

КУДЛАЕВА АННА МИХАЙЛОВНА

**АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ И
ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ ПРИ IN
VITRO ВОЗДЕЙСТВИИ L-КАРНИТИНА И МОДУЛЯТОРОВ
ГЕНЕРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Рязань – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук, доцент Фомина Мария Алексеевна

Официальные оппоненты:

Шумаев Константин Борисович – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва

Максименко Александр Васильевич – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Отдела биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 г. в _____ ч. на заседании Диссертационного совета Д 001.002.01 при ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» и на сайте www.ion.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Шилина Н.М.

1. Общая характеристика работы

1.1. Актуальность темы

В настоящее время активно изучается внелизосомальная роль лизосомальных гидролаз. В интактных клетках лизосомальные ферменты находятся в латентном состоянии, обусловленном изоляцией их от цитозоля посредством лизосомальной мембраны (Пупышев А.Б., 2011), изменения ее проницаемости приводят к выходу гидролаз в цитозоль с потенциальной атакой внелизосомальных структур (Serrano-Puebla A., 2015). На данный момент особый интерес вызывает пермеабилзация лизосомальных мембран (ПЛМ), при которой выход ферментов во внелизосомальное пространство не сопровождается повреждением ультраструктуры лизосом (Stoka V., 2007; Benes P., 2008; Пупышев А.Б., 2011). Последние годы ознаменованы описанием нового варианта клеточной гибели: ПЛМ-зависимого апоптоза, который ассоциирован с ранней утечкой катепсинов в цитозоль, где они способны активировать клеточную гибель посредством ряда механизмов (Cirman T., 2004; Nagaraj N.S., 2007; Kreuzaler P.A., 2011; Serrano-Puebla A., 2015). В связи с этим обнаружение индукторов и описание механизмов ПЛМ приобрело высокую степень актуальности. В частности, среди факторов ПЛМ рассматривается окислительный стресс (Terman A., 2006; Boya P., 2008), который сопровождает ряд патологий (Butterfield D., 2014), в том числе ассоциированных с апоптозом (De Milito A., 2007; Tonin A., 2012). При этом считается, что мягкий окислительный стресс ведет к ПЛМ и апоптозу, а выраженное действие свободных радикалов - к повреждению мембраны и некрозу (Boya P., 2008), однако механизмы связи окислительного стресса и ПЛМ требуют дальнейшей конкретизации.

Среди существующих методов выявления ПЛМ наиболее перспективным в настоящее время считается измерение активности цистеиновых катепсинов (Repnik U., 2015), поскольку они имеют наименьшие размеры среди других лизосомальных ферментов (Turk V., 2012) и наибольшую вероятность выхода из лизосом через дестабилизированную мембрану (Repnik U., 2015). Кроме того, для определения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ (ЛЦП) существуют специфические субстраты, метод отличается простотой пробоподготовки, стойкостью реагентов, а флуоресценция может быть измерена количественно (Turk V., 2012).

Следует отметить, что выявление ПЛМ на клеточном и тканевом уровне усложняется динамикой биологических систем, поэтому в ходе *in vivo* экспериментов необходимо учитывать функции и целостность других органелл (Repnik U., 2016). Изучение ПЛМ на уровне *in vitro* лишено данного недостатка и позволяет выявить прямое действие потенциальных лизосомотропных соединений.

В этом отношении особый интерес вызывает исследование эффектов L-карнитина и модуляторов генерации оксида азота, поскольку ранее в серии *in vivo* экспериментов была обнаружена способность данных соединений влиять на проницаемость лизосомальной мембраны и активность ЛЦП (Абаленихина

Ю.В., 2015; Арапова А.И., 2017; Ильичёва А.С., 2017). Кроме того, в литературе описаны как антиоксидантные эффекты карнитина хлорида, L-аргинина, нитропруссиды Na и метилового эфира L-N^o-нитроаргинина (L-NAME) (Moosavi M., 2016; Абаленихина Ю.В., 2015; Wallner S., 2001; Kaur G., 2015; Арапова А.И., 2017), так и прооксидантное действие указанных соединений (Wassermann E., 2013; Арапова А.И., 2017; Grossi L., 2005; Абаленихина Ю.В., 2015). Также следует отметить, что в настоящее время значительное внимание уделяется изучению механизмов развития про- и антиапоптогенных эффектов L-карнитина (Roy M.J., 2009; Junli Ye., 2014; Mao Cui-Ying, 2014; Mutomba M.C., 2000) и оксида азота (Дмитренко Н.П., 2005; Douglas D. Thomas, 2015).

На основании накопленных литературных данных была сформулирована гипотеза о том, что карнитина хлорид и модуляторы генерации оксида азота *in vitro* способны изменять проницаемость лизосомальной мембраны, влиять на активность ЛЦП и окислительные процессы в изолированных лизосомах. Исследование описанных эффектов является актуальной задачей, решение которой могло бы внести вклад в понимание механизмов пермеабилзации лизосомальной мембраны и способствовать дальнейшему поиску потенциальных агентов управления апоптозом.

1.2. Цель и основные задачи исследования

Цель исследования: провести комплексную оценку *in vitro* воздействия карнитина и модуляторов генерации оксида азота на процесс карбонилирования белковых молекул, активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и пермеабилзацию мембраны лизосом, выделенных из гомогенатов печени интактных крыс.

Задачи исследования:

1. Описать изменения окислительной модификации белков (ОМБ) в лизосомах печени крыс под *in vitro* влиянием L-аргинина, карнитина хлорида, нитропруссиды Na и метилового эфира L-N^o-нитроаргинина (L-NAME) в динамике воздействия.
2. Изучить изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ (катепсинов В, L и Н) под *in vitro* влиянием L-аргинина, карнитина хлорида, нитропруссиды Na и L-NAME в динамике воздействия.
3. Оценить эффекты изучаемых соединений на степень проницаемости лизосомальной мембраны в динамике воздействия.

1.3. Научная новизна

Впервые произведена комплексная оценка состояния окислительной модификации белков в лизосомах печени крысы в *in vitro* эксперименте. Выявлено прооксидантное действие карнитина хлорида и модуляторов генерации оксида азота при 4-часовом воздействии, сопровождающееся снижением показателя резервно-адаптационного потенциала (РАП). Установлена способность L-аргинина снижать уровень карбонильных производных белков и повышать РАП после 1-часового воздействия.

Впервые обнаружена способность карнитина хлорида и модуляторов генерации оксида азота вызывать подавление активности катепсина Н

изолированных лизосом печени крыс. Показано, что карнитина хлорид, L-NAME и L-аргинин способны повышать общую активность катепсина L, а нитропруссид Na проявляет разнонаправленное действие на данный показатель в зависимости от продолжительности воздействия.

Впервые показана способность L-NAME и карнитина хлорида изменять компартментализацию ЛЦП: *in vitro* действие данных соединений приводит к увеличению доли внелизосомальной активности катепсинов B и L.

Впервые изучено *in vitro* влияние карнитина хлорида и модуляторов синтеза оксида азота на состояние проницаемости лизосомальной мембраны. Обнаружено прямое дестабилизирующее действие L-NAME на мембрану лизосом. Установлено, что *in vitro* действие нитропруссид натрия в целом характеризуется снижением мембранной проницаемости. Показано, что степень изменения проницаемости мембраны под влиянием карнитина хлорида и L-аргинина зависит от продолжительности воздействия.

1.4. Теоретическая значимость и практическая значимость работы

Работа носит преимущественно фундаментальный характер. Полученные экспериментальные данные о влиянии L-карнитина и модуляторов генерации оксида азота на проницаемость лизосомальной мембраны расширяют список соединений, индуцирующих ПЛМ. Комплексная оценка *in vitro* воздействия изучаемых соединений на активность ЛЦП и процесс карбонилирования белковых молекул открывает новые горизонты для исследования механизмов утилизации окислительно модифицированных белков.

Полученные данные об *in vitro* воздействии L-карнитина и модуляторов генерации оксида азота на ПЛМ и активность ЛЦП, неразрывно связанных с запуском клеточной гибели, могут быть использованы для разработки новых подходов к лечению ряда заболеваний, в том числе онкологических и нейродегенеративных.

1.5. Положения, выносимые на защиту

1. Карнитина хлорид и модуляторы генерации оксида азота *in vitro* вызывают изменения окислительного статуса лизосом печени крыс; степень изменения зависит от продолжительности воздействия.
2. Изменения активности цистеиновых катепсинов демонстрируют различия их чувствительности к эффектам карнитина хлорида и модуляторов генерации оксида азота *in vitro*.
3. Характер и степень изменений проницаемости лизосомальной мембраны различны для действующих агентов и зависят от продолжительности воздействия.

1.6. Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов работы подтверждается выбором современных экспериментальных методов, а также соответствующих эксперименту способов статистической обработки данных. Полученные в ходе исследования результаты и выводы корректно обоснованы. Положения теории опираются на известные научные достижения фундаментальных и прикладных дисциплин, сопутствующих предмету исследования диссертации.

