким механизмам: фрагментация пептидной основы с модификацией боковой цепи каждой аминокислоты и перекрестные сшивки [221]. В большинстве случаев эти изменения необратимы, могут варьировать в достаточно широких пределах. Эти вариации коррелируют с ингибированием ферментативной, транспортной, рецепторной функциями белков [86,149].

Имеются данные о нарушении нативной структуры белковой молекулы с образованием агрегированных конгломератов или фрагментированных частиц [34,171,235]. Агрегирование белков, в основном, связано с влиянием гидроксильного радикала [171]; если же есть влияние последнего в тандеме с супероксиданионом, то протекают процессы фрагментации белковых молекул, которые также могут вызвать липидные радикалы [72,235]. В процессе формирования агрегированных белковых молекул можно выделить следующие этапы [171,235]:

- нарушение нативной конформации белкового домена в результате свободно - радикального воздействия;

- увеличение количества гидрофобных остатков;
- формирование конгломератов;

В настоящее время выделяют несколько механизмов окислительной модификации белков [206,207]:

- связывание аминокислотных остатков гистидина, цистеина, лизина в белках с липидными пероксидами;
- образование карбонильных производных, дисульфидов Cys-S-S-Cys, цистеинсульфеновой (SO), цистеинсульфиновой (SO<sub>2</sub>), цистеинсульфоновой (SO<sub>3</sub>) кислот, а также метионин сульфоксида (MetSO);
- гликирование и гликоксидация остатков лизина, аспарагина.

Некоторые авторы [30,172,244] также указывают на способность окислительно-модифицированных углеводов и липидов ковалентно связываться с функциональными группами окислительно неизмененных белков.



Как уже указывалось выше, окислительно-модифицированные белки способствуют вторичному повреждению биомолекул [171,235,250,273]. Окисленные протеины катаболизируются лизосомами, но некоторые из них, особенно агрегированные формы, способны накапливаться в клеточных компартментах и даже внеклеточно, подавляя функцию протеасом [171,235]. В результате уменьшение протеолиза сопровождается одновременным накоплением окислительно - поврежденных белков [206,234,239,242].

Некоторые исследователи считают карбонильные производные белков достаточно стабильными продуктами [153,236], а другие утверждают, что карбонилированные белковые продукты менее стабильны и, следовательно, подвержены быстрой дегенерации [241]. Однако, все они сходятся во мнении, что такие белки более восприимчивы к протеолизу.

Карбонилированные белки в тандеме с аддуктами Михаэля образуются благодаря участию пролиновых, аргининовых, треониновых, лизиновых остатков в комплексе с продуктами ПОЛ при участии цистеина и гистидина [86]. Процессы карбонилирования белковых молекул могут происходить в результате гликирования лизина и при металл – индуцированном окислении белков [73,86].

В ряде работ описано [225,230] что предшественниками формирования карбонильных производных являются метионин-сульфоксидные производные белков, механизм восстановления которых регулируется метионин-сульфоксид-редуктазной системой (Mrs) благодаря метионинсульфоксидредуктазе А (MsrA). В опытах на мышах, при «выключении» данного фермента, по сравнению с контрольной группой показано, что, в организме животных-мутантов накапливалось большее количество карбонилированных белков, а также у них повышалась чувствительность к окислительному стрессу, что влекло за собой уменьшение продолжительности жизни [225].

Актуальным последствием ОМБ [168], является инактивация транспортных ферментов, например,  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{АТФ}$ -азы, фермента, отвечающего за перенос глюкозы; подавление шаперона Hsp90, протеин-дисульфидизомеразы, контролирующей фолдинг. Эти процессы осуществляются с помощью альдегидов

путем взаимодействия с цистеиновыми и гистидиновыми остатками киназ [86,149,168].

Выведение и удаление модифицированных белков может протекать следующими способами [149,221]:

- разрушение белков с нарушенным фолдингом при участии 20 S убиквитин – независимой протеасомы, которая способна определять участки глобул с персистенцией свободных радикалов;
- с помощью протеаз.

Реакции карбонилирования белков имеют необратимый характер и играют яркую роль в прогрессировании процессов старения и заболеваний, связанных с ними – болезни Альцгеймера, Паркинсона [89,117]. Выдвинуто предположение [229], что развитие и накопление карбонилированных белков может происходить при отсутствии избыточного продуцирования АФК, в условиях антиоксидантной защиты и при нормальной протеазной активности. В этом случае карбониловый стресс будет связан с нарушением трансляции абберантных белков, а также под воздействием провоцирующих факторов, например, повышенной температуры. Карбонилирование здесь выступает в роли условия для деградации белков с нарушенным фолдингом [216,239,269], т.е., выступает в роли контролера качества фолдинга белков [86].

Возникновение карбонильного стресса возможно при накоплении промежуточных продуктов метаболизма глюкозы при сахарном диабете - глиоксаля и метилглиоксаля [61], которые в дальнейшем способны реагировать с amino- и сульфгидрильными группами аминокислот белков, что в дальнейшем приводит к изменению свойств и функций последних [40,53,85,88].

Продукты окислительного изменения белков, накапливаясь в миокарде [48], приводят к нарушению его сократительной функции за счет модификации и повреждения липидного бислоя кардиомиоцитов [180,255,269]. При ишемии-реперфузии миокарда, образующиеся модифицированные белки активируют ренин-ангиотензин-альдостероновую систему, провоспалительные цитокины и повреждают митохондриальную ДНК [34,78,255].

Активация некоторых генов, имеющих в своем составе антиоксидантные элементы, подвержена регуляции с помощью карбонилирования, т.е. активируются под воздействием оксидативного стресса: например, NF-E2-related factor 2 (Nfr2) – основной фактор транскрипции [256,270].

В современных источниках [73] приводятся данные о взаимодействии эндотелина-1 с рецепторами, в результате которого, происходит образование АФК, что в свою очередь, благодаря пероксиду и железу в реакции Фентона, способствует карбонилированию белков. В результате карбонилированные белки уничтожаются протеосомами. В роли такого белка выступает аннексин-1, который стимулирует апоптоз и ингибирует рост клетки [216,239].

Анализируя литературные данные, можно подвести итог, что повышение активности карбонилирования белков неотъемлемо связано с возрастом биологических тканей [138,139,200,206,257,259], нарушениями процессов сперматогенеза [184], онкологическими заболеваниями и сахарным диабетом [53], сепсисом [149,206,207], дерматозами [91], хронической обструктивной болезнью легких [84], заболеваниями мочевыделительной системы [57], эндотелиальной дисфункцией [13,35,37,135,202], кардиопатиями [40] и многими другими патологическими состояниями и определить карбонилирование белков, как фактор удаления, выведения поврежденных протеинов из организма [52,138,139,174,206,207,216,239,257,273].

### **1.1.3. Гипергомоцистеинемия: современные представления о механизмах формирования и повреждающего действия**

Поступающие извне или образующиеся в результате метаболизма различные соединения могут обладать высокой активностью, провоцируя не только свободнорадикальные процессы, но и, как отмечалось выше, подавлять антиоксидантную систему [59,137,144]. Такими свойствами обладает гомоцистеин [185,186,187,192].

К проблеме гипергомоцистеинемии ученые обратились в шестидесятых годах прошлого столетия, когда его димер - гомоцистин- в значительной концентрации обнаружили в моче умственно отсталых детей. Впоследствии было

установлено, что из-за недостатка цистатионин- $\beta$ -синтетазы происходит повышение уровня гомоцистеина. Первым связь между гомоцистинурией и сосудистыми нарушениями обнаружил в 1964 году J. Gibson et al. В 1969 году К. Mc-Cully установил связь между повышенными концентрациями ГЦ в крови и ранним развитием атеросклероза [8,62,215]. В конце двадцатого века проводилось огромное количество исследований с целью выявления побочных эффектов гипергомоцистеинемии у взрослых людей, таких как, атеросклероз, тромбоэмболические осложнения, цереброваскулярные заболевания, нефропатии и, как следствие, развитие хронической почечной недостаточности [8]. Нормальное содержание гомоцистеина в сыворотке крови, по мнению разных авторов, составляет от 5 до 15 мкмоль/л [26,83,62,132,205]. По мнению Г.Е. Ройтберга (2007), доля риска коронарной болезни сердца в общей популяции, связанная с гипергомоцистеинемией, составляет 10 %, а вероятность возникновения тромбоза глубоких вен увеличивается в 4 раза при нарастании концентрации гомоцистеина в сыворотке крови более 22 мкмоль/л. М.М. Одинак и др. (2008) выделяют несколько причин развития гипергомоцистеинемии:

- возраст, пол;
- образ жизни;
- системные заболевания;
- сопутствующая терапия.

Гомоцистеин является производным метионина – незаменимой аминокислоты, которая, в свою очередь, является его единственным метаболическим предшественником [62,179,192,218]. Совместно с цистеином и глутатионом, гомоцистеин относится к тиолам, играющим важную роль в метаболизме метионина и фолата [47,83,129,185]. Все тиолы принимают участие в реакциях формирования дисульфидов, протекающие в присутствии меди или кобальта [62]. Основные превращения гомоцистеина претерпевает в печени, на метаболизм в почках приходится его меньшая часть [192]. Пищевой метионин, а точнее, S-аденозил метионин, является донором метильной группы, которая используется для синтеза нуклеиновых кислот, адреналина, креатинина и других

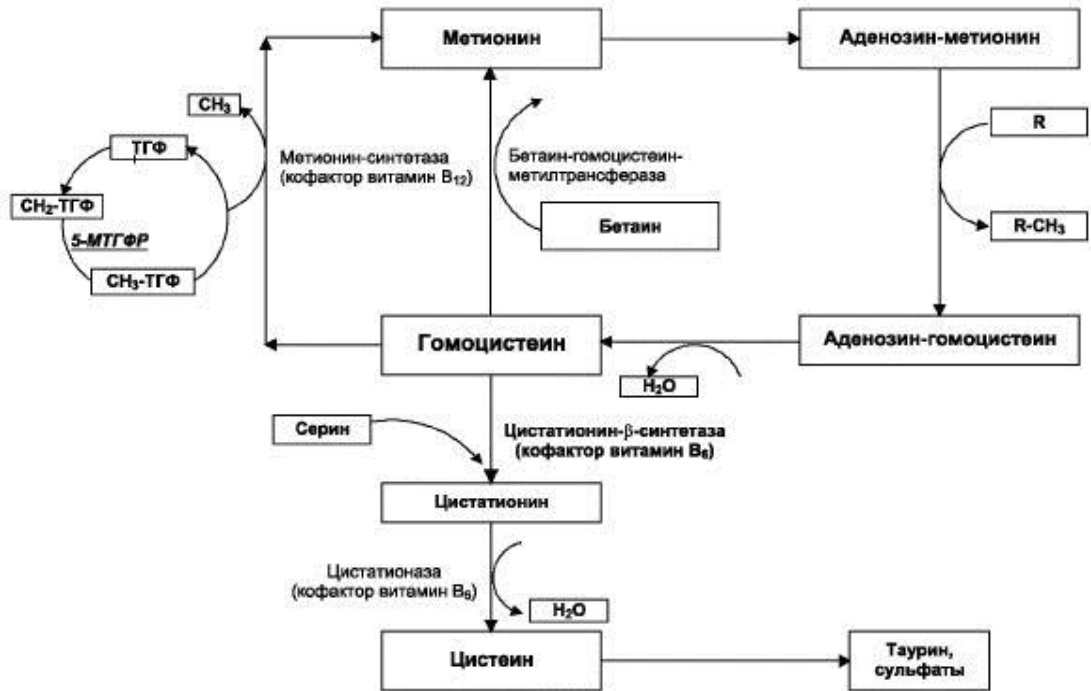
биологически активных веществ. Вследствие утраты  $\text{CH}_3$ -группы, S-аденозил метионин превращается в S-аденозил гомоцистеин и после гидролиза последнего, образуется гомоцистеин, обладающий цитотоксичными свойствами (рис.1). Поддержание его на низком уровне регулируется реметилизацией до метионина и транссульфированием до цистеина [8,32,62,77,132].

Реметилирование гомоцистеина может происходить по следующим направлениям [77]. В первом случае активная форма фолиевой кислоты 5-метилентетрагидрофолат (5-МТГФ) является донором метильной группы. Катализирует превращение метионин-синтетаза, коферментом которой является витамин В12. Данный путь реметилирования протекает во всех тканях организма [62,77,129,152].

Во втором случае донором метильной группы является бетаин, а переход гомоцистеина в метионин катализирует бетаин-гомоцистеин-метил-трансфераза. Эта реакция протекает в печени и почках [8,62,77,129].

Транссульфирование до цистеина характерно для большинства тканей организма кроме головного мозга [62] и осуществляется цистатионин- $\beta$ -синтетазой, вследствие чего гомоцистеин и серин превращается в цистатионин. Последний гидролизуется цистатионазой с образованием цистеина и  $\alpha$ -кетобутирата. Коферментом в обеих реакциях выступает витамин В6. В дальнейшем цистеин с помощью реакции окисления превращается в таурин и органические сульфаты [62,77,199], которые необходимы для синтеза гепарина, гепарин-сульфата, являющиеся прямыми антикоагулянтами, а также до хондроитина сульфата [83]. При нарушении внутриклеточного метаболизма гомоцистеина, излишки последнего попадают через внеклеточное пространство в кровь и оказывают на эндотелиальные клетки токсическое воздействие [47]. Обладая прооксидантной активностью из-за наличия сульфгидрильной группы, гомоцистеин при высоких концентрациях окисляется [189,197,205,218]. Образование формы гомоцистеина, обладающей цитотоксическим эффектом, двух протонов и двух электронов происходит при окислении двух молекул гомоцистеина [62]. В результате этого образуются свободные радикалы,

представленные супероксидом кислорода и перекисью водорода [132,183,189].



*Обозначения:* Пути метаболизма гомоцистеина: ТГФ - активная форма фолиевой кислоты (тетрагидрофолат);  $\text{CH}_2\text{ТГФ}$  - метилентетрагидрофолат;  $\text{CH}_3\text{-ТГФ}$  - 5-метилтетрагидрофолат; 5-МТГФР - 5-метилентетрагидрофолат-редуктаза; R - акцептор метильной группы

Рисунок 1. Метаболизм гомоцистеина (цит. по: Лебеденкова М.В.,2006)

Свободные радикалы инициируют перекисное окисление липидов, приводящее к повреждению эндотелия, образованию окисленных липопротеидов плазмы крови [163,202], что само по себе стимулирует развитие оксидативного стресса. Помимо этого, снижается действие глутатион-пероксидазы в эндотелии сосудов [188,202], что также влияет на перекисное окисление липидов активными формами кислорода. Взаимодействие супероксида с NO приводит к образованию пероксинитрита OONO, обладающего токсичными свойствами. В случае отсутствия оксида азота с помощью супероксиддисмутазы супероксид превращается в гидроген пероксид, а далее в воду под воздействием глутатионпероксидазы или каталазы [132,212,213], что указывает на способность  $\text{H}_2\text{O}_2$  реагировать с радикалами; например, образование активного гидроксил радикала при взаимодействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  с  $\text{Fe}^{2+}$  [132]. Гомоцистеин в высоких концентрациях, приводит к дополнительному образованию активных кислородных радикалов, что ведет к развитию оксидативного стресса [8,62,132].

По мнению I. Dalle-Donne et al. (2006), изменяется степень текучести мембраны клетки, что влечет за собой инактивацию мембраносвязанных рецепторов или ферментов, что увеличивает проходимость тканей. В результате повреждающего действия гомоцистеина нарушается нормальная продукция оксида азота клетками эндотелия, снижается биологическая доступность NO и его продукция NO-синтазой, и, как следствие, происходит развитие дисбаланса системы оксида азота [39,49].

В норме оксид азота непрерывно продуцируется эндотелиальными клетками и обеспечивает такие свойства, как вазодилатацию, снижение пролиферации гладкомышечных клеток, торможение агрегации тромбоцитов [5,62,74,102]. Все эти механизмы не могут реализоваться в условиях гипергомоцистеинемии. В следствие оксидативного стресса, нарушается соотношение между простаглицином и тромбоксаном A<sub>2</sub>, синтезирующимися под действием циклооксигеназы из арахидоновой кислоты [3,17,26]. Тромбоксан A<sub>2</sub> вызывает агрегацию тромбоцитов и обладает мощным сосудосуживающим эффектом [21]. Простаглицин PGI<sub>2</sub> вызывает вазодилатацию, деагрегацию тромбоцитов и, в основном, синтезируется эндотелиальными клетками. Следовательно, при гипергомоцистеинемии, увеличивается соотношение Тромбоксан A<sub>2</sub>/ простаглицин I<sub>2</sub>, что влияет на тонус сосудов и усиливает тромбогенез [3,17,26]. Помимо прочего, гомоцистеин способен активировать дифференцировку Т-лимфоцитов и NADPH-оксидазу нейтрофилов и моноцитов, повышая их активность и аутоксичность [186,191,264].

Имеются данные [183], что гомоцистеин способен снижать активность фермента S-аденозил-гидролазы, что приводит к уменьшению содержания аденозина, снижающего тонус артериол и прекапиллярных сфинктеров, не только в плазме, но и в интерстиции почек крыс. Примерно 80% гомоцистеина в плазме связано с белком [45]. На свободный, представленный окисленной (гомоцистин, гомоцистеин-цистеин), и восстановленной (гомоцистеин) формами, приходится оставшиеся 20% [179].

Понятие «общий гомоцистеин плазмы крови» представляет сумму

концентраций восстановленной (-SH) и окисленной (-S-S-) формы аминокислоты [45]. Основную роль в токсических эффектах гипергомоцистеинемии играют окисленные формы гомоцистеина [166,181,199].

Как уже указывалось выше, гипергомоцистеинемию могут вызывать генетические аномалии (мутации в генах ферментов цистатионин- $\beta$ -синтетазы (CBS), метилентетрагидрофолатредуктазы (MTGFR), дефицит витаминов B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> и фолиевой кислоты, заболевания, ведущие к снижению уровня фолатов в организме [21,25,55,81,92]. У мужчин более высокий уровень гомоцистеина связывают с большей мышечной массой, и чаще встречающимся дефектом на генетическом уровне MTGFR [28,79,83]. MTGFR является катализатором перехода фолиевой кислоты в ее активную форму [62,92]. В литературе описано 9 мутаций гена MTGFR, расположенного в локусе 1p36.3. Самой распространенной является замещение аланина на валин (C677T), что проявляется снижением активности фермента [21,25,32,62,130]. Гомозиготная мутация CBS (частота встречаемости 1 на 300000 населения в общей популяции) наследуется по аутосомно-рецессивному типу и является наиболее частой причиной классической гомоцистинурии и тяжелой гипергомоцистеинемии [92,100,123]. При данной патологии уровень гомоцистеина претерпевает сорокократное увеличение по сравнению с нормой [21,25]. В многочисленных работах гипергомоцистеинемию рассматривают как фактор риска развития тромбоза артерий мелкого и среднего калибра [15,22], гломерулярной дисфункции и склероза [62,185,197,215], неалкогольной жировой болезни печени [31,133]. В последние годы актуальна проблема гипергомоцистеинемии в акушерской патологии, а именно: в развитии гестозов, дефектов нервной трубки у плода, плацентарной недостаточности, задержки внутриутробного развития, преждевременного прерывания беременности [9,17,96,108,110,115,127]. Обнаружена прямая корреляция повышения уровня гомоцистеина с угнетением синтеза тромбомодулина, антитромбина III, эндогенного гепарина и повышением секреции тромбоксана A<sub>2</sub>, что вызывает изменение микроциркуляции, микротромбообразование и, как следствие, нарушение маточно-плацентарного



кровообращения [17,21,25,110,187,215].

Большую роль отводят гипергомоцистеинемии в развитии осложнений сахарного диабета [24,40,102,109], когнитивных и нейродегенеративных нарушений [46], а также болезни Альцгеймера [238], при которой повышенные концентрации гомоцистеина коррелируют с церебральной атрофией и атрофией гиппокампа [118,135].

Исходя из вышеизложенного, гипергомоцистеинемия является мультифакторным процессом, в который вовлечены многие ткани и органы. В основе патогенеза развития различных патологических состояний, сопровождающихся повышенными уровнями гомоцистеина, лежат микроангиопатии, эндотелиальная дисфункция, повышенная агрегация тромбоцитов, оксидативный стресс, апоптоз [20,49,70,116,135,187,190,202,214].

## **1.2. Некоторые аспекты влияния аргинина и карнитина на развитие оксидативного стресса**

### **1.2.1. Аргинин как регулятор метаболических процессов**

Аргинин принимает участие в пластическом и энергетическом обмене [97], регулирует иммунные и метаболические процессы [11], обладает широким спектром биологических свойств и многофункциональностью [1,4,33,125]. Поддержание уровня аргинина на постоянном уровне обеспечивается поступлением последнего с пищей, белковых превращений и процессов синтеза и распада этой аминокислоты в организме [33,125]. В основном, L –аргинин образуется в почках из L – цитруллина, который преимущественно синтезируется в тонком кишечнике; в печени же происходит синтез L –аргинина для дальнейшего его использования в цикле мочевиной кислоты, что практически не оказывает влияние на его содержание в плазме [33,125,217]. Катаболизм аргинина в неповрежденных эндотелиальных клетках проходит, в основном, по пути орнитин/мочевина, так называемый неокисный путь, а в случае взаимодействия клеток с цитокинами, преобладает продукция оксида азота (окисный путь) (рис.2,3) [33]. Так, в основе патогенеза эндотелиальной дисфункции, являющимся начальным этапом в развитии атеросклероза, лежит подавление свободными

радикалами продукции оксида азота, который образуется под действием эндотелиальной NO – синтазы (eNOS) из L – аргинина [114,128,217]. Дисфункция эндотелия может быть результатом его пониженной способности синтезировать, освобождать и инактивировать NO [35].

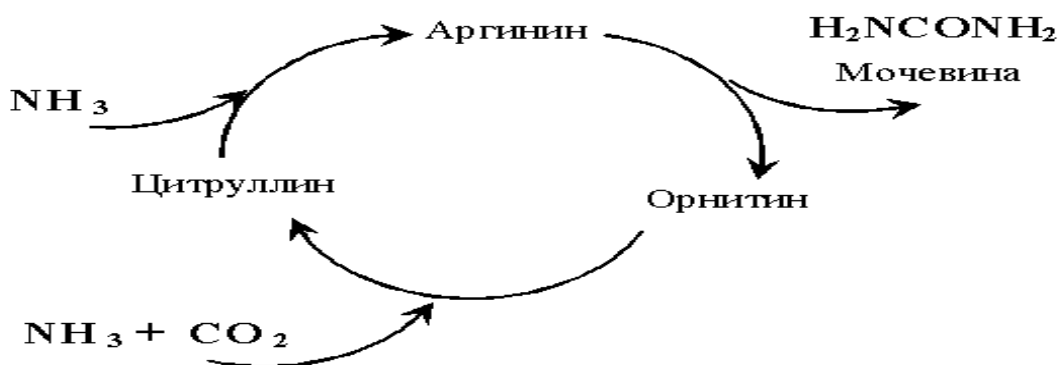


Рисунок 2. Катаболизм аргинина (неокисный путь) (цит. по: Граник В.Г., 2003)

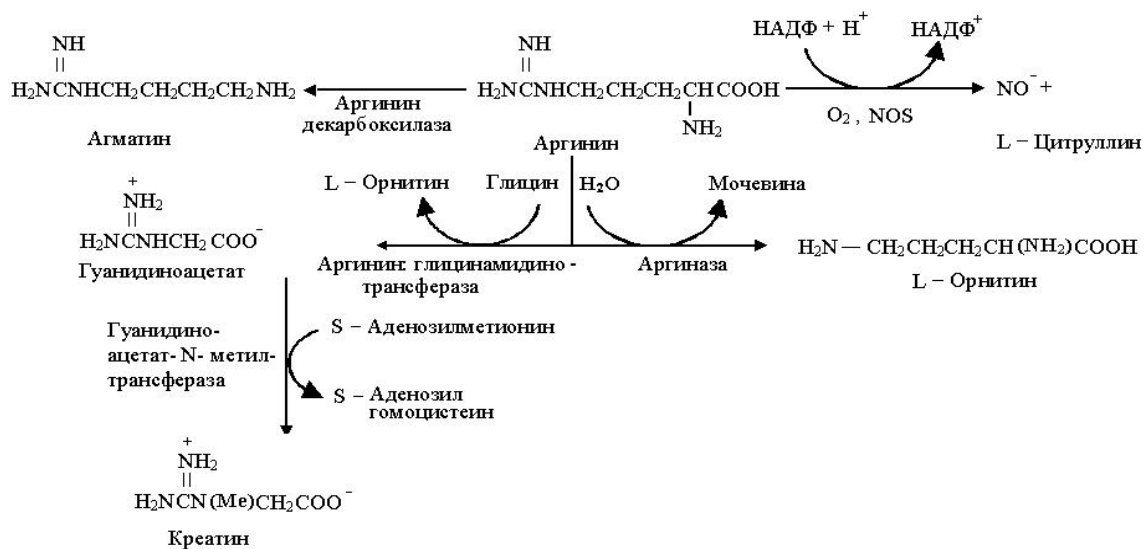


Рисунок 3. Схема образования аргинина (цит. по: Граник В.Г., 2003)

Необходимо отметить, что у здоровых взрослых людей, L-аргинин является заменимой аминокислотой, в отличие от посттравматических, послеоперационных состояний, в период интенсивного роста [217], когда

эндогенный синтез L-аргинина не покрывает физиологические потребности. В результате преобразования L-аргинина в L-цитруллин под действием NO-синтазы (eNOS), происходит образование оксида азота в эндотелии [142,217]. Функция eNOS заключается в синтезе базального уровня оксида азота и изменении его концентрации в ответ на действия различных раздражителей [196]. Этот фермент активируется в результате изменения реологических особенностей крови, под действием брадикинина и ацетилхолина, а подавляется при воспалительных реакциях, в процессах старения, под действием свободнорадикального окисления, в ходе фосфорилирования [125]. Происходит гидроксильное окисление L-аргинина до N-гидрокси-L-аргинина с дальнейшим окислением и образованием NO и L-цитруллина [125,142]. Оксид азота запускает процессы, так называемой, эндотелий-зависимой вазодилатации [125]. Клетки, содержащие NO-синтазу могут превращать L-цитруллин в L-аргинин (цикл аргинин-цитруллин) [33]. Уменьшение продукции оксида азота усугубляет дисфункцию эндотелия, выражающуюся в процессах гиперкоагуляции, пролиферации эндотелиальных клеток и вазоконстрикции [78].

Оксид азота обладает мощным потенциалом, играя роль цитотоксического фактора [271]. Продуцируется же он в относительно небольшом количестве, по сравнению, с общим содержанием L-аргинина [33,271]. L-аргинин почти в 10 раз интенсивнее превращается в креатин, чем используется для синтеза NO [33,125]. Промежуточным продуктом синтеза креатина является гомоцистеин [62]. Сосудистые клетки могут реметилировать гомоцистеин, но в процессах транссульфирования до цистеина они бессильны [125] и, следовательно, происходит воздействие избыточных концентраций этой аминокислоты на эндотелий сосудов. Более того, следствием гипергомоцистеинемии является повышение содержания асимметричного диметиларгинина (ADMA)[231].

При гипергомоцистеинемии количество вырабатываемого оксида азота может варьировать как в сторону снижения, так и в сторону повышения [30]. Обнаружена способность гомоцистеина активировать индуцибельную NO-синтазу (iNOS) и фактор транскрипции NF-κB [256], регулирующих высвобождение

цитокинов и медиаторов воспаления в гладкомышечных клетках [113] и вызывать не прямое угнетение активности эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [128,189].

Значительный интерес представляет феномен, обозначенный в литературе как, «L –аргининовый парадокс» [125]. С позиции биохимии ферментов, eNOS насыщается субстратом на физиологическом уровне и ее активность не должна зависеть от внеклеточного поступления L-аргинина [125]. Но, независимо от этого, L –аргинин оказывает благоприятный эффект в организме на вазодилатацию. Объяснением этому следует то, что изменяется афинитет eNOS к L –аргинину [125] и наличием при некоторых патологиях эндогенного ингибитора NOS– АДМА, активность которого может быть подавлена избытком субстрата - L –аргинина [125,271]. L-аргинин способен снижать концентрацию эндотелина-1, оказывающего сосудосуживающий эффект и играющего важную роль в формировании эндотелиальной дисфункции [13,37,104,107,136].

Аргиназный (неокисный) путь метаболизма L–аргинина участвует в биосинтезе мочевины и L – орнитина и, к тому же, стимулируется различными медиаторами воспаления и другими повреждающими агентами [142,271]. Эксперименты на старых животных с повышенным уровнем аргиназы показали, что подавление активности этого фермента ведет за собой повышение синтеза оксида азота эндотелиальными клетками [30]. В литературе имеются данные [125, 224,271] об экспрессии аргиназы в человеческих эритроцитах, а повышение ее концентрации наблюдается при хронических гемолитических анемиях, при легочной гипертензии, что ведет к снижению содержания L- аргинина и, как следствие, дефициту продукции оксида азота и дисфункции эндотелия. Т.е., аргиназа влияет на эндотелий сосудистой стенки посредством как окисного, так и неокисного механизмов, повышая синтез полиаминов, пролина, коллагена [33,125,271]. Следствием снижения синтеза оксида азота является вазоконстрикция, свободнорадикальное повреждение клеточных мембран и т.д. Снижение синтеза NO может возникать в результате «повышения оксидативной инактивации» в нитрит, нитрат и пероксинитрит [125,224].

Аргинин, не использующийся в синтезе орнитина посредством аргиназы,

подвергается воздействию NOS до образования оксида азота, аргинил- $\tau$ -PHK – синтазы с образованием аргинил- $\tau$ -PHK, аргининдекарбоксилазы (до агматина); аргининглицинамидтрансферазы (до креатина) [125]. L-аргинин способен понижать содержание «NOS- опосредованного супероксида» и приводить к накоплению оксида азота в скелетных мышцах при реперфузионной ишемии [208]. Это обусловлено улучшением транспорта кальция и активацией eNOS, а также индуцированием неэнзиматического перехода нитрита в оксид азота [136]. Ряд работ [94,231] посвящен изучению влияния L- аргинина на концентрацию гомоцистеина в плазме крови. Так, пероральный и внутривенный способ введения аргинина приводил к снижению содержания гомоцистеина и диастолического давления за счет снижения сердечного выброса [125,208,224,231].

### 1.2.2. Влияние карнитина на метаболические процессы в организме

L-карнитин был впервые выделен в начале прошлого столетия из экстракта тканей мышц [54]. В организме L-карнитин присутствует в свободном виде и в виде O-ацильных эфиров (рис.4) [119].

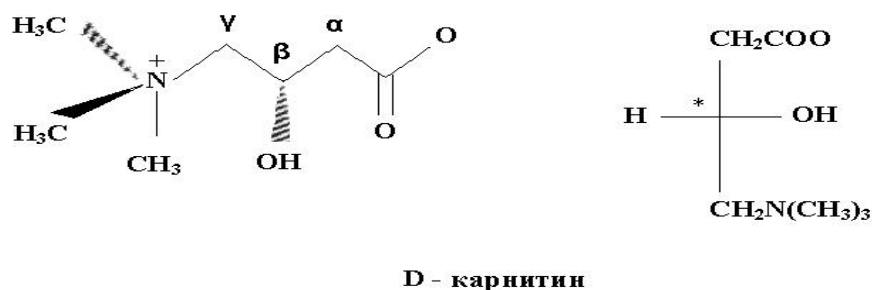
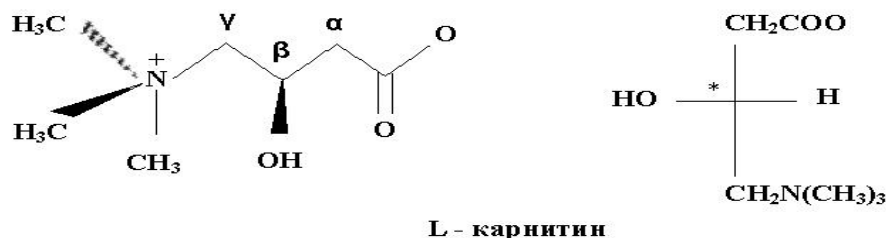


Рисунок 4. D- и L-конфигурации карнитина (цит. по: Спасов А.А., Иежица И.Н., 2005)

В середине 20 века, было установлена способность L-карнитина повышать скорость окисления жиров в митохондриальном матриксе [54].

L-карнитин синтезируется в печени и почках, откуда транспортируется в другие органы и ткани (рис.5) [54]. Синтез его невозможен без лизина, метионина, витаминов С, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, фолиевой кислоты, железа, при недостатке любого из перечисленных веществ собственная выработка L-карнитина значительно падает [119,175]. В митохондриальном матриксе из жирных кислот образуется ацетил-СоА [119]. На внешней стороне мембраны ацил перебрасывается с СоА на карнитин, на внутренней стороне с карнитина на СоА, находящийся внутри митохондрии. Затем происходит процесс превращения жирных кислот в длинноцепочечный ацил-СоА, и, при дальнейшем взаимодействии последнего с карнитином, трансформируется под действием карнитинацилтрансфераз в длинноцепочечный ацилкарнитин (ДЦАКар), обладающий способностью проходить через внутреннюю мембрану митохондрии [56,119,203].

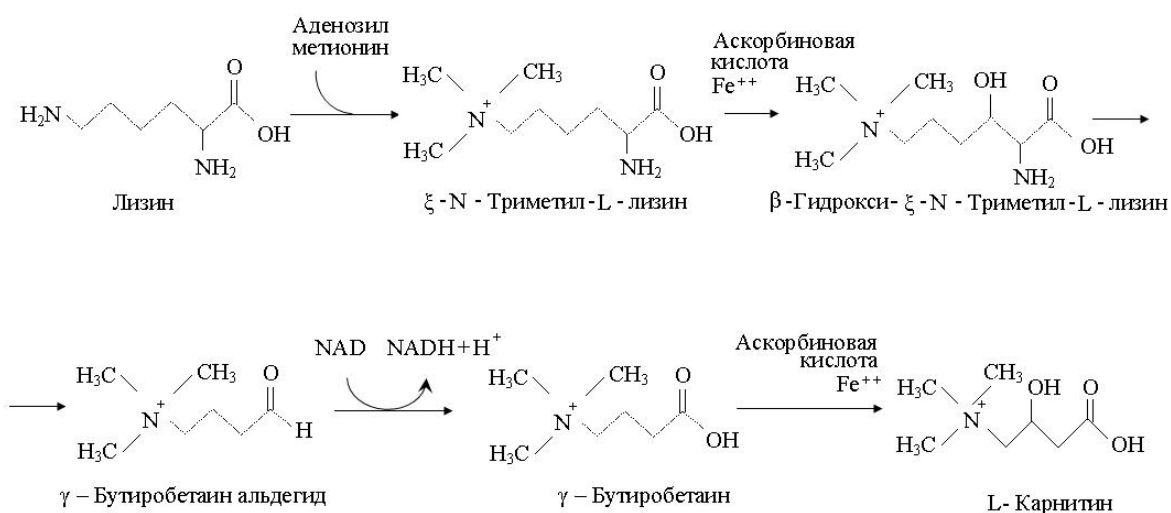


Рисунок 5. Схема и синтез L-карнитина (цит. по: Спасов А.А., Иежица И.Н., 2005)

С помощью карнитинацилтрансферазы осуществляется перенос ацилкарнитинов через внутримитохондриальную мембрану [203]. Кроме переноса ацильных радикалов между структурными компонентами клетки, система

карнитина поддерживает стабильный уровень КоА, активирующий карбоксилсодержащие продукты обмена [119]. Это заключается в удалении короткоцепочечных жирных кислот из митохондрий, благодаря этому внутри митохондрий освобождается СоА. Оптимальное соотношение последнего с карнитином играет важную роль в нормальном функционировании энергетического метаболизма [54]. В результате, недостаточное поступление L карнитина приводит к ослаблению окисления жирных кислот, утилизации углеводов и других веществ [75,203].

К еще одной важнейшей функции карнитина относится способность удаления органических кислот и ксенобиотиков, которые путем биотрансформации в производные ацил-СоА, удаляются из дальнейшего катаболизма [175,203].

Имеются данные о защитной функции карнитина при воздействии амфетамина, который повышает образование активных форм кислорода/азота [54]. Особая опасная роль отводится пероксинитриту, вырабатываемому из оксида азота и играющему немаловажную роль в патогенезе ряда заболеваний [30,63,71]. Предполагается, что усиление метаболизма митохондрий, снижение дефицита энергии может предотвратить образование как пероксинитрита, так и других свободных радикалов [44,54,75,131,243].

До сих пор нет объяснения механизмам анаболического эффекта карнитина. Предполагается, что это, возможно, связано с метаболизмом фосфолипидов и поддержания оптимума соотношения ацил –СоА к СоASH [54].

В литературе есть данные о защитном действии карнитина при апоптозе, важную роль в котором играют церамиды и каспазы [147,246]. Карнитин ингибирует синтез церамидов и подавляет активность каспаз [204,246]. Введение карнитина в кардиомиоциты приводит к снижению церамидов и подавлению активности каспаз -3 и каспаз -8 [204,232,246].

Нельзя не отметить нейрозащитный эффект карнитина, который был выявлен у крыс при воздействии 3-нитропропионовой кислоты [203]. Здесь показан эффект карнитина за счет стимулирования функций митохондрий.

### **1.3. Лизосомальный цистеиновый протеолиз**

#### **1.3.1. Понятие о цистеиновых протеазах и их роль в развитии оксидативного стресса**

Одним из важных последствий окислительного стресса является значительное повреждение структуры ДНК и РНК, липидов и белков, а также повышение способности генерировать вторичные активные формы, что в итоге приводит к некрозу или апоптозу клеток [30,41,42,112,149].

Апоптоз представляет собой программированную гибель клеток [98, 121], протекает с затратой энергии, носит системный характер в зависимости от общего плана развития организма и является неотъемлемой частью гомеостаза [112]. Затрата энергии при апоптозе является главным отличием этого процесса от некроза, который является следствием резкой потери энергии внутри клетки [112,275].

В осуществлении апоптоза огромную роль играют протеазы [112,258]. Различные протеазы, взаимодействуя друг с другом, идут по собственным сигнальным путям [65]. К ним относятся сериновые, цистеиновые, треониновые, аспаргатные и металлопротеазы [12,65]. Одну из существенных ролей в апоптозе играют лизосомальные цистеиновые протеазы – катепсины [14,112,155,260].

Лизосома –органелла клетки, имеющая набор кислых гидролаз [93,223,272], отличающаяся полиморфностью, различной формой, диаметром. У растений и низших эукариот именуется вакуолями [112]. Из всех клеток эукариот, только эритроциты не содержат лизосомы [112]. В своем составе лизосомы содержат основные классы гидролаз – протеазы, липазы, нуклеазы, фосфатазы, карбогидразы [93,272]. Процесс выброса лизосомальных ферментов провоцирует избирательный протеолиз [52], активирующий фибринолиз, калликреин-кининовую систему, систему комплемента, и неспецифический протеолиз, приводящий к инактивации различных белков [12,93], в том числе ингибиторов протеиназ [52]. К основным протеолитическим ферментам лизосом относятся коллагеназы, желатиназы, аминопептидаза, протеиназа 3, эластаза, катепсины [93,112]. Среди них протеазы цистеинового типа [12,65,162,169,252]: катепсины



B, H, L, C (DPPI), K, F, O,S,V,X, лимфопаин. Лизосомальные ферменты активны в кислой среде и защищены мембраной от остальных составляющих клетки [65,147,164,176].

Выделяют первичные и вторичные лизосомы [112]. К первичным относят вновь образованные лизосомы, не участвующие в гидролизе, имеющие гомогенное содержимое [93,112]. Остальные лизосомы относят к вторичным (поздним). В составе своего матрикса они содержат различные включения, мультивезикулярные тельца, богатые холестерином [12]. Поступление гидролаз в лизосомы может осуществляться несколькими путями [112,265]:

1. Cvt-путь (cytoplasmato-vacuole targeting) характерен для катепсина Н [260]. Суть этого пути состоит в том, что предшественник фермента доставляется в лизосому с помощью двухмембранных везикул. Во время слияния с лизосомой, внешняя мембрана разрушается, внутри лизосомы попадают мембранные Cvt-тельца, после разрушения последних освобождается их содержимое, олигомеры предшественника расщепляются в активный фермент.

2. Путь аутофагии.

3. Эндоцитоз

Ряд авторов [211,228] описывают возврат гидролаз в лизосомы с помощью «старьевщиков». Кроме функции переваривания, ферменты лизосом участвуют в формировании собственного типа апоптоза, где сигнальную роль осуществляют катепсины [260].