Результаты исследования доложены на: XIV межвузовской биохимической научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов н/Д., 2015), Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2015), Российской научно-практической конференции «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), III Всероссийской научной конференции с международным участием «Свободные радикалы, антиоксиданты и старение» (Астрахань, 2016), Всероссийской образовательно-научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2017), Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и лабораторной диагностики» (Ижевск, 2017).

1.7. Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 5 - в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

1.8. Личный вклад соискателя

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

1.9. Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка условных сокращений, списка литературы. Объём работы составляет 141 страницу машинописного текста, содержит 63 рисунка и 13 таблиц. Список литературы содержит 241 источник, из них 37 российских и 204 зарубежных.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Экспериментальные модели *in vitro*

Работа выполнена на 90 суспензиях лизосом, выделенных из гомогенатов печени интактных половозрелых крыс-самок линии Wistar массой 280-330 г. Суспензии лизосом делили на 4 экспериментальные модели:

Экспериментальная модель № 1: 6 суспензий лизосом инкубировали в 2 мл 5 мМ (Li et al., 2012) раствора карнитина хлорида (ФГУ «РКНПК» Минздрава России-ЭПМБП), приготовленного на 0,25 М сахарозе.

Экспериментальная модель № 2: 6 суспензий лизосом инкубировали в 2 мл 0,1 мМ (Шиманская Т.В. и др., 2007) раствора нитропрусида Na (НПО «Биохимреактив», Россия), приготовленного на 0,25 М сахарозе.

Экспериментальная модель № 3: 6 суспензий лизосом инкубировали в 2 мл 5 мМ (Абаленихина Ю.В., 2015) раствора L-аргинина («Sigma», США), приготовленного на 0,25 М сахарозе.

Экспериментальная модель № 4: 6 суспензий лизосом инкубировали в 2 мл 5 мМ (Абаленихина Ю.В., 2015) раствора метилового эфира L-N^ω-нитроаргинина - L-NAME («Sigma», США), приготовленного на 0,25 М сахарозе.

Продолжительность инкубации составляла 1, 2 и 4 часа для каждой экспериментальной модели; инкубацию осуществляли при $t=37^{\circ}\text{C}$ на водяной бане.

Для каждой продолжительности инкубации существовала соответствующая группа контроля: по 6 суспензий лизосом инкубировали в 2 мл 0,25 М раствора сахарозы на водяной бане при $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 1, 2 и 4 часов.

2.2. Методы получения биологического материала

Суспензии лизосом получали методом дифференциального центрифугирования из гомогенатов печени интактных крыс. Далее осуществляли *in vitro* инкубацию с изучаемой субстанцией согласно экспериментальным моделям, после чего лизосомы подвергали окончательному центрифугированию при 20000g в течение 30 мин. Затем надосадочную жидкость (неседиментируемая фракция) отбирали, а осадок (седиментируемая фракция) подвергали ресуспендированию в 2 мл 0,25 М сахарозы с добавлением 0,1% Тритона X-100. Полученные аликвоты замораживали и хранили до момента исследования при температуре -20°C не более 1 месяца.

2.3. Метод оценки окислительной модификации белков

Оценку содержания карбонильных производных белков в седиментируемой фракции проводили по методике R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой (Дубинина Е.Е. и др., 1995) в спонтанном и металл-индуцированном варианте (Дубинина Е.Е., 2006). Метод основан на реакции карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, определяемых спектрофотометрически. Регистрацию и дальнейшую обработку результатов осуществляли в соответствии с патентом РФ №2524667 (Фомина М.А. и др., 2014). По полученным данным рассчитывали площадь под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков (Собщ), складывающуюся из площадей под кривой спектра поглощения альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) (Фомина М.А. и др., 2014). Далее вычисляли доли первичных маркеров окислительного карбонилирования белков (сумма АДНФГ нейтрального и основного характера) и вторичных маркеров (сумма КДНФГ нейтрального и основного характера) по отношению к Собщ (Губский Ю.И. и др., 2005; Фомина М.А. и др., 2014). Резервно-адаптационный потенциал вычисляли по разности между общей площадью под кривой карбонильных производных белков при металл-катализируемом

окислении (принималась за 100%) и при спонтанном окислении, выраженном в процентном соотношении (Никитина Ю.В., Мухина И.В., 2009; Фомина М.А. и др., 2014).

2.4. Метод определения концентрации белка

Определение концентрации белка в неседиментируемой и седиментируемой фракции лизосом проводили по методу Лоури с помощью коммерческого набора НПЦ «Эко-сервис».

2.5. Метод определения активности ЛЦП

Активность катепсинов В, L и Н в неседиментируемой и седиментируемой фракции определяли по Barrett&Kirschke (Barrett A.J., Kirschke H., 1981). Метод основан на регистрации продукта расщепления соответствующих синтетических флуорогенных субстратов 7-амидо-4-метилкумарина. Общую активность фермента (ОА) рассчитывали как сумму активности в седиментируемой (СА) и неседиментируемой фракции (НСА).

2.6. Метод определения активности кислой фосфатазы

В неседиментируемой и седиментируемой фракции активность кислой фосфатазы определяли методом, основанном на фотометрической регистрации продукта ферментативной реакции *n*-нитрофенола. при помощи коммерческого набора «Витал Диагностикс СПб» (Санкт-Петербург),

2.7. Метод оценки степени проницаемости мембраны лизосом

Оценку степени проницаемости мембраны лизосом проводили с помощью коэффициента лабильности (Клаб) для всех изучаемых ферментов, который представляет собой отношение активности кислой гидролазы в неседиментируемой фракции к общей активности фермента (Покровский А.А., Тутельян В.А., 1976).

2.8. Метод определения концентрации метаболитов NO

В седиментируемой фракции лизосом экспериментальной модели №2 измеряли концентрацию метаболитов NO спектрофотометрией в видимой области спектра с использованием реактива Грисса (Метельская В.А., Гуманова Н.Г., 2005).

2.9. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили при помощи программ «Microsoft Office Excel 2016» и «Statistica 10». Использовали непараметрические критерии оценки статистической значимости отличий, такие как U – критерий Манна-Уитни (для парных сравнений независимых групп) и критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони (для сравнений независимых групп нескольких выборок). Оценку ранговой корреляции осуществляли с использованием коэффициента Спирмена. Статистически значимыми считали различия при вероятности нулевой гипотезы об отсутствии различий $p \leq 0,05$. Результаты представляли в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей [Q1; Q3], а также, в некоторых случаях, значений min и max.

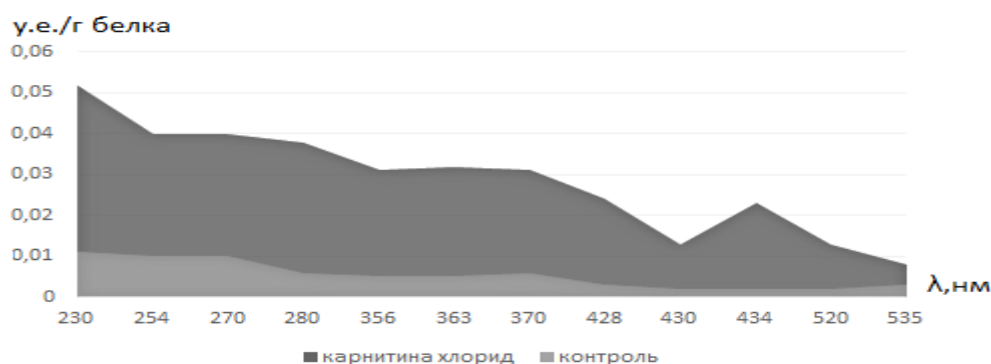
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Состояние окислительного карбонилирования белков, активности и компартиментализации катепсинов В, L, Н и проницаемости лизосомальной мембраны при *in vitro*

воздействии 5 мМ карнитина хлорида

3.1.1. Характеристика окислительного карбонилирования белков под влиянием 5 мМ карнитина хлорида

Оценка влияния 5 мМ карнитина хлорида на окислительное карбонилирование белков лизосом печени крыс показала, что 4-часовая *in vitro* инкубация в присутствии данного соединения сопровождается статистически значимым ростом уровня карбонильных производных по сравнению с контрольными образцами (рисунок 1).