### **1.3.2. Структура и классификация катепсинов**

Лизосомальные цистеиновые протеиназы занимают одну из ключевых позиций в ряде важнейших процессов внутри клетки. Еще в начале текущего столетия было показано, что катепсины, помимо разрушения белковых молекул выполняют и другие биологические функции [169], связанные с определенной тканевой локализацией [177,178,260].

Являясь папаиноподобными протеиназами [12,65], катепсины имеют сходство с последовательностью аминокислот, а также с вторичной структурой папаина. Катепсины - это гликопротеины, синтезируются в виде зимогена в

комплексе Гольджи [112,260]. Зимоген состоит из продомена, малой субъединицы, большой субъединицы и связующего региона между субъединицами [112]. Зрелые катепсины содержат два домена (L – left и R – right) [38,162], между которыми располагается активный центр. Особенностью L-домена является наличие центральной спирали из 30 остатков, а для R-домена характерен  $\beta$ -цилиндрический мотив [162,169]. Связывание с субстратом происходит вдоль щели активного центра [169]. На N- конце центральной  $\alpha$ -спирали находится каталитический Cys25, с противоположной стороны активного центра в  $\beta$ -цилиндрическом домене находится His159. Они и образуют между собой активную ионную пару и составляют тиолат-имидазоль. В современных источниках [38,162,169,173,177,178] имеются четкие сведения об идентифицированных связывающих участках S2, S1, S1, причем основными детерминантами специфичности являются S2 и S1 [169,177,178], а S4, S3, выступают в роли добавочных субстрат – связывающих областей [178].

подавляющее большинство катепсинов являются эндопептидазами (L,S,F,K,O) [38,260]. Катепсин В сочетает эндо- и карбоксипептидазную [14,155,156,157], а катепсин Н эндо- и аминопептидазную активности [38,158]. Экзопептидазы имеют ограниченный доступ к субстрат – связывающему участку благодаря «преграждающим» петлям в катепсинах В и Х [38,160,162]. У аминопептидаз этот доступ ограничен пептидными участками (катепсины Н, С) [38,158,169].

Выделяют L-подобные катепсины (L,V, К, S, Н), F-подобные (F, W), В-подобные (В, Х) [38]. Все они отличаются между собой длиной консервативной последовательности и длиной пропептида [38,169,260]. Например, у В-подобных катепсинов консервативная последовательность GNFD [38], у L –подобных две последовательности: ERF/MINи GNFD [260]. Изучение F-подобных катепсинов [38, 158,169] показало сходство гена катепсина F, имеющего последовательность CTSF, с катепсином W, содержащего мотив CTSW [233].

### 1.3.3. Регуляция лизосомального цистеинового протеолиза

Регуляция лизосомальных цистеиновых протеиназ [169,177,178] протекает на уровнях транскрипции, трансляции, посттрансляционного процессинга (активация зимогена, изменение рН, влияние эндогенных ингибиторов), регуляции активности самого фермента. Катепсины синтезируются в виде препробелков [162,177,178,211]. Во время прохождения через эндоплазматический ретикулум препептиды удаляются, после чего происходит гликозилирование и образование дисульфидных связей [211]. В комплексе Гольджи происходит фосфорилирование остатков маннозы в боковых цепях олигосахаридов с образованием маннозо-6-фосфата, необходимого для связывания с рецепторами на мембранах аппарата Гольджи [222,227,249]. Образуются комплексы рецептор – профермент, отправляющиеся в лизосомы [38]. В них из-за низких значений рН происходит диссоциация рецептора от профермента [227]. Впоследствии, в кислой среде лизосом происходит протеолитический процессинг, в результате которого образуется активная форма фермента [38,251,263]. Удаленный во время активации препептид, регулирует транспорт фермента и «надлежащий фолдинг» [227]. Имеются сведения о способности N-концевого препептида ингибировать активность зрелых форм лизосомальных цистеиновых протеиназ [248,260,263]. Помимо всего, удаление препептида может быть стимулировано автокаталитическим процессингом при низких значениях рН [38]. Активация одной молекулы катепсина другой по типу цепной реакции называется автокаталитической активацией [38,143].

Важную роль в регуляции лизосомальных цистеиновых протеиназ играет значение рН среды [38,260]. Многие катепсины (L, B, H, K, V, F) достаточно неустойчивы в нейтральной среде [193,211,222,233], а вот катепсин S, при таких условиях достаточно стабилен [267] и, возможно, может функционировать вне лизосом [177,178,211,263].

Как правило, при созревании лизосом, рН среды значительно снижается и это является фактором необратимой денатурации таких катепсинов, как B, S, L [38], что затрудняет связывание с ними субстрата, препептида, ингибиторов

[38,177,178,211].

Катепсин D в кислой среде обладает высокой активностью, описана его способность денатурировать катепсин L [263,266].

Эндогенные белковые ингибиторы играют ведущую роль в регуляции зрелых активных катепсинов [38]. К ним относятся цистатины, тиропины,  $\alpha_2$  – макроглобулин [38,211].

К семейству цистатинов относятся стефины, кининогены, цистатины [38]. Цистатины оказывают свое подавляющее влияние на катепсины по-разному, а именно: эндопептидазы ингибируются в пикомолярной, а экзопептидазы в наномолярной областях [169].

В отличие от цистатинов, тирапины более избирательно ингибируют лизосомальные цистеиновые протеиназы [169]. Например, избирательным ингибитором катепсина L является белок p41, ассоциированный с главным комплексом гистосовместимости (MCH) класса II [38].

Выраженной ингибиторной активностью в отношении катепсинов обладают антиген I плоскоклеточного рака (SSCA) и цитотоксический антиген 2 $\beta$  Т-лимфоцитов [167]. SSCA ингибирует катепсины L, S, K, а также сам папаин. Цитотоксический антиген 2 $\beta$  Т-лимфоцитов также обладает выраженным подавляющим эффектом в отношении зрелых катепсинов L [14,56].

#### **1.3.4. Физиологическая роль катепсинов**

Большинство катепсинов (B, L, H, F, X) имеют широкую тканевую локализацию [169]. Однако, у некоторых лизосомальных цистеиновых протеиназ отмечается ограниченная тканевая локализация (таблица 1).

Концентрация катепсинов внутри лизосом достаточно высокая и достигает 1 мМ [232]. На основании этого, длительное время считали основной функцией лизосом неизбирательный протеолиз [38]. Это подтверждалось методом «генного накаута», заключающегося в выключении той или иной протеиназы [38,173]. У животных после такого эксперимента не наблюдалось нарушения протеолиза. Этот же метод позволил установить определенную функцию ряда катепсинов (S, V, K) в зависимости от их локализации [173].

Катепсины В, Н, L, С, X, V, O, F находятся почти во всех тканях [148,162]. В отличие от них, катепсины К, W, S [159,162] встречаются в ограниченном числе клеток определенных тканей при определенных состояниях. Например, катепсин К [162] обнаруживается в остеокластах, эпителиальных клетках и в синовиальных фибробластах при ревматоидном артрите. Это единственный фермент, для которого была подтверждена роль в костной резорбции в исследовании на мышах и человеке [38]. Катепсин W преимущественно выражен в CD8-лимфоцитах и клетках киллерах [169]. Катепсин S [159,169] выражен в клетках дендритов нейронов. Указана роль катепсинов В, L, Н в апоптозе [103,106,112] (табл. 1).

Таблица 1

## Сравнительная характеристика лизосомальных цистеиновых протеиназ

Катепсин	Распространение	Роль в физиологических и патологических процессах
<b>L – подобные</b>		
L	Широкое	Деградация соединительной ткани, избыточная экспрессия в опухолевых тканях [169], участие в обменных процессах эпидермиса [251]
V	Эпителиальные клетки вилочковой железы, роговицы, яичка	Участие в протеолизе [38]
K	Эпителиальные клетки бронхов, остеокласты	Способность к продукции эндостатинподобных фрагментов [56], участие в процессах ремоделирования костной ткани [162,263]
S	Дендритные клетки, макрофаги, В-клетки	Повышенная экспрессия в лимфатической ткани [38], паренхиме легкого и сыворотке крови у больных с раком легкого [159]; экспрессия в клетках астроцитомы при отсутствии в нормальных астроцитах [261,267]
H	Широкое	Регуляция во внутриклеточном метаболизме белков, клеточной дифференцировке, обмене БАВ [222]. Вовлечен в раковую прогрессию [38].

<b>В –подобные</b>		
<b>В</b>	Широкое	Повышенная экспрессия атипичными клетками, участие в апоптозе, патогенезе РА [155,162,169]
<b>X</b>	Широкое	Увеличенная экспрессия при воспалении слизистой оболочки желудка [148,162]
<b>F –подобные</b>		
<b>F</b>	Макрофаги	Принимает участие в процессинге инвариантной цепи, презентации антигена класса II [38], повышенная экспрессия в отделяемом цервикального канала при опухолях [233].
<b>W</b>	Лимфоциты	Экспрессируется у больных с хроническим воспалением слизистой желудка [268].

Функции катепсина В заключаются в снижении распада коллагена и фибронектина в нормальной или опухолевой тканях [36,160] путем инициации сигнального пути клеточного апоптоза [112,173,254]. Освобождаясь из лизосом, катепсин В в составе остальных протеаз оказывает повреждающее действие на митохондрии [133], увеличивается их проницаемость с последующим выходом цитохрома С, что играет важную роль в патогенезе развития жировой дистрофии печени [31,133].

Катепсин Н участвует в регуляции внутриклеточного метаболизма белков [38,245], их посттрансляционных изменений [14], в клеточной дифференцировке и росте [156], старении [14], обмене гормонов и иммунном ответе [14,38]. Изменение уровня катепсина Н, а именно увеличение его концентрации, обнаруживают в плазме крови у людей с раком легких, молочной железы [14,158], простаты [158], меланомой, глиобластомой, анапластической астроцитомой [261], предопухолевыми состояниями ротовой полости [103]. Также как и катепсин В [169], катепсин Н синтезируется в рибосомах в качестве неактивного предшественника –препроэнзима [245], который при прохождении через ЭПР, теряет препептид, что приводит к эволюции прокатепсина в активный фермент.

Этот процесс протекает в лизосомах или поздних эндосомах [112]. Процесс отщепления пропептида идет под действием пепсина, нейтрофильной эластазы, и катепсинами других классов [38]. При смещении рН в кислую сторону, ослабляется связь между пропептидом и активной частью молекулы [211]. Похожий процесс был показан при изучении взаимодействия катепсинов В и L [193,211]. На данный момент описан аутокаталитический механизм активации катепсинов L и В [143,211]. Имеются данные [56] об аутокаталитической активации прокатепсина Н в кислой среде в присутствии гликозаминов, а следовательно и возрастании концентрации зрелой формы этого фермента.

Катепсин L синтезируется в форме препроэнзима [38], в результате посттрансляционных изменений транспортируется в лизосомы. Там он выполняет функцию укладки лизосомальных ферментов [211], участвующих в различных клеточных функциях. Прокатепсин L синтезируется макрофагами и остеокластами [169]. В кислой среде лизосом, путем ограниченного протеолиза, он активируется и переходит во внеклеточный матрикс, изменяя обменные процессы, а также принимает участие в деградации соединительной ткани [251]. Многочисленные злокачественные клетки способны продуцировать прокатепсин L [56]. Имеются данные, что уровень экспрессии РНК коррелирует с злокачественностью этих клеток [56]. Способность катепсина L разрушать белковые компоненты внеклеточного матрикса, играет не последнюю роль в прогрессировании опухоли и метастазов [214], развитии ревматоидного артрита и нейродегенеративных расстройств [56]. Катепсин L имеет аминокислотную последовательность на 80% идентичную катепсину V [177,178], который, в отличие от катепсина L, распространенного во многих органах, встречается в вилочковой железе и яичках [211]. Из образцов тканей рака предстательной железы были выделены повышенные уровни катепсина L [211]. В инвазивных опухолевых клетках молочной железы концентрация этого катепсина выше, чем в неинвазивных [214]. При ревматоидном артрите в синовиальной выстилке также обнаруживаются повышенные концентрации катепсина L [211]. Активность катепсина L повышается при аневризме аорты в пристеночном тромбе [161]. В

результате взаимодействия с белками эндотелия, изменяется эластичность и механическая прочность артерий [161,211].

Описана роль катепсина L в развитии и метастазировании рака яичника. Это подтверждается высоким содержанием катепсина L в секрете серозного содержимого карциномы яичника (рис. 6) [214].

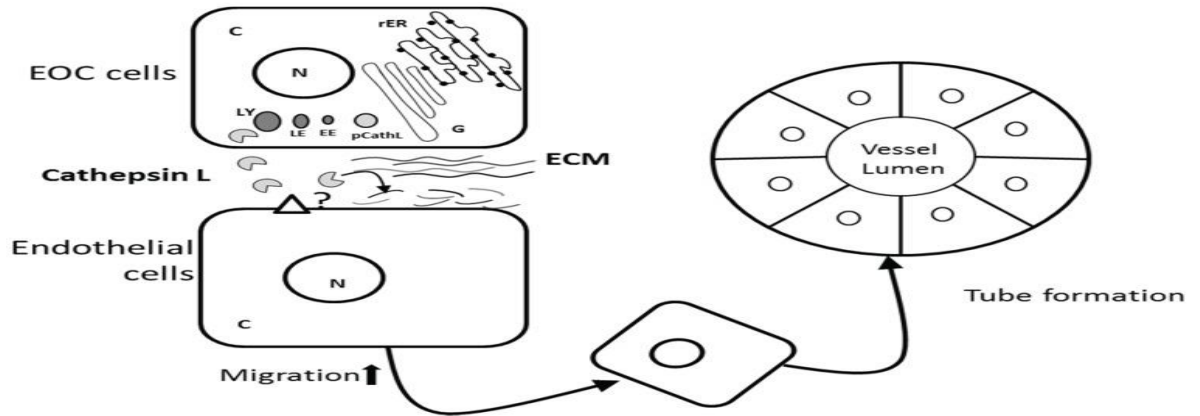


Рисунок 6. Роль катепсина L в развитии рака яичника (цит. по: Pranjol M.Z. et al.,2015)

В современных источниках [161,169,177,178] имеются данные, говорящие о роли катепсинов вне лизосом, и даже вне клетки. Такие протеиназы как катепсины С, G способны разрушать компоненты базальных мембран и активировать процессинг таких белков как, проренин, тиреоглобулин.

### 1.3.5. Взаимосвязь протеолиза и окислительной модификации белков

Участие катепсинов в апоптозе и клеточной смерти описаны в современных источниках [98,106,121,187,195,260]. В следствие разрушения лизосомальной мембраны и выхода в цитозоль активных ферментов [247,248], в первую очередь катепсинов, могут активироваться программы клеточного разрушения [106]. «Жертвой» катепсинов могут являться различные белки цитозоля, митохондрии, ядро клетки, а также различные проферменты [112]. Инактивация лизосомных цистеиновых протеиназ может тормозить некоторые пути апоптоза [106,112,260]. Имеются данные о связи окислительного стресса с лабильностью мембран лизосом [151], а также активности некоторых катепсинов с проницаемостью лизосомальной мембраны [4].

В неактивированной клетке ферменты находятся в латентном состоянии



[112, 140]. При различных воздействиях, повреждающих мембраны клеток, может происходить транспорт различных субстратов в лизосомы, где они гидролизуются, затем высвобождаются и повреждают клеточные структуры [106,112, 170].

Условно к факторам, вызывающим пермеабиллизацию мембраны, можно отнести лизосомотрофные агенты [112,247,248,249], активные формы кислорода / азота [106], сигналы от рецепторов апоптоза (TNF –R1) [176,256]. Одним из факторов повреждения лизосом является перекисное окисление липидов [87], которое индуцируется активными формами кислорода и азота. В самих лизосомах ключевым моментом в образовании свободных радикалов является запуск реакции Фентона [209]. Апоптоз, вызванный реактивными формами кислорода [155,244] и сопровождающийся пермеабиллизацией лизосомальной мембраны, связан с выходом катепсина D в цитозоль, освобождением митохондриального цитохрома c и активацией каспаз [154]. Такой апоптоз характерен для клеток нейробластомы [156], а также апоптозе нейтрофилов, вызванным бактериями [154]. Прямое повреждение лизосомальных мембран активными формами кислорода характерно для ишемии-реперфузии [156].

Пермеабиллизацию мембраны лизосом вызывают сфингозин [210], фосфолипаза A2 [106], производные олигопептидов [252], кротамин из яда гремучей змеи [170], белковые медиаторы апоптоза такие, как белок Vim и p 53 [150]. Причем, Vim не обладает прямыми пермеабиллизирующими свойствами и работает опосредованно через белки Вах и Вак, для которых доказаны пермеабиллизирующие свойства [146,210]. Белок p 53 работает в тандеме с LAPF – белком, который осуществляет перемещение p 53 к мембранам лизосом и связывания с ними [165,265], запуская тем самым пермеабиллизацию, а также формирование, так называемых, белковых пор для секреции лизосомных ферментов без «признаков повреждения лизосомальных мембран» .

Первыми мишенями для катепсинов после выхода их из лизосом являются белки цитозоля, а именно сигнальные белки Bcl-2 [106]. Имеются данные о прямом воздействии катепсинов на митохондрии [147] или способности вызывать

пермеабиллизацию их мембран путем активации белков Bid, Bak, Bax [146,150,165,210,265]. Также лизосомальные цистеиновые протеазы (в частности катепсин В) могут вызывать быструю конденсацию хроматина ядра [156,260]. Участие катепсинов в апоптозе может протекать путем активации эффекторной каспазы 3 [154] или самостоятельно выступать в роли эффекторного фермента, как, например, в клетках фибросаркомы [156].

Имеются данные [2,101] о взаимосвязи окислительного изменения белков и активности катепсинов. В частности, установлено, что процессы старения сопровождаются снижением активности катепсина D [51] и повышением интенсивности карбонилирования среднемолекулярных олигопептидов [101]. Продукты окислительного повреждения белков играют роль эндогенных токсинов в организме, в выведении и дезактивации которых, огромную роль играют протеиназы [12,65,117] в качестве «рулевого» биохимических процессов адаптации.

## **Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Работа выполнена на 240 гомогенатах мышечных тканей (по 80 образцов грудной аорты, левого желудочка сердца, большеберцовой мышцы) 80-ти конвекциональных половозрелых крысах самцах линии Wistar с массой тела 280-330 граммов. Животные содержались при естественном освещении в металлических клетках по 4 особи. Их рацион состоял из воды и комбикорма «Чара» (производитель ЗАО «Ассортимент Агро», Россия, Московская область, Сергиево-Посадский район, д. Тураково) и рассчитывался сотрудниками вивария исходя из установленных норм. Пребывание животных в виварии соответствовало «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993. Содержание и выведение животных из эксперимента выполнялись согласно правилам, описанным Международным Советом Медицинских Научных обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), а также в соответствии приказу Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Взвешивание проводили в помещении вивария на технических весах. Перенос животного на весы производился экспериментатором с использованием защитных брезентовых перчаток. Маркировка проводилась непосредственно после взвешивания окрашиванием шерсти на спине животного насыщенным раствором пикриновой кислоты. Клетки для содержания крыс маркировались заранее с указанием серии животных, даты начала и окончания эксперимента.

### **2.1. Экспериментальные модели и схемы введения препаратов**

#### *Моделирование умеренной гипергомоцистеинемии*

Моделирование гипергомоцистеинемии умеренной степени выраженности [94] проводили внутрижелудочным введением метионина в качестве субстрата для синтеза гомоцистеина в виде суспензии, приготовленной на 1% крахмальном растворе с добавлением 10% твина-80, в дозе 1,5 г/кг ежедневно 2 раза в сутки группе животных в течение 7 дней (n=8) и группе животных в течение 14 дней

(n=8). Суспензия вводилась экспериментатором с участием ассистента с помощью стеклянного градуированного шприца с зондом. Объем вводимой суспензии зависит от массы животного и не превышает 1,5 мл. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 8 и 15 сутки соответственно.

Животным контрольной группы (n=8 для каждой группы), таким же образом, внутривенно вводилась суспензия, не содержащая метионин (состав по массе: 10% твина-80, 1% крахмала, 89% воды) в течение 7 (контроль 1<sub>7</sub>) и 14 дней (контроль 1<sub>14</sub>).

#### *Моделирование выраженной гипергомоцистеинемии*

Моделирование выраженной гипергомоцистеинемии [69] проводили внутривенным введением метионина в качестве субстрата для синтеза гомоцистеина в виде суспензии, приготовленной на 1% крахмальном растворе с добавлением 10% твина-80, в дозе 1,5 г/кг ежедневно 2 раза в сутки в течение 21 дня (n=8). Суспензия вводилась экспериментатором с участием ассистента с помощью стеклянного градуированного шприца с зондом. Объем вводимой суспензии зависит от массы животного и не превышает 1,5 мл. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

Животным контрольной группы (n=8) таким же образом внутривенно вводилась суспензия, не содержащая метионин (состав по массе: 10% твина-80, 1% крахмала, 89% воды) в течение 21 дня - контроль 1<sub>21</sub>.

#### *Изучение эффектов L-аргинина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии*

Для изучения эффектов аргинина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии [136] выборке животных (n=8) вводили аргинин per os 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток параллельно с введением метионина по схеме, описанной выше (с 12 по 21 сутки введения метионина). Животным контрольной группы (n=8) осуществляли введение аргинина per os 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток параллельно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше – контроль 2. Выведение животных из эксперимента

осуществлялось на 22-е сутки.

*Изучение эффектов карнитина на фоне выраженной  
гипергомоцистеинемии*

Влияние карнитина [243] изучали в экспериментальной группе животных (n=8), получавших карнитин хлорид (производство ФГУ «РКНПК» Минздрава России – ЭПМБП) в дозе 300 мг/кг внутривентриально в течение 21 дня параллельно с введением метионина по схеме, описанной выше. Контрольную группу составили 8 животных, получавших карнитин хлорид в дозе 300 мг/кг внутривентриально в течение 21 дня параллельно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше – контроль 3. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

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

**2.2. Методы получения биологического материала**

Для стандартизации условий, в которых проводился эксперимент, животных лишали пищи за 12 часов до забоя. Животных обескровливали, пересекая брюшной отдел аорты, под эфирным рауш – наркозом. Немедленно после этого, извлекали сердце с участком аорты и большеберцовую мышцу, помещая органы в охлажденный 0,25 М раствор сахарозы. Затем выделяли участки левого желудочка, большеберцовой мышцы и участок грудной аорты длиной 3 см. Очищенные участки тканей взвешивали на электронных весах АН-220 СЕ (Япония), измельчали ножницами и помещали в емкость гомогенизатора «Potter S» (Sartorius, Германия) в холодный 0,25 М раствор сахарозы в соотношении 1/100 и гомогенизировали в течение 60 секунд при 1500 об/мин, температура при этом не превышала 4°C. Полученные гомогенаты мышечных тканей центрифугировали 10 мин при 1000g, используя центрифугу СМ-6М ЕЛМІ (Латвия), для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Для удаления митохондрий надосадочную жидкость отбирали в отдельные гильзы, центрифугировали в течение 15 минут при 14000 g. Полученный таким образом

супернатант центрифугировали дополнительно при 20000 g в течение 30 минут для получения чистой цитоплазматической неседиментируемой фракции используя рефрижераторную центрифугу К 24 Д (Германия). Седиментируемую фракцию (осадок грубой фракции лизосом) ресуспендировали в 0,25 М растворе сахарозы с добавлением 0,1% раствора тритона X-100.

Раздельно, в седиментируемых и неседиментируемых фракциях, определяли активность катепсинов L, H, кислой фосфатазы, обозначая СА (седиментируемая активность) и НСА (неседиментируемая активность). Сумму СА и НСА обозначали как общую активность (ОА).

Оценку окислительной модификации белков проводили в неседиментируемой (цитоплазматической, внелизосомальной) фракции.

### **2.3. Метод определения концентрации гомоцистеина в сыворотке крови**

По истечении срока эксперимента, животных обескровливали, пересекая брюшной отдел аорты, под эфирным рауш – наркозом. Кровь отбирали в пробирку с активатором свертывания и центрифугировали для отделения сыворотки в течение 5 минут при 3000 об/мин, в которой определяли концентрацию гомоцистеина методом иммуноферментного анализа коммерческим набором «Axis Shield» (США).

### **2.4. Метод определения содержания белка в тканях животных**

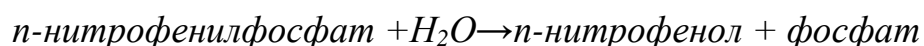
Содержание белка определяли в седиментируемой и неседиментируемой фракциях гомогената по методу Лоури коммерческим набором НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург).

Принцип метода заключается в образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот при взаимодействии с реактивом Фолина – Чокальтеу в комплексе с биуретовой реакцией на пептидные связи. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка в исследуемой пробе, определяемой при длине волны 750 нм. Содержание белка в экспериментальной пробе определяли по калибровочному графику, построенному с использованием калибровочного бычьего сывороточного альбумина 0,25 мг/мл, входящего в состав набора.

## 2.5 Определение общей активности кислой фосфатазы в тканях

В седиментируемой и неседиментируемой фракциях гомогенатов тканей определяли активность кислой фосфатазы унифицированным методом по «конечной точке» с помощью коммерческого набора «Витал Диагностикс СПб» (Россия, Санкт – Петербург).

Метод основан на количественном определении в единицу времени п-нитрофенола, которое пропорционально активности фермента, по оптической плотности образца при длине волны 405 нм.



Активность фермента оценивали по калибровочному графику, построенному с помощью калибровочного раствора п-нитрофенола, входящего в состав набора.

## 2.6. Определение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ (катепсинов L, H)

Активность катепсинов L, H определялся методом спектрофлуориметрии на спектрофлуориметре System 3 Scanning Spectrofluorometr, Opticaltechnologydevices, inc. Elmstord, NewYork, 10523 (США) по Barret и Kirshke [145].

В основе метода лежит количественное определение 7-амидо-4-метилкумарина, освобождающегося вследствие ферментативного гидролиза пептидной связи Na-CBZ-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина L, Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина H. Данный метод обладает высокой чувствительностью и высокой специфичностью субстратов.

### *Ход определения*

К 0,4 мл субстратно-буферного раствора, содержащего в своем составе 20 мкМ Na-CBZ-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin для катепсина L, Arg-7-amido-4-methylcoumarin для катепсина H, 8 мМ ДТТ и 2 мМ ЭДТА в 0,1 М ацетатном буфере pH 5,5 для катепсина L, Na/К-фосфатном буфере pH 6,8 для катепсина H с преинкубированием в течение 2-х минут при 37°C, добавляли 0,1 мл

исследуемого материала. Реакционную смесь выдерживали на водяной бане при 37°C в течении 1 часа. Реакцию останавливали путем добавления 2-х мл холодного 0,1 М ацетатного буфера pH 4,0. В качестве контроля использовали те же компоненты реакционной смеси, исключая исследуемый материал, который вносился непосредственно после добавления ацетатного буфера pH 4,0. Количество свободного 7-амидо-4-метилкумарина измеряли при  $\lambda_{ex}$  360 нм и  $\lambda_{em}$  440 нм, против контроля. Стандартным раствором служил 7-амидо-4-метилкумарин, растворенный в диметилсульфоксиде (Вектон, Санкт – Петербург). Для вычисления активности (А) ферментов в 1 мл гомогената использовалась формула:  $A = F_o * C * V / F_{st} * t * 0,1$ ; где

$F_o$  – интенсивность флуоресценции анализируемого образца;

$F_{st}$  – интенсивность флуоресценции стандартного раствора 7-амидо-4-метилкумарина;

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

$V$  – разведение гомогената;

$t$  – время инкубации в секундах;

0,1 – объем гомогената в пробе.

Удельную активность протеиназ выражали в нмоль 7-амидо-4-метилкумарина/сек <sup>x</sup> г белка (нкат/г белка).

## **2.7. Оценка активности коэффициента лабильности катепсинов L, Н и кислой фосфатазы**

Принцип метода [95] заключается в одновременной оценке коэффициента лабильности катепсинов и коэффициента лабильности кислой фосфатазы в качестве маркеров функционального состояния лизосомальной мембраны.  $C_{lab}KФ$  – отношение активности кислой фосфатазы внелизосомальной фракции (НСА) к общей активности (ОА) кислой фосфатазы;

$C_{lab}Кат$  – отношение активности катепсина внелизосомальной фракции (НСА) к общей активности (ОА) катепсина.



## 2.8. Метод оценки окислительной модификации белков в тканях

Определение окислительной модификации белков осуществляли путем оценки уровня карбонильных производных по R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [43]. В основе метода лежит реакция взаимодействия карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4 – динитрофенилгидразином (2,4 – ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов (рисунок 7). Последние регистрировались спектрофотометрическим методом.

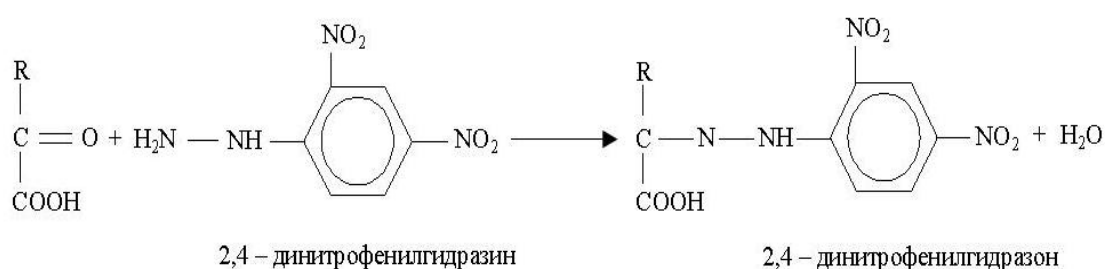


Рисунок 7. Реакция образования 2,4-динитрофенилгидразона

### *Ход определения*

Для исследования использовали неседиментируемую фракцию, которая была получена центрифугированием гомогенатов миокарда, скелетной мышцы, грудной аорты. В гомогенатах тканей, предварительно, с помощью 10% раствора стрептомицина в соотношении 1:9 при комнатной температуре, осаждали нуклеиновые кислоты. После 15-ти минутной экспозиции центрифугировали в течение 10 минут при 800g для получения надосадочной жидкости, которую использовали для дальнейшего определения спонтанной и металл-катализируемой окислительной модификации белков.

Определение спонтанной окислительной модификации белков осуществляли путем добавления к 0,1 мл надосадочной жидкости 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты в пробирки «Опыт» и «Контроль». Затем в пробирку «Опыт» вносили 1 мл 0,01 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2М HCl, в пробирку «Контроль» - 1 мл 2 М HCl. Определение металл-катализируемой окислительной

модификации белков осуществляли путем добавления к 0,1 мл надосадочной жидкости 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты, по 0,1 мл  $4 \times 10^{-3}$  М FeSO<sub>4</sub>,  $1 \times 10^{-3}$  М ЭДТА,  $3 \times 10^{-4}$  М Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (реактив Фентона, приготовленный непосредственно перед применением) в пробирки «Опыт» и «Контроль». В реакции Фентона происходит взаимодействие двухвалентного железа с перекисью водорода с образованием свободного радикала ОН, а ЭДТА способствует сохранению окисленного железа:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}$  [42]. Затем, в обоих определениях, в пробирку «Опыт» вносили 1 мл 0,01 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2М НСl, в пробирку «Контроль» - 1 мл 2 М НСl. Инкубацию проб проводили при комнатной температуре в темном месте в течении 1 часа, после чего центрифугировали при 1000 g 15 минут.

Полученные таким образом осадки троекратно промывали смесью из равного количества этилового спирта и этилацетата, высушивали и растворяли в 3-х мл 8 М раствора мочевины. Для лучшего растворения добавляли к каждой пробе по капле 2 М НСl.

Карбонильные производные белков, полученные в ходе определения спонтанной и металл-катализируемой окислительной модификации белков регистрировали с помощью спектрофотометра (СФ-2000, Россия, Санкт-Петербург). Альдегидинитрофенилгидразоны (S<sub>аднфг</sub>) регистрировали на длинах волн: 230,254,270,280,356 нм, что соответствует ультрафиолетовой части спектра и 430, 434 нм (область видимого света). Кетондинитрофенилгидразоны регистрировали в области ультрафиолетовой части спектра на длинах волн 363, 370 нм, а в области видимого спектра на длинах волн 434, 520 и 535 нм. Данные длины волн использовались в соответствии с диапазонами, на которых регистрируются карбонильные производные [201].

По данным экстинций, полученных после регистрации на спектрофотометре, строили график, отражающий спектр поглощения продуктов окислительного изменения белков.

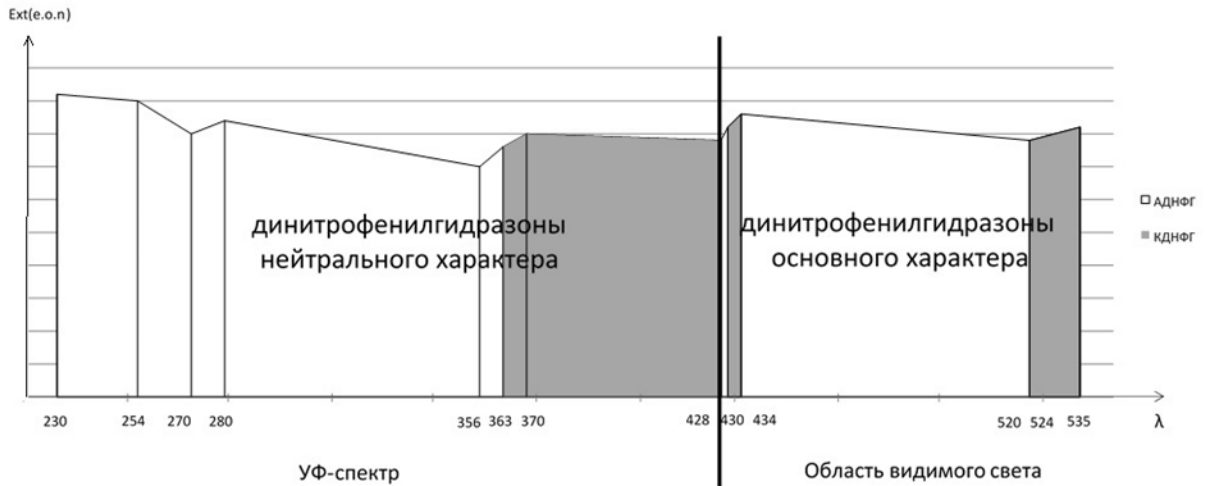


Рисунок 8. Регистрация динитрофенилгидразонов в световом спектре (цит. по: Фомина М.А. и др., 2014)

Исходя из того, что «шаг» между длинами волн непостоянная величина и отсутствует возможность вычислить площадь плоской фигуры, площадь по кривой разбивалась на отдельные прямоугольные трапеции. Высота трапеции равна разнице между длинами волн ( $h = \lambda_2 - \lambda_1$ ), основания равны значениям экстинции на заданной длине волны ( $Ext \lambda_2, Ext \lambda_1$ ) и выраженные в единицах оптической плотности (е.о.п.).

Площадь под кривой спектра поглощения окислительной модификации белков суммировалась из 4 площадей под кривой альдегидных и кетоновых динитрофенилгидразонов, рассчитывалась по формуле (патент) и выражалась в условных единицах/грамм белка:

$$S_{омб} = S_{\underset{uv}{\text{АДНФГ}}} + S_{\underset{vs}{\text{АДНФГ}}} + S_{\underset{uv}{\text{КДНФГ}}} + S_{\underset{vs}{\text{КДНФГ}}},$$

где:

$$S_{\underset{uv}{\text{АДНФГ}}} = \frac{Ext_{230} + Ext_{254}}{2} \times 24 + \frac{Ext_{254} + Ext_{270}}{2} \times 16 + \frac{Ext_{270} + Ext_{280}}{2} \times 10 + \frac{Ext_{280} + Ext_{356}}{2} \times 76 + \frac{Ext_{356} + Ext_{363}}{2} \times 7,$$

$$S_{\underset{vs}{\text{АДНФГ}}} = \frac{Ext_{428} + Ext_{520}}{2} \times 92,$$

$$S_{\underset{uv}{\text{КДНФГ}}} = \frac{Ext_{363} + Ext_{370}}{2} \times 7 + \frac{Ext_{370} + Ext_{428}}{2} \times 58,$$

$$S_{\underset{vs}{\text{КДНФГ}}} = \frac{Ext_{430} + Ext_{434}}{2} \times 4 + \frac{Ext_{520} + Ext_{535}}{2} \times 15.$$

## 2.9. Способ оценки долей первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса

Для оценки доли первичных маркеров окислительного стресса [95] подсчитывалось отношение суммы альдегидных динитрофенилгидразонов ультрафиолетового и видимого спектра света к общему содержанию карбонильных производных белков:  $S_{\text{АДНФГ}_{\text{uv}}} + S_{\text{АДНФГ}_{\text{vs}}} / S_{\text{общ}}$ . По аналогии высчитывалась доля вторичных маркеров: отношение суммы кетоновых динитрофенилгидразонов ультрафиолетового и видимого спектра света к общему содержанию карбонильных производных белков:  $S_{\text{КДНФГ}_{\text{uv}}} + S_{\text{КДНФГ}_{\text{vs}}} / S_{\text{общ}}$ .

## 2.10. Способ оценки резервно-адаптационного потенциала (РАП)

Для оценки резервно-адаптационных возможностей использовали расчет процентного соотношения содержания карбонильных производных, измеренного при спонтанном окислении к аналогичному показателю, полученному в реакциях металлиндуцированного окисления, принимая последний за 100% [80]. При этом, значение резервно – адаптационного потенциала (РАП) рассчитывалась как разница между площадью под кривой поглощения карбонильных производных, полученной при металлкаatalизируемом окислении (100%) и долей (в %) аналогичного показателя, зарегистрированном при спонтанном окислении [95]. Чем больше доля спонтанной ОМБ в металлкаatalизируемой, тем меньше резервно-адаптационный потенциал исследуемого образца.

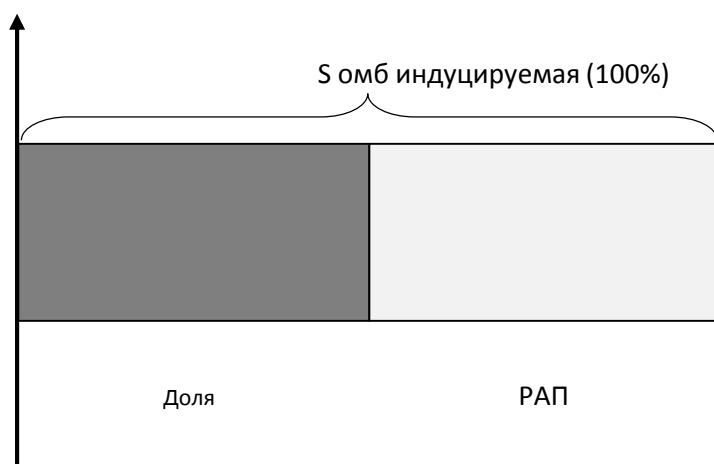


Рисунок 9. Выражение результата оценки резервно – адаптационного потенциала

### **2.11. Статистическая обработка данных**

Статистический анализ результатов исследований проведен с использованием программы «Microsoft Office Excel 2013» и «Statistica 10». С помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий) проводили проверку нормальности распределения данных. Поскольку, подавляющее количество вариационных рядов не продемонстрировало нормального распределения данных, дальнейшая статистическая обработка осуществлялась с использованием непараметрических критериев. Результаты представляли с использованием медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей [Q1;Q3]. Статистическую значимость отличий показателей экспериментальной группы от группы сравнения оценивали по U – критерию Манна-Уитни. Проверку равенства медиан нескольких выборок осуществляли с помощью критерия Краскела -Уоллиса. Оценку ранговой корреляции осуществляли с помощью коэффициента Спирмена.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Характеристика экспериментальных моделей

Для верификации развития гипергомоцистеинемии осуществляли измерение содержания гомоцистеина в крови животных экспериментальных и контрольных групп. Установлено, в сыворотке крови крыс, получавших метионин в течение 7 дней, статистически значимое незначительное нарастание показателя относительно Контроля  $1_7$ .

Группа животных, получавших метионин в течение 14 дней, также демонстрировала статистически значимое незначительное нарастание концентрации гомоцистеина относительно контрольной выборки (Контроля  $1_{14}$ ). В сыворотке крови животных, получавших метионин в течение 21 дня, обнаружено статистически значимое резкое нарастание показателя относительно Контроля  $1_{21}$ .

Экспериментальные группы с введением аргинина и карнитина демонстрировали повышение уровня гомоцистеина относительно соответствующих контрольных групп, однако результаты измерений оказались статистически значимо ниже, чем в группе, получавшей только метионин в течение 21 дня (табл. 2).