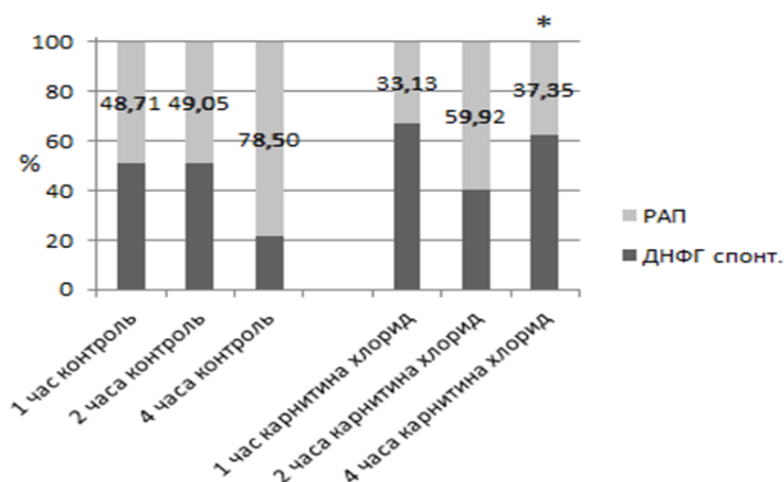
Показатель	Контроль	5 мМ карнитина хлорид	Значение Р
S АДНФГ н.	1,19 [0,73;1,18]	5,23 [3,69;6,27]*	0,005075
S КДНФГ н.	0,31 [0,30;0,46]	1,90 [0,88;2,29]*	0,008239
S АДНФГ о.	0,24 [0,22;0,48]	1,70 [0,79;2,74]*	0,013066
S КДНФГ о.	0,06 [0,04;0,09]	0,26 [0,13;0,39]*	0,013066
S общ.	1,75 [1,65;1,81]	9,93 [5,71;10,83]*	0,005075

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов ($p < 0,05$)

Рисунок 1 - Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков под влиянием 5 мМ карнитина хлорида при 4-часовом *in vitro* воздействии относительно контроля (у.е./г белка), Me [Q1;Q3]

В литературе уже встречались сведения о способности L-карнитина приводить к окислению липидов как *in vivo* (Wassermann E. et al., 2013), так и *in vitro* (Miao-Lin H. et al., 1995). Также ранее была обнаружена способность данного соединения приводить к ОМБ на участке грудной аорты крыс (Арапова А.А., 2017). Однако механизмы прооксидантного действия L-карнитина остаются не изученными.

Кроме того, данная продолжительность воздействия характеризуется статистически значимым падением РАП по сравнению с контрольными образцами (рисунок 2).

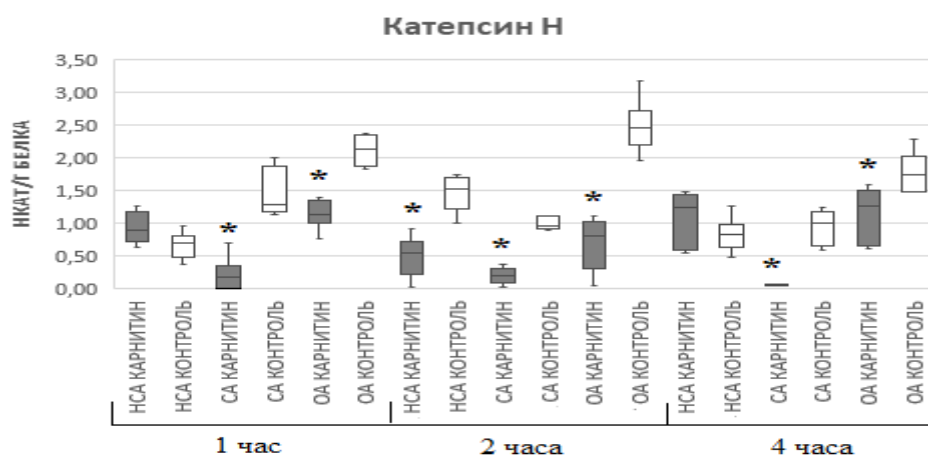


Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 2 - Состояние резервно - адаптационного потенциала суспензии лизосом под влиянием 5 мМ карнитина хлорида на исследуемых интервалах времени, %

3.1.2. Оценка активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ под влиянием 5 мМ карнитина хлорида

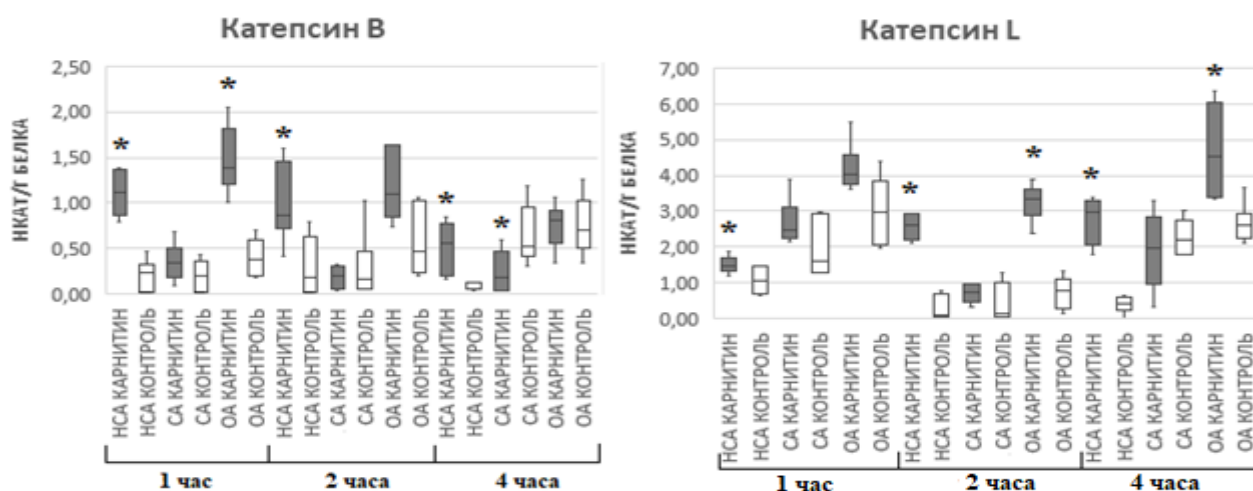
Было обнаружено, что на всех исследуемых временных интервалах *in vitro* инкубации лизосом в среде, содержащей 5 мМ карнитина хлорид, снижается общая активность катепсина Н (рисунок 3) и повышается внелизосомальная активность катепсинов В и L (рисунок 4) по сравнению с соответствующими контрольными образцами. Способность данного соединения влиять на компартиментализацию ЛЦП, для которых известна их роль в апоптозе (Kreuzaler P.A. et al., 2011), может лежать в основе проапоптогенного действия L-карнитина (Roy M.J. et al., 2009).



Примечание: — - медиана; Т - максимум; ⊥ - минимум; □ - Q₁-Q₃

* - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 3 - Изменения активности и распределения катепсина Н под действием 5 мМ карнитина хлорида *in vitro*, нкат/г белка



Примечание: — - медиана; $\top$ - максимум; $\perp$ - минимум; $\square$ - Q_1 - Q_3

* - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 4 - Изменения активности и распределения катепсинов В и L под действием 5 мМ карнитина хлорида *in vitro*, нкат/г белка

3.1.3. Оценка пермеабиллизации мембраны лизосом под влиянием 5 мМ карнитина хлорида

1- и 2-часовое *in vitro* воздействие 5 мМ карнитина хлорида характеризуется снижением Клаб кислой фосфатазы по сравнению с контрольными образцами (таблица 1). Обнаруженное на этом фоне статистически значимое нарастание Клаб катепсина Н после 1 и 2 часов инкубации может быть следствием избирательного увеличения проницаемости мембраны для данного фермента.

Таблица 6 - Влияние 5 мМ карнитина хлорида на проницаемость лизосомальной мембраны во временной динамике, %; Me [Q_1 ; Q_3]

Показатель	1 час		2 часа		4 часа	
	Контроль	Карнитина хлорид	Контроль	Карнитина хлорид	Контроль	Карнитина хлорид
Клаб кат. В	39,09 [9,31;85,23]	74,87 [70,76;78,00]	64,09 [13,72;78,81]	84,12 [76,18;91,42]	10,83 [6,69;13,25]	62,45* [45,19;91,46]
Клаб кат. L	36,22 [33,07;40,70]	37,13 [30,88;40,20]	42,85 [14,65;82,17]	79,38 [▲] [75,36;83,19]	16,85 [11,60;20,56]	55,43* [▲] [53,34;62,10]
Клаб кат. Н	37,36 [25,99;37,45]	86,24* [79,46;97,45]	59,07 [55,16;62,58]	68,44* [65,76;70,42]	50,56 [38,27;54,43]	94,75* × [92,45;96,97]
Клаб КФ	25,28 [18,06;27,25]	9,52* [7,18;12,03]	27,12 [26,35;28,8]	18,06* [▲] [16,95;19,26]	27,62 [24,13;30,22]	41,35* [▲] × [38,64;42,71]

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

[▲] - статистически значимые отличия от 1- часового воздействия ($p < 0,05$)

× - статистически значимые ($p \leq 0,05$) отличия от 2- часового воздействия

Увеличение времени инкубации до 4 часов приводит к общему мембранодестабилизирующему эффекту, проявляющемуся нарастанием как Клаб КФ, так и Клаб изучаемых катепсинов по сравнению с контрольными

образцами. Данный феномен может быть связан с повреждением лизосомальной мембраны за счет окислительной модификации белков в ее составе (Губский Ю.И. и др., 2005). Следует отметить, что сравнительный анализ коэффициента лабильности для кислой фосфатазы в зависимости от продолжительности воздействия карнитина хлорида продемонстрировал рост данного показателя с течением времени, что дает возможность говорить о постепенном повышении проницаемости мембраны лизосом.