Гомоцистеин, переходя из клетки, внеклеточного пространства в кровь, воздействует на эндотелий сосудов [202]. В современных источниках практически не описывается пагубное воздействие гомоцистеина на клетки различных тканей. Но, несомненно, содержание избытка этой аминокислоты в клеточных компартментах приводит к дисбалансу работы тех или иных органов. В литературе имеются данные [125,231] о влиянии аргинина на концентрацию АДМА, миелопероксидазы, а также снижение содержания в сыворотке крови метаболита метионинового обмена – гомоцистеина, что мы и увидели на экспериментальных моделях. Повышенные концентрации гомоцистеина и, как следствие, развитие ОС, могут вызывать митохондриальную дисфункцию [90]. Мы обнаружили снижение уровня гомоцистеина под влиянием карнитина, что,

вероятно, объясняется улучшением энергетического обмена клетки, в котором он участвует за счет стимулирования деятельности митохондрий [54].

Таблица 2

Содержание гомоцистеина в сыворотке крови (Ме[Q1;Q3])

Группа	Гомоцистеин( мкмоль/л)
Контроль 1 <sub>7</sub>	5,9 [5,5; 6,7]
Контроль 1 <sub>14</sub>	6,1 [5,8; 7,3]
Контроль 1 <sub>21</sub>	5,8 [5,1; 6,7]
Контроль 2	5,87 [5,65; 6,77]
Контроль 3	5,9 [5,73; 6,09]
Метионин 7 дней	9,25 [7,77; 10,7]* p=0,02
Метионин 14 дней	9,95 [8,90; 11,82]* p=0,01
Метионин 21 день	293,1 [273,1; 318,2] * p=0,001
Метионин +L-аргинин	92,8 [58,75; 112,07]***p=0,001;#p=0,002
Метионин +Карнитин	72,7 [55,27; 91,85] ***p=0,001; #p=0,002

*Примечание:*

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

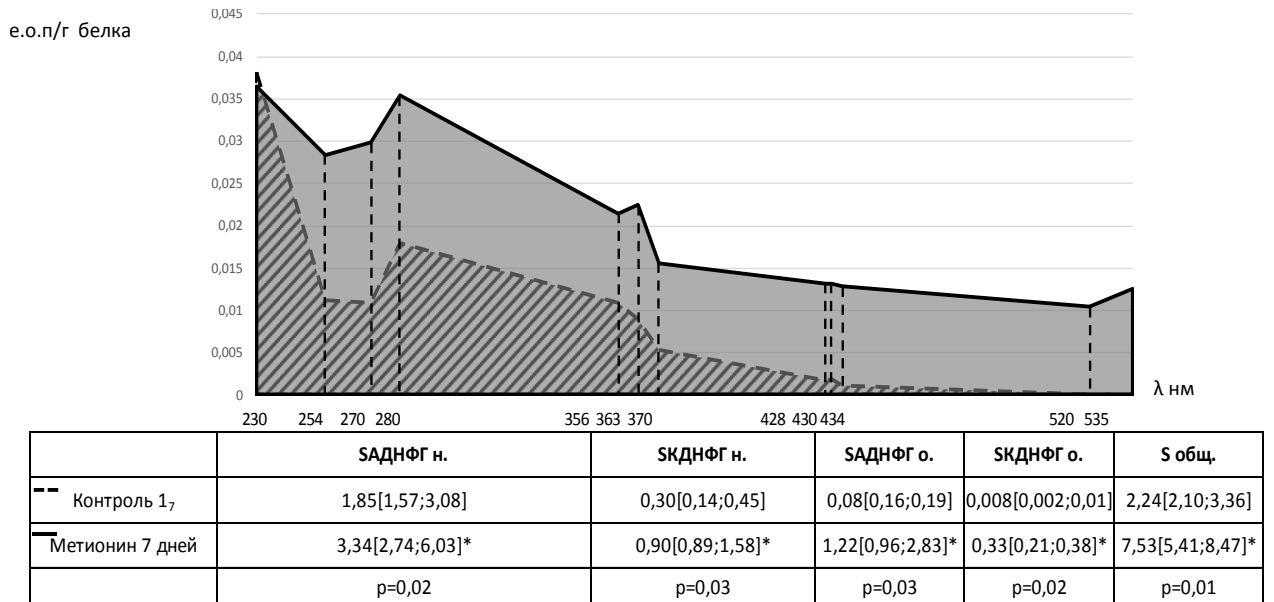
#-статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин (p<0,05)

Поскольку моделирование гипергомоцистеинемии и введение L-аргинина и карнитина не вызывали статистически значимых изменений концентрации белка в исследуемых мышечных тканях, значения исследуемых показателей выражали перерасчетом на 1 грамм белка.

### 3.2. Характеристика состояния окислительной модификации белков мышечных тканей

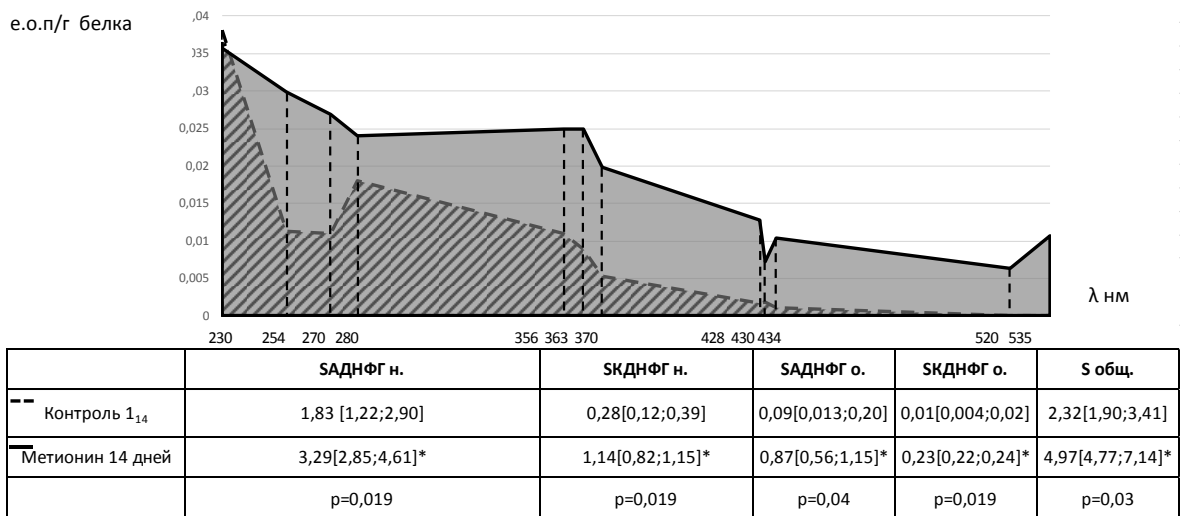
#### 3.2.1. Окислительная модификация белков при умеренной гипергомоцистеинемии

В сердечной мышце животных, получавших метионин в течение 7 дней и в течение 14 дней, обнаружено статистически значимое нарастание площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков. Причем, обнаружены однонаправленные незначительно отличающиеся изменения при 7-ми и 14- ти дневном введении метионина (рисунок 9, 10, 11).



Примечание: \* статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>7</sub> ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 9. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков миокарда при введении метионина в течение 7 дней относительно Контроля 1<sub>7</sub>



Примечание: \* статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>14</sub> ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 10. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков миокарда при введении метионина в течение 14 дней относительно Контроля 1<sub>14</sub>



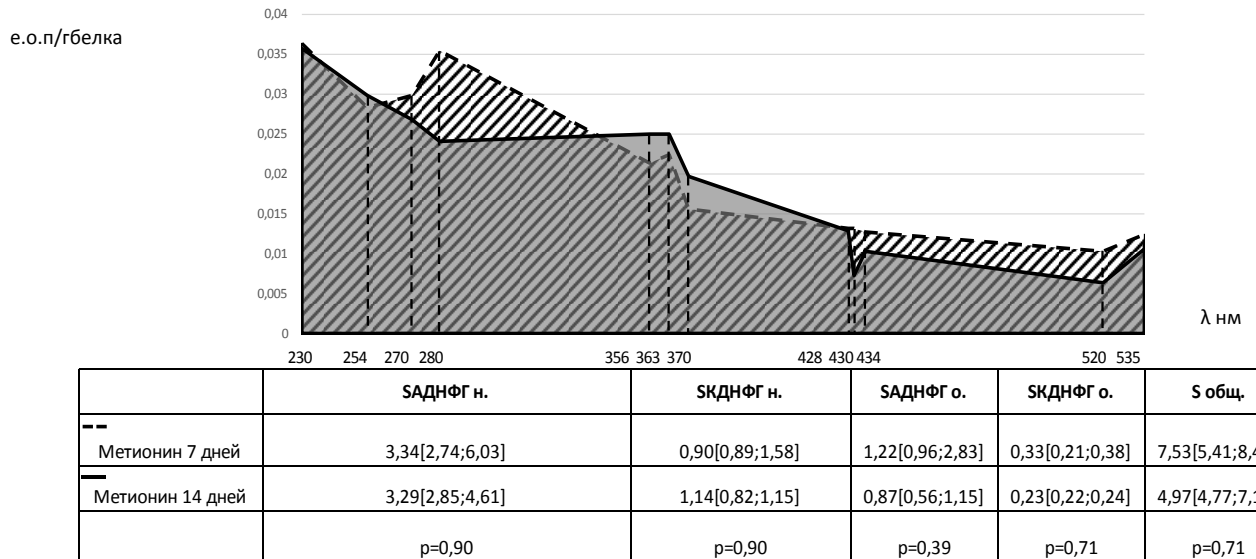


Рисунок 11. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков миокарда при умеренной гипергомоцистеинемии

При оценке отношения содержания первичных и вторичных маркеров в развитии оксидативного стресса в экспериментальных моделях, не было получено статистически значимых отличий, хотя прослеживалась тенденция к снижению доли первичных маркеров с соответствующим увеличением доли вторичных относительно контрольной выборки (табл. 3).

Таблица 3

Доля первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса миокарда крыс при умеренной гипергомоцистеинемии, (Ме [Q1;Q3])

	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 1 <sub>7</sub>	86,57 [78,65;93,30]	13,43 [6,71;21,35]
Метионин 7 дней	77,51 [75,97;79,43]	22,49 [20,57;24,03]
Контроль 1 <sub>14</sub>	83,72 [75,48;91,28]	16,28 [8,42;25,64]
Метионин 14 дней	79,84 [74,89;80,62]	20,16 [19,38;25,11]

Чтобы оценить степень толерантности белков к повреждающему воздействию свободных радикалов, была использована реакция Фентона, применяемая еще и для оценки антиоксидантных свойств различных веществ [73].

Оценивая резервно-адаптационный потенциал, рассчитанный по общему содержанию карбонильных производных сердечной мышцы в условиях 7- и 14-дневного введения метионина, не получили статистические значимые отличия от контрольной группы (рис. 12).

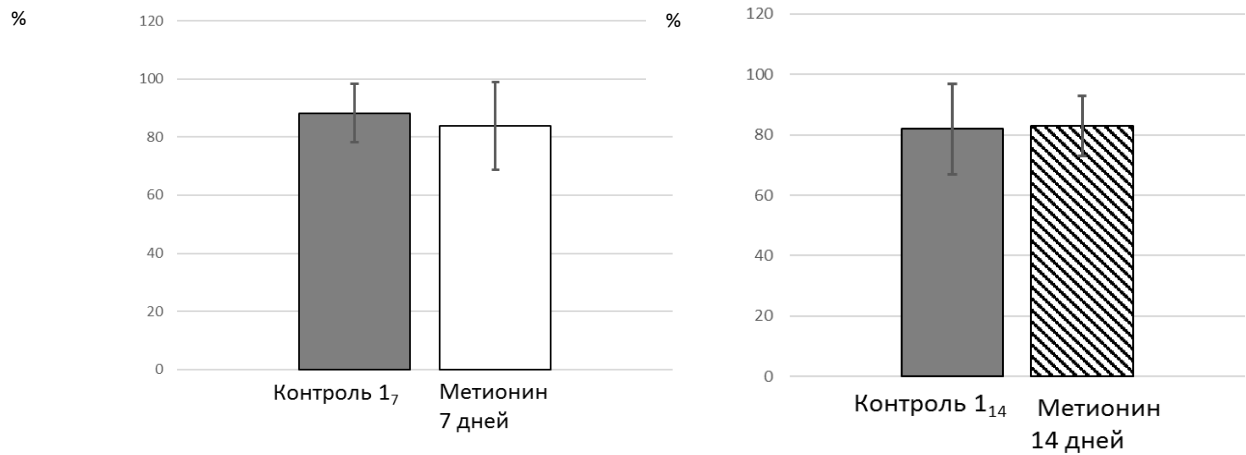


Рисунок 12. Резервно-адаптационный потенциал миокарда при умеренной гипергомоцистеинемии, (%)

Однако следует отметить, что при введении метионина в течение 7 дней получено статистически значимое снижение РАП за счет КДНФГ нейтрального, основного и АДНФГ основного характера в результате увеличения соответствующих долей спонтанной ОМБ. У животных, получавших метионин в течение 14 дней, статистически значимо снижался РАП только за счет АДНФГ и КДНФГ основного характера (табл. 4).

Таблица 4

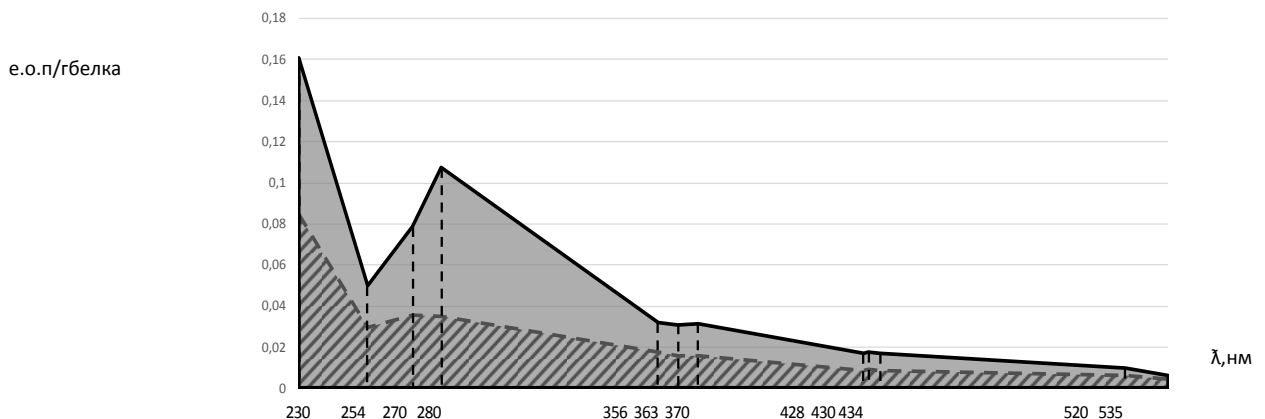
Сравнительный анализ резервно-адаптационного потенциала миокарда при умеренной гипергомоцистеинемии, % (Me [Q1;Q3])

	РАП АДНФГ <sub>н</sub>	РАП КДНФГ <sub>н</sub>	РАП АДНФГ <sub>о</sub>	РАП КДНФГ <sub>о</sub>
Контроль 1 <sub>7</sub>	84,56 [78,97;86,67]	92,69 [87,21;97,04]	98,25 [95,52;100,00]	98,93 [97,84;100,00]
Метионин 7 дней	76,13 [60,99;87,74]	87,69 [40,40;93,04]* p=0,02	88,18 [79,66;90,71]* p=0,031	83,71 [54,14;92,23]* p=0,031
Контроль 1 <sub>14</sub>	81,36	95,42	96,35	95,23

	[77,47;92,63]	[84,36;98,24]	[94,32;98,52]	[92,14;98,12]
Метионин	79,49	90,78	83,91	89,25
14 дней	[60,33;84,99]	[79,21;100,00]	[55,87;97,11]*	[57,70;92,69]*
			p=0,02	p=0,01

*Примечание:* \* статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p \leq 0,05$ )

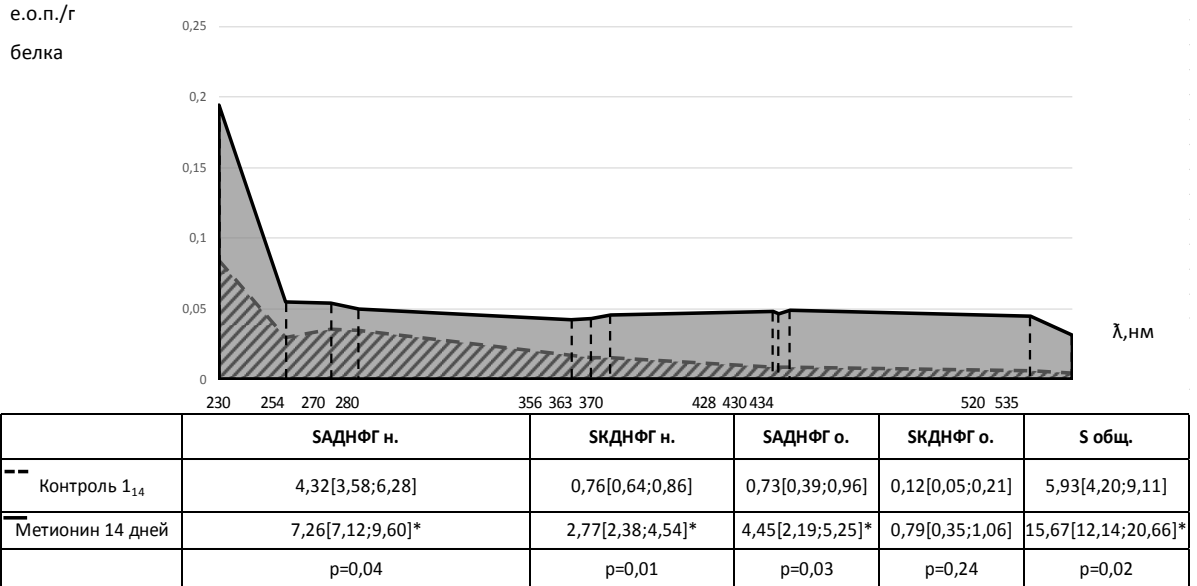
В скелетной мышце животных экспериментальных выборок, получавших метионин 7 и 14 дней, обнаружено статистически значимое нарастание площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков относительно контрольной группы (рис. 13, 14, 15).



	САДНФГ н.	СКДНФГ н.	САДНФГ о.	СКДНФГ о.	S общ.
--- Контроль 17	4,66[3,62;6,44]	0,84[0,67;0,96]	0,75[0,50;0,95]	0,13[0,07;0,20]	6,39[4,75;8,07]
— Метионин 7 дней	11,32[7,45;16,73]*	1,68[1,34;1,91]*	1,40[0,94;1,83]	0,20[0,12;0,35]	14,69[9,91;20,15]*
	p=0,04	p=0,01	p=0,13	p=0,15	p=0,03

*Примечание:* \* статистически значимые отличия от Контроля 17 ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 13. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков скелетной мышцы при введении метионина 7 дней относительно Контроля 17



Примечание: \* статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>14</sub> ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 14. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков скелетной мышцы при введении метионина 14 дней относительно контроля 1<sub>14</sub>

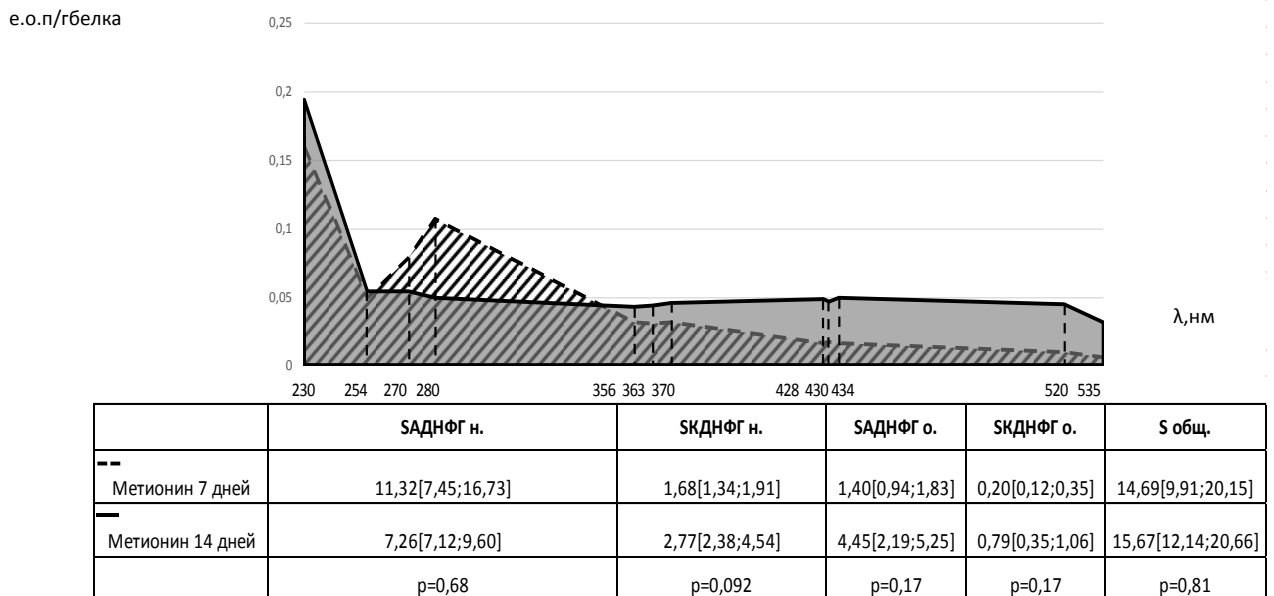


Рисунок 15. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков скелетной мышцы при умеренной гипергомоцистеинемии

При оценке путей развития оксидативного стресса, статистически значимые результаты были получены лишь для выборки с 14-дневным введением метионина относительно контроля. Доля первичных маркеров превалировала над долей вторичных маркеров окислительного стресса. Хотя, при сравнении с контрольной группой, получено статистически значимое увеличение доли

вторичных с соответствующим уменьшением доли первичных маркеров. При введении этой аминокислоты в течение 7 дней отличия от контроля оказались статистически незначимы (табл. 5).

Изменения общего резервно – адаптационного потенциала для обеих экспериментальных выборок оказались статистически незначимыми (рисунок 16), равно как и изменения резервно-адаптационного потенциала за счет доли кетонных и альдегидных динитрофенилгидразонов основного и нейтрального характера (табл. 6).

Таблица 5

Доля первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса скелетной мышцы крыс при умеренной гипергомоцистеинемии, % (Me [Q1;Q3])

	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 1 <sub>7</sub>	84,18 [82,92;85,22]	15,82 [14,78;17,08]
Метионин 7 дней	85,51 [84,10;87,33]	14,49 [12,67;15,90]
Контроль 1 <sub>14</sub>	85,16 [81,26; 87,12]	14,84[12,34; 18,45]
Метионин 14 дней	76,99 [75,61;77,89]* p=0,01	23,01 [22,11;24,39]* p=0,01

Примечание: \* статистически значимые отличия от соответствующего контроля (p≤0,05)

Таблица 6

Сравнительная оценка резервно – адаптационного потенциала скелетной мышцы при умеренной гипергомоцистеинемии, % (Me [Q1;Q3])

	РАП АДНФГ н	РАП КДНФГ н	РАП АДНФГ о	РАП КДНФГ о
Контроль 1 <sub>7</sub>	35,98 [22,34;49,18]	66,24 [48,05;67,52]	58,40 [30,62;77,83]	39,15 [14,08;54,09]
Метионин 7 дней	47,20 [37,81;90,28]	55,11 [21,98;62,67]	61,28 [34,46;43,06]	52,46 [33,73;60,41]
Контроль 1 <sub>14</sub>	36,38 [25,73;52,69]	64,17 [49,28;69,15]	59,84 [29,43;79,12]	41,28 [16,23;58,26]
Метионин 14 дней	68,22 [25,73;73,44]	46,42 [10,44;73,61]	61,63 [13,11;75,9]	71,13 [19,48;82,82]

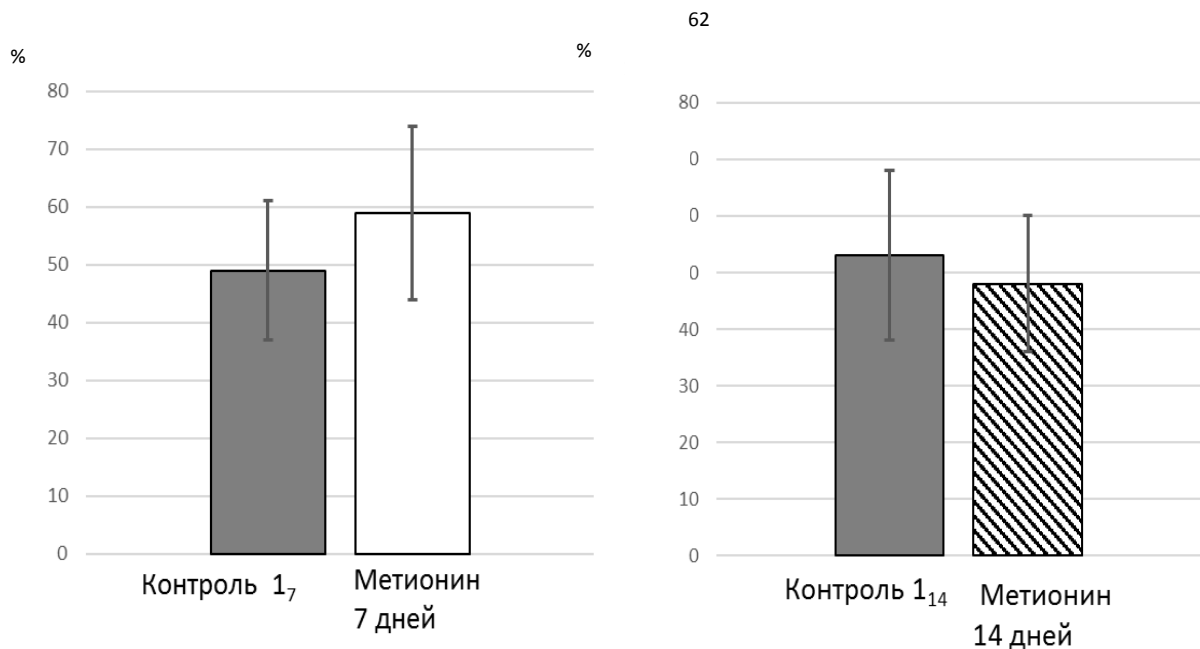


Рисунок 16. Общий резервно-адаптационный материал скелетной мышцы при умеренной гипергомоцистеинемии

При сравнительном анализе площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков грудной аорты, статистически значимых изменений при 7-дневном введении метионина выявлено не было. Однако, получено статистически значимое нарастание площади под кривой за счет АДНФГ и КДНФГ нейтрального характера при введении метионина в течение 14 дней относительно контрольной группы (рис. 17, 18, 19).

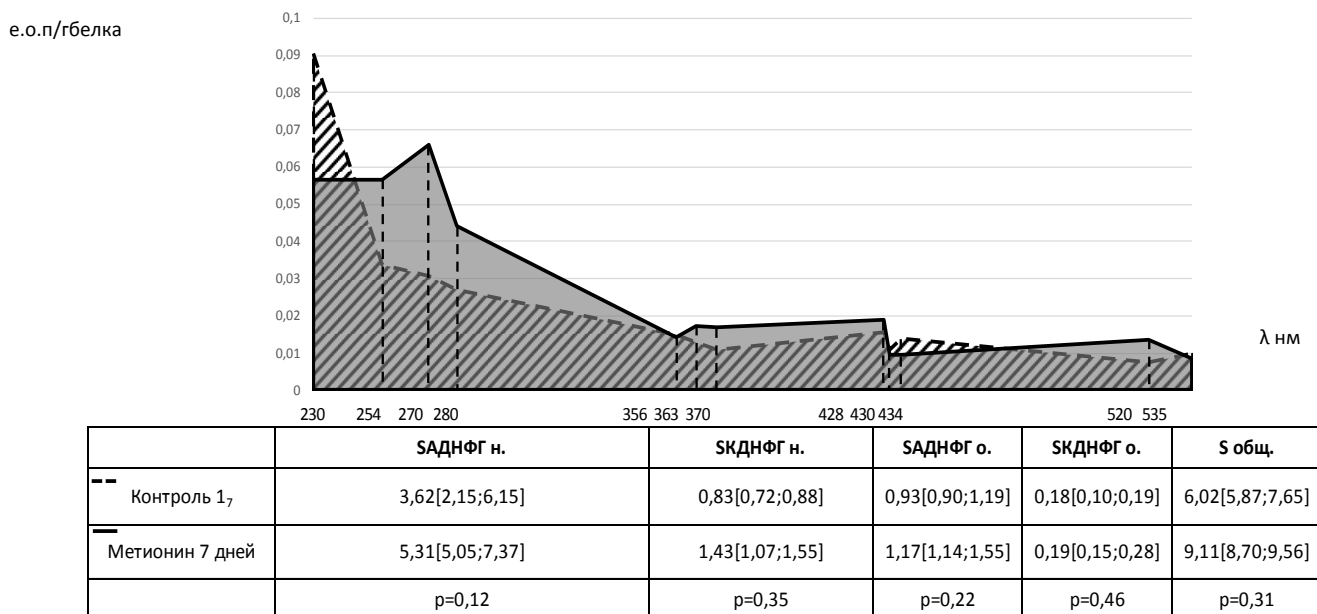
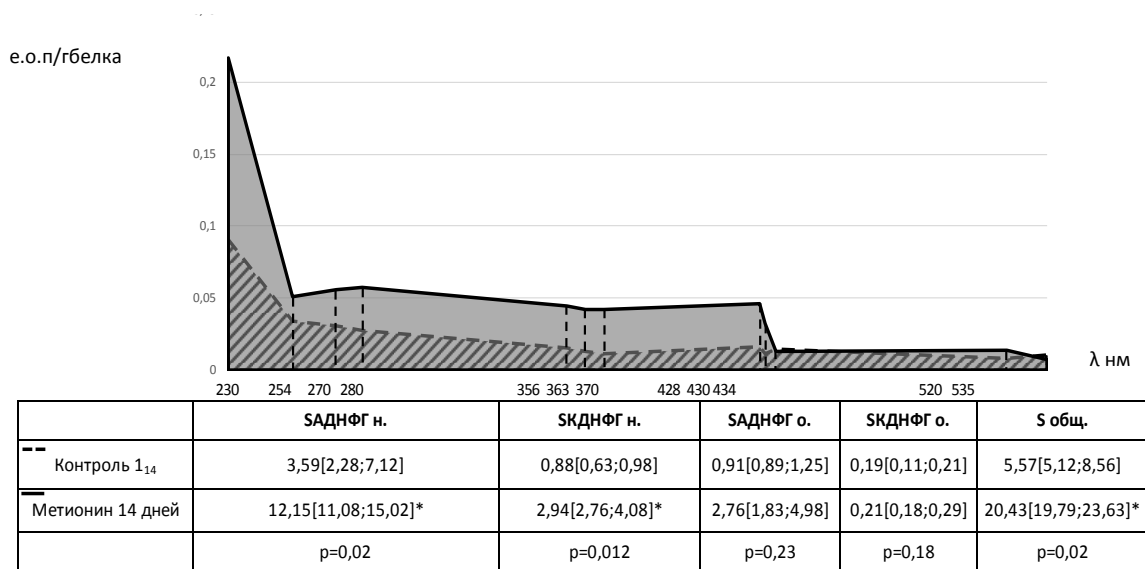
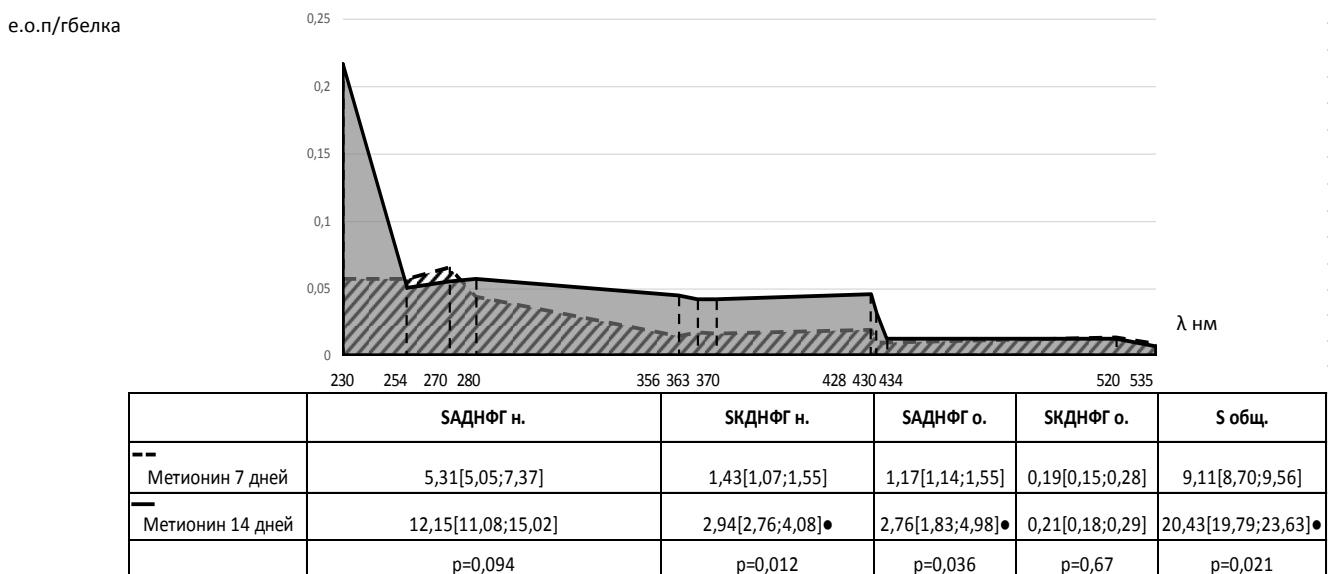


Рисунок 17. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков грудной аорты при введении метионина в течение 7 дней относительно Контроля 1<sub>7</sub>



Примечание: \* статистически значимые отличия от группы контроль 1<sub>14</sub> ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 18. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков грудной аорты при введении метионина в течение 14 дней относительно Контроля 1<sub>14</sub>



Примечание: • - статистически значимые отличия от группы метионин 7 дней ( $p \leq 0,05$ )

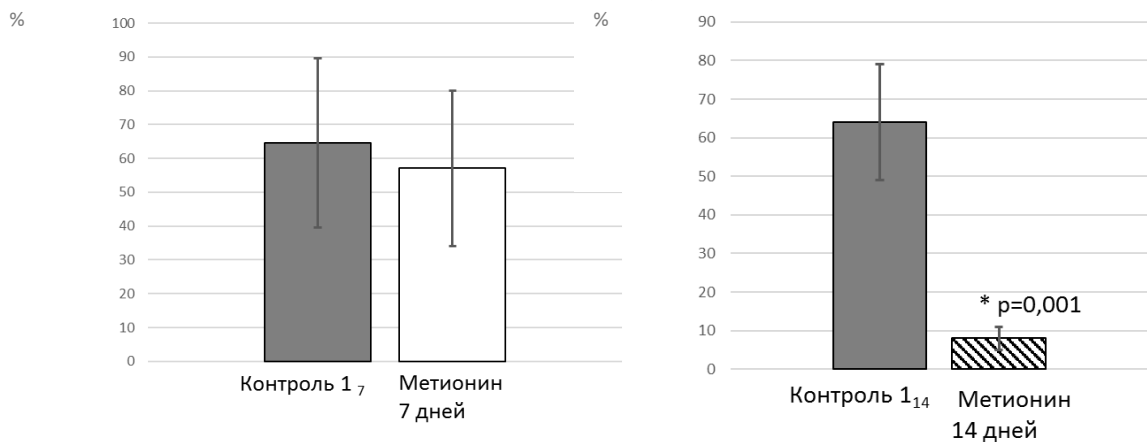
Рисунок 19. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков грудной аорты при умеренной гипергомоцистеинемии

Доля первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса в обеих экспериментальных выборках не претерпевала статистически значимых изменений относительно контроля (табл. 7).

Доля первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса грудной аорты крыс при умеренной гипергомоцистеинемии, % (Me [Q;1Q3])

	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 1 <sub>7</sub>	83,00[81,78;84,1]	17,00[15,9;18,22]
Метионин 7 дней	80,91[79,66;92,67]	19,09[7,33;20,34]
Контроль 1 <sub>14</sub>	80,70[78,26;86,32]	19,30[16,28;24,46]
Метионин 14 дней	80,38[78,60;85,12]	19,62[14,88;21,40]

В грудной аорте при введении метионина в течение недели статистически значимых отличий общего резервно – адаптационного потенциала не отмечалось. Но, наблюдалось статистически значимое снижение резервно – адаптационного потенциала при 14-дневном введении метионина за счет КДФГ нейтрального и АДНФГ основного характера (рис. 20, табл. 8).



Примечание: \*Статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 20. Общий резервно-адаптационный потенциал грудной аорты при умеренной гипергомоцистеинемии



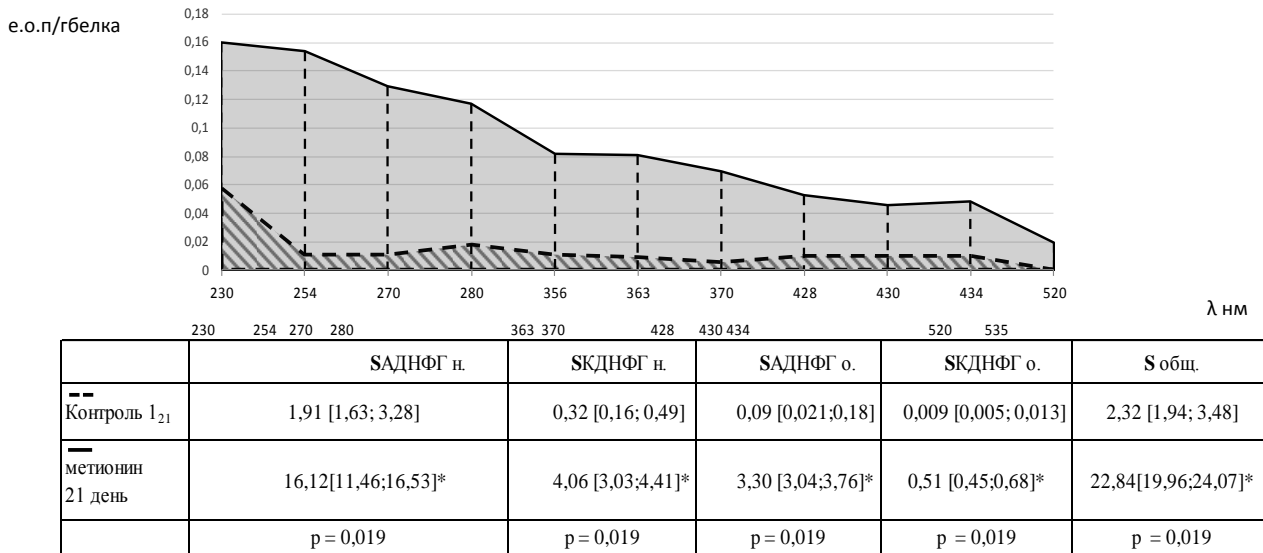
**Сравнительный анализ резервно-адаптационного потенциала грудной аорты при умеренной гипергомоцистеинемии, % (Ме [Q1;Q3])**

	РАП АДНФГ н	РАП КДНФГ н	РАП АДНФГ о	РАП КДНФГ о
Контроль 1 <sub>7</sub>	49,49 [33,63;70,47]	42,05 [27,83;61,02]	37,91 [22,15;85,08]	44,44 [8,53;88,18]
Метионин 7 дней	57,38 [35,49;66,82]	71,64 [27,22;88,01]	59,18 [35,23;64,67]	37,69 [4,94;81,08]
Контроль 1 <sub>14</sub>	51,24 [35,36;63,17]	42,05 [29,98;64,42]	37,91 [29,35;75,35]	42,18 12,35;79,36]
Метиони н 14 дней	11,11 [7,01;45,64]* p=0,029	12,91 [3,69;31,50]* p=0,029	10,09 [8,25;43,73]* p=0,029	56,68 [11,49;69,04]

*Примечание:* \* статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p \leq 0,05$ )

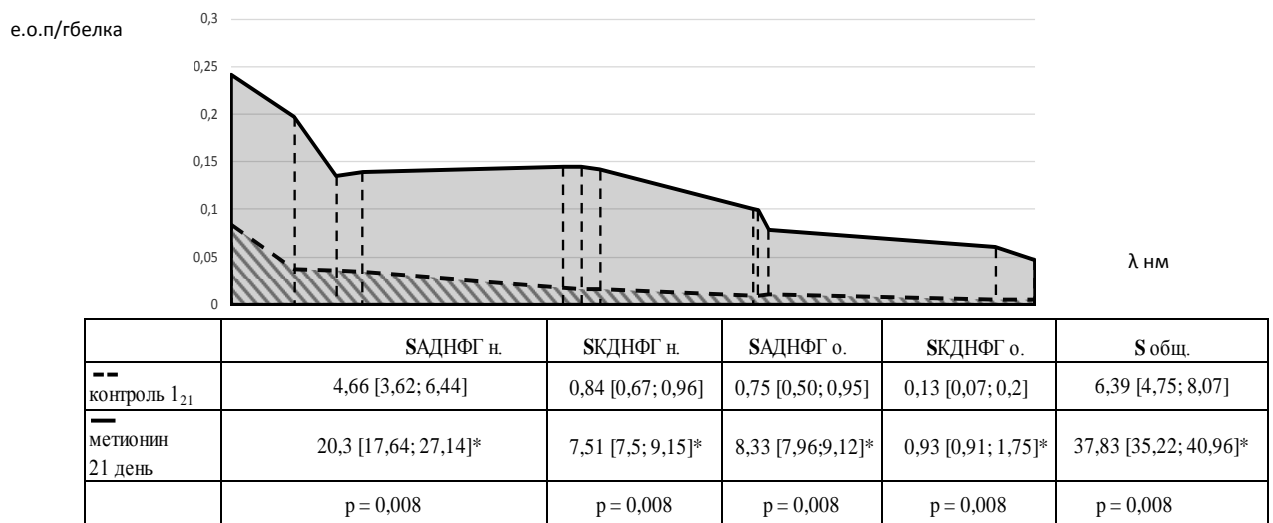
### **3.2.2. Окислительная модификация белков при выраженной гипергомоцистеинемии**

Сопоставляя результаты ОМБ при ежедневном внутривенном введении суспензии метионина в течение 21 дня в испытуемых группах, получили статистически значимое увеличение площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков в гомогенатах мышечных тканей по сравнению с контрольными. На фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии обнаружено статистически значимое нарастание альдегидных, кетоновых динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера. Причем, анализируя каждый вид исследуемой мышечной ткани, мы обнаружили однонаправленные изменения, без присутствия тканевой специфичности (рис. 21, 22, 23).



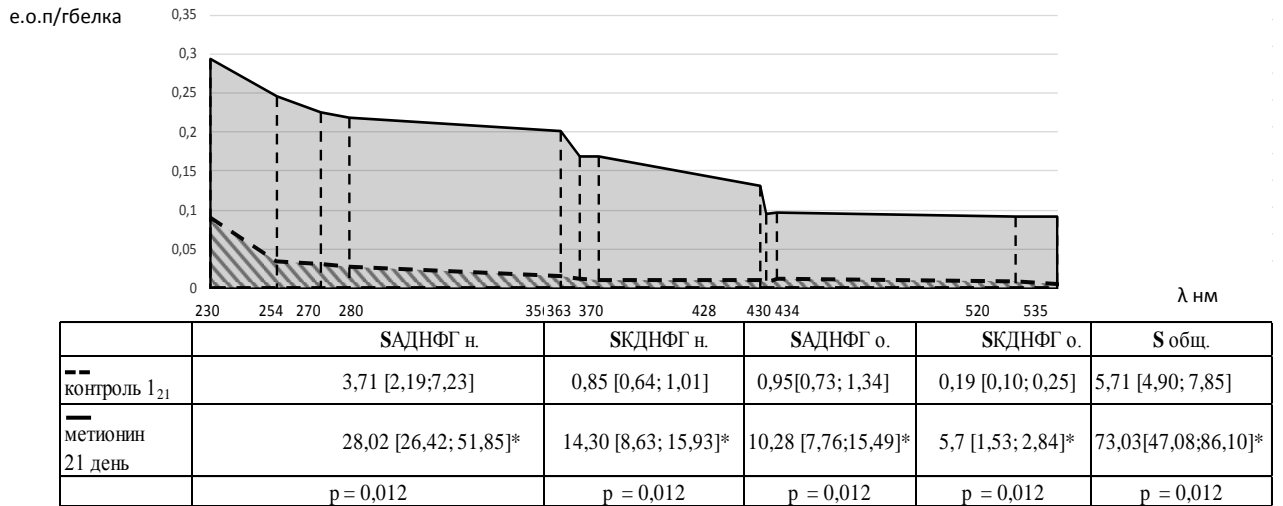
Примечание: \* статистически значимые отличия от группы Контроль 1<sub>21</sub> ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 21. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков миокарда при выраженной гипергомоцистеинемии относительно Контроля



Примечание: \* статистически значимые отличия от группы Контроль 1<sub>21</sub> ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 22. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков скелетной мышцы при выраженной гипергомоцистеинемии относительно Контроля



*Примечание:* \* статистически значимые отличия от группы Контроль 1<sub>21</sub> ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 23. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков грудной аорты при гипергомоцистеинемии относительно Контроля

В миокарде животных экспериментальной и контрольной групп содержание АДНФГ, выступающих в роли первичных маркеров оксидативного стресса [34], значительно превышает содержание КДНФГ. Последние, по сравнению, с показателями контрольной группой, ощутимо выросли (табл. 9). Хотя нами не были получены статистически значимые отличия для кетоновых и альдегидных динитрофенилгидразонов, можно все же предположить, что, превалирование первичных маркеров оксидативного стресса, указывает на персистенцию фрагментов [34] окислительно поврежденных белков в сердечной мышце, оказывающих повреждающее воздействие на кардиомиоциты и нарушению их сократительной функции. Предположительно, высокие концентрации гомоцистеина приводят к формированию смешанных дисульфидов и дополнительному образованию активных форм кислорода, и, как следствие, возникновению оксидативных нарушений в ткани миокарда.

Таблица 9

Доля первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса миокарда крыс при выраженной гипергомоцистеинемии, % Me [Q1;Q3]

	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 1 <sub>21</sub>	86,79 [74,12;93,69]	13,79 [5,18;24,61]
Метионин 21 день	77,87 [76,24;79,58]	22,13 [20,42;23,76]

В скелетной мышце было получено статистически значимое изменение соотношения первичных и вторичных маркеров окислительного стресса: доля вторичных увеличивалась с соответствующим снижением доли первичных маркеров (табл.10).

Таблица 10

Доля первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса скелетной мышцы крыс при выраженной гипергомоцистеинемии, % Me [Q1;Q3]

	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 1 <sub>21</sub>	84,91 [80,45;89,38]	15,09 [12,28;19,46]
Метионин 21 день	75,65 [73,73;77,75]* p=0,02	24,35 [22,25;26,27]* p=0,02

*Примечание:* \* статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>21</sub> (p≤0,05)

Тенденция к нарастанию кетоновых динитрофенилгидразонов, выступающих в роли вторичных маркеров, и снижению альдегидных (первичные маркеры) в условиях выраженной гипергомоцистеинемии наблюдалась при оценке путей развития оксидативного стресса в грудной аорте, хотя полученные изменения оказались статистически незначимыми (табл. 11).

Доля первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса грудной аорты крыс при выраженной гипергомоцистеинемии, % (Ме [Q1;Q3])

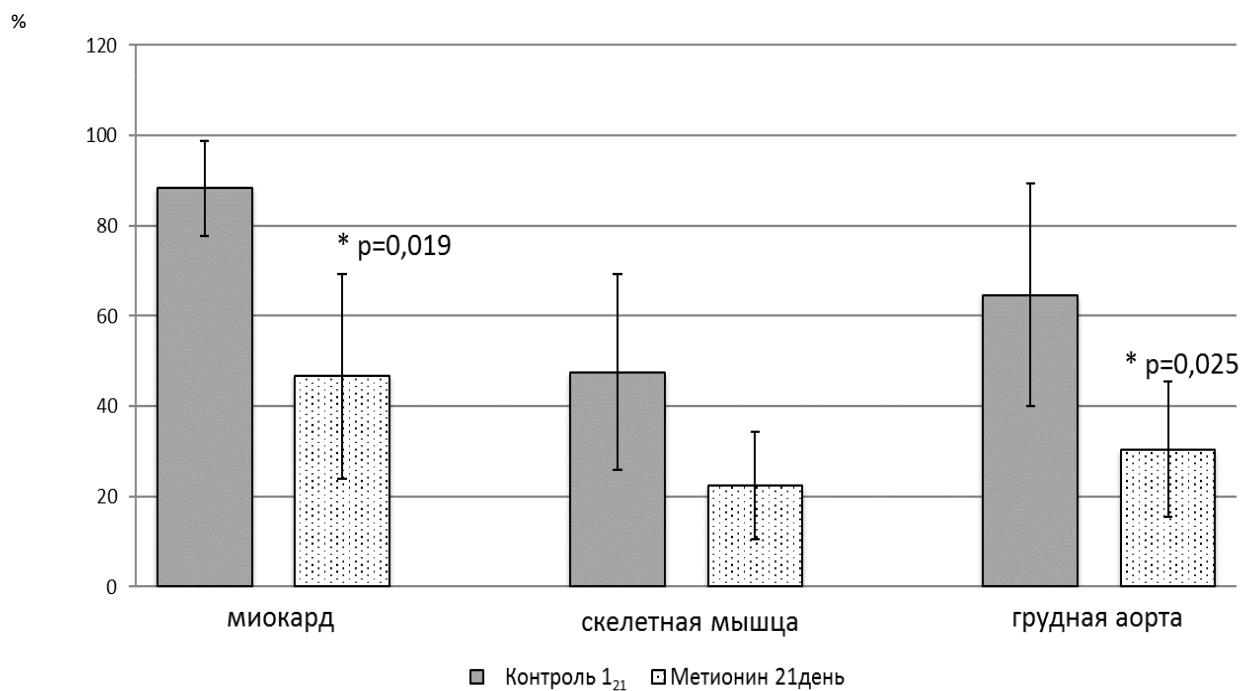
	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 1 <sub>21</sub>	81,60 [76,11;89,45]	18,40 [14,35;21,32]
Метионин 21 день	78,20 [77,96;78,28]	21,80 [21,72;22,04]

Во всех исследуемых органах доля АДНФГ контрольной группы оказалась выше, той же доли при гипергомоцистеинемии, а вот доля КДНФГ, как вторичного маркера окислительного стресса, оказалась выше в экспериментальной выборке по отношению к группе сравнения, что доказывает развитие достаточно интенсивного окислительного повреждения, сопровождающегося дополнительным образованием агрегированных окисленных молекул.

Еще одним вопросом проведенного исследования являлась оценка резервно – адаптационного потенциала сердечной, скелетной мышц и грудной аорты. С помощью этого параметра возможно косвенно оценить антиоксидантную возможность исследуемых органов при выраженной гипергомоцистеинемии по сравнению с контрольной группой.

При экспериментальной гипергомоцистеинемии получили статистически значимое снижение общего резервно-адаптационного потенциала в сердечной мышце относительно контрольной группы, что говорит об истощении резервных возможностей миокарда. У животных контрольной группы мы видим значительную устойчивость кардиомиоцитов по сравнению с экспериментальной выборкой (рис. 24). Причем, снижение общего резервно – адаптационного потенциала обусловлено статистически значимым нарастанием доли спонтанного окисления в индуцированном АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера (табл. 12). Для скелетной мышцы не были получены статистически значимые изменения РАП, хотя тенденция к его истощению наблюдалась (рис. 24,

табл. 12). Для грудной аорты были получены статистически значимые изменения общего резервно-адаптационного потенциала за счет долей АДНФГ и КДНФГ нейтрального характера (рис. 24, табл. 12) относительно животных контрольной группы, что подтверждает предположение о негативном влиянии гипергомоцистеинемии за счет формирования оксидативного стресса.



*Примечание:* \*Статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 24. Общий резервно-адаптационный потенциал миокарда, скелетной мышцы, грудной аорты при выраженной гипергомоцистеинемии

Сравнительная оценка резервно-адаптационного потенциала мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии, % (Ме [Q1;Q3])

		РАП АДНФГ н	РАП КДНФГ н	РАП АДНФГ о	РАП КДНФГ о
Миокард	Контроль 1 <sub>21</sub>	81,26 [79,47;86,67]	91,79 [84,12;95,42]	96,52 [90,32;98,09]	96,38 [94,41;98,01]
	Метионин 21 день	26,58 [21,59;38,71]* p=0,001	50,47 [48,89;66,2]* p=0,01	64,90 [59,25;71,9]* p=0,01	73,39 [60,21;75,62]* p=0,01
Скелетная мышца	Контроль 1 <sub>21</sub>	36,89 [20,74;48,21]	64,35 [47,25;62,51]	59,42 [31,26;79,38]	38,25 [13,81;55,49]
	Метионин 21 день	20,07 [19,75;22,29]	26,64 [26,63;44,42]	27,47 [20,39;36,86]	36,38 [13,83;39,79]
Грудная	Контроль 1 <sub>21</sub>	48,34 [31,23;71,17]	41,25 [28,38;62,12]	35,98 [20,15;84,08]	43,24 [10,31;78,15]
	Метионин 21 день	16,05 [8,75;20,07]* p=0,02	38,15 [22,65;46,26]* p=0,02	33,28 [20,6;80,65]	36,01 [27,47;79,98]

Примечание: \* статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>21</sub> (p≤0,05)

Окислительный стресс может приводить к возникновению дисфункций различных органелл клетки, дискоординации процессов транскрипции, трансляции ДНК и РНК [229,256]. К примеру, нарушение функций митохондрий приводит к повышенному супероксидобразованию [90,166], что увеличивает вероятность повреждения скелетной мускулатуры, миокарда свободными радикалами и, как следствие, повышенное окисление миоглобина [194], а также нарушение процессов связывания Ca<sup>2+</sup> с тропонином и усиление взаимодействия с другими сократительными белками, что приводит к ослаблению сократительной способности мышечных клеток. Можно предположить, что развитие окислительного стресса может инициировать процессы некроза или апоптоза

миоцитов, кардиомиоцитов, клеток эндотелия с накоплением продуктов белковой деградации не только в клеточных органеллах, но и внеклеточно, тем самым подавляя функцию протеасом [171,275].

### **3.3. Влияние аргинина и карнитина на окислительную модификацию белков при выраженной гипергомоцистеинемии**

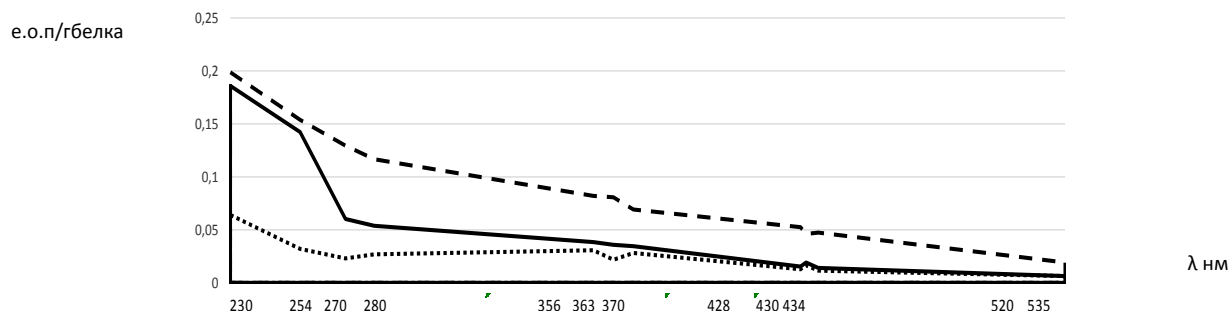
Поскольку более выраженные изменения процесса карбонилирования белков демонстрировала экспериментальная модель с 21-дневным введением метионина (выраженная гипергомоцистеинемия), эффекты влияния аргинина и карнитина изучались именно на ней.

#### **3.3.1. Влияние аргинина на окислительную модификацию белков при выраженной гипергомоцистеинемии**

Введение аргинина животным на фоне Твин 80 (Контроль 2) и животным на фоне введения метионина в течение 21 дня привело к следующим результатам.

В миокарде у животных, получавших аргинин на фоне метионина, обнаружено статистически значимое нарастание площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков за счет альдегидных динитрофенилгидразонов нейтрального характера, относительно группы животных получавших аргинин с Твин 80. К тому же, обнаружено статистически значимое снижение площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков за счет АДНФГ и КДНФГ основного и КДНФГ нейтрального характера относительно показателей у животных с выраженной гипергомоцистеинемией (рисунок 25).





	САДНФГ н.	СКДНФГ н.	САДНФГ о.	СКДНФГ о.	S общ.
..... контроль 2	3,93 [3,54; 6,34]	1,42 [0,99; 1,72]	0,87 [0,82; 1,13]	0,13 [0,11; 0,19]	6,17 [5,87; 8,08]
-- метионин	16,12[11,46;16,53]	4,06 [3,03;4,41]	3,30 [3,04;3,76]	0,51 [0,45;0,68]	22,84[19,96;24,07]
— аргинин + метионин	9,86[9,21;11,08]*	1,82 [1,28; 1,92]#	1,01[0,72; 1,42]#	0,17 [0,15; 0,23]#	12,75 [11,68; 14,43]*#
	*p = 0,005	#p=0,013	#p=0,008	#p=0,008	*p = 0,008 #p=0,035

*Примечание:* \* статистически значимые отличия от Контроля 2 ( $p \leq 0,05$ )

#- статистически значимые отличия относительно группы метионин 21 день ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 25. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков миокарда при введении аргинина относительно контроля 2 и группы метионин 21 день

В ходе анализа соотношения первичных и вторичных маркеров окислительного стресса в миокарде были получены статистически значимые отличия для группы животных, получавших аргинин на фоне метионина относительно Контроля 2, а именно: доля первичных маркеров увеличивалась с соответствующим снижением вторичных маркеров. Изменения относительно выборки с гипергомоцистеинемией оказались статистически незначимыми (табл. 13).

Таблица 13

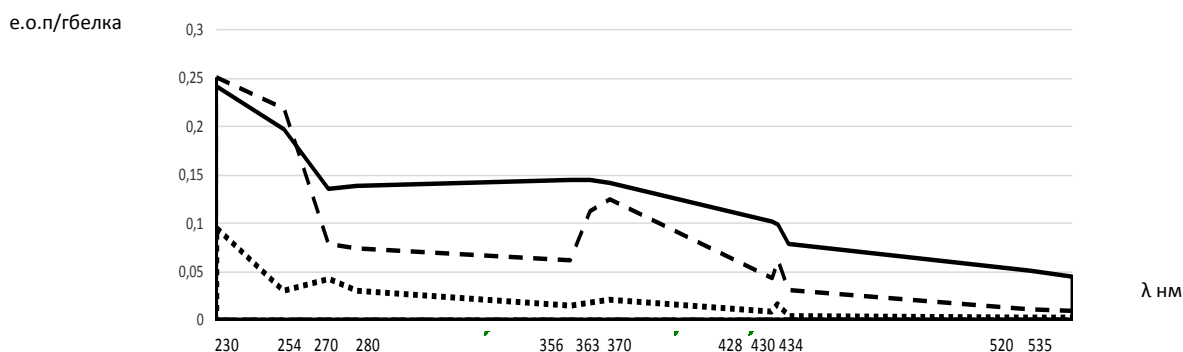
Сравнительный анализ долей первичных и вторичных маркеров окислительного стресса миокарда крыс при введении аргинина, % Me [Q1;Q3])

	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 2	79,51 [72,57;82,08]	20,49 [17,92;27,43]
Метионин 21 день	77,87 [76,24;79,58]	22,13 [20,42;23,76]
Метионин+аргинин	85,23 [83,78;88,13]* p=0,02	14,77 [11,87;16,22]* p=0,02

*Примечание:* \* статистически значимые отличия от Контроля 2 ( $p \leq 0,05$ )

В скелетной мышце введение аргинина на фоне метионина, привело к статистически значимому нарастанию площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков за счет всех групп изучаемых динитрофенилгидразонов относительно Контроля 2. Статистически значимое снижение продуктов окислительного изменения белков под влиянием аргинина, отмечалось лишь для АДНФГ и КДНФГ основного характера относительно выборки животных с гипергомоцистеинемией (рис. 26).

Соотношение первичных и вторичных маркеров окислительного стресса оказалось статистически значимым для группы животных, получавших аргинин на фоне метионина относительно Контроля 2: увеличение доли вторичных с соответствующим снижением доли первичных маркеров, что говорит о преобладании агрегированных белковых конгломератах. Изменения относительно выборки, с тяжелой формой гомотеинемией, оказались статистически незначимыми (табл. 14).



	САДНФГ н.	СКДНФГ н.	САДНФГ о.	СКДНФГ о.	S общ.
..... контроль 2	4,28 [3,97; 4,55]	0,95 [0,85; 1,05]	0,51 [0,43; 0,57]	0,09 [0,05; 0,10]	5,78 [5,24; 6,22]
— метионин	20,3 [17,64; 27,14]	7,51 [7,5; 9,15]	8,33 [7,96; 9,12]	0,93 [0,91; 1,75]	37,83 [35,22; 40,96]
- - - метионин + аргинин	14,03 [13,50; 24,66]*	5,72 [5,11; 7,33]*	2,48 [2,32; 3,61]*#	0,37 [0,29; 0,50]*#	22,23 [21,50; 36,20]*
	*p = 0,005	*p = 0,005	*p = 0,005 #p=0,008	*p = 0,005 #p=0,008	*p = 0,005

Примечание: \* статистически значимые отличия от Контроля 2 ( $p \leq 0,05$ );

#- статистически значимые отличия относительно группы метионин 21 день ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 26. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков скелетной мышцы при введении аргинина относительно контроля 2 и группы метионин 21 день

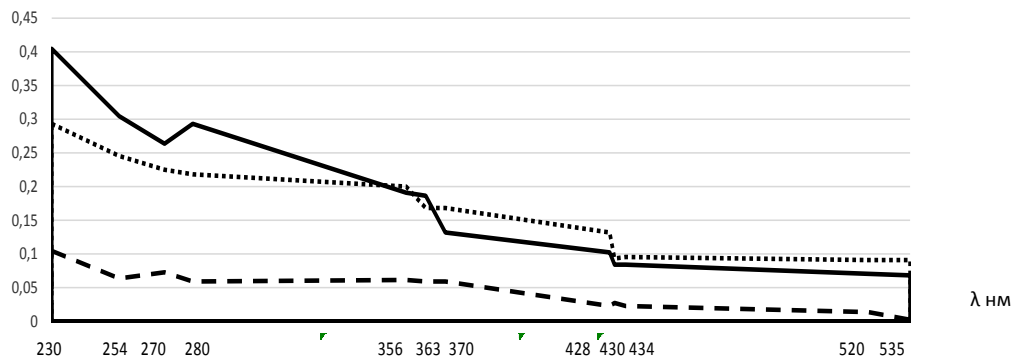
**Сравнительный анализ долей первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса скелетной мышцы крыс при введении аргинина, % (Me[Q1;Q3] )**

	Доля первичных маркеров,%	Доля вторичных маркеров,%
Контроль 2	82,51[80,13;83,34]	17,49[16,66;19,87]
Метионин 21 день	75,65 [73,73;77,75]	24,35 [22,25;26,27]
Метионин+аргинин	75,62 [73,74;78,76]* p=0,031	24,38 [21,24;26,26]* p=0,031

*Примечание:* \* статистически значимые отличия от Контроля 2 ( $p \leq 0,05$ )

В грудной аорте статистически значимые отличия общей площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков были получены у животных, получавших совместно аргинин и метионин относительно Контроля 2. Статистически значимых изменений показателей у животных, получавших аргинин на фоне метионина, относительно выборки с гипергомоцистеинемией не было (рис.27).

е.о.п/гбелка



	САДНФГ н.	СКДНФГ н.	САДНФГ о.	СКДНФГ о.	S общ.
--- контроль 2	9,25 [6,09;10,27]	2,81 [2,18;3,17]	1,48 [1,03;2,23]	0,26 [0,14;0,41]	13,90 [9,82;17,67]
.... метионин	28,02 [26,42; 51,85]	14,30 [8,63; 15,93]	10,28 [7,76;15,49]	1,74 [1,53; 2,84]	73,03[47,08;86,10]
- метионин + аргинин	38,05[25,78;40,66]*	7,24 [6,14;11,41]*	8,02 [5,71;9,76]*	1,39 [0,99;1,83]*	54,12[38,64;72,01]*
	p = 0,008	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,008

*Примечание:* \* статистически значимые отличия от группы «метионин 21», ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 27. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков грудной аорты при введении аргинина относительно контроля 2 и группы метионин 21 день

Соотношение первичных и вторичных маркеров окислительного стресса в грудной аорте оказалось статистически незначимо у группы животных, получавших метионин совместно с аргинином относительно выборок, получавших изолированно метионин и аргинин на фоне Твин 80 (Контроль 2) (табл. 14).

Таблица 14

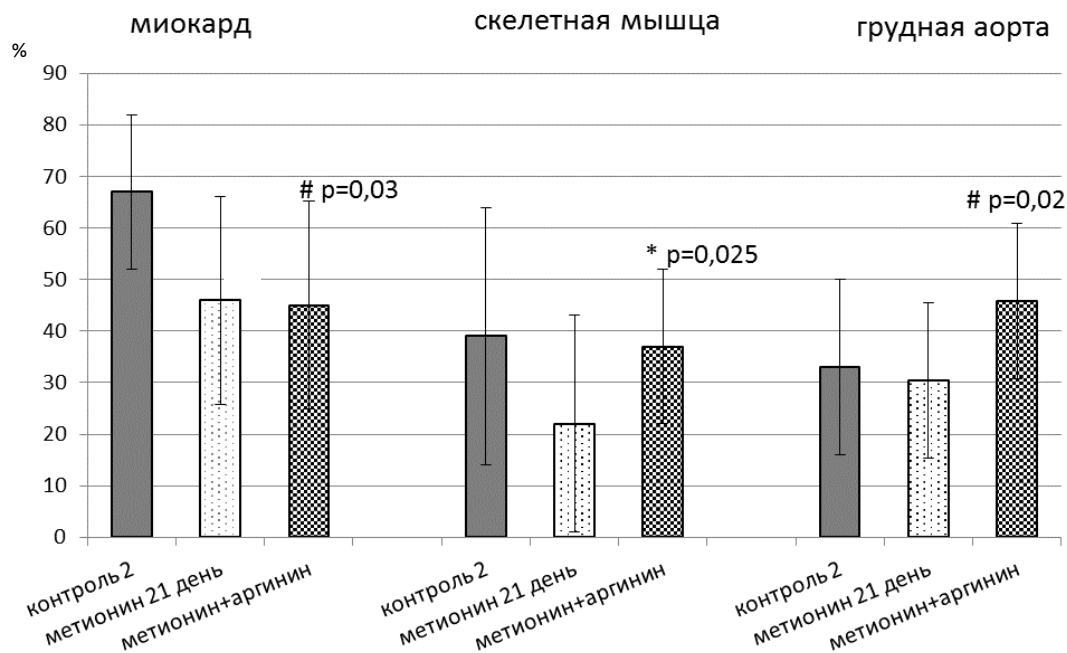
Сравнительный анализ долей первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса стенки грудной аорты крыс при введении аргинина, % (Ме [Q1;Q3])

	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 2	79,58[75,55;82,3]	20,42[17,7;24,45]
Метионин 21 день	78,20 [77,96;78,28]	21,80 [21,72;22,04]
Метионин+аргинин	80,62[76,58;83,93]	19,38[16,07;23,42]

РАП миокарда статистически значимо снижался в группе животных, получавших аргинин на фоне метионина, относительно контроля 2. Положительного влияния аргинина на РАП при гипергомоцистеинемии не отмечалось (рис. 28, табл. 15).

В скелетной мышце РАП в выборке, получавшей метионин с аргинином, статистически значимо снижался за счет КДФГ основного характера относительно группы животных, получавших аргинин на фоне Твин 80 (Контроль2). Изменения относительно группы, с изолированным введением метионина, оказались статистически не значимыми (рис. 28, табл. 15).

В грудной аорте, были получены статистически значимые изменения общего РАП за счет КДФГ и АДНФГ нейтрального характера для группы животных, получавших аргинин с метионином относительно выборки с изолированным введением метионина (рис. 28, табл. 15).



Примечание: \* статистически значимые отличия от Контроля 2 ( $p \leq 0,05$ );

#- статистически значимые отличия относительно группы метионин 21 день ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 28. Сравнительный анализ общего резервно-адаптационного потенциала мышечных тканей при введении аргинина относительно контроля 2 и группы «метионин 21 день»

Таблица 15

Сравнительный анализ резервно – адаптационного потенциала при введении аргинина относительно контроля 2 и группы метионин 21 день, %

Me [Q1;Q3]

		РАП АДНФГ н	РАП КДНФГ н	РАП АДНФГ о	РАП КДНФГ о
Миокард	Контроль 2	66,66 [64,19;67,17]	66,94 [55,35;73,13]	71,12 [69,05;72,89]	73,22 [70,07;75,67]
	Метионин 21 день	26,58 [21,59;38,71]	50,47 [48,89;66,2]	64,90 [59,25;71,9]	73,39 [60,21;75,62]
	Метионин+ аргинин	47,23 [42,2;50,95]* p=0,025	42,14 [29,58;63,04]	52,64 [33,8;73,25]	46,93 [32,39;64,66]
Скелетная мышца	Контроль 2	33,25 [30,71;37,19]	50,44 [42,04;55,33]	56,62 [52,06;66,61]	51,74 [41,9;67,21]
	Метионин 21 день	20,07 [19,75;22,29]	26,64 [26,63;44,42]	27,47 [20,39;36,86]	36,38 [13,83;39,79]

	Метионин+ аргинин	44,29 [38,73;59,54]	16,81 [13,56;28,99]	47,72 [29,89;56,15]	24,08 [14,21;34,51]* p=0,02
Грудная аорта	Контроль 2	33,93 [17,13;50,4]	41,15 [23,9;51,45]	29,34 [8,77;44,65]	8,65 [2,02;29,89]
	Метионин 21 день	30,45 [15,04;33,60]	16,05 [8,75;20,07]	38,15 [22,65;46,26]	33,28 [20,6;80,65]
	Метионин+ аргинин	45,82 [26,11;52,5] # p=0,02	36,74 [32,49;44,02]*# *p=0,001 #p=0,02	52,85 [29,61;57,64]	42,75 [38,67;63,37]

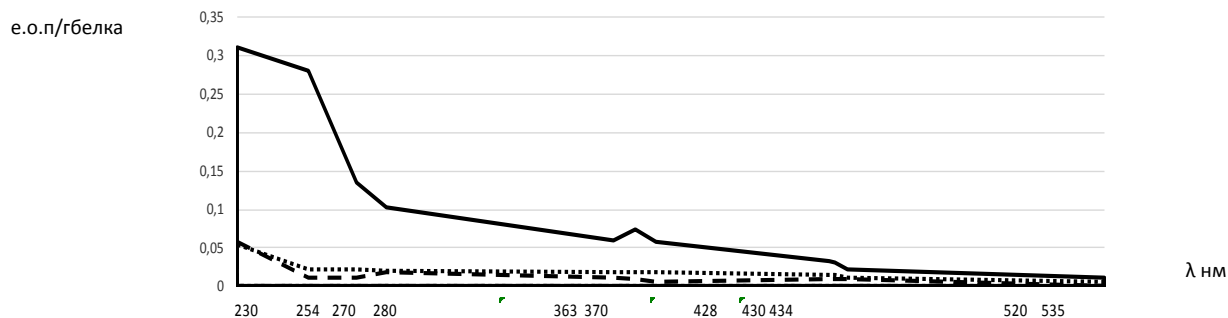
*Примечание:* \* статистически значимые отличия от Контроля 2 ( $p \leq 0,05$ );

#- статистически значимые отличия относительно группы «метионин 21 день» ( $p \leq 0,05$ )

### 3.3.2. Влияние карнитина на окислительную модификацию белков при выраженной гипергомоцистеинемии

При введении карнитина животным на фоне Твин 80 (Контроль 3) и животным на фоне метионина в течение 21 дня привело к следующим результатам.

В миокарде животных, получавших карнитин на фоне метионина, обнаружены статистически значимые изменения площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков за счет альдегидных и кетоновых динитрофенилгидразонов нейтрального характера относительно Контроля 3(карнитин + Тин 80). Изменения относительно выборки с введением метионина оказались статистически незначимыми (рис. 29).



	САДНФГ н.	СКДНФГ н.	САДНФГ о.	СКДНФГ о.	S общ.
..... контроль 3	2,98 [2,14; 6,74]	1,01 [0,91; 1,59]	0,94 [0,67; 1,26]	0,13 [0,10; 0,17]	4,78 [4,35; 8,60]
--- метионин	16,12[11,46;16,53]	4,06 [3,03;4,41]	3,30 [3,04;3,76]	0,51 [0,45;0,68]	22,84[19,96;24,07]
-·- карнитин + метионин	19,67[14,77;22,92]*	2,87 [2,39; 4,47]*	2,12[1,18; 4,39]	0,35 [1,17; 0,50]	24,34 [19,58; 32,13]*
	*p = 0,005	*p=0,013	p=0,21	p=0,31	*p = 0,005

Примечание: \* статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>21</sub> (p≤0,05)

Рисунок 29. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков миокарда при введении карнитина относительно контроля 3 и группы «метионин 21 день»

Доля первичных маркеров окислительного стресса статистически значимо возросла, а доля вторичных снизилась при совместном введении метионина и карнитина относительно контроля 3 и выборки с гипергомоцистеинемией (табл. 16).

Таблица 16

Сравнительный анализ долей первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса миокарда крыс при введении карнитина, % Me [Q14Q3]

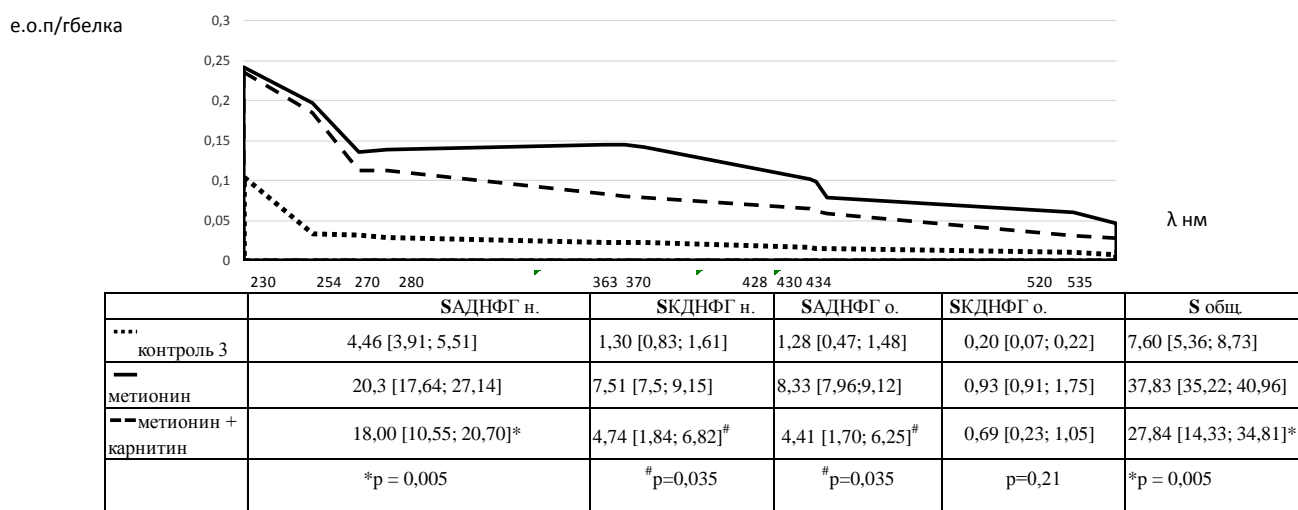
	Доля первичных маркеров,%	Доля вторичных маркеров,%
Контроль 3	77,98[77,17;79,67]	22,02[20,33;22,83]
Метионин 21 день	77,87 [76,24;79,58]	22,13 [20,42;23,76]
Метионин+карнитин	86,15 [83,75;87,58]*# *p=0,02; #p=0,02	13,85 [12,42;16,25]*# *p=0,02; #p=0,02

Примечание: \* статистически значимые отличия от Контроля 3 (p≤0,05);

#- статистически значимые отличия относительно группы метионин 21 день (p≤0,05)

В скелетной мышце экспериментальных животных, получавших карнитин на фоне метионина обнаружено статистически значимое нарастание площади под

кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков за счет альдегидных динитрофенилгидразонов нейтрального характера относительно выборки, получавшей карнитин на фоне Твин 80 (Контроль 3). Изменения площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков относительно группы животных с гипергомоцистеинемией оказались статистически значимыми только для КДНФГ нейтрального и АДНФГ основного характера (рис. 30).



*Примечание:* \* статистически значимые отличия от Контроля 3 ( $p \leq 0,05$ )

#- статистически значимые отличия относительно группы метионин 21 день ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 30. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков скелетной мышцы при введении карнитина относительно контроля 3 и группы метионин 21 день

В скелетной мышце животных соотношение первичных и вторичных маркеров оказалось статистически значимо только относительно Контроля 3: доля вторичных возросла с соответствующим снижением доли первичных маркеров (табл. 17).



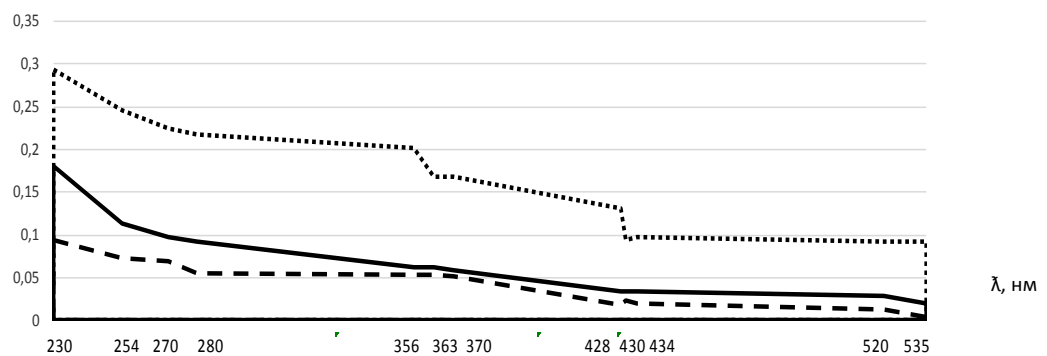
Сравнительный анализ долей первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса скелетной мышцы крыс при введении карнитина, % (Ме [Q1;Q3])

	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 3	80,34[79,02;84,07]	19,66[15,93;20,98]
Метионин 21 день	75,65 [73,73;77,75]	24,35 [22,25;26,27]
Метионин+карнитин	75,87[74,08;76,85]* p=0,031	24,13[23,15;25,92]* p=0,031

Примечание: \* статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>21</sub> (p≤0,05)

В грудной аорте группы крыс получено статистически значимое снижение площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков за счет всех изучаемых составляющих, относительно выборки животных с гипергомоцистеинемией. Статистически значимых изменений относительно Контроля 3 не обнаружено (рис. 31).

е.о.п/гбелка



	САДФНГ н.	СКДФНГ н.	САДФНГ о.	СКДФНГ о.	S общ.
-- контроль 3	8,51 [5,04; 9,64]	2,30 [2,03; 2,75]	1,26 [0,95; 1,90]	0,23 [0,12; 0,32]	12,80 [8,60; 14,32]
.... метионин	28,02 [26,42; 51,85]	14,30 [8,63; 15,93]	10,28 [7,76; 15,49]	1,74 [1,53; 2,84]	73,03[47,08;86,10]
- метионин + карнитин	12,23 [7,17; 19,80] <sup>#</sup>	3,11 [1,34; 4,63] <sup>#</sup>	3,05 [1,41; 4,50] <sup>#</sup>	0,5 [0,30; 0,70] <sup>#</sup>	18,91 [10,05; 29,61] <sup>#</sup>
	<sup>#</sup> p = 0,035	<sup>#</sup> p = 0,022	<sup>#</sup> p = 0,035	<sup>#</sup> p = 0,035	<sup>#</sup> p = 0,022

Примечание: #- статистически значимые отличия относительно группы метионин 21 день (p≤0,05)

Рисунок 31. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков грудной аорты при введении карнитина относительно контроля 3 и группы метионин 21 день

Изменение соотношения первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса оказалось статистически незначимо в экспериментальной выборке относительно Контроля 3 и выборки с гипергомоцистеинемией.

Таблица 18

Сравнительный анализ долей первичных и вторичных маркеров оксидативного стресса грудной аорты крыс при введении карнитина, % (Ме [Q1;Q3])

	Доля первичных маркеров, %	Доля вторичных маркеров, %
Контроль 3	79,34[76,28;82,63]	20,66[17,37;23,72]
Метионин 21 день	78,20 [77,96;78,28]	21,80 [21,72;22,04]
Метионин+карнитин	80,96[78,37;82,27]	19,04[17,73;21,63]

Анализируя общий РАП в миокарде, получили статистически значимое снижение (рис. 32, табл. 19) относительно выборки, получавшей изолированно метионин, что не показывает положительного влияния карнитина на эффекты гипергомоцистеинемии.