3.2. Состояние окислительного карбонилирования белков, активности и компартиментализации катепсинов В, L, Н и проницаемости лизосомальной мембраны при *in vitro* воздействии 0,1 мМ нитропруссид Na

3.2.1. Оценка концентрации метаболитов оксида азота

1 часовая инкубация лизосом в 0,1 мМ нитропруссиде Na характеризуется увеличением уровня метаболитов NO по сравнению с контрольными образцами (таблица 2). Увеличение времени инкубации до 2 и 4 часов не приводит к изменению этого показателя, возможно, из-за короткой продолжительности «жизни» и высокой реакционной способности оксида азота.

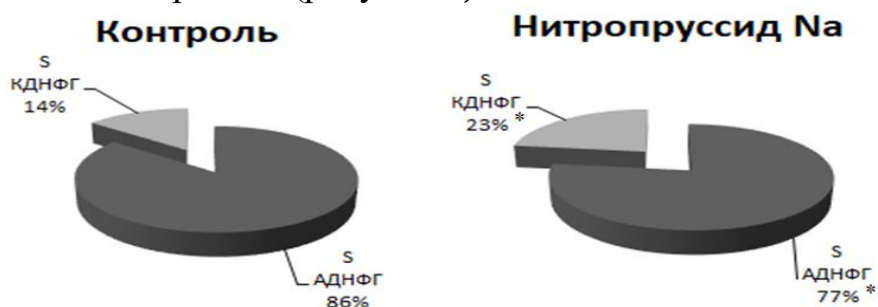
Таблица 2 - Концентрация метаболитов NO в седиментируемой фракции лизосом после *in vitro* воздействия нитропруссид Na, мкмоль/г белка, Me [Q1-Q 3]

Группа	Продолжительность воздействия		
	1 час	2 часа	4 часа
Сахароза (контроль)	716,35 [514,12;831,06]	1029,70 [893,08;1078,49]	1175,32 [1142,43;1285,04]
Нитропруссид Na	1257,06* [1202,56;1340,00]	1046,40 [1023,30;1116,44]	1069,39 [1012,64;1112,60]

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

3.2.2. Характеристика окислительного карбонилирования белков под влиянием 0,1 мМ нитропруссид Na

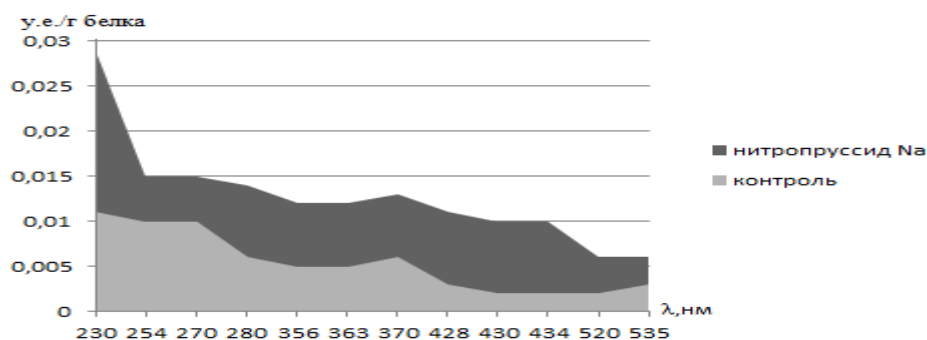
1-часовая инкубация в присутствии 0,1 мМ нитропруссид Na приводит к статистически значимому росту вторичных маркеров ОМБ по отношению к контрольным образцам (рисунок 5).



Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов ($p < 0,05$)

Рисунок 5 - Доля первичных и вторичных маркеров относительно общего содержания карбонильных производных белков лизосом, образующихся при 1-часовом воздействии 0,1 мМ нитропруссид Na

Возможно, NO, сгенерированный после 1 часа инкубации, участвует в образовании активных форм азота, которые приводят к образованию вторичных маркеров окислительной деструкции белков (Hsieh H. et al., 2014). Однако в полной мере прооксидантное действие 0,1 мМ нитропруссид Na проявляется только после 4-часового *in vitro* воздействия (рисунок 6): наблюдается статистически значимый рост общего содержания карбонильных производных белков. Данный эффект проявляется практически на всех изучаемых спектрах поглощения продуктов ОМБ.

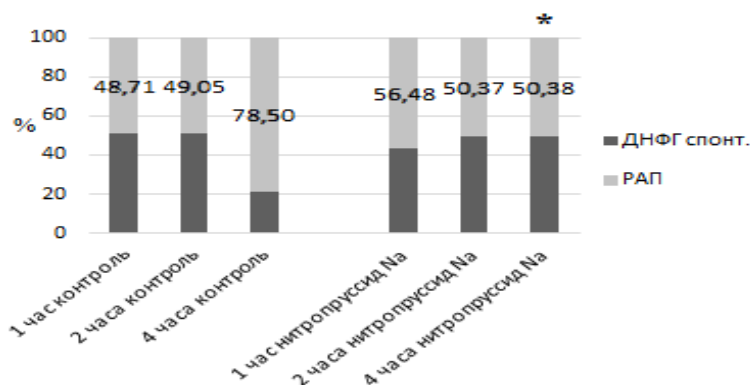


Показатель	Контроль	0,1 мМ нитропруссид натрия	Значение Р
S АДНФГ н.	1,19 [0,73;1,18]	1,95[1,88;2,28]*	0,005075
S КДНФГ н.	0,31 [0,30;0,46]	0,74[0,69;0,88]*	0,013066
S АДНФГ о.	0,24 [0,22;0,48]	0,80[0,65;0,83]*	0,045328
S КДНФГ о.	0,06 [0,04;0,09]	0,14[0,11;0,15]	0,092697
S общ.	1,75 [1,65;1,81]	3,62[3,37;4,10]*	0,008239

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов ($p < 0,05$)

Рисунок 6 - Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков под влиянием 0,1 мМ нитропруссида натрия при 4-часовом *in vitro* воздействии относительно контроля (у.е./г белка), Me [Q1; Q3]

Кроме того, 4-часовая инкубация характеризуется снижением резервно-адаптационного потенциала по сравнению с контрольными образцами (рисунок 7).

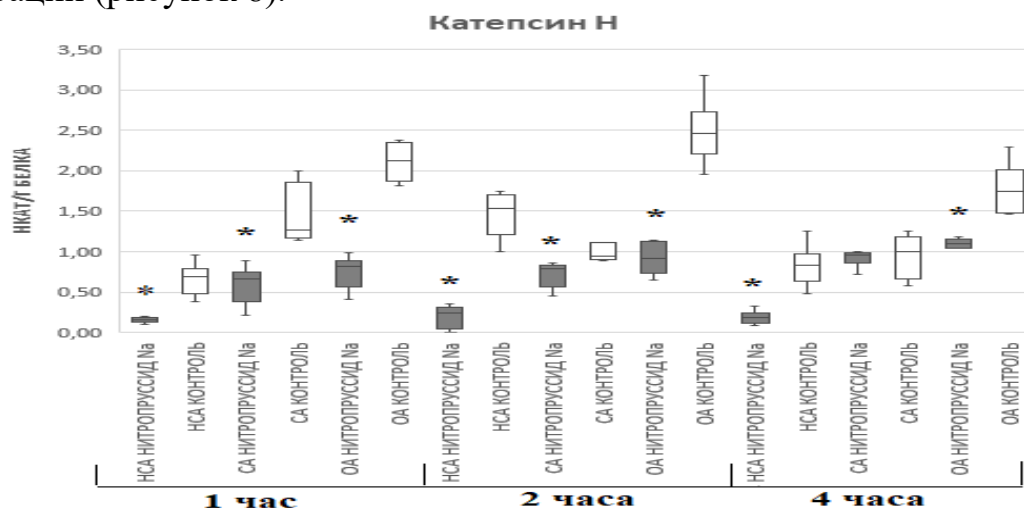


Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 7 - Состояние резервно - адаптационного потенциала суспензии лизосом под влиянием 0,1 мМ нитропруссида натрия на исследуемых интервалах времени, %

3.2.3. Оценка активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ под влиянием 0,1 мМ нитропрусида натрия

После 1 часа *in vitro* воздействия нитропрусида Na происходит падение общей активности катепсина Н, данный эффект сохраняется после 2 и 4 часов инкубации (рисунок 8).

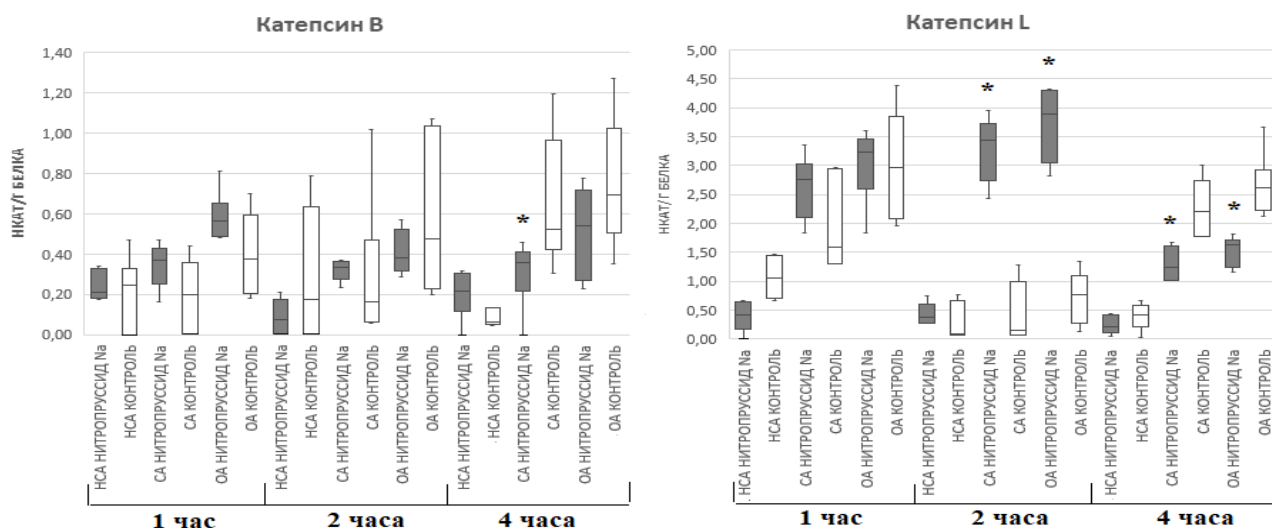


Примечание: — - медиана; Т - максимум; ⊥ - минимум; □ - Q₁-Q₃

* - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 37 - Изменения активности и распределения катепсина Н под действием 0,1 мМ нитропрусида натрия *in vitro*, нкат/г белка

Кроме того, наблюдается статистически значимый рост седиментируемой и общей активности катепсина L после 2 часов инкубации, однако увеличение времени воздействия до 4 часов ведет к падению указанных показателей, а также к падению седиментируемой активности катепсина В (рисунок 9).



Примечание: — - медиана; Т - максимум; ⊥ - минимум; □ - Q₁-Q₃

* - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 9 - Изменения активности и распределения катепсинов В и L под действием 0,1 мМ нитропрусида натрия *in vitro*, нкат/г белка

Следует отметить, что после 4 часа воздействия донора NO наблюдается падение активности всех изучаемых ЛЦП, что может происходить по причине инактивации тиоловых катепсинов продуктами окислительной модификации белков (Zeng J. et al., 2006; Lee J., Giordano S., Zhang J., 2012). С другой стороны, падение активности лизосомальных протеиназ, участвующих в деградации окислительно-модифицированных молекул (Dunlop R., Brunk U., Rodgers K., 2009; Fomina M.A., Abalenikhina Y.V., 2015) может оказаться одним из механизмов падения РАП, наблюдаемого после 4 часовой инкубации в нитропруссиде натрия.

3.2.4. Оценка пермеабилзации мембраны лизосом под влиянием 0,1 мМ нитропруссид натрия

2 и 4 часовое воздействие генератора NO характеризуется статистически значимым снижением Клаб лизосомальной мембраны для кислой фосфатазы, на этом фоне происходит также падение Клаб мембраны для катепсина Н (таблица 3). Также наблюдается падение Клаб катепсина L, но после 1-часового воздействия. Ранее сообщалось о способности 0,1 мМ нитропруссид Na стабилизировать мембраны за счет антиоксидантного действия NO (Kaur G. et al., 2015). Однако в нашем исследовании генератор NO демонстрирует прооксидантные эффекты в отношении белков лизосом после 4 часового действия. Не исключено, что 0,1 мМ нитропруссид Na не влияет на структурные белки лизосомальной мембраны, а образование карбонильных производных происходит за счет окисления других белков лизосом.

Таблица 3 - Влияние 0,1 мМ нитропруссид натрия на проницаемость лизосомальной мембраны во временной динамике, %; Ме [Q₁; Q₃]

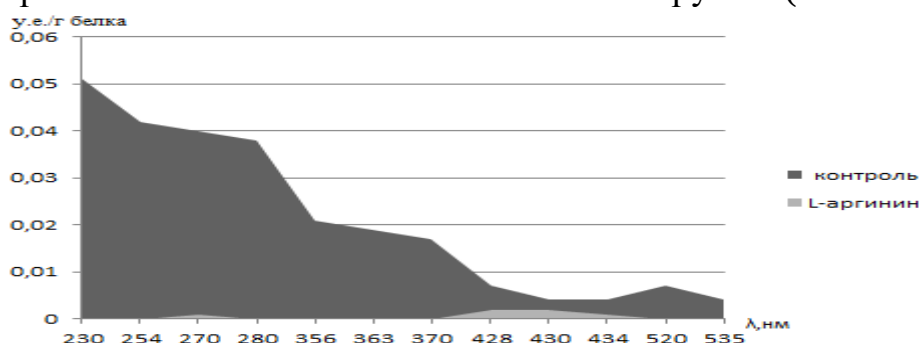
Показатель	1 час		2 часа		4 часа	
	Контроль	0,1 мМ нитропруссид натрия	Контроль	0,1 мМ нитропруссид натрия	Контроль	0,1 мМ нитропруссид натрия
Клаб кат. В	39,09 [9,31;85,23]	39,00 [34,27;41,87]	64,09 [13,72;78,81]	20,93 [2,78;32,26]	10,83 [6,69;13,25]	38,25 [32,71;62,42]
Клаб кат. L	36,22 [33,07;40,70]	12,69* [6,95;18,01]	42,85 [14,65;82,17]	11,00 [8,31;13,85]	16,85 [11,60;20,56]	16,54 [8,66;23,19]
Клаб кат. Н	37,36 [25,99;37,45]	20,39 [17,13;25,54]	59,07 [55,16;62,58]	21,74* [10,87;30,04]	50,56 [38,27;54,43]	16,14* [11,82;17,30]
Клаб КФ	25,28 [18,06;27,25]	16,61 [14,09;19,5]	27,12 [26,35;28,8]	11,48* [11,19;18,31]	27,62 [24,13;30,22]	10,61* [10,44;10,94]

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия (p<0,05)

3.1. Состояние окислительного карбонилирования белков, активности и компартиментализации катепсинов В, L, Н и проницаемости лизосомальной мембраны при *in vitro* воздействии 5 мМ L-аргинина

3.1.1 Характеристика окислительного карбонилирования белков под влиянием 5 мМ L-аргинина

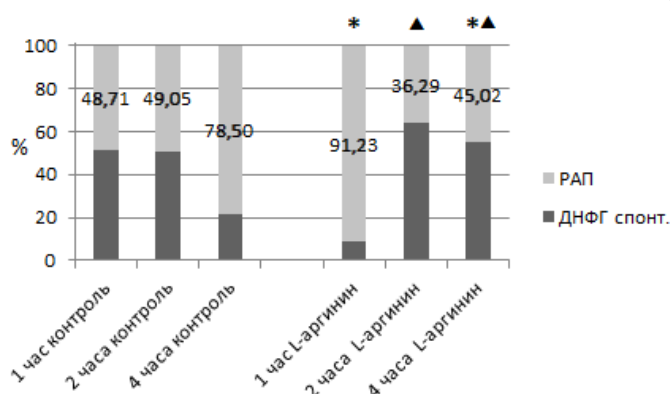
1 часовое действие 5 мМ L-аргинина сопровождается значительным падением уровня окислительной модификации белков (рисунок 10) и увеличением резервно-адаптационного потенциала по сравнению с контрольными образцами (рисунок 11). Полученные нами результаты при данной продолжительности инкубации указывают на наличие прямого антиоксидантного действия у 5 мМ L-аргинина. Данное свойство L-аргинин может проявлять за счет наличия в нем α -аминогруппы (Wallner S. et al., 2001).



Показатель	Контроль	5 мМ L-аргинин	Значение Р
S АДНФГ н.	4,72 [4,38;5,11]	0,17[0,04;0,21]*	0,005075
S КДНФГ н.	0,82 [0,52;1,01]	0,06[0,00;0,12]*	0,004998
S АДНФГ о.	0,59 [0,47;0,79]	0,09[0,00;0,19]*	0,012907
S КДНФГ о.	0,11 [0,09;0,13]	0,01[0,00;0,02]*	0,012907
S общ.	6,38 [5,79;6,97]	0,55[0,01;0,57]*	0,005075

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов ($p < 0,05$)

Рисунок 10 - Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков под влиянием 5 мМ L-аргинина при 1-часовом *in vitro* воздействии относительно контроля (у.е./г белка), Me [Q1;Q3].