В скелетной мышце РАП в экспериментальной выборке статистически значимо увеличился относительно выборки с гипергомоцистеинемией за счет КДФГ основного характера (рис. 32, табл. 19).

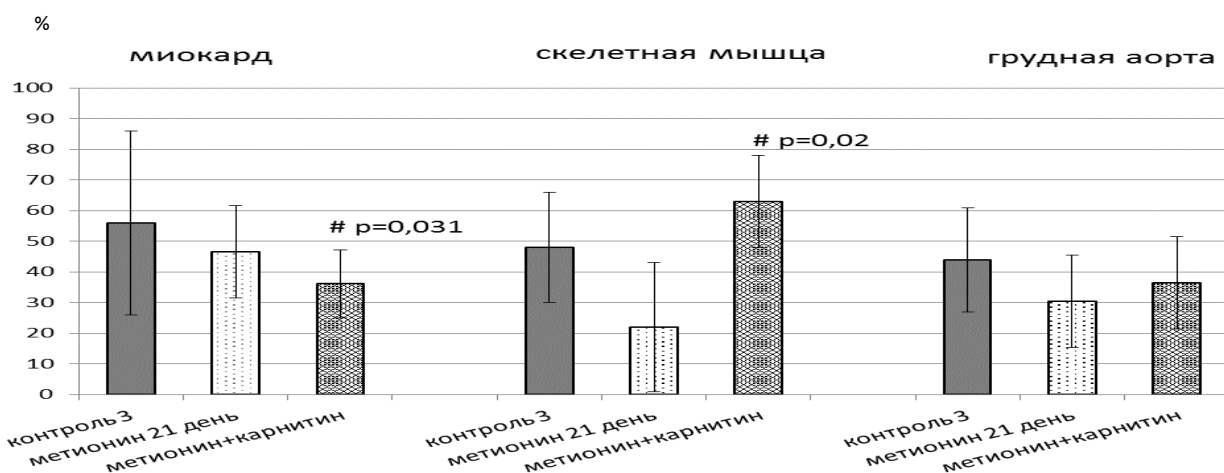
В грудной аорте в экспериментальной группе изменения РАП оказались статистически незначимы относительно Контроля 3 и выборки животных с гипергомоцистеинемией (рис. 32, табл. 19).

Сравнительный анализ резервно-адаптационного потенциала при введении карнитина относительно контроля 3 и группы метионин 21 день, % (Ме [Q1;Q3])

		РАП АДНФГ н	РАП КДНФГ н	РАП АДНФГ о	РАП КДНФГ о
Миокард	Контроль 3	53,78 [36,11;61,71]	55,12 [46,57;66,46]	63,01 [58,6;65,13]	64,60 [61,92;69,64]
	Метионин 21 день	26,58 [21,59;38,71]	50,47 [48,89;66,2]	64,90 [59,25;71,9]	73,39 [60,21;75,62]
	Метионин+ карнитин	32,40 [25,84;38,14]* p=0,031	35,45 [14,92;59,09]# p=0,03	51,64 [8,56;84,91]	73,78 [31,46;89,71]
Скелетная мышца	Контроль 3	54,89 [41,19;61,01]	32,03 [10,68;59,95]	20,41 [4,78;72,54]	10,26 [0,52;68,06]
	Метионин 21 день	20,07 [19,75;22,29]	26,64 [26,63;44,42]	27,47 [20,39;36,86]	36,38 [13,83;39,79]
	Метионин+ Карнитин	16,54 [12,65;31,45]	46,42 [10,44;73,61]	21,63 [13,11;75,9]	71,13 [19,48;82,82]*# *p=0,001 #p=0,02
Грудная аорта	Контроль 3	50,39 [42,45;53,24]	19,06 [4,4;40,82]	19,27 [3,68;50,52]	9,24 [3,29;50,98]
	Метионин 21 день	16,05 [8,75;20,07]	38,15 [22,65;46,26]	33,28 [20,6;80,65]	36,01 [27,47;79,98]
	Метионин+ карнитин	38,13 [10,29;48,62]# p=0,01	41,28 [16,74;54,28] p=0,01	16,58 [4,99;51,67]# p=0,01	25,11 [5,53;57,31]

Примечание: \* статистически значимых отличия от Контроля 3 (p≤0,05);

#- статистически значимых отличий относительно группы метионин 21 день (p≤0,05)



*Примечание:* #- статистически значимые отличия относительно группы метионин 21 день ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 32. Сравнительный анализ общего резервно-адаптационного потенциала мышечных тканей при введении карнитина относительно контроля 3 и группы метионин 21 день

Таким образом, показано развитие интенсивного окислительного повреждения белков с персистенцией фрагментированных и дополнительным синтезом агрегированных протеинов, истощением резервно-адаптационного потенциала исследуемых мышечных тканей, а также корректирующее влияние L-аргинина и карнитина при выраженной гипергомоцистеинемии.

### 3.4. Характеристика лизосомального цистеинового протеолиза мышечных тканей

В интактных клетках лизосомальные ферменты отграничены мембраной от цитозоля. При ряде условий, приводящих к повреждению лизосомальных мембран, ферменты высвобождаются, активируются и воздействуют на внелизосомные структуры, повреждая их, что, впоследствии, может приводить к развитию клеточного апоптоза и некроза [112]. Долгое время катепсины рассматривались в качестве факторов развития опухолей, метастазирования, регуляции синтеза кости [38,56,162,169]. Несомненно, в последнее время, эти протеазы привлекают к себе внимание, как важные факторы в развитии сердечно – сосудистой патологии, атерогенезе. Повышенные концентрации гомоцистеина в

сыворотке крови являются дополнительным фактором риска развития данных состояний. Поэтому, нами была предпринята оценка активности катепсинов L и H в миокарде, скелетной мышце и стенке сосуда при моделировании гипергомоцистеинемии различной степени выраженности.

### 3.4.1. Лизосомальный цистеиновый протеолиз мышечных тканей при умеренной гипергомоцистеинемии

В ходе анализа изменения активности катепсинов L, H выявлены следующие тенденции в сердечной мышце. Обнаружено статистически значимое повышение общей активности катепсина H за счет как седиментируемой, так и неседиментируемой фракций при 7- и 14-дневном введении метионина (рисунок 34), изменения для катепсина L оказались статистически незначимыми относительно контрольной выборки (рис. 33).

Изменение активности катепсинов L, H миокарда в группе животных, получавших метионин в течение 14 дней статистически незначимы относительно группы, получавшей метионин 7 дней (табл. 20).

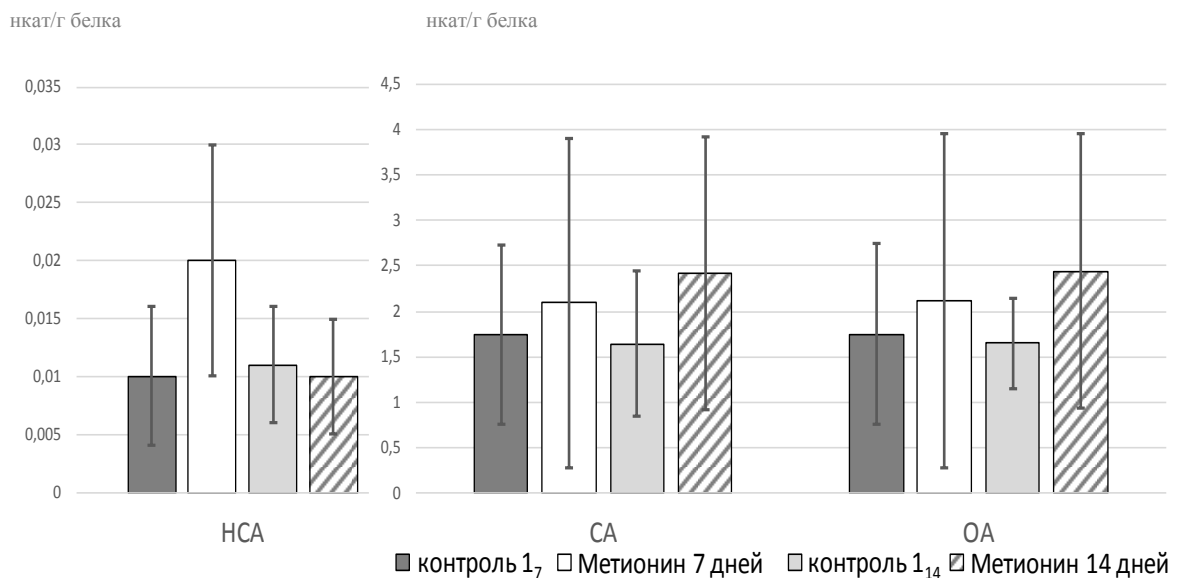
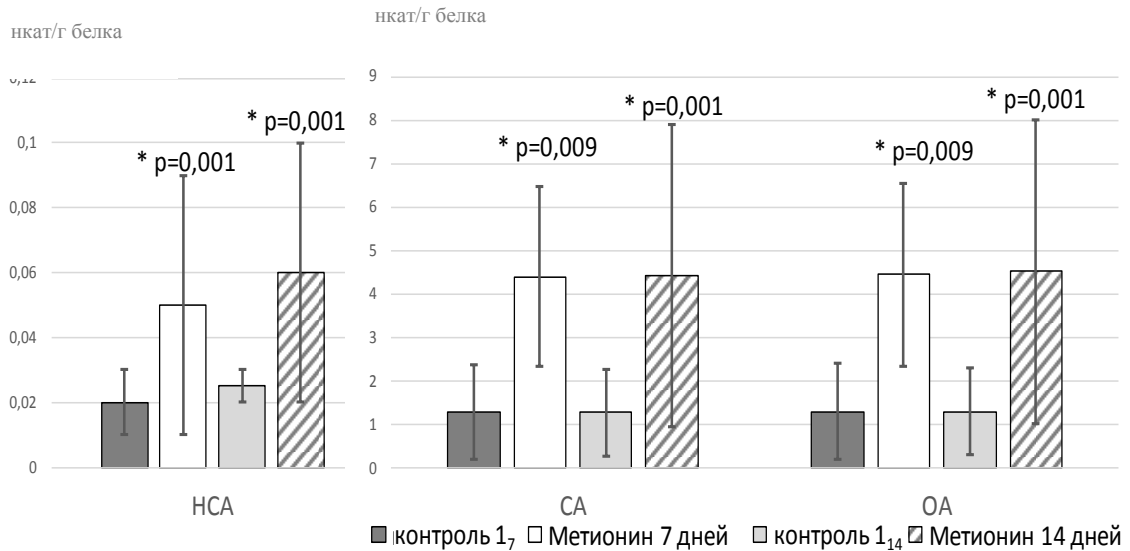


Рисунок 33. Активность катепсина L миокарда, нкат/г белка (Me[Q1;Q3])



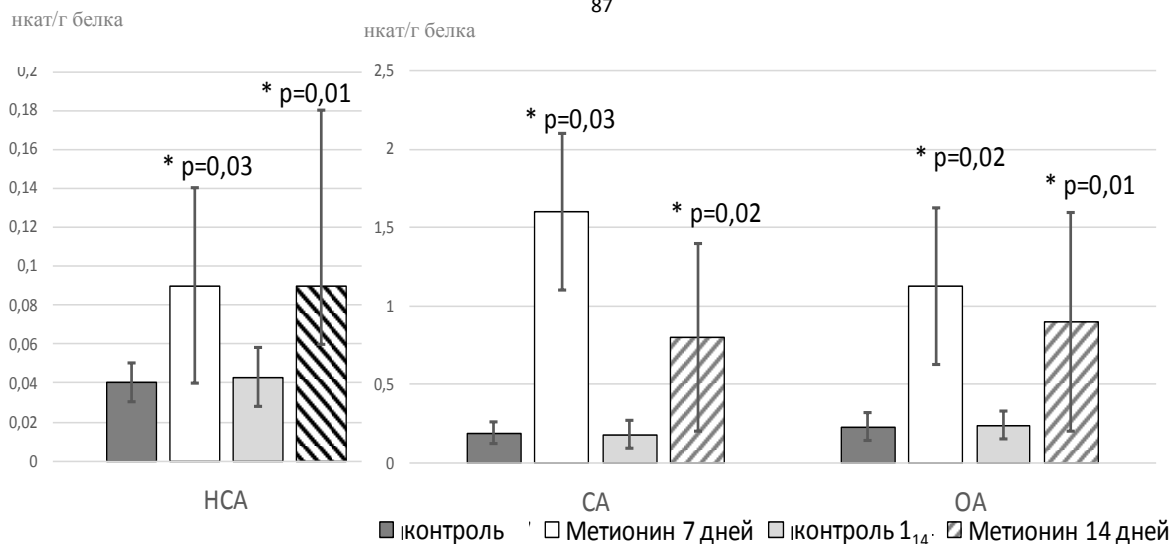
Примечание: \*Статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p < 0,5$ )  
 Рисунок 34. Активность катепсина Н миокарда, нкат/г белка (Me [Q1;Q3])

Таблица 20

Сравнительная активность катепсинов L и Н миокарда при умеренной гипергомоцистеинемии, (Me [Q1;Q3])

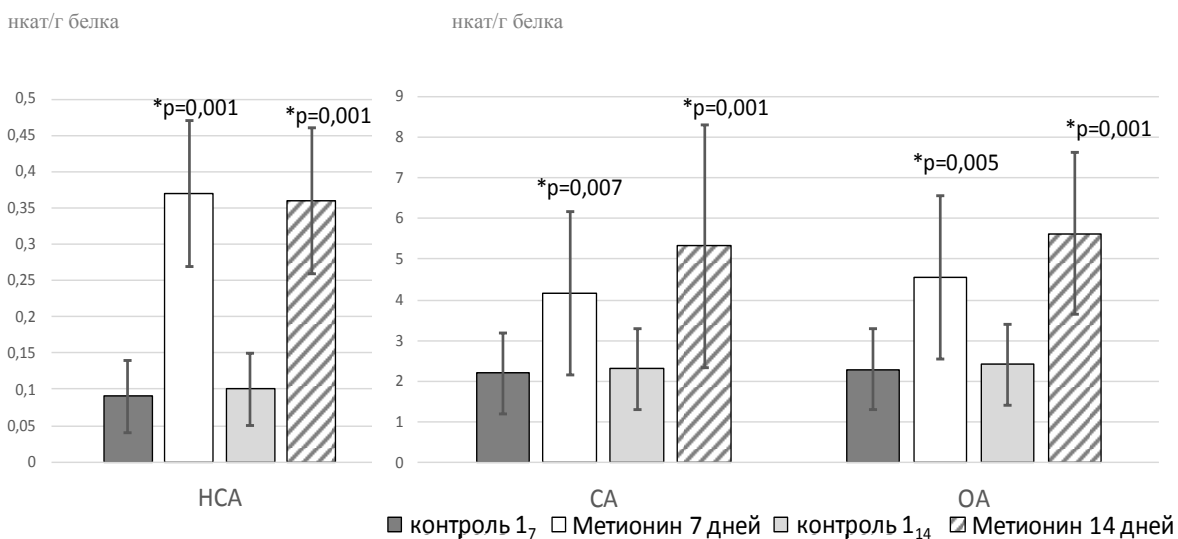
		катепсин L нкат/г белка	катепсин Н нкат/г белка
Метионин 7 дней	НСА	0,02[0,01;0,05]	0,05[0,04;0,05]
	СА	2,09[1,82;2,84]	4,40[2,06;4,79]
	ОА	2,12[1,84;2,89]	4,45[2,10;4,84]
Метионин 14 дней	НСА	0,01[0,00;0,02]	0,06[0,04;0,09]
	СА	2,42[1,50;3,42]	4,42[3,46;4,78]
	ОА	2,44[1,51;3,45]	4,51[3,49;4,84]

Активность катепсинов L, Н за счет лизосомальной и внелизосомальной фракций скелетной мышцы статистически значимо выросла в группах 7-ми и 14-дневного введения метионина относительно контроля (рис. 35, 36). Статистически значимых изменений активности обеих изучаемых протеаз при 14-дневном введении метионина относительно выборки, получавшей метионин 7 дней, не установлено (табл. 21).



Примечание: \*Статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p < 0,5$ )

Рисунок 35. Активность катепсина L скелетной мышцы, нкат/г белка (Me[Q1;Q3])



Примечание: \*- статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p < 0,5$ )

Рисунок 36. Активность катепсина H скелетной мышцы, нкат/г белка (Me[Q1;Q3])

Таблица 21

Сравнительная активность катепсинов L и H скелетной мышцы при умеренной гипергомоцистеинемии, (Me [Q1;Q3])

		катепсин L нмоль/с х г белка	катепсин H нмоль/с х г белка
Метионин	HSA	0,09[0,05;0,12]	0,37[0,32;0,40]

7 дней	СА	1,06[0,65;1,42]	4,16[3,23;5,98]
	ОА	1,13[0,77;1,58]	4,55[3,59;6,32]
Метионин 14 дней	НСА	0,09[0,06;0,13]	0,36[0,32;0,44]
	СА	0,80[0,71;1,24]	5,32[4,50;6,40]
	ОА	0,90[0,76;1,33]	5,63[4,87;6,89]

В грудной аорте при 7-дневном введении метионина обнаружено статистически значимое повышение активности катепсина Н за счет лизосомальной фракции относительно контрольной выборки. Причем активность цитоплазматической доли фермента снижалась. При 14-дневном введении метионина обнаружены статистически значимые изменения активности обоих изучаемых катепсинов также за счет лизосомальных фракций фермента относительно контрольной группы (рисунок 37, 38), а также были установлены статистически значимые нарастания активности протеаз относительно группы животных, получавших метионин 7 дней (табл. 22).

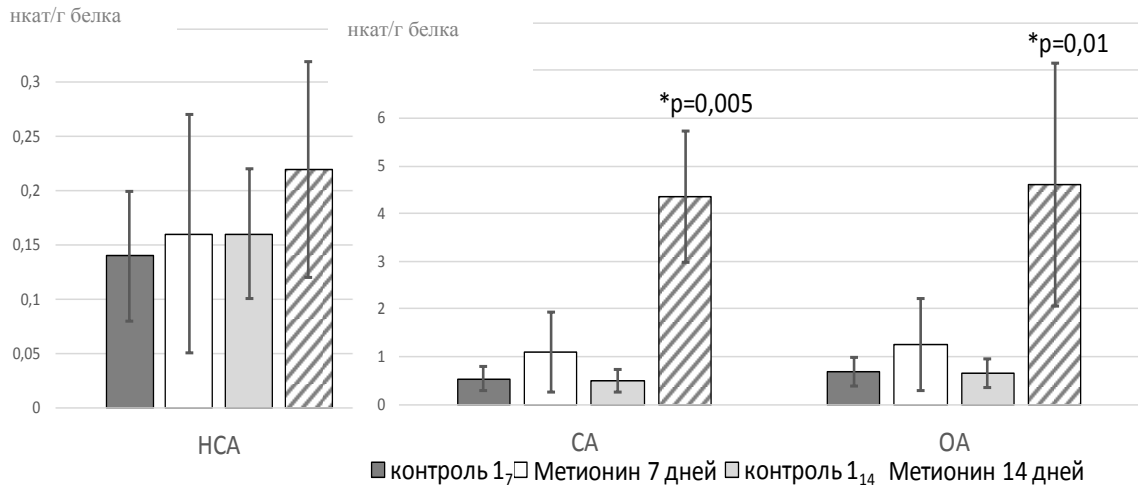
Таблица 22

Сравнительная активность катепсинов L и Н грудной аорты  
при умеренной гипергомоцистеинемии, (Ме [Q1;Q3])

		катепсин L нкат/ г белка	катепсин Н нкат/г белка
Метионин 7 дней	НСА	0,16[0,11;0,18]	0,17[0,14;0,22]
	СА	1,09[0,83;2,18]	2,66[2,19;3,74]
	ОА	1,26[0,97;2,28]	2,79[2,40;3,99]
Метионин 14 дней	НСА	0,22[0,15;0,35]	0,35[0,31;0,39]• p=0,009
	СА	4,36[3,37;5,14]• p=0,007	5,99[4,49;7,59]• p=0,003
	ОА	4,61[3,54;5,53]• p=0,007	6,29[4,81;8,01]• p=0,002

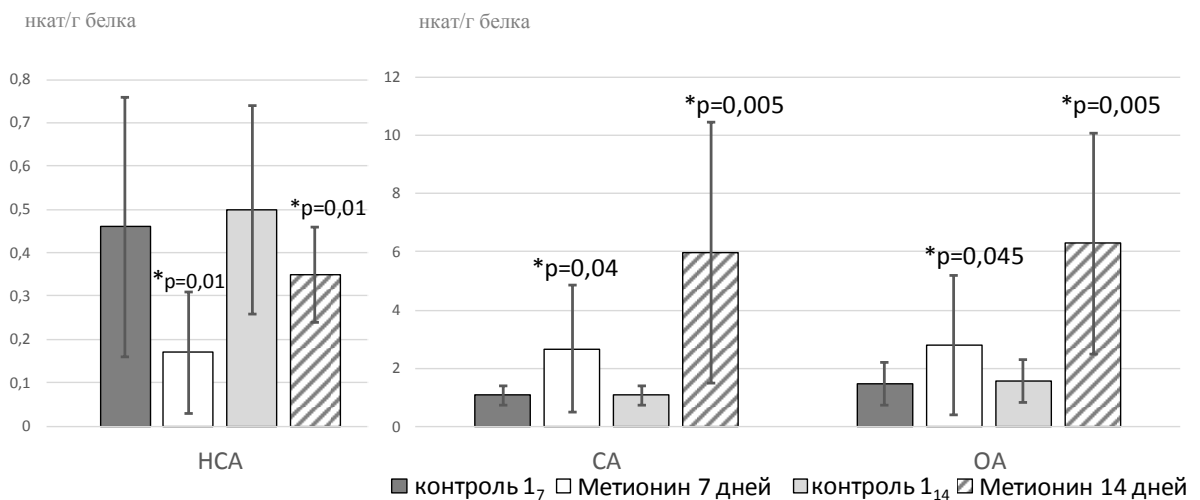
Примечание: • статистически значимые отличия от группы метионин 7 дней





*Примечание:* \*Статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p < 0,5$ )

Рисунок 37. Активность катепсина L грудной аорты, нкат/ г белка (Me[Q1;Q3])

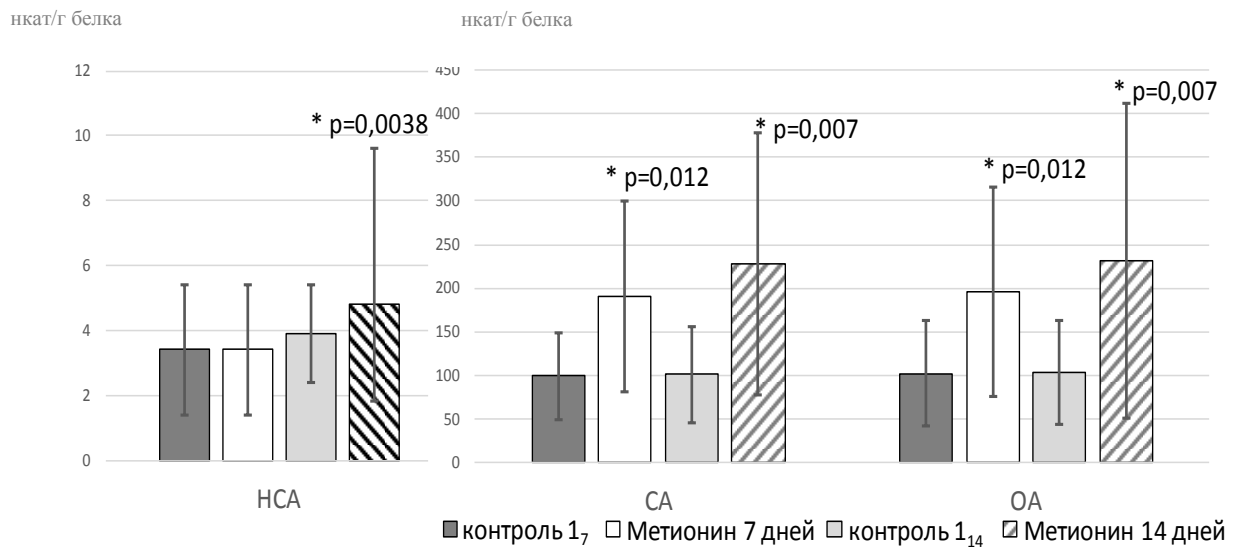


*Примечание:* \*Статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p < 0,5$ )

Рисунок 38. Активность катепсина H грудной аорты, нкат/ г белка (Me[Q1;Q3])

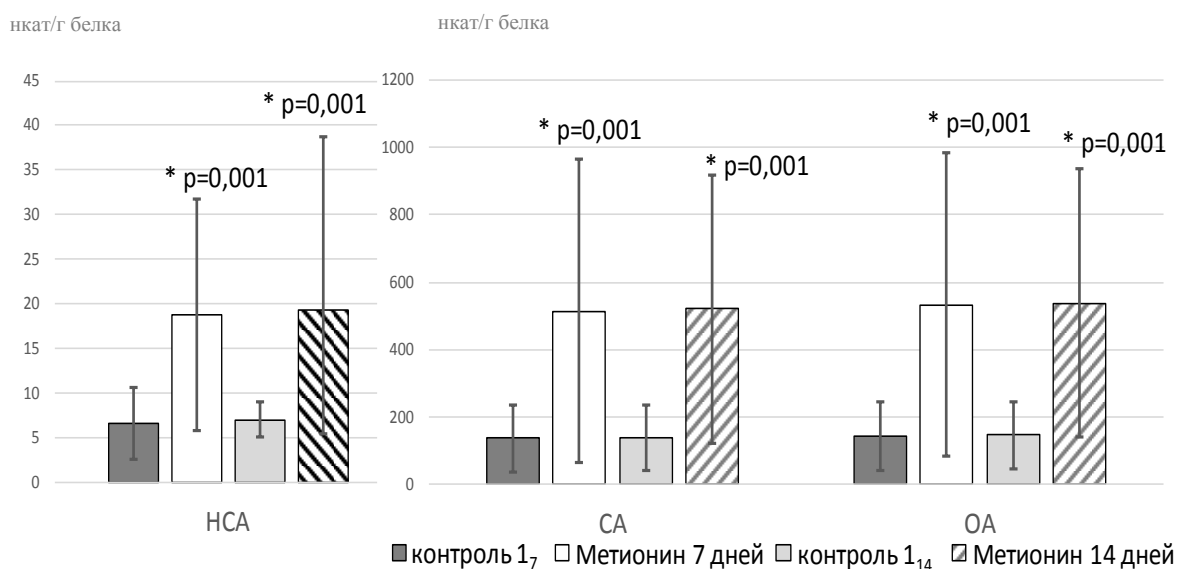
Нарастание активности катепсина в цитоплазматической фракции (рис. 34, 35, 36), скорее всего, обусловлено повышением лабильности лизосомальной мембраны [106]. В качестве признанного основного маркера лабилизации лизосомальных мембран использовали активность кислой фосфатазы (КФ), которая в миокарде статистически значимо возрастала за счет лизосомальной

фракции при 7- и 14-дневном введении метионина относительно контроля (рис. 39). В скелетной мышце активность кислой фосфатазы статистически значимо нарастала за счет лизосомальной и цитоплазматической фракции в экспериментальных группах относительно контроля (рис. 40). В грудной аорте в экспериментальных группах обнаружено статистически значимое нарастание активности кислой фосфатазы (рис. 41).



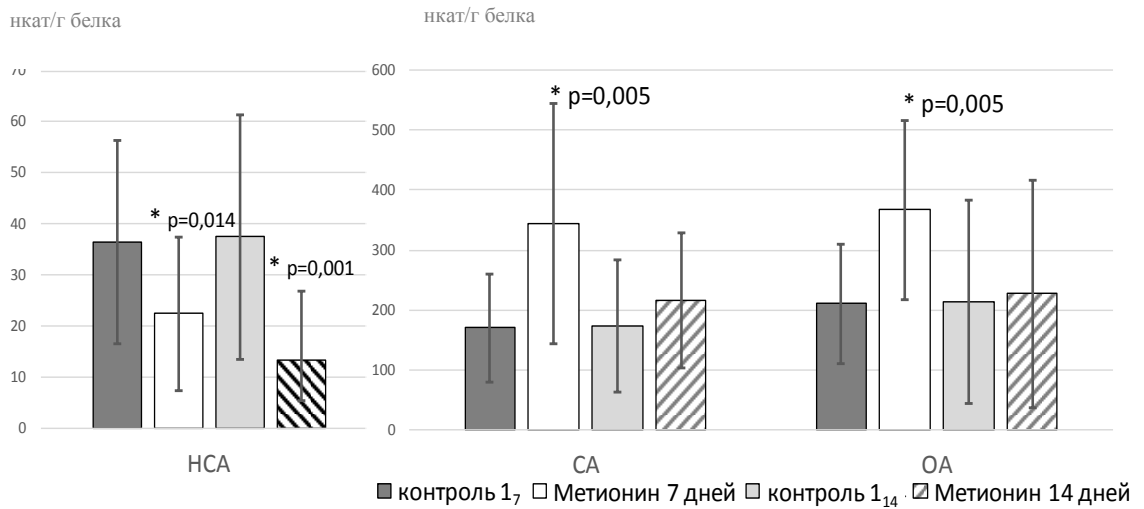
*Примечание:*\*- статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 39. Активность кислой фосфатазы (нкат/г белка) миокарда



*Примечание:*\*- статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p \leq 0,05$ )

Рисунок 40. Активность кислой фосфатазы (нкат/г белка) скелетной мышц



*Примечание:*\*- статистически значимые отличия от соответствующего контроля ( $p \leq 0,05$ )  
 Рисунок 41. Активность кислой фосфатазы (нкат/г белка) грудной аорты

При оценке сравнительной активности кислой фосфатазы между экспериментальными выборками, получены статистически значимые отличия при 14-дневном введении метионина относительно группы, получавшей метионин 7 дней только для грудной аорты (табл.23).

Таблица 23

Сравнительная активность кислой фосфатазы мышечных тканей при умеренной гипергомоцистеинемии, (Me[Q1;Q3])

		НСА нкат/ г белка	СА нкат/ г белка	ОА нкат/ г белка
Миокард	Метионин 7 дней	3,41 [3,13;4,74]	193,49 [154,81;207,45]	196,36 [159,83;210,52]
	Метионин 14 дней	4,80 [4,26;5,86]	227,42 [161,20;264,89]	231,36 [166,77;270,75]
Скелетная мышца	Метионин 7 дней	18,74 [15,47;22,54]	514,70 [482,61;538,33]	533,61 [503,97;555,59]
	Метионин	19,34	520,56	538,40

	14 дней	[15,02;29,95]	[407,28;578,20]	[420,87;608,15]
Грудная аорта	Метионин 7 дней	22,38 [20,19;26,17]	344,72 [234,05;423,78]	366,74 [260,70;445,20]
	Метионин 14 дней	13,35 [11,68;14,27]• p=0,001	215,05 [203,69;221,27]• p=0,04	227,53 [214,94;235,27]• p=0,007

*Примечание:* •Статистически значимые отличия группы от группы метионин 7 дней ( $p \leq 0,05$ )

При анализе показателей коэффициента лабильности (Клаб%) изучаемых ферментов в скелетной мышце получено статистически значимое нарастание коэффициента лабильности катепсина Н при 7- дневном введении относительно контроля, что говорит о нарастании секреции катепсина, что говорит о секреции катепсина во внелизосомальное пространство. Однако, в миокарде получили статистически значимое снижение показателя для катепсина L в группе животных получавших метионин 14 дней относительно выборки с 7-дневным введением метионина., в грудной аорте, статистически значимое снижение коэффициента лабильности для кислой фосфатазы и катепсина Н в обеих экспериментальных группах и коэффициента лабильности для катепсина L при 14-дневном введении метионина относительно контроля 1, что может говорить о вероятном включении компенсаторных процессов, ведущих к стабилизации мембран лизосом (табл. 24)

Таблица 24

Сравнительная характеристика коэффициентов лабильности кислой фосфатазы и катепсинов L и H, % (Me [Q1;Q3])

		Клаб,% Кислой фосфатазы	Клаб, %	
			Катепсин L	Катепсин H
Миокард	Контроль 1 <sub>7</sub>	3,28 [2,52;5,34]	0,73 [0,36;1,17]	1,18 [1,06;1,29]
	Метионин 7 дней	1,71 [1,36;3,14]	1,20 [0,74;1,68]	1,19 [1,06;1,67]
	Контроль 1 <sub>14</sub>	3,11 [2,45; 4,98]	0,75 [0,32;1,21]	1,20 [1,16;1,38]
	Метионин 14 дней	2,03 [1,67;3,34]	0,62[0,46;0,71]• p=0,04	1,40[1,12;1,83]

Скелетная мышца	Контроль 1 <sub>7</sub>	4,61 [3,99;5,42]	9,49[4,47;40,05]	4,48[3,41;5,13]
	Метионин 7 дней	3,85 [3,19;4,46]	10,35[4,05;13,09]	7,44[5,48;10,19]* p=0,02
	Контроль 1 <sub>14</sub>	4,12 [3,48;6,12]	9,53[4,17;41,05]	4,51[3,59;6,17]
	Метионин 14 дней	4,27 [3,31;5,00]	8,54[6,19;13,38]	6,60[5,15;8,29]
Грудная аорта	Контроль 1 <sub>7</sub>	16,99[15,35;19,88]	21,63[18,71;22,56]	34,03[20,35;51,05]
	Метионин 7 дней	6,03 [4,87;7,88]* p=0,003	11,54[4,76;19,75]	5,91[4,40;7,70]* p=0,001
	Контроль 1 <sub>14</sub>	17,12[15,49;21,45]	21,83[17,81;23,61]	35,13[21,45;50,03]
	Метионин 14 дней	5,59 [5,25;5,91]* p=0,001	4,98[4,20;7,67]* p=0,01	5,66[4,79;6,68]* p=0,001

*Примечание:*\* -статистически значимые отличия от соответствующей контрольной группы (p<0,05),

- статистически значимые отличия от группы метионин 7 дней (p<0,5)

### 3.4.2. Лизосомальный цистеиновый протеолиз при выраженной гипергомоцистеинемии

Активность катепсина L лизосомальной фракции сердечной мышцы при выраженной гипергомоцистеинемии не претерпела статистически значимых изменений относительно контроля, в отличие от цитоплазматической, которая статистически значимо выросла. Одновременно, активность катепсина H оказалась статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой; указанные изменения касались всех фракций гомогената сердечной мышцы. В скелетной мышце при моделировании выраженной гипергомоцистеинемии установлено статистически значимое увеличение активности катепсина L в цитоплазматической и лизосомальной фракциях, а также увеличение общей активности фермента. Для катепсина H увеличение неседиментируемой и общей активности статистически значимо выросло, активность лизосомальной фракции также увеличилась, хотя оказалась статистически незначимой. Анализируя изменение активности изучаемых протеиназ в стенке аорты, мы получили следующие результаты, а именно: для катепсина L получены статистически

значимое увеличение активности. Для катепсина Н статистически значимое увеличение неседиментируемой активности (табл. 25).

Таблица 25

Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии, Me [Q1;Q3]

		КатепсинL нкат/ г белка		Катепсин Н нкат/ г белка	
		Контроль 1 <sub>21</sub>	Метионин 21 день	Контроль 1 <sub>21</sub>	Метионин 21 день
Миокард	НСА	0,01[0,01;0,01]	0,02[0,02;0,03]* p=0,02	0,02[0,01;0,02]	0,11[0,11;0,12]* p=0,004
	СА	1,74[0,99;2,01]	1,06[0,84;1,37]	1,28[1,10;1,86]	3,63[3,25;3,99]* p=0,004
	ОА	1,75[1,00;2,02]	1,10[0,87;1,38]	1,29[1,11;1,88]	3,75[3,41;4,09]* p=0,004
Скелетная	НСА	0,04[0,01;0,06]	0,13[0,07;0,14]* p=0,014	0,09[0,07;0,12]	0,19[0,14;0,22]* p=0,009
	СА	0,19[0,07;0,41]	1,09[0,83;2,18]* p=0,04	2,19[1,83;2,37]	2,57[2,15;2,91]
	ОА	0,23[0,09;0,42]	1,26[0,91;2,28]* p=0,023	2,28[1,91;2,45]	2,77[2,35;3,11]*
Грудная аорта	НСА	0,04[0,01;0,06]	0,37[0,27;0,62]* p=0,014	0,09[0,07;0,12]	0,46[0,34;0,60]* p=0,009
	СА	0,19[0,07;0,41]	2,52[1,16;3,66]* p=0,04	2,19[1,83;2,37]	1,07[0,32;1,71]
	ОА	0,23[0,09;0,42]	3,18[1,43;4,22]* p=0,023	2,28[1,91;2,45]	1,48[0,74;2,26]

Примечание: \* -статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>21</sub> (p<0,05).

Обнаружение у животных с гипергомоцистеинемией статистически значимого нарастания активности кислой фосфатазы в цитоплазматической фракции без однотипных изменений общей активности, позволяет говорить о наличии феномена лабильности лизосомальных мембран миокарда. Похожую картину мы наблюдали, оценивая изменение активности фермента в сосудистой

стенке. В большеберцовой мышце группы крыс с гипергомоцистеинемией получено статистически значимое увеличение активности всех изучаемых фракций фермента, что указывает на пермеабиллизацию лизосомальных мембран (табл. 26).

Таблица 26

Активность кислой фосфатазы мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии, (Ме [Q1;Q3]) нкат/г белка

		Миокард	Скелетная мышца	Грудная аорта
Контроль 1 <sub>21</sub>	НСА	3,40[2,85;3,70]	6,54 [6,27;7,41]	36,41[28,10;42,63]
	СА	99,00[57,33;140,18]	135,19[122,30;178,18]	170,05[142,77;203,33]
	ОА	102,12[60,47;143,77]	142,28[129,17;185,39]	210,54[181,43;234,04]
Метионин 21 день	НСА	6,98[6,01;7,64]* p=0,004	22,38[20,19;26,17]* p=0,001	72,03[56,48;78,93]* p=0,031
	СА	79,77[67,13;83,98]	344,72[234,05;423,78]* p=0,001	170,05[133,20;261,43]
	ОА	86,75[71,62;89,99]	366,74[260,70;445,20]* p=0,001	244,78[177,40;341,43]

*Примечание:* \* - статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>21</sub> (p<0,05)

Анализируя коэффициент лабильности при выраженной гипергомоцистеинемии, были получены статистически значимые результаты для катепсинов L, H, кислой фосфатазы в миокарде относительно контрольной группы, подтверждающие феномен пермеабиллизации мембран лизосом. Для скелетной мышцы не были получены статистически значимые результаты. А вот для грудной аорты были получены статистически значимые изменения коэффициента лабильности кислой фосфатазы относительно контрольной группы, еще раз подтверждающие секрецию фермента сквозь избыточно проницаемую мембрану (табл. 27).

Сравнительная характеристика коэффициентов лабильности катепсинов в мышечных тканях при выраженной гипергомоцистеинемии, % (Ме [Q1;Q3])

		Клаб,% кислой фосфатазы	Клаб, % катепсинов	
			Катепсин L	Катепсин H
Миокард	Контроль 1 <sub>21</sub>	3,31 [2,89;6,17]	0,73[0,36;1,17]	2,54[1,77;3,30]
	Метионин 21 день	8,05 [6,68;8,21]* p=0,033	2,54[1,77;3,30]* *p=0,02	3,15 [2,68;3,47]* *p=0,004
Скелетная мышца	Контроль 1 <sub>21</sub>	4,62 [4,01;5,42]	9,49 [4,47;40,05]	9,00 [4,37;17,68]
	Метионин 21 день	6,03 [4,87;7,88]	9,00 [4,37;17,68]	7,15[6,15;7,41]
Грудная аорта	Контроль 1 <sub>21</sub>	17,02 [16,43;20,18]	9,49 [4,47;40,05]	9,00 [4,37;17,68]
	Метионин 21 день	24,76 [18,22;30,04]* p=0,002	9,00 [4,37;17,68]	7,15[6,15;7,41]

Примечание: \* -статистически значимые отличия от Контроля 1<sub>21</sub> (p<0,05)

#### 4. Влияние аргинина и карнитина на лизосомальный цистеиновый протеолиз при выраженной гипергомоцистеинемии

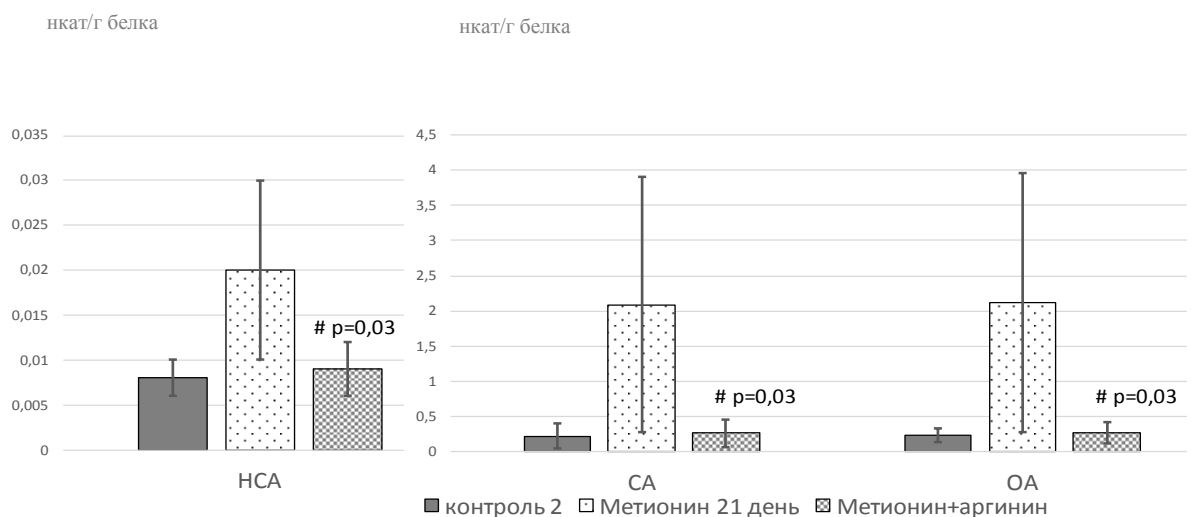
Поскольку исследуемые параметры претерпевали значительные отличия именно при выраженной гипергомоцистеинемии, нами была предпринята оценка изменения лизосомального цистеинового протеолиза при введении аргинина и карнитина на фоне моделирования гипергомоцистеинемии 21-дневным введением метионина.