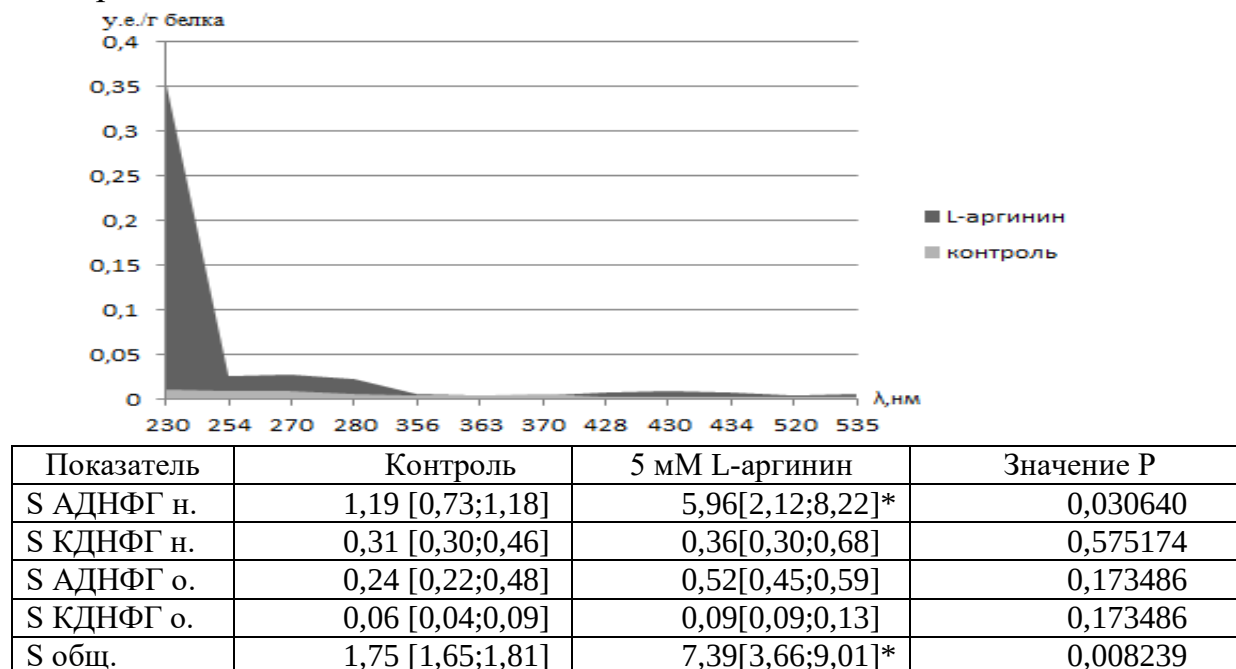


Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от 1 часа воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 11 - Состояние резервно - адаптационного потенциала суспензии лизосом под влиянием 5 мМ L-аргинина на исследуемых интервалах времени, %

Однако увеличение времени воздействия до 4 часов ведет к росту общего уровня карбонильных производных преимущественно за счет АДНФГ нейтрального характера (рисунок 12), а также к падению РАП по сравнению с контрольными наблюдениями (рисунок 11). Таким образом, 5 мМ L-аргинин в зависимости от продолжительности воздействия способен оказывать как анти-, так и прооксидантное действие на белки лизосом.

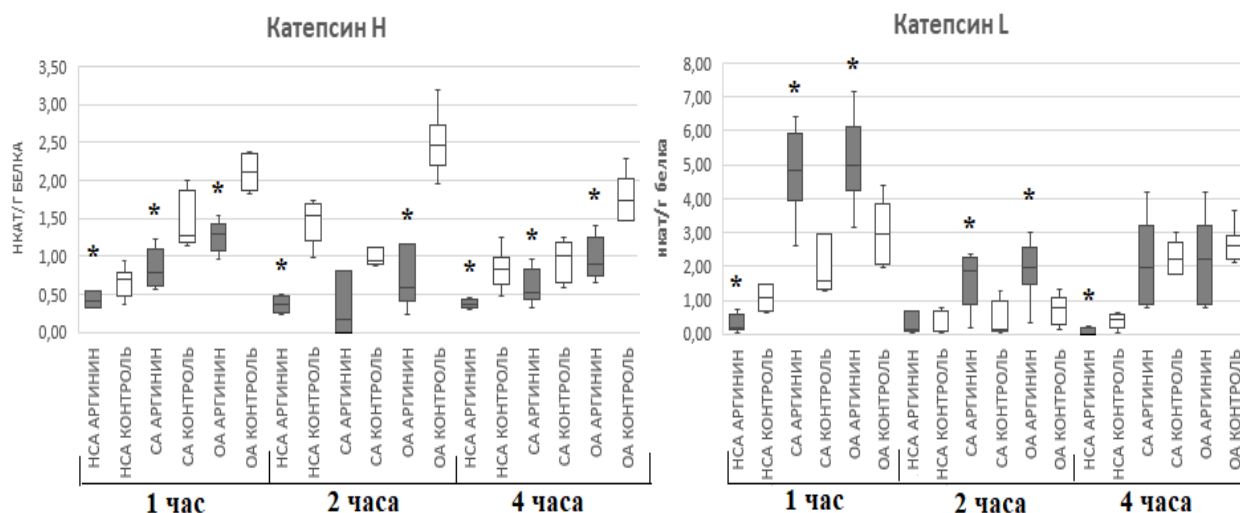


Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов ($p < 0,05$)

Рисунок 12 - Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков под влиянием 5 мМ L-аргинина при 4- часовом *in vitro* воздействии относительно контроля (y.e./г белка), Me [Q1; Q3]

3.2.2. Оценка активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ под влиянием 5 мМ L-аргинина

Наблюдалось стойкое статистически значимое снижение общей активности катепсина Н по сравнению с контрольными образцами после 1-, 2- и 4- часового воздействия и увеличение общей активности катепсина L после 1 и 2 часа инкубации (рисунок 13). В отношении общей активности катепсина В не было обнаружено статистически значимых изменений. Данные явления могут объясняться специфическими особенностями структуры изучаемых протеиназ. Возможно, наличие в структуре катепсина В «окклюзионной петли», загораживающей активный центр фермента (Costa M. et al., 2010), делает его устойчивым к действию L-аргинина. Катепсин L является типичной эндопептидазой без дополнительных структур вблизи активного центра (Turk V. et al., 2012), увеличение седиментируемой и общей активности данного катепсина может указывать на его посттрансляционную активацию под *in vitro* влиянием L-аргинина. Вблизи активного центра катепсина Н имеется специфический октапептид, называемый «мини-цепью» (Jevnikar Z., Kos J., 2008). Возможно L-аргинин способен специфически связываться с данной структурой, что приводит к снижению активности фермента.



Примечание: — - медиана; Т - максимум; ⊥ - минимум; □ - Q₁-Q₃

* - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 13 - Изменения активности и распределения катепсинов Н и L под действием 5 мМ L-аргинина *in vitro*, нкат/г белка

3.2.3. Оценка пермеабилзации мембраны лизосом под влиянием 5 мМ L-аргинина

После 1 часа инкубации наблюдается рост Клаб для кислой фосфатазы как относительно контрольных наблюдений, так и по отношению к данному показателю при 2 и 4 часовом воздействии (таблица 4). Однако увеличение времени инкубации до 2 и 4 часов ведет к снижению проницаемости мембраны для кислой фосфатазы по сравнению с контрольными образцами.

Таблица 4 - Влияние 5 мМ L-аргинина на проницаемость лизосомальной мембраны во временной динамике, %; Me [Q₁; Q₃]

По-каза-тель	1 час		2 часа		4 часа	
	Контроль	L-аргинин	Контроль	L-аргинин	Контроль	L-аргинин
Клаб кат. В	39,09 [9,31;85,23]	38,08 [27,86;86,24]	64,09 [13,72;78,81]	3,11 [0,15;76,40]	10,83 [6,69;13,25]	22,44* [20,86;80,91]
Клаб кат. L	36,22 [33,07;40,70]	4,63* [3,92;10,1]	42,85 [14,65;82,17]	14,11 [6,32;34,20]	16,85 [11,60;20,56]	0,00 [0,00;5,47]*
Клаб кат. Н	37,36 [25,99;37,45]	34,96 [27,19;42,45]	59,07 [55,16;62,58]	76,42 [50,22;100,00]	50,56 [38,27;54,43]	38,81 [36,17;42,84]
Клаб КФ	25,28 [18,06;27,25]	38,01* [35,32;43,25]	27,12 [26,35;28,8]	14,46*▲ [13,34;23,11]	27,62 [24,13;30,22]	20,87*▲ [19,73;21,78]

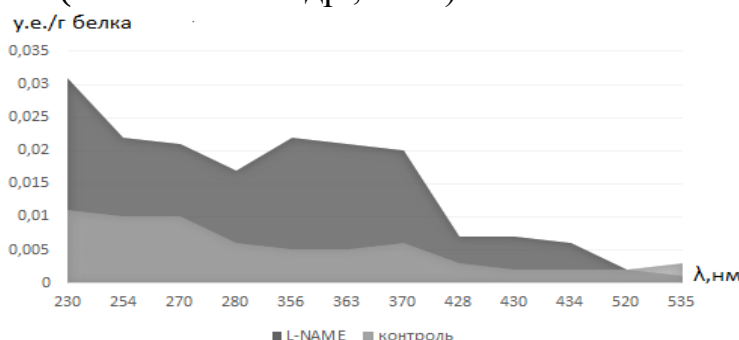
Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимые отличия от 1-часового воздействия ($p < 0,05$)

3.4. Состояние окислительного карбонилирования белков, активности и компартментализации катепсинов В, L, Н и проницаемости лизосомальной мембраны при *in vitro* воздействии 5 мМ L-NAME

3.4.1. Характеристика окислительного карбонилирования белков под влиянием 5 мМ L-NAME

После 4 часового *in vitro* действия 5 мМ L-NAME происходит статистически значимое увеличение карбонильных производных белков за счет роста уровня АДНФГ и КДНФГ нейтрального характера (рисунок 14). Это дает основание предполагать, что 5 мМ L-NAME проявляет прооксидантное действие в отношении белков лизосом за счет окисления нейтральных аминокислот. Ранее данное свойство L-NAME было обнаружено в *in vivo* эксперименте (Теплов С.А. и др., 2016).

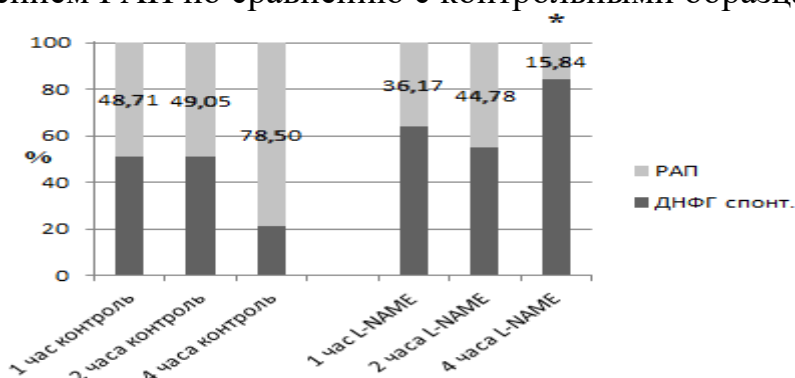


Показатель	Контроль	5 мМ L-NAME	Значение Р
S АДНФГ н.	1,19 [0,73;1,18]	2,83 [1,98;5,21]*	0,005075
S КДНФГ н.	0,31 [0,30;0,46]	0,93 [0,78;1,06]*	0,008239
S АДНФГ о.	0,24 [0,22;0,48]	0,39 [0,26;0,58]	0,471171
S КДНФГ о.	0,06 [0,04;0,09]	0,05 [0,02;0,08]	0,297954
S общ.	1,75 [1,65;1,81]	4,27 [3,00;6,82]*	0,013066

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов ($p < 0,05$)

Рисунок 14 - Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков под влиянием 5 мМ L-NAME при 4-часовом *in vitro* воздействии относительно контроля (y.e./г белка), Me [Q1;Q3]

Данная продолжительность воздействия также характеризуется снижением РАП по сравнению с контрольными образцами (рисунок 15).

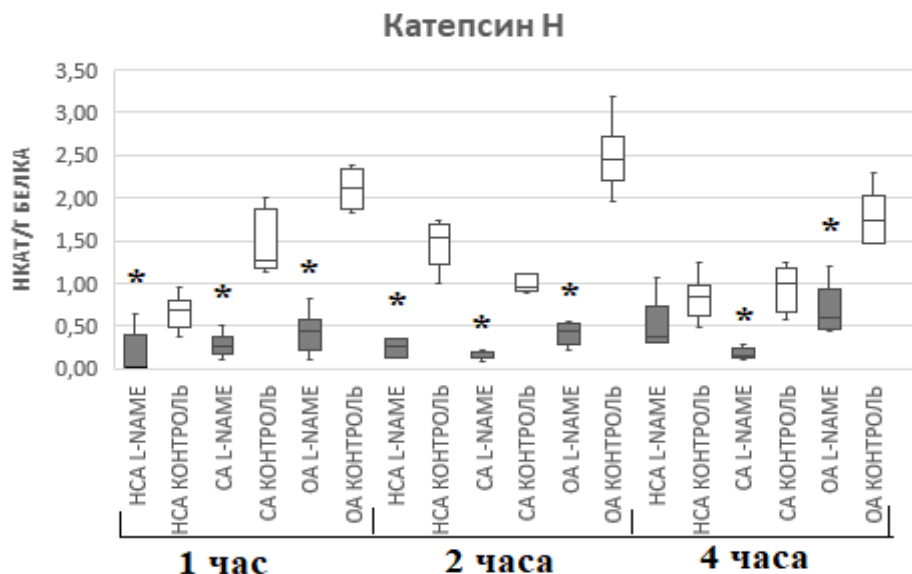


Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 15 - Состояние резервно - адаптационного потенциала суспензии лизосом под влиянием 5 мМ L-NAME на исследуемых интервалах времени, %

3.4.2. Оценка активности лизосомальных цистеиновых протеиназ под влиянием 5 мМ L-NAME

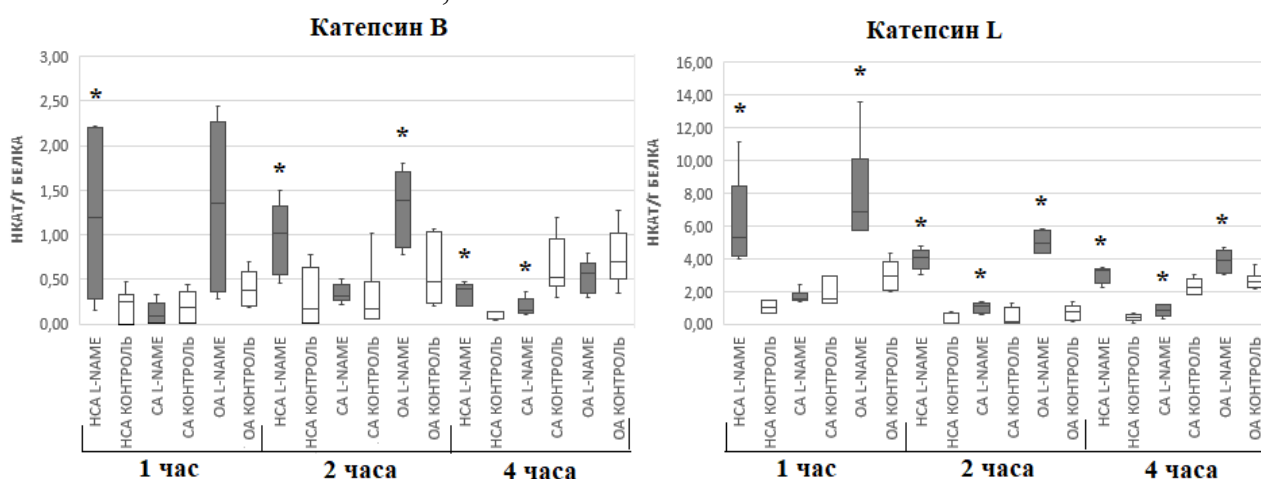
Под влиянием 5 мМ L-NAME был обнаружен стойкий ингибирующий эффект в отношении катепсина Н (рисунок 16) и увеличение общей активности катепсина L на протяжении всего времени инкубации (рисунок 17). Также было обнаружено свойство 5 мМ L-NAME увеличивать неседиментируемую активность катепсинов В и L. Увеличение активности данных катепсинов может происходить за счет посттрансляционной протеолитической активации, а также для них описан механизм аутокаталитической активации (Turk V. et al., 2012).



Примечание: — - медиана; Т - максимум; ⊥ - минимум; □ - Q₁-Q₃

* - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 16 - Изменения активности и распределения катепсина Н под действием 5 мМ L-NAME *in vitro*, нкат/г белка



Примечание: — - медиана; Т - максимум; ⊥ - минимум; □ - Q₁-Q₃

* - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия ($p < 0,05$)

Рисунок 17 - Изменения активности и распределения катепсинов В и L под действием 5 мМ L-NAME *in vitro*, нкат/г белка

3.4.3. Оценка пермеабиллизации мембраны лизосом под влиянием 5 мМ L-NAME

После 1 и 2 часа инкубации в L-NAME наблюдается статистически значимый рост Клаб лизосомальной мембраны для кислой фосфатазы (таблица 5), увеличение времени воздействия до 4 часов приводит к признакам общей дестабилизации мембраны с выходом кислой фосфатазы и всех изучаемых ЛЦП во внелизосомальное пространство, причем для катепсина L данная тенденция наблюдается уже после 1-часовой инкубации. Ранее аналогичные эффекты L-NAME проявлял в тимусе и селезенке крыс, при этом в тимусе не наблюдалось снижения концентрации метаболитов NO (Абаленихина Ю.В., 2015). Полученные нами данные указывают на то, что вышеописанные эффекты L-NAME может проявлять за счет своего прямого мембраноповреждающего действия, не связанного с ингибированием NO-синтаз.