#### 4.1. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ миокарда при введении аргинина

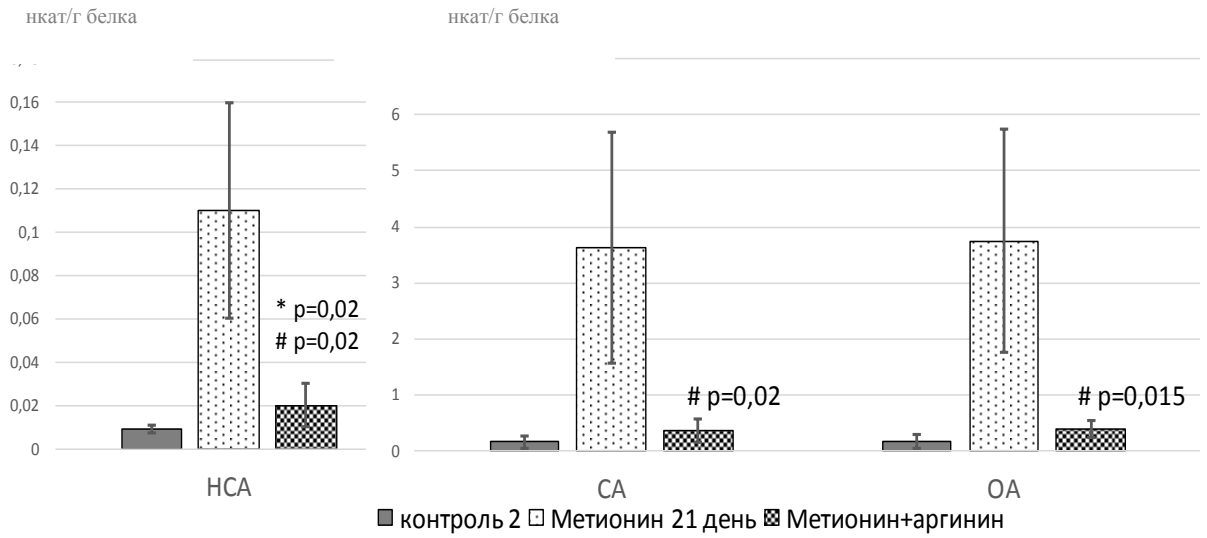
При сопоставлении активности катепсинов L и H миокарда в контрольной группе 2 и в группе животных, получавших совместно аргинин и метионин, получили статистически значимое увеличение активности всех изучаемых фракций катепсина H. Для катепсина L не получили статистически значимых изменений. Введение аргинина группе животных на фоне метионина сопровождалось статистически значимым снижением активности всех фракций обоих катепсинов, относительно группы, изолированно получавшей метионин (рис. 42, 43).

В скелетной мышце нами были обнаружены следующие изменения: статистически значимое нарастание активности катепсина L при совместном введении метионина и аргинина относительно соответствующего контроля во всех трех фракциях, статистически значимое снижение общей, лизосомальной и внелизосомальной активности катепсина H относительно группы животных, изолированно получавшей метионин (рис. 44, 45).



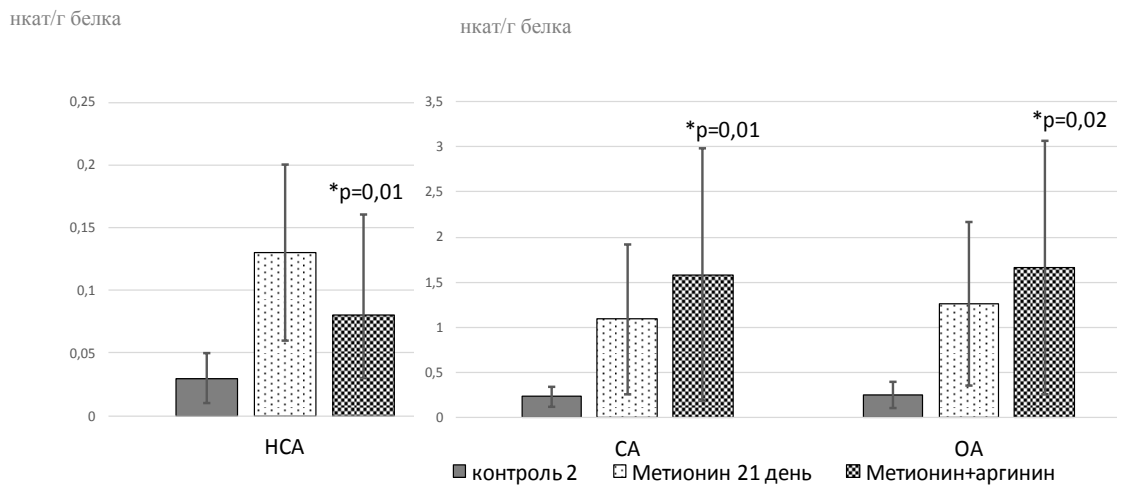
*Примечание:* #-статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

Рисунок 42. Изменение активности катепсина L миокарда при введении аргинина, нкат/гбелка



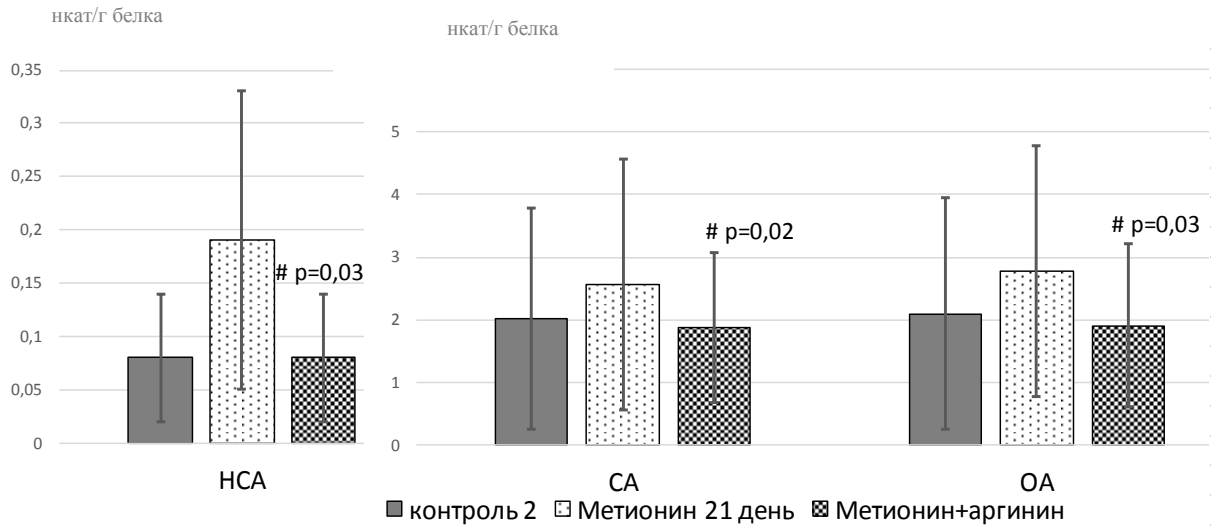
*Примечание:* \* -статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ );  
# -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

Рисунок 43. Изменение активности катепсина Н миокарда при введении аргинина, нкат/гбелка



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

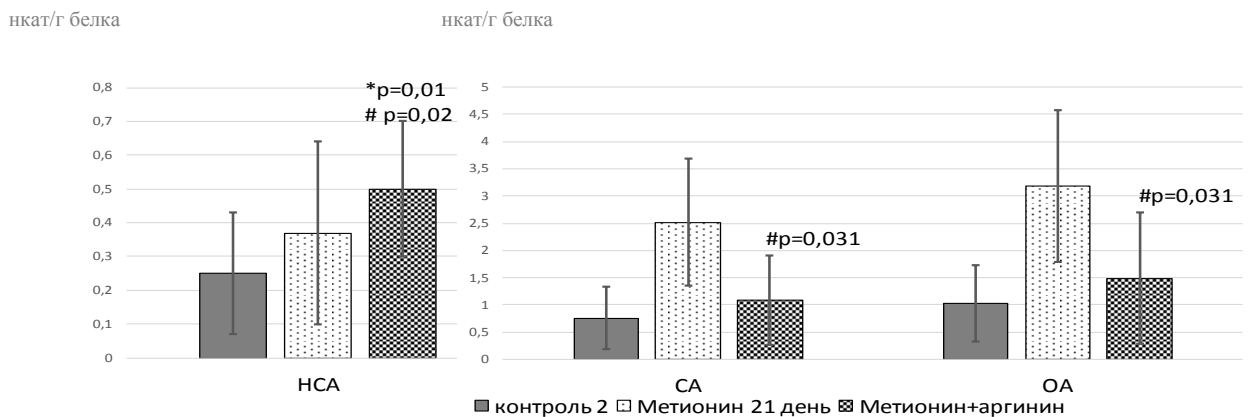
Рисунок 44. Изменение активности катепсина L скелетной мышцы при введении аргинина, нкат/гбелка



*Примечание:* # -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

Рисунок 45. Изменение активности катепсина Н скелетной мышцы при введении аргинина, нкат/гбелка

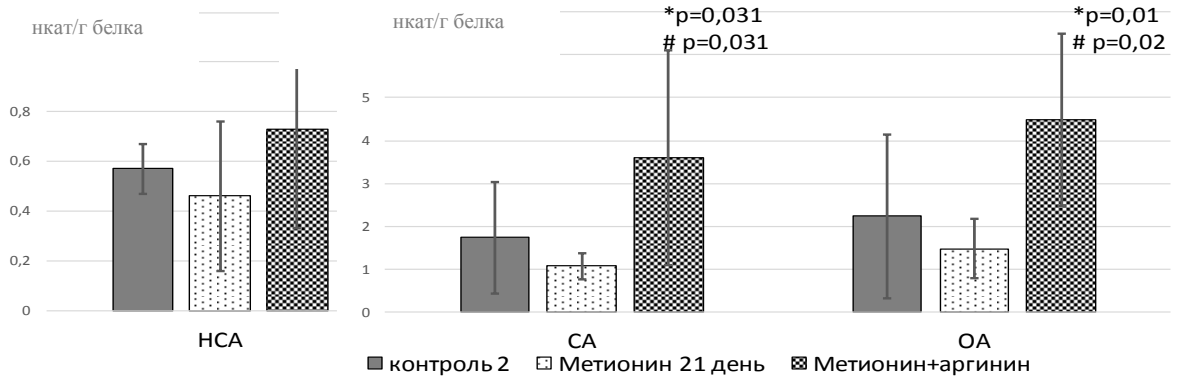
При совместном введении метионина с аргинином в исследуемом гомогенате грудной аорты обнаружено статистически значимое снижение седиментируемой и общей активности катепсина L, но неседиментируемая активность выросла по отношению к выборке, изолированно получавшей метионин (рисунок 46). Для катепсина Н получен статистически значимый рост седиментируемой и общей активности в экспериментальной группе, что, к сожалению, демонстрирует отсутствие корректирующего влияния аргинина на эффекты гомоцистеина в грудной аорте (рисунок 47).



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

# -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

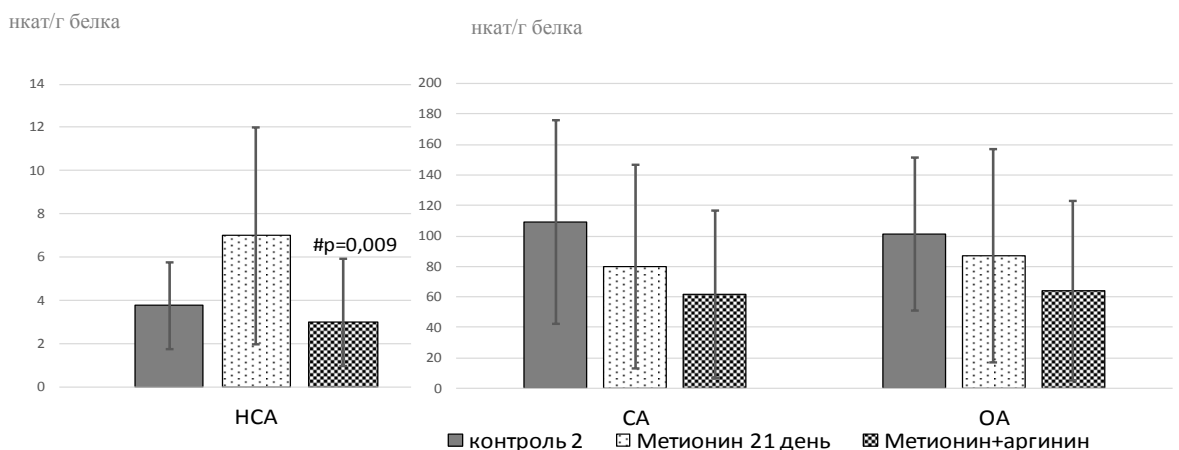
Рисунок 46. Изменение активности катепсина L грудной аорты при введении аргинина, нкат/гбелка



*Примечание:* \* -статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ );  
 # -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

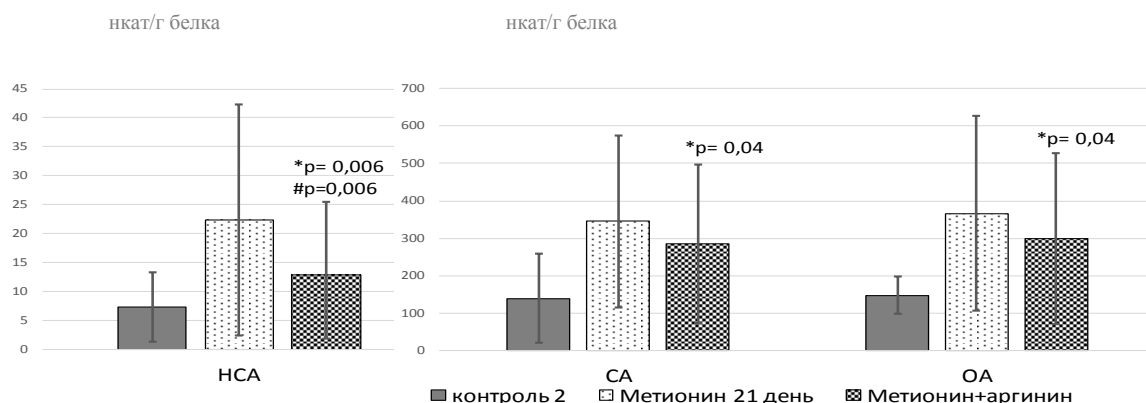
Рисунок 47. Изменение активности катепсина Н грудной аорты при введении аргинина, нкат/гбелка

В миокарде активность цитоплазматической фракции кислой фосфатазы статистически значимо снижались в условиях коррекции гипергомоцистеинемии аргинином относительно выборки, изолированно получавшей метионин, что подтверждает стабилизирующее воздействие аргинина на мембраны лизосом (рисунок 48). В большеберцовой мышце и мышечной ткани грудной аорты получены статистически значимое снижение активности фермента за счет цитоплазматической фракции в экспериментальной группе относительно группы с гипергомоцистеинемией (рис. 49,50).



*Примечание:* # -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

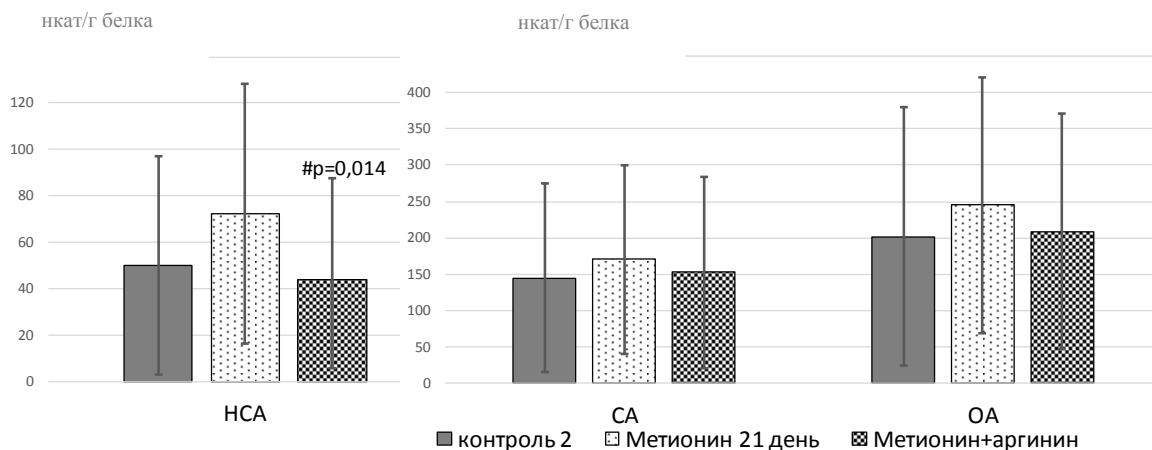
Рисунок 48. Сравнительная активность кислой фосфатазы миокарда при введении аргинина, нкат/гбелка



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

# -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

Рисунок 49. Сравнительная активность кислой фосфатазы скелетной мышцы при введении L-аргинина, нкат/гбелка



*Примечание:* # -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

Рисунок 50. Сравнительная активность кислой фосфатазы в грудной аорте при введении аргинина, нкат/гбелка

В миокарде статистически значимых изменений коэффициента лабильности катепсинов L, H в группе животных, получавших совместно аргинин и метионин относительно выборки с гипергомоцистеинемией не обнаружено, но установлено статистически значимое снижение данного показателя для кислой фосфатазы. В скелетной мышце и стенке сосуда выявлены статистически значимое снижение

коэффициента лабильности катепсина Н в экспериментальной группе относительно животных с гипергомоцистеинемией (табл. 28).

Таблица 28

Сравнительный анализ коэффициента лабильности кислой фосфатазы и катепсинов L, Н мышечных тканей при введении аргинина (Ме[Q1;Q3])

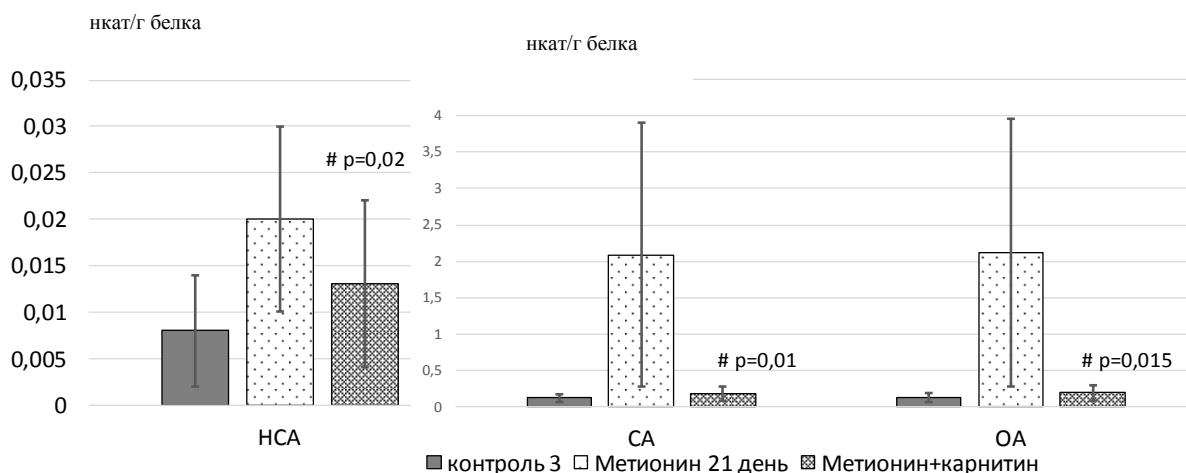
		К лаб Кислой фосфатазы%	К лаб%	
			Катепсин L	Катепсин Н
Миокард	Контроль 2	3,27[2,59;5,27]	0,73 [0,36;1,17]	1,18 [1,06;1,29]
	метионин 21 день	8,05 [6,68;8,21]	2,54 [1,77;3,30]	3,15 [2,68;3,47]
	метионин+ аргинин	5,03 [4,51;6,09] <sup>#</sup> p=0,023	1,54 [1,26;3,60]	4,91 [3,72;6,03]
Скелетная	Контроль 2	5,38 [4,33;5,84]	10,12[5,28;21,69]	3,93 [3,26;4,58]
	метионин 21 день	6,03 [4,87;7,88]	8,99 [4,37;17,68]	7,15 [6,15;7,41]
	метионин+ аргинин	4,83 [3,66;6,54]	4,78 [4,18;5,57]	4,28 [2,86;6,49] <sup>#</sup> p=0,03
Грудная аорта	Контроль 2	23,78 [21,65;25,65]	23,57 [21,32;30,64]	22,93 [20,83;27,13]
	метионин 21 день	24,76 [18,22;30,04]	12,38 [9,72;23,55]	34,03 [20,35;51,05]
	метионин+ аргинин	20,70 [15,51;24,50]	28,82 [27,94;39,74]	19,60 [15,69;20,40] <sup>#</sup> p=0,03

Примечание # статистически значимые отличия от группы метионин 21 день (p<0,5)

#### 4.2. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ миокарда при введении карнитина

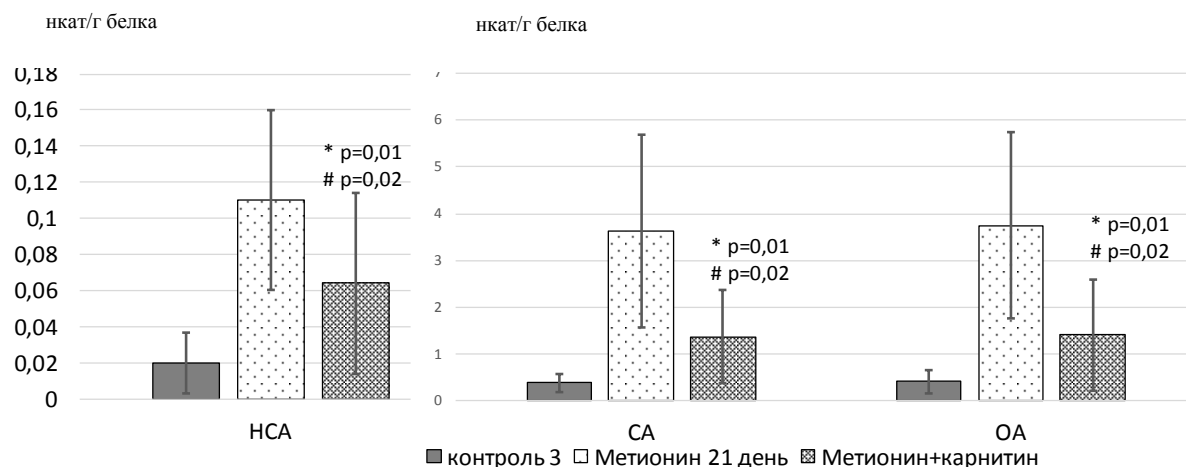
При сопоставлении результатов активности катепсинов в контрольной группе 3 и группе с введением карнитина на фоне метионина получили статистически значимое нарастание всех трех изучаемых фракций катепсина Н.

При совместном введении метионина и карнитина мы обнаружили статистически значимое снижение активности всех фракций катепсинов миокарда относительно выборки с гипергомоцистеинемией (рис. 51,52).



*Примечание:*# -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ ).

Рисунок 51. Изменение активности катепсина L миокарда при введении карнитина, нкат/гбелка



*Примечание:*

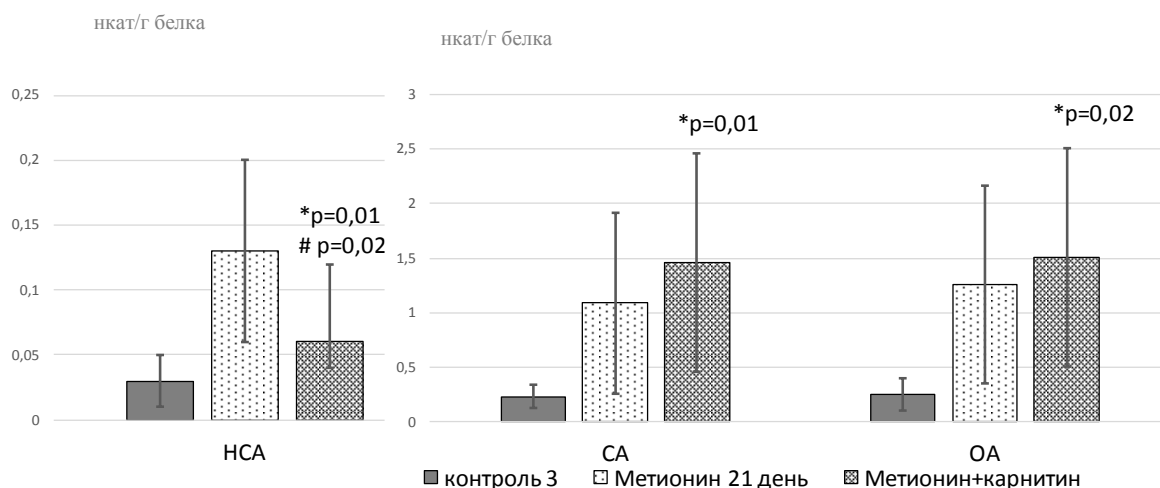
\* -статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ );

# -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ ).

Рисунок 52. Изменение активности катепсина H миокарда при введении карнитина, нкат/гбелка

При совместном введении карнитина и метионина в исследуемой скелетной мышце обнаружено статистически значимое нарастание неседиментируемой активности катепсинов L, H, а также седиментируемой и общей активности

катепсина L относительно соответствующего контроля 3. Сравнивая активность протеаз скелетной мышцы в выборках с гипергомоцистеинемией и введением карнитина на фоне метионина, обнаружили статистически значимое снижение только для неседиментируемой фракции катепсина L (рис. 53,54).

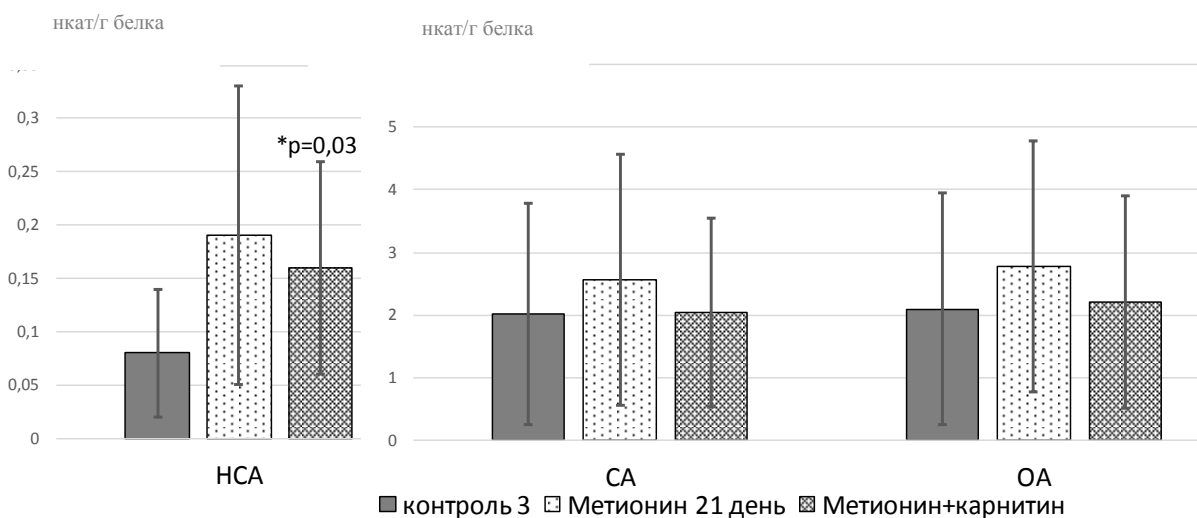


*Примечание:*

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

# -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

Рисунок 53. Изменение активности катепсина L скелетной мышцы при введении карнитина, нкат/гбелка



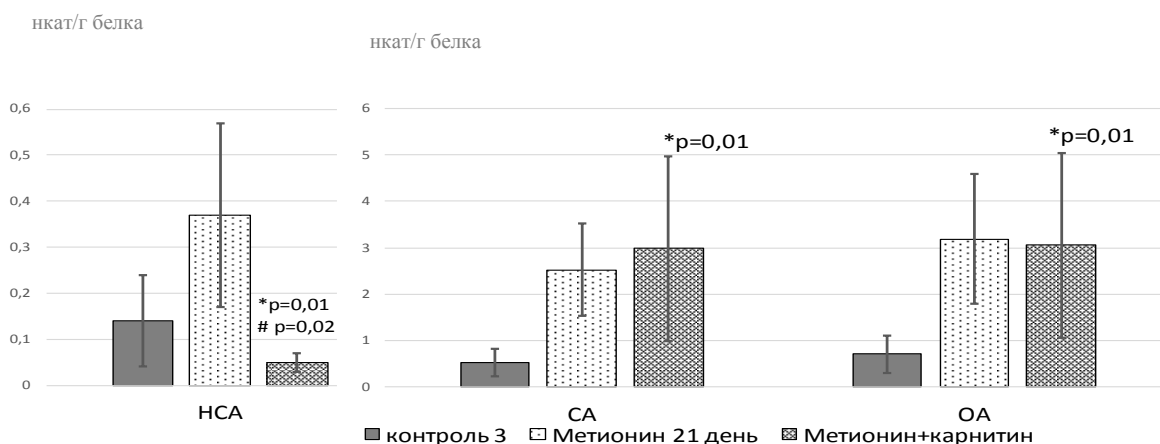
*Примечание:* \* -статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ );

# -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ ).

Рисунок 54. Изменение активности катепсина H скелетной мышцы при введении карнитина, нкат/гбелка

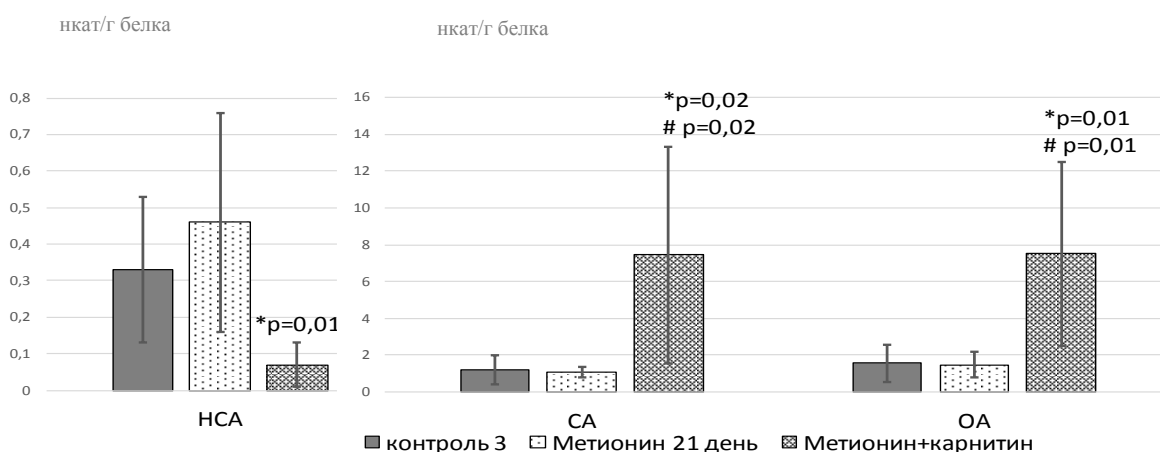


Практически аналогичную картину демонстрируют результаты активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в грудной аорте при совместном введении метионина с карнитином. Статистически значимое снижение неседиментируемой активности обнаружено лишь для катепсина L по сравнению с группой животных с гипергомоцистеинемией. Общая и седиментируемая активность катепсина Н статистически значимо выросла, что отвергает предположение о способности карнитина снижать активность протеиназ в гладкомышечной ткани (рисунки 55, 56).



*Примечание:* \* -статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ )  
#-статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

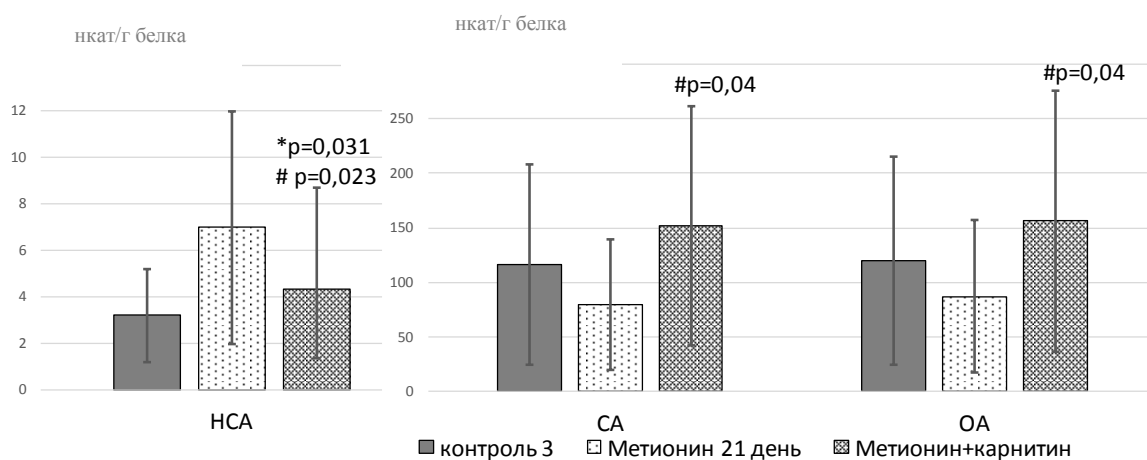
Рисунок 55. Изменение активности катепсина L грудной аорты при введении карнитина, нкат/гбелка



*Примечание:*\* -статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ )  
#-статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

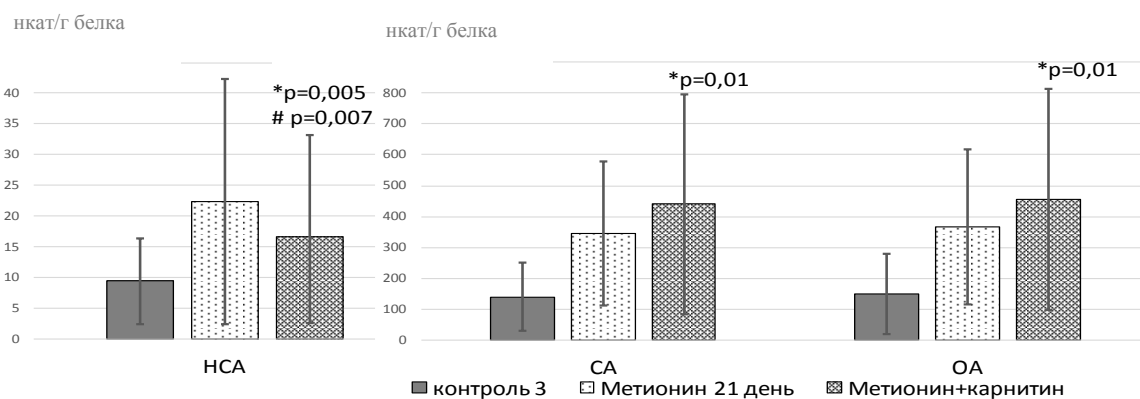
Рисунок 56. Изменение активности катепсина Н грудной аорты при введении карнитина, нкат/гбелка

В миокарде активность кислой фосфатазы статистически значимо снижалась только за счет цитоплазматической доли, седиментируемая и общая активность фермента статистически значимо увеличивалась при введении карнитина на фоне метионина относительно выборки с гипергомоцистеинемией (рис. 57). В скелетной мышце и грудной аорте обнаружено снижение цитоплазматической доли фермента относительно выборки с гипергомоцистеинемией (рис. 58, 59).



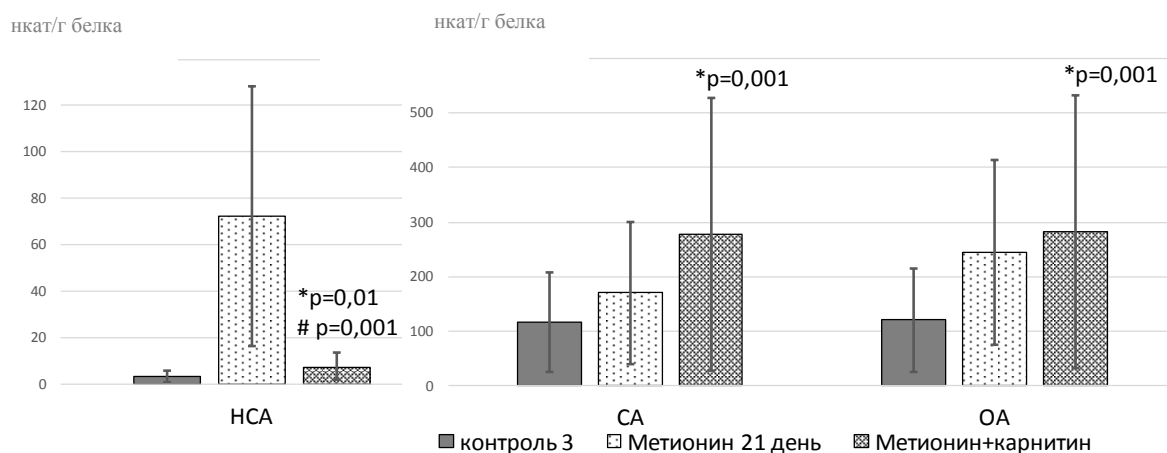
*Примечание:* \* -статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ )  
# -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

Рисунок 57. Активность кислой фосфатазы миокарда при введении карнитина, нкат/гбелка



*Примечание:* \* -статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ )  
# -статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

Рисунок 58. Активность кислой фосфатазы скелетной мышцы при введении карнитина, нкат/гбелк



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

#-статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин ( $p < 0,05$ )

Рисунок 59. Активность кислой фосфатазы грудной аорты при введении карнитина, нкат/гбелка

В сердечной мышце обнаружено статистически значимое нарастание коэффициента лабильности обоих катепсинов с одновременным снижением данного показателя для кислой фосфатазы в группе, совместно получавших метионин с карнитином относительно выборки с гипергомоцистеинемией. В скелетной мышце и грудной аорте установлено статистически значимое снижение коэффициента лабильности кислой фосфатазы относительно выборки, получавшей изолированно метионин, что позволяет предположить снижение эффекта дестабилизации лизосомальной мембраны под действием карнитина (табл. 29).

Таблица 29

Сравнительный анализ коэффициента лабильности кислой фосфатазы и катепсинов L, H мышечных тканей при введении карнитина (Me[Q1;Q3])

		Клаб% кислой фосфатазы	Клаб%	
			КатепсинL	КатепсинH
Миокард	Контроль 3	2,67 [1,81;3,28]	8,59 [3,06;15,22]	6,08 [3,97;7,79]
	метионин 21 день	8,05 [6,68;8,21]	2,54 [1,77;3,30]	3,15 [2,68;3,47]
	метионин+ карнитин	2,88 [2,18;4,02] <sup>#</sup> p=0,004	8,12 [1,15;11,70] <sup>#</sup> p=0,01	4,37 [4,04;4,90] <sup>#</sup> p=0,03
Скелетная мышца	Контроль 3	5,93 [4,69;6,66]	13,31 [6,77;42,50]	5,73 [5,34;6,26]
	метионин 21 день	6,03 [4,87;7,88]	8,99 [4,37;17,68]	7,15 [6,15;7,41]
	метионин+ карнитин	3,10 [2,69;4,27] <sup>*#</sup> <sup>*</sup> p=0,005 <sup>#</sup> p=0,005	2,94 [2,40;4,15]	8,58 [6,62;10,35]
Аорта	Контроль 3	2,67 [1,81;3,28]	22,12[19,10;25,70]	23,93[18,07;24,50]
	метионин 21 день	24,76[18,22;30,04]	12,38[9,72;23,55]	34,03[20,35;51,05]
	метионин+ карнитин	2,13 [1,92;2,30] <sup>#</sup> p=0,001	1,84 [0,63;4,13] <sup>*</sup> p=0,001	0,84 [0,75;1,24] <sup>*</sup> p=0,001

Примечание: \* -статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05),  
# статистически значимые отличия от группы метионин 21 день (p<0,5)

## 5. Анализ корреляционных связей выраженности окислительной модификации белков и активности катепсинов L и H

Анализируя полученные результаты установлены прямые корреляционные связи между общей площадью под кривой окислительной модификации белков и активностью лизосомальной доли катепсина L при выраженной гипергомоцистеинемии (рис. 61), активностью цитоплазматической фракции катепсина H при введении карнитина на фоне Твин 80 (рис. 60) и метионина в

миокарде (табл. 30). Прямые корреляционные связи обнаружены между общей площадью под кривой окислительной модификации белков и общей и седиментируемой активностью катепсина L при введении метионина на фоне карнитина в скелетной мышце (табл. 31, рис. 62, 63), а также при выраженной гипергомоцистеинемии в грудной аорте (табл. 32, рис. 64,65).

Коэффициенты корреляции (R) между общим содержанием карбонильных производных белков и активностью катепсинов L и H, кислой фосфатазы миокарда при выраженной гипергомоцистеинемии и введении L-аргинина, карнитина

Миокар д	Контроль 1		Метионин 21		Контроль 2		Метионин+ Аргинин		Контроль 3		Метионин+ Карнитин	
	R	p	R	p	R	p			R			p
Собщ & HCA Кат L	0,05	0,91	-0,41	0,49	-0,31	0,54	-0,66	0,16	-0,31	0,54	0,14	0,79
Собщ & CA Кат L	-0,29	0,48	<b><u>0,97</u></b>	<b><u>0,01</u></b>	-0,54	0,27	-0,14	0,79	-0,03	0,96	0,14	0,79
Собщ & OA Кат L	-0,29	0,48	1,00	0,57	-0,54	0,27	-0,09	0,87	0,09	0,87	0,14	0,79
Собщ & HCA Кат H	0,00	1,00	-0,10	0,87	-0,49	0,33	0,20	0,70	<b><u>-0,83</u></b>	<b><u>0,04</u></b>	<b><u>-0,94</u></b>	<b><u>0,01</u></b>
Собщ & CA Кат H	-0,24	0,56	0,40	0,50	-0,60	0,21	0,09	0,87	0,09	0,87	-0,09	0,87
Собщ & OA Кат H	-0,24	0,56	0,40	0,50	-0,60	0,21	0,09	0,87	0,09	0,87	-0,09	0,87
Собщ & КФ HCA	-0,10	0,82	0,60	0,28	0,60	0,21	-0,14	0,79	0,09	0,87	-0,37	0,47
Собщ & КФ CA	0,29	0,48	-0,30	0,62	0,54	0,27	-0,09	0,87	-0,77	0,07	0,60	0,21
Собщ & КФ OA	0,29	0,48	-0,30	0,62	0,54	0,27	-0,37	0,47	-0,77	0,07	0,60	0,21
Собщ & КФ Клаб	-0,29	0,40	0,60	0,28	-0,60	0,21	-0,26	0,62	0,49	0,33	-0,60	0,21

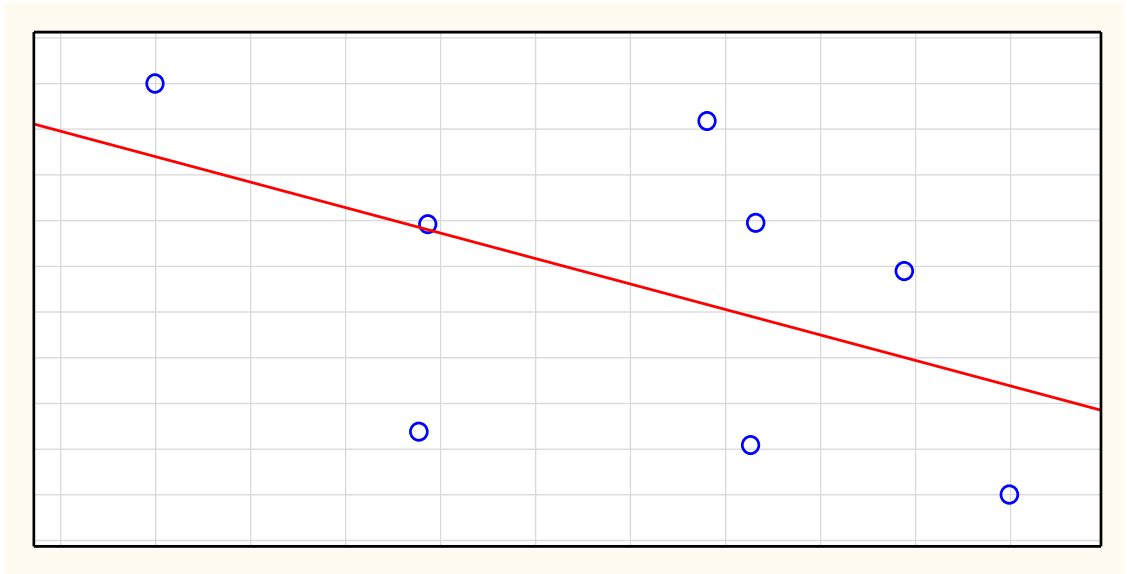


Рисунок 60. Корреляционная связь между общей площадью под кривой окислительной модификации белков и цитоплазматической долей катепсина Н миокарда при введении метионина на фоне Твин 80

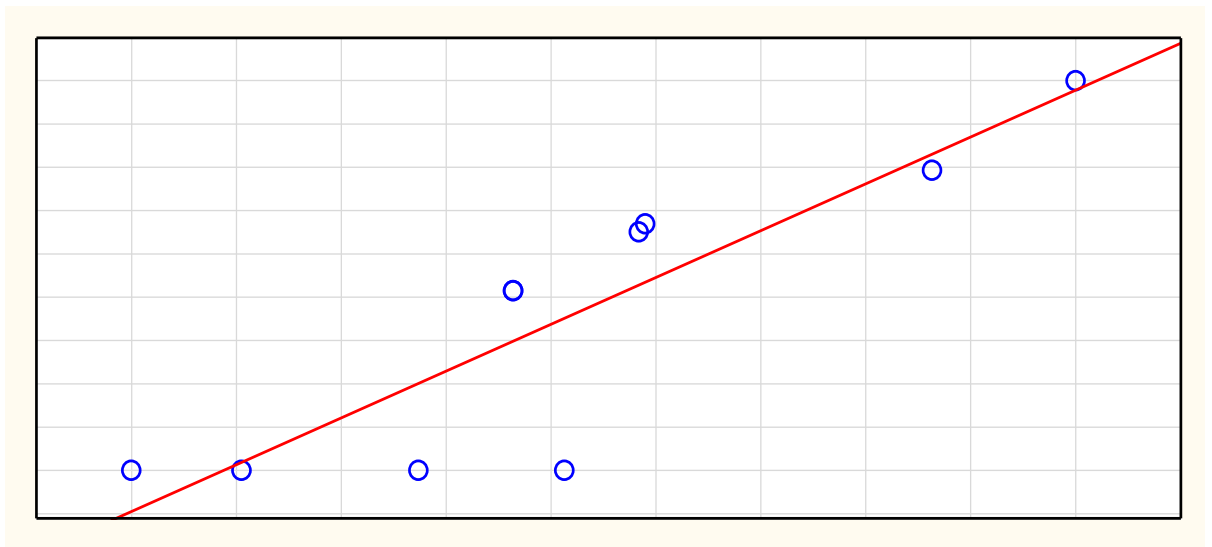


Рисунок 61. Корреляционная связь между общей площадью под кривой окислительной модификации белков и лизосомальной долей катепсина L миокарда при гипергомоцистеинемии

Коэффициенты корреляции (R) между общим содержанием карбонильных производных белков и общей активностью катепсинов L и H, кислой фосфатазы скелетной мышцы при выраженной гипергомоцистеинемии и введении L-аргинина, карнитина

Скелетная мышца	Контроль 1		Метионин 21 день		Контроль 2		Метионин+ Аргинин		Контроль 3		Метионин+ Карнитин	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Собщ & HCA Кат L	0,49	0,33	-0,70	0,19	0,37	0,47	0,71	0,11	0,31	0,54	0,77	0,07
Собщ & CA Кат L	-0,64	0,17	0,15	0,80	-0,37	0,47	-0,03	0,96	0,14	0,78	<b>-0,83</b>	<b>0,04</b>
Собщ & OA Кат L	-0,54	0,27	0,10	0,87	-0,26	0,62	-0,03	0,96	0,26	0,62	<b>-0,83</b>	<b>0,04</b>
Собщ & HCA Кат H	<b>0,83</b>	<b>0,04</b>	-0,30	0,62	0,03	0,96	-0,77	0,07	-0,37	0,47	0,03	0,96
Собщ & CA Кат H	-0,49	0,33	-0,30	0,62	-0,71	0,11	0,31	0,54	-0,31	0,54	-0,26	0,62
Собщ & OA Кат H	-0,49	0,33	-0,30	0,62	-0,71	0,11	0,31	0,54	-0,54	0,27	-0,26	0,62
Собщ & КФ HCA	-0,77	0,07	-0,70	0,19	-0,09	0,87	-0,37	0,47	-0,60	0,21	0,09	0,87
Собщ & КФ CA	-0,26	0,62	0,30	0,62	-0,03	0,96	-0,26	0,62	0,26	0,62	-0,77	0,07
Собщ & КФ OA	-0,49	0,33	0,30	0,62	-0,03	0,96	-0,26	0,62	0,26	0,62	-0,77	0,07
Собщ & КФ Клаб	0,03	0,96	-0,40	0,50	-0,20	0,70	-0,09	0,87	-0,60	0,21	0,49	0,33



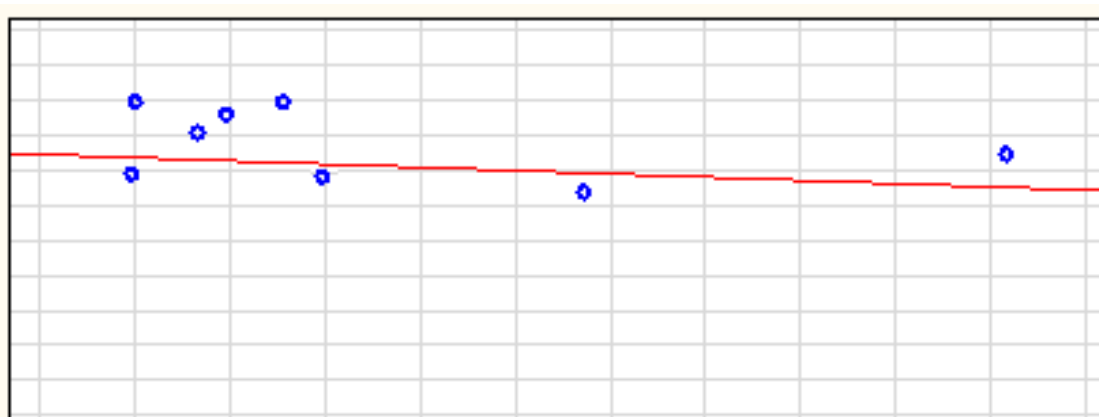


Рисунок 62. Корреляционная связь между общей площадью под кривой окислительной модификации белков и лизосомальной долей катепсина L скелетной мышцы при введении карнитина на фоне метионина

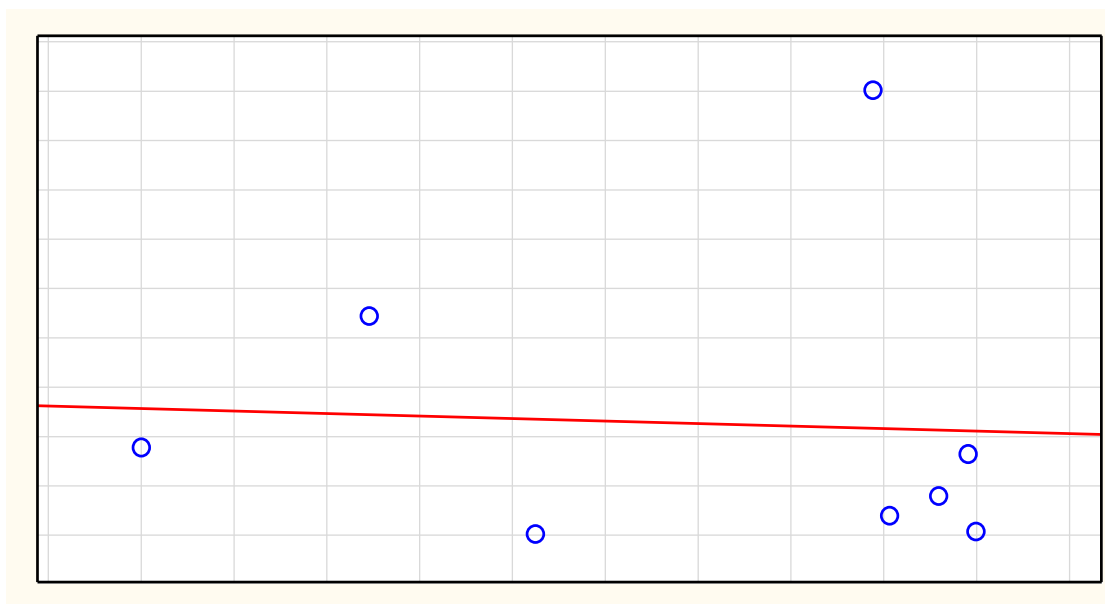


Рисунок 63. Корреляционная связь между общей площадью под кривой окислительной модификации белков и общей активностью катепсина L скелетной мышцы при введении карнитина на фоне метионина

Коэффициенты корреляции (R) грудной аорты между общим содержанием карбонильных производных белков и общей активностью катепсинов L и H, кислой фосфатазы при выраженной гипергомоцистеинемии и введении L-аргинина, карнитина

Грудная аорта	Контроль 1		Метионин 21 день		Контроль 2		Метионин+ Аргинин		Контроль 3		Метионин+ Карнитин	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Собщ & HCA Кат L	-0,10	0,87	0,20	0,75	<b><u>-0,90</u></b>	<b><u>0,04</u></b>	-0,54	0,27	-0,60	0,21	0,26	0,62
Собщ & CA Кат L	-0,10	0,87	<b><u>0,90</u></b>	<b><u>0,04</u></b>	-0,70	0,19	0,66	0,16	-0,26	0,62	-0,23	0,66
Собщ & OA Кат L	0,00	1,00	<b><u>0,90</u></b>	<b><u>0,04</u></b>	-0,70	0,19	0,66	0,16	-0,54	0,27	-0,37	0,47
Собщ & HCA Кат H	-0,50	0,39	-0,10	0,87	-0,40	0,50	-0,09	0,87	0,09	0,87	0,49	0,33
Собщ & CA Кат H	0,20	0,75	0,20	0,75	0,30	0,62	0,31	0,54	0,20	0,70	0,43	0,40
Собщ & OA Кат H	0,20	0,75	0,20	0,75	0,60	0,28	0,31	0,54	0,03	0,96	0,43	0,40
Собщ & КФ HCA	-0,20	0,75	0,40	0,50	0,40	0,50	-0,60	0,21	0,43	0,40	-0,14	0,79
Собщ & КФ CA	0,70	0,19	0,70	0,19	-0,10	0,87	-0,26	0,62	-0,54	0,27	-0,49	0,33
Собщ & КФ OA	0,70	0,19	0,70	0,19	-0,10	0,87	-0,26	0,62	0,54	0,27	-0,49	0,33
Собщ & КФ Клаб	-0,60	0,28	0,30	0,62	0,20	0,75	-0,26	0,62	<b><u>0,83</u></b>	<b><u>0,04</u></b>	0,43	0,40

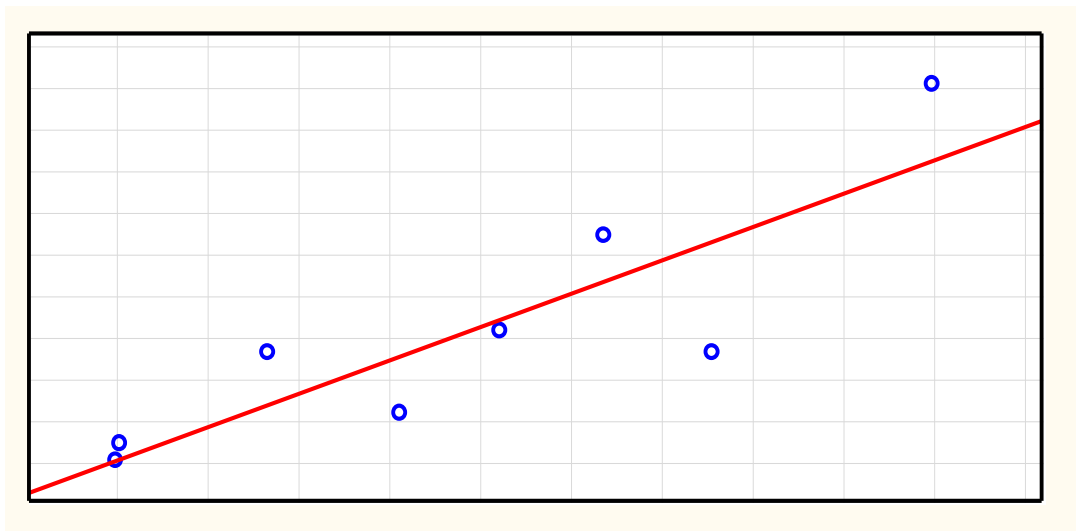


Рисунок 64. Корреляционная связь между общей площадью под кривой окислительной модификации белков и лизосомальной долей катепсина L грудной аорты при выраженной гипергомоцистеинемии

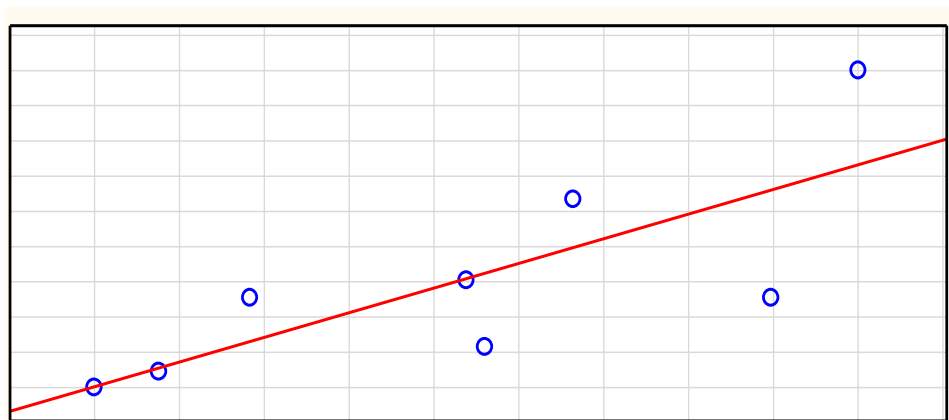


Рисунок 65. Корреляционная связь между общей площадью под кривой окислительной модификации белков и общей активностью катепсина L грудной аорты при введении карнитина на фоне метионина

Таким образом, установлено, что активность катепсинов L, Н при гипергомоцистеинемии разной степени выраженности нарастает и сопровождается эффектом пермеабиллизации лизосомальных мембран. Влияние аргинина и карнитина демонстрируют, в целом, благоприятный корректирующий эффект на влияние гипергомоцистеинемии в мышечных тканях. Кроме, того установлена взаимосвязь между окислительной модификацией белков и лизосомальным цистеиновым протеолизом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство исследований, посвященных проблеме гипергомоцистеинемии, связаны с риском развития сердечно - сосудистой [3,5,23,74,102], неврологической [8], акушерской [20,115], и любой другой патологии, в основе которой лежит развитие эндотелиальной дисфункции [13], вазоконстрикция [37], тромбообразование [39], усиление митотической активности миоцитов сосудистой стенки [23,45]. Обнаружение и эффекты воздействия повышенных концентраций гомоцистеина в различных тканях и органах практически не освещено в современной науке. Наравне с этим достаточно много источников приводят описание гипергомоцистеинемии, как предиктора развития окислительного стресса [132,199]. Именно поэтому, в данном эксперименте были изучены лизосомальный цистеиновый протеолиз и окислительная модификация белков мышечных тканей, а также взаимосвязь этих процессов при гипергомоцистеинемии и коррекции данного состояния L-аргинином и карнитином.

Для более подробного исследования влияния гомоцистеина, необходимо изучение различных концентраций этой аминокислоты в сыворотке крови, с последующей оценкой ее эффектов в мышечных тканях.

Наращение содержания окислительно модифицированных белков при моделировании обеих моделей умеренной гипергомоцистеинемии (введение метионина 7 и 14 дней) отмечалось в миокарде и скелетной мышце, что сочеталось с наращением активности лизосомальных цистеиновых протеиназ, причем увеличение активности катепсинов L и H, наряду с персистенцией аккумулялированных белковых молекул в двух изучаемых моделях было характерно лишь для скелетной мышцы. Данные явления сопровождаются повышением активности кислой фосфатазы, что подтверждает факт увеличения и накопления лизосом. В грудной аорте мы наблюдали аналогичную картину лишь при более длительном введении метионина (14 дней), где активация карбонилирования белков сочеталась с истощением резервно-адаптационного потенциала сосудистой стенки и сопровождалась повышением активности обоих

катепсинов за счет седиментируемой (лизосомальной) фракции, снижением коэффициентов лабильности для кислой фосфатазы, что отвергает предположение об избыточно проницаемых мембран лизосом. Отсутствие феномена пермеабиллизации лизосомальных мембран в грудной аорте еще раз подтверждается снижением активности кислой фосфатазы при 14-дневном введении метионина относительно 7 дней. Необходимо отметить, что все изменения в обеих моделях умеренной гипергомоцистеинемии протекали при практически одинаковых концентрациях гомоцистеина, что позволяет предположить постепенное нарастание интенсивности развития окислительного стресса. Что же относительно экспериментальной модели с выраженной гипергомоцистеинемией, то во всех изучаемых мышечных тканях отмечалось нарастание содержания карбонильных производных белков в сочетании с интенсификацией лизосомального цистеинового протеолиза. В миокарде развитие окислительного стресса сопровождалось повышением активности всех фракций катепсина Н, что сопровождалось феноменом пермеабиллизации мембран лизосом, причем толерантность сердечной мышце к воздействию окисленных белков снижалась. В скелетной мышце и грудной аорте активность обоих катепсинов нарастала с той лишь разницей, что в стенке аорты устойчивость к окислительно поврежденным белкам снижалась, активность катепсина L повышалась за счет обеих фракций фермента, а активность катепсина Н за счет его цитоплазматической доли в сочетании с повышенной проницаемостью мембраны лизосом. В большеберцовой мышце животных наблюдалось нарастание обеих фракций изучаемых катепсинов без изменения стабильности лизосомальных мембран с накоплением агрегированных карбонильных производных белков.

Полученные данные позволяют говорить об интенсивных процессах карбонилирования белков и протеолиза вне зависимости от степени выраженности гипергомоцистеинемии в миокарде и скелетной мышце. В гладкомышечной мускулатуре мы же наблюдаем постепенное нарастание изучаемых явлений.

Влияние аргинина при гипергомоцистеинемии на изучаемые процессы в мышечных тканях имеет не однозначный эффект. Развитие карбонильного стресса, повышение активности системы лизосомальных цистеиновых протеиназ, сопровождается не только повышенной выработкой катепсинов, но и дестабилизацией лизосомальных мембран, что влечет за собой выброс ферментов в цитозоль, а, следовательно, запускаются программы клеточного разрушения. Помимо основной функции донатора оксида азота [33], аргинин необходим для синтеза креатина, являющегося субстратом креатинкиназы, несущей функцию депонирования и транспорта энергии, а также для синтеза полиаминов, которые способны ингибировать апоптоз клетки, а также захватывать свободные радикалы, оказывая антиоксидантную защиту [33,125,271]. С другой стороны, окисление полиаминов сопровождается образованием перекиси водорода и развитием окислительных изменений [271]. При коррекции эффектов гипергомоцистеинемии в изучаемых мышечных тканях аргинином, отмечалось снижение содержания карбонильных производных во всех изучаемых мышечных тканях и увеличение толерантности белков грудной аорты к окислительному повреждению. Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ в сочетании с коэффициентом лабильности кислой фосфатазы уменьшались в миокарде; в скелетной мышце благоприятное влияние L-аргинина отражалось лишь на активности катепсина Н и его коэффициента лабильности, цитоплазматической доли катепсина L. В грудной аорте снижалась лишь активность катепсина L за счет лизосомальной фракции, а цитоплазматическая доля фермента и активность катепсина Н увеличивалась. Причем параллельное снижение цитоплазматической доли кислой фосфатазы и коэффициента лабильности позволяет предположить стабилизацию лизосомальных мембран.

Эффекты карнитина на лизосомальный цистеиновый протеолиз в полной мере проявились в сердечной мышце, где наиболее значимым эффектом данного вещества традиционно считалось его участие в энергетическом обмене, за счет транспорта ацильных остатков жирных кислот [64]. Антиоксидантный эффект карнитина объясняют усилением метаболических процессов, а также

стабилизированием запасов АТФ [131]. Однако отсутствие влияния на окислительную модификацию белков миокарда и скелетной мышцы показывают неэффективность введения данного вещества для уменьшения интенсивности карбонильного стресса, хотя устойчивость мышечной ткани к окисленным белкам под влиянием карнитина отмечалась. В скелетной мускулатуре и грудной аорте снижение активности цитоплазматических долей катепсина L, кислой фосфатазы и ее коэффициента лабильности в сочетании с уменьшением продуктов карбонилирования белков, демонстрируют благоприятное влияние. Хотя, так же как и под влиянием аргинина, в гладкомышечной ткани под влиянием карнитина увеличивается активность катепсина H.

Исходя из этого, мы можем предположить неизбежные, но благоприятные эффекты L-аргинина и карнитина на лизосомальный цистеиновый протеолиз и окислительную модификацию белков в различных мышечных тканях.

## ВЫВОДЫ

1. Гипергомоцистеинемия различной степени выраженности приводит к накоплению продуктов окислительной модификации белков в мышечных тканях. L-аргинин и карнитин уменьшают интенсивность процессов карбонилирования белков, при этом для миокарда наиболее выраженным эффектом обладает аргинин, для грудной аорты – карнитин.
2. Активность катепсинов L и H мышечных тканей при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности имеет тенденцию к нарастанию. Введение аргинина и карнитина приводит к существенной коррекции указанных изменений в миокарде, с одновременным выраженным нарастанием активности катепсина H в грудной аорте.
3. При гипергомоцистеинемии различной степени выраженности обнаруживаются признаки дестабилизации лизосомальных мембран мышечных тканей, корректируемые карнитином. Для аргинина этот эффект обнаружен только в ткани миокарда.
4. При выраженной гипергомоцистеинемии в миокарде и грудной аорте установлены прямые положительные корреляционные связи между общим содержанием продуктов окислительной модификации белков и активностью лизосомальной доли катепсина L.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаленихина, Ю.В. Влияние L-аргинина на активность катепсинов В и Н селезенки крыс [Текст] / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной патологии: межрегион. темат. сб. науч. тр., посвящ. 90-летию со дня рождения выдающегося общего патолога и патофизиолога академика Г.Н. Крыжановского и 180-летию со дня рождения основоположника российской научной клинической медицины С.П. Боткина. – Рязань, 2012. – С. 14-18.
2. 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 // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №1. – С. 44-48.
3. Аракелян, В.С. Случай высокой окклюзии брюшной аорты на фоне наличия мутаций факторов свертывания крови и гипергомоцистеинемии [Текст] / В.С. Аракелян, Н.А. Гидаспов, М.С. Джабаева // Анналы хирургии. – 2014. – №6. – С. 57-60.
4. Арапова, А.И. Влияние L-аргинина и L-name на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемость лизосомальной мембраны в аорте крыс [Текст] / А.И. Арапова, М.А. Фомина // Казанский медицинский журнал.- 2016.- Т. 97, № 2.- С. 250-255.
5. Арзамасцев, Д.Д. Воспаление сосудистой стенки и гипергомоцистеинемия у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей [Текст] / Д. Д. Арзамасцев, А.А. Карпенко, Г.И. Костюченко // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – Т.18, №1. – С. 27-30.
6. Архипкина, Т.Л. Фолиевая кислота и её роль в репродуктивном здоровье женщин с синдромом поликистозных яичников [Текст] / Т.Л. Архипкина // Світ медицини та біології.- 2016.- Т. 12. № 1 (55).- С. 9-17.
7. Атеросклероз и окислительные процессы. Новые способы оценки окислительной модификации белков [Текст] / Ю.И. Рагино [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – № 4(122) . – С. 67-73.

8. Баранова, И.Е. Клиническое значение гомоцистеинемии [Текст] / И.Е. Баранова, О.О. Большакова // Артериальная гипертензия. – 2004. – Т.10,№1. – С.45-50.

9. Белобородова, Е.В. Гипергомоцистеинемия и осложненное течение беременности [Текст] / Е.В. Белобородова, В.О. Бицадзе, С.М. Баймурадова // Рус. мед. журн. – 2006. – (Спец.вып.). – С.44-48.

10. Бельских, Э.С. Современные представления о патогенезе и подходах к коррекции митохондриальной дисфункции [Текст] / Э.С. Бельских, В.И. Звягина, О.М.Урясьев// Наука молодых (Eruditio Juvenium).- 2016.- № 1.- С. 104-112.

11. Бизунок, Н.А. Фармакодинамические взаимодействия редокс-модулирующих аминокислот L-аргинина и таурина с плейотропными антиоксидантами [Текст] / Н.А. Бизунок // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. -2015.- № 4.- С. 68-84.

12. Бондарева, Л.А. Внутриклеточная Ca<sup>2+</sup>-зависимая протеолитическая система животных [Текст] / Л.А. Бондарева, Н.Н. Немова, Е.И. Кяйвярйнен. – М.: Наука,2006.

13. Булаева, Н.И. Эндотелиальная дисфункция и оксидативный стресс: роль в развитии сердечно-сосудистой патологии [Текст] / Н.И. Булаева, Е.З. Голухова // Креативная кардиология. – 2013. – № 1. – С.14-22.

14. Васильева, О.С. Комплексное участие цистеиновых катепсинов в раковой прогрессии [Текст] / О.С. Васильева; Ин-т им. И. Стефана (Любляна, Словения) // Электронный научный журнал «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ».- Режим доступа: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2009/055.pdf> - С. 677-685.

15. Верткин, А.Л. Проблема гипергомоцистеинемии у кардиологических больных [Текст] / А.Л. Верткин, А.В. Тополянский // Фарматека. – 2007. – №15. – С.10-14.

16. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы [Текст] / Ю.А. Владимиров // Вестн. Рос. АМН. – 1998. – №7. – С.43-51.

17. Влияние гипергомоцистеинемии на тяжесть гипертензии у беременных и перинатальные исходы [Текст] / Л.Е. Мурашко [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2010. – №3. – С.24-27.

18. Влияние производных пиримидина и тиетанурацила на оксидативный и психоэмоциональный стресс у лабораторных животных [Текст] / И.В. Петрова [и др.] // Современные проблемы науки и образования.- 2016.- № 2.- С. 111.

19. Влияние пролинсодержащих олигопептидов PGP и RGP на пролиферативную и белок-синтетическую активность в культуре пульмональных фибробластов при оксидативном стрессе [Текст] / И.В. Толстенок [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2016.- № 1.- С. 50-53.

20. Гайструк, Н.А. Современные аспекты диагностики и терапии дистресса плода и ранних сосудистых нарушений у беременных [Текст] / Н.А. Гайструк, О.О. Мазаченко, М.В. Надеждин // Здоровье женщины. – 2012.- №8 (74).- С.98.

21. Генетические факторы тромбофилии и гипергомоцистеинемия при неразвивающейся беременности и начавшемся выкидыше [Текст] / Ю.Э. Доброхотова [и др.] // Рос. мед. журн. – 2008. – №1. – С.42-44.

22. Гипергомоцистеинемия - один из факторов развития тромботических осложнений у больных с хроническими миелопролиферативными заболеваниями [Текст] / М.А. Соколова [и др.] // Терапевт. арх. – 2007. – Т.79,№12. – С.57-62.

23. Гипергомоцистеинемия и возможности ее коррекции при посттромботическом синдроме нижних конечностей [Текст] / Р.Е. Калинин [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.- 2016. - № 1. - С. 61-67.

24. Гипергомоцистеинемия и острофазные белки плазмы у больных сахарным диабетом 2 типа с тяжелым течением атеросклероза, после сосудистых операций [Текст] / Р.М. Догужиева [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Т.17, №4. – С. 24-28.

25. Гипергомоцистеинемия и фолиевая кислота при невынашивании беременности [Текст] / Ю.Э. Доброхотова [и др.] // Российский вестник акушера – гинеколога. – 2007. – №5. – С.8-11.
26. Гипергомоцистеинемия как предиктор прогрессирования хронического пиелонефрита [Текст] / А.А. Протопопов [и др.] // Клиническая нефрология. – 2013. – №6. – С. 33-36.
27. Гипергомоцистеинемия у детей с пиелонефритом [Текст] / О.В. Нестеренко [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2016.- Т. 61,№ 4.- С. 88-92.
28. Гипергомоцистеинемия у мужчин Новосибирска [Текст] / Ю.П. Никитин [и др.] // Кардиология. – 2006. – Т.46,№4. – С.30-33.
29. Гиперинсулинемия в повреждении миокарда [Текст] / Л.Д. Хидирова [и др.] // Международный журнал прикладных и экспериментальных исследований. – 2009. – №4. – С.95.
30. Глебов, А.Н. Роль кислородосвязывающих свойств крови в развитии окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом [Текст] / А.Н. Глебов, Е.В. Шульга, В.В. Зинчук. – Гродно,2011. – 216 с.
31. Глущенко, С.В. Патогенетические механизмы развития неакогальной жировой болезни печени / С.В. Глущенко // Новости медицины и фармации. – 2012. – № 414: Гастроэнтерология. – С. 48-49.
32. Гомоцистеин, полиморфизмы гена MTHFR и осложнения беременности [Текст] / Е.А. Трифонова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2011. – №2. – С. 8–15.
33. Граник, В.Г. Метаболизм L-аргинина (обзор) [Текст] / В.Г. Граник // Хим.- фармац. журн. – 2003. – Т. 37, № 3. – С. 3–20.
34. Губский, Ю.И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) [Текст] / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т. 8, №3. – С. 20–26.

35. Де Сильва, Н.М. Дисфункции эндотелия у больных бронхиальной астмой [Текст] / Н.М. де Сильва, В.И. Немцов, В.И. Трофимов // Российский аллергологический журнал.- 2015.- № 2.- С. 15-18.

36. Дементьева, Н.А. Активность цистеиновых протеиназ у детей с гемангиомами [Текст] / Н.А. Дементьева, О.Ю. Боренко, О.Л. Лянная // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии.- 2014.- Т.4, № 1.- С. 16-19.

37. Диагностическая значимость определения содержания факторов повреждения эндотелия для оценки выраженности эндотелиальной дисфункции при остром коронарном синдроме [Текст] / Н.Н. Петрищев [и др.] // Клиническая больница.- 2015.- № 1 (11).- С. 41-45.

38. Дилакян, Э.А. Лизосомные цистеиновые протеиназы при неопластической трансформации [Текст] / Э.А. Дилакян, И.В.Цветкова // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, вып. 5. – С. 485-500.

39. Дисфункция эндотелия при экспериментальной гипергомоцистеинемии [Текст] / Н.Н. Цыбиков [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2016.- Т. 60, № 3.- С. 42-46.

40. Драпкина, О.М. Диабет и сердце - поражение миокарда при диабетической кардиомиопатии [Текст] / О.М. Драпкина, Б.Б. Гегенава // Эндокринология: новости, мнения, обучение. - 2015.- № 3 (12).- С. 84-92.

41. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях [Текст] / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Украинский биохимический журнал. – 2008. – Т.80, №6. – С.5-18.

42. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты [Текст] / Е.Е. Дубинина.- СПб.: Издательство «Медицинская пресса», 2006. – 400 с.

43. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса [Текст] / Е.Е. Дубинина // Вопр. мед. химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561–581.

44. Думова, С.В. Коррекция внутриклеточного энергообмена у недоношенных новорожденных детей с задержкой внутриутробного развития [Текст] / С.В. Думова, О.Л. Чугунова // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского.- 2016.- Т. 95, № 1.- С. 17-23.

45. Жлоба, А.А. Оценка связывания гомоцистеина с фракцией белков плазмы, ассоциированных с ремоделированием сосудистой стенки [Текст] / А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина // Артериальная гипертензия. – 2013. – Т.19,№2. –С.184-188.

46. Заичко, Н.В. Уровень гидроген сульфида и состояние антиоксидантной системы в мозге крыс при изолированной гипергомоцистеинемии и ее коррекции [Текст] / Н.В. Заичко, П.А. Юрченко, Д.А. Фильчуков // Медицинский журнал. -2016.- № 1 (55).- С. 109-112.

47. Изменение жирнокислотного состава ДНК-связанных липидов селезенки крыс при фолат-индуцированной гипергомоцистеинемии как результат нестабильности геномной ДНК [Текст] / Р.И. Жданов [и др.] // Казан. мед. журн. – 2008. – Т.89,№2. – С.135-139.

48. Ильичева, А.С. Характеристика продуктов окислительного повреждения белков миокарда на фоне гипергомоцистеинемии [Текст] / А. С. Ильичева, М. А. Фомина, Д. В. Медведев // Наука молодых. – 2014. – №4. – С. 37-43.

49. Исследование эндотелио- и кардиопротективных эффектов эналаприла, лозартана и амлодипина при моделировании гипергомоцистеин индуцированной эндотелиальной дисфункции [Текст] / М. В. Корокин [и др.] // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – №1. – С. 60-65.

50. Калашникова, Е.А. Ассоциация наследственных факторов тромбофилии с невынашиванием беременности у женщин в русской популяции [Текст] / Е.А. Калашникова // Медицинская генетика. – 2005. – Т.4, №8. – С.386-390.

51. Катепсин D - его физиологическая роль и использование в медицине (обзор литературы) [Текст] / А. М. Герасимов [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. – 2009. – №3. – С.3-5.

52. Кирпиченок, Л.Н. Значение компонентов системы протеолиза в регуляции воспалительных реакций [Текст] / Л.Н. Кирпиченок // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2010. – №2 (4). – С.15-23.

53. Клинико-биохимическое значение комплексного изучения молекул средней массы и окислительной модификации белков для оценки эндотоксикоза [Текст] / Г.К. Рубцов [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.- 2013.- Т. 11, № 2.- С. 41-47.

54. Копелевич, В.М. Витаминоподобные соединения L-карнитин и ацетил - L-карнитин: от биохимических исследований к медицинскому применению [Текст] / В.М. Копелевич // Украинский биохимический журнал. – 2005. – Т.77,№4. – С.25-45.

55. Корнацкая, А.Г. Особенности обмена гомоцистеина и фолиевой кислоты у женщин с бесплодием и доброкачественной дисплазией молочных желез [Текст] / А.Г. Корнацкая, О.Д. Дубенко // Репродуктивное здоровье Восточная Европа.- 2015.- № 2 (38).- С. 30-44.

56. 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.

57. Король, Л.В. Показники окисної модифікації білків крові у хворих на пієлонефрит [Текст] / Л.В. Король // Вестник проблем биологии и медицины. - 2015.- Т.1, №2.-С.140-144.

58. Кравченко, Ю.В. Исследование системы антиокислительной защиты в условиях алиментарно индуцированного окислительного стресса [Текст] / Ю.В. Кравченко, Г.Ю. Мальцев, А.В. Васильев // Биомедицинская химия. – 2009. – Т.50,№5. – С. 477-483.

59. Куликов, В.Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани

(обзор) [Электронный ресурс] [Текст] / В.Ю. Куликов // Медицина и образование в Сибири: электронный научный журнал. – 2009. – № 4. – Режим доступа : [http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=363](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=363)

60. Ланкин, В.З. О роли свободных радикалов в атерогенезе [Текст] / В.З. Ланкин // Кардиологический вестник. – 2009.- Т.4(16), № 1. – С. 62-63.