Таблица 5 - Влияние 5 мМ L-NAME на проницаемость лизосомальной мембраны во временной динамике, %; Ме [Q₁; Q₃]

По- ка- за- тель	1 час		2 часа		4 часа	
	Контроль	5 мМ L-NAME	Контроль	5 мМ L-NAME	Контроль	5 мМ L-NAME
Клаб кат. В	39,09 [9,31;85,23]	87,19 [74,96;97,77]	64,09 [13,72;78,81]	70,98 [65,60;80,95]	10,83 [6,69;13,25]	62,39* [57,14;70,09]
Клаб кат. L	36,22 [33,07;40,70]	77,17* [75,18;81,49]	42,85 [14,65;82,17]	79,83 [73,93;85,09]	16,85 [11,60;20,56]	76,66* [74,12;80,30]
Клаб кат. Н	37,36 [25,99;37,45]	14,68 [0,00;37,42]	59,07 [55,16;62,58]	58,10 [57,59;63,36]	50,56 [38,27;54,43]	72,88* [67,16;73,17]
Клаб КФ	25,28 [18,06;27,25]	43,55* [42,34;45,46]	27,12 [26,35;28,8]	51,87* [▲] [50,29;52,60]	27,62 [24,13;30,22]	55,14* [▲] [54,23;56,05]

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольных образцов с соответствующей продолжительностью воздействия (p<0,05)

[▲] - статистически значимые отличия от 1-часового воздействия (p<0,05)

3.5. Анализ ранговой корреляции

Анализ ранговой корреляции между уровнем карбонильных производных с активностью ЛЦП и стабильностью лизосомальной мембраны проводили отдельно для каждого изучаемого соединения (таблица 6).

Обнаружены обратные корреляционные связи между общим уровнем карбонильных производных и:

- проницаемостью лизосомальной мембраны для кислой фосфатазы, седиментируемой и общей активностью катепсина L для 5 мМ L-аргинина;
- седиментируемой активностью катепсина В для 5 мМ L-NAME;
- проницаемостью лизосомальной мембраны для катепсина Н для 0,1 мМ нитропруссиды Na.

Также существует прямая корреляционная связь между общим уровнем карбонильных производных с неседиментируемой и общей активностью катепсина L при *in vitro* воздействии 5 мМ карнитина хлорида.

Таблица 6- Показатели корреляционной связи между общим содержанием карбонильных производных белков (Собщ) с состоянием лизосомальной мембраны и активностью ЛЦП

Собщ	Аргинин		Карнитин		L-NAME		Нитропруссид Na	
	Spearman	p-value	Spearman	p-value	Spearman	p-value	Spearman	p-value
Клаб КФ	-0,36	0,03	0,13	0,47	0,08	0,64	-0,11	0,52
Клаб Н	-0,05	0,76	0,32	0,06	-0,16	0,36	-0,33	0,05
СА В	-0,05	0,80	-0,14	0,43	-0,48	0,003	-0,29	0,09
НСА L	-0,11	0,51	0,40	0,01	0,29	0,09	0,21	0,21
СА L	-0,43	0,01	0,20	0,25	0,04	0,82	0,04	0,81
ОА L	-0,39	0,02	0,39	0,02	0,23	0,18	0,16	0,35

ВЫВОДЫ

1. На модели *in vitro* обнаружена способность L-аргинина, карнитина хлорида, нитропруссид натрия и метилового эфира L-N^ω-нитроаргинина (L-NAME) индуцировать нарастание общего уровня карбонильных производных белков в лизосомах печени крыс после 4 часов воздействия (на 322%, p=0,008; 467%, p=0,005; 107%, p=0,008 и 144%, p=0,013 соответственно).
2. Выявлено, что краткосрочное (1 час) воздействие L-аргинина на лизосомы печени крыс вызывает антиоксидантный эффект, проявляющийся снижением общего содержания окислительно модифицированных белков лизосом относительно контрольных наблюдений (0,55[0,01;0,57] против 6,38 [5,79;6,97]; p=0,005).
3. Обнаружено, что L-аргинин, карнитина хлорид, нитропруссид натрия и L-NAME вызывают стойкое статистически значимое подавление общей активности катепсина Н на 37-459%, формирующееся начиная с 1 часа воздействия. Общая активность катепсина L при этом преимущественно повышается на 12-529%.
4. Установлена способность L-NAME вызывать лабильзацию лизосомальных мембран, что проявлялось повышением доли внелизосомальной активности кислой фосфатазы на 72-100%, начиная с 1 часа воздействия. Карнитина хлорид проявляет аналогичный эффект после 4 часов инкубации, при этом воздействие в течение 1 и 2 часа вызывает пермеабиллизацию лизосомальных мембран: индивидуальная проницаемость для катепсина Н повышается на 131% и 16% соответственно.
5. Показано, что L-аргинин и нитропруссид натрия вызывают снижение проницаемости лизосомальной мембраны после 2- и 4- часового воздействия (уменьшение доли внелизосомальной активности кислой фосфатазы составляет от 24 до 62%). При этом действие L-аргинина в течение 1 часа оказалось ассоциировано с признаками лабильзации лизосомальной мембраны: увеличение доли внелизосомальной активности кислой фосфатазы составило 150% по отношению к контрольным наблюдениям.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах,
рекомендованных Высшей аттестационной комиссией

Минобрнауки России:

1. Фомина, М.А. Влияние L-аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ в эксперименте и при стимуляции оксидативного стресса *in vitro* [Текст] / М.А. Фомина, А.М. Кудлаева // **Казанский медицинский журнал**. – 2015. – Т. 96. № 5. – С. 876-882. (0,62 печ.л.)
2. Фомина, М.А. Влияние L-карнитина *in vitro* на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и состояние лизосомальной мембраны [Текст] / М.А. Фомина, А.М. Кудлаева, А.Н. Рябков // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова**. – 2017. – Т. 25. № 1. – С. 14-20. (0,44 печ.л.)
3. Кудлаева, А.М. Влияние L-аргинина и L-карнитина на окислительную модификацию лизосомальных белков печени крыс [Текст] / А.М. Кудлаева, М.А. Фомина, С.А. Исаков // **Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле**. – 2017. – Т. 27. № 3. – С. 368-374. (0,88 печ.л.)
4. Фомина, М.А. Влияние L-N^ω-нитроаргинина метилового эфира и нитропруссиды натрия *in vitro* на окислительную модификацию белков лизосом печени крыс [Текст] / М.А. Фомина, А.М. Кудлаева, С.А. Исаков, А.Н. Рябков // **Казанский медицинский журнал**. – 2017. – Т. 98. № 6. – С. 1005-1011. (0,62 печ.л.)
5. Фомина, М.А. *In vitro*-эффекты нитропруссиды натрия и L- N^ω - нитроаргинина метилового эфира (L-NAME) на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемость мембраны лизосом [Текст] / М.А. Фомина, А.М. Кудлаева, С.А. Исаков, В.В. Давыдов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. - 2018. - № 1. – С.43-46. (0,48 печ.л.)

Материалы научных конференций

1. Фомина М.А. Изучение *in vitro*-воздействия L-аргинина на лизосомальный цистеиновый протеолиз изолированно и на фоне оксидативного стресса [Текст] / М.А. Фомина, А.М. Кудлаева // Обмен веществ при адаптации и повреждении (Дни молекулярной медицины на Дону): материалы XIV Российской научно-практической конференции с международным участием (Ростов-на-Дону, 15-16 мая 2015 г.) /под ред. З.И. Микашинович. – Ростов-на-Дону: ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России. - 2015. – С.117-121. (0,31 печ.л.)
2. Кудлаева А.М. Изучение *in vitro*-воздействия L-аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ изолированно и при стимуляции оксидативного стресса [Текст] / А.М. Кудлаева, М.А. Фомина // Материалы Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» / редкол.: Р.Е. Калинин, В.А. Кирюшин, И.А. Сучков; ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. – Рязань: РИО РязГМУ. - 2015. – С.146. (0,06 печ.л.)

3. Фомина М.А. Влияние L-карнитина *in vitro* на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и состояние лизосомальной мембраны на фоне оксидативного стресса [Текст] / М.А. Фомина, **А.М. Кудлаева** // Свободные радикалы, антиоксиданты и старение: сборник статей III Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной юбилею заслуженного работника высшей школы РФ, доктора биологических наук, профессора Д.Л. Теплого (г. Астрахань, 2-3 ноября 2016 г.) / составители: Е.И. Кондратенко, Е.В. Курьянова, А.В. Трясучев, А.С. Чумакова; Астрахань: Астраханский государственный университет, издательский дом «Астраханский университет», 2016.– С. 107-108. (0,13 печ.л.)
4. **Кудлаева А.М.** Изучение *in vitro*-воздействия L-NAME на лизосомальный цистеиновый протеолиз изолированно и на фоне оксидативного стресса [Текст] / А.М. Кудлаева, М.А. Фомина // Материалы ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова / РязГМУ. - Рязань, 2016. - С.29-32. (0,23 печ.л.)

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДНФГн. – альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера
АДНФГо. – альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера
Кат. – катепсин
КДНФГн. – кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера
КДНФГо. – кетон-динитрофенилгидразоны основного характера
Клаб – коэффициент лабильности
КФ – кислая фосфатаза
ЛЦП – лизосомальные цистеиновые протеиназы
НСА – неседиментируемая, внелизосомальная активность
ОА – общая активность
ОМБ – окислительная модификация белков
ПЛМ – пермеабиллизация лизосомальной мембраны
РАП – резервно-адаптационный потенциал
СА – седиментируемая, лизосомальная активность
L-NAME – метиловый эфир L-N^ω-нитроаргинина
Собщ – общий уровень карбонильных производных белков