61. Ланкин, В.З. Окислительный и карбонильный стресс при атеросклерозе и диабете [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе // Тезисы докладов Пленарного заседания (Plenary Session Abstracts, June 25-26,2015). – 2015. – С.16-18. – Электрон. дан. – Режим доступа: [elib.bsu.by/bitstream/123456789/119724/1/16](http://elib.bsu.by/bitstream/123456789/119724/1/16)

62. Лебедеженкова, М.В. Клиническое значение гипергомоцистеинемии в прогрессировании нефропатий (Обзор литературы) [Текст] / М.В. Лебедеженкова // Нефрология и диализ. – 2006. – Т.8, №4. – С.329-335.

63. Леонтьева, И.В. Кардиомиопатии при врожденных нарушениях метаболизма у детей [Текст] / И.В. Леонтьева, Е.А. Николаева// Российский вестник перинатологии и педиатрии.- 2016.- Т. 61, № 2.- С. 17-27.

64. Лушак, В.И. окислительный стресс и механизмы защиты от него [Текст] / В.И. Лушак // Биохимия.- 2001.- Т.66,№5.- С.592-609.

65. Лысенко, Л.А. Протеолитическая регуляция биологических процессов [Текст] / Л.А. Лысенко, Н.Н. Немова, Н.П. Канцерова.- Петрозаводск: Карельский научный центр РАН,2011. – 482 с.

66. Маслов, А.П. Гипергомоцистеинемия и повышенный риск сердечно – сосудистых осложнений у больных ИБС с атерогенной гиперхолестеринемией [Текст] / А.П. Маслов, А.Т. Тепляков, А.В. Кузнецова // Сиб. мед. журн. – 2009. – № 4, вып. 9. – С. 25-30.

67. Медведев, Д.В. Изучение биохимических механизмов развития дисфункции митохондрий гепатоцитов при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс [Текст] / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // Вопросы питания.- 2016.- Т. 85, № 1.- С. 29-35.



68. Медведев, Д.В. Метаболизм митохондрий клеток сердца при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс [Текст] / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // Фундаментальные исследования.- 2015.- № 2-4.- С. 734-739.
69. Медведев, Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс [Текст] / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, М.А. Фомина // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – №4. – С. 42-46.
70. Метаболическая коррекция гипергомоцистеинемии, дисфункции эндотелия и упруго-эластических свойств сосудов в постинфарктном периоде / А.В. Пырочкин [и др.] // Кардиология в Беларуси. – 2009. – №4(05) . – С.66-78.
71. Метаболический синдром [Текст] / под ред. чл.-корр. РАМН Г.Е. Ройтберга. – М.: МЕД-М54 пресс-информ, 2007. – 224 с.
72. Механизмы окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессах [Текст] / В.З. Ланкин [и др.] // Биохимия. – 2007. – Т.72. – С.1330-1341.
73. Механизмы хемилюминесценции в реакции Фентона [Текст] / Н.А. Аристова [и др.]. – М., 2011. – 23 с.
74. Милевская, И.В. Гипергомоцистеинемия и ремоделирование сосудов у больных артериальной гипертензией [Текст] / И.В. Милевская // Казан. мед. журн. – 2007. – Т.88, №5. – С.437-440.
75. Мохорт, Т.В. Потенциальная роль L-карнитина при сахарном диабете [Текст] / Т.В. Мохорт // Кардиология в Беларуси. -2015. -№ 6 (43). -С. 120-130.
76. Нарушение процессов перекисного окисления белков, липидов и антиоксидантной защиты при развитии бесплодия у больных хроническим простатитом на фоне инфекций, передающихся половым путём [Текст] / Р.А. Садретдинов [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник.- 2016.- № 1 (156).- С. 121-124.
77. Наумов, А.В. Три пути реметилирования гомоцистеина [Текст] / А.В. Наумов, И.В. Данильчик, Ю.В. Сарана // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. -2016.- № 2 (54).- С. 27-32.

78. Некоторые аспекты кардиопротективного действия потенциального антиангинального препарата "МТ" при моделировании острой ишемии миокарда [Текст] / И.С. Чекман [и др.] // Запорожский медицинский журнал. – 2010. – Т. 12, №5. – С. 198–202.

79. Некоторые генетические особенности метаболизма гомоцистеина, фолатов и монооксида азота как факторы риска ишемической болезни сердца [Текст] / С.Г. Щербак [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. -2016. -Т. 8, № 1.- С. 123-130.

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

81. Никонова, Л.В. Возможности фармакологической коррекции гипергомоцистеинемии [Текст] / Л.В. Никонова, В.А. Снежицкий, Э.В. Давыдчик // Рецепт.- 2015.- № 3 (101).- С. 16-25.

82. Новоселов, В.И. Роль пероксиредоксинов при окислительном стрессе в органах дыхания [Текст] / В.И. Новоселов // Пульмонология. – 2012. – № 1. – С.83-87.

83. Одинак, М.М. Уровень гомоцистеина плазмы, риск цереброваскулярных заболеваний и витамины группы В [Текст] / М.М. Одинак, С.Н. Янишевский, И.А. Вознюк // Медлайн-Экспресс. – 2008. – №1. – С.20-23.

84. Окислительная модификация белков - ранний критерий развития хронической обструктивной болезни лёгких [Текст] / М.Н. Палей [и др.] // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина.- 2014.- № 2.- С. 164-170.

85. Окислительная модификация белков и система глутатиона в адипоцитах при сахарном диабете [Текст] / Е.В. Шахристова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины.- 2014.- Т. 13, № 3.- С. 84-90.

86. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования [Текст] / Л.Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования.– 2010.–№1. – С.74-78.
87. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты [Текст] / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – М.: Слово, 2006. – 553 с.
88. Окислительный стресс: влияние на секрецию инсулина, рецепцию гормона адипоцитами и липолиз в жировой ткани [Текст] / В.В. Иванов [и др.] // Бюллетень сибирской медицины.- 2014.- Т. 13, № 3.- С. 32-39.
89. Оксидативный стресс и старение: возможности коррекции [Текст] / Т. Титова [и др.] // Врач.- 2015.- № 6.- С. 6-10.
90. Особенности функционирования митохондрий миокарда у крыс со спонтанной гипертензией (SHR) на фоне экспериментального сахарного диабета и атеросклероза [Текст] / М.Ю. Колесник [и др.] // Запорожский медицинский журнал. – 2012. – №2 (71). – С. 26-30.
91. Оценка окислительной модификации белков у больных хроническими распространенными дерматозами [Текст] / Т.В. Копытова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика.- 2014.- Т. 59, № 2.- С. 41-44.
92. Оценка роли гипергомоцистеинемии и полиморфизма С677Т гена метилентетрагидрофолат-редуктазы в развитии хронической сердечной недостаточности [Текст] / А.Т. Тепляков [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика.- 2016. -Т. 15, № 4.- С. 22-28.
93. Панин, Л.Е. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении [Текст] / Л.Е. Панин, Н.Н. Маянская. – Новосибирск: Наука СО, 1987. – 198 с.
94. Пат. 2414755 РФ, МПК6 G09B23/28. Способ моделирования гипергомоцистеин индуцированной эндотелиальной дисфункции [Текст] / Емельянов Сергей Геннадьевич [и др.]; заявитель и патентообладатель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Юго-Западный государственный университет» - № 2009138369/14; опубл. 20.03.2011, Бюл. № 8.- 4 с. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.findpatent.ru/patent/241/2414755.html>

95. Пат. 2524667 РФ, МПК 11 G01N33/52. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях / заявители: М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина, Н.В. Фомина, А.А. Терентьев; патентообладатель: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). – № 2013102618/15; заявл. 21.01.2013; опубл. 27.07.2014, Бюл. №21. – 9 с.

96. Патогенетические аспекты развития акушерской патологии при гипергомоцистеинемии [Текст] / О.В. Макаров [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2008. – №4. – С.3-5.

97. Патофизиологические и клинические аспекты применения L-аргинина в кардиологии и ангиологии [Текст] / В.В. Валеев [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. -2016.- Т. 22. № 3.- С. 9-14.

98. Паунова, С.С. Апоптоз – физиология и патология (Обзор литературы) [Текст] / С.С. Паунова // Нефрология и диализ. – 2004. – Т.6, №2. – С.132-137.

99. Перекисное окисление липидов как патогенетическая основа развития эндотелиальной дисфункции [Текст] / Д.А. Зобова [и др.] // Medicus. -2016. - № 3 (9). -С. 21-22.

100. Погорелова, Т.Н. Плацентарная экспрессия белков хроматина и их посттрансляционная модификация при осложненной беременности [Текст] / Т.Н. Погорелова, В.О. Гунько, В.А. Линде // Проблемы репродукции.- 2013.- № 6.- С. 82-85.

101. Подунай, Ю.А. Возрастная динамика активности катепсинов и содержания среднемoleкулярных пептидов в мышцах морского ерша [Текст] / Ю.А. Подунай, И.Н. Залевская, И.И. Руднева // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия».– 2009.–Т. 22 (61), № 4.– С.128-134

102. Покровский, А.В. Значение гипергомоцистеинемии при сосудистых заболеваниях [Текст] / А.В. Покровский, Р.М. Догужиева // Анналы хирургии. – 2009. – №1. – С.5-8.

103. Попова, А.Н. Активность катепсина Н в крови и биоптатах больных с предопухолевыми состояниями полости рта [Текст] / А.Н. Попова, А.А. Жлоба, М.М. Соловьев // Вопр. онкологии. – 2001. – Т.47,№5. – С.590-594.

104. Предикторы прогрессирующего течения облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей [Текст] / С.С. Дунаевская [и др.] // В мире научных открытий.- 2015.- №2(62).- 95-107.

105. Провоторов, В.М. Роль оксидативного стресса в патогенезе бронхиальной астмы [Текст] / В.М. Провоторов, Ю.И. Филатова, А.В. Чернов // Прикладные информационные аспекты медицины.- 2015.- Т. 18, № 4.- С. 43-49.

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

107. Раимжанов, А.Р. Геморрагический микротромбоваскулит: первичный гемостаз и иммунологические показатели / А.Р. Раимжанов, О.А. Джакыпбаев // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. -2016. -Т. 9, № 1. - С. 70-74.

108. Решетняк, Т.М. Значение гипергомоцистеинемии при системной красной волчанке и антифосфолипидном синдроме [Текст] / Т.М. Решетняк, И.Е. Широкова, Т.Л. Лисицына // Терапевт. арх. – 2006. – Т.78,№6. – С.24-30.

109. Роль гипергомоцистеинемии в патогенезе сосудистых осложнений сахарного диабета 2-го типа [Текст] / В. В. Потемкин [и др.] // Рос. мед. журн. – 2007. – №3. – С.53-55.

110. Роль гипергомоцистеинемии в реализации репродуктивных потерь и методы ее коррекции [Текст] / Л.А. Герилович [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2013. – №4. – С. 84-88.

111. Роль оксидативного стресса в становлении и прогрессировании гипертонической болезни [Текст] / О.Н. Ковалёв [и др.] // Научные ведомости

Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация.- 2015.- Т. 29, № 4 (201). -С. 5-10.

112. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза [Текст] / Г.А. Яровая [и др.] // Лабораторная медицина. – 2011. – №11. – С.39-52.

113. Роль экстраклеточного и внутриклеточного оксида азота в регуляции клеточных ответов макрофагов [Текст] / Е.В. Малышева [и др.] // Бюллетень эксперим. биологии и медицины. – 2006. – Т.141, №4. – С. 386-388.

114. Саенко, Ю.В. Роль оксидативного стресса в патологии сердечно-сосудистой системы у больных с заболеваниями почек (Сообщение II. Клинические аспекты оксидативного стресса) [Текст] / Ю.В. Саенко, А.М. Шутов // Нефрология и диализ. – 2004. – Т.6, №2. – С.138-144.

115. Самигуллина, А.Э. Роль гипергомоцистеинемии в развитии репродуктивной недостаточности (обзор литературы) [Текст] / А.Э. Самигуллина, А.К.Кушубекова // Наука, новые технологии и инновации.- 2016.- № 6.- С. 30-33.

116. Связь гормонов жировой ткани с маркерами воспаления и гомоцистеином при коронарном атеросклерозе [Текст] / Е.М. Стахнёва [и др.] // Атеросклероз и дислипидемии. -2016.- № 3 (24). -С. 75-79.

117. Сеницкая, Н.С. Роль пептидов в свободно-радикальном окислении и старении организма [Текст] / Н.С. Сеницкая, В.Х. Хавинсон // Успехи совр. биологии. – 2002. – Т. 122, вып. 6. – С. 557.

118. Сопоставление мембранных токов, кальциевых ответов и митохондриального потенциала при действии гомоцистеина на нейроны коры мозга крыс [Текст] / П.А. Абушик [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии.- 2015.- Т.51, № 4.- С. 258-265.

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

120. Столяров, А.А. Исследование активности протеолитических ферментов в злокачественных новообразованиях молочной железы, желудка,

кишечника и почек человека [Текст] /А.А. Столяров, В.Б Соловьев // Современные проблемы науки и образования. 2015. №6.- С. 571.

121. Стресс-ответ и апоптоз в про- и противовоспалительном фенотипе макрофагов [Текст] / Ю.И. Малышев [и др.] // Бюллетень эксперим. биологии и медицины. – 2004. – Т.138, №8. – С.162-165.

122. Ступницкий, М.А. Показатели оксидативного стресса как ранние критерии оценки состояния пациентов с тяжелой сочетанной торакальной травмой [Текст] /М.А. Ступницкий // Политравма.- 2014.- № 2.- С. 42-47.

123. Тадтаева, З.Г. Полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы, гипергомоцистеинемия и возможности ее медикаментозной коррекции при мигрени у детей [Текст] / З. Г. Тадтаева, Ю. Л. Кацадзе // Казан. мед. журн. – 2007. – Т.88,№1. – С.16-20.

124. Толочко, З.С. Влияние капсаицина на окислительную модификацию белков плазмы крови и артериальное давление у крыс, потреблявших фруктозу [Текст] / З.С. Толочко, В.К. Спиридонов // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2012. – Т.75, №3. – С. 3-6.

125. Трещинская, М.А. Теоретические и практические аспекты применения L-аргинина с целью профилактики цереброваскулярной патологии [Текст] / М.А. Трещинская // Укр. мед. часопис. – 2011. – 10 жовтня. – [Електронна публіка ція]. – Режим доступа: [www.umj.com.ua](http://www.umj.com.ua)

126. Тугушева, Ф.А. Оксидативный стресс и его участие в неимунных механизмах прогрессирования хронической болезни почек [Текст] / Ф.А. Тугушева // Нефрология. – 2009. – №13 (3). – С.15-24.

127. Ушкалова, Е.А. Роль гипергомоцистеинемии и дефицита витаминов группы В в развитии осложнений беременности [Текст] / Е.А. Ушкалова // Фарматека. – 2007. – №14. – С.10-15.

128. Филиппов, Е.В. Возможности фармакологической коррекции дисфункции эндотелия у пациентов с артериальной гипертензией: исследование никомах [Текст] / Е.В. Филиппов, С.С. Якушин // Кардиология.- 2015.- Т. 55, № 11.- С. 45-49.

129. Фофанова, И.Ю. Роль фолатов в профилактике гипергомоцистеинемии у беременных и ее последствий [Текст] / И. Ю. Фофанова, В. Н. Прилепская // Акушерство и гинекология. – 2014. – №10. – С. 8-15.

130. Хурани, И.Ф. Влияние мутации гена MTHFR на активность прооксидантных и профибротических агентов и уровень гомоцистеина у больных раком грудной железы [Текст] / И.Ф. Хурани, А.Ж. Чень // Здоровье женщины.- 2015.- № 1 (97).- С. 192.

131. Шалькевич, Л.В. Метаболическая терапия заболеваний нервной системы у детей лекарственными средствами на основе карнитина [Текст] / Л.В. Шалькевич, А.В. Малаш // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье.- 2016.- № 3 (21).- С. 6-17.

132. Шмелева, В.М. Состояние окислительной и антиокислительной систем у больных с атеросклерозом при наличии и отсутствии гипергомоцистеинемии [Текст] / В.М. Шмелева, Л.П. Рыбакова // Казан. мед. журн. – 2008. – Т.89, №3. – С.281-285.

133. Шульпекова, Ю.О. Неалкогольная жировая болезнь печени: патогенез, диагностика, лечение [Текст] / Ю.О. Шульпекова // Фарматека. – 2007. – №6. – С.48-53.

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

135. Эндотелиальная дисфункция у больных с хронической ишемией мозга и возможности ее фармакологической коррекции [Текст] / А. И. Федин [и др.] // Лечащий врач. – 2015. – №5. – Электрон. дан.- Режим доступа: <http://www.lvrach.ru/>

136. 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.



137. Якубовский, С. В. Динамика некоторых показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у больных острым холециститом [Текст] / С. В. Якубовский, С. В. Ткачев, Д. П. Кривонос // БМЖ. – 2007. – № 2 (20). – С. 41–47.
138. Age-related changes in oxidized proteins [Text] / C.N. Oliver [et al.] // J Biol Chem. – 1987. – Vol.262, № 12. – P.5488-5491.
139. Age-related oxidation reaction in proteins [Text] / E.R. Stadtman [et al.] // Toxicol Ind Health. – 1993. – Vol.9, № 1-2. – P.187-196.
140. Aits, S. Methods for the quantification of lysosomal membrane permeabilization: a hallmark of lysosomal cell death [Text] / S. Aits, M. Jäättelä, J. Nylandsted // Methods Cell Biol. – 2015. – Vol.126. – P.261-285.
141. Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: role of the brain oxidative stress [Text] / D. Hronic [et al.] // Can J Physiol Pharmacol. -2016.- Oct.
142. Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions [Text] / T. Bachetti [et al.] // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2004. – Vol. 37. – P. 515–523.
143. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro [Text] / R. Ménard [et al.] // J Biol Chem. – 1998. – Vol.273, № 8. – P. 4478-4484.
144. Barja, G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction [Text] / G. Barja // Ageing Res Rev. – 2002.– № 3 . – P.397-411.
145. Barret, A.J. Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L [Text] / A.J. Barret, H. Kirshke // Methods in Enzymol. – 1981. – Vol.80. – P.535-561.
146. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization [Text] / A.E. Feldstein [et al.] // Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2006. – Vol. 290. – P. G1339–G1346.

147. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis [Text] / M.E. Guicciardi [et al.] // *Gastroenterology*. – 2005. – Vol. 129. – P. 269–284.

148. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase [Text] / I. Klemencic [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267. – P. 5404-5412.

149. Biomarkers of oxidative damage in human disease [Text] / I. Dalle-Donne [et al.] // *Clin Chem.* – 2006. – Vol. 32. – P. 601–623.

150. Bivik, C. JNK mediates UVB-induced apoptosis upstream lysosomal membrane permeabilization and Bcl-2 family proteins [Text] / C. Bivik, K. Ollinger // *Apoptosis*. – 2008. – Vol.13. – P. 1111–1120.

151. Brunk, U.T. Lysosomal involvement in apoptosis [Text] / U.T. Brunk, J. Neuzil, J.W. Eaton // *Redox Rep.* – 2001. – Vol.6, № 2. – P.91-97.

152. Butkowski, E.G. Interaction of homocysteine, glutathione and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in metabolic syndrome progression [Text] / E.G. Butkowski, H.A. Al-Aubaidy, H.F. Jelinek // *Clin Biochem.* - 2016.- Oct 15.

153. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal [Text] / P.A. Grimsrud [et al.] // *Mol Cell Proteomics*. – 2007. – Vol.6, № 4. – P.624-637.

154. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome - cell line P39 [Text] / T. Hishita [et al.] // *Cancer Res.* – 2001. – Vol.61. – P. 2878–2884.

155. Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia—warm reperfusion injury [Text] / E.S. Baskin-Bey [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2005. – Vol. 288, № 2. – P. 396-402

156. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells [Text] / L.E. Bröker [et al.] // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, № 1. – P. 27-30.

157. Cathepsin B with the inhibitor CA030, which occupies the S2, S1, S1J and S2J sites [Text] / D. Turk [et al.] // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34. – P. 4791–4797.

158. Cathepsin H mediates the processing of talin and regulates migration of prostate cancer cells [Text] / Z. Jevnikar [et al.] // *J Biol Chem*. – 2013. – Vol.288, № 4. – P.2201-2209.

159. Cathepsin S in tumours, regional lymph nodes and sera of patients with lung cancer: relation to prognosis [Text] / J. Kos [et al.] // *Br J Cancer*. – 2001.–Vol. 85, № 8.– P.1193–1200.

160. Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis [Text] / B. Bian [et al.] // *Mol Carcinog*. – 2015. – Mar 25. doi: 10.1002/mc.22312. [Epub ahead of print]

161. Cathepsin cleavage of sirtuin 1 in endothelial progenitor cells mediates stress-induced premature senescence [Text] / J. Chen [et al.] // *Am J Pathol*. – 2012. – Vol.180,№ 3. – P.973-983.

162. Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa [Text] / F. Buhling [et al.] // *Biol Chem*. –2004. – Vol.385. – P. 439-445.

163. Ciaccio, M. Therapeutical approach to plasmahomocysteine and cardiovascular risk reduction [Text] / M. Ciaccio, G. Bivona, C. Bellia // *Therap. and Clin. Risk Manag*. – 2008. – №4. – P. 219-224.

164. Ciechanover, A. Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture) [Text] / A. Ciechanover // *Angew Chem Int Ed Engl*. – 2005. – Vol.44,№ 37. – P.5944-5967.

165. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells [Text] / C.H. Yan [et al.] // *Toxicon*. – 2006. – Vol. 47. – P. 521–530.

166. Converging evidence of mitochondrial dysfunction in a yeast model of homocysteine metabolism imbalance [Text] / K. Arun [et al.] // *The Journal of Biological chemistry*. – 2011. – Vol. 286, №24. – P. 21779-21795.

167. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis [Text] / C. Schick [et al.] // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37, №15. – P. 5258–5266.

168. Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase [Text] / D.L. Carbone [et al.] // *Chem Res Toxicol*. – 2005. – Vol.18, № 8. – P.1324-1331.

169. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers [Text] / V. Turk [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol.1824, № 1. – P.68-88.

170. Cytotoxic effects of crotamine aremediated through lysosomal membrane permeabilization [Text] / M.A. Hayashi [et al.] // *Toxicon*. – 2008. – Vol. 52. – P. 508–517.

171. Davies, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids [Text] / K.J. Davies, M.E. Delsignore, S.W. Lin // *Journal of Biological Chemistry*. – 1987. – Vol.262, №20. – P. 9908-9913.

172. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in liver mitochondria [Text] / K. Hensley [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2000. – Vol.21, № 5. – P.983-989.

173. Differential Impact of Cysteine Cathepsins on Genetic Mouse Models of De novo Carcinogenesis: Cathepsin B as Emerging Therapeutic Target [Text] / T. Reinheckel [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2012. – Vol.3. – P.133.

174. Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence-accelerated mouse [Text] / I. Rebrin [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2005. – Vol.39, № 4. – P.549-557.

175. Effect of L carnitine supplementation on red blood cells deformability in hemodialysis patients [Text] / S. Nikolaos [et al.] // *Ren Fail*. – 2000. – Vol. 22, № 1. – P. 73–80.

176. Fehrenbacher, N. Lysosomes as Targets for Cancer Therapy [Text] / N. Fehrenbacher, M. Jaattela // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 65, № 8. – P. 2993–2995.

177. Fonović, M. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation

[Text] / M. Fonović, B. Turk // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – Vol.1840, № 8. – P.2560-2570.

178. Fonović, M. Cysteine cathepsins and their potential in clinical therapy and biomarker discovery [Text] / M. Fonović, B. Turk // *Proteomics Clin Appl.* – 2014. – Vol.8, № 5-6. – P.416-426.

179. Friedman, A.N. The Kidney and Homocysteine Metabolism [Text] / A.N. Friedman, A.G. Bostom // *J Am Soc Nephrol.* – 2001. – Vol. 12. – P. 2181–2189.

180. Global analysis of myocardial peptides containing cysteines with irreversible sulfinic and sulfonic acid post-translational modifications [Text] / J. Paulech [et al.] // *Mol Cell Proteomics.*- 2015.- Mar.

181. Glushchenko, A.V. Molecular Targeting of Proteins by l-Homocysteine: Mechanistic Implications for Vascular Disease [Text] / A.V. Glushchenko, D.W. Jacobsen // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2007. – Vol. 9, № 11. – P. 1883-1898.

182. Glutathione depletion and acute exercise increase O-GlcNAc protein modification in rat skeletal muscle [Text] / T.T. Peternejl [et al.] // *Mol Cell Biochem.*- 2015 – Feb.

183. High homocysteine, low vitamin B-6, and increased oxidative stress are independently associated with the risk of chronic kidney disease [Text] / C.H. Chen [et al.] // *Nutrition.*- 2016.- Feb

184. Histone retention, protein carbonylation, and lipid peroxidation in spermatozoa: Possible role in recurrent pregnancy loss [Text] / G. Mohanty [et al.] // *Syst Biol Reprod Med.*- 2016.- Jun.

185. Homocystein, cysteine and B vitamins as predictors of kidney disease progression [Text] / M.J. Sarnak [et al.] // *Am J Kidney Dis.* – 2002. – Vol. 40,№ 5. – P. 932-939.

186. Homocysteine enhances superoxide anion release and NADPH oxidase assembly by human neutrophils. Effects on MAPK activation and neutrophil migration [Text] / M. Alvarez-Maqueda [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2004. – Vol.172,№ 2. – P.229-238.

187. Homocysteine Induces Cardiomyocyte Dysfunction and Apoptosis through p38 MAPK-Mediated Increase in Oxidant Stress [Text] / Wanga Xu [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2012. – Vol. 52, № 3. – P. 753–760.
188. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport / L. Jin [et al.] // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2007. – Vol.58, №2. – P.191-206.
189. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappa B and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants [Text] / M.A. Carluccio [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* –2007. – Vol. 293, № 4. – P.H2344-2354.
190. Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis [Text] / B. Sreckovic [et al.] // *Diabetes Metab Syndr.*- 2016.- Aug 22.
191. Homocysteine stimulates phosphorylation of NADPH oxidase p47phox and p67phox subunits in monocytes via protein kinase Cbeta activation [Text] / Y.L. Siow [et al.] // *Biochem J.* – 2006. – Vol.398, № 1. – P.73-82.
192. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a metaanalysis [Text] // *JAMA.* – 2002. – Vol.288. – P.2015-2022.
193. Human and mouse perforin are processed in part through cleavage by the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L [Text] / S. Konjar [et al.] // *Immunology.* – 2010. – Vol.131, № 2. – P.257-267.
194. Hydrogen peroxide plays a key role in the oxidation reaction of myoglobin by molecular oxygen - A computer simulation [Text] / T. Wasawa [et al.] // *Biophys. J.* - 1992. - Vol. 63. - P. 544–550.
195. Hypochlorous acid induces apoptosis of cultured cortical neurons through activation of calpains and rupture of lysosomes [Text] / Y.W. Yap [et al.] // *J. Neurochem.* – 2006. – Vol.98. – P. 1597-1609.
196. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase [Text] / K.Y. Lin [et al.] // *Circulation.* – 2002. – Vol.106. – P. 987–992.
197. Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients

[Text] / A. Perna [et al.] // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 69. – P. 869-876.

198. Iskra, R.Ia. Peculiarities of antioxidant defense system in erythroid cells and tissues of pigs under action of chromium chloride [Text] / R.Ia. Iskra, V.V. Vlizlo // *Ukr Biokhim Zh.* – 2013. – Vol.85, № 3. – P.96-102.

199. Jakubowski, H. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites [Text] / H. Jakubowski, R. Głowacki // *Adv. Clin. Chem.* – 2011. – Vol. 55. – P. 81-103.

200. Johansson, E. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana* [Text] / E. Johansson, O. Olsson, T. Nyström // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol.279, № 21. – P.22204-22208.

201. 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.

202. Lai, W.K. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction [Text] / W.K. Lai, M.Y. Kan // *Ann Nutr Metab.* – 2015. – Vol.67, № 1. – P.1-12.

203. L-carnitine and neuroprotection in the animal model of mitochondrial dysfunction [Text] / Z. Binienda [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 2003. – Vol. 993. – P. 289–295.

204. L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide [Text] / N. Andrieu-Abadie [et al.] // *FASEB J.* – 1999. – Vol. 13. – P.1501–1510.

205. Lentz, S.R. Homocysteine: Is it a clinical important cardiovascular risk factor? [Text] / S.R. Lentz, W.G. Haynes // *Clev. Clin. J. Med.* – 2004. – Vol.71. – P. 729-734.

206. Levine, R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease [Text] / R.L. Levine // *Free Radic Biol Med.* – 2002. – Vol.32, № 9. – P.790-796.

207. Levine, R.L. Oxidative modification of proteins during aging [Text] / R.L. Levine, E.R. Stadtman // *Exp Gerontol.* – 2001. – Vol.36, № 9. – P.1495-1502.

208. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans [Text] / A. Lerman [et al.] // *Circulation*. –1998. – Vol. 97. – P. 2123–2128.
209. Lysosomal Labilization [Text] / A. Terman [et al.] // *Iubmb Life*. – 2006. – Vol. 58, № 9. – P.531-539.
210. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis – involvement of Bax? [Text] / K. Kagedal [et al.] // *Int. J. Exp. Pathol*. – 2005. – Vol.86. – P. 309–321.
211. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death [Text] / U. Repnik [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol.1824, № 1. – P.22-33.
212. Madamanchi, N.R. Oxidative stress and vascular disease [Text] / N.R. Madamanchi, A. Vendrov, M.S. Runge // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2005. – Vol.25, № 1. – P.29-38.
213. Madamanchini, N. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes [Text] / N. Madamanchini, Z. Hakim, S. Runge // *Thromb. Haemost.* – 2005. –Vol.3. – P.254-267.
214. Mangoni, A.A. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects [Text] / A.A. Mangoni, S.H. Jackson // *Am J Med*. – 2002. – Vol.112, № 7. – P. 556-565.
215. McCully, K.S. Vasculare pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis [Text] / K.S. McCully // *Am J Pathol*. – 1969. – Vol. 56. – P.111-128.
216. Mechanism of protein decarboxylation [Text] / C.M. Wong [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2013. – Vol.65. – P.1126-1133.
217. Mechanisms of disease: L-arginine in coronary atherosclerosis clinical perspective [Text] / D. Tousoulis [et al.] // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med*. – 2007. – Vol. 4. – P. 274–283.
218. Medina, M. Roles of homocysteine in cell metabolism [Text] / Miguel A. Medina, Jose L. Urdiales, Maria I. Amores-Sanchez // *Eur J Biochem*. – 2001. – Vol. 268. – P. 3871–3882.



219. Michalak, A. The correlations between aging of the human body, oxidative stress and reduced efficiency of repair systems [Text] / A. Michalak, J. Krzeszowiak, I. Markiewicz-Górka // *Postepy Hig Med Dosw (Online)*.- 2014.- Dec 15.
220. Modification of heat shock protein 90 by 4-hydroxynonenal in a rat model of chronic alcoholic liver disease [Text] / D.L. Carbone [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2005. – Vol.315, № 1. – P.8-15.
221. Modification of peptide and protein cysteine thiol groups by conjugation with a degradation product of ascorbate [Text] / P. Kay [et al.]// *Chemical Research in toxicology*.-2013.-Vol.26, №9.-P.1333-1339
222. Molecular characterisation and expression analysis of the cathepsin H gene from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) [Text] / J.W. Kim [et al.] // *Fish Shellfish Immunol.* – 2013. – Vol.35, № 1. – P.188-194.
223. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system [Text] / D. Gatica [et al.] // *Circ Res.* – 2015. – Vol.116, № 3. – P.456-467.
224. Morris, S.I. Arginine metabolism in vascular biology and disease [Text] / S.I. Morris // *Vasc. Med.* – 2005. – Vol. 10. – P. 83.
225. Moskovitz, J. Protein carbonyl and the methionine sulfoxide reductase system [Text] / J. Moskovitz, D.B. Oien // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – Vol.12, № 3. – P.405-415.
226. Muntner, P. The prevalence of nontraditional risk factors for coronary heart disease in patients with chronic kidney disease [Text] / P. Muntner, L. Hamm // *J Intern Med.* – 2004. – Vol. 140, №1. – P. 9–17.
227. Novinec, M. Cysteine cathepsin activity regulation by glycosaminoglycans [Text] / M. Novinec, B. Lenarčič, B. Turk // *Biomed Res Int.* – 2014;2014:309718. doi: 10.1155/2014/309718. Epub 2014 Dec 21.
228. Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells [Text] / S. Tedelind [et al.] // *Biol Chem.* – 2010. – Vol.391, № 8. – P.923-935.
229. Nyström, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence [Text] / T. Nyström // *Embo J.* – 2005. – Vol.24, № 7. – P.1311-1317.

230. Oien, D. Protein-carbonyl accumulation in the non-replicative senescence of the methionine sulfoxide reductase A (msrA) knockout yeast strain [Text] / D. Oien, J. Moskovitz // *Amino Acids.*– 2007. – Vol.32, № 4. – P.603-606.

231. Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men [Text] / S.G. West [et al.] // *J. Nutr.* – 2005. – Vol.135, № 2. – P.212–217.

232. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and-10 in a caspase-9-dependent manner [Text] / E.A. Slee [et al.] // *J. Cell Biol.*– 1999.–Vol.144.– P. 281–292.

233. Over expression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer [Text] / G. Vazquez-Ortiz [et al.] // *BMC Cancer.* – 2005. – Vol.5. – P. 68.

234. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling. [Text] /S.B. Wall [et al.]// *Frontiers in Physiology.*-2012.-Vol.3.-Article 69.

235. Oxidative Modification of Proteins: Oxidation of Tryptophan and Production of Dityrosine in Purified Proteins Using Fenton's [Text] / K.J. Davies [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol.262. – P.9902-9907.

236. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes [Text] / P.A. Grimsrud [et al.] // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol.283,№ 32. – P.21837-21841.

237. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation [Text] / Y. Niu [et al.] // *Free Radic Biol Med.*- 2015.- May.

238. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease [Text] / S. Seshadri [et al.] // *N Engl J Med.* – 2002. – Vol.346, № 7. – P. 476-483.

239. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling [Text] / C.M. Wong [et al.] // *Circ Res.* – 2008. – Vol.102, № 3. – P.310-318.

240. Protein modification in aging [Text] / E.R. Stadtman [et al.] // *EXS.* – 1992. – Vol.62. – P.64-72.

241. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors [Text] / S. Dukan [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol.97, № 11. –

P.5746-5749.

242. Protein oxidation: identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways [Text] / J.E. Plowman [et al.] // Photochemical and Photobiological Sciences.- 2013.- Vol.12, №11.- P.1960-1967.

243. 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 // Clin Exp Hypertens. – 2007. – Vol.29, № 8. – P. 517-530.

244. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury [Text] / K. Hensley [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2000. – Vol.2, №10. – P.1456-1462.

245. Recombinant human cathepsin H lacking the mini chain is an endopeptidase [Text] / O. Vasiljeva [et al.] // Biochemistry. – 2003. – Vol.42, №46. – P. 13522-13528.

246. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine [Text] / M.C. Mutomba [et al.] // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 478. – P. 19– 25.

247. Repnik, U. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges [Text] / U. Repnik, M. Hafner Česen, B. Turk // Mitochondrion. – 2014. – Vol.19 (Pt. A). – P.49-57.

248. Repnik, U. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death [Text] / U. Repnik, B. Turk // Mitochondrion. – 2010. – Vol.10,№ 6. – P.662-669.

249. Sasaki, K. Organelle autoregulation-stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome [Text] / K. Sasaki, H. Yoshida // J Biochem. – 2015. – Vol.157,№ 4. – P.185-195.

250. Schöneich, C. Sulfur Radical-Induced Redox Modifications in Proteins: Analysis and Mechanistic Aspects [Text] / C. Schöneich // Antioxid Redox Signal.- 2016.- Jul 14.

251. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII [Text] / U. Felbor [et al.] // EMBO J. – 2000. – Vol. 19,№6. – P. 1187-1194.

252. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins [Text] / T. Cirman [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P.3578–3587.

253. Selective homocysteine-lowering gene transfer attenuates pressure overload-induced cardiomyopathy via reduced oxidative stress [Text] / I. Muthuramu [et al.] // J Mol Med (Berl).- 2015.- Jun.

254. Selective targeting of tumor and stromal cells by a nanocarrier system displaying lipidated cathepsin B inhibitor [Text] / G. Mikhaylov [et al.] // Angew Chem Int Ed Engl. – 2014. – Vol.53, № 38. – P.10077-10081.

255. Sheeran, F.L. Posttranslational modifications and dysfunction of mitochondrial enzymes in human heart failure [Text] / F.L. Sheeran, S. Pepe // Am J Physiol Endocrinol Metab.- 2016.- Aug.

256. Shelton, P. The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? [Text] / P. Shelton, A.K. Jaiswal // FASEB J. – 2013. – Vol.27, № 2. – P.414-23.

257. Sohal, R.S. Coenzyme Q, oxidative stress and aging [Text] / R.S. Sohal, M.J. Forster // Mitochondrion. – 2007. – Vol.7 (Suppl.). – P.S103-111.

258. Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors [Text] / Y. Suminami [et al.] // Biochem Biophys Res Commun.– 1991.–Vol. 181.– P. 51-58.

259. Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging and age-related diseases [Text] / E.R. Stadtman // Ann N Y Acad Sci. – 2001. – Vol.928. – P.22-38.

260. Stoka, Veronika. Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in Apoptosis [Text] / Veronika Stoka, Boris Turk, Vito Turk // IUBMB Life.- 2005. – Vol. 57, № 4/5. – P.347 – 353.

261. The clinical significance of cathepsin S expression in human astrocytomas [Text] / T. Flannery [et al.] // Am J Pathol. – 2003.– Vol. 163.– P.175–182.

262. The emerging role of cardiovascular risk factor-induced mitochondrial dysfunction in atherogenesis [Text] / P. Puddu [et al.] // Journal of biomedical science. – 2009. – Vol.112. – P. 127-136.

263. The expression and activity of cathepsins D, H and K in asthmatic airways [Text] / A. Faiz [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol.8, № 3. – P.e57245.

264. The immunoregulatory effects of homocysteine and its intermediates on T-lymphocyte function [Text] / H. Dawson [et al.] // Mech Ageing Dev. – 2004. – Vol.125, № 2. – P.107-110.

265. The lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology (PH) and FYVE domains (LAPF), representative of a novel family of PH and FYVE domain-containing proteins, induces caspase-independent apoptosis via the lysosomal-mitochondrial pathway [Text] / W. Chen [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 40 985–40 995

266. The Potential Role of the Proteases Cathepsin D and Cathepsin L in the Progression and Metastasis of Epithelial Ovarian Cancer [Text] / M.Z. Pranjol [et al.] // Biomolecules. – 2015. – Vol.5, № 4. – P.3260-3279.

267. The proinflammatory cytokines interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  promote the expression and secretion of proteolytically active cathepsin S from human chondrocytes [Text] / D. Caglič [et al.] // Biol Chem. – 2013. – Vol.394, № 2. – P.307-316.

268. Upregulation of cathepsin W expressing T cell is specific for autoimmune atrophic gastritis compared to other types of chronic gastritis [Text] / D. Kuester [et al.] // World J Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11. – P. 5951-5957.

269. Victorino, V.J. Post-translational modifications disclose a dual role for redox stress in cardiovascular pathophysiology [Text] / V.J. Victorino, A.L. Mencialha, C. Panis // Life Sci.- 2015.- May 15.

270. Walters, D.M. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2 [Text] / D.M. Walters, H.Y. Cho, S.R. Kleeberger // Antioxid Redox Signal. – 2008. – Vol.10, № 2. – P.321-332.

271. Wu, G. Arginine metabolism in mammals [Text] / G. Wu, S.M. Morris Jr. // Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition / ed.: L.A. Cynober. –Boca Raton: CRC Press, 2004. – P. 153–167.
272. Xu, H. Lysosomal physiology [Text] / H. Xu, D. Ren // Annu Rev Physiol. – 2015. – Vol.77. – P.57-80.
273. Yan, L.J. Analysis of oxidative modification of proteins [Text] / L.J. Yan, R.S. Sohal // Curr Protoc Protein Sci. – 2001. – Chapter 14:Unit14.4. doi: 10.1002/0471140864.ps1404s20.
274. Yang, H.Y. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review [Text] / H.Y. Yang, T.H. Lee // BMB Rep. -2015.- Apr.
275. Yarovaya, G.A. Contact system. New concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions [Text] / G.A. Yarovaya, T.B. Blokhina, E.A. Neshkova // Biochemistry (Mosc). – 2002. – Vol.67, № 1. – P.13-24.